



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

REBECA SOUZA VENTURA MARANHÃO

EFEITO DE ANÁLOGOS DA DINOPONERATOXINA M-PONTXDq3a SOBRE
CEPAS DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

FORTALEZA
2024

REBECA SOUZA VENTURA MARANHÃO

EFEITO DE ANÁLOGOS DA DINOPONERATOXINA M-PONTXDq3a SOBRE
CEPAS DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Alice Maria Costa Martins.

Coorientadora: Dr.^a Danya Bandeira Lima.

FORTALEZA

2024

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)

- M26e Maranhão, Rebeca Souza Ventura.
Efeito de análogos da dinoponeratoxina M-PONTXDQ3a sobre cepas de bactérias gram-negativas / Rebeca Souza Ventura Maranhão. – 2024.
60 f.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2024.
Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.
Coorientação: Profa. Dra. Danya Bandeira Lima.
1. *Dinoponera quadriceps*. 2. Infecções bacterianas. 3. Peptídeos antimicrobianos. 4. Resistência antimicrobiana. I. Título.

REBECA SOUZA VENTURA MARANHÃO

EFEITO DE ANÁLOGOS DA DINOPONERATOXINA M-PONTXDQ3A SOBRE
CEPAS DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

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

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a Carolina Sidrim de Paula Cavalcante
Centro Universitário 7 de setembro – UNI 7

Prof^a Dr^a Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle
Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA (Sobral)

AGRADECIMENTOS

A Deus que em sua infinita bondade cuidou de mim em todos os momentos, zelou pela minha família, pela minha vida e pela de todos que amo, em todos os passos que dei, pessoas que encontrei e me ajudaram, eu vejo a mão de Deus. Pai, muito obrigada por tua misericórdia e amor imensurável.

À minha família que me concedeu uma boa base nos estudos e na vida.

À minha mãe, Eliane Ventura, a senhora é uma mulher forte, eu à admiro por todas suas escolhas e agradeço por todos os seus esforços.

À minha avó, Enoi Ventura, que cuidou de mim como uma filha, me ensinou a ler, me colocou nos braços e nunca mais soltou, não estaria aqui se não fosse o seu cuidado.

Às minhas tias, Evanisa Ventura e Eloisa Ventura, que não tinham obrigação de fazer nada por mim, mas fizeram tudo por amor, sem esperar nada em troca, me dando o maior exemplo de generosidade e amor. Vocês são meus espelhos de profissionais, educadoras, líderes e sinônimos de caridade e amor. Tenho orgulho de contar como fui criada por vocês.

Ao meu esposo, Davi Paiva, por me apoiar em todas as minhas escolhas, me encorajar, acreditar no meu potencial, enxugar minhas lágrimas nos momentos de desespero e construir um ambiente seguro pra mim sempre que eu me perdia e me ajudar a encontrar soluções.

À minha amiga, Lôhanna Moreira, por me apoiar emocionalmente nos momentos que estive mais pra baixo e sempre conseguir me estimular a ser uma pessoa melhor.

À Universidade Federal do Ceará por todo o apoio técnico e financeiro nessa jornada.

À Professora, Alice Martins, que me acolheu no seu laboratório, por sempre ver em mim muito mais do que eu mesmo conseguia enxergar e me impulsionar a ser melhor.

À Danya Lima por todo o apoio técnico e científico nessa jornada.

À Carolina Sidrim que apareceu como um anjo no momento que eu mais precisei durante o mestrado e abriu meus horizontes.

À Professora Raquel Fontenelle que me acolheu em Sobral, abriu as portas do seu laboratório pra mim, foi gentil e profissional. Admiro muito sua postura e generosidade.

À Lídia e à Ingrid por todo o apoio nos experimentos em Sobral, pela acolhida calorosa e desenvolvimento científico. Vocês fazem parte desse trabalho.

À Rosemeire florêncio por toda a ajuda e compreensão nos momentos que precisei durante o mestrado. Admiro muito seu trabalho e trajetória.

Aos meus colegas Robson Colares e Sávio Araújo por todo o apoio nos momentos que precisei resolver algo relacionado ao mestrado. Há pessoas que nos ajudam, sem precisar entender o que o outro passa, ajudam porque querem e por serem boas pessoas, mas não sabem o quanto isso significa para o outro. Eu sempre lembrarei disso. O que fizeram por mim é o verdadeiro sinônimo de bondade e generosidade.

À FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro concedido durante os dois anos de mestrado, o que possibilitou a mobilidade acadêmica e a realização deste trabalho.

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”

(Josué 1:9)

RESUMO

A resistência antimicrobiana é um problema de saúde no Brasil e no mundo e as bactérias gram-negativas têm destaque, considerando que são frequentemente encontradas em infecções hospitalares (54,8%), acompanhadas por bactérias gram-positivas (23,8%) e leveduras (21,4%). Neste contexto, é sabido que os venenos de animais são importantes fontes de peptídeos antimicrobianos. A formiga *Dinoponera quadriceps* é uma das maiores formigas venenosas da terra, seu veneno é uma rica mistura de peptídeos antimicrobianos. No presente estudo, foi investigado a atividade antimicrobiana de M-PONTX-Dq3a e oito análogos sintéticos substituídos por arginina e lisina em posições estratégicas na molécula, contra bactérias gram-negativas, sendo elas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosas*. Para isto, foram realizados ensaios para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) através do ensaio de microdiluição em caldo, sinergismo *in vitro* com antimicrobianos disponíveis no mercado pelo método de *checkerboard*, avaliação do potencial hemolítico dos peptídeos e toxicidade renal sob células de linhagem renal humanas do tipo HK-2. Os peptídeos que apresentaram maior efeito antimicrobiano para as cepas ATCC e clínicas testadas foram [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15], atingindo valores de CIM e CLM de 1,56 µM para cepa ATCC e 0,19 µM para cepa clínica. A bactéria que apresentou maior sensibilidade a estes peptídeos foi a *E. coli* ATCC 25922 e clínica. O peptídeo [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] apresentou um perfil bactericida e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] apresentou um perfil bactericida e bacteriostático. Foi obtido efeito sinérgico entre ciprofloxacino com [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] sob *E. coli* ATCC 25922, reduzindo em até 4x a concentração do antibiótico, mostrando que são peptídeos promissores para combinações com outros antimicrobianos utilizados no mercado. Assim, como apresentaram maior efeito terapêutico, os peptídeos modificados [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15], também obtiveram resultados evidenciando seu efeito citotóxico aos eritrócitos e as células renais humanas, podendo haver benefício da nanotecnologia em estudos posteriores que possam auxiliar no desenvolvimento de uma molécula mais direcionada ao alvo terapêutico, que tenha efeito antimicrobiano pronunciado e efeitos colaterais reduzidos.

Palavras-chave: *Dinoponera quadriceps*; Infecções bacterianas; Peptídeos antimicrobianos; Resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a health problem in Brazil and around the world, gram-negative bacteria stand out at this point, considering that they are microorganisms normally found in hospital infections (54.8%), accompanied by gram-positive bacteria (23.8%) and yeasts (21.4%). In this context, it is known that the venoms of venomous animals are important sources of antimicrobial peptides. The ant *Dinoponera quadriceps* is one of the largest poisonous ants on earth, its venom is a rich mixture of antimicrobial peptides. In the present study, the antimicrobial activity of M-PONTX-Dq3a and eight synthetic analogues substituted by arginine and lysine in strategic positions in the molecule was investigated against gram-negative bacteria, namely *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosas*. For this, tests were carried out to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) through the broth microdilution test, in vitro synergism with commercially available antimicrobials using the checkerboard method, evaluation of the hemolytic potential of the peptides and renal toxicity under renal lineage cells. human HK-2 type. The peptides that showed the greatest antimicrobial effect for the ATCC and clinical strains tested were [Arg]3 M-PONTX-Dq3a[1–15] and [Arg]4 M-PONTX-Dq3a[1–15], reaching MIC and CLM of 1.56 μ M for ATCC strain and 0.19 μ M for clinical strain. The bacteria that showed the greatest sensitivity to these peptides was *E. coli* ATCC 25922 and clinical. The peptide [Arg]3 M-PONTX-Dq3a[1–15] presented a bactericidal profile and [Arg]4 M-PONTX-Dq3a[1–15] presented a bactericidal and bacteriostatic profile. A synergistic effect was obtained between ciprofloxacin with [Arg]3 M-PONTX-Dq3a[1–15] and [Arg]4 M-PONTX-Dq3a[1–15] under *E. coli* ATCC 25922, managing to reduce the concentration by up to 4x of the antibiotic, showing that they are promising peptides for combinations with other antimicrobials that are already used on the market. Thus, as they presented a greater therapeutic effect, the modified peptides [Arg]3 M-PONTX-Dq3a[1–15] and [Arg]4 M-PONTX-Dq3a[1–15] also obtained results demonstrating their cytotoxic effect on erythrocytes and human kidney cells, and there may be benefits from nanotechnology in subsequent studies that can assist in the development of a molecule more directed to the therapeutic target, which has a pronounced antimicrobial effect and reduced side effects.

Keywords: *Dinoponera quadriceps*; Bacterial infections; Antimicrobial peptides; Antimicrobial resistance.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – PAMs que apresentaram efeito antimicrobiano relevante descritos em literatura.....	21
Tabela 2 – Propriedades físico-químicas dos fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a.....	28
Tabela 3 – Screening inicial com os valores de CIM e CLM obtidos.....	35
Tabela 4 – Valores de CIM e CLM obtidos utilizando a bactéria <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	36
Tabela 5 – Ensaio de checkerboard dos peptídeos promissores ([Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15]) com ciprofloxacino sobre <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	37
Tabela 6 – Screening com os valores de CIM e CLM obtidos utilizando cepas clínicas de bactérias gram-negativas.....	38
Tabela 7 – Perfil antimicrobiano das cepas clínicas utilizadas, com valores de CIM e CLM expressos em µM (µg/mL).....	39
Tabela 8 – Ensaio de checkerboard dos peptídeos promissores ([Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15]) com ciprofloxacino sobre <i>E. coli</i> clínica.....	40
Tabela 9 – Atividade hemolítica dos fragmentos e análogos da M-PONTxDq3a.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Dinoponeratoxinas naturais encontradas e <i>D. quadriceps</i>	25
Figura 2 –	Isoblograma que representa a ocorrência de sinergismo entre o antimicrobiano ciprofloxacino e os peptídeos [Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] sob <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	38
Figura 3 –	Distribuição dos valores de % de hemólise dos diferentes peptídeos e antimicrobianos de acordo com a densidade óptica obtida nos ensaios.....	40
Figura 4 –	Distribuição dos valores de % de hemólise dos diferentes peptídeos e antimicrobianos de acordo com a densidade óptica obtida nos ensaios.....	41
Figura 5 –	Distribuição dos valores de % de hemólise dos diferentes peptídeos e antimicrobianos de acordo com a densidade óptica obtida nos ensaios.....	41
Figura 6 –	Resultado da viabilidade das células tubulares humanas HK-2 após o tratamento com Ciprofloxacino e Meropeném.....	43
Figura 7 –	Resultado da viabilidade das células tubulares humanas HK-2 após o tratamento com [Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg] ⁷ M-PONTX-Dq3a[1–15].....	44
Figura 8 –	Resultado da viabilidade das células tubulares humanas HK-2 após o tratamento com [Arg] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg] ¹¹ M-PONTX-Dq3a[1–15].....	45
Figura 9 –	Resultado da viabilidade das células tubulares humanas HK-2 após o tratamento com M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1–15].....	46
Figura 10 –	Resultado da viabilidade das células tubulares humanas HK-2 após o tratamento com [Lys] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1–15].....	47

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANOVA	Análise da Variação
APC	Ágar Plate Count
Arg	Arginina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
°C	Graus Celsius
CIM	Concentração inibitória mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CLM	Concentração letal mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPM	Erro padrão médio
gr	Grama
ICIF	Índices de Concentração Inibitória Fracionada
IC50	Concentração inibitória média
Lys	Lisina
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
nm	Nanômetros
PBS	Tampão fosfato salino
UFC	Universidade Federal do Ceará
ph	Potencial de hidrogênio
µL	Microlitros
µM	Micromolar
µH	Momento hidrofóbico
µg	Microgramas

LISTA DE SÍMBOLOS

- * Asterisco
- β Beta
- \geq Maior e igual
- $<$ Menor que
- $>$ Maior que
- μ Mi
- % Por cento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E JUSTIFICATIVA.....	17
2.1	Infecções por bactérias gram-negativas e resistência aos antibióticos.....	17
2.2	Peptídeos antimicrobianos como modelo para o desenvolvimento de moléculas bioativas.....	19
2.3	Dinoponeratoxinas.....	23
2.4	Justificativa.....	26
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	Geral.....	27
3.2	Específicos.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1	Obtenção das dinoponeratoxinas	28
4.2	Cepas microbianas.....	29
4.2.1	Obtenção das cepas.....	29
4.2.2	Perfil das cepas clínicas.....	29
4.3	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração letal.....	29
4.4	Sinergismo <i>in vitro</i> com ciprofloxacino.....	30
4.5	Atividade hemolítica.....	31
4.6	Avaliação da toxicidade renal dos peptídeos.....	32
4.6.1	Cultivo de células HK-2.....	32
4.6.2	Ensaio de viabilidade celular.....	32
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
6	RESULTADOS.....	35
7	DISCUSSÃO.....	48
8	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

A OMS (Organização Mundial da Saúde) em 2017 identificou as algumas cepas de bactérias gram-negativas entre outras como “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antibióticos, na tentativa de orientar e promover a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos antibióticos, como parte dos esforços para enfrentar a crescente resistência global aos medicamentos antimicrobianos. As bactérias gram-negativas são mais prevalentes em hospitais, casas de repouso e entre os pacientes cujos cuidados exigem dispositivos como ventiladores e cateteres intravenosos. Entre elas, estão *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e várias Enterobactérias (incluindo *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* e *Proteus*). São bactérias que podem causar infecções graves e frequentemente mortais, como infecções da corrente sanguínea e pneumonia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

Considerando a importância das bactérias citadas, sabe-se que o sucesso dos antimicrobianos em meados do século XX gerou o equívoco de que as doenças infecciosas tinham sido eficientemente controladas (RODRÍGUEZ VERDUGO *et al.*, 2020). Entretanto, após quase 50 anos, vemos um aumento alarmante na incidência de doenças infecto-contagiosas, tornando-as a segunda causa de mortalidade em países subdesenvolvidos e a quarta mundialmente (WHO, 2022).

O Relatório global de resistência antimicrobiana e sistema de vigilância de uso Antimicrobiano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022) forneceu análises das taxas de resistência antimicrobiana (RAM). O relatório revela que altos níveis de resistência (acima de 50%) foram descritos e relatados em bactérias que são causa frequente de sepse em hospitais, como *Klebsiella pneumoniae* e mais de 20% das cepas isoladas de *E.coli* - o patógeno mais comum nas infecções do trato urinário - eram resistentes tanto aos medicamentos de primeira linha (ampicilina e co-trimoxazol) quanto aos tratamentos de segunda linha (fluoroquinolonas), destacando a importância da pesquisa de novas moléculas ativas contra esses patógenos.

Com isso, por intermédio da bioprospecção de moléculas bioativas, os produtos naturais desempenham um papel relevante no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e outros bioprodutos, devido à diversidade estrutural e

funcional presentes em diversas substâncias encontradas nos ecossistemas, contribuindo para a descoberta de importantes moléculas de interesse a saúde humana (RAMESHA *et al.*, 2011). Muitos microrganismos têm desenvolvido resistência contra os antibióticos de uso convencional e contra os antibióticos de última geração (PRATES; BLOCH, 2020). Uma importante ferramenta no combate a esses microrganismos são os peptídeos antimicrobianos (PAMs) isolados de venenos animais, que estabelecidos há tempos como poderosos componentes do sistema imune inato de muitos organismos (ALLANE *et al.*, 2018).

Os venenos são produzidos pelos animais com o objetivo de capturar presa ou de defesa contra predadores ou competidores (FRATINI *et al.*, 2017). O veneno da formiga *Dinoponera quadriceps* contem PAMs (peptídeos antimicrobianos), denominados Dinoponeratoxinas (Dntxs) e , apresenta efeito antimicrobiano contra bactérias gram-positivas (ROCHA *et al.*, 2021), e gram-negativas (DODOU *et al.*, 2020), efeito antichagásico (LIMA *et al.*, 2017) e anticonvulsivante (NÔGA *et al.*, 2016).

As Dntxs foram denominadas de acordo com seu peso molecular teórico ou experimental e por uma nomenclatura normalizada. Dentre esses PAMs com atividade antimicrobiana, o M-PONTX-Dq3a foi identificado como um peptídeo promissor contra formas planctônicas e formadoras de biofilme de cepas sensíveis e resistentes de *S. aureus* (ROCHA *et al.*, 2021). Previamente, também foi descrito o efeito antimicrobiano da dinoponeratoxina M-PONTX-Dq4e contra cepas gram-negativas resistentes a carbapenêmicos, () (DODOU *et al.*, 2020).

A relação estrutura atividade e as propriedades físico-químicas influenciam no efeito dos PAMs, com isso, foram realizadas modificações nos fragmentos M-PONTX-Dq3a a fim de aumentar o potencial terapêutico e reduzir efeitos tóxicos. Com efeito, o presente estudo buscou novas moléculas antimicrobianas, por meio dos peptídeos modificados com substituições de arginina e lisina em posições estratégicas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E JUSTIFICATIVA

2.1 Infecções por bactérias gram-negativas e resistência aos antibióticos

Bactérias gram-negativas (BGN) são formadas por uma infinidade de gêneros/espécies causadoras de doenças em seres humanos, entre as quais se citam: infecções do trato urinário e respiratório, diarreia, pneumonia, meningite, sepse e choque endotóxico. Os gêneros/espécies que acometem o ser humano são *Escherichia* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., dentro outros (AUER; WEIBEL, 2017).

Considerando as BGN, existem dois grandes grupos – as enterobactérias e as não-fermentadoras da glicose – os quais comportam a maioria dos isolados clínicos relevantes, todavia, não se resumem apenas nestes, e microrganismos como *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., *Helicobacter pylori* e *Chlamydia trachomatis* também são importantes representantes das BGN. No entanto, um grupo de bactérias de importância hospitalar chamado de bacilos gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) foi destacado (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

As BGN são microrganismos normalmente encontrados em infecções hospitalares (54,8%), acompanhados por bactérias gram-positivas (23,8%) e leveduras (21,4%). As BGN estão entre os maiores problemas enfrentados na saúde pública no mundo por causa da sua elevada taxa de resistência antimicrobiana. Isso se dá porque esses microrganismos conseguem regular ou adquirir novos genes que possuem uma diversificação de mecanismos de resistência a antibióticos (KOULENTI *et al.*, 2019).

É relatado que em menos de 30 anos, a resistência a antimicrobianos poderá ser mais mortal que o câncer e matará 10 milhões de pessoas por ano até 2050 (MURRAY *et al.*, 2022). A China é a nação mais afetada, com 52 milhões de registros de infecções bacterianas, anualmente. O Brasil aparece em quinto lugar, com 4 milhões de casos. No mundo todo, esses microrganismos foram os responsáveis diretos por 1,27 milhão de mortes em 2019. Quando se incluem os casos em que o indivíduo tinha outra doença além da infecção, esse número sobe para 4,95 milhões, próximo ao total de óbitos registrados em três anos de pandemia

de Covid-19 e bem superior à soma das mortes anuais por malária, Aids e tuberculose (SOARES *et al.*, 2023).

Com 14% da população mundial, os 35 países das Américas concentram aproximadamente 11% das mortes por infecções bacterianas resistentes a antibióticos. Em 2019, foram 141 mil óbitos causados por esses microrganismos e 569 mil associados a eles (AGUILAR *et al.*, 2023). Estudo recentes revelam que a maioria (80%) foi causada por patógenos gram-negativos. As ocorrências, em números absolutos, estão concentradas nas nações mais populosas: Estados Unidos e Brasil. Sendo que neste último, foram 33,2 mil mortes (cerca de 90 por dia) diretamente causadas por infecções resistentes e 138 mil nas quais as superbactérias tiveram alguma participação (SOARES *et al.*, 2023).

Em relação aos tipos de resistência dessas bactérias, estas podem neutralizar os efeitos antibacterianos usando barreiras na parede celular ou alterando a permeabilidade da membrana para que os antibióticos não possam entrar nas células ou atingir locais-alvo, que é um mecanismo de defesa formado pelas bactérias durante a evolução. Este mecanismo de resistência aos medicamentos está presente principalmente em bactérias gram-negativas. Porque as bactérias gram-negativas são cercadas por uma barreira de membrana externa, que consiste em proteínas (incluindo porinas de membrana), lipopolissacarídeo (LPS) e fosfolipídios (XUANA *et al.*, 2023).

As ESBLs são β -lactamases caracterizadas pela inativação de cefalosporinas de espectro estreito e amplo espectro, sendo encontradas em bacilos anti-gram negativo. Pode reduzir o efeito dos antibióticos alterando os alvos de ligação de vários antibióticos (KITANO *et al.*, 2020). Este mecanismo de resistência é caracterizado como o mais importante das bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, que causam doenças infecciosas bacterianas clínicas (STEWART *et al.*, 2021).

Atualmente, mais cepas podem produzir duas ou mais enzimas que têm a capacidade de neutralizar os antibióticos aminoglicosídeos, estes após modificados enzimaticamente não conseguem interagir com os locais-alvo ribossômicos e perdem sua atividade antibacteriana. Essas enzimas podem ser divididas em acetiltransferase (AAC), fosfotransferase (APH) e nucleosídeo transferase (ANT). Por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, que frequentemente causa infecções do

trato respiratório, sistema urinário, pele e tecidos moles, pode produzir pelo menos dez enzimas de passivação para atingir um alto grau de resistência aos antibióticos aminoglicosídeos (XUANA *et al.*, 2023).

Além disso, já foram identificadas bactérias que possuem um gene móvel (*mcr-1*) de resistência a antibiótico colistina, um dos poucos antibióticos que ainda trata infecções multirresistentes, e as enterobactérias têm tido um papel fundamental na sua disseminação, com relatos no mundo todo (OLIVEIRA; PAULA, 2021). As opções de tratamento para infecções gram-negativas com resistência à múltiplas drogas (MDR) são escassas e os resultados geralmente têm sido desanimadores, porque apesar dos novos inibidores de β -lactamases que surgiram, os MDR's ainda estão em constante evolução, o que proporciona resistência aos antimicrobianos recentes. Desta forma, como a disponibilização de novos fármacos progride lentamente, algumas opções anteriormente abandonadas reapareceram, como as polimixinas e a colistina que apresentam alta toxicidade (nefrotoxicidade, ototoxicidade e neurotoxicidade). Ademais, genes de resistência a esses medicamentos têm sido relatados (*mcr-1*) causando preocupação adicional por ser uma das poucas opções terapêuticas (ZAKUAN; SURESH, 2018).

Logo, cabe à comunidade científica a busca por outras alternativas terapêuticas as BGN, seja de forma individual ou em sinergismo com outros antimicrobianos aumentando o arsenal terapêutico disponível e possibilitando a diminuição no número de agravos causados por infecções bacterianas.

2.2 Peptídeos antimicrobianos como modelo para o desenvolvimento de moléculas bioativas

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são componentes importantes no sistema de defesa inata dos organismos vivos. É considerado primitivo, uma vez que foi o primeiro mecanismo de defesa imunológica a evoluir na natureza, com sua síntese e secreção desencadeadas por agentes invasores ou gerados constitutivamente dentro do organismo como resultado de pressões ambientais. Esses peptídeos possuem um amplo espectro de atividade contra diferentes microrganismos, sendo eles, bactérias, protozoários, fungos, leveduras e vírus (VILELA, 2022).

Considerando isso, avanços recentes em tecnologias bioanalíticas, genômica, transcriptômica e biologia computacional têm permitido a obtenção de novos conhecimentos sobre a estrutura e função do conteúdo do veneno (TORRES, *et al.*, 2021; PALMER *et al.*, 2021). PAMs compreende biopolímeros curtos formados por resíduos de aminoácidos que naturalmente evoluíram ao longo do tempo para atingir alvos específicos na presa, como receptores acoplados à proteína G, canais iônicos ou enzimas, sem sofrer clivagem proteolítica (PRASHANTH *et al.*, 2017).

As características estruturais dos PAMs permitem interagir seletivamente com membranas celulares bacterianas através de interações eletrostáticas seguidas de interações hidrofóbicas com a bicamada lipídica. Estudos mostraram que, devido apresentar diferentes propriedades e composições estruturais, podem atuar por diversos mecanismos nas membranas plasmáticas (KOEHBACH; CRAIK, 2019). A atividade apresentada por esses compostos tem relação com suas propriedades físico-químicas, incluindo carga líquida, hidrofobicidade e acessibilidade ao solvente, que por sua vez ditam seus mecanismos de ação, seletividade e especificidade em relação aos seus alvos (TORRES *et al.*, 2019).

Ao contrário dos antibióticos tradicionais com apenas um alvo, os AMPs podem destruir patógenos em múltiplos alvos, reduzindo significativamente o surgimento de bactérias resistentes aos medicamentos. Eles têm propriedades antibacterianas de amplo espectro e atualmente são usados no tratamento clínico de infecções por patógenos, cicatrização de feridas e câncer. No geral, será um dos substitutos promissores dos antibióticos no futuro (MALLAPRAGADA *et al.*, 2017; T *et al.*, 2017). A tabela 1, mostra alguns dos PAMs, citados em literatura, que apresentaram efeito antimicrobiano importante e estão em fase de pesquisa como potencial molécula terapêutica.

Tabela 1 – PAMs que apresentaram efeito antimicrobiano relevante descritos em literatura

PAMs	Origem	Atividade antimicrobiana	Estudo
. Cbf-K16	encontrado no veneno da Golden Ring Snake	MRSA	Diene <i>et al.</i> 2011
Ib-AMP4	extraído de sementes de <i>Impatiens</i>	bactérias gram-positivas e gram-negativas	Flórez-Castillo <i>et al.</i> 2019
pseudodina-2 (PSE-T2)	isolado da pele de rã	bacilos gram-negativos	Olson <i>et al.</i> 2001
WLBU2	Sintético	biofilme de MDR <i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Swedan <i>et al.</i> 2019, Elsalem <i>et al.</i> 2022
SAAP-148	Sintético	“ESKAPE”	Anna 2018
TC19	Sintético	Cepas MDR do grupo “ESKAPE”	Kwakman <i>et al.</i> , 2011
polifemusina-I	obtido a partir de restos de hemócitos de <i>Lumulus polyphemus</i> (caranguejo-ferradura americano)	<i>Escherichia coli</i> e <i>Candida albicans</i>	Han <i>et al.</i> 2021
AaCrus1	derivado do <i>Amphibalanus</i>	bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	Zhang , W. <i>et al.</i> 2022
Catelecidinas	veneno de viperídeos da América do Sul	Cepas de <i>C. albicans</i> clínicas	Cavalcante <i>et al.</i> 2018

Fonte: O Autor (2024)

Legenda: MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; MDR: bactérias resistentes à múltiplas drogas; “ESKAPE”: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.

A classificação dos PAMs se ocorre de acordo com as suas propriedades físico-químicas tais como momento hidrofóbico, hidrofobicidade, carga líquida, conteúdo estrutural secundário e solubilidade (BOPARAI; SHARMA, 2020). A estrutura dos PAMs apresenta cadeias laterais hidrofóbicas e hidrofílicas, que conferem a característica de hidrofiliidade à essas moléculas. Parâmetro como o momento hidrofóbico (μH), são classificados como ferramenta relevante na anfipicidade das moléculas. Dessa forma, juntamente com a hidrofobicidade (H) e a carga líquida (z) dos peptídeos, são de grande importância para a avaliação de estudos da análise racional de interações peptídeo-membrana e mecanismo de ação dessas moléculas (TEIXEIRA; FEIRO; BASTOS, 2012).

Considerando a importância desta relação (estrutura-atividade), é mencionado que a maioria dos PAMs é de natureza catiônica com uma carga positiva variando de +2 a +9 (FARKAS *et al.*, 2017). Eles também têm uma estrutura anfipática que inclui a parte hidrofóbica separada e domínios hidrofílicos, nos quais a carga positiva desempenha um papel central no modo de ação pela interação eletrostática entre o peptídeo e o alvo (GUILHELMELLI *et al.*, 2013). As alterações na hidrofobicidade de sequências de aminoácidos estão intimamente ligadas a sua capacidade de ultrapassar membranas lipídicas, podendo esses resíduos de aminoácidos classificados de acordo com seus grupos de cadeias laterais em hidrofóbicos, hidrofílicos carregados, e hidrofílicos sem carga (SUN *et al.*, 2018).

Alguns PAMs podem ser lineares ou alongados ricos em um ou mais aminoácidos como glicina, triptofano, arginina e lisina. Semelhante aos peptídeos α -helicoidais, os membros do grupo têm uma estrutura flexível no ambiente aquoso que lhes permite transformar em uma estrutura anfipática quando estão localizados perto de uma membrana ou de uma estrutura semelhante à membrana. No entanto, a maioria dos PAMs estendidos não atuam diretamente nas membranas dos patógenos, mas penetram nas membranas e interagem com proteínas citoplasmáticas. Indolicidina e batenecina-5, que são ricos em triptofano e prolina/arginina, respectivamente, são dos membros deste grupo (NGUYEN *et al.* 2015).

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 (TORRES *et al.*, 2019). Os resíduos de aminoácidos que predominam, na maioria dos peptídeos antimicrobianos, são 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 (LOHNER, 2009).

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 (BAHNSEN *et al.*, 2013; HRISTOVA; WIMLEY, 2011; SCHMIDT *et al.*, 2012). Os resíduos ricos em 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 (NAKASE *et al.*, 2012; RICE; 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 *et al.*, 2011; ZAMORA-CARRERAS *et al.*, 2016).

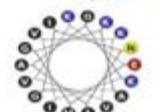
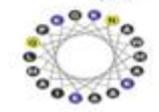
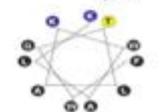
Considerando o exposto, a investigação sobre PAMs está em constante desenvolvimento e quantidades consideráveis de dados sobre PAMs têm sido armazenadas em bancos de dados. Logo, projetar PAMs para alcançar o efeito desejado tem atraído cada vez mais atenção. O planejamento racional de peptídeos antibacterianos deve se concentrar nos seguintes cinco aspectos: comprimento da cadeia, estrutura secundária, carga líquida, hidrofobicidade e anfifilicidade e estes têm sido mencionados em muitos estudos (HUAN *et al.*, 2020). Portanto, o PAM ideal deve atender às seguintes características: (i) alta atividade antimicrobiana; (ii) baixa toxicidade para as membranas de mamíferos; (iii) alta estabilidade proteásica e ambiental; (iv) baixa capacidade de ligação ao soro e (v) facilidade de acesso e baixo custo de produção (LI *et al.*, 2017).

2.3 Dinoponeratoxinas

As formigas do gênero *Dinoponera* são consideradas maiores formigas conhecidas, com comprimento de cerca de 3 cm. Um estudo com *D. australis* demonstrou a presença de cerca de 75 componentes proteicos, sendo que os seis peptídeos majoritários, referidos como dinoponeratoxinas (Dntx), apresentam elevada similaridade com PAMs já conhecidos de outras espécies animais (COLOGNA *et al.*, 2013).

A espécie *Dinoponera quadriceps*, pertence à subfamília Poneriane, distribuída no nordeste brasileiro, o seu veneno possui 64% de conteúdo proteico, sendo fonte de Dntx (SOUSA *et al.*, 2016). Foi evidenciado quatro peptídeos no veneno de *D. quadriceps*: M-PONTX-Dq3a, M-PONTX-Dq3b, M-PONTX-Dq3c e M-PONTX-Dq4e (LIMA *et al.*, 2017). As Dntx foram denominadas de acordo com seu peso molecular teórico ou experimental e por uma nomenclatura normalizada: (M-PONTX-Dq3a; 23 resíduos de aminoácidos), (M-PONTX-Dq3b; 13 resíduos de aminoácidos), (M-PONTX-Dq3c, 11 resíduos de aminoácidos) e (M-PONTX-Dq4e; 30 resíduos de aminoácidos). A figura 1 mostra as Dinoponeratoxinas naturais encontradas em *Dinoponera quadriceps* e algumas de suas características físico-químicas.

Figura 1 – Dinoponeratoxinas naturais encontradas em *D. quadriceps*

Dinoponeratoxina (nomenclatura normalizada)	(M-PONTX-Dq4e)	(M-PONTX-Dq3a)	(M-PONTX-Dq3b)	(M-PONTX-Dq3c)
Estrutura primária	GLKDWWNKHDKVKVVKEMGKAGINAAGK	FWGTLAKWALKAI PAAMGMKQNK	FWGTLAKWALKAI	FWGTLAKWALK
Peso molecular ^b	3348,97 (3350,02)	2561,13 (2562,16)	1503,83 (1504,85)	1319,59 (1320,61)
Predição de modelo ^c				
Carga líquida (z) ^d	6,1	5,0	3,0	3,0
pI ^e	10,9	14,0	14,0	14,0
Hidrofobicidade, H ^f	0,148	0,509	0,823	0,781
μ_H ^f	0,458	0,248	0,531	0,523
Roda α -helicoidal ^g				

Fonte: adaptado de Lima *et al.*, 2018.

Legenda: Peptídeos amidados C-terminal; bMassa molecular experimental e teórica entre parenteses respectivamente; c Predição de modelo arquivado com o servidor PEP-FOLD 2 (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>); dCarga líquida em pH e pI neutro, calculado por <http://pepcalc.com>; eFrom <http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>, com resíduos carregados negativamente em vermelho, positivamente em azul, não polares em preto e polares em amarelo; μ_H = momento hidrofóbico.

Diferentes efeitos terapêuticos foram atribuídos aos PAMs derivados da *D. quadriceps*, como efeito antimicrobiano (ROCHA *et al.*, 2021), antifúngico (DODOU *et al.*, 2020), antichagásico (LIMA, 2018) e efeito anticonvulsivante (NÔGA *et al.*, 2016). Anteriormente, nosso grupo de pesquisa demonstrou efeito antibacteriano contra MRSA e *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA) no veneno de *D. quadriceps* (DqV) (LIMA *et al.*, 2014). Recentemente demonstramos que um dos

peptídeos presentes no DqV, M-PONTX-Dq3a, é um potente inibidor de cepas MRSA e MSSA, sendo capaz de prevenir a formação de biofilme (ROCHA *et al.*, 2021). Além disso, M-PONTX-Dq3a apresentou efeito contra formas evolutivas de *T. cruzi*, possuindo o maior índice de seletividade (IS) dentre as Dntxs testadas (LIMA *et al.*, 2018). Em 2024, demonstramos o potencial neuroprotetor de M-PONTX-Dq3a, M-PONTX -Dq3b e M-PONTX-Dq3 ccontra convulsões (PAES *et al.*, 2024).

Considerando que a carga positiva do PAM é uma importante característica físico-química dos peptídeos, que influencia as interações eletrostáticas entre PAM e fosfolipídios carregados negativamente presentes nas membranas de microrganismo. Para melhorar a carga positiva líquida e a atividade antibacteriana do M-PONTX-Dq3a, aminoácidos de cadeia lateral positiva, com características hidrofílicas e análogos de substituição simples foram propostos, principalmente arginina ou lisina (PEDRON *et al.*, 2019). Sendo assim, alguns análogos de substituição única de arginina (R) foram propostos na face hidrofílica nas posições G3, T4, K7, L10 e K11, bem como substituições de lisina (K) nas posições G3, T4 e L10, levando a formação de oito análogos, os quais foram testados inicialmente sobre seu potencial antichagásico, tendo dois análogos ([Lys]³M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Lys]⁴M-PONTX-Dq3a[1-15]) evidenciado a importância dos aminoácidos iniciais da sequência peptídica para o efeito tripanocida, além disso também foi observado que os análogos substituídos com lisina tiveram melhor atividade tripanocida do que aqueles sintetizados com arginina (MONTEIRO *et al.*, 2022).

Os 8 análogos de M-PONTX-Dq3a também mostraram potencial antimicrobiano contra MSSA, MRSA e formação de biofilme, tendo como resultado maior atividade dos análogos [Arg]³ M-PONTX-Dq3a [1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1–15], apresentando inclusive melhor efeito do que o tratamento padrão, que seria a oxacilina, mostrando que para efeito antimicrobiano contra bactérias gram-positivas os análogos substituídos de arginina apresentaram maior atividade (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2023).

Em relação a outros análogos sintéticos, foi evidenciado o efeito de duas Dntxs sintéticas, de M-PONTX-Dq3a e M-PONTX-Dq4e, contra bactérias de isolados clínicos de bactérias com resistência à múltiplas drogas (MDR) *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

(LIMA *et al.*, 2020). Tudo isso corrobora para fortalecer o potencial efeito terapêutico das Dntxs e seus análogos, nos estudos apontados, que mostraram efeito positivo, além do aumento da seletividade, assim como a redução do tamanho da molécula e o custo e o tempo de produção da mesma. Assim, é notado que que foram estudados efeitos tripanocidas e antimicrobianos contra microorganismos gram-positivos dos análogos substituídos de arginina e lisina, assim cabem mais estudos para avaliar o efeito antimicrobiano sobre bactérias gram-negativas.

2.4 Justificativa

Diante do que foi exposto, é observado que a grande incidência de infecções por bactérias gram-negativas juntamente com a resistência que estes microorganismos têm desenvolvido aos antimicrobianos convencionais tem levado a busca por alternativas terapêuticas que possam oferecer condições de tratamento aos pacientes comprometidos. O uso de peptídeos antimicrobianos surge como fonte para a busca de novos compostos com atividade antibacteriana, devido seu potencial farmacológico como agentes de amplo espectro, possuindo atividade frente um grande número de microorganismos multiresistentes a medicamentos. Diversos peptídeos têm sido isolados e sintetizados, incluindo as Dinoponeratoxinas. Em estudos preliminares, uma dessas Dntxs, o peptídeo M-PONTX-Dq4e apresentou atividade significativa contra cepas resistentes de *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (LIMA *et al.*, 2020). De modo geral, o perfil antimicrobiano apresentado pelas Dntxs sugere que elas tenham um potencial para ser um modelo promissor para o desenvolvimento de fármacos de largo espectro a partir de peptídeos. Feita as devidas modificações estruturais nos peptídeos de Dntxs, é necessário testar através de estudos o perfil de atividade antimicrobiana dos peptídeos modificados, fragmento e analagos das Dntxs, a partir da premissa que as modificações iriam promover maior efetividade, especificidade e diminuição da toxicidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito antimicrobiano de análogos da dinoponeratoxina M-PONTXDq3a sobre cepas de bactérias gram-negativas

3.2 Específicos

- a) Determinar a concentração inibitória mínima e a concentração letal mínima dos análogos da dinoponeratoxina M-PONTXDq3a sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- b) Selecionar os peptídeos promissores e as bactérias gram-negativas que mais responderem em screening inicial;
- c) Avaliar a ocorrência de sinergismo entre os peptídeos promissores selecionados e as bactérias gram-negativas que apresentarem maior sensibilidade pelo ensaio de checkboard;
- d) Avaliar a atividade hemolítica dos análogos da dinoponeratoxina M-PONTXDq3a;
- e) Avaliar a toxicidade dos análogos da dinoponeratoxina M-PONTXDq3a sobre células de linhagem renal humana HK-2.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção das dinoponeratoxinas

Partindo da estrutura primária da dinoponeratoxina M-PONTX-Dq3a (23 resíduos de aminoácidos), a qual demonstrou grande potencial como modelo estrutural para a busca de novos PAMs (LIMA *et al.*, 2018), foram realizadas substituições únicas de arginina (R) na face hidrofílica nas posições G3, T4, K7, L10 e K11, e substituições de lisina (K) nas posições G3, T4 e L10, o que levou a um aumento das cargas positivas líquidas e do momento hidrofóbico (Tabela 2).

O fragmento peptídico M-PONTX-Dq3a [1-15] e os oito análogos ([Lys]³ M-PONTX-Dq3a [1-15], [Lys]⁴ M-PONTX Dq3a [1-15], [Lys]¹⁰ M-PONTX-Dq3a [1-15], [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1-15], [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15], [Arg]⁷ M-PONTX-Dq3a [1-15], [Arg]¹⁰ M-PONTX-Dq3a [1-15], [Arg]¹¹ M-PONTX-Dq3a [1-15]) foram sintetizados por síntese em fase sólida (LibertyBlue, Kamp-Lintfort, Alemanha) no Centro de Investigacion Principe Felipe (Valência, Espanha), purificado por HPLC e caracterizado por análise de espectrometria de massa, e o peso molecular experimental foi expresso na Tabela 2 (LIMA *et al.*, 2018). As soluções de peptídeos foram preparadas a 1 mM com solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS), dividida em alíquotas e mantidos a - 20°C até o teste.

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas dos fragmentos e análogos de M-PONTX-Dq3a

Peptídeo	Sequência	Peso molecular experimental (kDa)	Z	H	μH
M-PONTX-Dq3a [1-15]	FWGTLAKWALKAIPA	1673,00	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	0,410
[Arg] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWGTLAKWARKAIPA	1716,03	4	0,601	0,510
[Arg] ¹¹ M-PONTX-Dq3a[1-15]	FWGTLAKWALRAIPA	1701,02	3	0,781	0,412

Fonte: Bandeira *et al.* (2017)

Legenda: As sequências e propriedades físico-químicas do M-PONTX-Dq3a foram descritas por Lima *et al.* (2018), e do fragmento e análogos de M-PONTX-Dq3a descritas por Monteiro *et al.* (2022). A carga líquida em pH neutro (Z), hidrofobicidade (H) e momento hidrofóbico (μH) foram calculados a partir de <https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>.

4.2 Cepas microbianas

4.2.1 Obtenção das cepas

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram doadas 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 subcultivado a cada oito semanas. As cepas clínicas utilizadas nos ensaios foram obtidas através da parceria com o Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) de Sobral/Ceará sob o número de Comitê de Ética 4.313.543.

4.2.2 Perfil das cepas clínicas

O perfil das cepas clínicas (*E. coli*; *K. pneumoniae*; *P. aeruginosas*) foi traçado pelo método de determinação de CIM e CLM, como descrito no item 4.3, onde as cepas foram tratadas com os seguintes antimicrobianos: meropeném, imipiném, ciprofloxacino, gentamicina, polimixina B e sulbactam+ampicilina. Estes antimicrobianos são utilizados clinicamente no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas, o que possibilita traçar um perfil clínico das cepas utilizadas. Os antimicrobianos foram seriados em concentrações de 256 µg/mL a 0,125 µg/mL, exceto polimixina B, que é classificado como um antimicrobiano de amplo espectro, utilizado nas infecções com cepas mais resistentes e em geral apresenta CIM com valores menores, logo as concentrações utilizadas foram de 64 µg/mL a 0,0312 µg/mL. Os antimicrobianos utilizados foram doados pelo Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) e Instituto Doutor José Frota (IJF), ambos localizados em Fortaleza/Ceará.

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

A CIM e CLM do fragmento peptídico M-PONTX-Dq3a [1-15] e dos oitos análogos modificados estudados contra as cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC

700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e das cepas clínicas (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*) foram determinadas usando o ensaio de microdiluição em caldo (Clinical e Laboratory Standards Institute, 2018). Sendo assim, alíquotas de suspensões microbianas (1×10^6 UFC/mL) das culturas microbianas foram preparados em caldo Mueller-Hinton (MH) (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e incubadas em placas de 96 poços na presença de peptídeos (100 - 0,78 μ M). No controle positivo foi utilizado ciprofloxacino e solução de PBS como controle negativo. As microplacas foram incubadas a 37 °C e inspecionadas visualmente depois das 24h. A CIM foi considerada como a menor concentração de peptídeos capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, evidenciando através da ausência de turbidez.

Para determinação da CLM, 5 μ L dos poços que não apresentaram turbidez das microplacas usadas para determinação de CIM, foram semeadas em superfície do ágar Plate-Count (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e espalhado com cabo Drigalski. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C e foram contadas as colônias que haviam crescido na superfície do ágar. A CLM foi determinada como a concentração que matou 99,9% de células do inoculo inicial. Os ensaios foram realizados em triplicata (SHANHOLTZER *et al.*, 1988). O ensaio do sinergismo foi realizado com os peptídeos que apresentaram menores valores de CIM, assim como a cepa microbiana relacionada.

4.4 Sinergismo *in vitro* com ciprofloxacino

O ensaio do sinergismo foi realizado através Método de Checkboard, como descrito por Cleeland e Squires (1991). Sendo assim, o ensaio foi realizado em placas de 96 poços, onde foi adicionado 80 μ L de meio de cultura (caldo MH, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), 10 μ L dos peptídeos selecionados previamente ([Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15]) partindo da concentração da CIM e indo até 1/8, decaindo sempre pela metade da concentração, 10 μ L de ciprofloxacino sendo a concentração inicial $\frac{1}{2}$ da CIM e indo até 1/8 da CIM, e alíquotas de 100 μ L suspensões microbianas (1×10^6 UFC/mL) de *E. coli* ATCC 25922 e clínica, em seguida as placas foram incubadas a 37°C por 24h e foi realizada inspeção visual do crescimento microbiano.

Para analisar o efeito das associações [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15]-ciprofloxacino e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15]-ciprofloxacino foram calculados os Índices de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), como descrito por (SHIN; LIM, 2004):

$$ICIF = CIF_{\text{peptídeo}} + CIF_{\text{ciprofloxacino}} = \frac{[\text{peptídeo}]}{CIM_{\text{peptídeo}}} + \frac{[\text{ciprofloxacino}]}{CIM_{\text{ciprofloxacino}}}$$

Onde: [peptídeo] é a menor concentração de [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] na associação com atividade antimicrobiana, CIM_{peptídeo} é a CIM de [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15], CIF_{peptídeo} é a concentração inibitória fracionada de [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15], [ciprofloxacino] é a menor concentração do antibiótico na associação com atividade antimicrobiana, CIM_{ciprofloxacino} é a CIM do antibiótico, CIF_{ciprofloxacino} é a Concentração inibitória fracionada deste. O Índice CIF (ICIF) foi interpretado como: efeito sinérgico para ICIF ≤ 0,5, efeito aditivo ou indiferente para ICIF > 0,5 e < 1,0, e efeito antagônico para ICIF > 1,0 (Eucast, 2003).

4.5 Atividade hemolítica

Foram coletados 10mL de sangue fresco (10 mL) (CEUA nº 2456250719) em tubos contendo EDTA e centrifugados a 1000g durante 10 minutos a 4°C. Após a remoção do plasma, o sedimento contendo os glóbulos vermelhos (RBCs) foi lavado cinco vezes com PBS e, em seguida, novamente suspenso em PBS para obter uma solução com 8% (v/v) de eritrócitos. Foram adicionadas alíquotas de 100 µL desta suspensão a diferentes tubos de microcentrifuga, contendo 100 µL de cada análogo de peptídeo modificado ou ciprofloxacino ou meropeném, diluído seriadamente, com concentrações variando de 1,56 a 200 µM. As concentrações finais foram: 4% (v/v) de suspensão de eritrócitos e 0,78-100 µM de peptídeo ou antimicrobianos utilizados (ciprofloxacino e meropeném). Estas suspensões resultantes foram incubadas com agitação durante uma hora a 37 °C. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas durante 2 min a 1000 g. Os sobrenadantes foram transferidos para placas de microdiluição de 96 poços, e a liberação de hemoglobina foi medida por

absorvância a 540 nm, utilizando o leitor Synergy HT (Biotek). Foram utilizados Triton X-100 a 4% (v/v) com e sem RBCs, PBS também com e sem RBCs, ciprofloxacino e meropeném como controles. O percentual de hemólise foi calculado como $[(Abs_{540nm} \text{ tratado} - Abs_{540nm} \text{ não tratado}) / (Abs_{540nm} \text{ 1\% Triton X-100} - Abs_{540nm} \text{ não tratado})] \times 100$ e os experimentos foram realizados em triplicata (WANG *et al.*, 2013).

4.6 Avaliação da toxicidade renal dos peptídeos

4.6.1 Cultivo de células HK-2

Células tubulares humanas HK-2 (Human Kidney 2), provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foram cultivadas em meio DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium - suplementado com 10% SBF - soro bovino fetal - (MERCK, Darmstadt, Alemanha) e incubadas de acordo com condições padrões de temperatura e atmosfera (37°C, 5% CO₂) até o estado de confluência. Para realização dos ensaios subsequentes, as células foram deslocadas com solução de tripsina-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para microplacas de 96 poços, na concentração de 1×10^5 células/mL, após serem contabilizadas em Câmara de Neubauer com solução de azul de tripan (0,3% p/v em PBS) de acordo com a *Equação 1*. Por fim, as células foram incubadas novamente *overnight* nas mesmas condições de temperatura e atmosfera para permitir a adesão e proliferação celular.

Equação 1: concentração celular = (Número de células contadas na câmara / 4) \times $10^4 \times F_d$

Obs.: F_d corresponde ao fator de diluição da solução utilizada para contagem.

4.6.2 Ensaio de viabilidade celular

Para determinar o perfil de toxicidade dos peptídeos, as células HK-2 foram tratadas por 24 horas com soluções de concentrações decrescentes (25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78 μ M), diluídas em tampão fosfato (PBS) pH 7,4 \pm 0,5. Células tratadas apenas com PBS compuseram o grupo veículo, enquanto células que não

receberam nenhum tratamento compuseram o grupo controle. Após o período de incubação, foi realizado o ensaio de viabilidade celular pela redução do MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio Brometo), um sal de tetrazólio de coloração amarela que é prontamente endocitado pelas células viáveis e metabolizado através de desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais em formazan, um sal insolúvel, de coloração arroxeadada, que é então liberado para o meio (MOSMANN, 1983). As células foram centrifugadas (4000 RPM, por 5 minutos) e o sobrenadante foi removido, adicionando-se aos poços 100 μ L de solução de MTT 0,25 mg \cdot mL⁻¹. Após incubação a 37 °C por 3 horas, as placas foram novamente centrifugadas e o sobrenadante, descartado. Em seguida, foi adicionado 100 μ L de DMSO - Dimetilsulfóxido - para solubilização dos cristais de formazan. Células não-viáveis são incapazes de internalizar e reduzir o MTT, logo a concentração de sal de formazan produzido e a intensidade da coloração arroxeadada em cada poço são diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis, sendo medida pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 570 nm.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão médio (E.P.M.). As diferenças entre os grupos foram comparadas utilizando a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, utilizando como critério $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism 5*.

6 RESULTADOS

O fragmento M-PONTX-Dq3a[1-15] e oito peptídeos modificados foram testados contra as cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

De acordo com os resultados expressos na tabela 3, em relação as bactérias ATCC testadas, a bactéria *E. coli* ATCC 25922 apresentou menores valores de CIM para os peptídeos testados. Dentre os peptídeos estudados, [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15] apresentaram os menores valores de CIM (1,56 µM). Considerando os valores de Concentração Letal de Morte (CLM) obtidos, [Arg]³ M-PONTX-Dq3a [1-15] apresentou o menor valor quando testado para *P. aeruginosa* ATCC 27853 (6,25 µM) e *E. coli* ATCC 25922 (1,56 µM), ambos idênticos à CIM, apresentando um perfil bactericida (Tabela 3).

Tabela 3 – Screening inicial com os valores de CIM e CLM obtidos

Cepas microbianas/peptídeos modificados	<i>Pseudomonas</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella</i>	
	<i>aeruginosa</i> ATCC		ATCC 25922		<i>pneumoniae</i> ATCC	
	27853				700603	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
	(µM)	(µM)	(µM)	(µM)	(µM)	(µM)
[Lys] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15]	12,5	12,5	12,5	25	25	25
M-PONTX-Dq3a [1-15]	50	100	12,5	12,5	100	100
[Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15]	6,25	6,25	1,56	1,56	12,5	12,5
[Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15]	50	>100	1,56	6,25	25	25

Fonte: O Autor (2024)

Legenda: CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CLM (Concentração Letal Mínima) dos peptídeos modificados sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC 700603.

No presente estudo a bactéria *E. coli* ATCC 25922 apresentou maior sensibilidade aos peptídeos testados, considerando os valores de CIM e CLM (tabela 3), assim os ensaios posteriores realizados foram apenas com essa bactéria (tabela 4), e os ensaios prosseguiram para definir quais os análogos dos peptídeos

dinoponeratoxinas seriam mais ativos contra essa bactéria. Os resultados mostraram que [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] foram os mais ativos contra a cepa *E. coli* ATCC 25922, com menores valores de CIM e CLM dentre todos os peptídeos testados.

Tabela 4 – Valores de CIM e CLM obtidos utilizando a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922

PEPTÍDEO	CIM (μ M)	CLM (μ M)
M-PONTX-Dq3a [1-15]	12,5	12,5
[Lys] ³ M-PONTX-Dq3a[1–15]	6,25	6,25
[Lys] ⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15]	12,5	25
[Lys] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1–15]	25	25
[Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1–15]	1,56	1,56
[Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1–15]	1,56	6,25
[Arg] ⁷ M-PONTX-Dq3a[1–15]	12,5	100
[Arg] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1–15]	6,25	25
[Arg] ¹¹ M-PONTX-Dq3a[1–15]	6,25	12,5
Ciprofloxacino	0,78	0,78

Fonte: O Autor (2024)

Legenda: CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CLM (Concentração Letal Mínima) dos peptídeos modificados sobre *E. coli* ATCC 25922.

O ensaio de checkerboard, objetivou determinar a ocorrência ou não de sinergismo, sendo realizado a análise com os peptídeos que apresentaram melhores resultados ([Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15]) sobre *E. coli* ATCC 25922, bactéria que apresentou os menores valores de CIM e CLM frente aos peptídeos testados no screening inicial. As fluoroquinolonas ainda são indicadas como 1ª linha de tratamento nas infecções causadas por *E. coli* (IDSA, 2023), considerando que a cepa ATCC utilizada (*E. coli* ATCC 25922) apresenta este perfil de sensibilidade (American Type Culture Collection, 2023), o ensaio do sinergismo foi realizado com ciprofloxacino, considerando o tratamento padrão.

No ensaio do checkerboard para a cepa de *E. coli* ATCC 25922, como exposto na tabela 5 e gráfico 1, os resultados foram semelhantes para os peptídeos promissores ([Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15]), foi obtido como menor valor de ICIF (Índices de Concentração Inibitória Fracionada)

0,25, sendo coincidente com a ocorrência de sinergismo (EUCAST, 2003; SHIN; LIM, 2004).

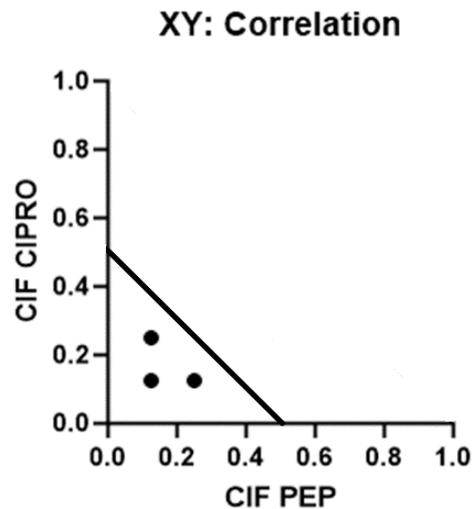
Tabela 5 – Ensaio de checkerboard dos peptídeos promissores ([Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15]) com ciprofloxacino sobre *E. coli* ATCC 25922

Antimicrobiano	Cepa	[peptídeos]	CIM peptídeos	CIF peptídeos	[ATB]	CIM ATB	CIF ATB	ICIF	Efeito	Redução [ATB]
Ciprofloxacino	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,78	1,56	0,5	0,39	0,78	0,5	1	adição	X2
		0,78	1,56	0,5	0,19	0,78	0,25	0,75	adição	X4
		0,78	1,56	0,25	0,09	0,78	0,125	0,625	adição	X8
		0,39	1,56	0,5	0,39	0,78	0,5	0,75	adição	X2
		0,39	1,56	0,25	0,19	0,78	0,25	0,5	adição	X4
		0,19	1,56	0,25	0,09	0,78	0,125	0,375	sinergismo	X8
		0,39	1,56	0,125	0,39	0,78	0,5	0,625	adição	X2
		0,19	1,56	0,125	0,19	0,78	0,25	0,375	sinergismo	X4
		0,19	1,56	0,125	0,09	0,78	0,125	0,25	sinergismo	X8

Fonte: O Autor (2024)

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima; ATB: Antibiótico; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; ICIF: Índices de Concentração Inibitória Fracionada; [peptídeos]: [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15], pois obtiveram os valores idênticos de CIM.

Figura 2 – Isoblograma que representa a ocorrência de sinergismo entre o antimicrobiano ciprofloxacino e os peptídeos [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] sob *E. coli* ATCC 25922



Fonte: O Autor (2024)

Legenda: No eixo X estão os valores de CIF dos peptídeos avaliados e no eixo y CIF do antimicrobiano ciprofloxacino. CIF CIPRO: Concentração Inibitória Fracionada do Ciprofloxacino; CIF PEP: Concentração Inibitória Fracionada do peptídeo. Os peptídeos [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] obtiveram os valores idênticos de CIM.

Considerando os resultados obtidos em relação as cepas clínicas (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosas*), o peptídeo [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] foi o que obteve a menor CIM para as bactérias clínicas testadas (tabela 6), exceto para *P. aeruginosas*. O peptídeo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] mostrou a segunda menor CIM para *E. coli*, mas para *K. pneumoniae* o fragmento peptídico M-PONTX-Dq3a [1–15] apresentou a segunda menor CIM. Quando observado os resultados obtidos para a bactéria *P. aeruginosas*, o peptídeo [Lys]¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1–15] foi o que teve o menor valor de CIM, seguido do peptídeo primário, o fragmento M-PONTX-Dq3a[1–15].

Tabela 6 – Screening com os valores de CIM e CLM obtidos utilizando cepas clínicas de bactérias gram-negativas

Cepas microbianas clínicas/peptídeos modificados	<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	CIM (µM)	CLM (µM)	CIM (µM)	CLM (µM)	CIM (µM)	CLM (µM)
M-PONTX-Dq3a [1-15]	1,56	6,25	1,56	6,25	12,5	12,5
[Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1–15]	0,19	0,19	0,78	0,78	25	50
[Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1–15]	0,78	0,78	3,12	6,25	25	50
[Arg] ⁷ M-PONTX-Dq3a[1–15]	25	25	100	100	50	100
[Arg] ¹¹ M-PONTX-Dq3a[1–15]	6,25	6,25	12,5	12,5	25	25
[Lys] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1–15]	25	100	25	100	6,25	12,5

Fonte: O Autor (2024)

Legenda: CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CLM (Concentração Letal Mínima) dos peptídeos modificados sobre cepas clínicas de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. Aeruginosa*. µM: micromolar;

Conforme os dados de Concentração Letal de Morte (CLM) obtidos utilizando cepas clínicas, como demonstrado na tabela 6, a maioria dos peptídeos apresentaram valores de CIM iguais a CLM, mostrando um perfil bactericida, exceto, M-PONTX-Dq3a [1-15] e [Lys]¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1–15] para *E. coli* e *K. pneumoniae* e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1–15] para *K. pneumoniae*. Para a bactéria *P. aeruginosa*

apenas M-PONTX-Dq3a [1-15] apresentou perfil bactericida, os demais apresentaram perfil bacteriostáticos.

A tabela 7 apresentou o resultado do screening realizado com as cepas clínicas utilizadas no estudo para obter o perfil de sensibilidade das bactérias utilizadas sobre os antimicrobianos disponíveis no mercado, que são utilizados comumente no tratamento contra infecções causadas por bactérias gram-negativas. Foi identificado maior sensibilidade para todas as cepas testadas (menores valores de CIM e CLM) no uso de polimixina B. As cepas *K. pneumoniae* e *E. coli* apresentaram menor sensibilidade (maiores CIM e CLM) para gentamicina, e *P. aeruginosas* apresentou menor sensibilidade ao meropeném, dentre os antimicrobianos testados.

Tabela 7 – Perfil antimicrobiano das cepas clínicas utilizadas.

Antimicrobianos/Bactérias	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosas</i>	
	CIM µM (µg/mL)	CLM µM (µg/mL)	CIM µM (µg/mL)	CLM µM (µg/mL)	CIM µM (µg/mL)	CLM µM (µg/mL)
Meropeném	<0,0003 (<0,125)	ND	0,053 (20,125)	ND	0,340 (128)	1,806 (680)
Imipiném	0,0033 (1)	0,0134 (4)	0,0033 (1)	0,0067 (2)	0,0033 (1)	0,0134 (4)
Ciprofloxacino	0,095 (32)	0,380 (128)	0,190 (64)	0,760 (256)	0,003 (1)	0,003 (1)
Gentamicina	0,13 (64)	0,26 (128)	0,26 (128)	0,52 (256)	0,008 (4)	0,016 (8)
Polimixina B	0,0001 (0,125)	0,0001 (0,125)	0,00005 (0,0625)	0,00005 (0,0625)	>0,05 (>64)	ND
Sulbactam + Ampicilina	0,1098 (64)	0,1098 (64)	0,2196 (128)	0,4392 (256)	0,1098 (64)	0,2196 (128)

Fonte: O Autor (2024)

Legenda: CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CLM (Concentração Letal Mínima) dos peptídeos modificados sobre cepas clínicas de *K. Pneumoniae*, *E. coli* e *P. Aeruginosa*.

µM: valores expressos em micromolar; µg/mL: valores expressos em microgramas por mililitros; ND: não determinado.

No ensaio do checkerboard realizado para a cepa clínica que apresentou maior sensibilidade aos peptídeos promissores do ensaio de screening inicial (*E. coli*) como demonstrado na tabela 8, não foi identificado a ocorrência de efeito sinérgico, apenas efeito aditivo, pois os valores de ICIF, nos poços onde houve inibição do crescimento, foram todos maiores de 0,5 (EUCAST, 2003; SHIN; LIM, 2004).

Tabela 8 – Ensaio de checkerboard dos peptídeos promissores ([Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15]) com ciprofloxacino sobre *E. coli* clínica

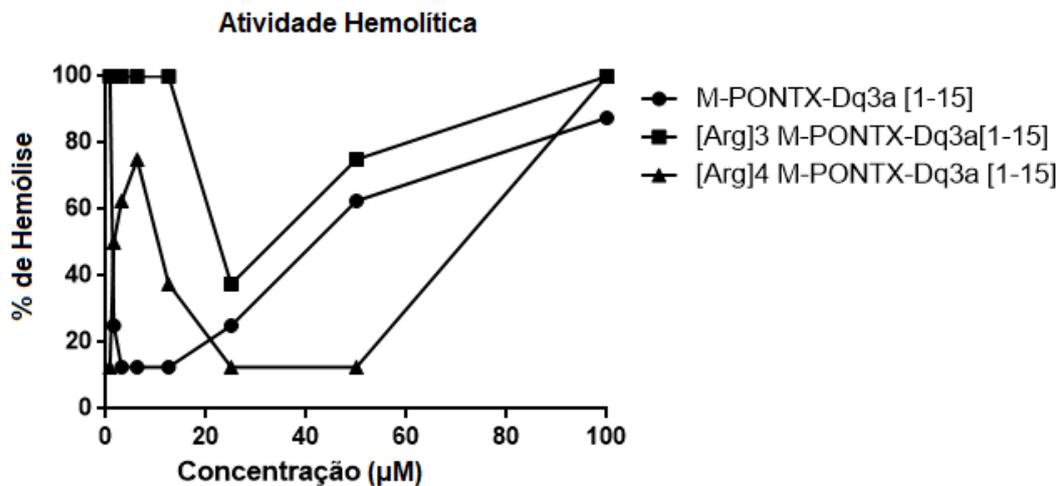
Antimicrobiano	Cepa	Peptídeos	MIC peptídeo	[peptídeos]	CIF peptídeos	MIC ATB	[ATB]	CIF ATB	ICIF	efeito	redução [ATB]
Ciprofloxacino	<i>Escherichia coli</i>	[Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1–15]	0,19	0,047	0,25	0,19	0,095	0,5	0,75	adição	4X
		[Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1–15]	0,78	0,39	0,5	0,19	0,047	0,25	0,75	adição	2X

Fonte: O Autor (2024)

Legenda: [peptídeos]: concentração dos peptídeos em micromolar; CIM peptídeo: concentração inibitória mínima do peptídeo para a bactéria *E. coli*; [ATB]: concentração do antimicrobiano. Todos os valores de concentração foram apresentados em micromolar.

Em relação aos resultados obtidos no ensaio de atividade hemolítica, conforme demonstrado nas figuras 3, 4, 5 e tabela 9, [Arg]⁴M-PONTX-Dq3a [1–15] atingiu 12,5% de hemólise na concentração de 50 µM. Observando ainda esses resultados, cabe destacar que o peptídeo que apresentou maior índice de hemólise foi o [Arg]³ M-PONTX-Dq3a [1–15], tendo menor a porcentagem quantificada a 37,5% de hemólise na concentração de 25 µM.

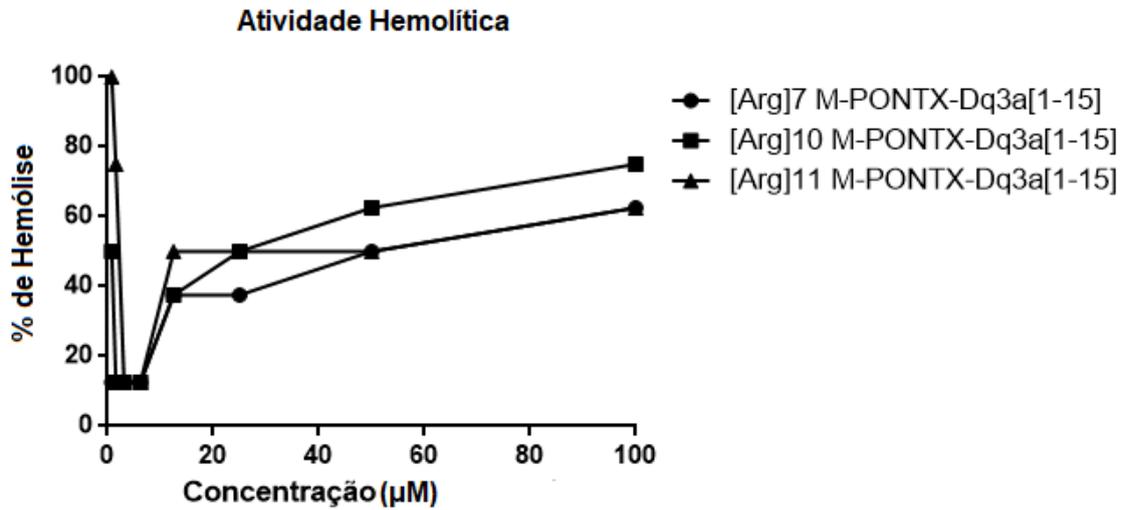
Figura 3 – Distribuição dos valores de % de hemólise dos diferentes peptídeos e antimicrobianos de acordo com a densidade óptica obtida nos ensaios



Fonte: O Autor (2024)

Legenda: µM: micromolar; %: porcentagem.

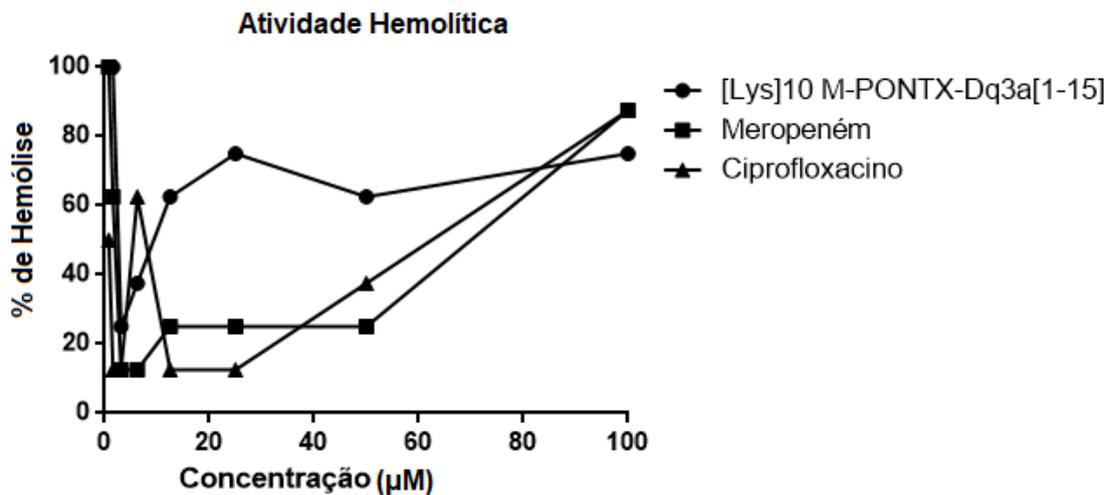
Figura 4 – Distribuição dos valores de % de hemólise dos diferentes peptídeos e antimicrobianos de acordo com a densidade óptica obtida nos ensaios



Fonte: O Autor (2024)

Legenda: µM: micromolar; %: porcentagem.

Figura 5 – Distribuição dos valores de % de hemólise dos diferentes peptídeos e antimicrobianos de acordo com a densidade óptica obtida nos ensaios



Fonte: O Autor (2024)

Legenda: µM: micromolar; %: porcentagem.

Tabela 9 – Atividade hemolítica dos fragmentos e análogos da M-PONTxDq3a

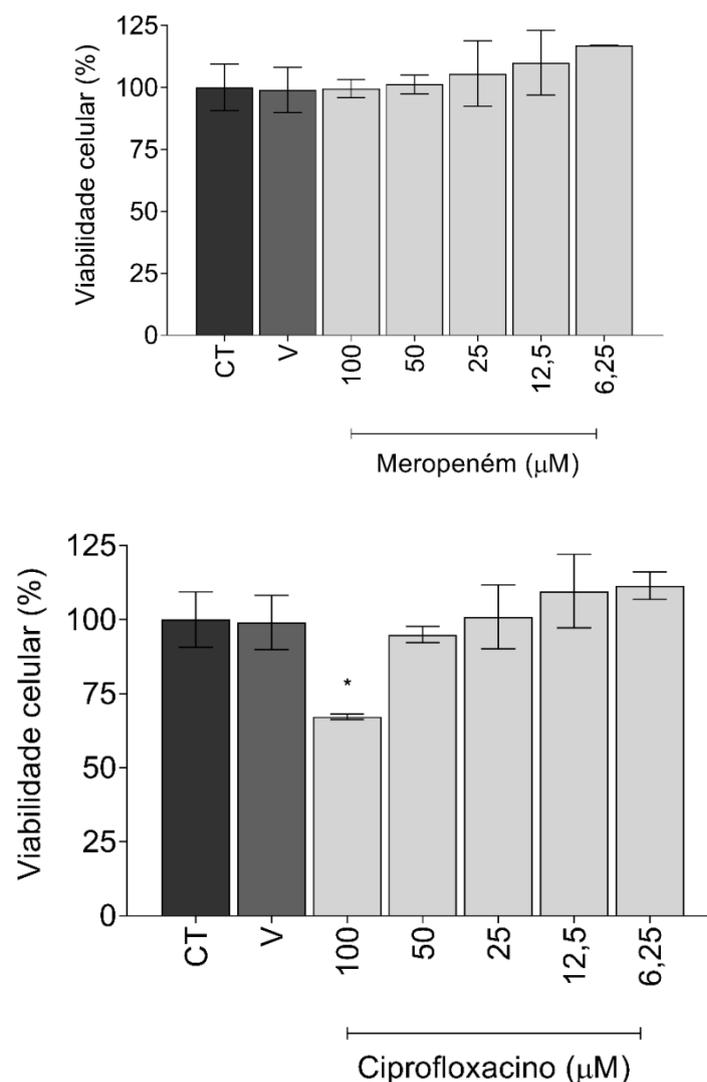
Peptídeos/%de hemólise	100 μM	50 μM	25 μM	12,5 μM	6,25 μM	3,125 μM	1,56 μM	0,78 Mm
M-PONTX-Dq3a [1-15]	87,5	62,5	25	12,5	12,5	12,5	25	100
[Arg] ³ M-PONTX-Dq3a[1-15]	100	75	37,5	100	100	100	100	100
[Arg] ⁴ M-PONTX-Dq3a [1-15]	100	12,5	12,5	37,5	75	62,5	50	12,5
[Arg] ⁷ M-PONTX-Dq3a[1-15]	62,5	50	37,5	37,5	12,5	12,5	12,5	12,5
[Arg] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15]	75	62,5	50	37,5	12,5	12,5	12,5	50
[Arg] ¹¹ M-PONTX-Dq3a[1-15]	62,5	50	50	50	12,5	12,5	75	100
[Lys] ¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15]	75	62,5	75	62,5	37,5	25	100	100
Meropeném	87,5	25	25	25	12,5	12,5	62,5	100
Ciprofloxacino	87,5	37,5	12,5	12,5	62,5	12,5	12,5	50

Fonte: O Autor (2024)

Legenda: μM: micromolar.

No ensaio de toxicidade em células renais (Figura 6, 7, 8, 9 e 10) o peptídeo M-PONTX-Dq3a [1-15] apresentou toxicidade somente na maior concentração estudada. [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15] foram os mais tóxicos quando comparado com os demais peptídeos testados. Os peptídeos [Arg]⁷ M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Arg]¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15] apresentaram toxicidade somente nas maiores concentrações. O peptídeo [Arg]¹¹ M-PONTX-Dq3a[1-15] apresentou toxicidade somente nas concentrações 25µM e 12,5 µM. O peptídeo [Lys]¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15] não apresentou toxicidade em nenhuma concentração testada.

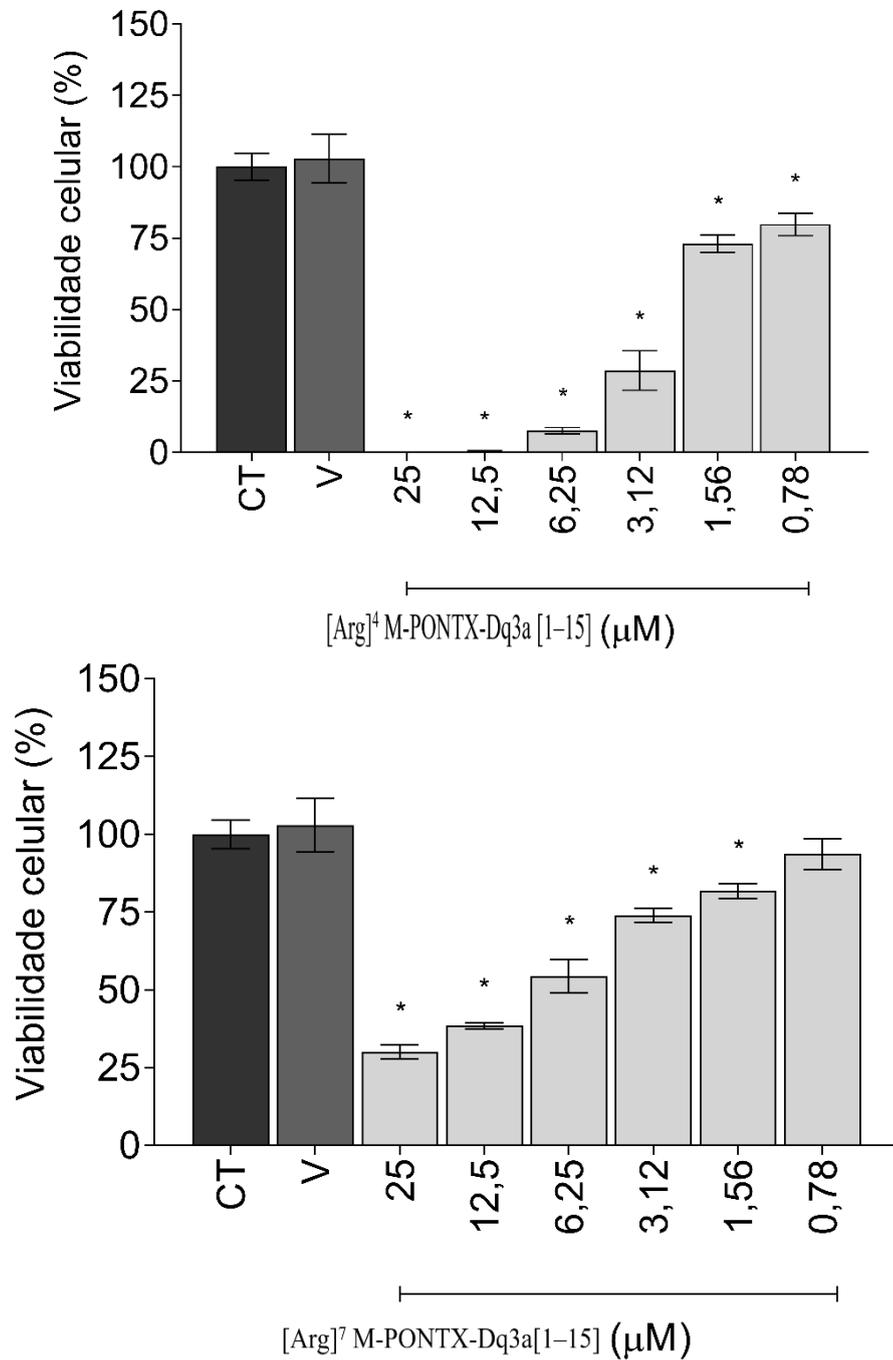
Figura 6 –Viabilidade das células tubulares humanas HK-2 após o tratamento com Ciprofloxacino e Meropeném.



Fonte: O Autor (2024)

Legenda: µM: micromolar; CT: controle; V: veículo.

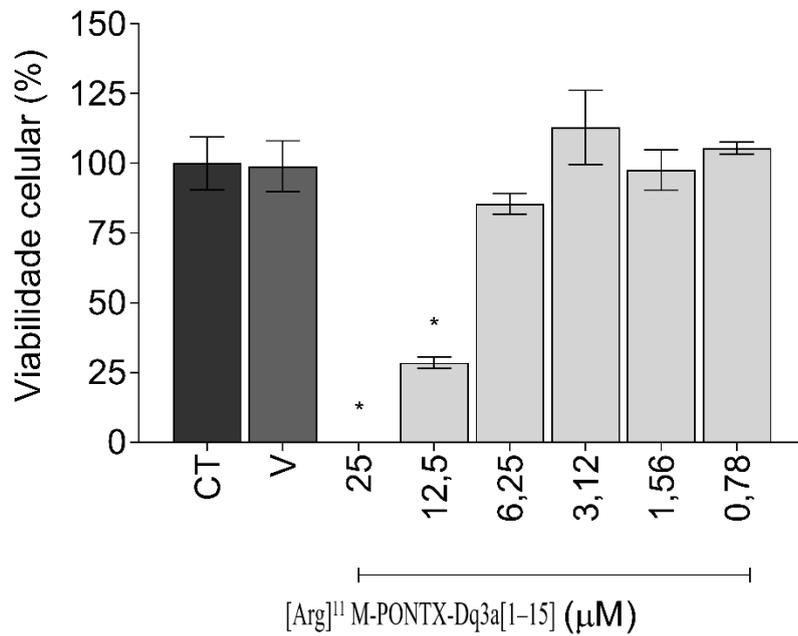
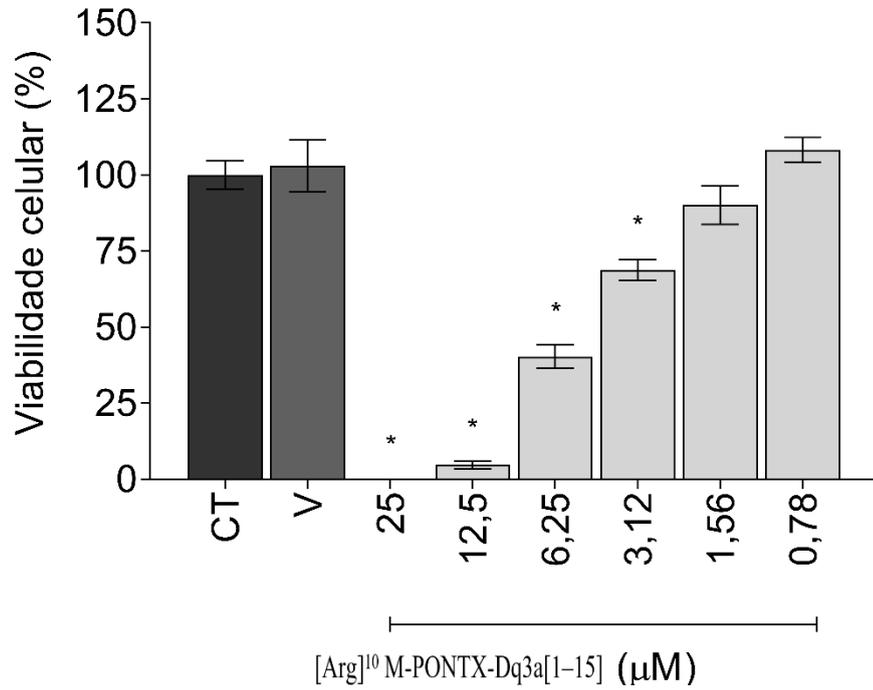
Figura 7 –Viabilidade das células tubulares humanas HK-2 após o tratamento com os peptídeos [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁷ M-PONTX-Dq3a[1–15]



Fonte: O Autor (2024)

Legenda: µM: micromolar; CT: controle; V: veículo.

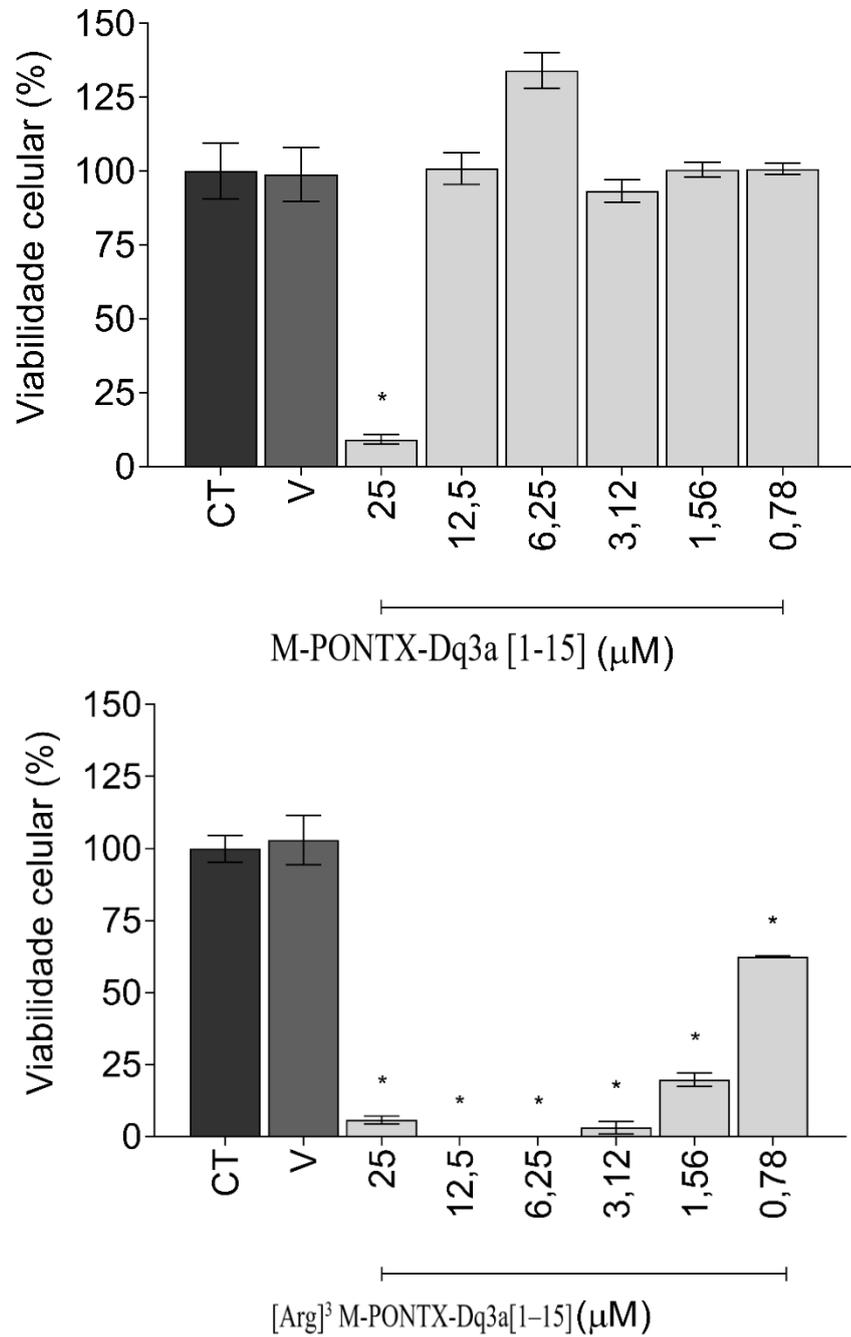
Figura 8 – Viabilidade das células tubulares humanas HK-2 e após o tratamento com [Arg]¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]¹¹ M-PONTX-Dq3a[1–15].



Fonte: O Autor (2024)

Legenda: μM: micromolar; CT: controle; V: veículo.

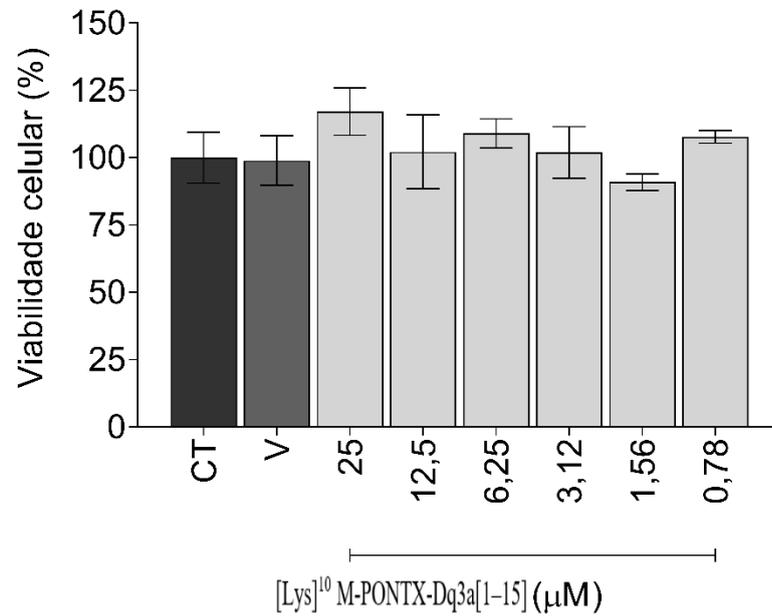
Figura 9 – Viabilidade das células tubulares humanas HK-2 após o tratamento com M-PONTX-Dq3a [1-15] e [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1-15].



Fonte: O Autor (2024)

Legenda: μM: micromolar; CT: controle; V: veículo.

Figura 10 – Viabilidade das células tubulares humanas HK-2 após o tratamento com [Lys]¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1–15].



Fonte: O Autor (2024)

Legenda: μM: micromolar; CT: controle; V: veículo.

7 DISCUSSÃO

Infecções por bactérias gram-negativas, principalmente por Enterobactérias (*E. coli* e *K. pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, têm se tornado uma preocupação crescente em todo o mundo. Previamente foi observada uma redução na sensibilidade aos antimicrobianos para bactérias gram-negativas isoladas em UTIs, (SILVA; OLIVEIRA; FEHLBERG, 2023), o que reforça a preocupação da disseminação de bactérias resistentes e a importância pela busca de novas alternativas terapêuticas.

Assim, neste trabalho investigamos o efeito antimicrobiano de fragmento e análogos da dinoponeratoxina M-PONTXDq3a sobre cepas de bactérias gram-negativas ATCC e clínicas. No presente estudo, PAMs com substituição pontual por arginina (Arg) na posição 3 e 4 apresentaram maior potencial antimicrobiano sobre *E. coli* ATCC 25922. As características físico-químicas dos PAMs influenciam na atividade biológica, logo, PAMs de alta cationicidade são atraídos pelas cargas negativas conferidas pelos fosfolipídeos e lipopolissacarídeos da membrana externa de bactérias gram-negativas (BRODGEN, 2005). Os peptídeos [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] possuem carga líquida positiva (Z) elevada em relação ao peptídeo primário, o fragmento (M-PONTX-Dq3a[1–15]) de +3 para +4, sugerindo o aumento da cationicidade elevou consideravelmente o potencial antimicrobiano dos peptídeos.

Apesar de M-PONTX-Dq3a[1–15] apresentar maiores valores de hidrofobicidade em relação aos peptídeos substituídos por arginina (Arg) na posição 3 e 4, o momento hidrofóbico (μH) dos análogos [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] são mais elevados em relação M-PONTX-Dq3a[1–15], mostrando que para as cepas gram-negativas ATCC testadas o momento hidrofóbico mostra relevância físico-química superior ao valor de hidrofobicidade.

Diferentemente da hidrofobicidade, o momento hidrofóbico é a hidrofobicidade de um peptídeo medida por diferentes ângulos de rotação por resíduo, ou seja, a quantificação da anfipaticidade do peptídeo, onde uma fase da hélice peptídica é hidrofílica e a outra é hidrofóbica (SEGREST *et al.*, 1990). Carmo (2019) também evidenciou que há uma correlação mais direta entre o momento hidrofóbico e a atividade antimicrobiana, assim, ao aumentar o momento hidrofóbico

a atividade antimicrobiana aumenta, assim como foi observado nos peptídeos [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15].

Considerando os valores de CLM obtidos sobre as cepas de bactérias gram-negativas ATCC testadas, foi possível quantificá-los dentro do limite de concentração molar utilizado (100 a 0,78 µM), ou seja, nenhum valor foi determinado devido necessidade de ampliação de faixa de concentração para determinar a CLM. Em Silva Júnior *et al.* (2023) foram testados os mesmos peptídeos utilizados neste estudo, mas para bactérias gram-positivas, porém vários peptídeos apresentaram valores de CLM não identificados, como [Arg]¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1–15], [Arg]¹¹ M-PONTX-Dq3a[1–15], [Lys]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15], [Lys]¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1–15], além do peptídeo primário M-PONTX-Dq3a [1-15], podendo inferir que os peptídeos apresentam maior capacidade de morte sobre bactérias gram-negativas do que para gram-positivas.

De acordo com o ensaio de checkerboard, foram obtidas três combinações sinérgicas de [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15]-Ciprofloxacino e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15]-Ciprofloxacino contra *E. coli* ATCC 25922, duas levaram à redução de 8 vezes a concentração do ciprofloxacino e outra reduziu em 4 vezes esta concentração. Dodou *et al.* (2020) em seu estudo demonstraram a ocorrência de atividade sinérgica entre um peptídeo sintético de dinoponeratoxinas (Dq-3142) e meropeném contra *E. coli* (cepa clínica), obtendo a redução em 4x a concentração do antimicrobiano. Assim, é possível observar que os peptídeos [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] apresentaram um efeito sinérgico considerável em combinação com ciprofloxacino, conseguindo reduzir em até 8x a concentração do antimicrobiano.

Para os ensaios realizados com as cepas clínicas é possível observar resultado coincidente aos das cepas ATCC, pois os peptídeos [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] foram os que apresentaram menores valores de CIM para as cepas clínicas testadas, exceto [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] para *K. pneumoniae*.

Considerando os resultados de CIM e CLM obtidos nos ensaios com cepas ATCC e cepas clínicas, cabe destacar que houve redução dos valores de CIM nas cepas clínicas em relação às cepas ATCC. Os peptídeos [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] apresentaram maior atividade antimicrobiana para cepas clínicas, exceto para *P. aeruginosa*, onde foi observado uma diminuição da CIM apenas para o peptídeo primário (M-PONTX-Dq3a[1–15]). Assim, é importante destacar a importância de encontrar novas alternativas terapêuticas para as infecções bacterianas causadas por cepas clínicas gram-negativas.

Moléculas com potencial antimicrobiano podem apresentar efeitos bacteriostáticos (impedem que os microrganismos se proliferem, mas não os inativa), e bactericidas (impedem o crescimento, multiplicação e capacidade metabólica, inativando o microrganismo) (HALUCH *et al.*, 2020). De acordo com os resultados obtidos neste estudo, o peptídeo [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] apresentou um perfil bactericida tanto para as cepas ATCC quanto para as cepas clínicas, sendo um peptídeo bastante promissor com grande potencial antimicrobiano.

O peptídeo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] apresentou um perfil bactericida e bacteriostático, pois para as cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922 apresentou perfil bacteriostático, mas para *K. pneumoniae* ATCC 700603 foi bactericida. Para as cepas clínicas os resultados de [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] foram distintos das cepas ATCC. Com isso, podem ser sugeridas novas estratégias terapêuticas que combinem os peptídeos antimicrobianos ([Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15]) com antibióticos já disponíveis no mercado farmacêutico, a fim de aumentar a efetividade terapêutica e reduzir o risco de resistência.

Os venenos de himenópteros (formigas, abelhas e vespas), contêm peptídeos curtos que muitas vezes são citolíticos e hemolíticos, além de, microbicida, desgranulador de mastócitos, (CEOLIN MARIANO *et al.*, 2019; ROBINSON *et al.*, 2018; TOUCHARD *et al.*, 2016). Nesse estudo, o peptídeo [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15], apesar de ter se mostrado esse promissor nos ensaios de CIM e CLM contra cepas bacterianas gram-negativas, mostrou ser hemolítico, quando comparado com os antimicrobianos ciprofloxacino e meropeném na concentração de 50 µM. [Arg]³ M-

PONTX-Dq3a[1–15] foi mais tóxico 3 vezes do que o meropeném e duas vezes do que ciprofloxacino,. Em relação ao peptídeo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15], esse também foi um peptídeo promissor em ensaios anteriores, e na atividade hemolítica seguiu mostrando um bom perfil, causando a metade da porcentagem de hemólise, se comparado ao meropeném, na concentração de 50 µM.

Em Monteiro *et al.* (2023), foi avaliado a citotoxicidade dos mesmos peptídeos utilizados no presente estudo em células epiteliais renais isoladas de macaco adulto (LLC-MK2) e foi observado que os peptídeos [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1–15] e [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] foram os mais tóxicos, apresentando uma redução da EC50 em 3,3 vezes para [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e 4,5 vezes para [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1–15] em relação ao fragmento M-PONTX-Dq3a[1–15].

No presente estudo, os dois peptídeos promissores testados apresentaram toxicidade para células renais HK2. O peptídeo [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1–15] foi menos tóxico que o peptídeo [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] para células renais HK-2. O peptídeo [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] foi mais tóxico para células renais, coincidindo com o resultado da sua atividade hemolítica. Comparando com os resultados de ciprofloxacino e meropeném, que são antimicrobianos que já estão disponíveis no mercado e tem toxicidade renal controlada e mensurável, é possível observar que [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] produz níveis de toxicidade elevados em quase todas as concentrações testadas, e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] tem menor toxicidade renal em duas concentrações, 1,56 µM e 0,78 µM, enquanto os antimicrobianos testados não apresentaram toxicidade nas concentrações avaliadas.

É preciso destacar a toxicidade dos peptídeos, devido à influência direta no seu mecanismo de ação. PAMs com efeitos tóxicos claros podem ser classificados em peptídeos de ligação ao receptor e peptídeos ativos na membrana (CHEN; LU, 2020). Em vez de matar diretamente as bactérias alvo, os peptídeos de ligação ao receptor exercem efeito através da modulação do sistema imunológico. Com o aumento da concentração de PAMs, podem surgir efeitos fora do alvo e podem ser desencadeadas doenças inflamatórias crônicas adicionais (TAKAHASHI *et al.*, 2018).

Considerando as características físico-químicas dos peptídeos testados, em um estudo recente de Pedron *et al.* (2020) substituições de Arg foram capazes de aumentar a seletividade contra a cepa de *T. cruzi*, mas o peptídeo substituído por

Lys apresentou maior efeito e índice de seletividade ([Lys]³-M-PONTX-Dq3a[1-15]). Na posição de substituição 3, Lys e Arg apresentaram quase os mesmos parâmetros físico-químicos, porém mostraram grandes diferenças quanto aos seus efeitos biológicos, assim neste estudo o análogo de Lys substituído na posição 3 apresentou pouca atividade antimicrobiana, não sendo selecionado para os estudos posteriores de sinergismo. Já o análogo substituído por Arg apresentou atividade antimicrobiana considerada neste estudo.

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 fosfolipídios carregados negativamente presentes nas membranas do microrganismo (PEDRON *et al.*, 2019). Os análogos substituído por arginina [Arg]³M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1–15] têm uma carga líquida positiva maior em 1 ponto do que M-PONTX-Dq3a[1-15]. Essa mudança aumentou a atividade antimicrobiana dos peptídeos, conforme mostrado nos resultados tanto das cepas ATCC quanto das cepas clínicas, mas também é observado o aumento da citotoxicidade e toxicidade renal, como evidenciado nos ensaios de atividade hemolítica e toxicidade renal.

WLBU2 é um peptídeo catiônico sintético que contém 24 aminoácidos, sendo 13 de arginina, este apresentou um forte efeito antimicrobiano para biofilme de *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*, ambas MDR (ELSALEM *et al.*, 2022). Neste estudo, também foi possível evidenciar a importância do aminoácido arginina na estrutura do peptídeo, para aumento do seu potencial antimicrobiano, provavelmente relacionado ao aumento da carga líquida e do momento hidrofóbico do peptídeo quando há a presença deste aminoácido em maior quantidade e em posições específicas na molécula.

Estudos de *docking* molecular realizados por Monteiro *et al.* (2022) com o objetivo que encontrar os alvos moleculares responsáveis pelo mecanismo de ação antitripanocida dos peptídeos modificados de M-PONTX-Dq3a[1-15], evidenciaram que os peptídeos substituídos com arginina que demonstraram maiores interações com as enzimas testadas foram [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1-15], [Arg]⁷ M-PONTXDq3a[1-15], [Arg]¹⁰ M-PONTX-Dq3a[1-15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15]. Diante disto, é possível pontuar que os peptídeos substituídos por arginina em posições estratégicas representam efeitos antitripanocidas e antimicrobianos

acentuados, considerando ainda as características físico-químicas dos análogos de arginina, das quais valores de cationicidade e hidrofobicidade são elevados em relação aos demais peptídeos, permitindo uma maior interação com a membrana plasmática das bactérias e maior facilidade de penetração à elas, respectivamente, tudo isso é somado para corroborar com os resultados obtidos, demonstrando o maior potencial farmacológico dos peptídeos Arg³ M-PONTX-Dq3a[1-15] e Arg⁴ M-PONTX-Dq3a[1-15].

Apesar de se apresentarem como os peptídeos mais promissores nos ensaios com as cepas ATCC e cepas clínicas, [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a [1–15] tem potencial bastante tóxico tanto para eritrócitos (atividade hemolítica) quanto para células renais do tipo HK-2. Com isso, é possível pensar que ainda seja necessário realizar ajustes estruturais, com a ajuda da tecnologia farmacêutica, como por exemplo, o uso da nanotecnologia, que permite encapsular moléculas, direcionando-as aos alvos terapêuticos de forma mais assertiva e diminuindo a toxicidade/reação adversas causadas pelo seu acúmulo em tecidos não-alvo. Como foi o caso da anfotericina B, que apresentava um potencial nefrotóxico importante, além de outros efeitos colaterais indesejados, a qual foi submetida à veiculação como lipossoma e teve seu efeito terapêutico pronunciado sob os efeitos colaterais (TOLENTINO *et al.*, 2021).

8 CONCLUSÃO

Os peptídeos [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15], apresentaram maior efeito antimicrobiano para as cepas ATCC e clínicas testadas, e a bactéria que apresentou maior sensibilidade foi a *E. coli*. O peptídeo [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] apresentou um perfil bactericida e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] apresentou um perfil bactericida e bacteriostático.

No presente estudo foi observado um efeito sinérgico entre ciprofloxacino e os peptídeos análogos [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] sob cepa de *E. coli* ATCC 25922. Esses resultados abre perspectivas para sugerir peptídeos promissores para combinações com antimicrobianos utilizados no mercado, contribuindo para diminuir a resistência bacteriana ao usar medicamentos com mecanismos de ação distintos e com dose reduzida.

, os peptídeos análogos [Arg]³ M-PONTX-Dq3a[1–15] e [Arg]⁴ M-PONTX-Dq3a[1–15] apresentaram maior efeito terapêutico em relação ao peptídeos parietal, mas apresentaram efeito citotóxico aos eritrócitos e as células renais humanas, assim outras modificações moleculares são necessárias para diminuir a toxicidade destas moléculas. Ademais, poderão ser propostos ajustes estruturais, com a ajuda da tecnologia farmacêutica, permitindo encapsular moléculas, direcionando-as aos alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, G. R. *et al.* Antimicrobial resistance (AMR) is an urgent global health challenge and a critical threat to modern health care. **The Lancet Regional Health – Américas**, [S.l.], v. 25, set. 2023. Disponível em: [https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanam/PIIS2667-193X\(23\)00135-7.pdf](https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanam/PIIS2667-193X(23)00135-7.pdf). Acesso em: 24 jul. 2022.
- ALLANE, D.; OUSSEDIK-OUMEHDI, H.; HARRAT, Z.; SEVE, M.; LARABA-DJEBARI, L. Isolation and characterization of an anti-leishmanial disintegrin from *Cerastes cerastes* venom. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, [S.l.], v. 32, n. 2, 2018. Disponível em: <https://ouci.dntb.gov.ua/en/works/7Xe2BVM4/>.
- ANNA, M. R. *et al.* The antimicrobial peptide SAAP-148 combats drug-resistant bacteria and biofilms. **Sci. Transl. Med**, [S.l.], v. 10, n. 423, 2018.
- AUER, G.; WEIBEL, D. Bacterial Cell Mechanics. **Biochemistry**, [S.l.], v. 56, n. 29, p. 3710-3724, 2017.
- BAHNSEN *et al.* Propriedades antimicrobianas e de penetração celular de análogos de penetratina: efeito da sequência e estrutura secundária. **Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranas**, [S.l.], v. 1828, n. 2, p. 223-232, 2013.
- BOPARAI, J. K.; SHARMA, P. K. Mini review on antimicrobial peptides, sources, mechanism and recent applications. **Protein Pept Lett**, v. 27, n. 1, p. 4-16, 2020.
- CARMO, B. A. **Caracterização estrutural e potencial antimicrobiano, antiparasitário e antiproliferativo de novos peptídeos análogos da stigmurina**. 2019. Dissertação (Mestrado em em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.
- CAVALCANTE, C. S. P. *et al.* Insights into the candidacidal mechanism of Ctn[15-34] - A carboxyl-terminal, crotalicidin-derived peptide related to cathelicidins. **Journal of Medical Microbiology**, [S.l.], v. 67, n. 1, p. 129-138, jan. 2018.
- CHEN, C. H.; LU, T. K. Development and challenges of antimicrobial peptides for therapeutic applications. **Antibiotics (Basel)**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 24, jan. 2020.
- CLEELAND, L.; SQUIRES, E. **Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infections**. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. New York: Willians & Wilkins, 1991. p. 739-788.
- COLOGNA, C. T. *et al.* Comparação peptidômica e caracterização dos principais componentes do veneno da formiga gigante *Dinoponera quadriceps* coletados em quatro diferentes áreas do Brasil. **Jornal de Proteômica**, [S.l.], v. 94, p. 413-422, 2013.

DIENE, S. M. *et al.* Real-time PCR assay allows detection of the New Delhi metallo β -lactamase (NDM-1)-encoding gene in France. **Int. J. Antimicrob Agents**, [S.l.], v. 37, n. 6, p. 544-546, 2011.

DODOU, H. V. L. *et al.* Antimicrobial activity of synthetic Dq-3162, a 28-residue ponicin G-like dinoponeratoxin from the giant ant *Dinoponera quadriceps* venom, against carbapenem-resistant bacteria. **Toxicon**, [S.l.], v. 187, p. 19-28, nov. 2020.

ELSALEM, L. *et al.* WLBU2 antimicrobial peptide as a potential therapeutic for treatment of resistant bacterial. **Turk. J. Pharm. Sci**, [S.l.], v. 19, n. 1, p. 110-116, 2022.

EUCAST. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. **Clinical Microbiology Journal**, [S.l.], v. 9, n. 8, p. 1-7, 2003.

FARKAS, A. *et al.* Consenso internacional sobre diagnóstico e manejo de pacientes pediátricos com angioedema hereditário com deficiência de inibidor de C1. **Alergia**, v. 72, n. 2, p. 300-313, 2017.

FLÓREZ-CASTILLO, J. M. *et al.* Biopolymeric pellets of polyvinyl alcohol and alginate for the encapsulation of Ib-M6 peptide and its antimicrobial activity against *E.coli*. **Heliyon**, [S.l.], v. 5, n. 6, e01872, jun. 2019.

FRATINI *et al.* Veneno de insetos, aracnídeos e centopéias: uma arma poderosa contra bactérias. Uma revisão da literature. **Toxicon**, [S.l.], v. 130, p. 91-103, 2017.

GUILHELMELLI, F. *et al.* Desafios do desenvolvimento de antibióticos: os vários mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos e da resistência bacteriana. **Microbiol Frontal**, [S.l.], v. 9, n. 4, 2013.

HALUCH, S. M. *et al.* Prospecting new antimicrobials and bactericides to combat microorganisms of public health interest. **Braz. J. Anim. Environ. Res.**, [S.l.], v. 3, n. 4, p. 3630-3652, 2020.

HAN, X., *et al.* Interactions of designed trp-containing antimicrobial peptides with DNA of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **DNA Cell Biol.**, [S.l.], v. 40, n. 2, p. 414-424, 2021.

HRISTOVA, K; WIMLEY. W. C. Peptídeos antimicrobianos: sucessos, desafios e questões sem resposta. **J Membr Biol.**, [S.l.], v. 239, p. 27-34, 2011.

KITANO, Y. *et al.* CTX-M group distribution and positivity of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) - Producing Enterobacteriaceae in Urinary Tract Infections in a Tertiary Metropolitan Hospital in Japan. **J. St. Marian. Univ**, [S.l.], v. 11, n. 2, p. 133-141, 2020.

KOEHBACH, J.; CRAIK, D. J. The vast structural diversity of antimicrobial peptides. **Trends Pharmacol Sci.**, [S.l.], v. 40, n. 7, p. 517-528, 2019.

KOULENTI, D.; SONG, A.; ELLINGBOE, A.; ABDUL-AZIZ, M. H.; HARRIS, P.; GAVEY, E.; LIPMAN, J. Infections by multidrug-resistant gram-negative bacteria: What's new in our arsenal and what's in the pipeline? **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.l.], v. 53, n. 3, p. 211-224, 2019.

KWAKMAN, P. H. *et al.* Native thrombocidin-1 and unfolded thrombocidin-1 exert antimicrobial activity via distinct structural elements. **J. Biol. Chem.**, [S.l.], v. 286, n. 50, 2011.

LI *et al.* Pigmentos fúngicos e bacterianos: metabólitos secundários com amplas aplicações. **Frente. Microbiol.**, [S.l.], v. 8, 2017.

LIMA *et al.* Antimicrobial effect of *Dinoponera quadriceps* (Hymenoptera: Formicidae) venom against *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Applied Microbiology**, [S.l.], p. 390-396, 2014.

LIMA, B. D. *et al.* The dinoponeratoxin peptides from the giant ant *Dinoponera quadriceps* display in vitro antitrypanosomal activity. *Biol Chem.*, v. 399, n. 2, p. 187-196, jan. 2018.

LOHNER. Novas estratégias para novos antibióticos: peptídeos direcionados às membranas celulares bacterianas. **Fisiologia Geral e Biofísica**, [S.l.], v. 28, 2009.

MALLAPRAGADA, S. *et al.* Antimicrobial peptides: the miraculous biological molecules. **J. Indian Soc. Periodontol.**, [S.l.], v. 21, n. 6, p. 434-438, 2017.

MONTEIRO *et al.* Rational design of a trypanocidal peptide derived from *Dinoponera quadriceps* venom. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], 2022.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, [S.l.], v. 65, n. 2, p. 55-63, 1983.

MURRAY, C. J. L. *et al.* Carga global da resistência bacteriana aos antimicrobianos em 2019: uma análise sistemática. **Lanceta**, [S.l.], v. 399, p. 629-655, 2022.

NAKASE *et al.* Entrega intracelular eficiente de produtos farmacêuticos de ácido nucleico usando peptídeos de penetração celular. **Ac. Química. Res.**, [S.l.], v. 45, n. 7, p. 1132-1139, 2012.

NGUYEN, H. T. *et al.* O escopo crescente das estruturas peptídicas antimicrobianas e seus modos de ação. **Tendências em Biotecnologia**, [S.l.], v. 29, n. 9, p. 464-72, 2011.

NGUYEN, H. T. *et al.* Human caspase-4 mediates noncanonical inflammasome activation against gram-negative bacterial pathogens. **Immunology and Inflammation**, [S.l.], v. 112, n. 21, p. 6688-6693, 2015.

NÔGA, E. J. *et al.* A diverse family of host-defense peptides (piscidins) exhibit specialized anti-bacterial and anti-protozoal activities in fishes. **PLOS ONE**, 2016.

OLIVEIRA, J. W. A.; PAULA, C. C. Bactérias gram-negativas multirresistentes: revisão sobre os desafios e demais discussões. **Carderno de publicações Univag**, [S.l.], n. 11, 2021.

OLIVEIRA, M. E. F. *et al.* Resistance of non-fermenting Gram-negative bacilli isolated from blood cultures from an emergency hospital. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.l.], p. 87-91, 2017.

OLSON, L. *et al.* Pseudin-2: An Antimicrobial Peptide with Low Hemolytic Activity from the Skin of the Paradoxical Frog. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, [S.l.], v. 288, n. 4, p. 1001–1005, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antibióticos**. 2017. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/27-2-2017-oms-publica-lista-bacterias-para-quais-se-necessitam-novos-antibioticos>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, **Relatório global de resistência antimicrobiana e sistema de vigilância de uso Antimicrobiano**. 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/9-12-2022-relatorio-sinaliza-aumento-da-resistencia-antibioticos-em-infeccoes-bacterianas>.

PAES, C. F. *et al.* Exploring the neuroprotective potential of antimicrobial peptides from *Dinoponera quadriceps* venom against pentylenetetrazole-induced seizures in vivo. **Toxicon**, [S.l.], v. 237, 2024.

PEDRON *et al.* O efeito das substituições de lisina nas atividades biológicas do peptídeo do veneno de escorpião VmCT1. **Revista Europeia de Ciências Farmacêuticas**, [S.l.], v. 136, 2019.

PRATES, M. V. *et al.* Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. **PLOS one**, [S.l.], v. 14, 2020.

RAMESHA, B. *et al.* Biodiversidade e quimiodiversidade: perspectivas futuras na bioprospecção. **Current Drug Targets**, [S.l.], v. 12, n. 11, p. 1515-1530, 2011.

RICE; WERESZCZYNSKI. Sondando os efeitos díspares dos resíduos de arginina e lisina na associação peptídeo antimicrobiano/bicamada. **Biochim Biophys Acta Biomembr.**, [S.l.], v. 10, p. 1941-1950, 2017.

ROCHA. *et al.* *Dinoponera quadriceps* venom as a source of active agents against *Staphylococcus aureus*. **Toxicon**, [S./], v. 189, p. 33-38, 2021.

RODRÍGUEZ VERDUGO *et al.* Compounding Effects of Climate Warming and Antibiotic Resistance. **iScience**, [S./], v. 23, 2020.

SCHIBLI *et al.* Structure-Function Analysis of Tritrpticin Analogs: Potential Relationships between Antimicrobial Activities, Model Membrane Interactions, and Their Micelle-Bound NMR Structures. **Biophysical Journal**, [S./], v. 91, 2006.

SCHMIDT *et al.* Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. **Rev. Saúde Pública**, [S./], v. 46, n. 1, 2012.

SEGREST, J. P. *et al.* Amphipathic helix motif: classes and properties. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S./], v. 8, n. 2, p. 103-117, 1990.

SHIN, S.; LIM, S. Atividade antibiótica e análise estrutural do peptídeo antimicrobiano derivado de escorpião IsCT e seus análogos. **Comunicações de pesquisa bioquímicos e biofísicos**, [S./], v. 323, n. 2, p. 712-719, 2004.

SILVA, A. C. R.; OLIVEIRA, M. H.; FEHLBERG, L. C. C. Programação de liderança e vigilância em testes antimicrobianos (Atlas): Análise retrospectiva de 5 anos do perfil de sensibilidade de bactérias gram-negativas isoladas em UTIs no Brasil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [S./], v. 27, n. 1, 2023.

SILVA JÚNIOR, P. N. *et al.* Effect from dinoponeratoxin M-PONTXDq3a arginine and lysine substituted analogues against *Staphylococcus aureus* strains. **Toxicon**, [S./], v. 231, p.107190. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37301297/>. Acesso em: 22 abr. 2022.

SOARES, J. M.; YAKOVLEV, V. V.; BLANCO, K. C.; BAGNATO, V. S. Recovering the susceptibility of antibiotic-resistant bacteria using photooxidative damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S./], v. 120, n. 39, 2023.

SOUSA *et al.* Efeito antiparasitário do veneno da formiga gigante *Dinoponera quadriceps*. **Toxicon**, [S./], v. 120, p. 128-132, 2016.

STEWART, A. G. *et al.* Molecular Epidemiology of Third-Generation-Cephalosporin Resistant Enterobacteriaceae in Southeast Queensland, Australia. **Antimicrob. Agents Chemother**, [S./], v. 65, n. 6, 2021.

SUN, H. *et al.* Synthesis, self-assembly, and biomedical applications of antimicrobial peptide-polymer conjugates. **Biomacromolecules**, [S./], v. 19, n. 6, p. 1701–1720, 2018.

TAKAHASHI, T. *et al.* A catelicidina promove a inflamação ao permitir a ligação do próprio RNA aos receptores necrófagos da superfície celular. **Ciência. Rep.**, [S.l.], 2018.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Prog Lipid Res**, [S.l.], v. 51, n. 2, p. 149-177, 2012.

TOLENTINO, N. L. B. **Sistemas lipossomais para administração de antibióticos: artigo de revisão**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Inhumas. Monte Alegre, 2021.

TORRES, M. D. T. *et al.* Dinâmica molecular para descoberta de peptídeos antimicrobianos. **ASM Journals**, [S.l.], v. 89, n. 4, 2021.

TORRES, M. *et al.* Aspectos gerais do uso de antimicrobianos e sua interação com o meio ambiente: um problema emergente. **Compend. cienc.**, San Lorenzo, v. 2, p. 24-37, dez. 2019.

VILELA, D. A. **Prospecção de peptídeos antimicrobianos na peçonha do escorpião *Tityus obscurus***, 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2022.

WANG, H. *et al.* BF-30 selectively inhibits melanoma cell proliferation via cytoplasmic membrane permeabilization and DNA-binding in vitro and in B16F10-bearing mice. **Eur. J. Pharmacol.**, [S.l.], v. 707, n. 3, p. 1-10, 2013.

XUANA *et al.* Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. **Drug Resistance Updates**, v. 68, 2023.

ZAKUAN, Z.; SURESH, K. Rational use of intravenous polymyxin B and colistin: A review. **Med J Malaysia**, [S.l.], v. 73, n. 5, p. 351-359, 2018.

ZAMORA-CARRERAS *et al.* A varredura de alanina e a análise de RMN de 2 H do peptídeo ativo na membrana BP100 apontam para um mecanismo de ação de tapete distinto. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranas**, [S.l.], v. 1858, n. 6, p. 1328-1338, 2016.

ZHANG, W. *et al.* Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. **Molecules**, [S.l.], v. 27, 2022.