

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Aline de Souza Afonso

PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DO PEPTÍDEO SINTÉTICO des-His16-  
LyeTx I, ANÁLOGO DE UM PEPTÍDEO OBTIDO DA  
PEÇONHA DA ARANHA *Lycosa erythrognatha*

Belo Horizonte

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Aline de Souza Afonso

PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DO PEPTÍDEO SINTÉTICO  
des-His16-LyeTx I, ANÁLOGO DE UM PEPTÍDEO OBTIDO DA  
PEÇONHA DA ARANHA *Lycosa erythrognatha*

Monografia apresentada como requisito  
parcial para obtenção de título de  
especialista em Microbiologia Ambiental e  
Industrial.

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

Co-orientador: Dr. Daniel Moreira dos  
Santos

Belo Horizonte

2015

Dedico este trabalho a todos que de alguma maneira estiveram envolvidos na elaboração, execução ou qualquer outra forma de apoio. Em especial aos amigos que fiz durante essa caminhada que tornaram meus finais de semana muito mais agradáveis, e que me deram forças pra terminar essa monografia.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais;

Ao mais paciente de todos que me acompanham: Rodrigo Campolina;

Ao pessoal querido do Laboratório de Venenos e Toxinas Animais;

Aos colaboradores do LVTA especialmente Daniel Santos, do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Patrícia Oliveira e Gabriel Bretz; e do Laboratório de Interação Microrganismos Hospedeiro, Rosana Cruz.

A meus amadinhos Gaby, Luciana e Mateus; e tantos amigos que levo sempre comigo;

A todos os professores que estiveram envolvidos nesse trabalho me ajudando, aconselhando e orientando especialmente Maria Elena, Adriano Pimenta, Luís Macedo, Paula Prazeres e Patrícia Cisalpino.

## RESUMO

Uma vertente para a pesquisa de novos antimicrobianos está nas proteínas e peptídeos de origem animal. As peçonhas de aranhas constituem misturas complexas de moléculas bioativas, incluindo peptídeos, proteínas, sais, aminoácidos, poliaminas, dentre outros. Essas moléculas atuam em diferentes alvos biológicos e despertam interesse pelo seu potencial para a aplicação biotecnológica e terapêutica. Nosso grupo (SANTOS et al, 2009) isolou e caracterizou o peptídeo antimicrobiano catiônico LyeTx I, da peçonha da aranha *Lycosa erythrognatha*. A partir do conhecimento de sua sequência este e outros peptídeos relacionados foram obtidos por síntese química utilizando-se a metodologia de Fmoc/t-butila. Um destes peptídeos, chamado des-His16-LyeTx I tem um resíduo de histidina a menos em comparação à LyeTx1 e o N-terminal acetilado. O presente trabalho avaliou a atividade antimicrobiana deste peptídeo sintético, determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) contra amostras de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12223, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Propionibacterium acnes* ATCC 6919, *Fusobacterium necrophorum* ATCC 25286, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337, *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, *Candida albicans* ATCC 90028, *Aspergillus fumigatus* ATCC 16913 e *Paracoccidioides brasiliensis*: Pb01, Pb 18 e B339. Após a síntese química, o peptídeo des-His16-LyeTx1, foi purificado por cromatografia de alta performance em coluna de fase reversa (RP-HPLC), com gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila, e liofilizado. Sua massa foi determinada por espectrometria de massa. A CIM foi obtida por microdiluição do peptídeo, em concentrações entre 1 a 128 µg/mL para bactérias e de acordo com as concentrações determinadas pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) para amostras padrão de fungos e leveduras. A leitura baseou-se na observação da turvação a olho nu. Para CBM, alíquotas dos poços nos quais não foi detectado crescimento foram cultivadas. Foram obtidos 14 mg do peptídeo com alto grau de pureza. A massa do peptídeo foi de 2,738 Kd, determinada em espectrômetro de massa. A CIM foi de 8 µg/mL para as amostras de *E. coli*, *P. aeruginosa* *P. anaerobius*. Para *S. aureus* e *S. epidermidis* e *P. acnes*, o valor determinado foi de 4

$\mu\text{g/mL}$ , nos testes com *B. fragilis* o resultado obtido foi  $16 \mu\text{g/mL}$ . Nos experimentos com amostras bacterianas observou-se equivalência entre os valores de CIM e CBM, o que sugere atividade bactericida do peptídeo des-His16-LyeTx I. De todas as cepas utilizadas, apenas *F. necrophorum* não foi sensível ao peptídeo, quanto à sua atividade antimicrobiana. Para as amostras fúngicas, os valores para CIM foram de  $16 \mu\text{g/mL}$  para *C. neoformans*,  $64 \mu\text{g/mL}$  para *C. albicans* e *A. fumigatus* e para *P. brasiliensis* não houve atividade. Os dados obtidos, sugerem grande potencial biotecnológico para des Hys-Lye Tx1 e abre perspectivas para estudos que visem ampliar sua caracterização, inclusive verificando possível toxicidade, ou outros efeitos para o ser humano.

Palavras-chave: LyeTx1, peptídeo antimicrobiano, fungos, bactérias, veneno de aranha, *Lycosa erythrognatha*.

## ABSTRACT

One avenue for research on new antimicrobial proteins and peptides is of animal origin. The spider venoms are complex mixtures of bioactive molecules including peptides, proteins, salts, amino acids, polyamines, and others. These molecules act on different biological targets and arouse interest in its potential for biotechnological and therapeutic application. Our group (Santos et al, 2009) isolated and characterized the cationic antimicrobial peptide LyeTx I, from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. Based on the knowledge of its sequence this and other related peptides have been obtained by chemical synthesis using the methodology of Fmoc / t-butyl. One of these peptides, called des-His16-LyeTx I has a histidine residue at least compared to LyeTx1 and the N-terminal acetylated. This study evaluated the antimicrobial activity of this synthetic peptide, by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12223, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Propionibacterium acnes* ATCC 6919, *Fusobacterium necrophorum* ATCC 25286, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337, *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, *Candida albicans* ATCC 90028, *Aspergillus fumigatus* ATCC 16913 e *Paracoccidioides brasiliensis*: Pb01, Pb 18 e B339. After chemical synthesis, the peptide des-His16-LyeTx1 was purified by high performance reversed phase column (RP-HPLC) with linear gradient of 0.1% TFA (v / v) acetonitrile, and lyophilized. His mass was determined by mass spectrometry The MIC was determined by the microdilution peptide, at concentrations between 1-128 µg / ml for bacteria and according to the concentrations determined by CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) standard samples for fungi and yeasts. The reading was based on the observation by the naked eye from turbidity. For CBM, aliquots from wells where no growth was detected were cultivated. There was obtained 14 mg of the peptide with a high degree of purity. The mass of the peptide was 2.738 Kd determined by mass spectrometer. The MIC was 8 µg / mL for samples of *E. coli*, *P. aeruginosa* and *P. anaerobius*. To *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. acnes*, the determined value was 4 µg / mL in tests with *B. fragilis* the result obtained was 16 µg / mL. In experiments with bacterial samples was observed

equivalence between the MIC and MBC, suggesting bactericidal activity of the peptide des-His16-LyeTx I. Of all the tested strains, only *F. necrophorum* was not sensitive to the peptide, for their antimicrobial activity. For yeast samples, the values for MIC were 16 µg / mL for *C. neoformans*, 64 µg / mL for *C. albicans* and *A. fumigatus* and *P. brasiliensis* there was no activity. The data suggest great potential for biotechnological des Hys-Lye Tx1 and opens perspectives for studies aimed at increasing its characterization including verifying possible toxicity, or other effects for the human being.

Keywords: LyeTx1, antimicrobial peptide, fungi, bacteria, poison spider, *Lycosa erythrognatha*.



## LISTA DE FIGURAS

Figura1.: Espectrometria de massa do peptídeo sintético des-His16-LyeTx I.....	23
Figura.2: Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC do peptídeo des-His16-LyeTx I. Coluna Source™ 15 RPC ST4.6/100.....	24
Figura.3: Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC do peptídeo des-His16-LyeTx I. Coluna µRPC C2/C18 ST 4.6/100.....	24
Figura 4: Microplaca dom diluições referente ao teste em duplicata com bactérias aeróbias.....	26
Figura 5: Microplaca dom diluições referente ao teste em duplicata com bactérias anaeróbias.....	27
Figura 6: Análise da atividade fungicida do peptídeo des-His16-LyeTx I contra <i>C. albicans</i> .....	28
Figura 7: Análise da atividade fungicida do peptídeo des-His16-LyeTx I contra <i>C. neoformans</i> .....	28

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Peptídeos antimicrobianos em fase de desenvolvimento clínico.....	15
Quadro 2: Faixa intervalar das concentrações do peptídeo utilizadas para os testes com fungos.....	18
Quadro 3: Concentração da solução do peptídeo utilizada no teste para cálculo da CIM, CBM e CFM.....	21

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de CIM encontrados para cada microrganismo avaliado.....	25
--	----

## LISTA DE SIGLAS

$\mu\text{mol L}^{-1}$	Micromolar
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
DAMP	Dragon Antimicrobial Peptide Database
FDA	Food and Drug Administration
His	Histidina
HPLC	High-performance liquid chromatography
Kd	Kilodalton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
PAM	Peptídeo Antimicrobiano
PCM	Paracoccidioidomicose
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
TFA	Ácido Trifluoroacético
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VRE	<i>Enterococos</i> Resistente a Vancomicina
YPD	Yeast Peptone Dextrose

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	2
1.1 ANTIBIÓTICOS SINTÉTICOS, NATURAIS E SUA RELAÇÃO COM RESISTÊNCIA MICROBIANA .....	2
1.2 VANTAGENS E DESVANTAGENS DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS .....	5
1.3 UTILIZAÇÃO DE VENENOS DE ARANHA .....	8
1.4 DESCRIÇÃO DOS MICRORGANISMOS UTILIZADOS DURANTE O ESTUDO.....	9
1.5 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM FASE PRÉ-CLINICA .....	13
2 OBJETIVOS .....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
3 METODOLOGIA .....	18
3.1 PURIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO .....	18
3.2 LINHAGENS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	18
3.3 MÉTODO DE CRESCIMENTO E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO.....	19
3.4 AVALIAÇÃO DA CIM, CBM E CFM DO PEPTÍDEO COM OS MICRORGANISMOS .....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	223
5 CONCLUSÃO .....	33
6 PERSPECTIVAS .....	34
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Antibióticos sintéticos, naturais e sua relação com resistência microbiana

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias (GUIMARÃES et.al., 2010) .

A maioria dos antibióticos foi identificada a partir de fontes naturais, produzidas por outros microrganismos (OYSTON et.al., 2009). O primeiro antibiótico para uso clínico, a penicilina, começou a ser utilizado em 1940, durante a Segunda Guerra Mundial. A partir de então, uma competição entre a busca de novos antimicrobianos e o surgimento de resistência a cada um deles marcou os últimos 60 anos (ANVISA, 2008).

Entre os anos 1940-1960 vários antibióticos foram descobertos através de triagens de produtos naturais microbianos, sendo a maioria deles eficazes para o tratamento de bactérias gram positivas:  $\beta$ -lactâmicos (cefalosporina), aminoglicosídeos (estreptomicina), tetraciclina (clortetraciclina), macrolídeos (eritromicina), peptídeos (vancomicina) e outros (cloranfenicol, rifamicina B, clindamicina e polimixina B). Neste período apenas três derivados sintéticos foram introduzidos no mercado: isoniazida, trimetropim e metronidazol (GUIMARÃES et.al., 2010) .

Entre os anos 1960-1980 foram introduzidos no mercado antimicrobianos semi-sintéticos eficazes para o tratamento de patógenos gram positivo e gram negativo, análogos aos antibióticos naturais já existentes. A maioria deles foi obtida a partir de protótipos naturais microbianos, como derivados  $\beta$ -lactâmicos (análogos de penicilina e cefalosporina, ácido clavulânico, aztreonam), análogos da tetraciclina, derivados aminoglicosídicos (gentamicina, tobramicina, amicacina) (GUIMARÃES et.al., 2010) .

Entre os anos 1980-2000 as principais ferramentas utilizadas para a busca de novos medicamentos foram a genômica e as triagens de coleções de compostos, em detrimento às triagens de produtos naturais microbianos. Porém, houve uma redução dramática na identificação de novos protótipos medicamentosos, ao mesmo

tempo em que ocorreu um aumento na incidência de resistência bacteriana (GUIMARÃES et.al., 2010).

Justamente devido a ocorrência de patógenos resistentes aos antimicrobianos convencionais o campo de pesquisa voltado para busca de peptídeos antimicrobianos está crescendo rapidamente em resposta à procura por novas drogas para tratamentos de diversas doenças (OYSTON et.al., 2009; SUNDARARAJAN et.al., 2012). Portanto, apesar da disponibilidade de um grande número de antibióticos de última geração, torna-se fundamental buscar compostos que possam atuar como novas opções no combate às doenças infecciosas (OYSTON et.al., 2009).

Antes do século XXI a resistência bacteriana ocorria predominantemente em ambientes hospitalares. Atualmente, a resistência está associada a diversos ambientes e pode atingir indivíduos saudáveis. Uma alternativa que pode ser adotada na tentativa de contornar este problema é o uso de terapias associadas. Porém, o uso extensivo e muitas vezes inapropriado dos antimicrobianos, más condições de higiene, fluxo contínuo de viajantes, o aumento de pacientes imunocomprometidos e a demora no diagnóstico das infecções bacterianas têm favorecido o aumento da resistência (GUIMARÃES et.al., 2010).

Algumas estratégias podem ser adotadas para evitar o desenvolvimento de resistência: prevenção de infecções com o uso de vacinas, uso racional de medicamentos, controle e prevenção da disseminação de micro-organismos resistentes, descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (GUIMARÃES et.al., 2010).

Organismos naturais com propriedades terapêuticas, utilizadas no cuidado de saúde tradicional, constituem importante fonte de novos compostos biologicamente ativos. Eles aparecem como parte do cuidado tradicional de saúde em muitas partes do mundo ao longo de décadas e têm despertado o interesse de vários pesquisadores (OLIVEIRA et. al., 2006).

Um grande exemplo da utilização de fontes naturais de medicamentos são as plantas usadas ao longo da história da humanidade, por várias culturas como a principal ou até mesmo a única matéria prima no tratamento de diversas afecções. Seu uso terapêutico na saúde humana constitui-se prática milenar, construída

conjuntamente à sabedoria do senso comum, articulando-se saúde e cultura, inseridas em um contexto histórico determinado (RAMOS et. al., 2012). Por definição da Organização Mundial da Saúde (OMS) tem-se que planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (OLIVEIRA, 2011).

Uma vertente para a pesquisa de novos antimicrobianos está nas proteínas e peptídeos de origem animal (ZASLOFF, 2002). O primeiro peptídeo antimicrobiano (bombinina) foi isolado a quase quarenta anos da secreção cutânea da rã *Bombina variegata* (Csordas & Michl, 1970), todavia o estudo dessas moléculas só se intensificou e consolidou no final da década de 80 com o isolamento das magainins de *Xenopus laevis* por Zasloff (1987), detentoras de uma ampla atividade contra fungos, bactérias e protozoários (LIBÉRIO, 2008).

Zasloff (2002) citou 900 peptídeos antimicrobianos já descritos isolados de vários organismos<sup>9</sup>. Em 2008, de acordo com Wang e colaboradores, baseados no banco de dados sobre peptídeos antimicrobianos (PAMs), criado e desenvolvido pelo grupo, as pesquisas demonstravam 1228 peptídeos, sendo 944 antibacterianos (WANG, 2009). Em dezembro de 2012, o banco de dados do Departamento de Patologia e Microbiologia da Universidade de Nebraska, continha mais de 2160 PAMs, com atividade demonstrada. A última atualização do banco de dados ocorrida em julho de 2014 indica uma lista com 1987 peptídeos antibacterianos em um total de 2418 peptídeos antimicrobianos (WANG et. al., 2014).

Muitos peptídeos antimicrobianos foram isolados a partir de uma vasta gama de organismos eucarióticos e procarióticos, podendo ser a ação observada, também, a partir de fragmentos de proteínas (SANTOS et. al., 2009). A ubiquidade desses peptídeos na natureza comprova sua importância global na construção de estratégias de defesa dos organismos (OTERO-GONZALES, 2010). Os PAMs são componentes do sistema imune inato, presentes na maioria dos seres vivos, que vêm despertando interesse crescente, uma vez que apresentam atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de microrganismos, sendo usualmente atóxicos para células de mamíferos (Sundararajan et.al., 2012; OTERO-GONZALES, 2010; CARVALHO, 2011; TÉLLEZ e CASTAÑO, 2010; FJELL et. al., 2012).



Os fatores determinantes dos mecanismos microbicidas desses peptídeos estão relacionados às características das membranas celulares das células microbianas e a natureza físico química do peptídeo (DE SIMONE e SOUZA, 2002).

A compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pela atividade antibacteriana direta dos PAMs permite o desenvolvimento de modelos de previsão, e vários mecanismos de ação têm sido propostos. Acredita-se que os peptídeos interagem com as membranas, levando a perturbação da mesma, a desregulação associada a eventos fisiológicos, tais como a biossíntese da parede celular, divisão celular e/ou a translocação através da membrana para interagir com alvos citoplasmáticos. Possíveis alterações na estrutura da membrana, incluindo formação de poros, alteração na curvatura, interrupção eletrostática e perturbações localizadas, podem resultar na reorientação de moléculas peptídicas. Os peptídeos podem se translocar através da membrana e se difundirem no citoplasma até atingir alvos intracelulares (FJELL et. al., 2012).

Uma vez no citoplasma, os peptídeos translocados podem alterar a formação do *septum* da membrana citoplasmática, inibir a síntese da parede celular, inibir alguma atividade enzimática, alterar a renaturação de proteínas, promover perda de ATP, dentre outros mecanismos. Portanto, os PAMs podem matar a mesma espécie de patógeno por mais de um mecanismo de ação, dependendo de fatores individuais como fase de crescimento, localização tecidual, e a presença ou ausência de outros mecanismos imunes ou agentes antimicrobianos exógenos sinérgicos (LIBÉRIO, 2008).

## 1.2 VANTAGENS E DESVANTAGENS DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Nenhum dos antibióticos catiônicos tem uma atividade extraordinariamente maior que os agentes antimicrobianos em uso. Mas a emergente resistência de vários grupos de bactérias aos medicamentos disponíveis, inclusive os de última geração, tem levado os laboratórios produtores a procurarem novas substâncias que possam ser utilizadas com eficácia contra bactérias resistentes. Assim, vários bancos com sequências peptídicas, com potencial efeito antimicrobicida, têm sido criados com a utilização da química combinatória. Embora muitos dos peptídeos identificados

tenham atividade bactericida menor que os agentes antimicrobianos em uso, vários aspectos os tornam uma boa alternativa como futuros agentes antimicrobianos (DE SIMONE e SOUZA, 2002).

A principal motivação para o uso terapêutico de peptídeos são suas diversas aplicações potenciais: podem ser utilizados como único agente antimicrobiano (MARR, et.al., 2006; GORDON e ROMANOWSKI, 2005), em combinação com outros para um efeito sinérgico (LIBÉRIO, 2008; MARR, et. al., 2006, GORDON e ROMANOWSKI, 2005), bastante úteis no combate às infecções por patógenos multi-resistentes, ou como imunomoduladores e/ou neutralizantes de endotoxinas (LIBÉRIO, 2008; GORDON e ROMANOWSKI, 2005).

As possibilidades de aplicação dos peptídeos antimicrobianos pela agroindústria, assim como pela indústria farmacêutica, são inúmeras. Um trabalho sistemático de prospecção dessas moléculas, com identificação e síntese química em larga escala, possibilitará, não somente um grande avanço na produção de novos medicamentos, melhor conhecimento biológico das espécies doadoras, reconhecimento do valor de cada uma delas, como novas categorias de recursos genéticos e, por fim, a necessidade de preservação desses animais (PRATES e JÚNIOR, 2000).

O potencial terapêutico dos peptídeos antimicrobianos é atribuído a sua capacidade de lisar membranas, aumentando a permeabilidade, matando rapidamente um amplo espectro de microorganismos, inclusive fungos, bactérias e vírus resistentes à múltiplas drogas. Devido ao seu mecanismo de ação relativamente não específico, o surgimento de resistência aos peptídeos pelos microorganismos ocorre a uma taxa bem menor que a dos antibióticos convencionais (LIBÉRIO, 2008).

A resistência adquirida está frequentemente associada à resistência a vários antimicrobianos disponíveis ou a combinações deles. Esse tipo de resistência parece não ocorrer nos peptídeos catiônicos. Por exemplo, não foi registrada nenhuma tendência a resistência à vancomicina, nos últimos 30 anos e o fato parece ser verdade, também para a teicoplanina (TÉLLEZ e CASTAÑO, 2012) que é um antibiótico bactericida do grupo da vancomicina, cujo espectro útil é o *Staphylococcus aureus* metilina-resistente e o *Streptococcus faecalis* (TEICOPLANINA, 2013).

A vancomicina é um produto de fermentação do *Streptomyces orientalis*, um microrganismo de solo, e é usada há muitos anos para tratamento de várias infecções causadas por organismos gram+. É bastante utilizada em pacientes alérgicos à penicilina e também contra infecções causadas por *Stafilococos* resistentes à penicilina e à meticiclina (DE SIMONE e SOUZA, 2002).

Outra característica satisfatória vem da frequente coincidência entre os valores de concentração inibitória mínima e as concentrações bactericidas, indicando um potencial bactericida, sendo este um mecanismo altamente desejável de ação (MARR, et.al., 2006).

O alto custo de produção de peptídeos é sem dúvida o principal problema que impede a utilização do uso clínico generalizado desta classe de agentes terapêuticos antibacterianos (DE SIMONE e SOUZA, 2002; MARR, et.al., 2006).

Outros obstáculos para o uso dos peptídeos como agentes anti-infecciosos são a sua toxicidade (LIBÉRIO, 2008; DE SIMONE e SOUZA, 2002), principalmente se forem administrados sistemicamente, e a pequena meia-vida na circulação (LIBÉRIO, 2008).

Apesar de peptídeos apresentam significativa atividade *in vitro* contra as bactérias, para muitos peptídeos esta atividade parece se perder em soluções salinas e condições séricas (DE SIMONE e SOUZA, 2002; MARR, et.al., 2006). Alguns também apresentam sensibilidade aos valores de Ph (DE SIMONE e SOUZA, 2002). No entanto nem todos os peptídeos são sensíveis aos altos níveis de sais, sendo que alguns apresentam um potencial de atividade antimicrobiana insensível ao sal (MARR, et. al., 2006).

Ainda existem problemas com relação a suscetibilidade à proteólise, aumento de sensibilidade e alergias após repetidas doses, relações de farmacocinética e farmacodinâmica, alteração de funções biológicas como angiogênese, além das patentes que inviabilizam o processo economicamente, em alguns casos (DE SIMONE e SOUZA, 2002).

### 1.3 UTILIZAÇÃO DE VENENOS DE ARANHA

Venenos e toxinas de origem natural há muito representam fonte de fascínio para o homem, graças aos seus extraordinários efeitos farmacológicos. O estudo destas substâncias tem contribuído para a elucidação de vários mecanismos fisiológicos. Como exemplos, podem ser citados os experimentos clássicos com o curare conduzidos por Claude Bernard, na década de 1850, bem como sua exploração industrial para o uso terapêutico (PRATES e JÚNIOR, 2000).

As aranhas pertencem ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida. Esta classe compreende cerca de quarenta mil espécies. Grande parte das espécies de aranhas é relativamente pequena (2-10 mm de comprimento corporal), embora as grandes tarântulas possam atingir de 80 a 90 mm de comprimento corporal. Os machos normalmente são menores e possuem vida mais curta que as fêmeas (SANTOS, 2009).

As tarântulas do gênero *Lycosa*, LATREILLE 1804, compõem o grupo de espécies responsáveis pelo maior número de acidentes no Brasil. Estes animais pertencem à família Lycosidae, e são conhecidas como aranhas-lobo ou aranhas de jardim. Ocorrem em todas as regiões e apresentam ampla adaptação às condições do meio ambiente (SANTOS, 2009).

A peçonha de aranhas constitui um conjunto diverso de moléculas bioativas, usado para subjugar a presa e, eventualmente, para defesa. Essas moléculas atuam de formas variadas em muitos sistemas biológicos e despertam interesse pelo seu potencial para a prospecção de produtos naturais (VIZZOTO, 2009).

Nas aranhas os peptídeos antimicrobianos estão presentes constitutivamente na glândula do veneno e são liberados juntos com os demais componentes para a captura da presa ou defesa. A função destes peptídeos no veneno ainda não é totalmente compreendida, mas eles podem proteger permanentemente as quelíceras das aranhas contra a infecção por fungos e bactérias (SANTOS, 2009).

Nosso grupo (SANTOS et. al., 2009) iniciou a caracterização do peptídeo antimicrobiano catiônico LyeTx I, isolado da peçonha da aranha *Lycosa erythrognatha* LyeTx I, bem como sintetizou este peptídeo em fase sólida. Os ensaios de atividade antimicrobiana de LyeTx-I sintético demonstram inibição do crescimento de bactérias (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) em

concentrações da ordem de  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e também de fungos (*Candida Krusei* e *Cryptococcus neoformans*) em concentrações da ordem de  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (SANTOS, 2009).

A partir do conhecimento da estrutura do peptídeo LyeTx I foi sintetizado um novo peptídeo denominado des-His16-LyeTx I, que possui um resíduo de His a menos (posição 16) com o N-terminal acetilado, em relação à molécula nativa, com o objetivo de aumentar a atividade e a estabilidade em relação ao peptídeo original, em solução.

#### 1.4 DESCRIÇÃO DOS MICRORGANISMOS UTILIZADOS DURANTE O ESTUDO

Para os testes, amostras de referência foram utilizadas a fim de verificar a eficiência do peptídeo, objeto de estudo deste trabalho. Todos os microrganismos selecionados para o estudo apresentam importância clínica relevante sendo causa comum de diversas infecções.

Os estudos envolvendo bactérias anaeróbias, foram feitos a partir de quatro cepas.

*Propionibacterium acnes* é um bacilo gram-positivo (VIZZOTO, 2009; WANG et. al., 2012), aerotolerante que produz o ácido propiônico como subproduto metabólico (VIZZOTO, 2009). Ele é onipresente em glândulas sebáceas dos seres humanos, e obtém energia a partir de ácidos graxos encontrados no sebo (WANG et. al., 2012; MAKRANTONAKI et. al., 2011). É normalmente relacionado com a patogênese da acne vulgar, foliculite, e as infecções sistêmicas (WANG, 2012).

*Peptostreptococcus anaerobius* é um coco gram positivo anaeróbio freqüentemente cultivado a partir de amostras clínicas da boca, do trato respiratório superior, pele e tecidos moles, ossos e articulações, e trato gastrointestinal e genitourinário (KÖNÖNEN, et. al., 2007).

*Fusobacterium necrophorum* é um bacilo anaeróbio obrigatório gram-negativo que freqüentemente coloniza a boca e trato respiratório. A apresentação clínica clássica de infecção devido a *F. necrophorum* é a tromboflebite séptica da jugular (também chamada de síndrome de Lemierre), com quadro de dor de garganta, febre persistente, inchaço no pescoço e bacteremia. Essa bactéria ainda pode estar

relacionada a casos de faringite em adolescentes e adultos jovens, com uma incidência estimada que se compara aos casos relacionados às infecções por espécies de *Streptococcus*. *F. necrophorum* também pode causar infecções intra-abdominais, peritonite, artrite séptica, abscesso cerebral e menos frequentemente endocardite infecciosa (HANDLER, 2011).

*Bacteroides fragilis* é um bacilo anaeróbico gram-negativo e representa uma causa comum de infecções endógenas nos seres humanos. É um componente da microbiota indígena do íleo terminal humano, do cólon e da vagina e é frequentemente associado com infecções polimicrobianas (RODRIGUES et. al., 2012).

O estudo envolvendo bactérias aeróbias foi desenvolvido com amostras referências de *Pseudomonas aeruginosas*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

*P. aeruginosas* é um bastonete gram negativo, aeróbio, quimioorganotrófico, que tolera uma variação de temperatura de 4-42 °C e pH entre 4-8 sendo altamente adaptável que habita ambientes diversos, incluindo o solo, habitats marinhos, plantas e animais (OLIVEIRA, 2008). Além dessa adaptação a referida bactéria tem capacidades não só de impor-se a outros, mas também de se comunicar uns com os outros para desenvolver uma comunidade de múltiplas espécies (TASHIRO et. al., 2013). Em seres humanos, causa infecções em indivíduos imunocomprometidos, como pacientes com AIDS e câncer, vítimas de queimaduras, e portadores de fibrose cística. Neste caso a bactéria coloniza os pulmões, onde produz grande quantidade do exopolissacarídeos alginato e acredita-se que cresça em forma de biofilme. Essa espécie também é comumente encontrada em infecções hospitalares, sendo capaz de se aderir a diversos materiais, contaminando catéteres, ventiladores, próteses e lentes de contato. Por causa da alta resistência a antimicrobianos e do grande arsenal de fatores de virulência desta bactéria, as infecções causadas por ela são de difícil controle (BALDINI, 2013).

*Escherichia coli*, é um microrganismo pertencente a família *Enterobacteriaceae* sendo constituinte da microbiota normal do trato intestinal de humanos e de uma diversidade de outros animais. Dentre suas principais características tem-se que elas são bacilos gram-negativos, não esporulados, capazes de fermentar glicose

com produção de ácido e gás, sendo que a maioria também fermenta lactose (KASNOWSKI, 2004).

Até 1950, este microrganismo foi considerado como habitante não patogênico do trato entérico do ser humano e dos animais de sangue quente. Mas existem cepas patogênicas associadas a uma grande variedade de infecções intestinais e extraintestinais (PIGATO, 2008).

O *Staphylococcus aureus* apresenta-se como cocos gram e catalase-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados. Essa bactéria é frequentemente encontrada na pele, garganta, intestinos e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Desses sítios anatômicos, as narinas possuem o maior índice de colonização, cuja prevalência é de cerca de 40% na população adulta, podendo ser ainda maior dentro de hospitais. Entretanto pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras). Sua distribuição é muito ampla, visto que essa bactéria é significativamente capaz de resistir à dessecação e ao frio, podendo permanecer viável por longos períodos em partículas de poeira. Esse microrganismo pode ser encontrado no ambiente de circulação do ser humano, sendo o próprio homem seu principal reservatório (SANTOS, 2007).

*Staphylococcus epidermidis* são cocos gram positivos da família Micrococcaceae que produzem catalase. É um microrganismo coagulase negativo e não saprofítico integrante da população autóctone da pele humana. Está relacionado a um grande número de infecções que afetam dispositivos médicos, sendo o microrganismo mais frequente na infecção de derivações ventrículo-peritoniais. É responsável por endocardites das válvulas prostéticas; infecta frequentemente tubos de ventriculostomia, e catéteres de doentes que recebem tratamento quimioterápico para meningite neoplásica, é responsável por 80-90% das infecções do trato urinário, frequentemente isolado de cerca de 50% dos doentes com peritonite e responsável por cerca de 60% das infecções dos enxertos aorto-femorais diagnosticados num período de 10 anos (FONSECA, 1998).

Nos testes com fungos e leveduras foram utilizadas amostras de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Aspergillus fumigatus*.

*Paracoccidioides brasiliensis* um fungo dimórfico com estruturas filamentosas (hifas) contendo propágulos infectantes ou conídeos em ambiente natural; a 37 °C apresenta forma leveduriforme com brotamentos múltiplos. A infecção ocorre provavelmente como resultado da inalação de conídios, que posteriormente se transformam em células leveduriformes. Esse microrganismo é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma doença sistêmica e endêmica que afeta pelo menos 10 milhões de pessoas na América Latina. A PCM é a mais frequente causa de morte entre as micoses sistêmicas no Brasil. Duas principais manifestações clínicas foram relatadas: aguda /subaguda (forma juvenil), que evolui rapidamente e tem uma taxa de mortalidade considerável, e crônica (adulto), que progride lentamente e é responsável por mais de 90% dos casos. Todos os dados apontam o epitélio pulmonar como o local primário de infecção, a partir de onde se espalha para outros órgãos e tecidos. Lesões secundárias podem ser encontradas nas mucosas, pele, nódulos linfáticos, fígado, baço e glândula adrenal (CRUZ et. al., 2013).

As leveduras do gênero *Candida* podem ser encontradas em variados ecossistemas, como solo, alimentos, água, fazendo parte da microbiota de homens e animais. Esses micro-organismos degradam proteínas e carboidratos para obterem carbono e nitrogênio, elementos essenciais para seu desenvolvimento. Este gênero é o principal entre as leveduras patogênicas, compreendendo aproximadamente 200 espécies. *C. albicans* é considerada a principal levedura patogênica oportunista por ser a espécie mais frequentemente isolada em humanos. São micro-organismos comensais, que habitam primariamente o intestino, fazendo parte também da microbiota vaginal e da uretra. Entretanto, essas mesmas leveduras podem se tornar patogênicas, caso ocorra um desequilíbrio em sua relação com o hospedeiro, por isso são consideradas oportunistas. Elas podem apresentar-se sob a forma arredondada denominada blastoconídio, ou formando pseudo-hifas ou hifas e micélios verdadeiros. Estudos sugerem que cada uma dessas formas contribui de alguma maneira para a virulência de *C. albicans* sobre os tecidos do hospedeiro (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010).

*Cryptococcus neoformans* é um basidiomiceto pertencente ao gênero *Filobasidiella*. Apresenta-se como levedura haploide, capsulada e ovalada, medindo cerca de 3 a 8 µm de diâmetro, com brotamento único ou múltiplo a partir de qualquer ponto da parede celular. Apresenta em sua estrutura microbiológica, uma cápsula de



polissacarídeos que lhe confere antigenicidade. Essa cápsula polissacarídea é considerada o fator de maior virulência do fungo e atua na resistência à fagocitose mediada por macrófagos, neutrófilos e monócitos interferindo assim, na resposta imunológica do hospedeiro (PEREIRA e BARROS, 2013; LEAL, 2006). É o agente etiológico da criptococose que é uma infecção fúngica, predominantemente oportunista e com uma distribuição epidemiológica mundial (SILVA, 2010).

*Aspergillus fumigatus* é um fungo saprofítico de grande importância ambiental por ser um agente cicladador de carbono e nitrogênio. Pode ser encontrado em todas as regiões do mundo e acredita-se que seu habitat natural seja o solo, onde o fungo sobrevive e cresce em vegetais em decomposição. É um ascomiceto que devido a disseminação da AIDS, bem como desenvolvimento de novos antimicrobianos imunossupressores deixou de ser apenas um fungo saprofítico e se tornou um dos principais agentes patogênicos. Essa espécie apresenta hifas hialinas e septadas com paredes paralelas. As cabeças conidiais apresentam aspecto de vesículas em forma de frasco, com uma série de fiáides uniseriadas. Ele é um fungo termófilo e pode crescer em temperaturas superiores a 55°C sendo essa uma característica importante para diferenciação de outras espécies (SORIANI, 2006).

#### 1.5 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM FASE PRÉ-CLÍNICA

Diversas razões justificam a necessidade urgente por novos agentes antimicrobianos: doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortalidade do mundo; altas taxas de resistência microbiana, especialmente em ambientes hospitalares; o decréscimo constante observado no número total de novos agentes antimicrobianos aprovados pelo FDA; a necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes aos antimicrobianos em uso (GUIMARÃES et. al., 2010).

Muitos peptídeos já estão presentes no balcão de medicamentos e em alimentos. Polimixina B está presente em cremes de uso tópico e pomadas para o olho enquanto nisina tem sido utilizada como um conservante de alimentos desde os anos 1960 (HULL et. al., 2012).

A partir de 2000, poucos antibióticos foram introduzidos para a terapêutica antimicrobiana. Em 2001, apenas um antibiótico de origem sintética da classe das

oxazolidinonas foi introduzido no mercado farmacêutico, a linezolida. Os programas de descoberta de antibióticos de fontes naturais têm sido retomados em algumas indústrias farmacêuticas, levando à aprovação do lipodepsipeptídeo natural, a daptomicina (isolado de *Streptomyces roseosporus*<sup>1,44</sup>) pelo FDA em 2003 (GUIMARÃES et. al., 2010; LANNES, 2010). O derivado semi-sintético glicopeptídico dalbavancina encontra-se em fase III de triagens clínicas pelo FDA (GUIMARÃES, 2010).

A empresa The Oragenics realiza testes pré-clínicos extensivamente, sendo seu objeto de estudo o lantibiótico mutacina MU1140 isolado de *Streptococcus mutans*. Esse peptídeo tem demonstrado atividade contra uma grande variedade de bactérias patogênicas gram-positivas, incluindo o MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina), VRE (*Enterococos* resistente a vancomicina), *Mycobacterium tuberculosis* e do antraz. Para os ensaios completos, a empresa criou a variação sintética MU1140-S (LÓPEZ-MEZA, 2011).

Outra empresa farmacêutica, a AMP Therapeutics, trabalha no desenvolvimento de novos medicamentos baseados em peptídeos antibióticos para o tratamento de infecções graves, particularmente aquelas causadas por bactérias multi-resistentes gram-negativas. Com base nos compostos progenitores isolados do mel de abelha e do inseto de serralha, estruturas análogas foram concebidas e testadas *in vivo* e *in vitro* para determinar propriedades importantes para o desenvolvimento farmacêutico. Testes preliminares apresentam valores de CIM baixos contra os principais patógenos gram-negativos, incluindo as estirpes multi-resistentes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. O composto está sendo adequado por testes de toxicidade para garantir a segurança durante a primeira fase dos testes pré-clínicos (AMPTerapeutics, 2013). Outros peptídeos em fase de testes pré-clínicos estão relacionado na tabela abaixo.

**Quadro 1:** Peptídeos antimicrobianos em fase de desenvolvimento clínico

Peptídeo	Origem	Estágio de desenvolvimento	Atividade	Resultados dos testes
<b>D2A21</b>	Análogo cecropina	Fase I de testes	Tratamento de infecções em feridas	Eficiente para prevenção de feridas de queimadura
<b>Defensinas de insetos (ETD 151)</b>	Derivado de heliomicina	Testes pré-clínicos	Tratamento de infecções fúngicas	Resultados promissores
<b>Defensinas de insetos</b>	Defensinas de libélula	Testes pré-clínicos	Tratamento de infecções por bactérias gram-positivas	
<b>Pexiganan</b>	Derivado sintético magainina	Fase III de testes	Infecções patogênicas de úlceras do pé diabético	Droga foi recusada a aprovação da FDA, uma vez que não foi mais eficaz que antibióticos convencionais
<b>Insegran</b>	Protegrinas	Abandonado	Infecções bacterianas	Falhou em mostrar resultados promissores
<b>Olmiganan</b>	Análogo sintético da indolicidina	Fase III de testes	Atividade contra bactérias e fungos	Falhou na prevenção de infecções, mas foi capaz de diminuir os casos de colonização por bactérias de cateteres.
<b>MBI 594AN</b>	Peptídeo baseado em catelisdina	Fase II de testes	Tratamento de acne	Altamente eficaz na redução da inflamação e a formação de lesões

Fonte: Hull, 2012

Há uma diversidade de métodos de laboratório que podem ser usados para medir a sensibilidade *in vitro* dos microrganismos aos agentes antimicrobianos. Os métodos de diluição em caldo ou ágar são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano. Para realizar o teste, preparam-se vários tubos de ensaio ou placas com meio caldo ou ágar, aos quais são acrescentadas diversas concentrações dos agentes antimicrobianos. A seguir, os tubos ou as placas são inoculados com uma suspensão padrão do organismo a ser testado (ZASLOFF,2002). Após incubação por 24 horas, examinam-se os testes e determina-se a concentração inibitória mínima (CIM), sendo esta a menor

concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo (FRENCH, 2006; ANVISA, 2003).

Tendo em vista a riqueza de informações e grande aplicabilidade biotecnológica que pode ser conseguida com exploração dos compostos bioativos presentes nos produtos naturais, e a necessidade de se descobrir novos antimicrobianos eficientes e sem alta toxicidade e efeitos colaterais para o hospedeiro, o estudo da ação desses peptídeos torna-se útil e necessário principalmente com foco no desenvolvimento farmacêutico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana do peptídeo sintético des His16-LyeTx1.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar o peptídeo sintético des-His16-LyeTx I utilizando técnica de cromatografia de fase reversa em sistema HPLC.
- Identificar o efeito bactericida ou bacteriostático do agente antimicrobiano;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo e a concentração bactericida mínima (CBM) peptídeo contra bactérias aeróbias e anaeróbias;
- Determinar a CIM e a concentração fungicida mínima (CFM) do peptídeo contra fungos e leveduras.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 PURIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO

O peptídeo des-His16-LyeTx I foi sintetizado utilizando-se a metodologia Fmoc/t-butila de síntese manual, em suporte sólido. Este peptídeo foi sintetizado com os resíduos *N* e *C*-terminais protegidos por acetilação e amidação, respectivamente<sup>16</sup>. A purificação foi realizada, inicialmente, por cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC), empregando-se coluna Source™ 15 RPC ST4.6/100. Para repurificação, utilizou-se coluna  $\mu$ RPC C2/C18 ST 4.6/100, ambas com emprego de gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila. Após análise em espectrômetro de massa e identificação das alíquotas com o peptídeo de interesse, o produto final da purificação foi liofilizado para utilização nas análises microbiológicas.

#### 3.2 LINHAGENS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para os testes foram utilizados os seguintes microrganismos listados abaixo:

**Quadro 2:** Microrganismos utilizados durante os experimentos

Microrganismo	Número de referência
<b>Bactérias aeróbias</b>	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12223
<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	ATCC 27853
<b>Bactérias anaeróbias</b>	
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	ATCC 25286
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC 27337
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC 6919

Fungos	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC 16913
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC 90112
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> :	Pb01, Pb 18 e B339

**Fonte:** Dados do autor

As amostras bacterianas vêm sendo mantidas pelo Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, da Universidade Federal de Minas Gerais em freezer -86°C, em meio Brucella Broth acrescido de glicerol 10%.

Ao descongelarem-se as amostras para os testes, as bactérias aeróbias, foram cultivadas em Ágar Triptona de Soja (TSA), por 24 h, a 37°C. As amostras anaeróbias foram cultivadas em Brucella Agar, suplementado com hemim e vitamina K1 por 48 horas, a 37°C, mantidas as condições de crescimento ótimas de anaerobiose, em ambiente específico.

As amostras fúngicas têm sido mantidas pelo laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro da Universidade Federal de Minas Gerais. As cepas de *C. neoformans* e *C. albicans* são mantidas em ágar sabouraud sendo repicadas periodicamente para manter a cultura jovem. Para os testes, as amostras foram repicadas com 48 horas de antecedência e crescidas a 37°C. Para *P. brasiliensis* o meio de manutenção e crescimento é o YPD. Como é um fungo de crescimento fastidioso, a amostra foi preparada com sete dias de antecedência com relação ao teste e o crescimento também foi a 37°C.

### 3.3 MÉTODO DE CRESCIMENTO E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Para padronizar a densidade do inóculo bacteriano para o teste de sensibilidade, utilizou-se um controle de turbidez para solução padrão McFarland de 0,5. O inóculo foi preparado selecionando-se, pelo menos, de três a cinco colônias, bem isoladas, do mesmo tipo morfológico de cultura em placa de TSA para espécies aeróbicas e Brucella, para anaeróbicas. Tocou-se o topo de cada colônia com uma alça,

transferindo-se os microrganismos para um tubo contendo 5mL de solução salina 0,9%.

O ajuste da cultura foi feito de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão McFarland de 0,5 resultando numa suspensão contendo aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/mL (unidade formadora de colônia por mL) do microrganismo a ser utilizado no teste. A avaliação foi feita a olho nu comparando-se o tubo de inóculo e a solução padrão contra um cartão de fundo branco e linhas contrastantes azuis. Após as diluições iniciais, no momento do teste com o peptídeo e o microrganismo de interesse, a diluição das bactérias era de aproximadamente  $1 \times 10^5$  UFC/mL para os testes realizados com bactérias aeróbicas e  $1 \times 10^7$  UFC/mL para os testes realizados com bactérias anaeróbicas.

A padronização para os testes com fungos foi feita de acordo com os protocolos internacionalmente utilizados (ANVISA, 2002 (A); ANVISA, 2002 (B); CLSI, 2008 (A); CLSI, 2008 (B)) para amostras de *C. neoformans* e *C. albicans* e *A.fumigatus*. Para o teste com *P. brasiliensis*, a padronização ocorreu segundo descrito por R.C Cruz e colaboradores (CRUZ et. al., 2013). Basicamente o processo consiste em transferir colônias isoladas das culturas previamente preparadas para tubos contendo solução salina para que a densidade celular fosse ajustada com espectrofotômetro. Para as leituras acrescentava-se solução salina suficiente para obter a transmitância ideal de cada espécie, sendo a leitura feita a 530 nm. A absorbância esperada para amostras de *C. neoformans* e *C. albicans* varia entre 70-75%, para *P. brasiliensis* a leitura era de 70% de absorbância e para *A. fumigatus* 75-77%. Essas leituras proporcionam ao volume final de amostra uma quantidade estimada de  $1-5 \times 10^6$  células por tubo para amostras de *C. neoformans* e *C. albicans* e *P. brasiliensis*. Para amostras de *A.fumigatus* tem-se uma quantidade estimada de  $1,5 \times 10^4$ .



### 3.4 AVALIAÇÃO DA CIM, CBM E CFM DO PEPTÍDEO COM OS MICRORGANISMOS

**Quadro 3:** Concentração da solução do peptídeo utilizada no teste para cálculo da CIM, CBM e CFM

Microrganismo	Faixa de concentração do peptídeo usada no teste
<b>Bactérias aeróbias</b>	
<i>Escherichia coli</i>	0,5 – 128 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5 – 128 µg/mL
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,5 – 128 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	0,5 – 128 µg/mL
<b>Bactérias anaeróbias</b>	
<i>Bacteroides fragilis</i>	1 – 128 µg/mL
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	1 – 128 µg/mL
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1 – 128 µg/mL
<i>Propionibacterium acnes</i>	1 – 128 µg/mL
<b>Fungos</b>	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,125 - 64 µg/mL
<i>Candida albicans</i>	0,25 – 128 µg/mL
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,25 – 128 µg/mL
<i>Paracoccidioides brasiliensis:</i>	0,0039 – 2 µg/mL

**Fonte:** Dados do autor

As concentrações do peptídeo e as diretrizes gerais para execução dos testes foram escolhidas avaliando-se as determinações contidas no CLSI para avaliação das amostras de referência quando os testes são feitos com os antimicrobianos de escolha para o tratamento (ANVISA, 2002 (A); ANVISA, 2002 (B); ANVISA, 2003; CLSI, 2008 (A); CLSI, 2008 (B)).

A avaliação da CIM do peptídeo des-His16-LyeTx I foi realizada por microdiluição, empregando-se concentrações do peptídeo que variaram de 0,0039 µg/mL a 128 µg/mL. Para o teste, foram utilizadas placas de acrílico esterilizadas com 96 poços com tampa. Em cada poço, foram dispensados 100 µL da solução do peptídeo LyeTx I e 100 µL do inóculo de cada amostra de cada espécie, perfazendo um volume final de 200 µL. Em cada experimento, foram utilizados controles, onde

tinham-se poços com meio de cultura na ausência do peptídeo e na presença do microrganismo, assim como aqueles contendo apenas o meio de cultura, o peptídeo e solução salina estéril substituindo o inóculo para garantir a esterilidade da solução que continha o peptídeo. Após o período de incubação que variou de acordo com o microrganismo, a leitura foi realizada por observação de turvação decorrente da multiplicação do microrganismo, considerando-se como CIM a menor concentração do peptídeo que inibiu o crescimento. A quantidade de crescimento nos poços contendo o agente antimicrobiano foi comparada com a quantidade de crescimento nos poços de controle de crescimento (sem o agente), usada em cada conjunto de testes para determinar os pontos finais de crescimento.

Para bactérias aeróbias o teste foi feito em Caldo Mueller Hinton, utilizando-se inóculo bacteriano de  $10^5$  UFC/poço incubadas a  $35^\circ\text{C}$  por 24 horas. Para bactérias anaeróbias a análise foi feita em Caldo Brucella, com inóculo bacteriano de  $10^7$  UFC/poço. Neste caso a placa foi incubada em ambiente anaeróbio, onde jarras específicas passaram por tratamento especial a vácuo para retirada do oxigênio, lavagem por duas vezes consecutivas com nitrogênio e climatizada com uma mistura de nitrogênio e gás carbônico para garantir a atmosfera ótima de crescimento dos microrganismos. A leitura foi feita após 48 horas de incubação a  $37^\circ\text{C}$ . Para fungos filamentosos e utilizou-se meio RPMI 1640, com inóculo a uma concentração de  $10^3$  UFC/poço. O tempo de incubação e a temperatura variaram de acordo com as necessidades especiais de cada microrganismo.

Para determinação da CBM do peptídeo, que é a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de reduzir a contagem de microrganismos em 99,9%, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  dos poços da microplaca utilizada para avaliação da CIM, nos quais não foi detectado crescimento, utilizando um meio equivalente de acordo com o microrganismo testado. Bactérias aeróbias foram cultivadas em TSA. Como controle positivo, empregou-se cultura de cada bactéria na diluição  $10^{-8}$ . Bactérias anaeróbias foram cultivadas em meio Brucella. Como controle positivo, empregou-se cultura de cada bactéria na diluição  $10^{-5}$ . Para determinação da CFM do peptídeo, alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  dos poços da microplaca utilizada para avaliação da CIM nos quais não foi detectado crescimento foram cultivadas em meio sabouraud. A avaliação do efeito fungicida ou fungistático é feita pela observação da continuidade do crescimento nos pontos de inoculação da concentração referente ao MIC e duas concentrações acima.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o processo de purificação inicialmente utilizou-se a coluna Source RPC, porém contaminantes podem ser observados junto com o peptídeo de interesse. Para garantir o alto grau de pureza da amostra, foi feita uma re-purificação empregando-se a coluna c2/c18 que garantiu o resultado esperado.

Como produto da purificação foram obtidos 14 mg do peptídeo com alto grau de pureza. Análise da massa do mesmo foi determinada em espectrômetro de massa Maldi Tof (Bruker Daltonics) sendo de 2,738 kd.

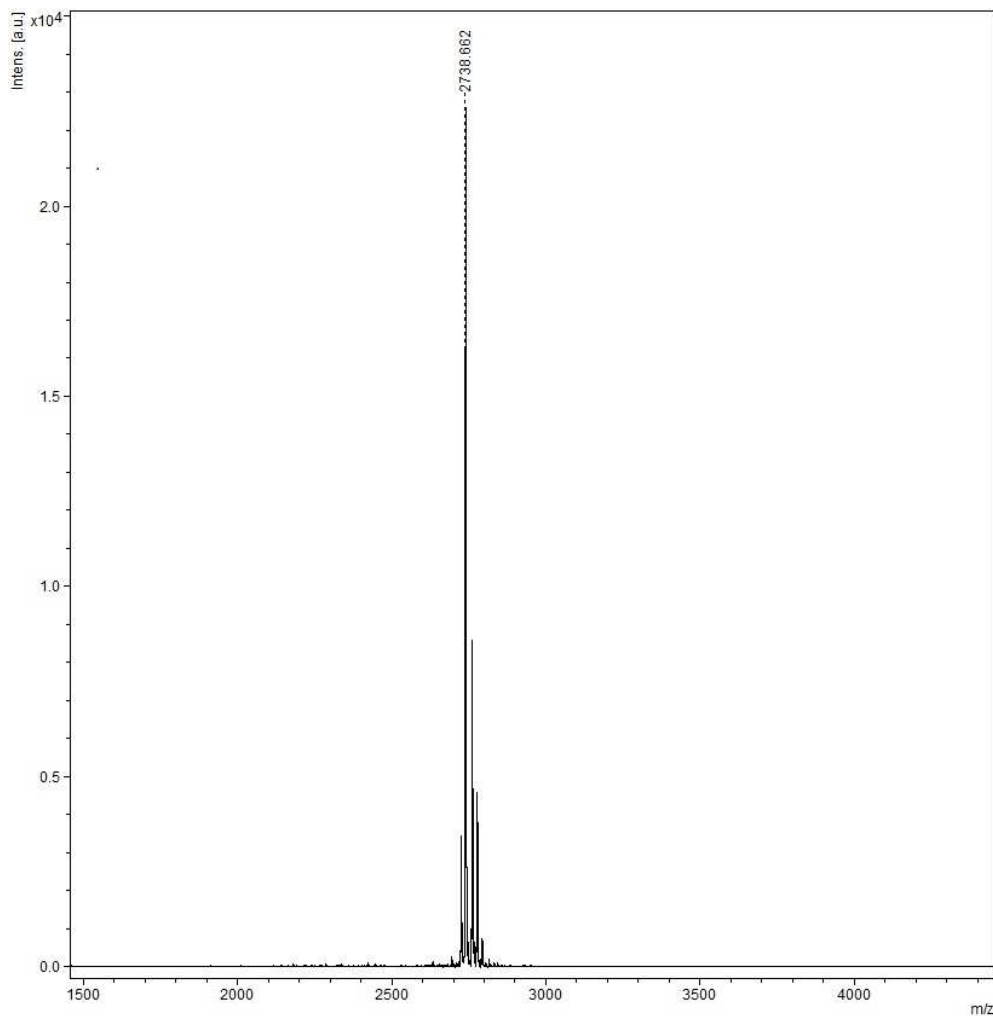


Figura1.: Espectrometria de massa do peptídeo sintético des-His16-LyeTx I.

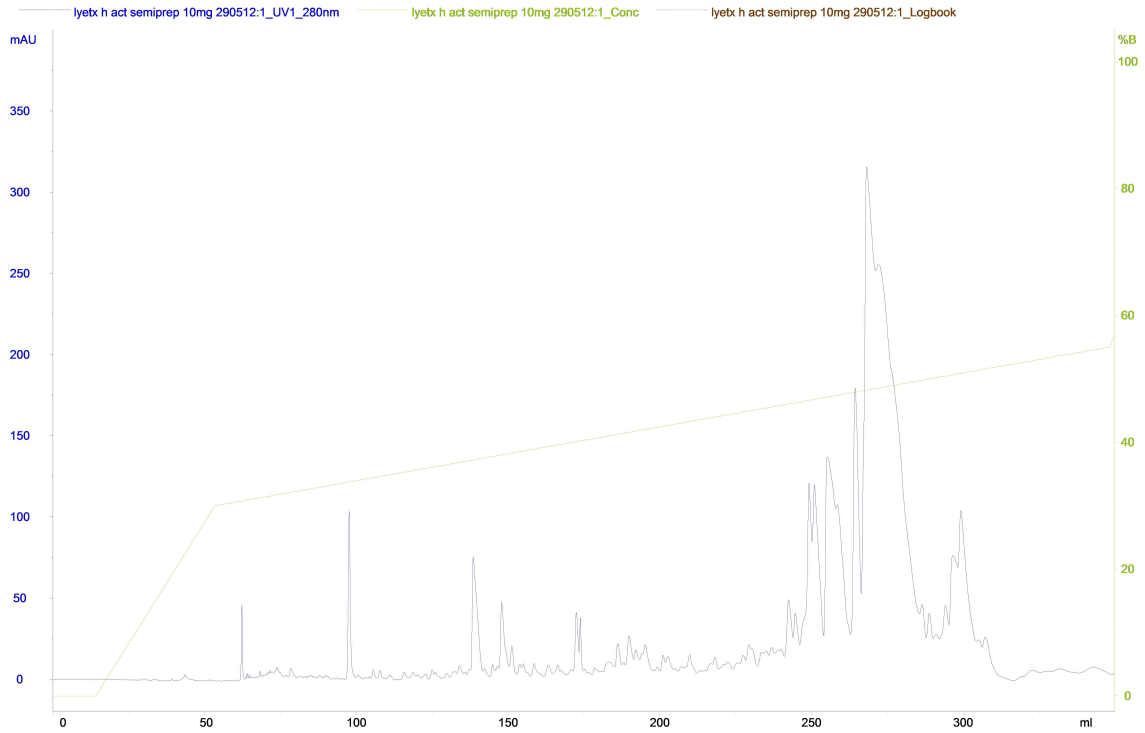


Figura.2: Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC do peptídeo des-His16-LyeTx I. Coluna SourceTM 15 RPC ST4.6/100, equilibrada com água Milli-Q 0,1% TFA (em volume) eluído com um gradiente linear de 0,1 % (em volume) TFA em acetonitrila

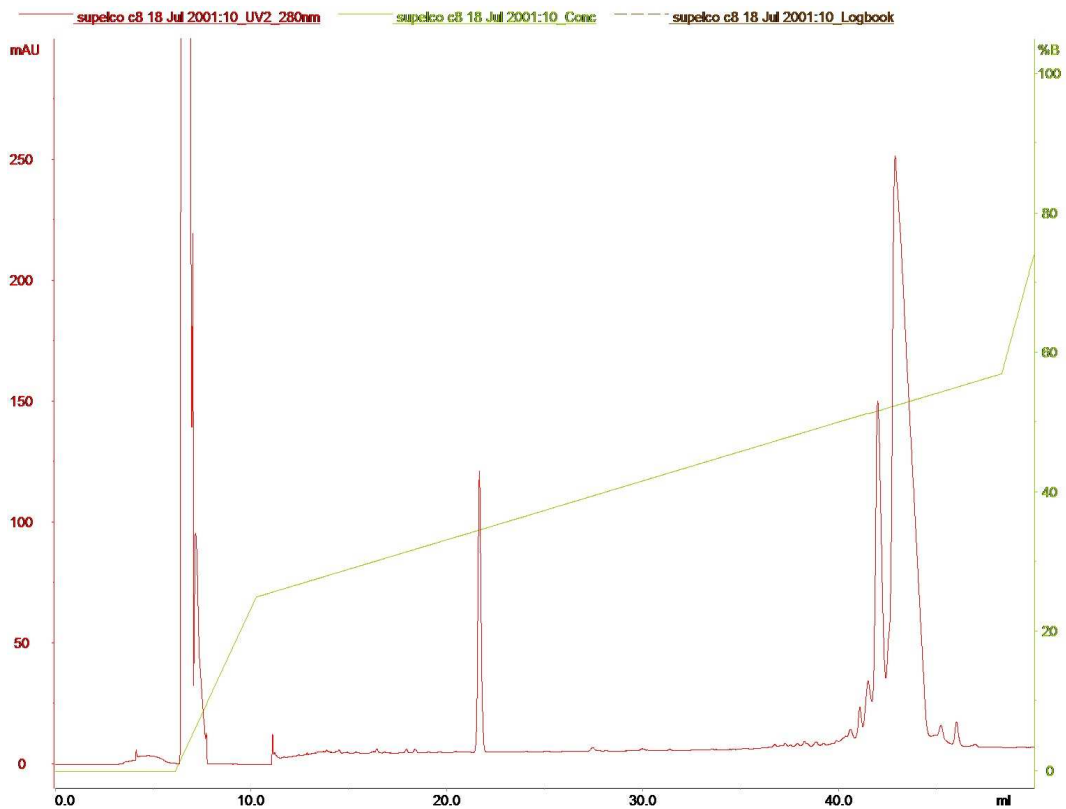


Figura.3: Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC do peptídeo des-His16-LyeTx I. Coluna µRPC C2/C18 ST 4.6/100, equilibrada com água Milli-Q 0,1% TFA (em volume) eluído com um gradiente linear de 0,1 % (em volume) TFA em acetonitrila.

Para a análise da atividade da ação do peptídeo sobre os microrganismos testados tem-se:

**Tabela 1:** Valores de CIM encontrados para cada microrganismo avaliado

<b>Microrganismo</b>	<b>Valor CIM</b>	<b>Valor CIM em <math>\mu\text{mol L}^{-1}</math></b>
<i>S. aureus</i>	4 $\mu\text{g/mL}$	1,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$
<i>S. epidermidis</i>	4 $\mu\text{g/mL}$	1,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$
<i>Propionibacterium acnes</i>	4 $\mu\text{g/mL}$	1,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$
<i>E. coli</i>	8 $\mu\text{g/mL}$	2,92 $\mu\text{mol L}^{-1}$
<i>P. aeruginosa</i>	8 $\mu\text{g/mL}$	2,92 $\mu\text{mol L}^{-1}$
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	8 $\mu\text{g/mL}$	2,92 $\mu\text{mol L}^{-1}$
<i>Bacteroides fragilis</i>	16 $\mu\text{g/mL}$	5,84 $\mu\text{mol L}^{-1}$
<i>C. neoformans</i>	16 $\mu\text{g/mL}$	5,84 $\mu\text{mol L}^{-1}$
<i>C. albicans</i>	64 $\mu\text{g/mL}$	23,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$
<i>A. fumigatus</i>	64 $\mu\text{g/mL}$	23,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Não reativo	-x-
<i>P. brasiliensis</i>	Não reativo	-x-

**Fonte:** dados do autor

Para os microrganismos reagentes observou-se equivalência entre os valores de CIM e CBM, o que demonstra atividade bactericida do peptídeo des-His16-LyeTx I. Para *F. necrophorum* o peptídeo não apresentou atividade nas concentrações testadas.

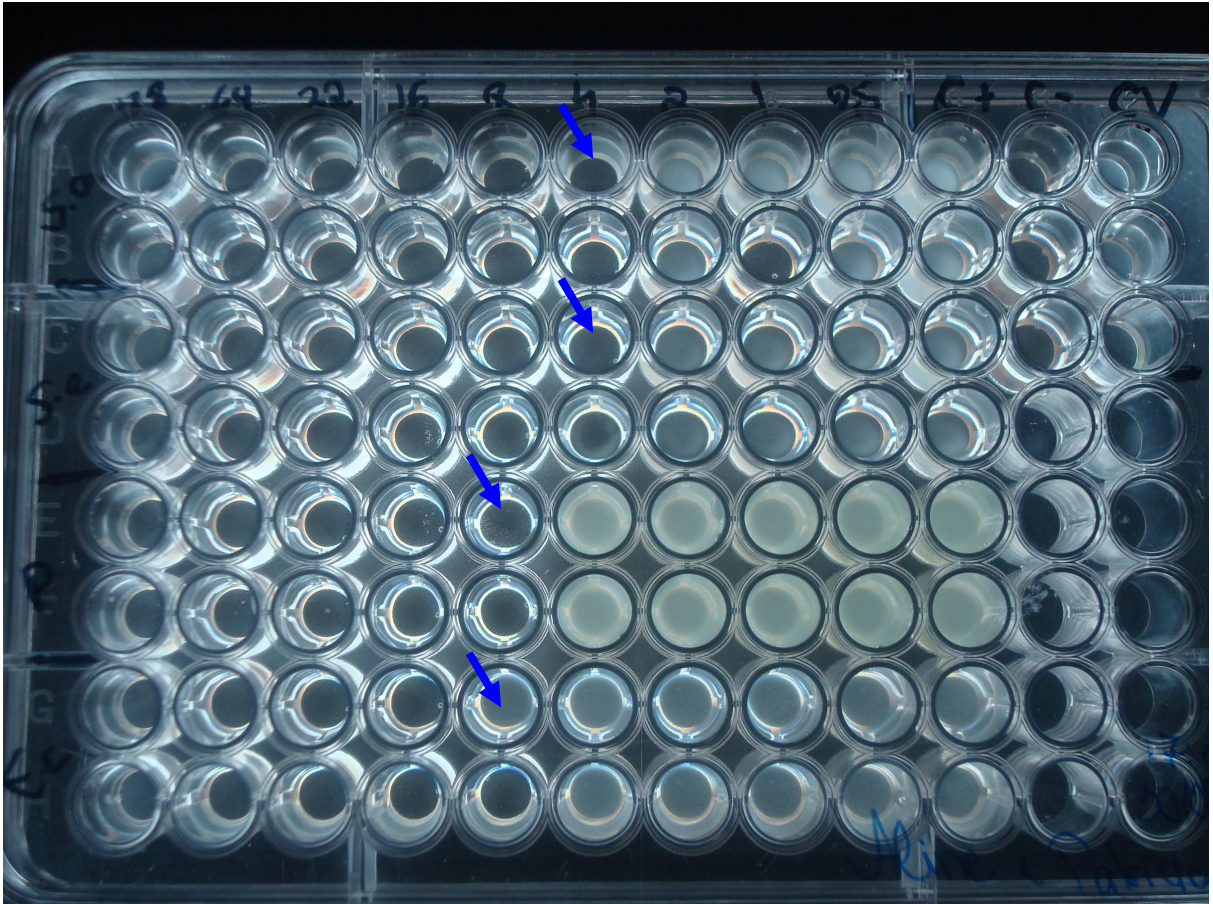


Figura 4: Microplaca com diluições referente ao teste em duplicata com bactérias aeróbias. Na placa A-B *S. aureus*; C-D: *S. epidermidis*; E-F: *P. aeruginosa*; G-H: *E. coli*. Nos poços 1 a 9 experimento com diferentes diluições que variaram entre 128 $\mu$ g/mL (poço1) a 0,5  $\mu$ g/mL (poço9). Os poços 10 e 11 são referentes aos controles positivo e negativo, respectivamente, e o poço 12 se refere ao controle do peptídeo.



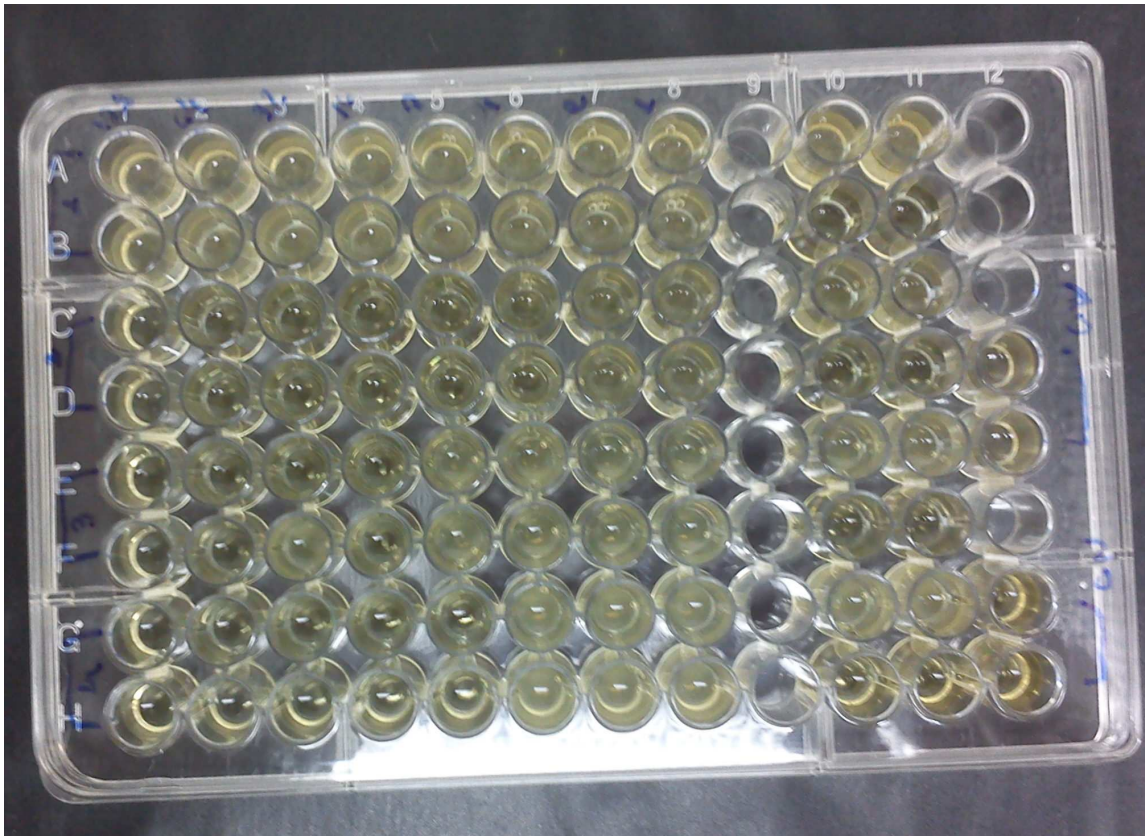


Figura 5: Microplaca com diluições referente ao teste em duplicata com bactérias anaeróbias. Na placa A-B *F. necroforum*; C-D: *p. acnes*; E-F: *B. fragilis*; G-H: *P. anaerobius*. Nos poços 1 a 9 experimento com diferentes diluições que variaram entre 128 $\mu$ g/mL (poço1) a 1  $\mu$ g/mL (poço8). Os poços 10 e 11 são referentes aos controles positivo e negativo, respectivamente, e o poço 12 se refere ao controle do peptídeo.

Nos testes onde foi possível averiguar o efeito fungicida e fungistático do peptídeo, os resultados sugerem ação fungicida para *C. neoformans* e *C. albicans*. O teste com *C. neoformans* foi realizado duas vezes para confirmação dos resultados. Com o MIC inicialmente determinado a 8  $\mu$ g/mL o segundo teste demonstrou uma característica que não era totalmente fungistática, uma vez que não ocorria crescimento pontual em todas as concentrações, mas também não poderia ser considerado fungicida já que no spot da concentração relativa ao MIC pode se observar crescimento do fungo. Realizando o teste com a concentração de 16  $\mu$ g/mL o resultado da análise sugere efeito fungicida do peptídeo contra essa amostra. Esse conjunto de resultados leva a crer que o MIC poderia ser um terceiro valor entre as duas faixas avaliadas nos experimentos. Para o teste realizado com *A. fumigatus* o resultado da avaliação da placa do MIC sugere efeito fungistático uma vez que na concentração de 64  $\mu$ g/mL houve uma redução de mais de 80% no crescimento com relação a concentração anterior. Essa leitura é indicativa deste efeito.

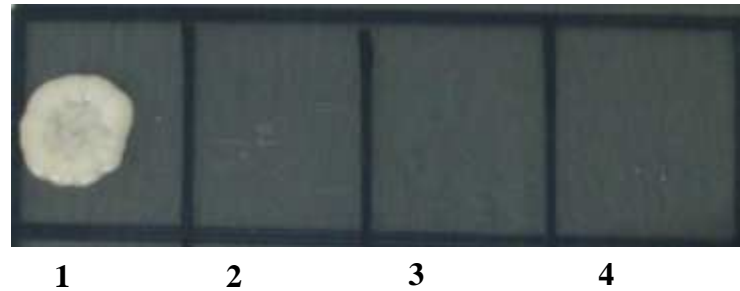


Figura 6: Análise da atividade fungicida do peptídeo des-His16-LyeTx I contra *C. albicans*. Após ensaio de determinação de CIM, um volume de 10  $\mu\text{L}$  da amostra de *C. albicans* proveniente do orifício controle (1), do orifício correspondente ao valor da CIM (2) e dos orifícios correspondentes a 2 concentrações acima do valor da CIM (3 e 4) foram inoculadas em ágar Sabouraud e incubadas em 37°C durante 48 hs. A ausência de crescimento observada em 2, 3 e 4 sugere atividade fungicida da fração do veneno na amostra microbiana.

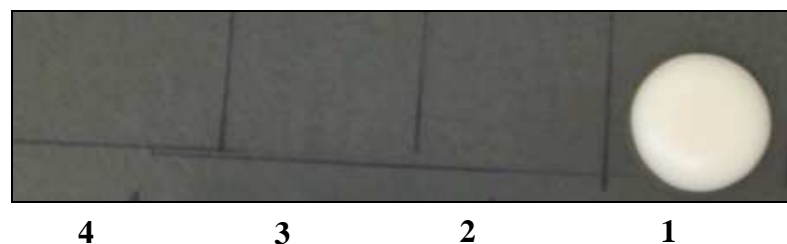


Figura 7: Análise da atividade fungicida do peptídeo des-His16-LyeTx I contra *C. neoformans*. Após ensaio de determinação de CIM, um volume de 10  $\mu\text{L}$  da amostra de *C. neoformans* proveniente do orifício controle (1), do orifício correspondente ao valor da CIM (2) e dos orifícios correspondentes a 2 concentrações acima do valor da CIM (3 e 4) foram inoculadas em ágar Sabouraud e incubadas em 37°C durante 72 hs. A ausência de crescimento observada em 2, 3 e 4 sugere atividade fungicida da fração do veneno na amostra microbiana.

Nos primeiros estudos do grupo com o peptídeo obtido da aranha *L. erythrognatha* foram observados valores de MIC de 3,79  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para *S. aureus*, 7,81  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para *E. coli* e 13,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  *Cryptococcus neoformans* (SANTOS, 2009). Com o peptídeo sintético des-His16-LyeTx I os valores para esses mesmos microrganismos foram de 1,46  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 2,92  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 5,84  $\mu\text{mol L}^{-1}$  respectivamente. Pode-se observar que houve uma redução de no mínimo 55,3% nos valores das concentrações ao comparar os dois peptídeos.



Outros estudos envolvendo 3 peptídeos encontrados na glândula de veneno de outra espécie do gênero *Lycosa*, *Lycosa singoriensis* também apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas *S.aureus*, *Bacillus subtilis*, gram-negativas (*E.coli*, *P.aeruginosa*) e *C.albicans* em concentrações micromolares (BUNDIK, 2004; DAMPD, 2013).

Ainda em estudos envolvendo espécies do mesmo gênero, um grupo de pesquisadores americanos, trabalhando com o veneno de *L. carolinensis* relatou inibição do crescimento de *E. coli* e *Candida glabrata* também em concentrações micromolares, além de ser letal para larvas de lepidópteros. Esse peptídeo ainda é capaz de formar poros que permeabilizam a membrana celular. Ainda promove o efluxo de cálcio dos sinaptosomas e causa hemólise (YAN e ADAMS, 1998; DAMPD, 2013).

Uma análise mais profunda do banco de dados DAMP revela inúmeros peptídeos animais avaliados com efeito inibidores de crescimento para as mais diversas espécies de microrganismos, entre bactérias, fungos, leveduras, protozoários, insetos. Os resultados demonstram algum tipo de ação dos peptídeos em diferentes concentrações que variam de acordo com o peptídeo e a espécie alvo (DAMPD, 2013).

Outros estudos como o de Silva Junior et. al, 2000, que purificou e caracterizou quatro moléculas presentes na hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana* demonstram que os peptídeos theraphosinina apresenta atividade anti-*Micrococcus luteus* e não apresenta similaridade com outros peptídeos; mygalomorphina, um peptídeo com atividade anti *E. coli*; gomesina, que apresenta amplo espectro de atividade contra bactérias, leveduras, fungos e Leishmania, acanthoscurrina um peptídeo com atividade contra *E. coli* e *C. albicans* e ainda apresenta grande similaridade com proteínas antifúngicas de insetos e proteínas relacionadas com a defesa em plantas. No geral a gomesina mostrou forte ação antimicrobiana contra 14 bactérias gram-positivas, 10 bactérias gram-negativas, 9 fungos filamentosos e 5 leveduras (DAFRE et. al., 2001, SILVA JR et. al., 2000).

Esse mesmo grupo de pesquisa investigou a produção de peptídeos antimicrobianos em outro aracnídeo, o carrapato de boi *Boophilus microplus*. O peptídeo foi inicialmente isolado do intestino do carrapato sendo que, para determinação do espectro de ação, o mesmo foi quimicamente sintetizado e após caracterização, foi testado contra várias cepas de bactérias e de fungos. Observou-se que o peptídeo

age em concentrações micromolares apenas contra bactérias gram-positivas e contra fungos, não tendo sido ativo contra bactérias gram-negativas. Verificou-se também que esse peptídeo que é um fragmento da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina apresenta atividade hemolítica (DAFRE et. al., 2001).

Outra atividade avaliada por diversos grupos de pesquisa envolvem a ação antiviral dos peptídeos. Os espectros de vírus que são afetados compreendem principalmente vírus envelopados de RNA e DNA, com a exceção do adenovírus não envelopado, calicivírus felino e echovírus 6. A atividade antiviral parece estar relacionada com o processo de adsorção, que é um resultado de um efeito direto sobre o envelope viral. Análogos sintéticos de diversos peptídeos antimicrobianos que ocorrem naturalmente têm sido feitos, na tentativa de identificar características estruturais importantes que contribuem para a esta atividade (JENSSEN, 2006).

Um exemplo disso envolve o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), que tem se mostrado capaz de sofrer mutações rapidamente criando resistência contra medicamentos anti-retrovirais. Nesse caso, o foco da prospecção de peptídeos desenvolve-se com base em proteínas celulares do hospedeiro, uma vez que esse é um caminho que apresenta menor possibilidade de desenvolver resistência. A proteína CypA, do hospedeiro, com um papel essencial no início da replicação do ciclo do HIV-1 foi identificada como um possível alvo para intervenção. Essa proteína, um membro das imunofilinas, liga-se especificamente para a poliproteína Gag viral. Esta interação é essencial para a replicação viral e a inibição prejudica esse processo. As ciclosporinas, conhecidas pela sua atividade imunossupressora, podem ligar-se a CypA, com um efeito anti-HIV-1 resultante (OYSTON et. al., 2009). Ainda com relação aos efeitos contra vírus, a lactoferina bovina demonstrou uma atividade contra o citomegalovírus humano e vírus do papiloma humano. A lactoferina também apresentou atividade anti-HIV, podendo esta ação se relacionar às ligações de sulfeto de heparano (JENSSEN, 2006).

Peptídeos antimicrobianos têm sido isolados a partir de uma vasta gama de espécies de vertebrados, incluindo os peixes, anfíbios, e mamíferos, o que indica que, mesmo na presença de uma resposta imune adaptativa, estes peptídeos têm um papel importante na defesa do hospedeiro. Glândulas da pele de anfíbios têm provado ser uma rica fonte de peptídeos antimicrobianos, com cerca de 500 destes, descritos até a data, desta fonte. As atividades antibacteriana e antifúngica, de

peptídeos isoladas a partir da pele de sapos Sul-Americanos, também têm sido amplamente estudados (JENSSEN, 2006).

Infecções graves muitas vezes não são curadas somente com drogas antimicrobianas, normalmente requerem a drenagem ou remoção de material infectado e um sistema imunitário competente. No entanto, a terapia antimicrobiana é muitas vezes essencial para a cura rápida por erradicar ou reduzir a carga do microrganismo (MAKRANTONAKI, et. al., 2011).

Alguns agentes antimicrobianos estão associados com o surgimento de resistência durante cursos prolongados de terapia. Assim, isolados inicialmente sensíveis podem se tornar resistentes nos três ou quatro primeiros dias após o início da terapia (CHARTONE-SOUSA, 1998). Esse fato justificaria a utilização de outros compostos para o tratamento das doenças em questão. Nesse quesito a utilização de antimicrobianos provenientes de peptídeos naturais seria uma opção mesmo que os valores de inibição de crescimento sejam maiores que os das drogas de escolha inicialmente para o tratamento.

O estudo dos PAMs e de seu potencial antimicrobiano foi enormemente motivado pela disseminação da resistência múltipla aos medicamentos disponíveis (PRATES e JÚNIOR, 2000). As dificuldades em descobrir e lançar novos produtos no mercado e de modificar os já existentes são muitas, envolvendo desde os altos investimentos necessários até o tempo decorrido entre as pesquisas, os testes clínicos e a disponibilidade comercial (WANG et. al., 2012). Desta forma, a identificação de agentes terapêuticos alternativos é de grande relevância. Considerando a problemática dos altos custos de produção desses peptídeos, ao considerar que a estrutura do peptídeo objeto desse estudo é relativamente pequena, o processo de síntese torna-se mais econômico. Além do mais, o fato do peptídeo ser acetilado dificulta o ataque por aminopeptidases, que o torna mais resistente.

Os PAMs constituem um grupo de substâncias naturais com espectro de atividade e mecanismos de ação complexos (ISOFORLAB, 2013). A relevância clínica destas moléculas tem sido cada vez mais reconhecida, especialmente em decorrência das crescentes taxas de resistência dos microrganismos aos antimicrobianos clássicos (VIZZOTO, 2009).

A possibilidade de substituição dos medicamentos clássicos por estas substâncias favoreceria, a longo prazo, o restabelecimento da atividade de antimicrobianos considerados, atualmente, pouco eficazes, em decorrência da resistência bacteriana

aos mesmos. O propósito final seria oferecer uma opção de tratamento eficiente e apropriada aos pacientes (NASCIMENTO, 2000).

## 5 CONCLUSÃO

Após todos os experimentos envolvendo o peptídeo objeto de estudo deste trabalho, têm-se que:

- A massa do peptídeo foi determinada, cujo valor é 2,738 kd;
- A purificação do material bruto recebido após a síntese química, permitiu obtenção de 14 mg de material com elevado grau de pureza para análises microbiológicas e outros estudos;
- A CIM foi verificada para as amostras de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *P. anaerobius*: como 8 µg/mL;
- Para *S. aureus* e *S. epidermidis* e *P. acnes*, o valor determinado da CIM foi de 4 µg/mL;
- Nos testes com *B. fragilis* o resultado obtido foi 16 µg/mL;
- Nos experimentos com amostras bacterianas observou-se equivalência entre os valores de CIM e CBM, o que sugere atividade bactericida do peptídeo des-His16-LyeTx I.
- De todas as cepas utilizadas, apenas contra *F. necrophorum* o peptídeo não apresentou atividade bactericida ou bacteriostática, até a concentração de 128 µg/mL;
- Para as amostras fúngicas, os valores encontrados para CIM foram de 16 µg/mL para *C. neoformans*, 64 µg/mL para *C. albicans* e *A. fumigatus* e para *P. brasiliensis* não houve atividade do peptídeo na faixa intervalar testada.

Os dados obtidos, que apontam efeito principalmente inibitório do peptídeo, sobre as bactérias e fungos incluídas no estudo, sugerem seu grande potencial biotecnológico e abre perspectivas para estudos que visem ampliar sua caracterização, inclusive verificando possível toxicidade, ou outros efeitos para o ser humano.

## 6 PERSPECTIVAS

- Avaliar possíveis efeitos de toxicidade do peptídeo des-His16-LyeTx I em células eucarióticas;
- Avaliar possíveis efeitos sinérgicos do peptídeo com medicamentos de referência;
- Verificar, em vesículas lipídicas artificiais (lipossomos), a interação do peptídeo com membranas de diferentes composições;
- Verificar a possível atividade hemolítica do peptídeo.
- Avaliar a possível atividade anti-viral do peptídeo.
- Avaliar a possível atividade anti-tumoral do peptídeo.
- Avaliar a eficiência do peptídeo frente a microrganismos multiresistentes;
- Testar a estabilidade do peptídeo com diferentes concentrações de pH.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA (A). Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada. 2002. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi\\_OPAS1M38-A.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPAS1M38-A.pdf)> Acesso em 08 março 2013.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA (B) Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – Segunda Edição. 2002. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi\\_OPAS1M27-A2.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPAS1M27-A2.pdf)> Acesso em 08 março 2013.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico. 2003. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi\\_OPASM7\\_A6.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM7_A6.pdf)> Acesso em 08 Março 2013.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. Tratamento das principais infecções comunitárias e relacionadas À assistência à saúde e a profilaxia antimicrobiana em cirurgia. 2008. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/atm\\_racional/modulo3/introducao.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo3/introducao.htm)> Acesso em 10 Mar. 2013

AMPTerapeutics. Antimicrobial Peptides from Insects. Disponível em <<http://www.amp-therapeutics.com/technology.html>> Acesso em 08 Março 2013.

BALDINI, R. L. Genes Envolvidos na Patogenicidade da Bactéria: *Pseudomonas aeruginosa*. Disponível em <<http://www2.iq.usp.br/docente/baldini/>> Acesso em 10 março 2013.

BUDNIK, BA. De novo sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolf spider *Lycosa singoriensis*. **Journal of Mass Spectrometry**, v.39, n.2, p. 193-201, Fevereiro 2004.

CARVALHO, A. C. Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos isolados das secreções cutâneas de anuros dos gêneros *Proceratophrys*, *Physalaemus* e *Hypsiboas*. 2011. 147p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal).– Instituto de Ciências Biológicas - Fundação Universitária de Brasília. Brasília 2011.

CHARTONE-SOUZA, E Bactérias ultra-resistentes: uma guerra quase perdida.. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.23, p. 26-35, 1998.

Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (A). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard - third edition. Wayne, Abril 2008, 40 p.

Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (B). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Third information supplement. Wayne, Abril 2008, 28 p.

CRUZ, R. C. et. al. Influence of Different Media, Incubation Times, and Temperatures for Determining the MICs of Seven Antifungal Agents against *Paracoccidioides brasiliensis* by Microdilution. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, n.2. Fevereiro 2013.

DAFFRE, S et. al. Peptídeos Antibióticos: Peptídeos antibióticos produzidos por aracnídeos. **Biociência**, Brasília, v.23, p. 48-55, Novembro/Dezembro 2001.

DAMPD: Dragon Antimicrobial Peptide Database. Disponível em <<http://apps.sanbi.ac.za/dampd/index.php>> Acesso em 11 Março 2013.

FONSECA, A. P. L.O.F.. Adesão de *Staphylococcus epidermidis* a biomateriais poliméricos. 1998.153f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Porto.Faculdade de Ciências. Porto, Novembro 1998.

FRENCH, G. L. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections—the potential role of daptomycin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p. 1107–1117. Outubro 2006.

DE SIMONE, S. G., SOUZA, A. L. A. Peptídeos Microbicidas: Uma alternativa viável para a terapia antimicrobiana. **Biociência**. n. 24, p. 12-16, Janeiro/Fevereiro 2002.

FJELL, C. D., HISS, J. A., HANCOCK, R. E. W., SCHNEIDER, G.. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews**, Estados Unidos, v.11, Janeiro 2012.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, Junho 2010 .

GUIMARAES, D. O; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, 2010

GORDON, Y. J. , ROMANOWSKI, E. G. A Review of Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential as Anti-Infective Drugs. Londres, **Current Eye Research**, n. 30, v.7, p. 505–515, Julho 2005.

HANDLER, M. Z. et al . *Fusobacterium necrophorum* causing infective endocarditis and liver and splenic abscesses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 53, n. 3, June 2011



- HULL, R.; KATETE, R.; NTWASA, M. Therapeutic potential of antimicrobial peptides from insects. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, vol. 7, n.2, Junho 2012.
- JENSSEN, H, HAMILL, P, HANCOCK, R E. W. Peptide Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.3, p. 491–511. Julho 2006.
- KASNOWSKI, M. C. *Listeria spp., Escherichia coli*: Isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída. 2004. 111f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Fluminense. Faculdade de Veterinária. Rio de Janeiro, 2004.
- KÖNÖNEN, E, , BRYK, A. , NIEMI, P. , KANERVO-NORDSTRÖM, A. Antimicrobial Susceptibilities of *Peptostreptococcus anaerobius* and the Newly Described *Peptostreptococcus stomatis* Isolated from Various Human Sources. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v.51, n.5, p. 2205-2207, Junho 2007.
- LANNES, A. C.. Cepas Bacterianas: suscetibilidade a derivados da classe acilhidrazona em amostras do Hospital Universitário Antônio Pedro. 2010. 125 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Medicina, Niterói, 2010.
- LEAL, A. L. Diferenciação das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti* utilizando a metodologia de PCR multiplex e determinação do perfil epidemiológico de pacientes com meningite criptocócica. 2006. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Centro de Biotecnologia. Porto Alegre, Abril 2006.
- LÓPEZ-MEZA, J. E. Antimicrobial Peptides: Diversity and Perspectives for Their Biomedical Application. In: KOMOROWSKA, Malgorzata Anna, OLSZTYNSKA-JANUS, Sylwia. **Biomedical Engineering: Trends, Research and Technologies**. Manhattan: Intech, Janeiro 2011, p. 275-303
- LIBÉRIO, M. S.. Caracterização química e biológica da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*: peptídeos antimicrobianos e anticarcinogênicos, fosfolipases e peptidases. 2008. 129 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília. 2008.
- MARR, A. K, GOODERHAM, W. J, HANCOCK, R. E.W. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. **ScienceDirect**, v. 6, p. 468–472, 2006.
- MAKRANTONAKI, E. , GANCEVICIENE, R. , ZOUBOULIS, C.. An update on the role of the sebaceous gland in the pathogenesis of acne. **Dermato endocrinology**, Austin, v.3, n.1, p. 41-49, Janeiro/Março 2011.
- Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. Disponível em <<http://isoforlab.com/phocadownload/csli/M11-A6.pdf>> Acesso em 16 Fev. 2013

NASCIMENTO, G. G. F., LOCATELLI, J., FREITAS, P.C., SILVA, G. L. Antibacterial activity of Plant Extracts and Phytochemicals on Antibiotic-Resistance Bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo. V.31, p.247-256, 2000.

OLIVEIRA, H. W. C. Cerrado e plantas medicinais: Algumas reflexões sobre o uso e a conservação. Brasília, Dezembro 2011.

OLIVEIRA, M. F. Gênero *Pseudomonas*. Disponível em <[http://www.ufrgs.br/agrofitossan/fit35/seminarios\\_2008/pseudomonas\\_margaroni.pdf](http://www.ufrgs.br/agrofitossan/fit35/seminarios_2008/pseudomonas_margaroni.pdf)> Acesso em 10 março 2013.

OLIVEIRA, R. A. Guerra de, et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.16, n.1, jan/fev/mar 2006.

OTERO-GONZÁLEZ, A. J., et. al. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. **The FASEB Journal**, Estados Unidos, vol. 24 no. 5 p. 1320-1334, Maio 2010.

OYSTON, P. C. F., FOX, M. A., RICHARDS, S. J., CLARK, G. C. Novel peptide therapeutics for treatment of infections. **Journal of Medical Microbiology**, Reino Unido, v. 58, n. 8, p. 977-987, Agosto 2009.

PEREIRA, T. C. D., BARROS, R. A. M. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*: Perspectivas Sobre a Eco-Epidemiologia e Novos Nichos Ecológicos. Disponível em <<https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CEIQFjAC&url=http%3A%2F%2Fseicesucol.edu.br%2Frevista%2Findex.php%2Ffacider%2Farticle%2Fdownload%2F19%2F45&ei=vKJKUYnrOYj49gTCiYGIBw&usg=AFQjCNFFdkndzVFyNwaipbqFssmh2mRjjQ&sig2=YZd6wNtcjHrTkqrGI0fPGA&bvm=bv.44158598,d.eWU>> Acesso em 10 de Março 2013.

PIGATTO, C. P. Caracterização Fenotípica e Genotípica de *Escherichia coli* Produtora de Toxina Shiga (Stec) Isoladas de Bovinos de Corte do Estado do Paraná. 2008. 84 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista "Julio De Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, Fevereiro 2008.

PRATES, M. V; JÚNIOR, C. B. Peptídeos antimicrobianos. 2000. Disponível em: <[http://www.bioteecnologia.com.br/revista/bio17/17\\_pa.pdf](http://www.bioteecnologia.com.br/revista/bio17/17_pa.pdf)> Acesso em 03 Jul. 2012.

RAMOS, R. S, et. al. Atividade antimicrobiana in vitro dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Zeyheria tuberculosa*. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**. Fortaleza, v.13, n.5, p.1015-24, 2012.

RODRIGUES, C. et al . Bacteroides fragilis endocarditis: a case report and review of literature. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 16, n. 1, Fev. 2012 .

- SANTOS, André Luis dos et al . *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**., Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, Dez. 2007.
- SANTOS, D. M. et. al. LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. **Amino Acids**. Inglaterra. v. 39, p. 135-144, nov. 2009.
- SANTOS, D. M. Síntese e caracterização do peptídeo antimicrobiano LyeTx I do veneno da aranha *Lycosa erythrognatha*. 2009. 145 f. Tese (doutorado em Bioquímica) – Instituto de Ciências Bilógicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2009.
- SILVA, I. F. H. P. L. Tipagem molecular de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans*. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Lisboa, 2010.
- SILVA JUNIOR, P. I.. Sistema Imune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*. 2000. 169 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. São Paulo, 2000.
- SILVA JR, P I, DAFFRE, S, BULETI, P. Isolation and Characterization of Gomesin, an 18-Residue Cysteine-rich Defense Peptide from the Spider *Acanthoscurria gomesiana* Hemocytes with Sequence Similarities to Horseshoe Crab Antimicrobial Peptides of the Tachyplesin Family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33464–33470. Outubro 2000.
- SORIANI, F. M.. Caracterização de uma cálcio ATPase PMR1 de *Aspergillus fumigatus*. 2006. 154 f. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas a Farmácia) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto 2006.
- SUNDARARAJAN, V. S., et. al. DAMPD: a manually curated antimicrobial peptide database. **Nucleic Acids Research**, Reino Unido, vol. 40, n. D1, Janeiro 2012
- TASHIRO, Y. et. al. Interspecies Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and Other Microorganisms. **Microbes and Environments**. Vol. 28, No. 1, p. 13–24, 2013.
- Teicoplanina. Disponível em  
<<http://www.misodor.com/FARMACON/TEICOPLANINA.html>> Acesso em 10 mar 2013
- TÉLLEZ, G. A. T., CASTAÑO, J. C. Péptidos antimicrobianos. **Infectio**. Bogotá, v.14, n.1, p. 55-67. 2010.
- VIZZOTO, C. S. Isolamento e caracterização de compostos bioativos da peçonha da aranha caranguejeira *Lasiodora* sp. 2009. 70f. Dissertação (Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas - Fundação Universitária de Brasília. Brasília, 2009.

Disponível em: <<http://repositorio.bce.unb.br/handle/10482/3903>> Acesso em: 19 set 2012.

WANG, E. , LEE, J. Siong-See , HEE, T. H. . Is *Propionibacterium acnes* associated with hair casts and alopecia? **International Journal of Trichology**, Índia, v. 4, n.2, p. 93-97, 2012.

WANG, G., et. al. The Antimicrobial Peptide Database. Disponível em <<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>> Acesso em 25 Jul. 2014.

WANG, G., WANG, Z., LI, X.. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acids Research**, Reino Unido, v.37, p. D933–D937, 2009.

YAN, L., ADAMS, M. E. Lycotoxins, Antimicrobial Peptides from Venom of the Wolf Spider *Lycosa carolinensis*. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.273, p. 2059-2066, Janeiro 1998.

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