

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós- Graduação em Bioquímica e Imunologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JOAQUIM TEIXEIRA DE AVELAR JÚNIOR

Estudo de três peptídeos sintéticos
com atividade antimicrobiana,
derivados da toxina
LyeTx I da aranha
Lycosa erythrognatha (Lucas, 1836)

Belo Horizonte MG - Brasil
Abril - 2015

Joaquim Teixeira De Avelar Júnior

Estudo de três peptídeos sintéticos
com atividade antimicrobiana,
derivados da toxina
LyeTx I da aranha
Lycosa erythrognatha (Lucas, 1836)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia

Coorientador: Dr. Daniel Moreira dos Santos

Belo Horizonte MG - Brasil
Abril - 2015

043

Avelar Júnior, Joaquim Teixeira de.

Estudo de três peptídeos sintéticos com atividade antimicrobiana, derivados da toxina LyeTx I da aranha *Lycosa erythrognatha* (Lucas, 1836) [manuscrito]
Joaquim Teixeira de Avelar Júnior. – 2015.

102 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia. Coorientador: Dr. Daniel Moreira dos Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Doenças Transmissíveis. 3. Anti-Infeciosos. 4. Peptídeos. I. Garcia, Maria Elena de Lima Perez. II. Santos, Daniel Moreira dos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JOAQUIM TEIXEIRA DE AVELAR JÚNIOR. Aos dezessete dias do mês de abril de 2015 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Estudo de três peptídeos sintéticos com atividade antimicrobiana, derivados da toxina LyeTx I da aranha *Lycosa erythrognatha* (Lucas,1836) ", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Maria Elena de Lima Perez Garcia, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Vera Lúcia dos Santos (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Valbert Nascimento Cardoso (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Daniel Moreira Santos Co-orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Maria Elena de Lima Perez Garcia - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 17 de abril de 2015.

Vera Lúcia dos Santos

Dra. Vera Lúcia dos Santos (UFMG)

Valbert Nascimento Cardoso

Dr. Valbert Nascimento Cardoso (UFMG)

Jader dos Santos Cruz
 Prof. Jader dos Santos Cruz
 Coordenador de Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

Daniel Moreira Santos

Dr. Daniel Moreira Santos Co-orientador (UFMG)

Maria Elena de Lima Perez Garcia

Dr. Maria Elena de Lima Perez Garcia - Orientadora (UFMG)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por todas as oportunidades dadas que tornaram possível chegar a este ponto, aonde cheguei.

Agradeço à minha mãe por todo o apoio que me tem dado desde a infância, incentivando-me sempre a estudar, e por toda sua ajuda logística.

Agradeço à minha orientadora, a Doutora professora Maria Elena de Lima, por ter aberto as portas de seu laboratório e pelas oportunidades de trabalho por ela oferecidas, bem como pela confiança depositada em minha pessoa, para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu coorientador, Doutor Daniel Santos, por toda paciência e boa vontade em auxiliar-me em todos os pontos deste trabalho, seja de forma direta ou indireta, pelas discussões a respeito dos resultados obtidos, e pelo aprendizado a respeito dos peptídeos antimicrobianos.

Agradeço aos colaboradores deste trabalho, sem os quais seria impossível ter chegado ao final:

- À Karla Gusmão pela boa vontade em ensinar-me a síntese química de peptídeos e pela ajuda com os experimentos de difração circular, e ao Doutor professor Jarbas Resende, por abrir a porta do Laboratório de síntese e estrutura de peptídeos (LASEP) de tão bom grado, e pela disposição em discutir os resultados, sempre.
- Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia Oral e de Anaeróbios, pela simpatia e cortesia ao me receberem, e pela gentileza. Nominalmente, à Patrícia Oliveira (Paty) por ter, com bom humor, ensinado-me a realizar os experimentos com bactérias e pelas discussões dos resultados obtidos. Aos professores e doutores Luiz Macedo Farias e Paula Prazeres, pela boa vontade e interesse neste trabalho, deixando a estrutura do seu laboratório sempre à nossa disposição.
- Ao pessoal do Laboratório Interação Microrganismo-Hospedeiro pela hospitalidade em seu laboratório, como a Rosana Cruz, por ter auxiliado com os ensaios com os fungos e pela ajuda em entender o teste de Friedman. À Doutora professora Patrícia Cisalpino, pela simpatia e humildade, desde quando ela me deu aulas na graduação e, por abrir seu laboratório para realização de parte deste trabalho.

Agradeço aos que me auxiliaram neste trabalho de alguma forma, como o Filipe do LASEP pelas discussões a respeito da síntese e, claro, pelas dicas quanto ao teste de Kaiser. À Carol Peconvick, pela ajuda com as dezenas de placas de Petri e por autoclavar material quando necessário. À Patrícia Campi (Paty Campi) e à técnica Gilvania, por sempre que faltava algum material ajudar no seu preparo. Ao Paulo Alexandre, pelas discussões e sugestões de tratamento estatístico, em especial nos testes de hemólise e, claro, pela amizade desde a época de BASES. À Doutora professora Míriam Tereza Paz Lopes e ao pessoal do LSAT pela boa vontade em disponibilizar o uso da centrífuga e do leitor de ELISA, para os testes de hemólise. Ao Doutor professor Carlos Salas por disponibilizar seu HPLC para as purificações necessárias. À Thaís Magalhães, do Laboratório de Microbiologia, pelos auxílios nas leituras de OD dos microrganismos, bem como por disponibilizar tubos para tais

leituras e, claro, a Doutora professora Maria Aparecida de Resende por gentilmente disponibilizar o uso deste aparelho em seu laboratório. Aos integrantes do LVTA, pelos auxílios, seja em experimentos, seja em discussões a respeito de resultados, além da grande amizade, nesses 3 anos. À Andrea Fonseca, pelo bom ânimo constante, e pelas discussões e sugestões dadas a respeito deste trabalho. Ao Yuri do departamento de Química, por disponibilizar nitrogênio líquido sempre que necessário, ao Jamil por sempre ter um espaço no liofilizador e a ao Doutor professor Jader Cruz, por gentilmente disponibilizar um exemplar de seu artigo, a respeito do estudo com a peçonha da aranha *Lycosa*. Aos técnicos do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Eneida e Elimar, por sempre colherem água milli-Q para os experimentos. Ao Julinho do LVTA, pela boa vontade em ajudar em alguns experimentos, bem como na resolução de alguns "pepinos" burocráticos. Às faxineiras que sempre deixaram o ambiente limpo e agradável para se trabalhar.

Agradeço aos que de alguma forma deram apoio, como a Mariane Izabella, Lucas Dhom e Virgílio. Aos funcionários, como o Orlando e a Rízia, que, no exercício de suas respectivas funções administrativas, sempre me auxiliaram, de forma gentil e competente para o bom termo da construção deste trabalho.

Agradeço também aos integrantes da banca, Doutora professora Rafaela Salgado Ferreira, Doutor professor Valbert Nascimento Cardoso e à Doutora professora Vera Lúcia dos Santos por aceitarem o convite e poderem contribuir para a discussão deste trabalho.

E claro, agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPEMIG e ao INCTTOX, pelos recursos financeiros necessários para o desenvolvimento deste trabalho, bem como ao Departamento de Bioquímica e Imunologia pela oportunidade de estudo, disponibilizada.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.
(Albert Einstein)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotografias de microscopia	1
Figura 2: Múmia do Médio Egito (a) de onde foram encontrados vestígios de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . (b) Mosaico de Justiniano I.....	3
Figura 3: Prevalência de usuários de drogas injetáveis	4
Figura 4: Fotografias obtidas por microscopia	5
Figura 5: Fungo <i>Cryptococcus neoformans</i>	7
Figura 6: Tomografia apresentando uma lesão no cerebelo.....	8
Figura 7: Foto dos microbiologistas (a) Paul Ehrlich e (b) Alexander Fleming	10
Figura 8: Linha do tempo	11
Figura 9: Linha do tempo	12
Figura 10: Estrutura base das penicilinas.	14
Figura 11: Estrutura de alguns aminoglicosídeos.....	15
Figura 12: Estrutura de alguns glicopeptídeos.	16
Figura 13: Estrutura de alguns macrolídeos conhecidos.	17
Figura 14: Fórmula estrutural da (a) 7-clorotetraciclina, (b) 5-hidroxitetraciclina, (c) tetraciclina e (d) da metaciclina.....	19
Figura 15: (a) Alguns exemplos de sulfonamidas. Microbiologista Gerhard Domagk (b)	20
Figura 16: Antifúngicos que interferem na via de biossíntese do ergosterol	21
Figura 17: Exemplos de antifúngicos azólicos.....	22
Figura 18: Exemplos de antifúngicos da classe dos polienos.....	23
Figura 19: Exemplos de fármacos das classes das alilamidas (a), equinocandinas (b) e 5-fluorocitosina (c).....	24
Figura 20: Mariposa <i>Hyalophora cecropia</i>	26
Figura 21: <i>Xenopus laevis</i>	27
Figura 22: Exemplos de peptídeos antimicrobianos com enovelamento em α -hélice....	30
Figura 23: Exemplos de peptídeos antimicrobianos com estrutura de folha- β	31
Figura 24: Peptídeos antimicrobianos com estruturação randômica.....	31
Figura 25: Mecanismos de ação encontrados em peptídeos antimicrobianos.	33
Figura 26: Aranha <i>Lycosa erythrognatha</i>	35
Figura 27: Estrutura de RMN obtida por Santos et al do peptídeo LyeTx I.....	36

Figura 28: Espectros de massas obtidos em espectrômetro de massas MALDI-ToF, referentes aos produtos brutos de síntese..	50
Figura 29: Cromatogramas da purificação dos peptídeos sintéticos..	51
Figura 30: Espectros de massas obtidos em espectrômetro de massas MALDI-TOF, referentes as frações purificadas dos produtos de síntese.....	52
Figura 31: Representação em código de cores dos testes estatísticos de Friedman realizados entre os MICs das bactérias estudadas..	55
Figura 32: Atividade hemolítica dos peptídeos LyeTxImn, LyeTxImnΔKAc, LyeTxImnΔK e LyeTx I.....	58
Figura 33: Gráfico apresentando as curvas concentração-resposta dos peptídeos estudados, complexados com hidróxiopril-β-ciclodextrina, com relação à suas atividades hemolíticas.....	61
Figura 34: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImn em diferentes porcentagens de TFE..	63
Figura 35: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImnΔK em diferentes porcentagens de TFE.....	63
Figura 36: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImnΔKAc em diferentes porcentagens de TFE.....	64
Figura 37: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImn em diferentes concentrações de SDS..	64
Figura 38: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImnΔK em diferentes concentrações de SDS.....	65
Figura 39: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImnΔKAc em diferentes concentrações de SDS.....	65
Figura 40: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImn em diferentes concentrações de DPC.....	66
Figura 41: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImnΔK em diferentes concentrações de DPC.....	66
Figura 42: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImnΔKAc em diferentes concentrações de DPC.....	67
Figura 43: Deconvolução dos espectros de dicroísmo circular das diferentes porcentagens de TFE dos peptídeos minimizados.....	68
Figura 44: Deconvolução dos espectros de dicroísmo circular das diferentes concentrações de SDS dos peptídeos minimizados.....	68

Figura 45: Deconvolução dos espectros de dicroísmo circular das diferentes concentrações de DPC dos peptídeos minimizados..	69
Figura 46: Diagramas de α -hélice de wheel dos peptídeos estudados.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de patologias bacterianas	2
Tabela 2: Exemplos de peptídeos antimicrobianos	29
Tabela 3: Amostras microbianas utilizadas para os experimentos.....	45
Tabela 4: Cepas fúngicas utilizadas para os experimentos.....	46
Tabela 5: Concentrações utilizadas para os experimentos de dicroísmo circular	49
Tabela 7: Rendimentos na forma de porcentagem	53
Tabela 8: MICs dos peptídeos estudados contra bactérias	54
Tabela 9: MBCs dos peptídeos estudados contra bactérias.....	54
Tabela 10: MICs dos peptídeos estudados contra fungos.....	57
Tabela 11: CFMs dos peptídeos estudados contra fungos.....	57
Tabela 12: Relação de LD ₅₀ , MHC e significância estatística	59
Tabela 13: MICs dos peptídeos complexados em hidróxiopropil-β-ciclodextrina contra fungos	60
Tabela 14: CFMs dos peptídeos complexados em hidróxiopropil-β-ciclodextrina contra fungos	60
Tabela 15: Relação de LD ₅₀ , MHC e significância estatística	62
Tabela 16: Valores dos índices terapêuticos	72
Tabela 17: Valores de índice terapêutico contra fungos dos peptídeos em estudo puros ou em complexos com HP-β-CD.....	75

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE ABREVIACÕES.....	X
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. DOENÇAS INFECCIOSAS.....	1
1.1.1. Micoses.....	3
1.1.2. Fungos do gênero <i>Cryptococcus</i>	6
1.2. ANTIMICROBIANOS.....	10
1.2.1. Antibacterianos ou antibióticos.....	12
1.2.2. Antifúngicos.....	20
1.3. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS.....	26
1.3.1. Diversidade de peptídeos antimicrobianos.....	28
1.3.2. Estrutura dos peptídeos antimicrobianos.....	30
1.3.3. Mecanismo de ação.....	32
1.4. A ARANHA <i>Lycosa erythrognatha</i>	35
2. OBJETIVOS	37
2.1. OBJETIVO GERAL.....	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. MATERIAL.....	38
3.1.1. Equipamentos:.....	38
3.1.2. Reagentes:.....	39

3.1.3. Material biológico:	40
3.2. MÉTODOS	41
3.2.1. Síntese dos peptídeos em fase sólida	41
3.2.2. Análise de espectrometria de massas	42
3.2.3. Purificação dos peptídeos sintéticos	43
3.2.4. Ensaio de atividade antimicrobiana	44
3.2.5. Ensaio de atividade hemolítica	46
3.2.6. Formulação dos peptídeos em ciclodextrina	47
3.2.7. Dicroísmo circular	47
3.2.8. Análise diagramática de alfa hélice	48
4. RESULTADOS	49
4.1. SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA	49
4.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	53
4.2.1. Atividade antibacteriana	53
4.2.2. Atividade antifúngica	56
4.3. ENSAIO DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA	58
4.4. ATIVIDADE ANTIFUNGICA DOS PEPTÍDEOS EM CICLODEXTRINA	59
4.5. ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS PEPTÍDEOS EM CICLODEXTRINA ..	61
4.6. DICROÍSMO CIRCULAR.....	62
4.7. ANÁLISE DIAGRAMÁTICA DE ALFA HÉLICE	69
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÃO	77
7. PERSPECTIVAS	79
8. REFERÊNCIAS	80
ANEXOS	88

RESUMO

Doenças infecciosas é uma significativa causa de morte e, infecções bacterianas aparecem entre as 10 principais causas de mortes no mundo. Os fungos também podem causar graves infecções, especialmente em pessoas imunossuprimidas. No entanto, apesar de existir um grande arsenal de antimicrobianos como os antibacterianos e antifúngicos é importante o desenvolvimento de novos fármacos, considerando-se o aparecimento de linhagens resistentes aos medicamentos existentes. Os peptídeos com atividade antimicrobiana, encontrados em diversos organismos multicelulares, são potenciais candidatos para modelos de novos antibióticos. Neste trabalho o peptídeo antimicrobiano denominado LyeTx I, obtido da peçonha da aranha *Lycosa erythrognatha*, foi utilizado como modelo de estudo. Sintetizou-se, pelo método de Fmoc, um peptídeo representando parte da sequência de LyeTx I, mas com diferentes modificações, obtendo-se três diferentes derivados: LyeTxImn, LyeTxImnΔK e LyeTxImnΔKAc. Estes peptídeos derivados apresentaram diferentes atividades antimicrobianas, bem como diferentes atividades hemolíticas. Esta última é um importante indicador da atividade dos peptídeos antimicrobianos em células de mamífero, isto é, peptídeos com alta atividade hemolítica em geral não são bons candidatos para antibióticos. Dos peptídeos derivados obtidos, somente LyeTxImnΔK foi mais eficaz do que o peptídeo original, LyeTx I, quando seus índices terapêuticos foram comparados. Investigou-se ainda, a estruturação desses peptídeos em meios miméticos tais como trifluoretanol, dodecil sulfato de sódio e dodecil fosfocolina, sendo encontrado padrões de estruturação condizentes com perfis de α -hélice, semelhante ao peptídeo LyeTx I original. Em conclusão, obtivemos por síntese química, um peptídeo menor, derivado da estrutura da toxina original (LyeTxI), com mais alta atividade para alguns fungos e bactérias, menos hemolítico bem como, com menor custo de produção, características fundamentais para um candidato a novo fármaco.

Palavras-chaves: *Lycosa erythrognatha*, peptídeos antimicrobianos, novos fármacos, fungos, bactérias

ABSTRACT

Infectious disease is one big cause to death, where bacterium infections show among some 10 mainly death's causes in the world. Fungi can cause severe diseases too, particularly in immunosuppressed people. However, although there are a vast antimicrobial arsenal, as antibiotics antimicrobials and antimycotic against fungi is important to develop new medicines, considering the growing of resistance by microorganisms. Antimicrobial peptides found in many multicellular organisms could be good candidates to this aim. In this work, the antimicrobial peptide, LyeTx I, from the spider *Lycosa erythrognatha*'s venom was used as a model. Part of this molecule (LyeTxI minimized) was synthesized by the Fmoc method. Three derivatives were obtained: LyeTxImn, LyeTxImn Δ K and LyeTxImn Δ KAc. They showed different antimicrobial activities as well as different hemolytic activities. This last activity is an important indicator to verify if the antimicrobial peptide is also active in cells from mammals. A high hemolytic activity is not a good indicator for a peptide as a good antibiotic. But only LyeTxImn Δ K was more effective than the native peptide (LyeTx I), when compared therapeutic index among them. The structuration of these peptides was also investigated in mimetic media such as trifluoroethanol, sodium dodecyl sulfate and dodecyl phosphocholine, being found structuration patterns consistent with α -helix profiles, similar to the original peptide LyeTx I. Therefore, was possible the synthesis of a peptide derivative from the a spider toxin LyeTxI with higher antimicrobial activities, as well as with lower production cost, some, essential characteristics to a candidate to newtherapeutic drugs.

Keywords: *Lycosa erythrognatha*, antimicrobial peptides, new medicines, fungi, bacteria

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇAS INFECCIOSAS

Doenças infecciosas são causadas por patógenos tais como fungos, bactérias ou vírus. Alguns dos primeiros agentes infecciosos descritos foram descobertas por Robert Koch no século XIX, onde a sua teoria dos germes substituiu a teoria do miasma, a qual propunha que o ar contaminado por certos odores fétidos seriam responsáveis pelas doenças infecciosas (Maheu-Giroux, 2014). Porém, com as descobertas de Koch sobre os agentes etiológicos da tuberculose, do carbúnculo (antraz), do cólera (Figura 1), entre outras doenças, a teoria do germe da doença tornou-se aceita como explicação para diversas doenças, no caso para aquelas causadas por patógenos, que satisfazem os Postulados de Henle-Koch (Evans, 1976).

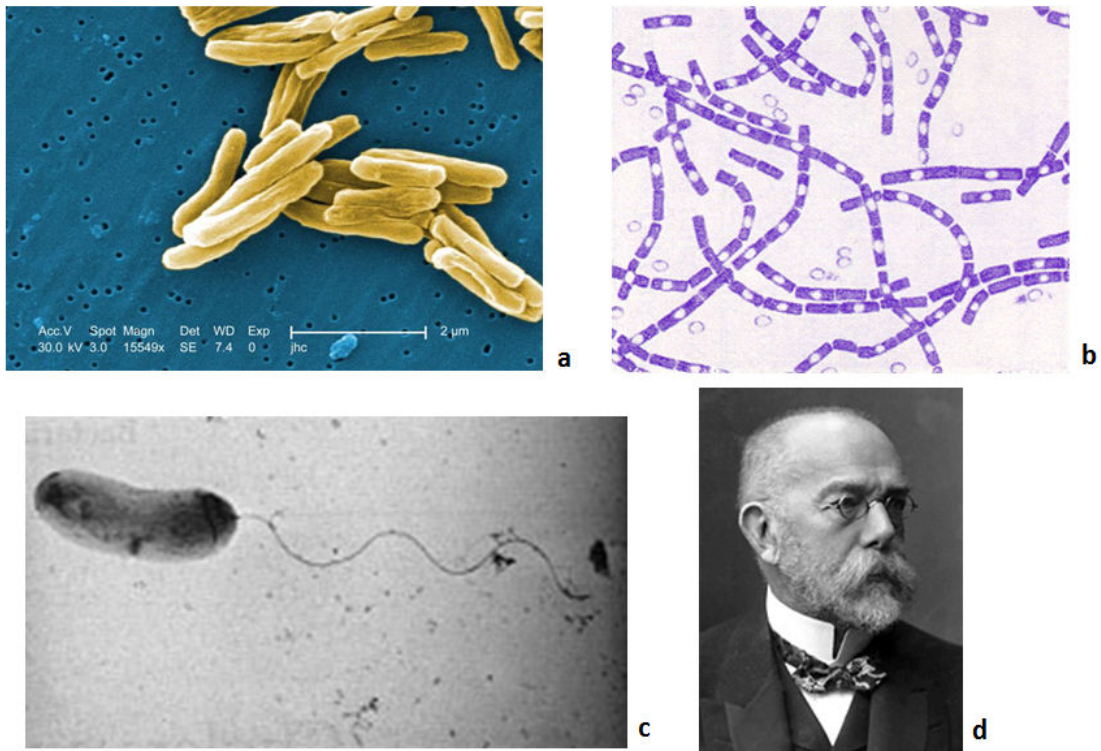


Figura 1: Fotografias de microscopia apresentando os agentes etiológicos da tuberculose (a), do antraz (b) e do cólera (c) descobertos por Robert Koch (d) no século XIX. Fontes: <http://textbookofbacteriology.net> e http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/

Bactérias são os principais patógenos humanos, sendo responsáveis por algumas das 10 principais causas de mortes no mundo (WHO, 2012). Diversas bactérias causam um grande número de doenças infecciosas tais como, a escarlatina e febre reumática causadas por *Streptococcus pyogenes*, algumas pneumonias que são causadas por *Streptococcus pneumoniae*, alguns tipos de dores de garganta que são causadas por *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pyogenes* (Madigan; Martinko; Parker, 2004). Algumas bacterioses são apresentadas na Tabela 1, que mostra também a data de descoberta da bactéria causadora.

Tabela 1: Exemplos de patologias bacterianas e suas respectivas datas de descoberta

Doença	Agente etiológico	Ano de descoberta
Hanseníase (lepra)	<i>Mycobacterium leprae</i>	1873
Carbúnculo (antraz)	<i>Bacillus anthracis</i>	1877
Gonorréia	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1879
Febre tifoide	<i>Salmonella typhi</i>	1880
Tuberculose	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1882
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>	1883
Difteria	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1883
Tétano	<i>Clostridium tetani</i>	1884
Algumas meningites	<i>Neisseria meningitidis</i>	1887
Gangrena	<i>Clostridium perfringens</i>	1892
Peste	<i>Yersinia pestis</i>	1894
Sífilis	<i>Treponema pallidum</i>	1903

Fonte: Madigan; Martinko; Parker, 2004

Até o século XIX doenças infecciosas, como as causadas por bactérias, mataram milhões de pessoas. Muitas doenças podem ter coexistido em eras antigas, como a tuberculose, que pode ter estado presente no Médio Egito (Figura 2a), em um período entre 4000 e 3000 anos atrás (Zink *et al*, 2003). A peste possui relatos muito antigos como no caso da praga de Justiniano que, possivelmente, foi uma epidemia de peste causada por *Yersinia pestis* entre 541 e 544 DC no Império Bizantino, durante o reinado de Justiniano I (Figura 2b) (Drancourt; Houhamdi & Raoult, 2006) ou a peste negra que assolou a Europa na Idade Média e que talvez também tenha sido causada por *Yersinia pestis*, apesar de haver muitos questionamentos a respeito deste agente etiológico ser o mesmo da peste descrita por Alexandre Yersin em 1894 (Titball, 2004).



Figura 2: Múmia do Médio Egito (a) de onde foram encontrados vestígios de *Mycobacterium tuberculosis*. (b) Mosaico de Justiniano I (482-565) do Império Bizantino que governou de 527 até sua morte, o Império Romano do Oriente e enfrentou durante o seu reinado em 541 a 544 uma epidemia de peste em seu Império. Fonte: Basílica de São Vital, Ravena, Itália, extraído de <http://pt.wikipedia.org> em 10/02/2015.

1.1.1. Micoses

As micoses são doenças causadas por fungos que, frequentemente, aproveitam-se de hospedeiros com um estado imune alterado seja por outro patógeno, por desnutrição ou devido a imunossupressão. Uma das formas mais comuns de imunossupressão deve-se ao vírus HIV que acomete cerca de 35,3 milhões de pessoas em todo o mundo e, no mínimo, 530 mil no Brasil (UNAIDS, 2013).

Outra forma de imunossupressão deve-se ao abuso de drogas recreativas as quais desregulam o sistema imune, e, alguns estudos já apresentaram relações entre o uso de drogas e a prevalência de doenças infecciosas, sejam causadas por bactérias, tais como *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas spp*; por fungos como *Candida spp*; ou vírus como os da hepatite A, B e C ou o HIV. Diversas drogas podem causar este problema de imunorregulação tais como os opióides derivados da papoula, a maconha, cocaína, o cigarro comum e

até mesmo o álcool (Friedman; Newton & Klein, 2003). O uso de drogas injetáveis por pacientes HIV positivos, apesar de ter sido reduzido, ainda é bastante preocupante, e 1,6 milhões de pessoas encontram-se nesta situação de risco dobrado para imunossupressão e, conseqüentemente, o desenvolvimento infecções fúngicas. No entanto, o número de pessoas sob o risco somente do abuso de drogas é muito maior, entre 167 e 315 milhões de pessoas no mundo o que corresponde à 3,6% e 6,9% de toda a população adulta mundial (UNODC, 2013), sendo apresentado na Figura 3a prevalência mundial do uso somente de drogas injetáveis.

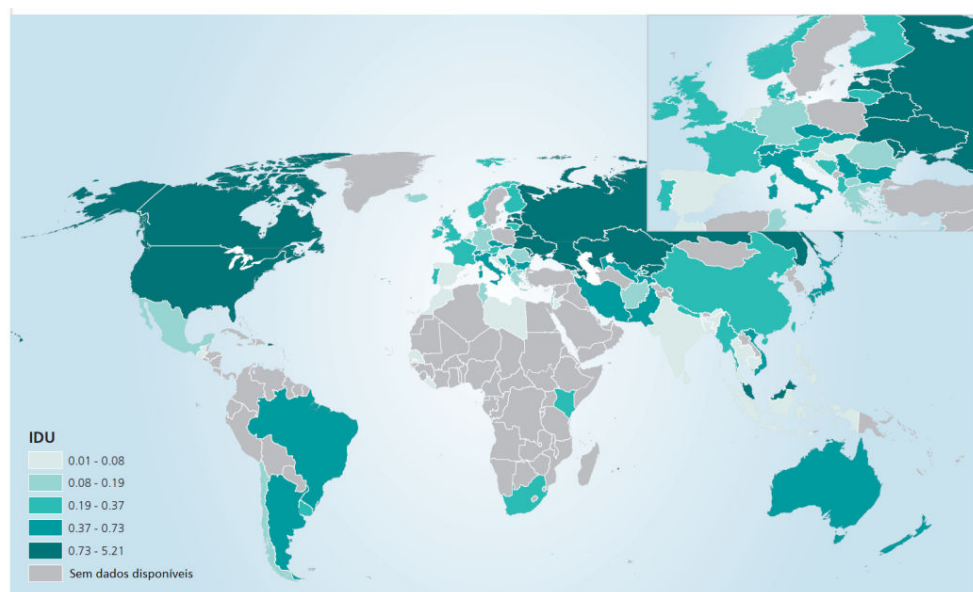


Figura 3: Prevalência de usuáries de drogas injetáveis (IDU) pela população adulta (entre 15 e 64 anos) no ano de 2011. Fonte: UNODC, 2013 com adaptações

A desnutrição afetou 805,3 milhões de pessoas ao redor do mundo em 2012, com 98% destas pessoas afetadas localizadas em países em desenvolvimento (FAO, 2014). Este número corresponde a mais de 10% da população mundial, que, além dos problemas diretos causados pela desnutrição, estão sob maior risco de contraírem infecções fúngicas devido a seus sistemas imunes estarem enfraquecidos pela fome.

Outro grupo de indivíduos sob-risco de contraírem infecções causadas por fungos são pessoas imunossuprimidas, devido a desordens hematológicas (p. ex. doenças autoimunes), câncer ou transplantes. Pessoas com doenças autoimunes ou transplantadas precisam utilizar drogas imunossupressoras para

evitarem respostas lesivas de seus respectivos sistemas imunes. Já as pessoas com câncer comumente tem seus sistemas imunes comprometidos devido aos tratamentos de quimioterapia e radioterapia que são muito agressivos à células com altas taxas de divisão, como as do sistema imune. Portanto, pessoas imunossuprimidas possuem como efeito colateral de seus respectivos tratamentos, não conseguem responder com eficácia a ataques de fungos oportunistas, cujas infecções seriam rapidamente resolvidas em indivíduos imunocompetentes (Romani, 2011).

Infelizmente as taxas de mortalidade de pessoas infectadas por fungos oportunistas em situações como as apresentadas acima, é muito alta, onde mais de 50% dos infectados morrem e, em casos como os de receptores de medula óssea, essa taxa é ainda maior, chegando a 95% de mortalidade para os infectados por espécies do gênero *Aspergillus* (Figura 4a) (Romani, 2004). Outros grandes causadores de micoses em pacientes imunossuprimidos são muitas espécies do gênero *Candida* (Figura 4b) tais como *C. krusei* e *C. tropicalis* que são muito comuns em infecções em receptores de medula óssea. Além do mais, tais espécies possuem cepas resistentes a antifúngicos azólicos e cepas menos vulneráveis à equinocandinas (Miceli; Díaz e Lee, 2011). *Paracoccidioides brasiliensis* é um patógeno muito comum na América Latina que pode causar graves infecções pulmonares (Franco *et al*, 1987). Um gênero de fungos que tem causado preocupação é o *Cryptococcus* devido a possibilidade de causar meningite criptocócica.



Figura 4: Fotografias obtidas por microscopia eletrônica com coloração artificial de fungos do mesmo gênero mencionados no texto, *Aspergillus glaucus* (a) e *Candida albicans* (b). Fonte: <http://fineartamerica.com> acessado em: 13/02/2015

1.1.2. Fungos do gênero *Cryptococcus*

O gênero *Cryptococcus* é composto por fungos basidiomicetos leveduriformes que crescem majoritariamente por reprodução assexuada. No passado as duas espécies mais importantes do grupo, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* já foram consideradas uma só espécie onde *C. gattii* era um sorogrupo, sendo denominada *Cryptococcus neoformans var gattii* (Chen, Meyer & Sorrell, 2014). Entretanto existem outras espécies do gênero que causam micoses oportunistas, tais como *C. albidus*, *C. curvatus*, *C. humicolus*, e *C. uniguttulatus*, que estão relacionadas a muitos casos de micoses em pacientes com HIV avançado ou sob tratamento de câncer (Miceli; Díaz e Lee, 2011).

É notável a resistência de diversas espécies de fungos deste gênero a várias drogas, como por exemplo *C. neoformans* que é naturalmente insensível às equinocandinas (Denning, 2003), vários isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* são resistentes a antifúngicos azólicos, bem como à fluorcitosina (Khawcharoenporn, Apisarnthanarak & Mundy, 2007).

Cryptococcus neoformans (Figura 5) é um fungo comumente encontrado em fezes de pombo, apesar de serem incapazes de crescer nestes animais porque aves possuem alta temperatura corporal (Chae *et al*, 2012), ou no solo (Levitz, 1991 *apud* Mitchell & Perfect, 1995).

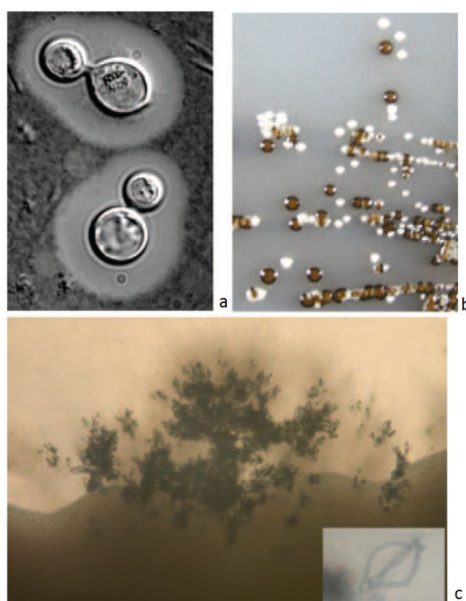


Figura 5: Fungo *Cryptococcus neoformans*, corado com tinta indiana (a), produzindo melanina, um dos fatores de virulência (b), e a sua forma filamentososa de basidiomiceto (c). Fonte: Idnurm *et al*, 2005 com adaptações.

Comumente *C. neoformans* é um patógeno oportunista que inicialmente causa uma infecção assintomática que pode ser resolvida pelo sistema imune ou evoluir para granulomas latentes nos pulmões. Entretanto, com uma redução da competência do sistema imune, a infecção latente pode evoluir para um quadro de meningite que pode ser alcançado diretamente sem a passagem pela fase latente em pessoas já imunossuprimidas (Idnurm *et al*, 2005). Três fatores de virulência já foram bem caracterizados em *C. neoformans* que são, a cápsula de carboidratos, importante para proteção contra a ação de fagócitos ou do sistema do complemento; a secreção de melanina, importante para proteção quando no ambiente ou para proteção contra radicais livres produzidos por células de defesa, e a habilidade de crescer à temperatura do corpo humano. Um ponto de interesse a respeito da infecção por *C. neoformans* é que esta possui similaridades com a tuberculose, como, por exemplo, pela existência de uma fase de latência pulmonar que evolui para a doença propriamente dita após um episódio de imunossupressão (Idnurm *et al*, 2005).

C. gattii foi inicialmente identificada em eucaliptos, na Austrália, sendo disperso pelo ar, apesar desta dispersão ser relativamente limitada. Porém, mais de 50 espécies de árvores podem prover um ambiente para *C. gattii*, entre as quais pode-se citar o eucaliptio (Hagen & Boekhout, 2010). Este fungo já foi

isolado em diversas partes do mundo tais como, as Américas (inclusive no Brasil), Europa ocidental e setentrional, Extremo oriente, Oceania, Sudeste asiático e sul da África (Chen, Meyer & Sorrell, 2014).

Assim como *C. neoformans*, *C. gattii* é um fungo que primeiramente infecta os pulmões para depois infectar outros órgãos, principalmente os do sistema nervoso central (Figura 6). Outro ponto em comum com *C. neoformans* é a semelhança dos fatores de virulência, podendo também produzir melanina, cápsula polissacarídica, mas também possuindo genes como urease que auxilia na invasão tecidual (possivelmente também com uma função anti-inflamatória por evitar uma resposta imunológica do tipo Th2), superóxido dismutase e trealose, ambos com função antioxidante (Chen, Meyer & Sorrell, 2014). *C. gattii* pode infectar diversos animais, como coalas, golfinhos, esquilos, furões, aves, bem como vários animais domésticos, como gatos, cães cavalos, ovelhas ou vacas, porém, os sintomas podem ser diferentes daqueles apresentados por humanos. *C. gattii* geralmente infecta pessoas imunossuprimidas sendo muito comuns os relatos em pacientes HIV positivos. Apesar de ser um patógeno relacionado a região da Austrália, onde é endêmico, o primeiro caso de infecção em humanos foi relatado no final da década de 60 na República Democrática do Congo (ex. Zaire) em uma criança de 7 anos com leucemia, no entanto, hoje os casos estão distribuídos por todos os continentes habitados (Chen, Meyer & Sorrell, 2014).

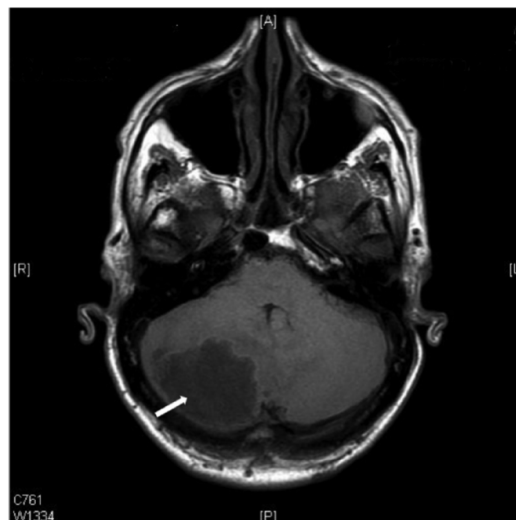


Figura 6: Tomografia apresentando uma lesão no cerebelo (indicado pela seta) de um paciente infectado por *Cryptococcus gattii*, sendo o fungo isolado de tecido obtido por biópsia. Fonte: Chen, Meyer & Sorrell, 2014 com adaptações.

A terapia comumente consiste em um tratamento com o uso de anfotericina B em conjunto com 5-fluorocitosina (Sugar, 1999; Chen *et al*, 2013). Porém o uso da anfotericina B é arriscado devido a sua alta nefrotoxicidade, bem como a outros efeitos colaterais (Baginski & Czub, 2009), a 5-fluorocitosina pode também causar hepatotoxicidade e toxicidade à medula óssea, o que pode causar imunossupressão ou agravá-la em pacientes já imunossuprimidos, sendo, portanto pouco tolerada por pacientes com HIV (Vermees; Guchelaar & Dankert, 2000).

Apesar de comumente as micoses serem oportunistas, *C. gattii* é bem descrito como um fungo que pode desencadear a patologia mesmo em pessoas imunocompetentes (Kronstad *et al*, 2011). Isso quebra o paradigma de que os fungos são descritos como sendo meros patógenos oportunistas e também levanta a necessidade de novas drogas serem desenvolvidas para combater um fungo com potencial mais agressivo, tanto pelo risco de surgirem cepas resistentes, como a fim de evitar efeitos adversos dos fármacos comumente usados.

Com o fenômeno da resistência, já descrito para, potencialmente todos os antimicrobianos existentes, é importante a busca por novos fármacos com esta atividade. Infelizmente poucas novas descobertas foram feitas nas últimas décadas (Ostrosky-Zeichner *et al*, 2010; WHO, 2014).

1.2. ANTIMICROBIANOS

Os primeiros antimicrobianos foram desenvolvidos no início do século XX, tais como os antibacterianos salvarsan, penicilina e sulfas; bem como os antifúngicos griseofulvin, polienos e azólicos. Em 1909 o alemão Paul Ehrlich (Figura 7a) junto com Alfred Bertheim e Sahachiro Hata testaram o "composto 606", a base de arsênio, no tratamento de coelhos infectados com sífilis, o qual apresentou resultados promissores, sendo depois empregado no tratamento de pacientes infectados com sífilis. O composto foi nomeado de Salvarsan (Aminov, 2010).

Cerca de duas décadas depois o britânico Alexander Fleming (Figura 7b) percebeu, em 1928, que uma cultura de *Staphylococcus* contaminada com um fungo do gênero *Penicilium* teve seu crescimento inibido por um composto produzido pelo fungo, sendo que em 1940 o grupo de pesquisa de Fleming conseguiu purificar o composto responsável pela inibição bacteriana, a penicilina. Seu uso no final da 2ª guerra mundial ajudou a salvar a vida de milhares de soldados que, do contrário, teriam sucumbido a infecções bacterianas em suas feridas.

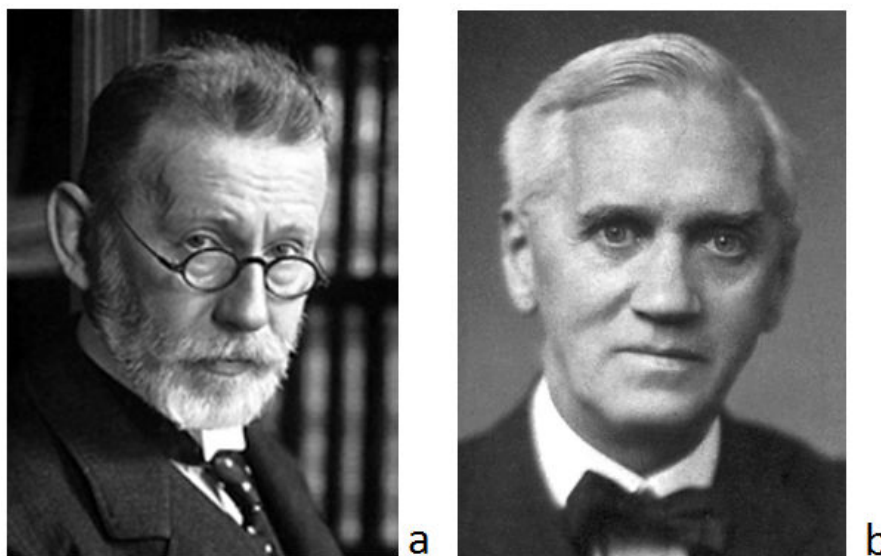


Figura 7: Foto dos microbiologistas (a) Paul Ehrlich e (b) Alexander Fleming. Fonte: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/

Desde 1909 até 1987 (Figura 8) foram descobertos mais de 20 classes de antibacterianos entre as quais os beta lactâmicos -onde inclui-se a penicilina- o cloranfenicol, os glicopeptídeos (p. ex. vancomicina), as tetraciclina, as sulfas, os macrolídeos (p. ex. eritromicina), entre outros (WHO, 2014). Entretanto após o final da década de 80 não foram descobertas novas classes de antibióticos, até o início de 2015 quando um composto peptídico com uma ligação éster interna (sendo

compostos deste tipo chamados de depsipeptídeos), nomeado teixobactina foi purificado e caracterizado, apresentando valores de MIC para *Escherichia coli* de 20,12 μM ; para *Pseudomonas aeruginosa* acima de 25,76 μM e para *Staphylococcus aureus* de 0,20 μM . O composto aparentemente inibe a síntese de peptideoglicano e, segundo relatado, não apareceram mutantes de *S. aureus* ou *Mycobacterium tuberculosis*, resistentes à teixobactina (Ling *et al*, 2015).

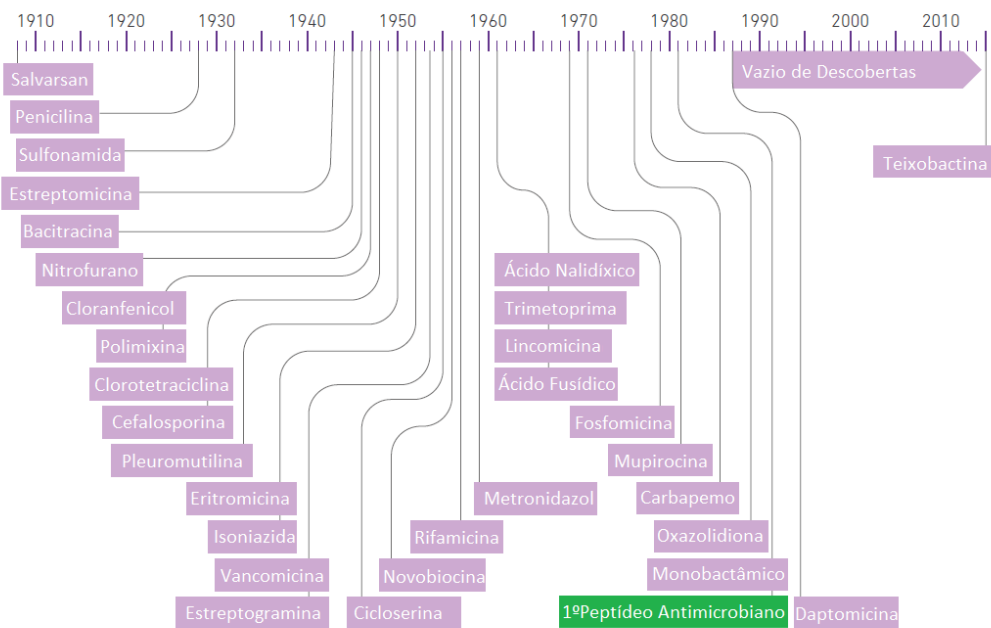


Figura 8: Linha do tempo apresentando a data de descoberta dos mais comuns antibacterianos. Está incluso a descoberta dos peptídeos antimicrobianos bem como da teixobactina em 2015. Fonte: WHO, 2014 com adaptações.

Apesar do uso medicinal de antibióticos ser aceito como uma invenção do século XX há indícios de que muito antes, comunidades antigas, à sua maneira, faziam uso dos mesmos. Esqueletos sudaneses datados como tendo entre 1460 e 1660 anos apresentaram altas concentrações de tetraciclina que, possivelmente, foi incorporada através da dieta. Igualmente, esqueletos do fim do império romano foram encontrados no Egito com altas concentrações de tetraciclinas (Aminov, 2010). Outro antibiótico com origem antiga é a penicilina e outros β -lactâmicos naturais. Esta antiguidade é corroborada pelos achados da enzima β -lactamase, possivelmente com mais de 1 bilhão de anos de idade (Aminov, 2010).

Do lado dos antifúngicos a griseofulvina foi isolada inicialmente do fungo *Penicillium griseofulvum* em 1939, porém até o final dos anos 50 este composto não

foi usado para finalidades clínicas (Rhodes *et al*, 1957; Sheehan, Hitchcock & Sibley; 1999). Em 1949 foi descoberta a anfotericina B, mas somente 10 anos depois seu uso clínico teve início. Além dessas classes de antifúngicos outras também já foram descobertas tais como os antifúngicos azólicos, as equinocandinas e as alilamidas (Sheehan, Hitchcock & Sibley; 1999). Porém a maioria desses antifúngicos demoraram a serem lançados no mercado (Figura 9).

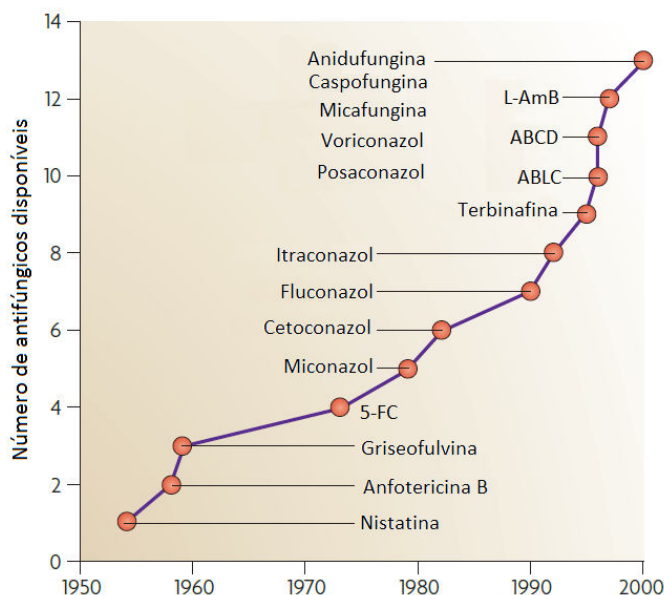


Figura 9: Linha do tempo apresentando quando os diferentes antifúngicos foram disponibilizados para uso clínico, onde ABCD é anfotericina B em dispersão coloidal, ABLC é anfotericina B complexada com lipídios, L-AmB é anfotericina B em lipossomos e 5-FC é a 5-fluorocitosina. Fonte: Ostrosky-Zeichner *et al*, 2010

Semelhante aos antibacterianos, infelizmente, os antifúngicos produzem o fenômeno da resistência, onde cepas de fungos munidos de um ou mais genes de resistência sobrevivem a tratamentos com antimicrobianos, tornando-se a população majoritária e bem menos sensível ao tratamento com o fármaco para o qual ela possui resistência.

1.2.1. Antibacterianos ou antibióticos

Antibacterianos (chamados por alguns autores de antibióticos) são fármacos tanto de origem natural, semissintética (isto é, compostos naturais que são modificados quimicamente) ou sintética. No caso, a origem não está ligada

à forma de produção mas sim, como o composto foi obtido pela primeira vez (Aminov, 2010 e WHO, 2014).

Existem diversas classes de antibacterianos classificados, principalmente, por grupos químicos ou motivos presentes nos mesmos. Os principais grupos de antibacterianos são: os β -lactâmicos, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, macrolídeos, tetraciclina, sulfonamidas, compostos aromáticos, quinolonas, entre outros grupos menos importantes (Madigan; Martinko & Parker, 2004; Kohanski; Dwyer & Collins, 2010). Dentro dos grupos dos antibacterianos de menor importância estão fármacos com alta especificidade utilizados em tratamentos de bacterioses específicas.

Os diversos tipos de antibacterianos têm diferentes alvos e mecanismos de ação também distintos. Alguns deles interferem na síntese de peptidoglicanos tais como os β -lactâmicos e os glicopeptídeos. Em sua maioria, os antibacterianos interferem na maquinaria de síntese proteica bacteriana (sendo a maioria deles bacteriostáticos e não bactericidas), tais como os aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina e alguns compostos aromáticos tais como o cloranfenicol (Wilson, 2014). Outros exploram diferentes alvos, como a actinomicina que interfere na síntese de RNA, indiretamente interferindo na síntese de proteínas (Sobell, 1985).

Antibacterianos β -lactâmicos, possuem o núcleo β -lactâmico como grupo funcional com efeito bactericida. Neste grupo estão as penicilinas, as cefalosporinas e as carbapenemas (Kohanski; Dwyer & Collins, 2010). Eles possuem origem natural e semissintética, sendo o seu mecanismo de ação principal a inibição de enzimas com função transpeptidase (Shahid *et al*, 2009). Estas enzimas catalisam a ligação de um resíduo de D-alanina a uma cadeia vizinha de pentaglicina formando assim ligações transversais no polímero peptidoglicano. Estes antibacterianos atuam pela "penicilação" das transpeptidases inibindo-as e assim bloqueando a síntese de peptidoglicano, o que leva à formação de esferoplastos que facilmente são lisados devido ao desequilíbrio osmótico (Shahid *et al*, 2009; Kohanski; Dwyer & Collins, 2010). Estruturalmente os β -lactâmicos são formados por dois anéis condensados, o anel β -lactâmico (de 4 membros) característico do grupo e o anel de 5 membros -no caso das penicilinas- ou de 6 membros -no caso das cefalosporinas- (Shahid *et al*, 2009), sendo tais estruturas básicas apresentadas na Figura 10.

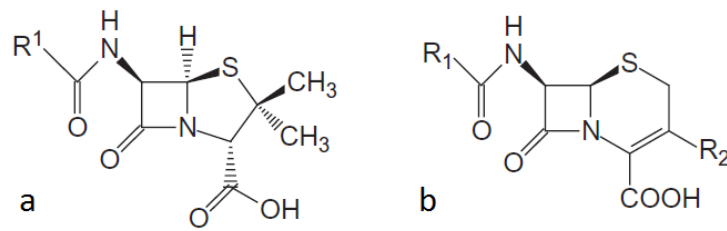


Figura 10: Estrutura base das penicilinas (a) e das cefalosporinas (b). Os grupos substituintes de R1 e R2 é que são os responsáveis pelas diferenças entre cada uma das penicilinas e cada uma das cefalosporinas. Fonte: Shahid, 2009.

Os aminoglicosídeos (Figura 11) inibem a síntese protéica através da interação com a subunidade menor ribossomal. Como exemplos dessa classe destacam-se a gentamicina, estreptomicina e canamicina (Kohanski; Dwyer & Collins, 2010). O primeiro aminoglicosídeo foi purificado em 1944 de uma bactéria do solo porém, ao longo de 20 anos foram isolados muitos outros aminoglicosídeos de outras espécies bacterianas do solo de gêneros como *Streptomyces* e *Actinomycetes* (Hermann, 2007). Os aminoglicosídeos naturais possuem como grupo característico o grupo 2-desoxiestreptamina (2-DOS) ao qual se ligam diferentes amino açúcares. Por possuírem diversas cargas positivas estes compostos possuem alta afinidade pela membrana externa negativamente carregada de bactérias, o que contribui para a seletividade antibacteriana. Entretanto, devido a necessidade de um transporte dependente de cadeia transportadora de elétrons aminoglicosídeos são pouco efetivos em ambientes anaeróbicos (Jana & Deb, 2006). Já é bem conhecido que aminoglicosídeos agem ligando-se aos ribossomos bacterianos, mais precisamente à subunidade menor 30S que é responsável pela alta fidelidade da tradução, porém o exato mecanismo de ação que gera a atividade antimicrobiana ainda precisa ser melhor estudado. No caso do modelo em *Escherichia coli*, o rRNA 16S já foi estudado como um sítio de ligação de diversos aminoglicosídeos. A atividade possivelmente consiste em dificultar a interação do tRNA com o rRNA por um mecanismo semelhante ao de inibição enzimática competitiva (Jana & Deb, 2006).

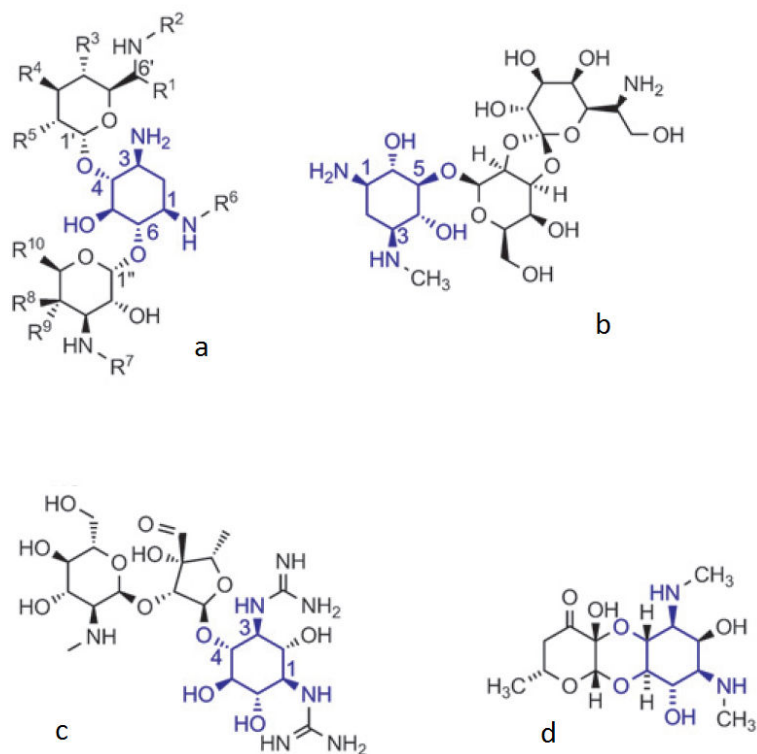


Figura 11: Estrutura de alguns aminoglicosídeos tais como a gentamicina e canamicina (a), higromicina B (b), estreptomicina (c) e espectinomicina (d). Fonte: Hermann, 2007.

Os mecanismos de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos consistem em diferentes estratégias. Algumas bactérias possuem genes que expressam bombas que bombeiam para fora do citoplasma estes compostos, sendo este um processo ATP-dependente. Menos comumente, algumas bactérias expressam enzimas com atividade RNA metiltransferase que modificam o rRNA, dificultando com isso a ligação dos aminoglicosídeos à subunidade 30S (Jana & Deb, 2006). Porém, a maioria das bactérias resistentes expressam enzimas que modificam os aminoglicosídeos reduzindo assim a afinidade destes pela subunidade menor ribossomal. Estas modificações podem ser acetilações, fosforilações, ou ligações de nucleotídeos a estrutura do composto (Vakulenko & Mobashery, 2003).

Os glicopeptídeos (Figura 12) são antibacterianos que inibem a síntese da parede celular de espécies bacterianas Gram-positivas. Neste grupo, os principais exemplos de antibióticos são a vancomicina, avoparcina, teicoplanina e a telavancina (Jeya *et al*, 2011). Eles são caracterizados estruturalmente pela presença de anéis moleculares fusionados que formam um esqueleto em forma

de "cesta" e pela presença de carboidratos ligados ao arcabouço principal (Jeya *et al*, 2011). A ação antimicrobiana se dá pela inibição da maturação do peptidoglicano da bactéria, por impedimento estérico, porém, alguns glicopeptídeos interagem com transglicosilases (Kohanski; Dwyer & Collins, 2010). A transglicosilase alvo da interação com tais fármacos é geralmente a mesma enzima com atividade transpeptidase, tratando-se de uma enzima com atividade dupla (Jeya *et al*, 2011).

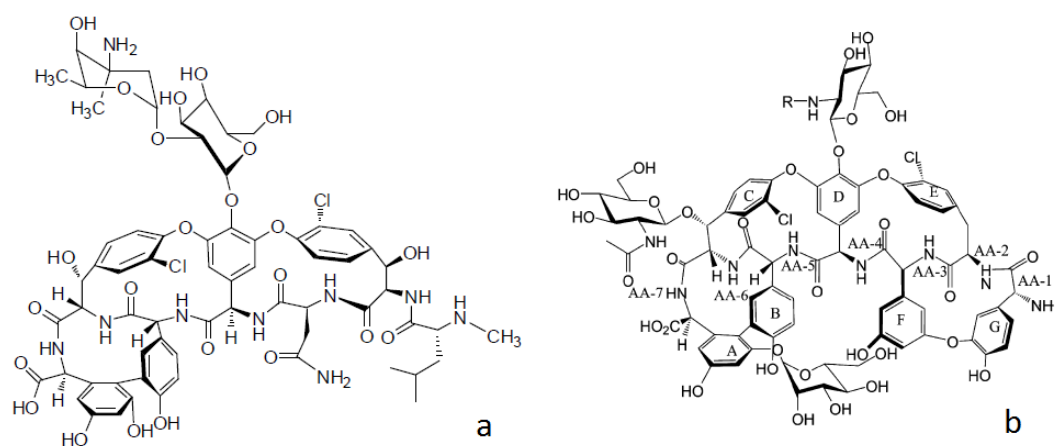


Figura 12: Estrutura de alguns glicopeptídeos tais como a vancomicina (a) e a teicoplanina (b). Fonte: Jeya *et al*, 2011 modificado.

A resistência a glicopeptídeos era inesperada devido ao seu modo de ação, bloqueando a ação de diferentes enzimas. Entretanto, bactérias usam diversas enzimas distintas (que geralmente são codificados por transposons) para conseguir driblar a interação com os antimicrobianos dessa classe (Jovetic *et al*, 2010).

Os macrolídeos são antibacterianos que possuem anéis de lactona de 14 a 16 átomos neste arcabouço principal. Como exemplos existem a eritromicina, espiramicina, estreptogramina e telitromicina (Figura 13). Alguns macrolídeos (como os que contêm o açúcar micarose) inibem a reação peptidil transferase catalisada pela subunidade ribossomal maior, já outros tais como a eritromicina bloqueiam o túnel de saída do polipeptídeo nascente, provocando um término prematuro da síntese protéica (Tenson; Lovmar & Ehrenberg, 2003).

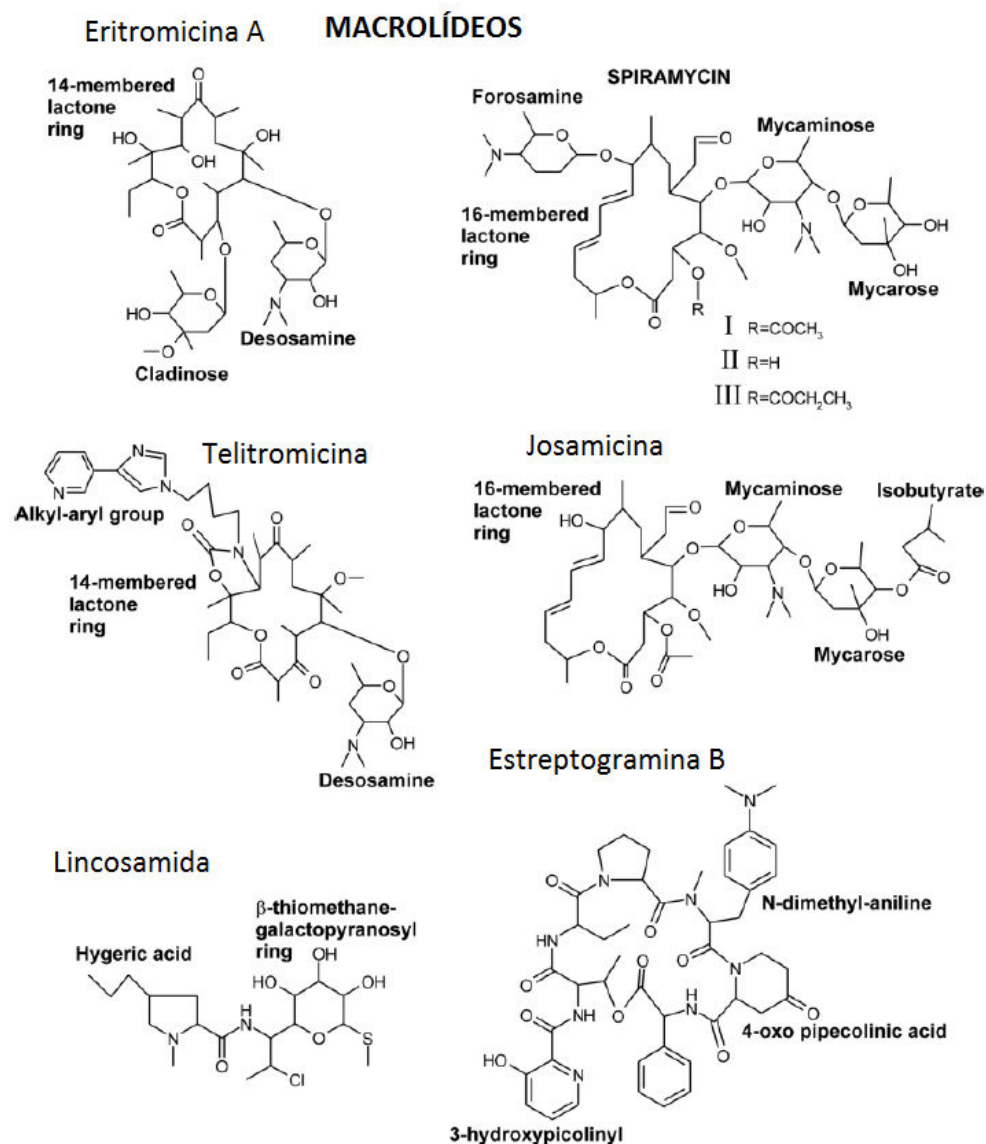


Figura 13: Estrutura de alguns macrolídeos conhecidos. Fonte: Tenson; Lovmar & Ehrenberg, 2003

Os mecanismos de resistência a tais drogas exploram tanto a excreção de tais fármacos como a modificação do sítio de ação (ribossomos) pela produção de rRNAs mutantes como pela expressão de proteínas diferentes das que comumente compõem a estrutura do subunidade 50S ribossomal. Alguns organismos produzem proteínas L4 e L22 mutantes que reduzem a ligação dos macrolídeos à subunidade 50S. Existem cepas de *E. coli* que substituem bases na posição 2058 e 2059 do rRNA 23S. *Campylobacter* resistentes produzem bombas de transporte ativo tal como a CmeABC. A presença de mecanismos de resistência diferentes também pode ocorrer como a expressão da bomba CmeABC juntamente com rRNA 23S mutante (Belanger & Shryock, 2007).

As tetraciclina são antibacterianos caracterizados pela presença de quatro anéis de seis membros condensados, o núcleo hidroantraceno, com uma série de substituições (Figura 14). Esta classe de fármacos é bacteriostática, que atua se ligando à subunidade menor ribossomal (Morita; Tomida & Kawamura, 2014). As primeiras tetraciclina foram descobertas em 1948, sendo as 7-clorotetraciclina e a 5-hidroxitetraciclina. Entretanto existem outros exemplos de antibacterianos desta classe tais como a rolitetraciclina, limeciclina, metaciclina, entre outras (Chopra & Roberts 2001). Tais moléculas são possivelmente transportadas, em bactérias gram-negativas, através de canais do tipo porina na forma de complexos com cátions divalentes tais como o magnésio. No periplasma o Mg^{2+} se dissocia da tetraciclina liberando-a, esta atravessa facilmente a membrana plasmática. No citoplasma a tetraciclina novamente liga-se a íons divalentes (que são abundantes), sendo que a forma ativa é possivelmente, também um complexo tetraciclina: Mg^{2+} . Esta forma se liga à proteína S7 e às bases G693, A892, U1052, C1054, G1300, e G1338 do rRNA 16S (Chopra & Roberts 2001). No entanto, autores como Schnappinger & Hillen, em 1996, citaram sítios de ligação de menor afinidade das tetraciclina em ambas as subunidades dos ribossomos, bem como as proteínas S3, S8, S14 E S19 como importantes alvos na ligação de tais compostos à subunidade 30S. Esta ligação impede a ligação de aminoacil-tRNAs com o ribossomo, o que impede, portanto a síntese protéica. Contudo, essa ligação é reversível, sendo uma possível explicação para os efeitos bacteriostáticos e não bactericidas observados (Chopra & Roberts 2001).

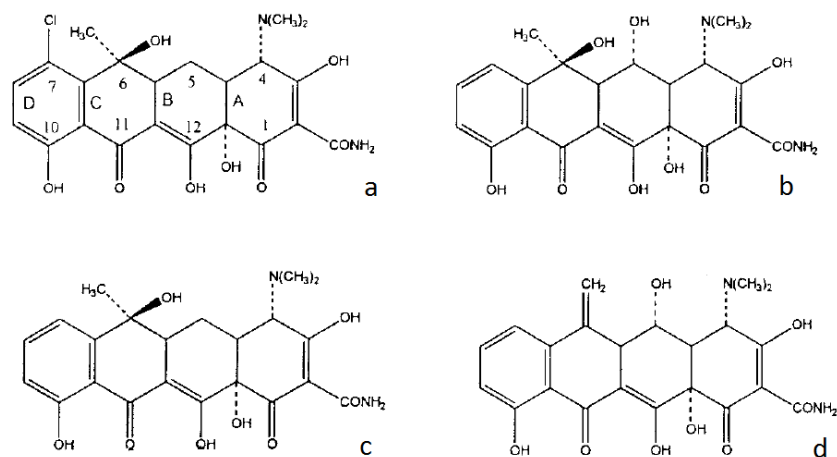


Figura 14: Fórmula estrutural da (a) 7-clorotetraciclina, (b) 5-hidroxitetraciclina, (c) tetraciclina e (d) da metaciclina. Fonte: Chopra & Roberts 2001.

A resistência pode ocorrer pela produção de proteínas que protegem os ribossomos da ação das tetraciclina, sendo tais proteínas semelhantes a fatores de alongamento, tais como o EF-G e EF-Tu, possuindo inclusive atividade GTPase. Outros mecanismos exploram modificações nos tRNAs ou a redução da permeabilidade às tetraciclina ou pela expressão de bombas de efluxo, que usam o gradiente de pH através da membrana, porém não sendo necessária a existência de potencial elétrico portanto se tratando de um antiporte (Schnappinger & Hillen, 1996).

As sulfonamidas (Figura 15a) são drogas que interferem na biossíntese do tetrahydrofolato, um cofator importante na biossíntese de nucleotídeos e do metabolismo de alguns aminoácidos. O primeiro fármaco desta classe foi sintetizado em 1932 pelo alemão Gerhard Domagk (Figura 15b) (Sköld, 2000). O alvo dessas drogas é a enzima dihidroperato sintase se que condensa o ácido p-aminobenzóico com dihidro-6-hidroxipterina-pirofosfato para formar o ácido dihidropteróico o penúltimo precursor da biossíntese dihydrofolato. Como mamíferos são incapazes de sintetizar este cofator, eles o obtêm da dieta ou do que é produzido pela microbiota indígena do sistema digestório, portanto são pouco afetados por essa classe de antimicrobianos (Sköld, 2000).

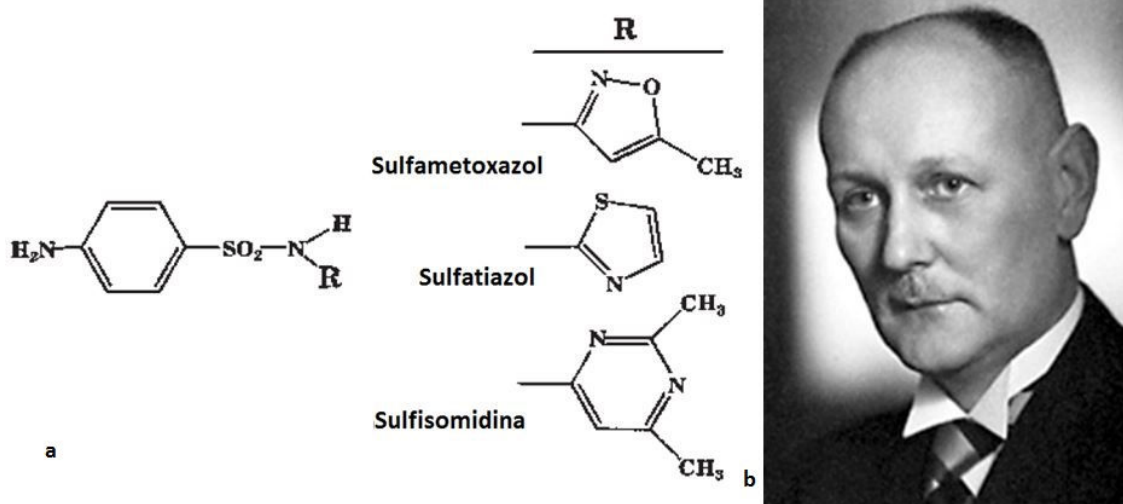


Figura 15: (a) Alguns exemplos de sulfonamidas. Microbiologista Gerhard Domagk (b), laureado com o prêmio Nobel em 1939. Fontes: Sköld, 2000 e http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/

A resistência a essa classe de antibacterianos ocorre pela presença de bactérias mutantes para o gene da dihidroperoxato sintase que possui uma afinidade bem menor tanto pelo substrato original, o ácido p-aminobenzóico, como para as sulfas (Sköld, 2000).

As quinolonas e os compostos fenólicos têm como alvos respectivamente proteínas topoisomerase (DNA girase) e a subunidade 50S ribossomal. As quinolonas são antibacterianos sintéticos tais como o ácido nalidixico ou a ciprofloxacina que atuam inibindo a topoisomerase II, o que resulta em quebras duplas no DNA bacteriano e com isso bloqueando a sua replicação. Inibições no mecanismo de SOS (um mecanismo de resposta a danos ao DNA) da bactéria auxiliam na morte delas, bem como reduzem as chances de aparecimento de resistência. Compostos fenólicos tais como o cloranfenicol tem como alvo a subunidade 50S ribossomal atuando pela inibição da fase de alongamento da tradução protéica (Kohanski; Dwyer & Collins, 2010).

1.2.2. Antifúngicos

Os antifúngicos, também conhecidos como antimicóticos, são os fármacos utilizados no combate contra os fungos patogênicos. Eles são classificados nas seguintes classes principais: azólicos, polienos, alilaminas, equinocandinas e 5-fluorocitosina (Ghannoum & Rice, 1999).

O principal alvo dos antifúngicos é o ergosterol, tanto interferindo na sua via de biossíntese (Figura 16), como ligando-se a ele quando já inserido na membrana plasmática. Outros alvos são os ácidos nucleicos, a parede celular ou o aparato mitótico (Anderson, 2005).

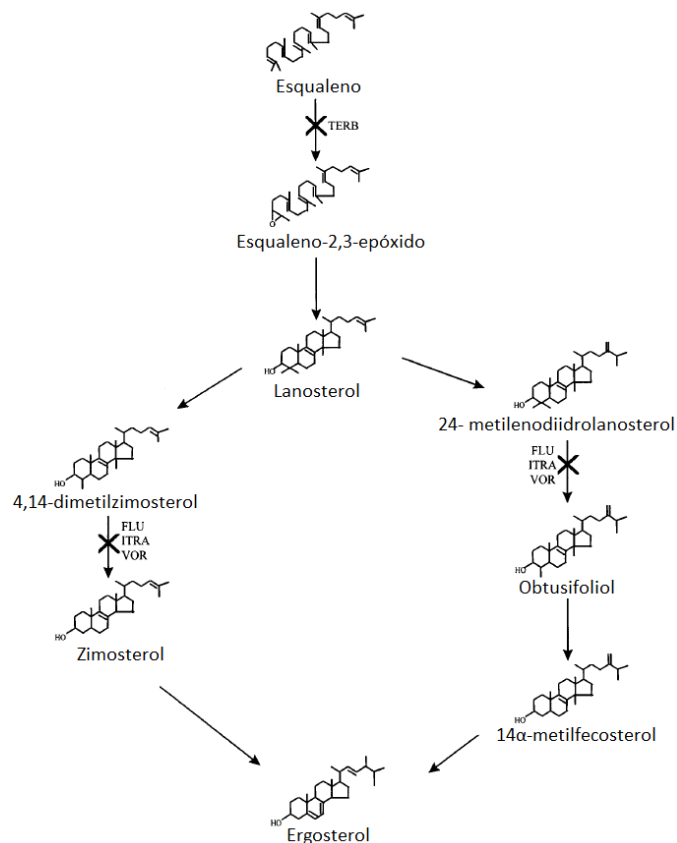


Figura 16: Antifúngicos que interferem na via de biossíntese do ergosterol, onde TERB é a terbinafina, FLU é o fluconazol, ITRA é o itraconazol e VOR é o voriconazol. Fonte: Ghannoum & Rice, 1999

Os antifúngicos azólicos são derivados do imidazol N-substituído que foram pela primeira vez reportados na literatura científica, no final da década de 60 do século XX (Ghannoum & Rice, 1999). Alguns exemplos de fármacos dessa classe são miconazol, clotrimazol, fluconazol, voriconazol e o itraconazol, sendo alguns deles apresentados na Figura 17. Entretanto, geralmente seu uso é tópico devido à alta toxicidade ou por problemas de biodistribuição o que, infelizmente, limita o uso de tais fármacos (Ostrosky-Zeichner *et al*, 2010). Agentes antifúngicos azólicos atuam na via de biossíntese do ergosterol, inibindo a enzima lanostenil demetilase que é dependente do citocromo P-450. Esta enzima também está presente na via de biossíntese de colesterol de

mamíferos, porém tais agentes possuem maior afinidade pela enzima de fungos do que pela de mamíferos em concentrações terapêuticas (Sheehan; Hitchcock; Sibley, 1999).

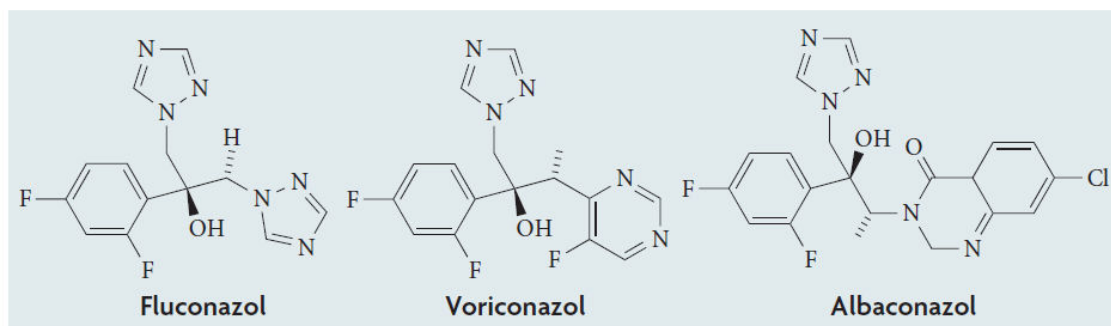


Figura 17: Exemplos de antifúngicos azólicos. Fonte: Zeichner *et al*, 2010.

Entretanto, o fenômeno da resistência, semelhante à existente para os antibacterianos, ocorre também para os antifúngicos. A resistência contra os antifúngicos azólicos se dá pela modificação da enzima alvo ou pela superexpressão da mesma, bem como pela expressão de bombas de efluxo, do tipo MFS ("major facilitator superfamily") ou ABC, que possui 4 famílias principais em *Saccharomyces cerevisiae*, MDR, CFTR, YEF, e PDR. Outro mecanismo já descrito é a alteração na composição da membrana, o que altera a permeabilidade a tais fármacos (Ghannoum & Rice, 1999; Cowen, 2008).

Antifúngicos da classe dos polienos são compostos que possuem múltiplas ligações duplas conjugadas, o que dá nome a esta classe de compostos, tendo como exemplos a anfotericina B e a nistatina (Figura 18). Eles começaram a ser utilizados na década de 50 como o antifúngico padrão para o tratamento de micoses até o desenvolvimento dos antifúngicos azólicos (Ghannoum & Rice, 1999). O mecanismo de ação de tais compostos se baseia na ligação aos esteróides da membrana plasmática do fungo e pela formação de poros formados por uma mistura do fármaco e de esteróis. Portanto organismos tais como fungos, algas e protozoários são susceptíveis a tais ataques (Ghannoum & Rice, 1999). Os polienos, tais como a anfotericina B, possuem uma afinidade maior por ergosterol do que pelo colesterol (esterol encontrado em mamífero), o que pode explicar sua toxicidade seletiva (Ostrosky-Zeichner *et al*, 2010). A resistência a essa classe é relativamente rara, geralmente

ocorrendo em espécies do gênero *Candida* pela produção de esteróis não usuais e que, portanto ligam-se com menor afinidade aos polienos (Ghannoum & Rice, 1999).

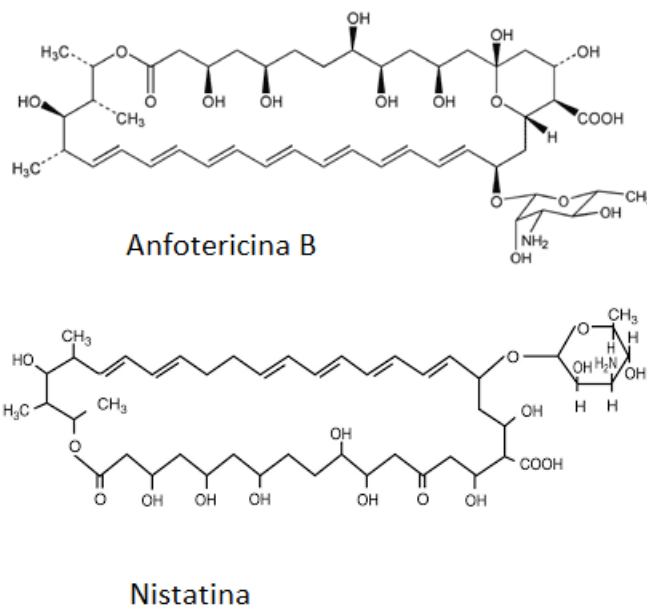


Figura 18: Exemplos de antifúngicos da classe dos polienos.

As alilaminas são caracterizadas por possuírem um grupo alil (RCH_2CHCHR') ligado a um grupo amina. Como exemplos da classe existem a naftifina e a terbinafina (Figura 19a). Esta classe de antifúngicos atua possivelmente, inibindo a via de biossíntese do ergosterol pela inibição da esqualeno epoxidase, devido à observação do acúmulo de esqualeno nas células tratadas com tais fármacos. Além do mero acúmulo deste precursor este fenômeno é o possível responsável pela lise da célula fúngica, devido ao aumento de permeabilidade das células como consequência de tal acúmulo. O aparecimento de resistência não foi documentado em cepas patogênicas. Porém, em algumas espécies investigadas, um dos mecanismos consiste na presença de bombas de transporte do tipo CDR1 (Ghannoum & Rice, 1999).

Equinocandinas são compostos que possuem um hexapeptídeo cíclico como núcleo, o ácido linoleico acilando o *N*-terminal da porção peptídica e diferentes grupos laterais com diferentes padrões de hidroxilação. A primeira autorização do FDA de compostos dessa classe foi para a caspofungina (Figura 19b) em 2001, desenvolvida pela Merck, seguida pela micafungina em 2005

(Astellas Pharma) e pela anidulafungina em 2006 desenvolvida pela Pfizer (Moris & Villmann, 2006). Este grupo de antifúngico atua como inibidor da 3 β -glucano sintase, uma enzima integral de membrana que participa no metabolismo da parede celular fúngica (Ghannoum & Rice, 1999). Cepas resistentes são resultado de células com mutações na subunidade Fks1 da 3 β -glucano sintase o que resulta em uma menor sensibilidade às equinocandinas (Cowen, 2008).

A 5-fluorocitosina (Figura 19c) atua interferindo no metabolismo de DNA e RNA e assim interfere na replicação devido a conversão de 5-fluorocitosina em 5-fluordesoxiuridina monofosfato e interferindo na transcrição de RNA e por consequência, na síntese de proteínas. A resistência aparece pela redução ou perda de atividade da permease, a proteína responsável pelo transporte da 5-fluorocitosina para o citosol, ou pela perda de função na enzima responsável pela conversão da droga em precursores utilizáveis pela célula fúngica (Ghannoum & Rice, 1999).

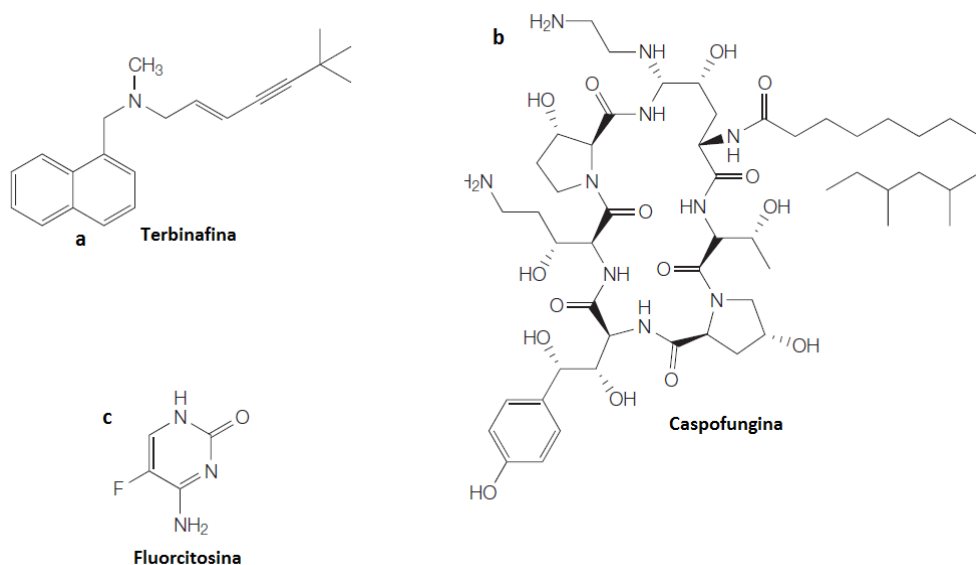


Figura 19: Exemplos de fármacos das classes das alilamidas (a), equinocandinas (b) e 5-fluorocitosina (c). Fonte: Anderson, 2005 com modificações.

Comparando-se o arsenal de drogas contra bactérias (os antibióticos) e o arsenal contra fungos (os antimicóticos) percebe-se a diferença tanto na diversidade como no número de fármacos existentes, onde nosso arsenal contra fungos é muito mais

limitado. Um dos motivos se deve ao fato de que animais e fungos são muito próximos filogeneticamente, quando comparados às bactérias (Cowen, 2008).

Entretanto, nossos arsenais contra bactérias e fungos não tem avançado como ocorreu no século XX, quando entre as décadas de 40 e de 60 quase todas as classes de antibacterianos e uma parte considerável de classes de antifúngicos foram descritas (WHO, 2014). Porém para os antifúngicos houve um período de descobertas durante os anos 90, quando muitos antimicóticos foram disponibilizados no mercado (Ostrosky-Zeichner *et al*, 2010). Sendo assim é importante a busca por novos fármacos, bem como a criação de novos métodos para tratar as doenças infecciosas causadas por microrganismos, sejam bactérias ou fungos.

1.3. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Os peptídeos antimicrobianos são compostos de baixa massa molecular, abaixo de 5000 Da, em geral positivamente carregados e apresentando diferentes estruturas secundárias (Bulet *et al*, 1999).

O primeiro relato de peptídeos com atividades antimicrobianas foi feito em 1981 por um grupo sueco que purificou e caracterizou a cecropina, com 37 resíduos de aminoácidos e carga positiva, da larva da mariposa *Hyalophora cecropia* (Steiner *et al*, 1981; Izadpanah & Gallo, 2005), mostrada na Figura 20. O primeiro peptídeo antimicrobiano purificado de um vertebrado foi a magainina em 1987, tendo como fonte a pele da rã *Xenopus laevis* (Zasloff, 1987) (Figura 21) e os primeiros de mamíferos foram três defensinas, nomeadas HPN-1, 2 e 3, purificadas de grânulos de neutrófilos de mamíferos (Gans; Selsted & Lehrer, 1990; Brogden, 2005).

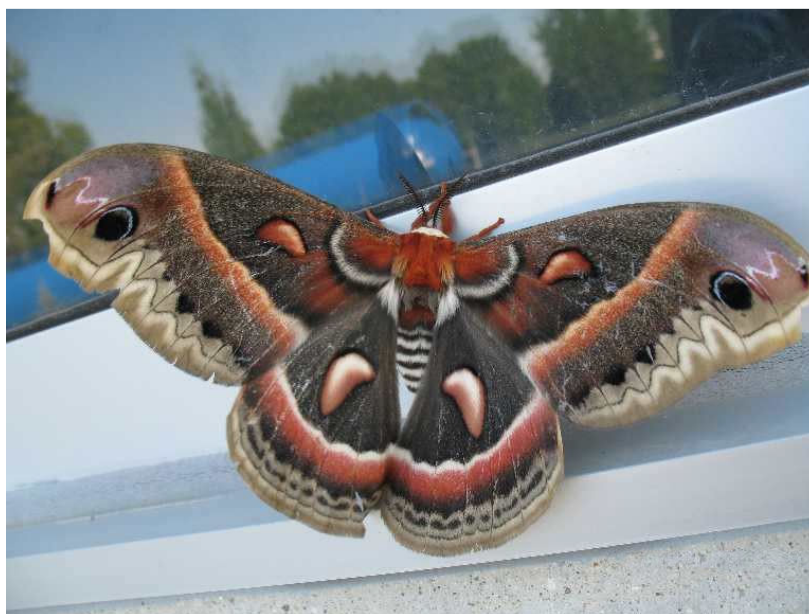


Figura 20: Mariposa *Hyalophora cecropia*, de onde foi isolado e descrito o primeiro peptídeo antimicrobiano. Fonte: <http://en.wikipedia.org> acessada em 13/02/2015.



Figura 21: *Xenopus laevis*, primeiro vertebrado onde foi descrito um peptídeo antimicrobiano por Zasloff em 1987. Fonte: <http://www.xenopus.com> acessado em 13/02/2015.

Desde os primeiros relatos mais de 2400 peptídeos antimicrobianos foram descritos, segundo o "The Antimicrobial Peptide Database" (APD). Os peptídeos antimicrobianos conhecidos possuem as mais diversas origens; como de bactérias, fungos, insetos, aracnídeos, anfíbios, diversas espécies de mamíferos inclusive o homem, plantas e até mesmo sintética. Estes peptídeos isolados dos mais variados organismos são produzidos a partir de precursores maiores e podem ser, inclusive, modificados após serem produzidos pelos ribossomos, sendo comuns glicosilações, amidações do C-terminal e isomerizações (Zasloff, 2002). Porém, não é somente por produção direta que peptídeos antimicrobianos podem ser sintetizados visto que já foram descritos peptídeos com atividades antimicrobianas como produto de degradação de proteínas maiores, como p. ex. a hemoglobina humana, que pode ser clivada em peptídeos com atividade antibacteriana (Liepke *et al*, 2003). Outros peptídeos antimicrobianos são produzidos por células, sendo uma das respostas da imunidade inata contra patógenos como por exemplo, a LL-37, produzida a partir de um precursor maior (Reinholz; Ruzicka & Schaubert, 2012) ou as defensinas estocadas em neutrófilos (Ganz, 2003).

1.3.1. Diversidade de peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos possuem diversas fontes tais como artrópodes, vertebrados, ou vegetais (Zasloff, 2002). Também possuem diferentes estruturas como α -hélice (p. ex. magainina, LL-37 ou lactoferrampina bovina), folha- β (p. ex. β -defensina-3 humana, protegrina I ou lactoferricina bovina) ou estruturas estendidas (p. ex. tritripticina ou indolicidina) (Nguyen; Haney & Vogel, 2011). Diferentes atividades também já foram descritas em peptídeos antimicrobianos, como atividade antibacteriana (Zasloff, 1987), antifúngica (De Lucca & Walsh, 1999), antiviral (Reinholz; Ruzicka & Schaubert, 2012) e anti-Trypanosoma cruzi (Brand *et al*, 2002). A Tabela 2 apresenta alguns peptídeos de diferentes organismos com suas respectivas atividades antimicrobianas.

Tabela 2: Exemplos de peptídeos antimicrobianos com suas respectivas fontes e microrganismos para os quais possuem atividades

Nome do peptídeo	Fonte	Atividade contra	Sequência	Referência literatur
Cecropina A	Mariposa	Bactéria Gram negativas e fungos	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK-NH ₂	(Steiner <i>et al</i> , 1981; Izadpanah & Gallo, 2005)
Magainina-2	Anfíbio	Bactéria Gram positivas, Gram negativas e fungos	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	(Zasloff, 1987)
Dermaseptina 1	Anfíbio	Bactéria Gram negativas e fungos	ALWKTMLKKLGTMLHAGKAALGAAADTISQGTQ	(Mor & Nocolas, 1994)
LL-37	Humano	Bactéria Gram positivas, Gram negativas, fungos e vírus envelopados	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	(Reinholz; Ruzicka & Schaubert, 2012)
Tachyplesina	Caranguejo ferradura	Bactéria Gram positivas, Gram negativas e fungos	RWCFRVCYRGICYRKCR-NH ₂	(Miyata <i>et al</i> , 1989)
β-defensina BNBD-12	Bovina	Bactéria Gram positivas, Gram negativas	GPLSCGRNGGVCIPIRCPVPMRQIGTCFGRPVKCCRSW	(Mandal; Jagannadham & Nagaraj, 2002)
Thionina	Vegetal	Bactérias e fungos	TTCCPSIVARSNFNVCRIPTPEAICATYTGCIIPGATCPGDYAN	(Pelegriani & Franco, 2005)
Apidaecina	Abelha	---	GNNRPVYIPQRPHPRI	(Zasloff, 2002)
Dermaseptina-DS01	Anfíbio	Bactéria Gram positivas, Gram negativas e T. cruzi	GLWSTIKQKGKEAAIAAAKAAGQAALGAL-NH ₂	(Brand <i>et al</i> , 2002)
Opisthoporin-1	Escorpião	Bactéria Gram positivas, Gram negativas e fungos	GKVWDWIKSTAKKLWNSEPVKELKNTALNAAKNLVAEKIGATPS	(Harrison <i>et al</i> , 2014)
Lycotoxina I	Aranha	Bactéria Gram negativas e fungos	IWLTALKFLGKHAACKHLAKQQLSKL	(Yan & Adams, 1998)
LyeTxI	Aranha	Bactéria Gram positivas, Gram negativas e fungos	IWLTALKFLGKNLKGHLAKQQLAKL-NH ₂	(Santos <i>et al</i> , 2010)

1.3.2. Estrutura dos peptídeos antimicrobianos

São encontradas diferentes estruturas para os diferentes peptídeos antimicrobianos, onde alguns possuem conformação de α -hélice, folha- β ou estrutura randômica. Também são encontrados peptídeos com pontes dissulfeto intra ou intercadeias.

Peptídeos com conformação em α -hélice (Figura 22), geralmente adquirem tal conformação em um ambiente favorável para essa conformação como, p. ex., o microambiente de membranas, ou em soluções contendo certos agentes que favorecem tal conformação, como o 2,2,2-trifluoretanol (Nguyen; Haney & Vogel, 2011). Geralmente tais peptídeos apresentam-se como uma α -hélice monomérica porém, há relatos de peptídeos com conformação em α -hélice diméricos, onde uma ponte dissulfeto faz a ligação entre as subunidades (Batista *et al*, 2001).

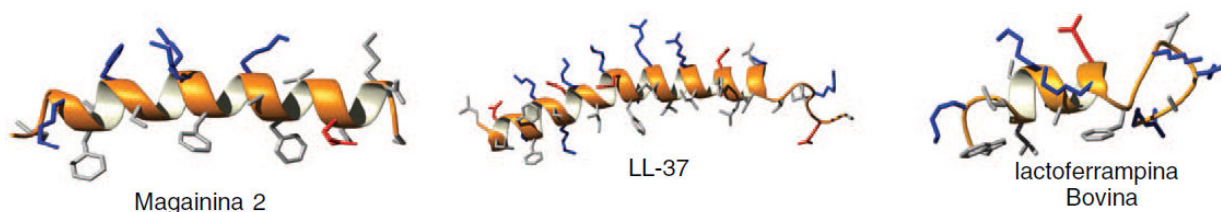


Figura 22: Exemplos de peptídeos antimicrobianos com enovelamento em α -hélice. Fonte: Nguyen; Haney & Vogel, 2011.

Existem também peptídeos com conformação de folha- β , onde duas ou mais folhas- β compõem a estrutura, sendo que esta é estabilizada por pontes dissulfeto (Figura 23). Entretanto, nesta classe existem peptídeos com segmentos de α -hélice e com maior frequência de alças conectando os segmentos de folha- β , bem como podem existir diversos segmentos estruturais (Torres & Kuchel, 2004). Possivelmente as pontes dissulfeto apesar de não serem imprescindíveis para a atividade mantém a estrutura estável em ambientes de maior salinidade (Harwig *et al*, 1996).

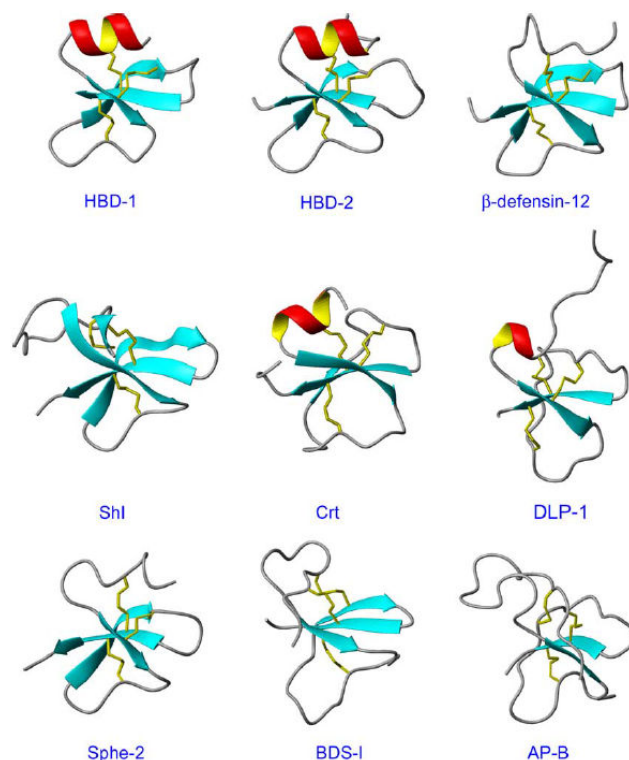


Figura 23: Exemplos de peptídeos antimicrobianos com estrutura de folha beta. Alguns deles como o HBD-1, HBD-2, Crt e DLP-1 possuem segmentos estruturados em α -hélice também. Pontes dissulfeto estão representadas em barras amarelas e as folhas- β em azul claro. Fonte: Torres & Kuchel, 2004.

Os peptídeos randômicos ou com conformação estendida (Figura 24) na maioria das vezes contém grandes quantidades de determinados resíduos tais como Arg, Trp, e Pro. Geralmente esses peptídeos são curtos, contendo menos de 15 resíduos de aminoácidos, sendo muitas vezes derivados de proteínas maiores (p. ex. lactoferricina ou lisozima) (Nguyen; Haney & Vogel, 2011).

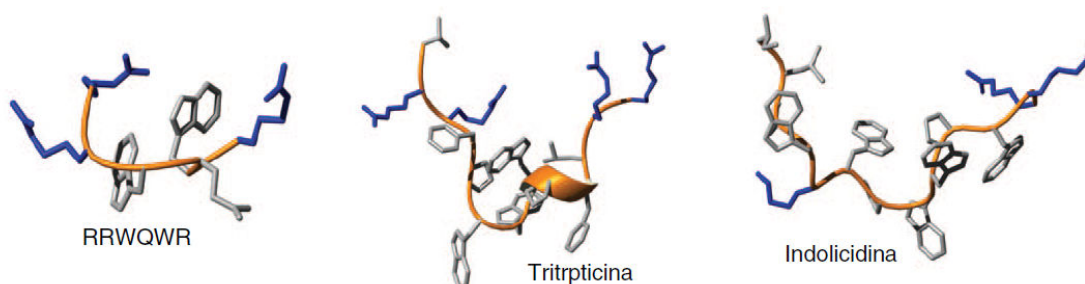


Figura 24: Peptídeos antimicrobianos com estruturação randômica exemplificando esta forma de enovelamento. . Fonte: Nguyen; Haney & Vogel, 2011

1.3.3. Mecanismo de ação

São descritos diferentes possíveis modos de ação para peptídeos antimicrobianos. A membrana externa de bactérias é povoada por lipídios negativamente carregados, ao contrário da membrana de animais e plantas. Devido a esta particularidade e a grande maioria dos peptídeos antimicrobianos serem positivos, estes possuem afinidade muito maior por membranas de bactérias do que pelas de animais ou plantas. Isso proporciona um sítio inicial de ligação com uma seletividade mais dirigida às bactérias, bem como uma baixa toxicidade para os organismos multicelulares (Zasloff, 2002). Além do mais, as membranas plasmáticas de animais possuem colesterol, geralmente inexistente em membranas bacterianas, o que aumenta o empacotamento dos lipídios reduzindo-se assim a possibilidade de ligação dos peptídeos antimicrobianos a elas, sendo para tal necessária uma concentração bem maior para tal efeito, quando comparado com as membranas bacterianas. No entanto, membranas heterogeneamente povoadas por colesterol não se beneficiam tanto desta particularidade, visto que, somente uma parte desta membrana estará protegida do ataque pelos peptídeos antimicrobianos (Brander, McHenry & Ramamoorthy, 2012).

Tanto os peptídeos com conformação de α -hélice, como os de folha- β possuem mecanismos de ação parecidos, seja por formação de poros ou por mecanismo de tapete (Figura 25). O modelo de formação de poros ocorre pela formação de diversos poros na membrana plasmática da célula onde, primeiramente, os peptídeos são atraídos pela membrana por diferentes mecanismos como p. ex. força eletrostática. Logo depois são anexados à membrana onde os poros formados podem ser do tipo barril de aduelas, onde a parede do poro é formada somente pelos peptídeos e suas partes hidrofílicas estão orientadas para dentro do poro e as hidrofóbicas para fora do poro interagindo com as caudas lipídicas. O outro modelo de poro é o toroidal que apesar de formar poros, assim como o barril de aduelas, induz a formação de um contínuo da parte hidrofílica da membrana dentro do poro sendo o lúmen do poro constituído tanto por lipídeos da membrana como pelas moléculas do peptídeo (Brogden, 2005).

A ação pelo mecanismo do tipo tapete ocorre comumente em concentrações elevadas do peptídeo, podendo ser uma via alternativa de ação de peptídeos que agem sob-baixas concentrações por meio de formação de poros (Nguyen; Haney & Vogel, 2011). Porém alguns peptídeos possuem este mecanismo como sua principal

forma de ação. Nestes casos, diversas moléculas do peptídeo se ligam às cabeças negativas dos fosfolipídios, cobrindo uma parte da membrana, que é fortemente perturbada formando aglomerados de micelas que conseqüentemente, destroem a membrana matando assim a célula (Brogden, 2005).

Contudo, existem outros mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos (Figura 25) envolvendo p. ex., a despolarização da membrana, a oxidação de lipídeos da membrana, a mudança de carga da membrana e mecanismos que são comumente encontrados em peptídeos com conformação estendida como a interação com proteínas chaperonas ou com junções de Holliday durante o reparo do DNA (Nguyen; Haney & Vogel, 2011). Outros mecanismos hipotetizados são a indução de hidrolases, ativação de vias de sinalização que culminam na morte celular, ou ações *in vivo* que podem ativar o sistema imune (Ganz, 2003).

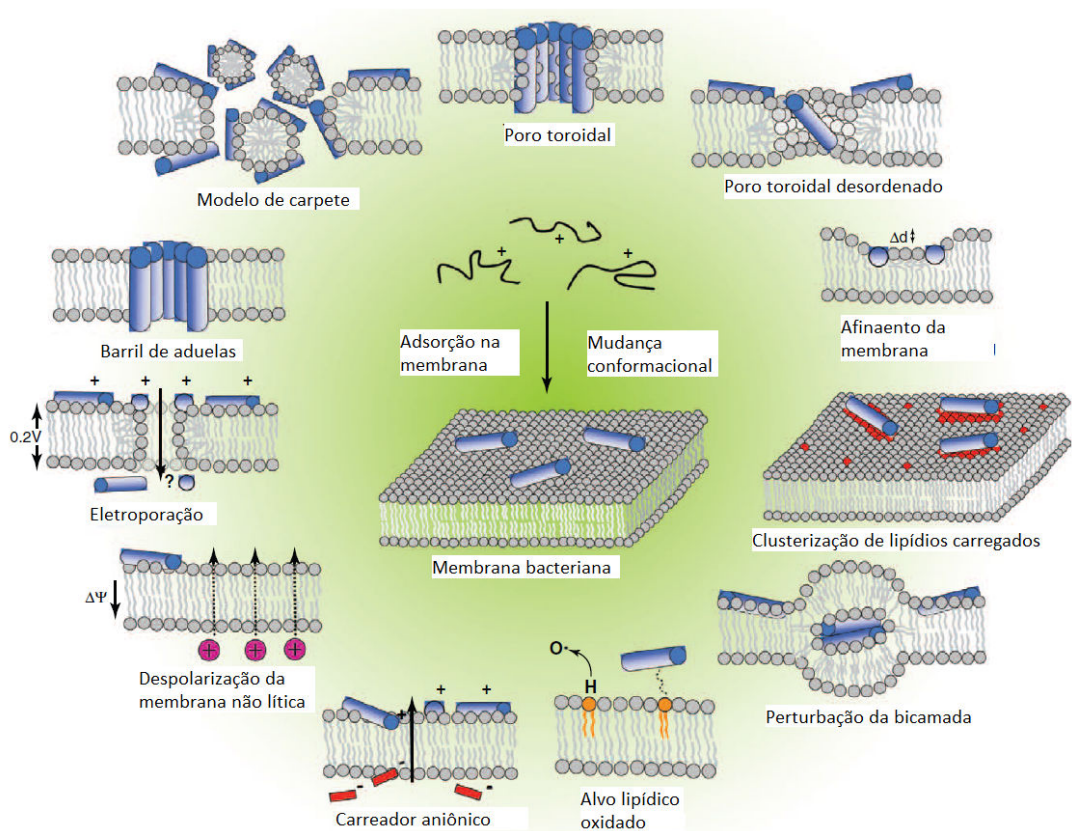


Figura 25: Mecanismos de ação encontrados em peptídeos antimicrobianos que tem como alvo a membrana plasmática. São apresentados os mais comuns p. ex. modelo de tapete, poro toroidal e barril de aduelas; bem como outros menos comuns ou raramente observados. Fonte: Nguyen; Haney & Vogel, 2011.

Um fato notável a respeito dos peptídeos antimicrobianos é que uma possível resistência é pouco provável de ocorrer, devido a necessidade do microrganismo de reorganizar toda a composição de lipídeos da membrana para assim reduzir a afinidade dos peptídeos pela membrana (Chen *et al*, 2005). Por essa razão, os peptídeos antimicrobianos são bons candidatos para possíveis novos antibacterianos ou antifúngicos, pois é possível que, cepas resistentes surjam muito lentamente e esta resistência deveria ser parcial (Izadpanah & Gallo, 2005). Os principais mecanismos de resistência envolvem a produção de proteases específicas para um peptídeo antimicrobiano ou mudanças pequenas na composição de lipídios (Zasloff, 2002).

Um peptídeo singular é o LyeTx I, produzido pela aranha *Lycosa erythrognatha* e que possui atividade significativa contra bactérias e fungos, sendo pouco hemolítico (Santos *et al*, 2010).

1.4. A ARANHA *Lycosa erythrognatha*

Popularmente conhecida por aranha-lobo (Figura 26), a aranha *Lycosa erythrognatha* (Lucas, 1836), possui uma peçonha complexa, porém pouco estudada. Estudos dos anos 60 demonstraram que essa peçonha possui polipeptídeos com atividade sobre íleo de cobaia, bem como componentes não proteicos tais como histamina e serotonina (Diniz, 1963 *apud* Cruz *et al*, 1994). Outros estudos como os de Ribeiro e colaboradores em 1990, mostraram que essa peçonha não possui efeitos necróticos na pele de humanos, porém provoca dor severa no local injuriado (Ribeiro *et al*, 1990). Outro estudo de 1994, utilizando-se nervos ciáticos de rã demonstrou que a peçonha possui atividade alterando a repolarização dos nervos estudados, esta atividade possivelmente se deve a um polipeptídeo com massa entre 2 e 15 KDa, sendo tal atividade identificada na fração IV de uma cromatografia de fase reversa (Cruz *et al*, 1994).



Figura 26: Aranha *Lycosa erythrognatha* onde pode ser visto a parte frontal do cefalotórax, as quelíceras e os olhos. Fonte: Santos, 2009.

Todavia, somente em 2010 essa peçonha voltou a ser estudada, sendo purificado um peptídeo antimicrobiano nomeado LyeTx I com massa de 2831,1 Da. Essa molécula possui atividade contra bactérias e fungos sendo investigadas as espécies

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*, todas elas susceptíveis ao peptídeo. Porém em teste hemolítico, utilizando-se hemácias de coelho como modelo, mostrou-se que LyeTxI causa baixo índice de hemólise (Santos *et al*, 2010). A estrutura deste peptídeo é apresentada na Figura 27.

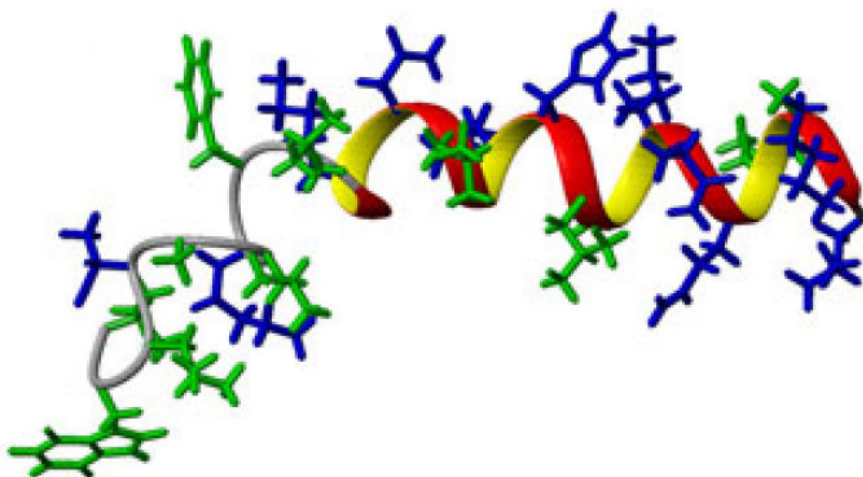


Figura 27: Estrutura de RMN obtida por Santos *et al* do peptídeo LyeTx I. Os resíduos hidrofílicos estão representados em azul e os hidrofóbicos em verde. Fonte: Santos *et al*, 2010 com modificações.

Devido a baixa recuperação do peptídeo LyeTx I a partir da peçonha da aranha, este foi sintetizado para realização dos testes biológicos e físico-químicos, obtendo-se quantidades adequadas para os estudos em curso. Entretanto durante a síntese foram obtidos subprodutos como o peptídeo des-His16-LyeTx I, que apresentou-se promissor devido a sua atividade diferenciada sobre lipossomos, quando comparado com o LyeTx I (Santos, 2009). Com base no aumento de atividade pela perda de um único resíduo de aminoácido (a histidina 16), foi levantada a possibilidade de se minimizar o peptídeo LyeTx I e assim torná-lo mais ativo, menos hemolítico e com menores custo para a síntese, pontos imprescindíveis para um possível novo fármaco: alta atividade baixa toxicidade e mais baixo custo de produção.

Em vista desse cenário, peptídeos antimicrobianos que começaram a ser descritos há mais de 30 anos passaram a ganhar importância, pois eles possuem diversas atividades seja contra bactérias, ou fungos, ou até mesmo contra diversos grupos de protozoários. Essa classe de compostos constitui então, uma boa candidata a ser explorada para a criação de novos fármacos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Obter peptídeos sintéticos, derivados da sequência de LyeTx I e avaliar suas possíveis atividades antimicrobianas, bem como estudar suas estruturas secundárias, buscando-se possíveis candidatos para novos fármacos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar quimicamente peptídeos derivados da sequência de LyeTx I, com diminuição da cadeia de aminoácidos;
- Purificar os peptídeos sintéticos produzidos, avaliando-se a pureza e a massa dos mesmos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos peptídeos obtidos, contra bactérias e fungos;
- Avaliar a atividade antifúngica dos peptídeos em complexos com ciclodextrina
- Investigar a atividade hemolítica dos peptídeos puros e em complexos com ciclodextrina;
- Determinar a estrutura secundária dos peptídeos através de técnicas de dicroísmo circular e diagramações *in silico*;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Equipamentos:

Mesa agitadora marca Velp Scientifica

Banho seco marca Labnet

Liofilizador da marca Thermo, ModulyoD FR-drying com bomba Thermo RV8

Aparelho de coleta de água milli-Q® marca Millipore modelo Direct-Q® 3UV

Espectrômetro de massas marca Bruker MALDI-TOF Autoflex III

Cromatógrafo de alta pressão tipo HPLC marca Shimadzu equipado com uma unidade de controle, uma bomba, um leitor de UV e um desgaseador

Coluna C-18 de 250mm x 10mm widepore 5µm semipreparativa da marca Supelco™

Espectrofotômetro da marca Thermo Scientific, modelo BioMate 3S

Estufa marca Fanem, modelo 347 CD

Centrífuga modelo Sorvall ST 16R da marca Thermo Scientific

Aparelho de ELISA modelo Multiskan GO da marca Thermo Scientific

Espectropolarímetro, modelo Jasco-715 da marca Jasco

3.1.2. Reagentes:

Resina Rink Amide (Iris Biotech GmbH)

Piperidina (Sigma-Aldrich)

Dimetilformamida (Synth)

Ninhidrina (Merck)

Diclorometano (Synth)

1,3-diisopropilcarbodimida (Sigma-Aldrich)

1-hidroxibenzotriazola (Iris Biotech GmbH)

Lys N- α -(9fluorenilmetiloxicarbonil)-N- ϵ -t-butil-oxicarbonil-L-lisina marca (Iris Biotech GmbH)

Gly N- α -(9fluorenilmetiloxicarbonil)-L-glicina (Iris Biotech GmbH)

Leu N- α -(9fluorenilmetiloxicarbonil)-L-leucina (Iris Biotech GmbH)

Asn N- α -(9fluorenilmetiloxicarbonil)-N- β -tritol-L-asparagina (Iris Biotech GmbH)

Phe N- α -(9fluorenilmetiloxicarbonil)-L-fenilalanina (Iris Biotech GmbH)

Ala N- α -(9fluorenilmetiloxicarbonil)-L-alanina (Iris Biotech GmbH)

Thr N- α -(9fluorenilmetiloxicarbonil)-o-t-butil-L-treonina (Iris Biotech GmbH)

Trp N- α -(9fluorenilmetiloxicarbonil)-N-in-t-butil-oxicarbonil-L-triptofano (Iris Biotech GmbH)

IsoN- α -(9fluorenilmetiloxicarbonil)-L-isoleucina (Iris Biotech GmbH)

Isopropanol (Synth)

Anidrido acético (Vetec)

Ácido trifluoracético grau HPLC (Vetec)

Triisopropilsilano (Sigma-Aldrich)

Isopropoxi-isopropano (Éter diisopropílico) (Vetec)

Nitrogênio adquirido da White Martins

Calibrante de peptídeos Peptide calibratin standard II (Bruker Daltonics)

Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma-Aldrich)

Acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker)

Meio Mueller-Hinton(Difco)

Ágar Mueller-Hinton(Difco)

Meio RPMI com glutamina e indicador vermelho de fenol e sem bicarbonato (Inlab)

Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (Sigma-Aldrich)

Cloreto de bário (Synth)

Ácido sulfúrico (Quimex)

Cloreto de sódio (Sigma-Aldrich)
Ágar sabouraud (Difco)
Hidroxipropil- β -ciclodextrina (Sigma-Aldrich)
Cloreto de potássio (Fmaia)
Fosfato de sódio dibásico (Synth)
Fosfato de potássio monobásico (Reagen)
Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
2,2,2-trifluoretanol (Sigma-Aldrich)
Dodecil sulfatode sódio (Avanti Polar Lipids)
Dodecil fosfocolina (Avanti Polar Lipids)
Nitrogênio de alta pureza (Air products)
Outros reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

3.1.3. Material biológico:

Escherichia coli ATCC 25922 (USA)
Staphylococcus aureus ATCC 33591 (USA)
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (USA)
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 (USA)
Acinetobacter baumannii ATCC 19606 (USA)
Cryptococcus neoformans ATCC 24067 (USA)
Cryptococcus gatti ATCC 32608 (USA)
Candida krusei ATCC 20029 (USA)
Hemácias de coelho da CasaLab (Belo Horizonte, MG)

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Síntese dos peptídeos em fase sólida

A escolha dos peptídeos de estudo foi feita baseando-se em dados de estudos prévios de Santos e colaboradores (2012, dados não publicados), que buscaram minimizar o peptídeo LyeTx I. Com esses dados, mostrou-se que a região do *C*-terminal poderia ser removida, aparentemente sem prejuízo da atividade antimicrobiana. Baseados nestas informações, desenhamos os três peptídeos derivados da sequência de LyeTx I. LyeTxImn foi um peptídeo desenhado pela remoção de parte do *C*-terminal. LyeTxImn Δ K e LyeTxImn Δ KAc foram planejados como uma tentativa inicial de síntese do derivado LyeTxImn, porém com uma lisina adicional na quinta posição. LyeTx I também foi sintetizada para uso como controle nos experimentos "in vitro".

Os quatro peptídeos programados, foram sintetizados no Laboratório de Síntese e Estrutura de Peptídeos (LASEP) do Departamento de Química da UFMG, utilizando-se o método de síntese manual de Fmoc/*t*-butila (CHAN & WHITE, 2000; MERRIFIELD, 1963). A síntese foi realizada utilizando-se a resina Rink Amide -com grau de substituição de 0,63mmol/g. A resina Rink Amide é provida de grupos protetores Fmoc nos respectivos sítios de acoplamento para a síntese em fase sólida. Foram utilizadas duas lavagens, de 15 min. cada, com uma solução de piperidina a 20% (v/v) em *N,N*-dimetilformamida (DMF) para a remoção do grupo protetor. Nesta etapa foi realizado o teste de Kaiser (para detectar aminas livres) utilizando-se uma solução de ninhidrina (Chan & White, 2000) para monitorar a etapa de desproteção, onde um resultado positivo, cor azul, acusa a presença de aminas, os sítios de acoplamento dos aminoácidos a serem adicionados. Caso o resultado fosse negativo, uma lavagem adicional com solução de piperidina era realizada.

Após a desproteção ser realizada a resina foi incubada com o primeiro aminoácido protegido pelo Fmoc. Nesta etapa foi utilizada uma solução contendo 2 ml de DMF e 1 ml de diclorometano (DCM) como solvente, para o acoplamento utilizaram-se concentrações equimolares do aminoácido, de 1,3-diisopropilcarbodimida (DIC) e de 1-hidroxibenzotriazola (HOBT). Para o acoplamento foi usado excesso de 4 equivalentes molares para a concentração de peptídeo a ser sintetizado, baseado no grau de substituição da resina. Após duas horas de incubação, uma alíquota da resina era removida para realização do teste de Kaiser, onde um resultado negativo significou um

acoplamento eficiente, pois os grupos aminos livres foram ocupados, porém em caso de um teste positivo, a etapa de acoplamento era repetida.

As etapas de desproteção e acoplamento foram repetidas até todos os resíduos de aminoácidos serem adicionados. Entre cada etapa de desproteção e de acoplamento, a resina foi lavada três vezes com DMF e isopropanol (ISO), alternadamente, e depois por duas vezes com DCM.

Peptídeos com *N*-terminal acetilados foram produzidos pela desproteção do ultimo resíduo de aminoácido e incubação com 4 equivalentes de anidrido acético por duas horas, e, após esta reação, o teste de Kaiser era realizado para verificar a eficácia da incorporação do grupo acetil, onde um teste negativo acusava o sucesso da reação.

Para a clivagem, inicialmente o ultimo grupamento Fmoc era removido dos peptídeos não acetilados e, após o teste de Kaiser acusar a eficácia do processo, a clivagem era realizada utilizando-se uma solução de ácido trifluoracético (TFA) a 95% (v/v) e triisopropilsilano (TIS) a 2,5% (v/v). A clivagem ácida, além de liberar os peptídeos da resina, remove os grupos protetores de algumas cadeias laterais de aminoácidos protegidas, tais como asparagina, lisina, treonina e triptofano. A clivagem ácida dos peptídeos ligados à resina Rink Amide, libera-os com o C-terminal amidado.

TFA e TIS foram removidos por secagem com fluxo de N₂ gasoso (White Martins[®]) e, após a secagem parcial, os peptídeos foram precipitados com éter diisopropílico. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 3500 rpm por 5 min. sendo o sobrenadante desprezado. O processo de precipitação foi repetido 5 vezes. Em seguida o éter remanescente foi removido por fluxo de N₂ gasoso, restando após a evaporação o peptídeo.

Cada um dos peptídeos sintetizados foram ressuspensos em 35 mL de água milli-Q[®] e depois liofilizados em liofilizador da marca Thermo, ModulyoD FR-drying. Desta forma, foram obtidos 250 mg de cada um dos peptídeos que foram novamente ressuspensos em 25 mL de água milli-Q[®] e congelados a -20°C até a purificação.

3.2.2. Análise por espectrometria de massas

As análises de pureza foram realizadas utilizando-se um MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics), presente no núcleo de biomoléculas do ICB/UFMG.

Para o preparo das amostras 0,5 µL de cada uma delas foram cocrystalizados com 0,5 µL de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/ml) na placa MTP AnchorChip 600/384. As análises foram realizadas utilizando-se o modo refletor, para obtenção de

melhores resultados. Como calibrante foi utilizado o Peptide Standard II (Bruker Daltonics) que consiste de uma mistura de bombesina, substância P, angiotensina I, angiotensina II, somatostatina, ACTHclip 1-17 e ACTH clip 18-39.

3.2.3. Purificação dos peptídeos sintéticos

Os peptídeos foram purificados utilizando-se uma coluna de fase reversa C-18 semipreparativa, marca Supelco e um sistema HPLC (high pressure liquid chromatography) (Shimadzu). A coluna foi equilibrada com uma solução de TFA a 0,1% em água milli-Q[®] (sol. A). Após a injeção de 5 mg de peptídeo em 1 ml de sol. A, utilizou-se um gradiente linear (detalhado abaixo) de TFA a 0,1% (v/v) em acetonitrila (sol. B), a um fluxo de 5 ml/min. A eluição das frações foi monitorada a 220 nm e a pureza, bem como a identificação dos peptídeos de interesse, foram monitorados por espectrometria de massas (MALDI-TOF).

Durante 5 min. a coluna foi percolada pela sol. A, em seguida pela sol. B - 0% a 30% por 5 min., depois -30% a 50% por 40 min e 50% a 100% por 5 min. No final a coluna foi lavada por 5 min com 100% de sol. B para a remoção de compostos altamente hidrofóbicos.

Após a purificação, as frações de interesse foram liofilizadas e os peptídeos puros foram ressuspensos em água milli-Q[®]. A concentração dos peptídeos foi determinada por dosagem espectrofotométrica por absorbância a 280 nm (espectrofotômetro marca Thermo Scientific, modelo BioMate 3S). O cálculo das concentrações baseou-se na lei de Lambert-Beer, conforme a equação abaixo.

$$A_{280} = L. M. \varepsilon$$

Onde: A_{280} é a absorbância obtida; "L" é o caminho óptico do feixe de luz (valor igual a 1 cm); "M" é a concentração molar da substância e "ε" é o coeficiente de extinção molar da substância. O ε foi calculado através da página do EXPASY: "<http://web.expasy.org/protparam/>", que leva em consideração a existência de resíduos de aminoácidos como a tirosina e triptofano bem como resíduos de cisteína ou pontes dissulfeto.

3.2.4. Ensaios de atividade antimicrobiana

3.2.4.1. Atividade antibacteriana

Os ensaios da possível atividade antibacteriana com os peptídeos foram realizados utilizando-se o método de microdiluição, de acordo com o recomendado pelo CLSI (2013) na norma M100-S23. Foram feitas diluições seriadas dos peptídeos partindo-se de uma concentração máxima de 256 µg/mL e reduzindo-se pela metade este valor a cada diluição até uma concentração de 0,125 µg/mL em caldo Mueller-Hinton (MH). As bactérias utilizadas, bem como seus números de referência (American Type Culture Collection - ATCC), estão especificadas na Tabela 3.

Após a multiplicação bacteriana em meio sólido (ágar MH, 24 h, 37 °C), uma amostra da cultura foi removida, utilizando-se uma alça estéril, e dissolvida em solução salina (NaCl 0,85% (p/v)). A quantidade de bactérias foi ajustada utilizando-se a escala 0,5 de McFarland para obter cerca de 10^8 UFC/ml. Em seguida o inóculo foi diluído 200 vezes e colocado em cada um dos poços contendo diferentes diluições dos peptídeos e nos poços dos controles positivos de crescimento, de forma a obter cerca de 5×10^5 UFC/mL em cada poço. Controles negativos, contendo apenas o meio MH e meio MH com peptídeos foram também utilizados. Após 24 h de incubação a 37 °C as placas foram lidas, macroscopicamente. A menor concentração do peptídeo, onde o crescimento bacteriano visível foi inibido, corresponde à concentração inibitória mínima (*Minimum Inhibitory Concentration* - MIC). Todas as incubações foram feitas em estufa (marca Fanem, modelo 347 CD). O experimento foi realizado com um N amostral de 3 e cada um foi feito em duplicata, para possibilitar a realização de teste estatístico. Para tal, utilizou-se o teste de Friedman utilizando-se o pós-teste de Dunn, no programa Graph Pad Prism 5.01.

Para o ensaio de concentração bactericida mínima (*Minimum Bactericidal Concentration* - MBC) foram semeados, com auxílio de alça de vidro “em L”, 50 µL da suspensão contida no poço, que correspondeu ao MIC e de duas concentrações superiores a este valor (ou seja, MIC, 2 vezes o valor do MIC e 4 vezes o MIC) em placas de Petri contendo o meio ágar MH. Após 24 h de incubação, a 37° C em estufa, o número de colônias formadas foi contado para as três concentrações testadas e para o controle positivo. Os valores de MBC foram considerados como a redução de 99,9% do número de colônias quando comparados com o controle positivo.

Tabela 3: Amostras microbianas utilizadas para os experimentos de MIC, com as respectivas ATCCs discriminadas.

Espécie de bactéria	ATCC usada
<i>Escherichia coli</i>	25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	33591
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606

3.2.4.2. Atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi determinada de acordo com a norma M27-A2 do CLSI (2001). Foram realizadas diluições seriadas dos peptídeos, partindo-se de uma concentração máxima de 256 µg/mL e reduzindo-se pela metade a cada diluição este valor no meio RPMI. As ATCCs de fungos utilizadas neste ensaio são apresentadas na Tabela 4.

Os inóculos de fungos foram semeados em meio ágar Sabouraud, com o auxílio de uma alça, e incubados por 48 h para o fungo *Candida krusei*, e por 72 h, para as espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti*. Após o crescimento três amostras foram retiradas e adicionadas à solução salina de NaCl a 0,85% (p/v), sendo posteriormente ajustadas, usando-se uma escala de McFarland para obtenção de 1×10^6 a 5×10^6 células fúngicas/ml, para tanto foram feitas leituras de transmitância em espectrofotômetro a 530 nm. Após o ajuste, os inóculos foram diluídos para se obter nos poços da placa entre 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ células por ml. Todas as incubações foram feitas em estufa. O experimento foi realizado com um N amostral de 3 e cada ponto foi feito em duplicata. O teste estatístico utilizado foi o de Friedman utilizando-se o pós-teste de Dunn (programa Graph Pad Prism 5.01).

Para determinação das concentrações mínimas, onde os peptídeos são fungicidas (CFM: concentração fungicida mínima), após a leitura das placas, retiraram-se 10 µL do poço correspondente ao MIC e dos dois poços, com valores acima do MIC, os quais foram depositados em placas contendo o meio ágar Sabouraud. As placas foram incubadas pelo tempo correspondente ao de crescimento do microrganismo, como mencionado acima, e, em seguida foi verificada a presença ou não do crescimento de fungos. No ponto depositado onde não houve crescimento, corresponderia ao valor do CFM.

Tabela 4: Cepas de fungos, utilizadas para os experimentos de MIC com os peptídeos complexados com ciclodextrina, com as respectivas ATCCs discriminadas.

Espécie de fungo	ATCC usada
<i>Cryptococcus neoformans</i>	24067
<i>Cryptococcus gatti</i>	32608
<i>Candida krusei</i>	20029

3.2.5. Ensaio da atividade hemolítica

Para este ensaio foram utilizados eritrócitos de coelho, comprados da empresa CasaLab (Belo Horizonte, MG). Foram feitas diluições seriadas dos peptídeos puros (partindo-se de 2 Mm) e dos peptídeos complexados com hidroxipropil- β -ciclodextrina (partindo-se de 1mM). Incubaram-se estas preparações com eritrócitos de coelho (1%, v/v) em solução tampão fosfato-salina (PBS), pH 7,4 (composição em mM NaCl -140; KCl - 2,7 ; Na₂HPO₄- 10 mM e KH₂PO₄- 1,8 mM). Como controle negativo, incubou-se a preparação de eritrócitos a 1% (v/v) apenas com PBS, e como controle positivo a preparação de eritrócitos a 1% (v/v) foi incubada com uma solução de Triton X-100 a 1% (v/v) em PBS. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, incubada por 1 h, a 37° C em estufa. Segue-se uma centrifugação (300 g por 5 min, centrífuga Thermo Scientific, modelo Sorvall ST 16R). O sobrenadante (50 μ L) foi transferido para outra placa de 96 poços e lido em aparelho de ELISA (Thermo Scientific, modelo Multiskan GO), a 405 nm. Para os peptídeos livres o experimento foi realizado com um N amostral de 3 e cada ponto foi feito em duplicata e, para os peptídeos complexados com hidroxipropil- β -ciclodextrina, o N amostral foi de 5 com cada ponto feito em duplicata.

Para os cálculos da dose efetiva para causar 50% de hemólise (EC₅₀) e da concentração hemolítica mínima (MHC) utilizou-se o programa Sigma Plot 11.0, com a equação da curva sigmóide de Hill de 3ª ordem, ou a equação exponencial de crescimento, modelo Stirling, apresentadas abaixo. A concentração hemolítica mínima foi determinada como o ponto onde, 1% das hemácias foram lisadas.

Equação de Hill 3ª ordem:

$$y = \frac{ax^b}{c^b + x^b}$$

Equação de crescimento, modelo Stirling : $y = y_0 + \frac{a(e^{bx} - 1)}{b}$

A comparação entre as curvas concentração-resposta dos peptídeos foram feitas através do programa Graph Pad Prism 5.01, realizando-se o teste de Critério de Informação de Akaike.

3.2.6. Formulação dos peptídeos em ciclodextrina

Os peptídeos foram adicionados a hidroxipropil- β -ciclodextrina na proporção molar de 1:1 em água, sob agitação constante, a 200 rpm, por 5 horas e depois liofilizados (liofilizador Thermo, ModulyoD FR-drying). Para o uso, os peptídeos foram ressuspensos em água milli-Q® para os testes de MIC contra fungos, ou em tampão fosfato salina, para os ensaios hemolíticos.

3.2.7. Dicroísmo circular

Para analisar a estrutura secundária dos peptídeos sintetizados foram feitos experimentos de dicroísmo circular, utilizando-se um espectropolarímetro, modelo Jasco-715. Para todas as leituras foram feitas varreduras abrangendo as faixas de 190 a 280 nm, sendo feitas análises com distância de 0,2 nm cada uma.

Foram investigadas três condições, i) diferentes porcentagens de (v/v) de 2,2,2-trifluoretanol (TFE), um álcool halogenado, utilizado como mimetizador de ambientes de membrana plasmática, ii) diferentes concentrações molares de dodecil sulfato de sódio (SDS) e iii) diferentes concentrações de dodecil fosfocolina (DPC) - detergentes aniônicos e zwitteriônicos, respectivamente. As diferentes concentrações de TFE, SDS e DPC utilizadas para as leituras estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Diferentes percentagem e concentrações utilizadas de 2,2,2-trifluoretanol (TFE) dodecil sulfato de sódio (SDS) e dodecil fosfocolina (DPC), nos experimentos de dicroísmo circular com os peptídeos sintéticos.

TFE	SDS	DPC
10%	20 μ M	20 μ M
20%	50 μ M	50 μ M
30%	100 μ M	100 μ M
40%	200 μ M	200 μ M
50%	500 μ M	500 μ M
60%	1 mM	1 mM
	2 mM	2 mM
	5 mM	5 mM
	10 mM	10 mM
	15 mM	15 mM
	20 mM	20 mM

Para aquisição dos dados foram feitas quatro acumulações para as diferentes percentagens de TFE, e, seis acumulações para as diferentes concentrações de SDS e DPC.

Após obtenção dos espectros estes foram transformados em tabelas e utilizados para realizar a desconvolução de cada grupo de dados e assim compreender os possíveis graus de estruturação dos peptídeos com diferentes concentrações dos três meios utilizados. O software utilizado para as análises foi o CDPro, tendo-se como referência as bases de dados CDSSTR, CONTINLL e SELCON3 para obtenção das pontuações de estruturação. A média aritmética foi obtida dos três valores encontrados.

3.2.8. Análise diagramática de alfa hélice

A análise preliminar de posição dos resíduos de aminoácidos foi realizada pelo diagrama de "wheel", utilizando-se o programa "<http://kael.net/helical.htm>" para a construção do gráfico. Diferentes posições de início dos segmentos de alfa hélice para o peptídeo LyeTx I foram testados utilizando-se como base os dados do diagrama NOE (Santos, 2010).

4. RESULTADOS

4.1. SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

Foram sintetizados 250 mg de cada um dos quatro peptídeos, nomeados LyeTx I, LyeTxImn, LyeTxImnΔK e LyeTxImnΔKAc. O peptídeo LyeTx I é o mesmo já descrito por Santos *et al* em 2010. Já o peptídeo LyeTxImn possui os primeiros 15 resíduos de aminoácidos *N*-terminais da sequência de LyeTx I, e possui amidação *C*-terminal. LyeTxImnΔK foi obtido como um subproduto de síntese, apresentando uma lisina extra entre o quarto e quinto aminoácido da sequência de LyeTxImn. LyeTxImnΔKAc somente difere do peptídeo anterior (LyeTxImnΔK), por possuir seu *N*-terminal acetilado. A estrutura primária dos quatro peptídeos é apresentada na Tabela 6, juntamente com alguns parâmetros físico-químicos.

Tabela 6: Alguns parâmetros físico-químicos, obtidos *in silico*, dos peptídeos sintetizados. A lisina extra está indicada em vermelho

Peptídeo	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	M.Mon.	Sequência	pI teórico
LyeTx I	5500	2830,73	H-IWLTALKFLGKNLGKHLAKQLAKL-NH ₂	10,60
LyeTxImn	5500	1700,03	H-IWLTALKFLGKNLGK-NH ₂	10,30
LyeTxImnΔK	5500	1828,13	H-IWLTKALKFLGKNLGK-NH ₂	10,48
LyeTxImnΔKAc	5500	1871,13	Ac-IWLTKALKFLGKNLGK-NH ₂	10,48

M.Mon: massa monoisotópica, pI: ponto isoelétrico e ϵ : coeficiente de extinção molar em A280

Não houve dificuldades de desproteção dos resíduos de aminoácidos dos peptídeos sintetizados. Entretanto, os quatro últimos resíduos a serem acoplados na síntese de LyeTx I necessitaram de um segundo acoplamento (os quatro primeiros aminoácidos da sequência, lembrando que a síntese química é realizada em sentido oposto ao da síntese ribossomal).

A análise de pureza dos peptídeos, realizada por espectrometria de massas, MALDI-TOF, acusou a presença de uma série de contaminantes (Figura 28), o que demandou uma purificação, feita por cromatografia de fase reversa em coluna semipreparativa.

Como resultado da cromatografia foram obtidas diversas frações (Figura 29), sendo cada uma analisada por espectrometria de massa do tipo MALDI-ToF. As frações

correspondentes aos peptídeos de interesse estão assinaladas em vermelho e seus espectros de massa estão apresentados na Figura 30.

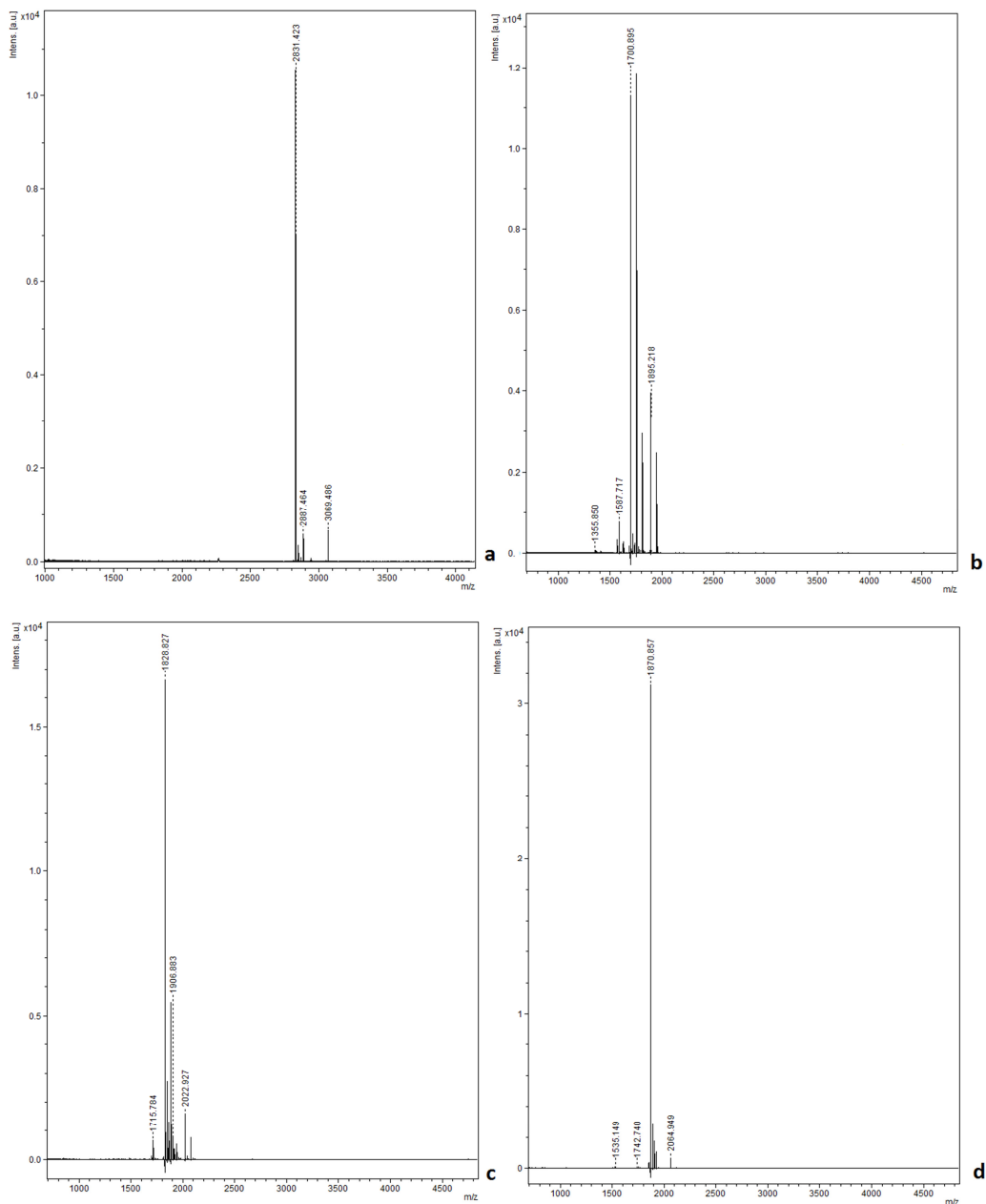


Figura 28: Espectros de massas obtidos em espectrômetro de massas MALDI-ToF, referentes aos produtos brutos da síntese dos peptídeos. **a:** LyeTxI; **b:** LyeTxImn; **c:** LyeTxImnΔKe **d:** LyeTxImnΔKAc; sendo utilizado o modo refletido positivo, analisando-se a faixa de massas de 970 a 4800 Da. Foram aplicados 0,5 μ l da solução de cada peptídeo em placa MTP AnchorChip juntamente com ácido α -ciano-4-hidroxibenzoico.

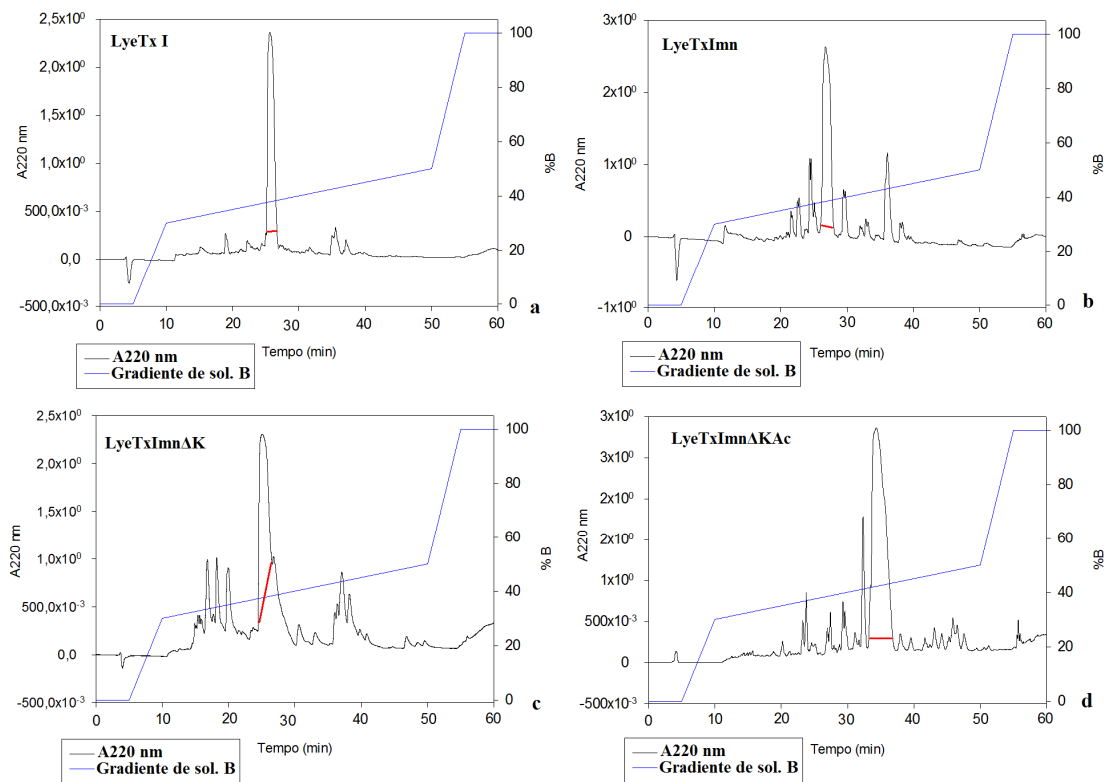


Figura 29: Cromatogramas da purificação dos peptídeos sintéticos.a:LyeTxI; **b:**LyeTxImn; **c:**LyeTxImnΔK **d:** LyeTxImnΔKAc. As respectivas frações assinaladas em vermelho correspondem aos peptídeos de interesse. 5mg de produto bruto dissolvidos em 1 mL de água com 0,1% de TFA foram aplicados na coluna(semipreparativa de fase reversa C-18, Supelco) a um fluxo de 5 ml/min, eluindo-se as frações com um gradiente linear de ACN com 0,1% TFA, sendo os respectivos espectros de massas apresentados na figura 30.

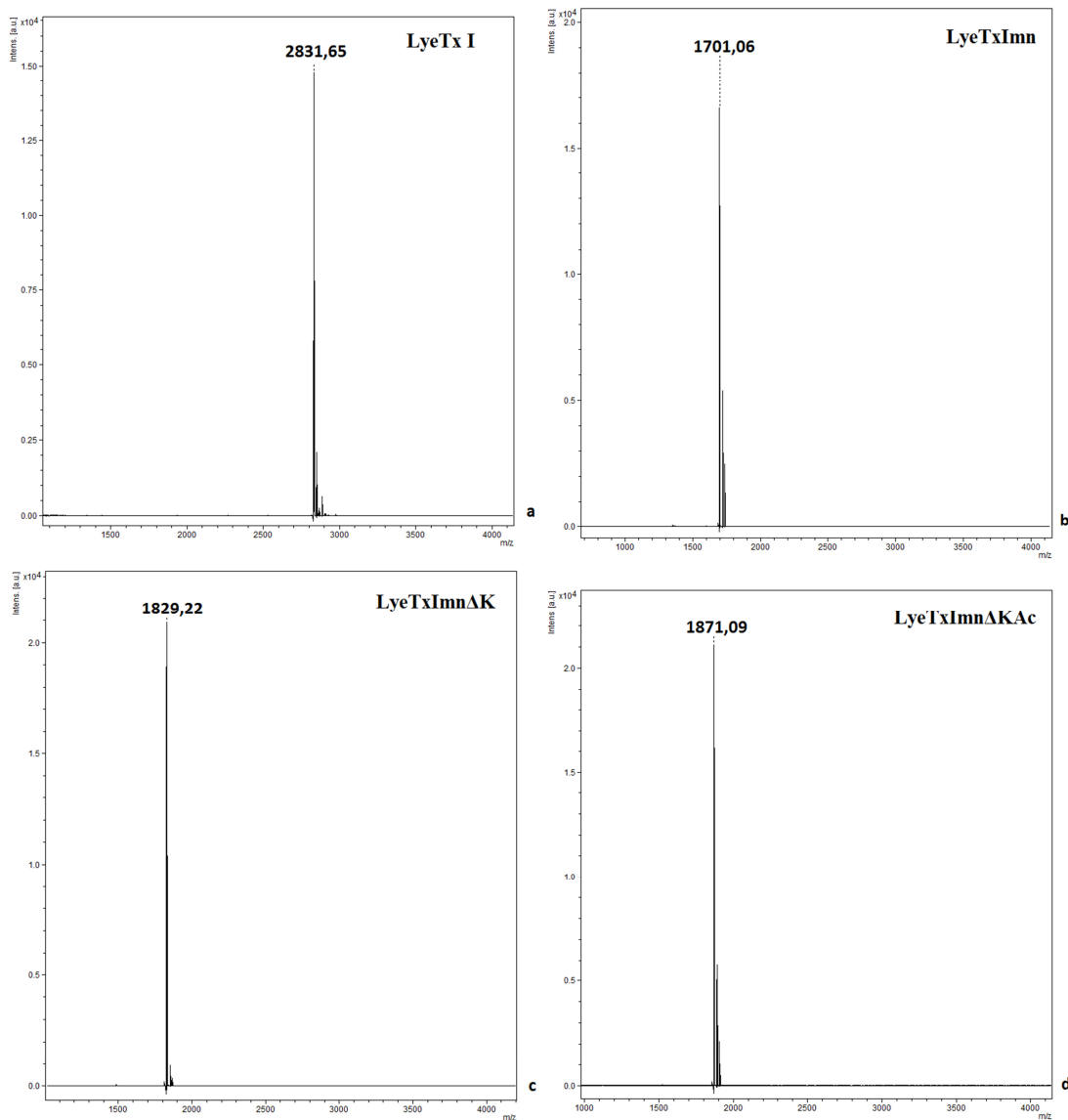


Figura 30: Espectros de massas obtidos em espectrômetro de massas MALDI-TOF, referentes às frações purificadas dos produtos de síntese. **a:** LyeTxI; **b:** LyeTxImn; **c:** LyeTxImnΔK **d:** LyeTxImnΔKAc; sendo utilizado o modo refletido positivo, analisando-se a faixa de massas de 970 a 4800 Da. Foram aplicados 0,5 μ l da solução de cada peptídeo em placa MTP AnchorChip juntamente com ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico.

O rendimento dos peptídeos, em cada síntese, foi calculado utilizando-se a área sob a fração de interesse coletada. Para isso utilizou-se o software Origin 8.0 para os cálculos, bem como as informações obtidas pelo programa de controle do cromatógrafo Shimadzu. Estes dados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Rendimentos, em porcentagem, dos peptídeos sintetizados, após purificação

Peptídeo	Rendimento em porcentagem
LyeTx I	47%
LyeTxImn	39%
LyeTxImnΔK	29%
LyeTxImnΔKAc	45%

Após purificação, os peptídeos de interesse foram liofilizados e as amostras já secas foram ressuspendidas em água milli-Q para uso nos experimentos.

4.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.2.1. Atividade antibacteriana

Os dados de MICs são apresentados na Tabela 8, incluindo valores de MICs para alguns antibacterianos usados como princípios ativos na clínica. Os valores de concentração bactericida mínima (MBC) são apresentados na Tabela 9.

Os testes estatísticos apresentaram que, para *E. coli*, houve significância estatística para as diferenças de MICs entre LyeTxImn e LyeTxImnΔK (95%) e LyeTxImn e LyeTx I (99%). Para *S. aureus* houve significância entre as diferenças de valores dos MICs de LyeTxImn e LyeTx I (99%) e de LyeTxImnΔK e LyeTx I (95%). Para *S. epidermidis* houve diferenças entre os MICs de LyeTxImn e LyeTxImnΔKAc (95%), de LyeTxImn e LyeTxI (99,9%) e de LyeTxImnΔK e LyeTx I (95%). As diferenças estatísticas dos MICs de *A. baumannii* significativas foram entre LyeTxImn e LyeTxImnΔK (95%), entre LyeTxImn e LyeTx I (99,9%) e entre LyeTxImnΔKAc e LyeTx I (95%). Por fim as diferenças de valores dos MICs com relevância estatística para *P.aeruginosa* foram os conjuntos LyeTxImn e LyeTxImnΔK (95%), LyeTxImn e LyeTx I (99,9%) e LyeTxImnΔKAc e LyeTx I (95%). A Figura 31 apresenta estes dados na forma de quadro, onde pode-se visualizar as comparações estatísticas.

Tabela 8: Valores de MICs, representados em µg/ml e em molaridade (µM), dos peptídeos estudados, contra diversas bactérias, Em asterisco (*) dados do fármaco tetraciclina, em asterisco duplo (**) dados do cloranfenicol. SD: sem dados

Espécie	ATCC #	LyeTxImn		LyeTxImnΔKAc		LyeTxImnΔK		LyeTx I		Fármaco	
		Em µM	Em µg	Em µM	Em µg	Em µM	Em µg	Em µM	Em µg	Em µM	Em µg
<i>Escherichia coli</i>	25922	14,93	25,3	3,01	5,6	0,96	1,7	1,41	4,0	0,90*	0,2*
<i>Staphylococcus aureus</i>	33591	4,70	8,0	4,27	8,0	3,08	5,6	0,70	2,0	99,03**	32**
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	37,64	64,0	24,18	45	9,82	17,9	2,82	8,0	14,06*	15,6*
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	4,18	7,1	2,13	4,0	2,18	4,0	0,70	2,0	24,15**	7,8**
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	5,27	8,9	2,68	5,0	1,09	2,0	0,70	2,0	SD	SD

MIC: concentração inibitória mínima.

Tabela 9: Valores de MBCs, representados em µg/ml e em molaridade (µM), dos peptídeos estudados, contra diversas bactérias

Espécie	ATCC #	LyeTxImn		LyeTxImnΔKAc		LyeTxImnΔK		LyeTx I	
		Em µM	Em µg	Em µM	Em µg	Em µM	Em µg	Em µM	Em µg
<i>Escherichia coli</i>	25922	14,93	25,3	8,55	16,0	2,17	4,0	2,82	8,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	33591	9,41	16,0	17,10	32,0	4,36	8,0	2,82	8,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	37,64	64,0	34,20	64,0	11,02	20,1	2,82	8,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	4,70	8,0	2,13	4,0	2,18	4,0	0,70	2,0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	5,92	10,0	4,27	8,0	1,09	2,0	1,41	4,0

MBC: concentração bactericida mínima.

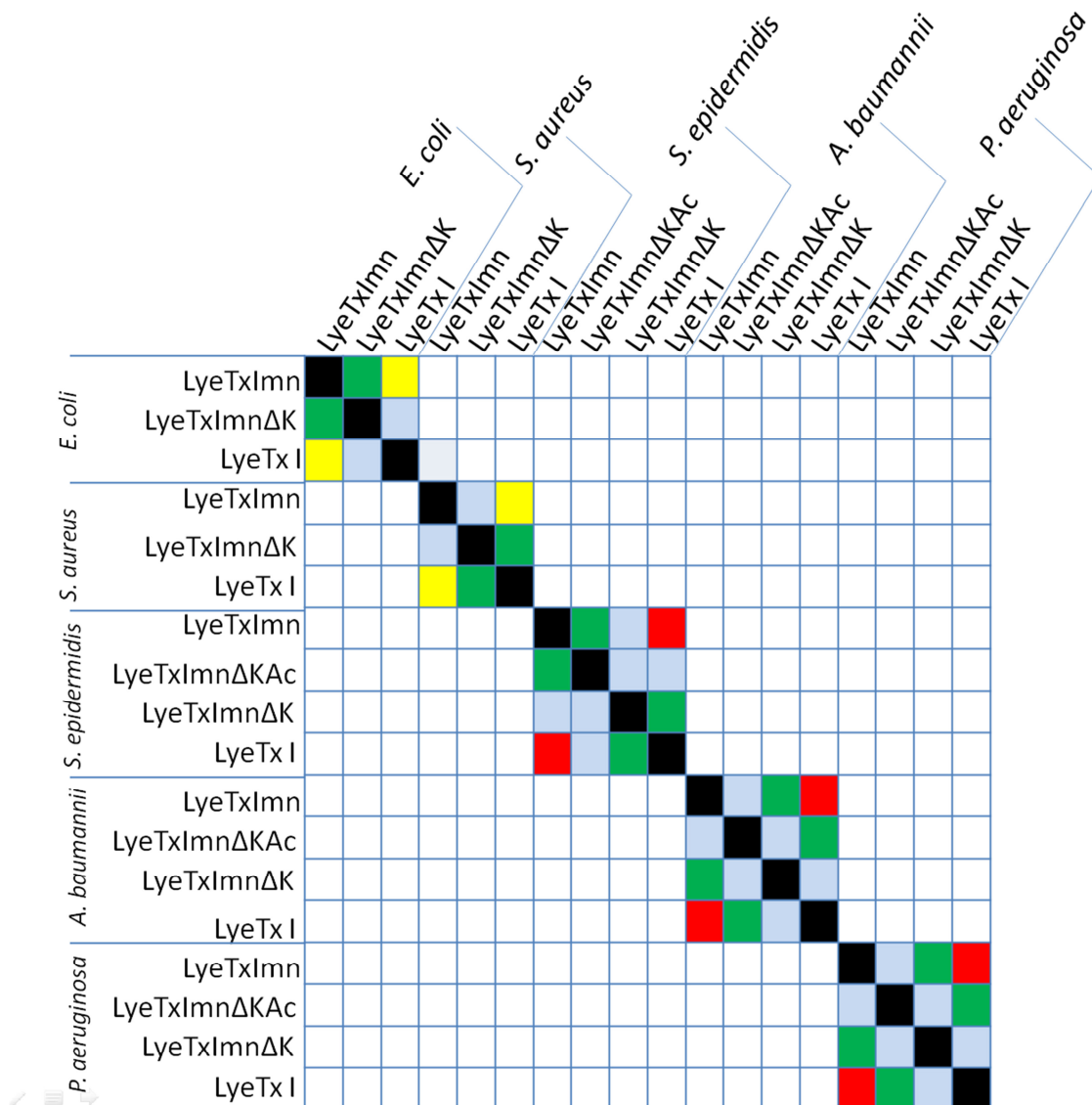


Figura 31: Representação em código de cores dos testes estatísticos de Friedman realizados entre os MICs das bactérias estudadas. A coloração verde representa uma significância de 95 %, a cor amarela uma significância de 99 % e a cor vermelha uma significância de 99,9 %. A coloração lilás claro mostra valores não significativos e a preta onde as comparações não foram feitas porque se tratava de comparar o mesmo conjunto de valores. Os testes foram realizados somente entre os MICs dos peptídeos estudados contra a mesma espécie de bactéria testada.

4.2.2. Atividade antifúngica

O MIC foi determinado onde não se observou o crescimento visível dos fungos. Dados com os respectivos valores de MICs são apresentados na Tabela 10, juntamente com alguns valores de MICs para alguns antifúngicos, usados como princípios ativos na clínica.

A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada pela leitura das placas de ágar Sabouraud semeadas com a suspensão obtida do experimento de MIC, onde não houve crescimento de fungos. Esses dados são apresentados na Tabela 11.

Os valores de MICs para *C.neoformans* somente foram significativos entre LyeTxImn e LyeTxImn Δ K (99%). Contra o fungo *C.gattii* a diferença foi significativa entre LyeTxImn e LyeTxImn Δ K (99%). A significância contra *C. krusei* foi vista entre LyeTxImn e LyeTxImn Δ K (95%) e entre LyeTxImn e LyeTxI (99%).

Tabela 10: MICs dos peptídeos estudados contra alguns fungos, representados em µg/ml e em molaridade (µM).

Espécie	ATCC #	LyeTxImm		LyeTxImmΔKAc		LyeTxImmΔK		LyeTx I		Fármaco fluconazol	
		Em µM	Em µg	Em µM	Em µg	Em µM	Em µg	Em µM	Em µg	Em µM	Em µg
<i>Cryptococcus neoformans</i>	24067	14,93	25,3	8,55	16	4,90	8,9	7,11	20,1	3,26	0,9
<i>Cryptococcus gatti</i>	32608	3,73	6,3	3,38	6,3	1,73	3,1	2,23	6,3	52,25	16,0
<i>Candida krusei</i>	20029	37,64	64	30,46	57	17,50	32	14,23	40,3	52,25	16,0

MIC: concentração inibitória mínima.

Tabela 11: CFMs dos peptídeos estudados contra alguns fungos, representados em µg/ml e em concentração molar (µM).

Espécie	ATCC #	LyeTxImm		LyeTxImmΔKAc		LyeTxImmΔK		LyeTx I	
		Em µM	Em µg	Em µM	Em µg	Em µM	Em µg	Em µM	Em µg
<i>Cryptococcus neoformans</i>	24067	31,36	53,3	14,25	26,6	7,29	13,3	7,96	22,6
<i>Cryptococcus gatti</i>	32608	7,05	13,3	7,12	13,3	3,64	6,6	2,82	8,0
<i>Candida krusei</i>	20029	37,64	128	68,4	128,0	35,00	64,0	22,60	64,0

CFM: concentração fungicida mínima

4.3. ENSAIO DA ATIVIDADE HEMOLÍCA

Neste ensaio eritrócitos de coelho (1%) foram usados para obter-se o EC_{50} de hemólise com os peptídeos testados. EC_{50} representa a concentração efetiva do peptídeo, necessária para causar 50% de hemólise. Para esse ensaio alíquotas dos peptídeos foram novamente liofilizadas e ressuspensas em tampão fosfato salina (PBS). As curvas de concentração-resposta dos peptídeos são apresentadas na Figura32.

Os valores de EC_{50} e de MHC (concentração mínima onde iniciou-se a atividade hemolítica), foram calculados utilizando-se a equação da curva sigmóide de Hill de 3ª ordem, sendo apresentados na Tabela 12.

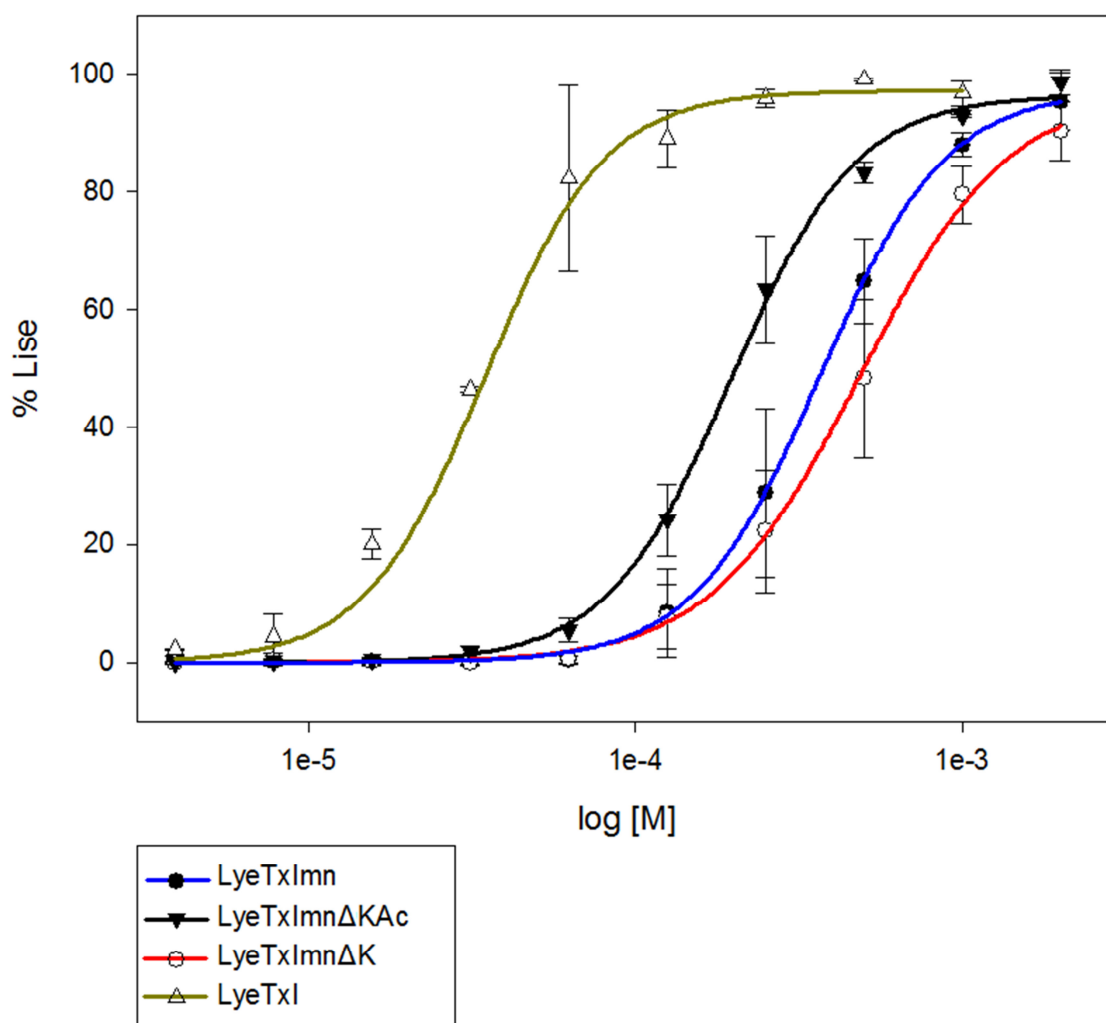


Figura32:Atividade hemolítica dos peptídeos LyeTxImn, LyeTxImnΔKAc, LyeTxImnΔK e LyeTx I. Uma suspensão de hemácias de coelho (1%) foi incubada com diferentes concentrações de peptídeos (3,9 μ M a 2 mM)A liberação de hemoglobina, indicio de hemólise, foi evidenciada monitorando-se a absorbância do sobrenadante das suspensões submetidas aos diversos tratamentos, a 405 nm. Os valores foram calculados, considerando-se como 100% da leitura a suspensão de hemácias incubadas com 1% de Triton X-100.

Tabela 12: -EC₅₀, MHC e significância estatística dos peptídeos sintetizados (com sequências menores e/ou modificadas), comparados com o peptídeo original, LyeTxI

Peptídeo	EC ₅₀ (μM)	MHC (μM)	Significância estatística de EC ₅₀ em função de LyeTxI
LyeTxImn	381,40	48,06	>99,9%
LyeTxImnΔKAc	207,50	27,44	>99,9%
LyeTxImnΔK	506,50	44,67	>99,9%
LyeTx I	32,35	5,06	20,57%

MHC: concentração hemolítica mínima. **Significância estatística:** resultado do Teste de Critério de Informação de Akaike, comparando-se os valores de EC₅₀ de cada um dos peptídeos minimizados com o valor de EC₅₀ de LyeTx I.

4.4. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS PEPTÍDEOS EM CICLODEXTRINA

Os complexos dos peptídeos com hidroxipropil-β-ciclodextrina foram testados com as mesmas ATCCs de fungos que foram utilizadas para determinação dos MICs dos peptídeos não complexados com ciclodextrina. Os valores de MICs obtidos são apresentados na Tabela 13 e os de CFM na Tabela 14.

Após aplicado o teste estatístico de Friedman foi evidenciada significância entre os peptídeos LyeTxImn e LyeTxI (99%) contra *C. neoformans*. Contra *C. gattii* significâncias foram observadas entre LyeTxImn e LyeTxImnΔK (95%) e entre LyeTxImn e LyeTxI (99%). Significância semelhante à anterior foi observada entre os peptídeos contra *C. krusei*.

Tabela 13: MICs, apresentados em µg/ml e em concentração molar (µM), dos peptídeos complexados em hidroxipropil-β-ciclodextrina, contra fungos.

Espécie	ATCC #	LyeTxImn		LyeTxImnΔKAc		LyeTxImnΔK		LyeTx I		Fármaco fluconazol	
		Em µM	Em µg	Em µM	Em µg	Em µM	Em µg	Em µM	Em µg	Em µM	Em µg
<i>Cryptococcus neoformans</i>	24067	42,25	71,8	19,19	35,9	12,37	22,6	7,11	20,1	3,26	0,99
<i>Cryptococcus gatti</i>	32608	26,61	45,2	17,10	32,0	9,81	17,9	7,11	20,1	52,25	16,00
<i>Candida krusei</i>	20029	37,64	64,0	34,20	64,0	19,64	35,9	22,60	64,0	52,25	16,00

MIC: concentração inibitória mínima.

Tabela 14: CFMs, apresentados em µg/ml e em concentração molar (µM), dos peptídeos complexados em hidroxipropil-β-ciclodextrina, contra fungos.

Espécie	ATCC #	LyeTxImn		LyeTxImnΔKAc		LyeTxImnΔK		LyeTx I	
		Em µM	Em µg	Em µM	Em µg	Em µM	Em µg	Em µM	Em µg
<i>Cryptococcus neoformans</i>	24067	53,23	90,5	24,18	45,2	17,50	32,0	7,11	20,1
<i>Cryptococcus gatti</i>	32608	37,64	64,0	24,18	45,2	12,36	22,6	11,30	32,0
<i>Candida krusei</i>	20029	37,64	64,0	34,20	64,0	24,74	45,2	22,60	64,0

CFM: concentração fungicida mínima

4.5. ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS PEPTÍDEOS EM CICLODEXTRINA

A atividade hemolítica dos peptídeos complexados em hidroxipropil- β -ciclodextrina foram testadas sobre eritrócitos de coelho (1%) e os respectivos EC_{50} e MHC calculados (Tabela 15), utilizando-se a equação de curva sigmóide de Hill de 3ª ordem para os peptídeos LyeTx I e LyeTxImn Δ KAc, bem como a equação exponencial de crescimento, modelo Stirling para os peptídeos LyeTxImn e LyeTxImn Δ K. Curvas concentração-resposta também foram feitas com os dados obtidos sendo apresentados na Figura33.

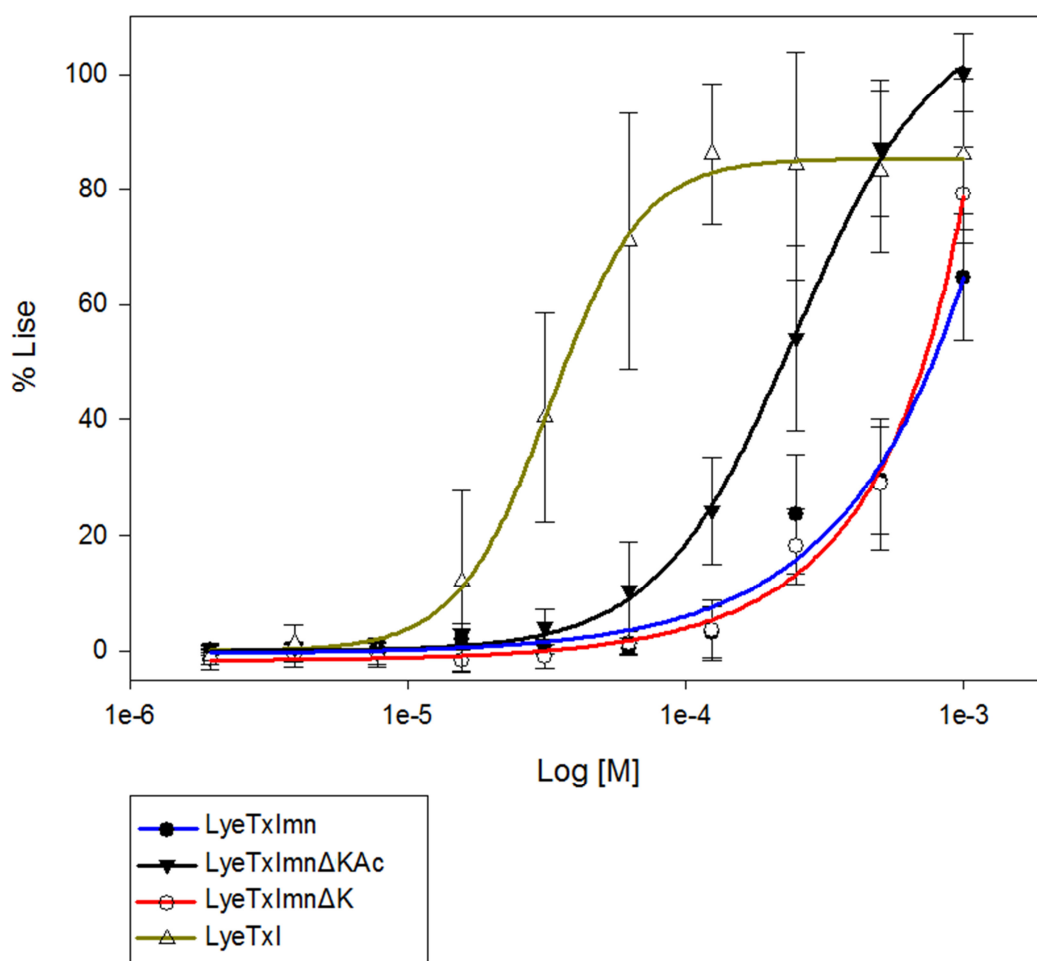


Figura33: Gráfico apresentando as curvas concentrações-respostas dos peptídeos estudados, complexados com hidroxipropil- β -ciclodextrina, com relação às suas atividades hemolíticas. Uma suspensão de hemácias de coelho (1%) foi incubada com os diversos peptídeos em diferentes concentrações ($1,95 \mu\text{M}$ a 1 mM). A liberação de hemoglobina, indício de hemólise, foi evidenciada monitorando-se a absorvância a 405 nm , onde comparou-se tais valores com o controle positivo (1% de Triton X-100, considerado como causando 100% de hemólise)

Tabela 15: Relação de EC₅₀, MHC e significância estatística dos peptídeos sintetizados e complexados, comparados com o peptídeo LyeTxI também complexado, onde o traço (-) mostra que o resultado foi ambíguo (isto é, não foi possível através deste teste, observar diferenças entre LyeTx I e o grupo analisado) para o teste estatístico de EC₅₀

Peptídeo	EC ₅₀ (μM)	MHC (μM)	Significância estatística de ED ₅₀ em função de LyeTxI:HP-β-CD
LyeTxImn:HP-β-CD	822,88	20,76	>99,9%
LyeTxImnΔKAc:HP-β-CD	237,46	17,93	>99,9%
LyeTxImnΔK:HP-β-CD	746,45	51,15	-
LyeTx I:HP-β-CD	40,09	5,30	22,48%

MHC: concentração hemolítica mínima. **Significância estatística:** resultado do Teste de Critério de Informação de Akaike, comparando-se os valores de EC₅₀ de cada um dos peptídeos minimizados com o valor de EC₅₀ de LyeTx I.

4.6. DICROÍSMO CIRCULAR

Os experimentos de dicroísmo circular geraram diversos perfis de estruturação para os diferentes peptídeos, em diferentes condições, a saber: i) soluções contendo diferentes porcentagens de TFE, cujos perfis de estruturação dos peptídeos LyeTxImn, LyeTxImnΔK e LyeTxImnΔKAc são mostrados nas figuras 34, 35 e 36, respectivamente; ii) soluções com diferentes concentrações de SDS, um detergente aniônico, com os perfis de estruturação, para os peptídeos LyeTxImn, LyeTxImnΔK e LyeTxImnΔKAc, mostrados nas figuras 37, 38 e 39, respectivamente; e iii) soluções contendo diferentes concentrações de DPC, um detergente zwitterionico, cujos perfis de estruturação dos peptídeos LyeTxImn, LyeTxImnΔK e LyeTxImnΔKAc, são apresentados nas figuras 40, 41 e 42, respectivamente.

Condição TFE LyeTxImn

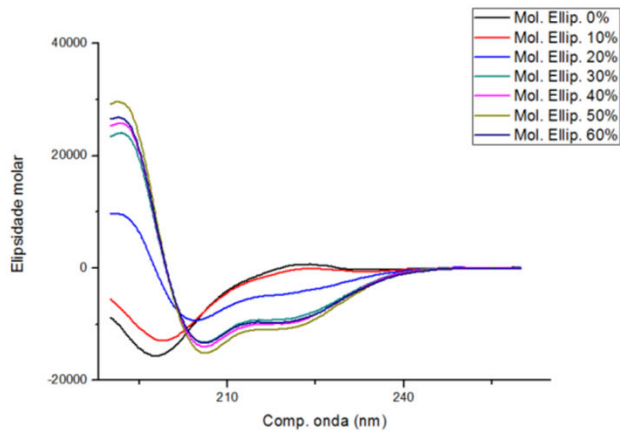


Figura 34: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImn em diferentes porcentagens de TFE. O experimento foi realizado incubando-se o peptídeo a uma concentração de 0,1 mg/ml em de 0 até 60 % de TFE, varrendo-se o espectro de 190 até 280 nm, fazendo-se 4 acumulações em um espectropolarímetro Jasco-715.

Condição TFE LyeTxImn Δ K

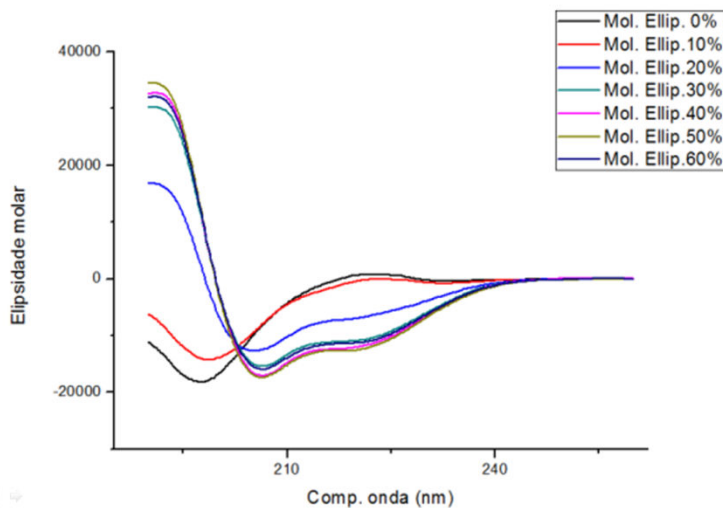


Figura 35: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImn Δ K em diferentes porcentagens de TFE. O experimento foi realizado incubando-se o peptídeo a uma concentração de 0,1 mg/ml em de 0 até 60 % de TFE, varrendo-se o espectro de 190 até 280 nm, fazendo-se 4 acumulações em um espectropolarímetro Jasco-715.

Condição TFE LyeTxImn Δ KAc

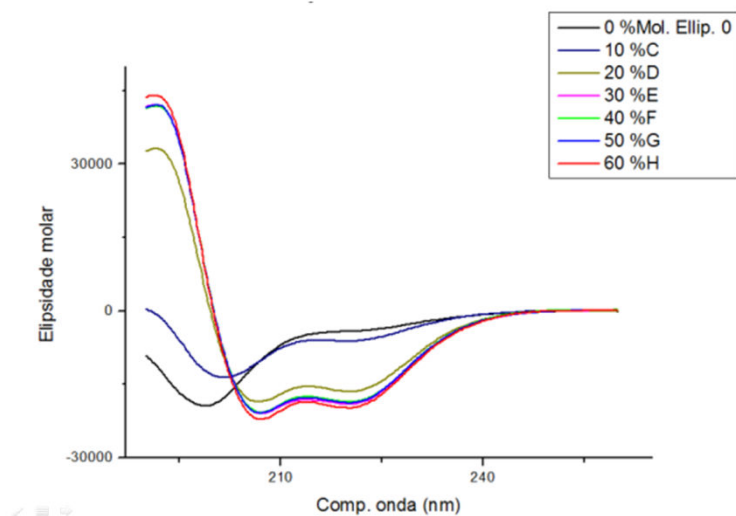


Figura 36: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImn Δ KAc em diferentes porcentagens de TFE. O experimento foi realizado incubando-se o peptídeo a uma concentração de 0,1 mg/ml em de 0 até 60 % de TFE, varrendo-se o espectro de 190 até 280 nm, fazendo-se 4 acumulações em um espectropolarímetro Jasco-715.

Condição SDS LyeTxImn

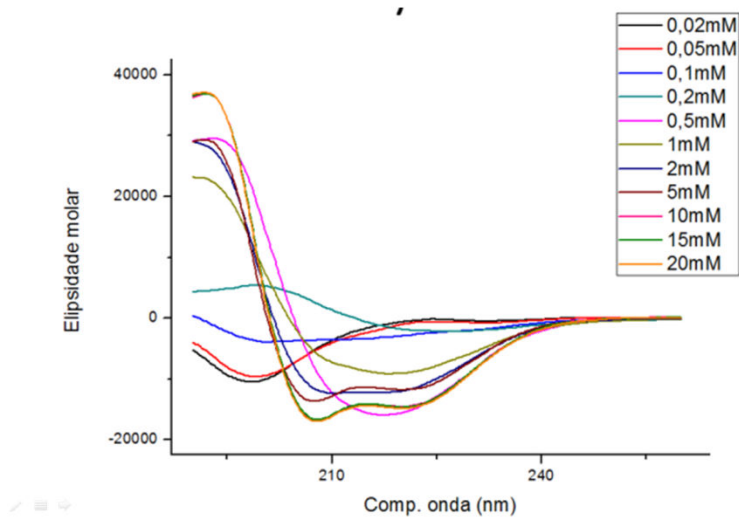


Figura 37: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImn em diferentes concentrações de SDS. O experimento foi realizado incubando-se o peptídeo a uma concentração de 0,1 mg/ml em de 0,02 mM até 20 mM de SDS, varrendo-se o espectro de 190 até 280 nm, fazendo-se 6 acumulações em um espectropolarímetro Jasco-715.

Condição SDS LyeTxImn Δ K

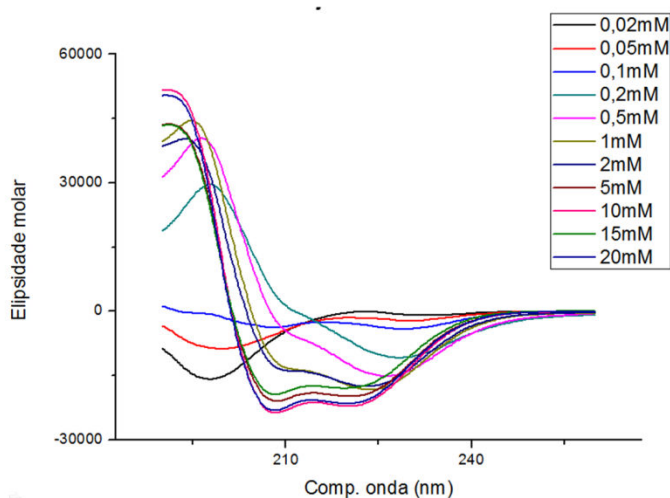


Figura 38: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImn Δ K em diferentes concentrações de SDS. O experimento foi realizado incubando-se o peptídeo a uma concentração de 0,1 mg/ml em de 0,02 mM até 20 mM de SDS, varrendo-se o espectro de 190 até 280 nm, fazendo-se 6 acumulações em um espectropolarímetro Jasco-715.

Condição SDS LyeTxImn Δ KAc

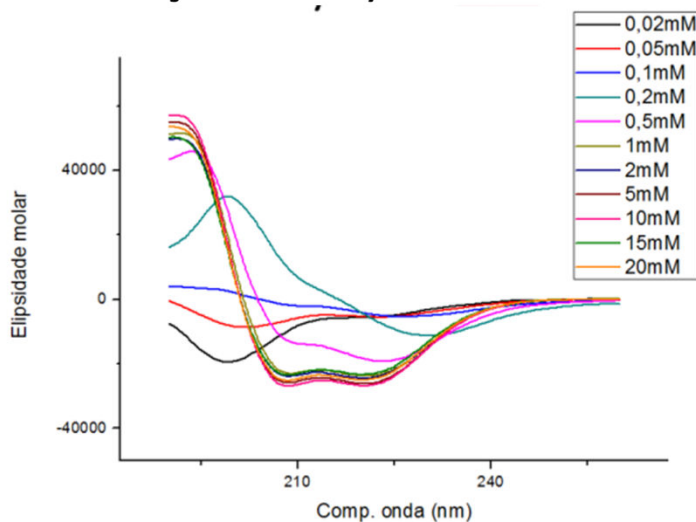


Figura 39: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImn Δ KAc em diferentes concentrações de SDS. O experimento foi realizado incubando-se o peptídeo a uma concentração de 0,1 mg/ml em de 0,02 mM até 20 mM de SDS, varrendo-se o espectro de 190 até 280 nm, fazendo-se 6 acumulações em um espectropolarímetro Jasco-715.

Condição DPC LyeTxImn

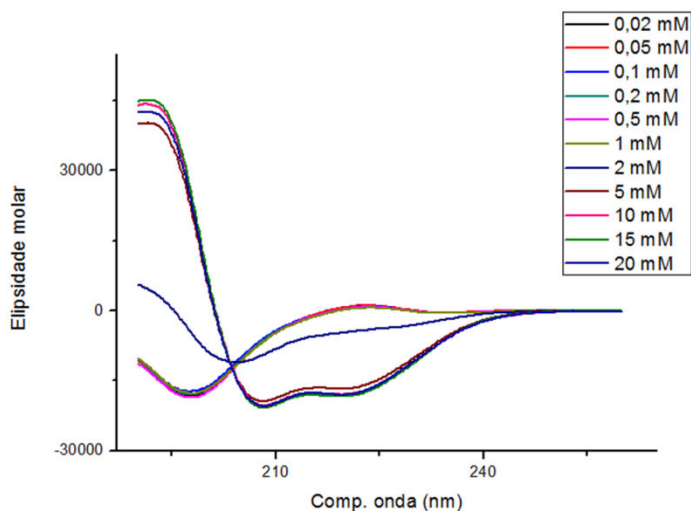


Figura 40: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImn em diferentes concentrações de DPC. O experimento foi realizado incubando-se o peptídeo a uma concentração de 0,1 mg/ml em de 0,02 mM até 20 mM de DPC, varrendo-se o espectro de 190 até 280 nm, fazendo-se 6 acumulações em um espectropolarímetro Jasco-715.

Condição DPC LyeTxImn Δ K

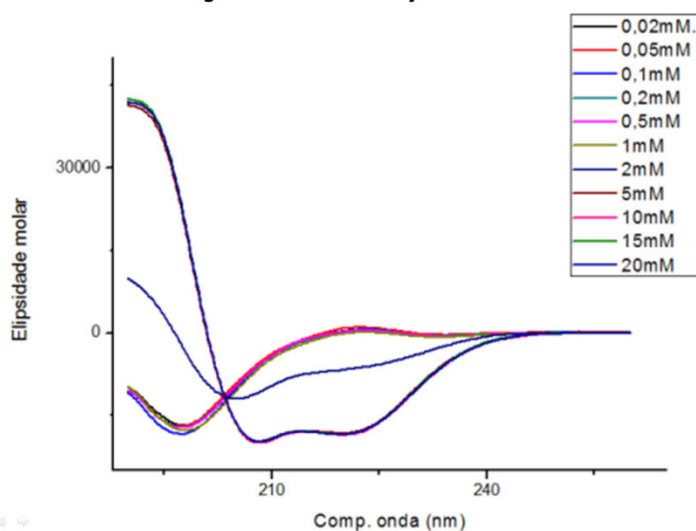


Figura 41: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImn Δ K em diferentes concentrações de DPC. O experimento foi realizado incubando-se o peptídeo a uma concentração de 0,1 mg/ml em de 0,02 mM até 20 mM de DPC, varrendo-se o espectro de 190 até 280 nm, fazendo-se 6 acumulações em um espectropolarímetro Jasco-715.

Condição DPC LyeTxImn Δ KAc

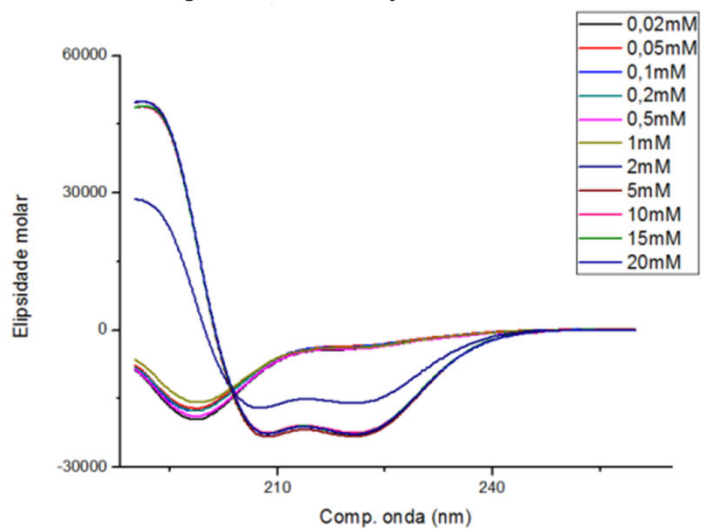


Figura 42: Espectros de estruturação do peptídeo LyeTxImn Δ KAc em diferentes concentrações de DPC. O experimento foi realizado incubando-se o peptídeo a uma concentração de 0,1 mg/ml em de 0,02 mM até 20 mM de DPC, varrendo-se o espectro de 190 até 280 nm, fazendo-se 6 acumulações em um espectropolarímetro Jasco-715.

As respectivas desconvoluções de cada uma das condições são apresentadas nas figuras 43 para os dados na condição de TFE, 44 para a condição SDS e 45 para a condição DPC. Em cada uma das condições estão apresentados os comparativos entre os três peptídeos.

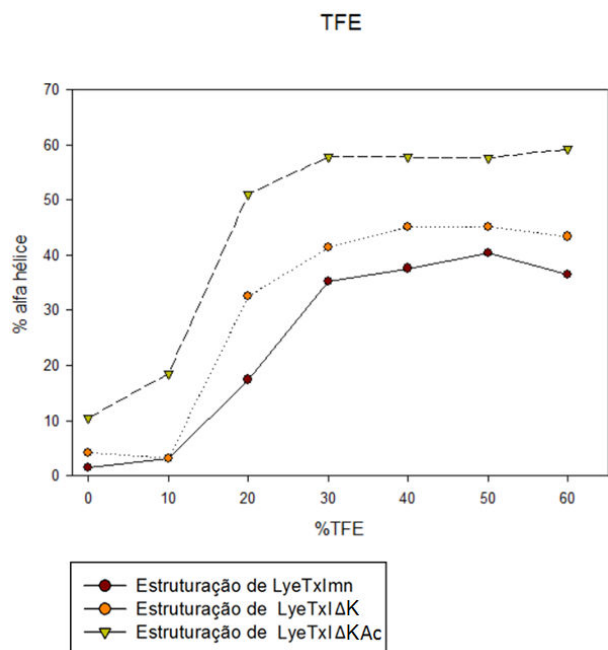


Figura 43: Desconvolução dos espectros de dicroísmo circular das diferentes porcentagens de TFE dos peptídeos minimizados. Os dados de desconvolução foram obtidos através do uso dos dados de cada uma das curvas obtidas sendo utilizado o programa CDPro.

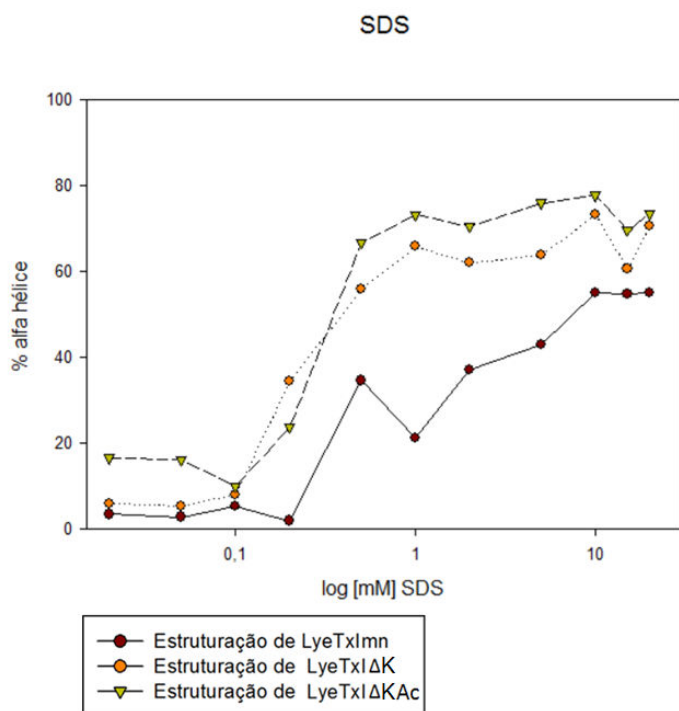


Figura 44: Desconvolução dos espectros de dicroísmo circular das diferentes concentrações de SDS dos peptídeos minimizados. Os dados de desconvolução foram obtidos através do uso dos dados de cada uma das curvas obtidas sendo utilizado o programa CDPro.

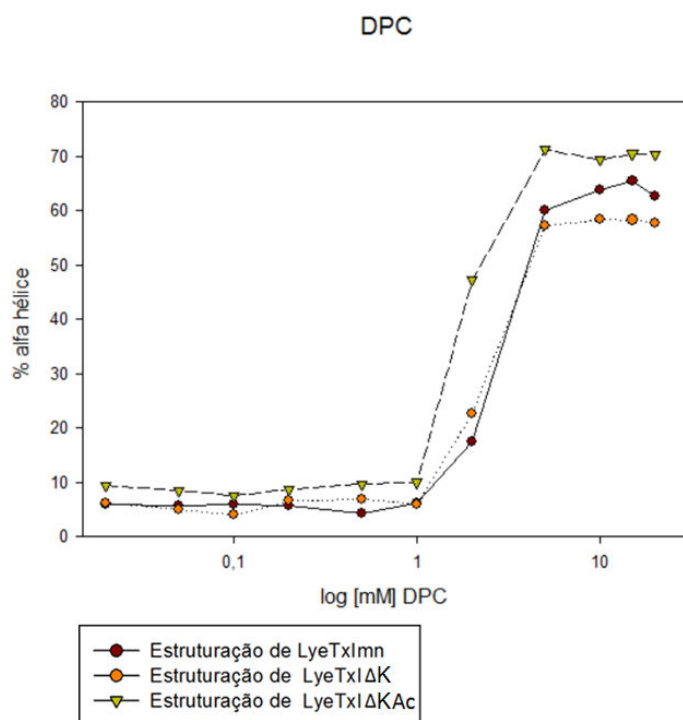


Figura 45: Desconvolução dos espectros de dicroísmo circular das diferentes concentrações de DPC dos peptídeos minimizados. Os dados de desconvolução foram obtidos através do uso dos dados de cada uma das curvas obtidas sendo utilizado o programa CDPro.

4.7. ANÁLISE DIAGRAMÁTICA DE ALFA HÉLICE

As análises de diagrama de "wheel" apresentadas, mostram uma possível orientação dos resíduos, caso os peptídeos estruturassem completamente, isto é, se todos os resíduos estivessem presentes na α -hélice ou caso somente a partir do 5º resíduo esta estruturação ocorresse (Figura 46).

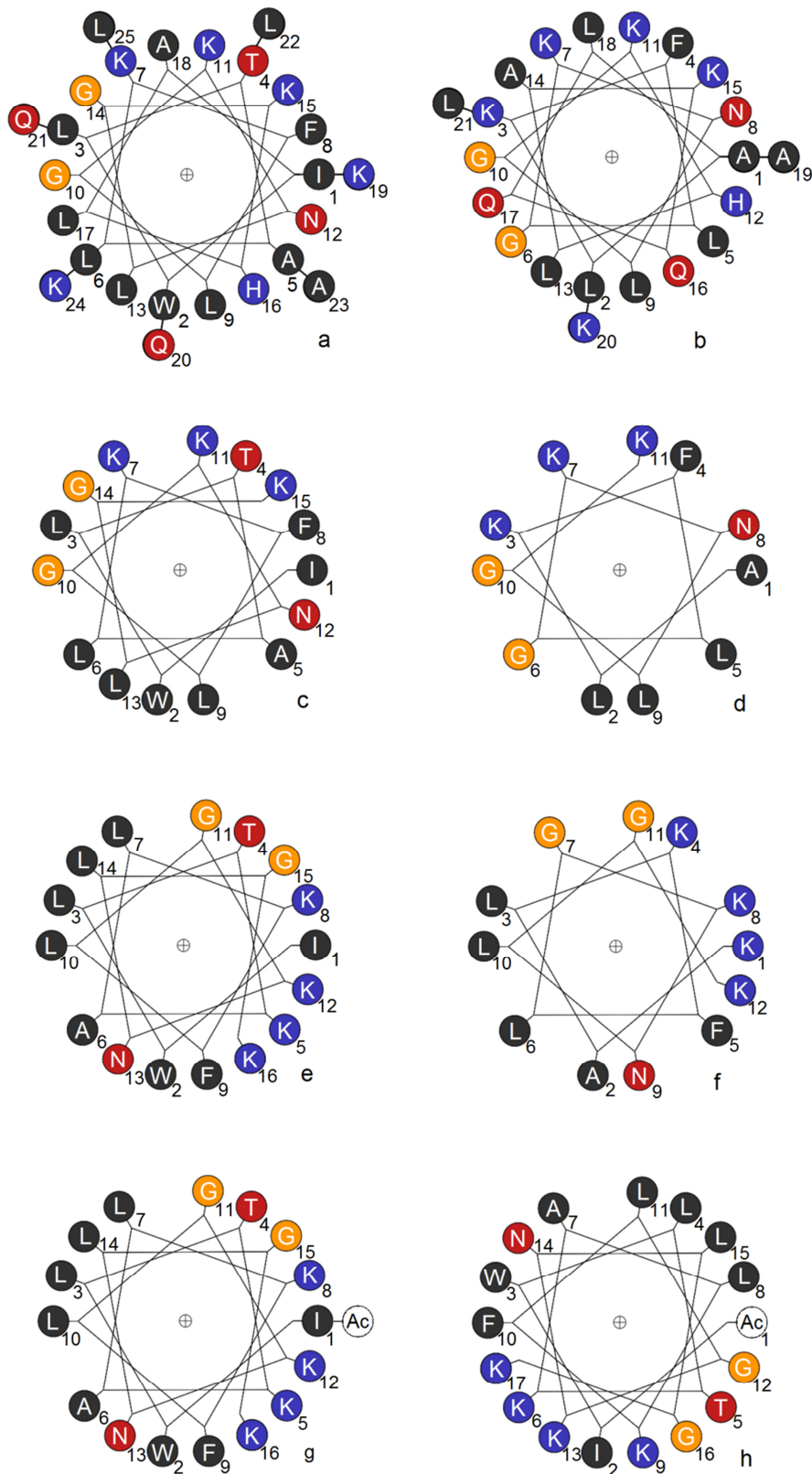


Figura 46: Diagramas de α -hélices de “wheel” dos peptídeos estudados. a: representação de LyeTx I caso a estruturação iniciasse no primeiro resíduo. **b:** Estruturação de LyeTx I caso esta iniciasse no 5º resíduo. **c:** Representação diagramática de LyeTxImn, caso a estruturação deste peptídeo iniciasse no primeiro resíduo. **d:** Representação de LyeTxImn caso sua estruturação em α -hélice iniciasse-se no 5º resíduo. **e:** Representação esquemática de LyeTxImnΔK e LyeTxImnΔKAc caso suas estruturações iniciassem-se no primeiro resíduo e em **f** a mesma representação destes peptídeos porém pressupondo que a estruturação inicie-se no quinto resíduo. **g** e **h:** Representação esquemática de LyeTxImnΔKAc onde a acetilação (Ac) é levada em consideração na representação, sendo que em **h** a acetilação (Ac) está contida na estrutura da hélice.

5. DISCUSSÃO

A busca por novos antimicrobianos tem sido necessária devido ao fato de que virtualmente, para todos os antimicrobianos utilizados existem mecanismos de resistência. Os peptídeos antimicrobianos já estão sendo usados como moldes para possíveis novos fármacos, como ocorreu com a Magainina para o tratamento de úlcera em diabéticos, a indolicidina para proteção de cateteres contra colonização por microrganismos (Hancock & Sahl, 2006) ou com a LL-37 já descrita em uso semelhante no tratamento de úlceras em diabéticos (Duplantier & Hoek, 2013) e outros tipos de infecções bacterianas (Wang, 2006). Mas mesmo assim, o único fármaco que estava em uso clínico era um derivado da magainina que depois de alguns anos foi removido do mercado pelo FDA (Food and Drug Administration), devido ao alto custo de produção e a eficácia ser semelhante a de outros fármacos já usados.

Os estudos de Afonso em 2013 com o peptídeo "des-His16-LyeTx I" (LyeTx I desprovida de um resíduo de histidina na posição 16) apontaram que seria possível a remoção de alguns resíduos de aminoácidos do peptídeo LyeTx I mantendo-se ainda a atividade antimicrobiana. Baseado nisso, estudos preliminares desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do LVTA, mostraram que, removendo-se alguns dos resíduos do C-terminal de LyeTx I a atividade ainda era mantida. Usando estes dados foram planejados os peptídeos sintetizados neste trabalho, LyeTxImn, LyeTxImn Δ K e LyeTxImn Δ KAc. Tomou-se o cuidado de sintetizar novamente o peptídeo LyeTx I pois, seriam estudadas novas cepas de bactérias e de fungos não contemplados pelo estudo inicial de caracterização de LyeTx I (Santos *et al*, 2010). Os rendimentos em massa obtidos (dados não apresentados) disponibilizaram material suficiente para uma caracterização preliminar de um possível novo peptídeo candidato a um fármaco antimicrobiano.

As atividades antimicrobianas dos peptídeos estudados apresentaram diferentes efeitos, com relação aos valores de MICs quando comparadas entre si. Os dados evidenciam que LyeTxImn possuiu um decréscimo significativo na atividade antibacteriana contra todas as bactérias analisadas quando comparado com o peptídeo original LyeTx I e contra o fungo *Candida krusei*. Já o peptídeo LyeTxImn Δ K possuiu atividade significativamente maior que LyeTxImn contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* e *C. krusei* porém, comparado ao peptídeo original, LyeTx I, as atividades contra *Staphylococcus aureus*, e *Staphylococcus epidermidis* foram

significativamente menores, segundo a análise estatística, uma evidência de que entre os dois, LyeTx I é mais ativo contra bactérias gram-positivas do que LyeTxImnΔK. Por fim LyeTxImnΔKAc possuiu atividade significativamente maior somente quando comparado com LyeTxImn contra *S. epidermidis* sendo menos ativo quando comparado a LyeTx I contra *A. baumannii* e *P. aeruginosa*.

Entretanto, quando os parâmetros de atividade hemolítica são comparados, é notável a alta atividade de LyeTxI em relação aos outros peptídeos, com valores de EC₅₀ 6 vezes maiores (no caso de LyeTxImnΔKAc) ou até mais de 11 vezes maiores para os outros dois peptídeos derivados de LyeTx1. Em conclusão, no que concerne à atividade hemolítica, LyeTxI é, significativamente mais ativa, portanto causando maiores índices de hemólise, do que os peptídeos derivados, testados neste trabalho. Os valores de concentrações hemolíticas mínimas (MHC) também evidenciam estas diferenças, que são maiores do que 5 vezes comparando-se o controle e os peptídeos testados.

Levando-se em conta a razão entre o valor de MHC e a média geométrica dos MICs para cada um dos peptídeos, obtém-se um valor conhecido como índice terapêutico (Chen *et al*, 2005) que apresenta um "score" entre a média dos MICs e a toxicidade contra hemácias. Foram feitas três divisões de índices terapêuticos, uma somente com bactérias, outra com fungos e uma terceira levando-se em conta ambos os valores de MICs (doravante nomeado "índice terapêutico de amplo espectro"). Esses dados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Valores dos índices terapêuticos calculados para cada um dos peptídeos estudados

	LyeTxImn	LyeTxImnΔKAc	LyeTxImnΔK	LyeTxI
Índice terapêutico de bactérias	5,355	6,145	19,153	4,755
Índice terapêutico de fungos	3,755	2,863	8,438	0,831
Índice terapêutico de amplo espectro	4,688	4,615	14,084	2,472

Observando-se os valores dos índices terapêuticos que possibilitam visualizar qual o peptídeo possui o melhor conjunto de atividade antimicrobiana geral maior com toxicidade menor contra eritrócitos, é possível observar que LyeTxImnΔK é o peptídeo do conjunto com melhor índice terapêutico, seja contra bactérias, fungos ou o de "amplo espectro". Com base nessas evidências é possível sugerir o uso do peptídeo sintético

LyeTxImn Δ K para ensaios mais aprofundados visando-se usá-lo como um candidato a um novo fármaco antimicrobiano, seja como antifúngico ou como antibacteriano.

A vantagem na escolha de um peptídeo antimicrobiano em α -hélice como um possível novo fármaco, é sua produção relativamente simples, não havendo a necessidade de formar pontes dissulfeto, como as existentes frequentemente nos peptídeos em folha- β , que em alguns casos são imprescindíveis para a atividade antimicrobiana (Andreu & Rivas, 1998). Conforme já observado, o fenômeno da resistência seria menos preocupante, pois ocorre em um grau muito menor do que para outros tipos de antibióticos (Zasloff, 2002; Chen *et al*, 2005). Esta resistência seria parcial, como no caso de bactérias que diminuem a quantidade de lipídios negativamente carregados, porém isso não as torna resistentes aos peptídeos antimicrobianos, mas somente um pouco menos susceptíveis a eles (Izadpanah & Gallo, 2005). Por outro lado, as bactérias também podem secretar proteases para degradarem tais peptídeos contra os quais são desafiadas (Yeaman & Yount, 2003).

A atividade dos peptídeos antimicrobianos geralmente é imediata ou rápida, lisando rapidamente a célula alvo (Brogden, 2005) diferente de outros antimicrobianos, como p. ex. as penicilinas, que formam esferoplastos (Shahid, 2009) não matando imediatamente a célula alvo.

Pelos dados de dicroísmo circular é possível inferir que, todos os três peptídeos sintetizados, derivados de LyeTxI, possuem, muito provavelmente, conformação em α -hélice quando em contato com a membrana, visto que, no meio de TFE assumiram esta conformação (caracterizada pelo máximo à 192 nm, e dois mínimos na faixa de 208 e 222 nm por leituras obtidas em espectropolarímetro).

Um fato relevante observado é a relação entre os perfis obtidos nos meios de SDS e DPC e as respectivas atividades antimicrobianas e hemolíticas. Baseados nos dados após a desconvolução das curvas, é possível observar que, nas concentrações relativamente baixas de SDS (a partir de 1 mM) LyeTxImn Δ K e LyeTxImn Δ KAc atingiram o patamar de estruturação, porém LyeTxImn só atingiu este patamar em 10 mM, sendo também o peptídeo com a menor atividade antimicrobiana. Como a monocamada externa das membranas plasmáticas de bactérias possui carga líquida negativa (Epanand & Epanand, 2009), as micelas do detergente SDS são uma extrapolação deste tipo de membrana, tendo um perfil de cargas semelhante. Sendo assim, LyeTxImn Δ K mostrou uma estruturação visualmente maior, que foi atingida a uma

concentração bem menor, quando comparada à LyeTxImn. Porém, LyeTxImnΔKAc e LyeTxImnΔK estruturaram-se de forma bem semelhantes.

As micelas do detergente zwitteriônico, DPC, apresentaram um perfil ainda mais coerente com as atividades hemolíticas onde, na concentração de 2 mM do detergente, os peptídeos LyeTxImn e LyeTxImnΔK apresentaram baixo teor de α -hélice. Porém, a estruturação de LyeTxImnΔKAc foi o dobro dos outros dois peptídeos analisados, justamente o peptídeo entre os três com maior atividade hemolítica (menor valor de ED₅₀ e de MHC).

É interessante ressaltar a diferença dos perfis de estruturação dos peptídeos LyeTxImnΔK e LyeTxImnΔKAc nas três condições estudadas, bem como de suas atividades hemolíticas, sendo que, a diferença entre os dois é de apenas um grupo acetil *N*-terminal. Esta acetilação aparenta estabilizar a estrutura em α -hélice do peptídeo LyeTxImnΔKAc, o que poderia explicar sua maior atividade hemolítica. Porém, esta estabilização não é significativa para a atividade antimicrobiana visto que não houve diferenças estatísticas entre os MICs de LyeTxImnΔK e LyeTxImnΔKAc, padrões de atividade diferentes dos encontrados para outro caso de peptídeo antimicrobiano, onde a acetilação interferiu na atividade antimicrobiana porém não interferiu na atividade hemolítica (Crusca *et al*, 2010).

Comparando-se LyeTxImnΔK e LyeTxImn, a diferença advinda de um resíduo extra de lisina no primeiro peptídeo, aumentou notavelmente, sua atividade antimicrobiana. Observando-se os diagramas de "wheel" (Figura 18) para ambos os peptídeos, verifica-se que há um aumento na anfipaticidade de LyeTxImnΔK em relação a LyeTxImn. Diferente do observado em alguns trabalhos, onde a anfipaticidade não está muito relacionada à atividade antimicrobiana, mas sim à atividade hemolítica (Blondelle & Houghten, 1992; Chen *et al*, 2005), no caso de LyeTxImnΔK a hemólise foi menor que a causada pelo peptídeo não acetilado LyeTxImn. Contudo, a descrição do trabalho de Blondelle & Houghten descreve um peptídeo composto somente por lisinas e leucinas. Levando-se em consideração trabalhos com peptídeos de origem natural onde p. ex. a cecropina foi modificada pela adição de resíduos positivos e com aumento de atividade, ou a magainina porém neste caso diferente do peptídeo LyeTxImnΔK a magainina teve um aumento da hemólise (Tossi; Sandri; Giangaspero, 2000).

Como os peptídeos derivados de LyeTxI estudados poderiam apresentar certa toxicidade devido a sua atividade hemolítica, levantou-se a possibilidade de complexá-los em hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) a fim de reduzir sua atividade tóxica.

Além do mais, os peptídeos complexados podem ser protegidos de degradações por parte tanto dos microrganismos alvo, quanto como por parte das proteases de um possível paciente em tratamento, caso usado como fármaco

Para tanto foi escolhida a HP- β -CD, porque esta não é tóxica para uso parenteral bem como para outros usos como p. ex. em colírios (Loftsson & Brewster, 2012). Os ensaios de atividade antimicrobiana dos peptídeos derivados e em complexo, foram realizados contra os fungos estudados neste trabalho, porque existem poucos fármacos para o tratamento de infecções fúngicas mais graves, como as causadas por fungos do gênero *Cryptococcus*, que inclusive podem infectar pessoas imunocompetentes (Kronstad *et al*, 2011). Outro ponto importante que se deve levar em consideração é que muitos antifúngicos como p. ex. os azólicos são muito tóxicos para usos além do tópico (Ostrosky-Zeichner *et al*, 2010).

Nos ensaios foi observado que os valores de MICs foram um pouco maiores ou seja, o complexo reduziu a atividade dos peptídeos. Entretanto, os ensaios de hemólise mostraram um aumento nos valores de EC₅₀ bem como de MHC, mostrando redução da atividade hemolítica. Observando-se os valores de EC₅₀ este aumento foi de 2 vezes para LyeTxImn, 1 vez para LyeTxImn Δ KAc e de cerca de 1,5 vezes para LyeTxImn Δ K. Por outro lado, os índices terapêuticos dos peptídeos em HP- β -CD foram menores do que aqueles de peptídeos não complexados. Para LyeTxImn e LyeTxImn Δ KAc estas diferenças foram bem maiores que para o peptídeo LyeTxImn Δ K e para o controle LyeTx I (Tabela 17). Portanto o peptídeo LyeTxImn Δ K apresentou bons valores de MICs, os menores valores de hemólise bem como, os melhores índices terapêuticos, quando comparado aos outros peptídeos estudados.

Tabela 17: Valores de índice terapêutico contra fungos dos peptídeos em estudo, puros, ou em complexados com HP- β -CD, bem como a razão entre estes índices.

	LyeTxImn	LyeTxImn Δ KAc	LyeTxImn Δ K	LyeTxI
Índice terapêutico de fungos (A)	3,755	2,863	8,438	0,831
Índice terapêutico de fungos para os peptídeos em HP- β -CD (B)	0,595	0,800	3,829	0,506
Razão A/B	6,303	3,575	2,203	1,639

Apesar de que, a eficácia tenha sido reduzida, pela complexação dos peptídeos em ciclodextrina, pela observação dos dados de índice terapêutico *in vitro*, as condições

in vivo são muito diferentes. *In vivo* é possível que os peptídeos complexados se desliguem gradativamente da HP- β -CD, quando diluídos na corrente sanguínea, evitando-se a exposição do paciente a altas doses do peptídeo o que poderia levar a hemólise, por ex. A complexação também protegeria o peptídeo da ação de proteases presentes no sangue. Porém é necessário a realização de testes *in vivo* para verificar a eficácia do uso do peptídeo (complexado, ou não) como fármaco, bem como para avaliar uma possível toxicidade.

Logo o uso de LyeTxImn Δ K como fármaco é uma proposta que nos parece viável necessitando, contudo, da realização dos testes de toxicidade e de eficácia terapêutica *in vivo*, assim como já foi feito para alguns peptídeos, tais como a magainina (Hancock & Sahl, 2006) e a LL-37 (Duplantier & Hoek, 2013). O uso de compostos biologicamente ativos em complexos, que melhorem a suas atividades, já é descrito como p. ex. a anfotericina B encapsulada em lipossomos (Ostrosky-Zeichner *et al*, 2010) ou propostas de uso de insulina em complexo com β -ciclodextrina por via nasal (Schipper *et al*, 1992). Propostas semelhantes, quanto ao uso de peptídeos antimicrobianos para o tratamento de doenças infecciosas, já estão sendo feitas para diversos peptídeos sendo que, muitos estudos já estão em fase III de desenvolvimento (Fjeli *et al*, 2012).

6. CONCLUSÃO

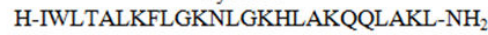
A diminuição do peptídeo LyeTx I, visando-se a possível criação de um novo fármaco antimicrobiano, nos parece viável, sendo que a remoção de vários resíduos, como no caso de LyeTxImn, apesar de comprometer a atividade antibacteriana reduz a atividade hemolítica. A adição de um resíduo positivo (lisina) à sequência minimizada, como ocorreu em LyeTxImn Δ K, tanto reduziu a atividade hemolítica como aumentou as atividades antibacterianas e antifúngicas, o que pode ser visto nas diferenças de índices terapêuticos. Entretanto, a acetilação, como em LyeTxImn Δ KAc mostrou-se pouco efetiva, reduzindo menos a hemólise deste peptídeo, quando comparado aos peptídeos LyeTxImn e LyeTxImn Δ K. o que refletiu na redução do índice terapêutico. O uso de ciclodextrinas aparenta ser interessante para um possível uso *in vivo* de peptídeos antimicrobianos. Um peptídeo menor, com maior atividade antimicrobiana e como menor atividade hemolítica é um bom candidato para estudos mais aprofundados visando-se a criação de um novo fármaco antibiótico e/ou antimicótico.

Em resumo, os resultados deste trabalho foram:

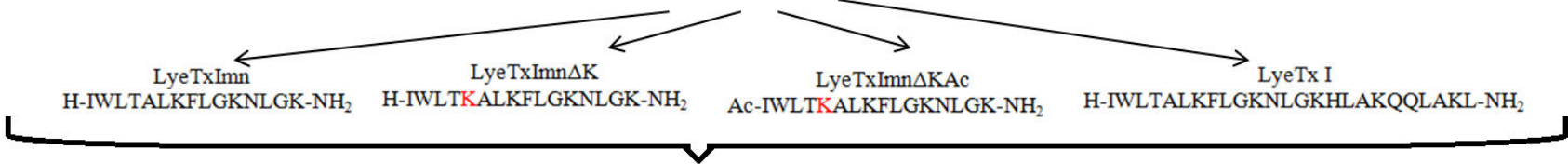
- Os peptídeos antimicrobianos, com sequência diminuída, derivados de LyeTx I foram sintetizados e purificados com sucesso.
- LyeTxImn apesar de ter tido uma atividade antimicrobiana inferior ao peptídeo original, LyeTx I, apresentou menor atividade hemolítica.
- O peptídeo LyeTxImn Δ K, com uma lisina extra, apresentou maior atividade antibacteriana e antifúngica, com redução da atividade hemolítica.
- LyeTxImn Δ KAc, apesar de ter tido um aumento de atividade antimicrobiana teve maior atividade hemolítica do que LyeTxImn e LyeTxImn Δ K.
- Comparando-se os índices terapêuticos de todos os peptídeos, o mais promissor entre eles é o LyeTxImn Δ K por possuir o melhor "score" de todos.
- Complexos com ciclodextrinas talvez possam ser usados para redução da toxicidade *in vivo* porém testes adicionais são necessários para validar esta possibilidade.
- Um peptídeo menor, com maior atividade antimicrobiana e como menor atividade hemolítica é um bom candidato para criação de um possível novo fármaco antimicrobiano.



LyeTx I



Síntese química



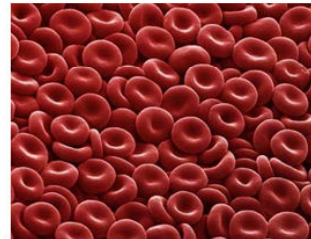
Atividade antibacteriana

- E.coli* †
- S.aureus* †
- P.aeruginosa* †
- S.epidermidis* †
- A.baumannii* †



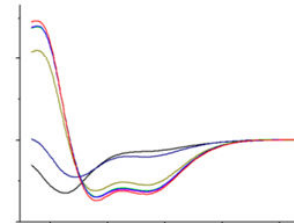
Atividade antifúngica

- C.neoformans* †
- C.gatti* †
- C.krusei* †



Atividade hemolítica

- LyeTxImn ±
- LyeTxImnΔK ±
- LyeTxImnΔKAc +
- LyeTx I +++



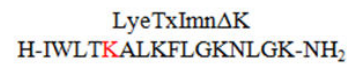
Índice terapêutico

- LyeTxImn +++
- LyeTxImnΔK +++++
- LyeTxImnΔKAc ++
- LyeTx I +

Estruturação

- LyeTxImn α hélice
- LyeTxImnΔK α hélice
- LyeTxImnΔKAc α hélice

MELHOR CANDIDATO:



7. PERSPECTIVAS

- Realizar experimentos em membranas artificiais (lipossomos) dos peptídeos estudados para verificar os possíveis mecanismos de ação.
- Realizar experimentos *in vivo* do peptídeo LyeTxImnΔK, em camundongos desafiados com o fungo patogênico *Cryptococcus gattii*.
- Realizar experimentos de toxicidade *in vitro* dos quatro peptídeos estudados, a fim de observar uma possível hepatotoxicidade e nefrotoxicidade em cultura de células.
- Realizar experimentos de toxicidade *in vivo* do peptídeo mais promissor, LyeTxImnΔK avaliando-se por histologia, os órgãos mais comumente lesados por fármacos.
- Realizar experimentos de toxicidade *in vivo* do peptídeo mais promissor, LyeTxImnΔK em hidroxipropil-β-ciclodextrina avaliando-se por histologia os órgãos mais comumente lesados por fármacos.
- Realizar experimentos *in vitro* dos quatro peptídeos estudados avaliando-se uma possível atividade antiviral contra algumas espécies de vírus envelopados.
- Realizar experimentos *in vitro* dos quatro peptídeos estudados avaliando-se uma possível atividade antiprotozoário usando *Trypanosoma cruzi*, espécies de *Plasmodium* e de *Leishmania* como modelos.
- Avaliar a atividade de LyeTxImnΔK em conjunto com alguns antibacterianos e antifúngicos já consagrados.
- Avaliar o uso de LyeTxImnΔK ligado a radioisótopos utilizados em diagnósticos por imagem como sonda para rastrear infecções bacterianas com foco na discriminação entre inflamação e infecção em casos de artrite.

8. REFERÊNCIAS

AFONSO, A. S. Purificação e análise da atividade antimicrobiana do peptídeo des-his16-Lytx I proveniente da peçonha da aranha *Lycosa erythrognatha*, Departamento de Microbiologia, ICB. UFMG, 2013.

AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol*, v. 1, p., 1-7, 2010

ANDERSON, J. B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat Rev Microbiol* v. 3, n. 7, p. 547-556, 2005

ANDREU, D. RIVAS, L. Animal Antimicrobial Peptides: An Overview. *Biopolymers*, v. 47, n. 6, p. 415-433, 1998

APD, The Antimicrobial Peptide Database. Disponível em: <<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>> acessado em 29 de Janeiro de 2015

BAGINSKI, M. CZUB, J. Amphotericin B and Its New Derivatives – Mode of Action. *Curr Drug Metab*, v. 10, n. 5, p. 459-469, 2009

BATISTA, C. V. SCALONI, A. RIGDEN, D. J. SILVA, L. R. RODRIGUES ROMERO, A. DUKOR, R. SEBEN, A. TALAMO, F. BLOCH, C. A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta*. *FEBS Lett* v. 494, p. 85-89, 2001

BELANGER, A. E. SHRYOCK, R. Macrolide-resistant *Campylobacter*: the meat of the matter. *J Antimicrob Chemother*, v. 60, n. 4, p. 715-723, 2007

BLONDLE, S. E. HOUGHTEN, R. A. Design of Model Amphipathic Peptides Having Potent Antimicrobial Activities. *Biochemistry*, v. 31, n. 50, p. 12688-12694, 1992

BRAND, G. D. LEITE, J. R. SILVA, L. P. ALBUQUERQUE, S. PRATES, M. V. AZEVEDO, R. B. CARREGARO, V. SILVA, J. S. SÁ, V. C. BRANDÃO, R. A. BLOCH, C. JR. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. *J Biol Chem*, v. 277, n. 51, p. 49332-49340, 2002

BRENDER, J. R. MCHENRY, A. J. RAMAMOORTHY, A. Does cholesterol play a role in the bacterial selectivity of antimicrobial peptides? *Front Immunol* v. 3, n. 195, 2012

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, v. 3, p. 238-250, 2005

- BULET, P. HETRU, C. DIMARCQ, J. -L. HOFFMAN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol*, v. 23, p. 329-344, 1999
- CHAE, H. S. JANG, G. E. KIM, N. H. SON, H. R. LEE, J. H. KIM, S. H. PARK, G. N. JO, H. J. KIM, J. T. CHANG, K. S. Classification of *Cryptococcus neoformans* and yeast-like fungus isolates from pigeon droppings by colony phenotyping and ITS genotyping and their seasonal variations in Korea. *Avian Dis* v. 56, n. 1, p. 58-64, 2012
- CHAN, W. C., WHITE, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Publicado por Oxford University Press, 2000.
- CHEN, S. C.-A. KORMAN, T. M. SLAVIN, M. A. MARRIOT, D. BYTH, K. CURRIE, B. J. HAJKOWICZ, K. HEATH, C. H. KIDD, S. MCBRIDE, W. J. H. MEYER, W. MURRAY, R. PLAYFORD, E. G. SORRELL, T. C. Antifungal Therapy and Management of Complications of Cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*. *Clin Infect Dis*, v. 57, n. 4, p. 543-551, 2013
- CHEN, S. C.-A. MEYER, W. SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* Infections. *Clin Microbiol Rev*, v. 27, n. 4, p. 980-1024, 2014
- CHEN, Y. MANT, C. T. FARMER, S. W. HANCOOCK, R. E. W. VASIL, M. L. HODGES, R. S. Rational Design of α -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity/Therapeutic Index. *J Biol Chem*, v. 280, n. 13, p. 12316-12329, 2005
- CHOPRA, I. ROBERTS, M. *Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance*. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001
- CLSI. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – Segunda Edição. M27-A2, republicado pela ANVISA, 2001
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. (2013). M100-S23, 2013
- COWEN, L. E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat Rev Microbiol*, v. 6, p. 187-198, 2008
- CRUSCA, E. JR. REZENDE, A. A. MARCHETTO, R. MENDES-GIANNINI, M. J. FONTES, W. CASTRO, M. S. CILLI, E. M. Influence of N-terminus modifications on the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide hylin-a1. *Biopolymers*, v. 96, n. 1, p. 41-48, 2010

CRUZ, J. S. COTTA, G. DINIZ, C. R. BEIRÃO, P. S. Partial purification and pharmacological characterization of a neurotoxic fraction isolated from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. *Braz J Med Biol Res*, v. 27, n. 11, p. 2653-2659, 1994

DE LUCCA, A. J. WALSH, T. J. Antifungal Peptides: Novel Therapeutic Compounds against Emerging Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 43, n. 1, p. 1-11, 1999

DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. *New Drug Classes*, v. 362, p. 1142-1151, 2003

DRANCOURT, M. HOUHAMDI, L. RAOULT, D. *Yersinia pestis* as a telluric, human ectoparasite-borne organism. *Lancet Infect Dis*, v. 6, n. 4, p. 234-241, 2006

DUPLANTIER, A. J. VAN HOEK, M. L. The Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 as a Potential Treatment for Polymicrobial Infected Wounds. *Front Immunol*, v. 4, n. 143, 2013

EPAND, R. M. EPAND, R. F. Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochim Biophys Acta*, v. 1708, p. 289-294, 2009

EVANS, A. S. Causation and Disease: The Henle-Koch Postulates Revisited. *Yale J Biol Med*, v. 49, p. 175-195, 1976

FAO: The State of Food Insecurity in the World. 2014, 53p

FIREDMAN, H. NEWTON, C. KLEIN, T. W. Microbial Infections, Immunomodulation, and Drugs of Abuse. *Clin Microbiol Rev*, v. 16, n. 2, p. 209-219, 2003

FJELL, C. D. HISS, J. A. HANCOCK, R. E. W. SCHNEIDER, G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov*, v. 11, p. 37-51, 2011

FRANCO, M. MONTENEGRO, R. MENDES, R. P. MARQUES, S. A. DILLON, N. L. SILVA MOTA, N. G. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* v. 20, n. 2, p. 129-132, 1987

GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, v. 3, n. 9, p. 710-720, 2003

GANZ, T. SELSTED, M. E. LEHRER, R. I. Defensins. *Eur J Haematol*, v. 44, p. 1-8, 1990

GHANNOUM, M. A. RICE, L. B. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999

HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. The Search for the Natural Habitat of *Cryptococcus gattii*. *Mycopathologia*, v. 170, n. 4, p. 209–211, 2010.

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

HARRISON, P. L. ABDEL-RAHMAN, M. A. MILLER, K. STRONG, P. N. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. *Toxicon*, v. 88, p. 115-137, 2014

HARWIG, S. S. WARING, A. YANG, H. J. CHO, Y. TAN, L. LEHRER, R. I. Intramolecular disulfide bonds enhance the antimicrobial and lytic activities of protegrins at physiological sodium chloride concentrations. *Eur J Biochem*, v. 240, n. 2, p. 352-357, 1996

HERMANN, T. Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci*, v. 64, p. 1841-1852, 2007

IDNURM, A. BAHN, Y.-S. NIELSEN, K. LIN, X. FRASER, J. A. HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol* v. 3, n. 3, p. 753-764, 2005

IZADPANA, A. GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol*, v. 52, n. 3, p. 381-390, 2005

JANA, S. DEB, J. K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 70, p. 140-150, 2006

JEYA, M. MOON, H.-J. LEE, K. -M. KIM, I. -W LEE, J. -K. Glycopeptide Antibiotics and their Novel Semi-Synthetic Derivatives. *Curr Pharm Biotechnol*, v. 12, n. 8, p. 1194-1204, 2011

JOVETIC, S. ZHU, Y. MARCONE, G. L. MARTINELLI, F. TRAMPER, J. Beta-Lactam and glycopeptide antibiotics: first and last line of defense? *Trends Biotechnol*, v. 28, n. 12, p. 596-604, 2010

KHAWCHAROENPORN, T. APISARNTHANARAK, A. MUNDY, L. M. Non-neoformans Cryptococcal Infections: a Systematic Review. *Infection* v. 35, n. 2, p. 51-58, 2007

KOHANSKI, M. A. DWYER, D. J. COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*, v. 8, n. 6, p. 423-435, 2010

KRONSTAD, J.W. ATTARIAN, R. CADIEUX, B. CHOI, J. D'SOUZA, C. A. GRIFFITHS, E. J. GEDDES, J.M. HU, G. JUNG, W. H. KRETSCHMER, M. SAIKIA,

S. WANG, J. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol*, v. 9, n. 3, 193-203, 2011

LIEPKE, C. BAXMANN, S. HEINE, C. BREITHAUPT, N. STÄNDKER, L. FORSSMANN, W. -G. Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v. 791, p. 345-356, 2003

LING, L. L. SCHNEIDER, T. PEOPLES, A. J. SPOERING, A. L. ENGELS, I. CONLON, B. P. MUELLER, A. SCHÄBERLE, T. F. HUGHES, D. E. EPSTEIN, S. JONES M. LAZARIDES, L. STEADMAN, V. A. COHEN, D. R. FELIX, C. R. FETTERMAN, K. A. MILLETT, W. P. NITTI, A. G. ZULLO, A. M. CHEN, C. LEWIS, K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, v. 517, p. 455-459, 2015

LOFTSSON, T. BREWSTER, M. E. Cyclodextrins as Functional Excipients: Methods to Enhance Complexation Efficiency. *J Pharm Sci*, v. 101, n. 9, p. 3019-3032, 2012

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10^a ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004

MAHEU-GIROUX, M. How medicine became modern. *Sicence*, v. 346, n. 6206, p. 174, 2014

MANDAL, M. JAGANNADHAM, M. V. NAGARAJ, R. Antibacterial activities and conformations of bovine beta-defensin BNBD-12 and analogs: structural and disulfide bridge requirements for activity. v. 23, n. 3, p. 413-418, 2002

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 85, p. 2149-2154, 1963.

MICELI, M. H. DÍAZ, J. A. LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis*, v. 11, n. 2, p. 142-151, 2011

MITCHELL, T. G. PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev*, v. 8, n. 4, p. 515-548, 1995

MIYATA, T. TOKUNAGA, F. YONEYA, T. YOSHIKAWA, K. IWANAGA, S. NIWA, M. TAKAO, T. SHIMONISHI, Y. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. *J Biochem*, v. 106, n. 4, p. 663-668, 1989

MOR, A. NICOLAS, P. Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. *Eur J Biochem*, v. 219, p. 145-154, 1994

MORITA, Y. TOMIDA, J. KAWAMURA Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front Microbiol*, v. 4, 2014

MORRIS, M. I. VILLMANN, M. Echinocandins in the management of invasive fungal infections, part 1. *Am J Health Syst Pharm*, v. 63, n. 18, p. 1693-1703, 2006

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

OSTROSKY-ZEICHNER, L. CASADEVALL, A. GALGIANI, J. N. ODDS, F. C. REX, J. H. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov*, v. 9, n. 9, p. 719-727, 2010

PELEGRINI, P. B. FRANCO, O. L. Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 37, n. 11, p. 2239-2253, 2005

REINHOLZ, M. RUZICKA, T. SCHAUBER, J. Cathelicidin LL-37: An Antimicrobial Peptide with a Role in Inflammatory Skin Disease. *Ann Dermatol* v. 24, n. 2, p. 126-135, 2012

RHODES, A. CROSSE, R. FERGUSON, T. P. FLETCHER, D. L. Improvements in or relating to the production the antibiotic griseofulvin. *Inglaterra*, n. GB784618, 9 de Outubro de 1957

RIBEIRO, L. A. JORGE, M. T. PIESCO, R. V. NISHIOKA, SDE. A. Wolf spider bites in São Paulo, Brazil: a clinical and epidemiological study of 515 cases. *Toxicon*, v. 28, n. 6, p. 715-717, 1990

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. *Nature Rev Immunol*, v. 11, p. 275-288, 2011

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. *Nature Rev Immunol*, v. 4, p. 1-13, 2004

SANTOS, D. M. VERLY, R. M. PILÓ-VELOSO, D. DE MARIA, M. DE CARVALHO, M. A. R. CISALPINO, P. S. SOARES, B. M. DINIZ, C. G. FARIAS, L. M. MOREIRA, D. F. F. FRÉZARD, F. BEMQUERER, M. P. PIMENTA, A. M. C. DE LIMA, M. E. LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. *Amino Acids* v. 39, p. 135-144, 2010

SANTOS, D. M. Síntese e caracterização do peptídeo antimicrobiano LyeTx I do veneno da aranha *Lycosa erythrognatha*. 2009. Tese de doutorado – UFMG

SCHIPER, N. G. M. ROMEIJN, S. G. VERHOEF, J. C. MERKUS, F. W. H. M. Nasal insulin delivery with dimethyl-beta-cyclodextrin as an absorption enhancer in rabbits: powder more effective than liquid formulations. *Pharm Res*, v. 10, n. 5, p. 682-686, 1993

SCHNAPPINGER, D. HILLEN, W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch Microbiol*, v. 162, p. 359-369, 1996

SHAHID, M. SOBIA¹, F. SINGH¹, A. MALIK, A. KHAN¹, H. M. JONAS, D. HAWKEY P. M. Beta-lactams and Beta-lactamase-inhibitors in current- or potential-clinical practice: A comprehensive update. *Crit Rev Microbiol*, v. 35, n. 2, p. 81-108, 2009

SHEEHAN, D. J. HITCHCOOK, C. A. SIBLEY, C. M. Current and Emerging Azole Antifungal Agents. *Clin Microbiol Rev*, v. 12, n. 1, p. 40-79, 1999

SKÖLD, O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat*, v. 3, n. 3, p. 155-160, 2000

SOBELL, H. M. Actinomycin and DNA transcription. *Proc. Natl Acad Sci*, v.82, p. 5328-5331, 1985

STEINER, H. HULTMARK, D. ENGSTRÖM, A. BENNICH, H. BOMAN, H. G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, v. 292, p. 246-248, 1981

SUGAR, A. M. Overview: Cryptocoecosis in the patient with AIDS. *Mycopathologia* v. 114, p. 153-157, 1991

TENSON, T. LOVMAR, M. EHRENBERG, M. The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. *J Mol Biol*, v. 330, p. 1005-1014, 2003

TIBALL, R. W. An elusive serial killer. *Nature*, v. 430, p. 145-146, 2004

TORRES, A. M. KUCHEL, P. W. The b-defensin-fold family of polypeptides. *Toxicon*, v. 44, p. 581-588, 2004

TOSSI, A. SANDRI, L. GIANGASPERO, A. Amphipathic, α -Helical Antimicrobial Peptides. *Biopolymers*, v. 55, p. 4-30 2000

UNAIDS: Global Report UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013. 2013, 116p

UNODC: World drug report. 2013, 115p

VAKULENKO, S. B. MOBASHERY, S. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. Clin Microbiol Rev, v. 16, n. 3, p. 430-450, 2003

VERMES, A. GUCHELAAR, H. J. DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. J Antimicrob Chemother, v. 46, n. 2, p. 171-179, 2000

WANG, G. New LL-37 peptide, useful for treating a bacterial infection or cancer. Estados Unidos da América, n. US2008125359-A1 e US7465784-B2, 26 de Outubro de 2006

WHO, 2012 The top 10 causes of death. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>> Acessado em 26 de Janeiro de 2015

WHO: Antimicrobial Resistance Global report on Surveillance. 2014, 232p

WILSON, D. N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. Nat Rev Microbiol v. 12, p. 35-48, 2014

YAN, L. ADAMS, M. E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. J Biol Chem, v. 273, n. 4, p. 2059-2066, 1998

YEAMAN, M. R. YOUNT, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. Pharmacol Rev, v. 55, p. 27-55, 2003

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature, v. 415, p. 389-395, 2002

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. Proc Natl Acad Sci USA, v. 84, n. 15, p. 5449-5453, 1987

ZINK, A. R.; SOLA, C.; REISCHL, U; GRABNER; RASTOGI, N. WOLF, H. NERLICH, A. G. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNAs from Egyptian Mummies by Spoligotyping. J Clin Microbiol, v. 41, n. 1, p. 359-367, 2003

