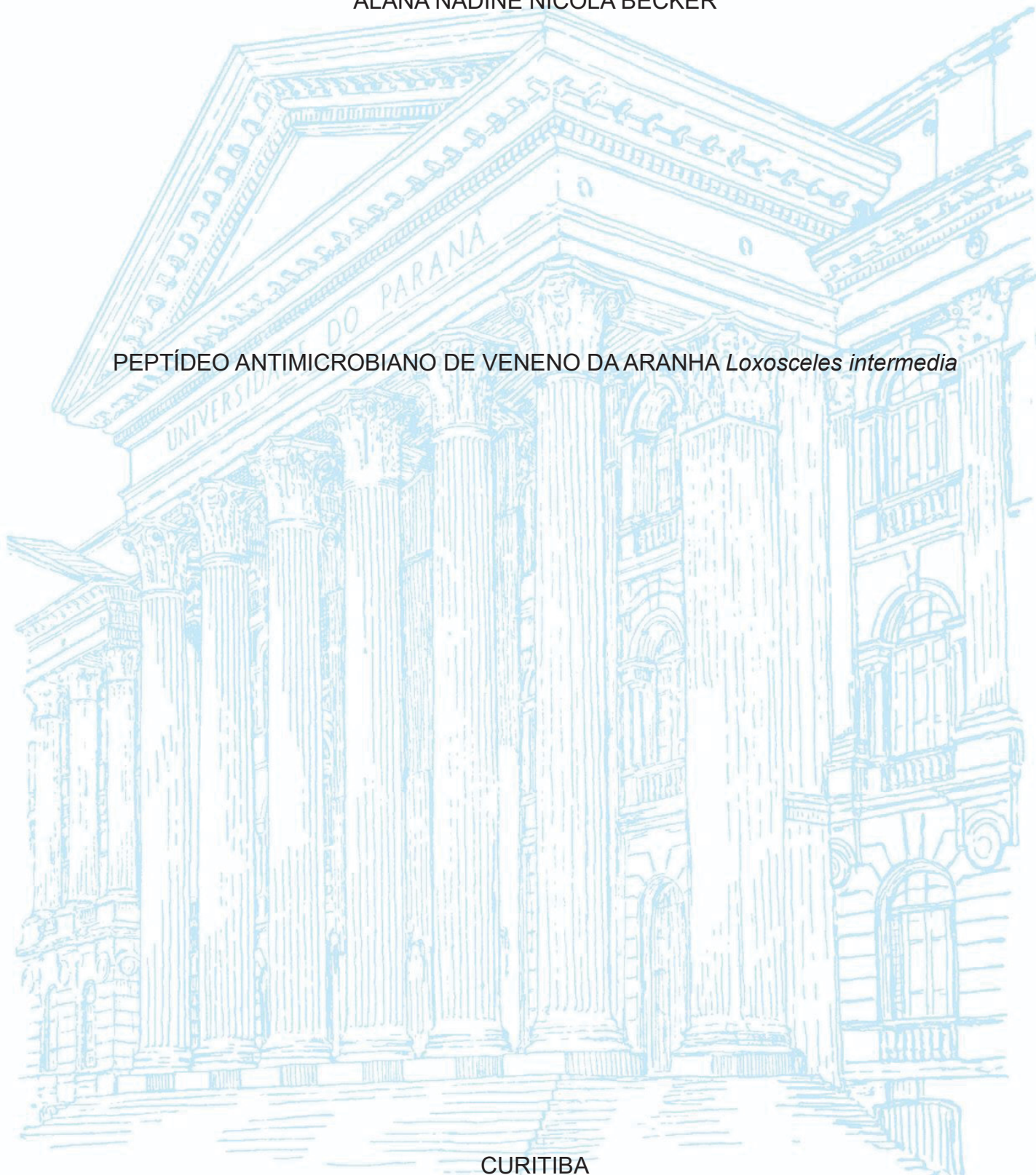


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALANA NADINE NICOLA BECKER

PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO DE VENENO DA ARANHA *Loxosceles intermedia*



CURITIBA

2021

ALANA NADINE NICOLA BECKER

PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO DO VENENO DA ARANHA *Loxosceles intermedia*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA

2021

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Becker, Alana Nadine Nicola

Peptídeo antimicrobiano do veneno da aranha *Loxosceles intermedia*. / Alana Nadine Nicola Becker. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol

1. Antimicrobianos. 2. Infecção. 3. Peptídeos. 4. Veneno. I. Soccol, Vanete Thomaz. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação m Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.. III. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585

TERMO DE APROVAÇÃO

ALANA NADINE NICOLA BECKER

PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO DO VENENO DA ARANHA *Loxosceles intermedia*

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de ALANA NADINE NICOLA BECKER intitulada: Peptídeo antimicrobiano de veneno da aranha *Loxoscelles intermedia.*, sob orientação da Profa. Dra. VANETE THOMAZ SOCCOL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Janeiro de 2022.

Assinatura Eletrônica 01/02/2022 10:26:07.0

VANETE THOMAZ SOCCOL

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica 01/02/2022 10:59:50.0

SUSAN GRACE KARP

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica 01/02/2022 11:18:54.0

CRISTINE RODRIGUES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

1

Dedico este trabalho à minha família, especialmente aos meus pais, Waigner e Maria Sirene que sempre me fizeram acreditar em mim mesma e na realização dos meus sonhos!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol, orientadora desta dissertação, com quem aprendi lições que levarei para a vida.

À minha família, especialmente aos meus pais e ao meu marido, por todo o suporte, compreensão e paciência.

Ao meu amigo e colega de trabalho, Raphael Boschero que me acolheu desde o primeiro dia e esteve presente em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho, sempre auxiliando, aconselhando e trazendo apoio, o que nos fez chegar até aqui.

A todos os colegas do laboratório de biologia molecular pelo apoio e momentos de descontração.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes” (Martin Luther King Jr.).

RESUMO

A resistência bacteriana aos antibióticos, combinada às dificuldades de descoberta de novas classes de fármacos para terapêutica antimicrobiana, tem levado à busca de novas alternativas para o tratamento de infecções bacterianas. Na última década, houve um crescente interesse por segmentos proteicos com ação antimicrobiana que podem estar presentes nos organismos vivos ou produtos de secreções. Peptídeos antimicrobianos podem potencialmente auxiliar no tratamento de um grande número de infecções causadas por bactérias, fungos, parasitos e vírus. O presente trabalho teve como objetivo central a descoberta de peptídeos com ação antimicrobiana bactericida ou bacteriostática. Para atingir o objetivo proposto, análise *in silico* foi realizada a partir de proteínas de aranha marrom (*Loxosceles intermedia*). Após as análises, os peptídeos selecionados foram sintetizados quimicamente e foi avaliada a taxa de mortalidade celular, frente às linhagens *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Mycobacterium tuberculosis*. A toxicidade do peptídeo foi avaliada frente à linhagem celular HaCat. O peptídeo demonstrou baixa citotoxicidade em células HaCat e atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas, mostrando promissora atividade antibacteriana.

Palavras-chave: Antimicrobiano. Infecção. Peptídeo. Resistência. Veneno.

ABSTRACT

Bacterial resistance to antibiotics, combined to the difficulties in discovering new classes of antimicrobial drugs, led to the search for new alternatives to treat bacterial infections. Interest in protein segments with antimicrobial action that may be present in living organisms or secretion products has grown in the last decade. Antimicrobial peptides can potentially aid in the treatment of a large number of infections caused by bacteria, fungi, parasites and viruses. Thus, this study aimed to discover peptides with antimicrobial bactericidal or bacteriostatic action. To achieve the proposed objective, in silico analysis was conducted from brown spider proteins (*Loxosceles intermedia*). After the analysis, the peptides were chemically synthesized and the cell mortality rate was evaluated against the strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Mycobacterium tuberculosis*. The cytotoxicity was evaluated against HaCat cell line. The peptide demonstrated low cytotoxicity in HaCat cells and antimicrobial activity against the tested bacteria, showing promising bactericidal and bacteriostatic action.

Keywords: Antimicrobial. Infection. Peptide. Resistance. Venom.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 – COEFICIENTE DA INCIDÊNCIA DA TUBERCULOSE (100 MIL HABITANTES).....21
- FIGURA 2 – PADRÃO DE RESISTÊNCIA DOS CASOS NOVOS DE TUBERCULOSE DROGARRESISTENTE. BRASIL, 2015 A 2020.....27

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 – FLUXOGRAMA DE METODOLOGIA DE ANÁLISE43

CAPÍTULO 3

- FIGURA 1 – AÇÃO DE P.LOX5 REPRESENTADA PELO PERCENTUAL DE MORTE CELULAR DE *Escherichia coli* ATCC 25922 FRENTE AO PEPTÍDEO P.LOX5.....65
- FIGURA 2 – AÇÃO DE P.LOX5 REPRESENTADA PELO PERCENTUAL DE MORTE CELULAR DE *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 FRENTE AO PEPTÍDEO P.LOX5.....65
- FIGURA 3 – AÇÃO DE P.LOX5 REPRESENTADA PELO PERCENTUAL DE MORTE CELULAR DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 FRENTE AO PEPTÍDEO P.LOX566
- FIGURA 4 – AÇÃO DE P.LOX5 REPRESENTADA PELO PERCENTUAL DE MORTE CELULAR DE *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 FRENTE AO PEPTÍDEO P.LOX566
- FIGURA 5 – AÇÃO DE P.LOX5 REPRESENTADA PELO PERCENTUAL DE MORTE CELULAR DE *Mycobacterium tuberculosis* H37RV FRENTE AO PEPTÍDEO P.LOX567
- FIGURA 6 – TOXICIDADE CELULAR DE P.LOX5 REPRESENTADA PELO PERCENTUAL DE MORTE CELULAR DE CÉLULAS HaCat FRENTE AO PEPTÍDEO P.LOX5.....69

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

QUADRO 1 – TERAPIAS ANTIMICROBIANAS APROVADAS NO ANO DE 2019 ...	25
QUADRO 2 – MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	28
QUADRO 3 – CLASSIFICAÇÃO DAS β -LACTAMASES	30
QUADRO 4 – PEPTÍDEOS DERIVADOS DO VENENO DE ARANHA	34
QUADRO 5 – APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DO VENENO DA ARANHA <i>Loxosceles</i> spp.....	36

CAPÍTULO 2

QUADRO 1 – SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS DE <i>Loxosceles intermedia</i>	44
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 – SCORE DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS A PARTIR DAS FERRAMENTAS DE TRIAGEM IN SILICO.....	47
TABELA 2 – SIMILARIDADE COM SEQUÊNCIAS JÁ PATENTEADAS	48
TABELA 3 – SIMILARIDADE COM SEQUÊNCIAS NATURAIS	50
TABELA 4 – QUANTIDADE DE PEPTÍDEO OBTIDO NA ETAPA DE SÍNTESE QUÍMICA.....	51
TABELA 5 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	52

CAPÍTULO 3

TABELA 1 – Similaridade do peptídeo P.LOX5 com sequências já patenteadas.....	62
TABELA 2 – Similaridade com sequências naturais	63

LISTA DE ABREVIATURAS

%	– Porcentagem
°C	– Graus Celsius
AIM	– <i>Australian</i> Imipenemase
AmpC	– Adenosina monofosfato cíclico
AMR	– Resistência antimicrobiana
APD	– <i>Antimicrobial Peptide Database</i>
BOR-SA	– <i>Bordeline Oxacillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
CIM	– Concentração inibitória mínima
CtxA	– Ceratotoxina A
CTX-M	– Cefotaximases
DBO	– Diazabiciclooctanonas
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
EMA	– <i>European Medicines Agency</i>
ESBL- β	– Lactamases de espectro estendido
ESKAPE	– <i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter spp.</i>
FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
GES	– <i>Guiana extended spectrum</i>
GIM	– <i>German</i> Imipenemase
HIV/Aids Syndrome	– <i>Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency</i>
ICK	– Inhibitor Cystine Knot
IMI	– <i>Imipenem hydrolyzing</i> carbapenemase
IMP	– Imipenemase
ITU	– Infecção do trato urinário
KPC	– <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LPS	– Lipopolissacarídeo
MBL	– Metalo- β -lactamases
MDR	– <i>Multidrug resistance</i>
mL	– Mililitro
MOD	– Model-based Design
MOD-SA	– <i>Modified Penicillin-binding protein Staphylococcus aureus</i>

MRS	– <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes a meticilina
NCBI	– <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDM	– <i>New Deli Metalobetalactamases</i>
NMC	– Não Metalo carbapenemase
OMS	– Organização Mundial da Saúde
ORS	– <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes a oxacilina
P&D	– Pesquisa e desenvolvimento
PAM	– Peptídeo antimicrobiano
PBP	– <i>Penicillin-Binding Protein</i>
PLD	– Fosfolipases-D
PMDA	– <i>Pharmaceuticals and Medicals Device Agency</i>
ESBL	– β -lactamases
SHV	– SupHydryl Variable
SMD	– Esfingomielinase-D
SME	– <i>Serratia marcescens enzyme</i>
SPM	– São Paulo Metalobetalactamase
TB	– Tuberculose
TEM	– Temoreira
μ g	– Micrograma
VIM	– Verona Imipenemase

LISTA DE SÍMBOLOS

α	– alfa
β	– beta
\geq	– maior ou igual
$>$	– maior
\leq	– menor ou igual
$<$	– menor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 OBJETIVO.....	19
1.1.1 Objetivo geral	19
1.1.2 Objetivos específicos.....	19
CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA	21
1 ASPECTOS TEÓRICO-CONCEITUAIS SOBRE O TRATAMENTO DE DOENÇAS BACTERIANAS	21
1.1 CONTEXTO HISTÓRICO.....	23
1.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS	26
1.2.1 Resistência aos β -lactâmicos.	29
2 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	31
2.1 ARANHAS DO GÊNERO <i>LOXOSCELES</i> COMO FONTE INEXPLORADA DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	35
REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 2: METODOLOGIAS E RESULTADOS COMPLEMENTARES	43
1 ANÁLISE IN SILICO	43
2 ANÁLISE EXPERIMENTAL	50
2.1 Síntese química.....	50
2.2 Determinação da atividade antibacteriana.....	51
REFERÊNCIAS	53
CAPÍTULO 3: PEPTÍDEO SINTÉTICO P.LOX5 COM AÇÃO ANTIBACTERIANA..	55
RESUMO	55
1 RELATÓRIO DESCRITIVO	55
1.1 CAMPO DA INVENÇÃO.....	55
1.2 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA	55
1.3 DESCRIÇÃO DA ABOARDAGEM DO PROBLEMA TÉCNICO	60
1.4 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO	61
1.4.1 Exemplo 1 – Método para obtenção e triagem do peptídeo	61
1.4.2 Exemplo 2 – Método para obtenção do peptídeo	63

1.4.3 Exemplo 3 – Método para determinação da atividade antibacteriana	63
1.4.4 Exemplo 4 – Método para determinação da toxicidade celular	67
1.5 DEFINIÇÕES	69
2 REIVINDICAÇÕES	70
REFERÊNCIAS.....	71
2 DISCUSSÃO GERAL	73
3 CONCLUSÃO	75
4 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	76
REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO GERAL

O mais antigo relato conhecido de “pestilência” foi encontrado no Egito, datado de 3.180 a.C. Esse relato pode representar a primeira epidemia registrada, apesar de que os termos *pestilência* e *peste* eram utilizados sem nenhuma definição (FADER; ENGELKIRK; DUBEN-ENGELKIRK, 2021). As doenças infecciosas estão entre as mais fatais, sendo que em 2019 a pneumonia e outras infecções respiratórias inferiores eram o grupo mais mortal de doenças transmissíveis e, juntas, foram classificadas como a quarta principal causa de morte no mundo de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), 2021. Segundo Levinson (2016) o tratamento das doenças infecciosas teve início com os primeiros medicamentos para sífilis. O conceito da quimioterapia, termo utilizado para tratamento farmacológico com objetivo de destruir células, é creditado a Paul Ehrlich. Ele desenvolveu um dos primeiros compostos para o tratamento de doença infecciosa, que data de 1910. O composto era o organo arsênico, conhecido como Salvarsian. A quimioterapia antibiótica teve início com a descoberta e elucidação da estrutura química da penicilina. O “período de ouro” das descobertas de novos antibióticos perdurou de 1940 a 1960. Neste período, foram introduzidos diversos medicamentos no uso clínico, fato que levou ao uso indiscriminado destes compostos e contribuiu para o cenário de resistência nos dias de hoje (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

Atualmente, a maioria das empresas farmacêuticas que investem em pesquisa e desenvolvimento têm poucos produtos antimicrobianos (AMP) no mercado, especialmente voltados para a lista de patógenos priorizada pela OMS (OLIVEIRA *et al.*, 2020). A resistência bacteriana aos fármacos disponíveis representa um desafio que une excepcionalmente interesses e preocupações globais para a saúde humana e animal, e também os setores alimentar e agrícola. O problema tem se exacerbado pela aquisição de genes de resistência antimicrobiana (AMR). Os patógenos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (ESKAPE), representam o maior paradigma para resistência, patogênese e transmissão de doenças, tanto na comunidade quanto em ambientes clínicos (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Este cenário mostra a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos e novas terapias.

Entre os principais desafios no desenvolvimento de novos fármacos, está o alto custo de investimento, sobretudo em estudos clínicos e ensaios pós-aprovação.

O processo é ainda mais oneroso no que diz respeito a compostos com ação múltipla. No centro do problema está o fato de que a justificativa financeira para o desenvolvimento e comercialização de novas terapias muitas vezes superam o valor de investimento para a saúde pública (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). Na última década, houve um crescente interesse por segmentos proteicos com ação antimicrobiana, que podem estar presentes nos organismos vivos ou produtos de secreções, incluindo venenos de animais. Também, peptídeos antimicrobianos podem potencialmente auxiliar no tratamento de um grande número de infecções causadas por bactérias, fungos, parasitas e vírus (RIBEIRO, 2016). Peptídeos antimicrobianos derivados de veneno de aranhas e escorpiões foram identificados pela primeira vez na década de 1990. As aranhas do gênero *Loxosceles*, estão amplamente distribuídas ao redor do mundo compreendendo em torno de 140 espécies (YI *et al.*, 2014). Os venenos de aranha, em particular, aqueles do gênero *Loxosceles* vem sendo pesquisados como auxiliares no desenvolvimento de drogas e produção de bioinseticidas, por exemplo, sendo o desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos uma frente a ser explorada (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2017).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo central a busca de peptídeos com ação antibacteriana contra patógenos causadores de doença infecciosa em humanos, incluindo o *Mycobacterium tuberculosis* causador da tuberculose que está entre a lista de prioridades da OMS.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo geral

Identificar peptídeos com ação bactericida ou bacteriostática derivados do veneno da aranha *Loxosceles intermedia* contra patógenos causadores de doença infecciosa em humanos, incluindo o *M. tuberculosis*.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Realizar a triagem *in silico* de peptídeos antimicrobianos a partir de proteínas disponíveis em bancos de dados por meio do algoritmo CampR3.
- b) Realizar modificações nos peptídeos selecionados por recurso *Rational*

Design of Antimicrobial Peptides disponível em CampR3.

- c) Realizar nova triagem por meio das ferramentas AntiTB_MD e AntiTB_RD disponíveis em AtbPpred para a predição de peptídeos com abrangência antituberculose.
- d) Verificar a similaridade com sequências já patenteadas.
- e) Sintetizar quimicamente os peptídeos selecionados.
- f) Testar diferentes concentrações dos peptídeos frente a cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos e bacilos álcool-ácido resistentes.
- g) Avaliar a toxicidade do peptídeo selecionado frente à linhagem de células HaCat.

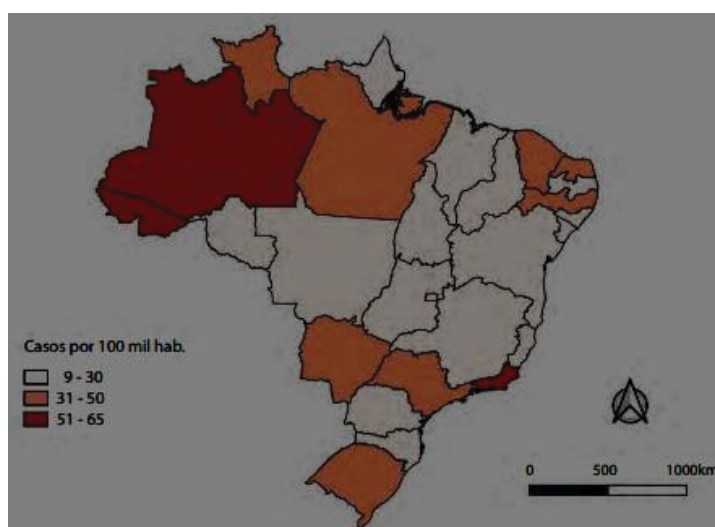
Para atingir os objetivos propostos, esse trabalho foi desenvolvido em duas etapas. Na primeira foi realizada a revisão dos dados de literatura sobre o tema (Capítulo 1). Na segunda etapa foram realizadas análises *in silico*, e análise experimental (Capítulos 2 e 3). No capítulo 2 foram abordados metodologia geral e resultados para a obtenção de peptídeos. No Capítulo 3 é apresentada a patente onde são descritos os fundamentos da invenção, o estado da técnica, abordagem do problema, e as metodologias empregadas de forma completa, compreendendo o passo a passo, mais especificamente no item 3.4 título “DESCRIPÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO”.

CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA

1 ASPECTOS TEÓRICO-CONCEITUAIS SOBRE O TRATAMENTO DE DOENÇAS BACTERIANAS

As doenças infecciosas estão entre as mais fatais, e que mais afligem as sociedades humanas. De acordo com a OMS, as cinco principais doenças infecciosas, incluem as infecções virais respiratórias, doenças diarreicas, *Human Immunodeficiency Virus/ Acquired immunodeficiency syndrome* (HIV/Aids), tuberculose e malária. Em 2019, a pneumonia e outras infecções respiratórias inferiores, eram o grupo mais mortal de doenças transmissíveis, e juntas, foram classificadas como a quarta principal causa de morte no mundo. Ainda em 2019, a tuberculose ocupou o 13º lugar na lista das principais causas de morte mundiais (OMS, 2020). No Brasil em 2020, foram registrados 66.819 novos casos de tuberculose, uma média de 31,6 casos a cada 100 mil habitantes. O Brasil está na lista de países com alta carga para tuberculose (TB) e coinfeção TB-HIV, sendo considerado prioridade no tratamento da doença pela OMS. A região norte do Brasil é onde se concentra o maior número de casos. Os estados do Amazonas, Acre e Espírito Santo são os de maior incidência da doença como pode ser observado na FIGURA 1 (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

FIGURA 1 – COEFICIENTE DA INCIDÊNCIA DA TUBERCULOSE (100 MIL HABITANTES).



Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Secretarias Estaduais de Saúde/Ministério da Saúde; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Contrariando as expectativas de erradicação das doenças infecciosas, nota-se o surgimento de novas doenças e o ressurgimento de infecções consideradas erradicadas. As doenças infecciosas emergentes podem ser definidas como aquelas com surgimento recente em uma população, ou que já existiam, mas têm aumentado rapidamente em incidência e alcance geográfico. Elas podem ocorrer pela introdução do agente etiológico ou como uma variante de uma infecção humana existente, seguida pelo seu estabelecimento e rápida disseminação dentro de uma nova população hospedeira. Muitos são os esforços para controle destas doenças e, com foco nas doenças bacterianas, pode-se citar os esforços dos profissionais da saúde para adesão do paciente ao tratamento, e a introdução de novas terapias e medicamentos para uso clínico (MORSE, 1995).

Para tratamento das doenças infecciosas bacterianas, atualmente existem disponíveis diferentes classes de antimicrobianos, definidas de acordo com seu mecanismo de ação. O alvo dos fármacos pode ser a síntese da parede celular, ou ainda a interrupção da replicação ou reparo do DNA bacteriano, transcrição e tradução (GOLAN *et al.*, 2018). Dentre as classes de fármacos antimicrobianos disponíveis, os betalactâmicos constituem a mais amplamente utilizada. Seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese da parede celular por meio do impedimento da ligação cruzada dos peptídeoglicanos e seu sítio ativo é o anel betalactâmico. Algumas bactérias possuem enzimas do grupo β -lactamases, capazes de degradar o anel betalactâmico do fármaco, atenuando sua ação. Como forma de contornar este problema, alguns antibióticos betalactâmicos, são associados a compostos inibidores de β -lactamase. Essa associação impede a ação da enzima, promovendo sua hidrólise e, conseqüentemente, protegendo a integridade do fármaco. Entre os inibidores em uso clínico estão os compostos ácido clavulânico, avibactam, tazobactam, vaborbactam e relebactam (YAHAV *et al.*, 2021).

De forma geral, o objetivo da terapia farmacológica antimicrobiana é a toxicidade seletiva. Ou seja, o ataque à vias críticas para a sobrevivência do patógeno com dano mínimo ao hospedeiro. A razão entre a dose terapêutica e a dose tóxica é denominada índice terapêutico, sendo que quanto menor o índice terapêutico, menor será a margem de segurança para tratamento sem efeitos colaterais. Isso está diretamente relacionado ao alvo no qual agem os fármacos. O alvo pode ser exclusivo, quando está presente no patógeno e ausente no hospedeiro. Pode ser semelhante, como por exemplo, isoformas de enzimas, sendo que neste caso ocorre uma

diminuição do índice terapêutico. Pode, ainda, ser um alvo comum presente tanto no patógeno quanto no hospedeiro, o que muitas vezes leva a um aumento da toxicidade do fármaco. Os agentes antimicrobianos são ainda capazes de produzir efeitos bacteriostáticos ou bactericidas. Os fármacos bacteriostáticos, inibem o crescimento bacteriano sem causar a morte do patógeno, devido à sua ação em vias essenciais para o desenvolvimento bacteriano, mas não para a sobrevivência. O sucesso do tratamento químico com esses agentes depende da integridade do sistema imune do hospedeiro para eliminar as bactérias. Os fármacos bactericidas, por sua vez, são aqueles que agem em vias essenciais à sobrevivência bacteriana causando a morte do patógeno (GOLAN *et al.*, 2018).

1.1 CONTEXTO HISTÓRICO

Por meio da evolução da medicina, sabe-se que doenças infecciosas e cânceres têm etiologias diferentes. De uma perspectiva farmacológica, estas doenças embora diferentes, apresentam tratamentos com princípios semelhantes, sendo identificados como tratamentos quimioterápicos. O alvo em comum são as diferenças seletivas entre o microrganismo ou célula cancerosa e a célula normal do hospedeiro, visando à destruição daquela causadora da patologia (GOLAN *et al.*, 2018). Historicamente, o conceito da quimioterapia é credenciado a Paul Ehrlich, que desenvolveu um dos primeiros compostos para o tratamento de doença infecciosa que data de 1910 (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). O Salvarsan, também conhecido como bala mágica, foi o primeiro tratamento para sífilis, e seu composto ativo era uma base organo arsênica que substituiu o mercúrio até então utilizado no tratamento da doença. Esse medicamento permaneceu em uso até o surgimento da penicilina (VERNON, 2019). A penicilina, descoberta em 1928 por Alexandre Fleming, deu início à era de ouro dos antibióticos que perdurou até 1960. Um dos importantes avanços a respeito foi a elucidação da estrutura da penicilina, que possibilitou o desenvolvimento de análogos semissintéticos para contornar a resistência. Por volta de 1930, os estudos voltavam-se a microrganismos como produtores de antimicrobianos, o que levou à identificação dos Actinomicetos. Estes microrganismos são bactérias Gram positivas produtoras de substâncias antibióticas. Em meio a este período, houve a descoberta da estreptomicina, o primeiro agente ativo para

tratamento da tuberculose (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

A maioria dos antibióticos descobertos na chamada idade do ouro está em uso atualmente, mas com eficácia menor pelo aumento da incidência de microrganismos resistentes. Ainda, durante este período, as sucessivas descobertas levaram ao uso indiscriminado destes compostos antibióticos, o que certamente contribuiu para o cenário de resistência atualmente. Devido ao fato que os microrganismos são capazes de desenvolver resistência às terapias medicamentosas, a pesquisa de novos fármacos e a elaboração de novos tratamentos é um processo em evolução contínua. Apenas cinco novas classes terapêuticas de antimicrobianos foram introduzidas clinicamente nas últimas quatro décadas; são elas: oxazolidinonas (linezolida), lipopeptídeos (daptomicina), pleuromutilinas (retapamulina), estreptograminas (quinupristina/ dalfopristina) e glicilciclinas (tigeciclina) (GOLAN *et al.*, 2018).

A estimativa é que o mercado financeiro global de antibióticos movimenta cerca de US\$30 bilhões anualmente. A maioria das empresas farmacêuticas que investem em pesquisa e desenvolvimento tem poucos produtos antimicrobianos no mercado, voltados para a lista prioritária de patógenos da OMS. Em 2018, três novos antibióticos com potencial para tratar infecções bacterianas graves surgiram com a aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA) ou da *European Medicines Agency* (EMA). Todos os três compostos têm como alvo a subunidade 30S do ribossomo bacteriano. O primeiro deles, análogo da classe de aminoglicosídeos, a Plazomicina (Zemdri; Achaogen Incorporated), possui indicação para o tratamento de pacientes em infecção do trato urinário complicada, incluindo pielonefrite em pacientes acima de 18 anos (OLIVEIRA *et al.*, 2020). O Eravaciclina (Xerava; Tetrphase Pharmaceuticals Incorporated), que é um análogo da tetraciclina, foi aprovado exclusivamente para o tratamento de complicações em infecções intra-abdominais causadas pelo grupo ESKAPE. Este grupo representa o maior desafio no tratamento de infecções em hospitais devido aos diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos em uso clínico (OLIVEIRA *et al.*, 2020). A Omadaciclina (Nuzyra; Paratek Pharmaceuticals Incorporated), que é um medicamento ativo da classe das tetraciclinas, foi aprovado para o tratamento de pneumonia bacteriana, infecções de pele e infecções do trato urinário (ITU) complicada e não complicada (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Em 2019, cinco novas terapias com drogas antimicrobianas (QUADRO 1)

foram aprovadas pelo FDA, a EMA ou o *Pharmaceuticals and Medicals Device Agency* (PMDA). Destas cinco terapias, quatro drogas demonstraram eficácia contra patógenos do grupo ESKAPE (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

QUADRO 1 – TERAPIAS ANTIMICROBIANAS APROVADAS NO ANO DE 2019

Terapia	Farmacêutica	Indicação
Imipenem-cilastatina-relebactam	Recarbrio; Merck & Co., Inc.	ITU e infecção intra-abdominal complicadas incluindo ESKAPE
Lefamulina	Xelenta; Nabriva Thera-peutics AG	Pneumonia bacteriana incluindo ESKAPE
Lascefloxacina	Lasvic; Kyorin Pharmaceutical Co. Ltd.	Pneumonia bacteriana incluindo ESKAPE
Cefiderocol	Fetroja; Shionogi & Co. Ltd.	ITU complicada incluindo ESKAPE
Pretomanid	TB Alliance	Tuberculose MDR

FONTE: Adaptado de Oliveira *et al.* (2020).

Dentre o portfólio de drogas em fase de ensaio clínico, a grande maioria é derivada de alguma classe química para a qual já existe um mecanismo de resistência. Uma das poucas drogas que fogem à regra é a Murepavadina, um composto peptídeo mimético de alvo de proteína de membrana externa, seletivo contra o transportador de proteína LptD, que medeia o transporte de lipopolissacarídeo (LPS) (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Uma nova classe que emerge e se encontra em estudos de fase II clínica é a Brilacidina (Innovation Pharmaceuticals Incorporated). Trata-se de um peptídeo mimético de defensina para o tratamento de infecções de pele agudas causadas por *S. aureus*. A necessidade de novas alternativas, somada às dificuldades de descoberta de novas classes de antibióticos, levou à busca por alternativas como os inibidores de β -lactamases (YAHAV *et al.*, 2021).

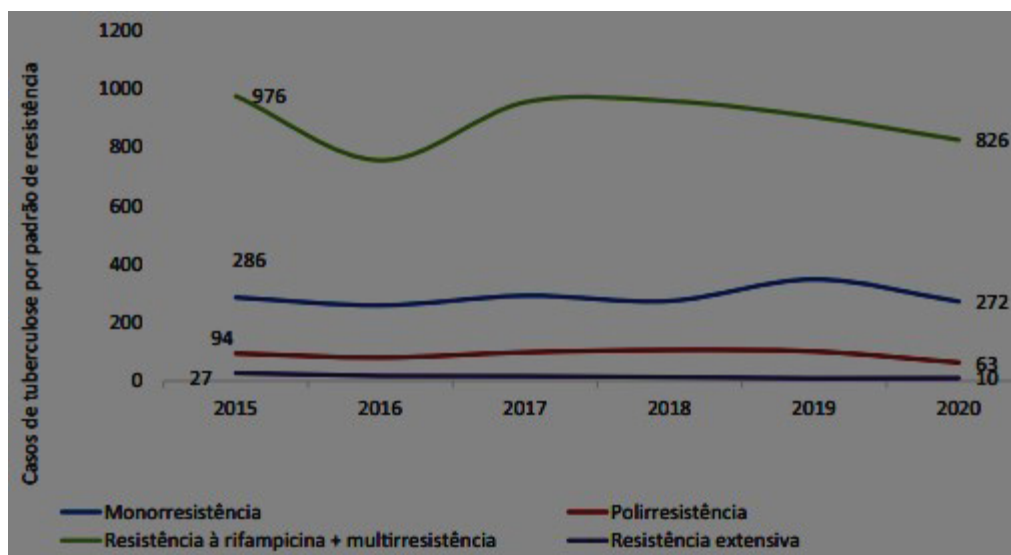
O primeiro inibidor utilizado clinicamente foi o ácido clavulânico, eficiente contra as enzimas mais amplamente distribuídas, as β -lactamases de classe A. Um dos avanços recentes mais importantes a ser colocado é a introdução das diazabiciclooctanonas (DBOs), das quais o composto avibactam foi o primeiro representante a ser utilizado clinicamente (TOOKE *et al.*, 2019). O avibactam é um inibidor de β -lactamases da classe A, incluindo a enzima carbapenemase presente em *Klebsiella pneumoniae* (KPC), sendo que a combinação com a ceftazidima foi aprovada para tratamentos incluindo infecções complicadas intra-abdominais, do trato

urinário e pneumonias adquiridas em hospitais e associadas a ventilação mecânica. O sucesso do avibactam, impulsionou o desenvolvimento de uma série de DBOs alternativos, entre eles o composto da empresa Merck®, o relebactam em combinação com o imipenem que foi aprovado pelo FDA em 2019 para tratamento de infecções do trato urinário e infecções intra-abdominais complicadas. O composto foi aprovado também pela EMA (JACOBS; PINTO JUNIOR, 2020).

1.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS

Nos últimos anos, muitas doenças curáveis, como a febre tifoide e a gonorreia, por exemplo, estão se tornando cada vez mais difíceis de tratar. Ao mesmo tempo, doenças como a tuberculose vêm ganhando resistência aos fármacos disponíveis em todo o mundo. De acordo com o trabalho de Jacobs e colaboradores (2020), que reuniu dados de 2017, a tuberculose droga resistente (TB-DR), ou a tuberculose *multidrug resistant* (TB-MDR), ocorreu em 3,5% dos novos casos no mundo, sendo classificada como resistência primária, e em 18% dos casos de tuberculose anteriormente tratados, classificada nestes casos como resistência adquirida. De acordo com a OMS, todos os anos cerca de 80.000 pessoas desenvolvem alguma forma de tuberculose resistente (Nutti *et al.*, 2017). A quarta doença infecciosa mais letal no mundo, a tuberculose, obteve no Brasil, entre 2015 e 2018, um total de 7.749 casos diagnosticados como drogarresistentes, 98% dos casos da forma pulmonar da doença, sendo cerca de 53% do total de casos concentrados em capitais (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). A FIGURA 2 mostra o padrão de resistência da tuberculose no Brasil entre os anos de 2015 a 2020, sendo a resistência a rifampicina ou multirresistência predominante, seguido da monorresistência.

FIGURA 2 – PADRÃO DE RESISTÊNCIA DOS CASOS NOVOS DE TUBERCULOSE DROGARRESISTENTE. BRASIL, 2015 A 2020.



Fonte: Sistema de Informação de Tratamentos Especiais da Tuberculose/Ministério da Saúde (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

As infecções resistentes resultam em mais de meio milhão de mortes globalmente e impactam na qualidade de vida dos indivíduos infectados. Também afetam a economia, pois o tratamento demanda períodos longos com drogas de maior custo, múltiplas testagens e ainda, em muitos casos, tratamentos associados em razão de efeitos colaterais (NUTI *et al.*, 2017). O tema resistência antimicrobiana toma maior proporção e impacto quando se considera que o sucesso de inúmeros outros tratamentos como transplantes, cirurgias ortopédicas, diálise renal e quimioterapia, por exemplo, depende da capacidade de controle das infecções (PERRY; WAGLECHNER; WRIGHT, 2016).

Entre as causas de resistência, incluem-se enzimas como as β -lactamases, capazes de inativar o sítio ativo do fármaco, e mecanismos de efluxo ou camuflagem do alvo do fármaco que podem reduzir a sua capacidade de ligação (GOLAN *et al.*, 2018). As causas genéticas de resistência incluem mutações cromossômicas em genes que codificam o alvo do fármaco ou alguma via envolvida, podendo ser transferida verticalmente entre gerações. A resistência pode ser adquirida também por transferência horizontal de material genético entre microrganismos, ou ainda pela incorporação de genes de resistência presentes no ambiente (ZAHA, FERREIRA E PASSAGLIA, 2014).

QUADRO 2 – MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

(continua)

Resistência	Mecanismo
Resistência à meticilina/oxacilina em <i>Staphylococcus</i> spp. (MRS/ORS)	Mediada por uma proteína auxiliar de ligação à penicilina (P2BP2a ou P2PB2C) codificada pelo gene <i>mecA</i> ou <i>mecC</i> para qual os betalactâmicos possuem baixa afinidade
Resistência de baixo nível a oxacilina em <i>Staphylococcus</i> spp. (BORSA-bordeline oxacillin-resistant <i>S. aureus</i>) e MOD-SA (modified penicillin-binding protein <i>S. aureus</i>)	Resistência associada a mutações de ponto levando a alterações no gene PBP ou hiperprodução de betalactamase
Resistência à penicilina em <i>Streptococcus</i> spp.	PBPs (alvo da penicilina) de baixa afinidade são codificados por genes “mosaicos” provenientes de transferência horizontal com <i>Streptococcus</i> do Grupo Viridans comensais
Resistência à vancomicina em <i>Staphylococcus</i> spp.	Altos níveis de resistência (CIM > 8 µg/mL) são mediados pelo gene <i>VnaA</i> .
Resistência à vancomicina em <i>Enterococcus faecalis</i> / <i>Enterococcus faecium</i>	Fenótipo mediado pelo gene <i>VanA</i> induzível e transferível confere também resistência a Teicoplanina (CIM ≥ 64 µg/mL)
Resistência à vancomicina em <i>Enterococcus faecalis</i> / <i>E. faecium</i>	Fenótipo mediado pelo gene <i>VanB</i> induzível e transferível (CIM ≥ 4-1.024 µg/mL)
Resistência à vancomicina em <i>Enterococcus gallinarum</i> / <i>Enterococcus casseliflavus</i> / <i>Enterococcus flavescens</i>	Fenótipo mediado pelo gene <i>VanC</i> de expressão constitutiva e não transferível (CIM ≥ 4-16 µg/mL)
Resistência à vancomicina em <i>Enterococcus faecium</i>	Fenótipo mediado pelo gene <i>VanD</i> não transferível (CIM ≥ 64-128 µg/mL)
Resistência à vancomicina em <i>Enterococcus faecalis</i>	Fenótipo mediado pelos genes <i>VanE</i> e <i>VanG</i> não transferíveis (CIM ≥ 16 µg/mL)
Resistência a macrolídeos, lincosaminas e estreptogramonas em <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> beta-hemolíticos e <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Efluxo codificado pelo gene <i>mrs(A)</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. ou gene <i>mef</i> em <i>Streptococcus</i> spp. confere resistência a macrolídeos; resistência a macrolídeos associada a resistência constitutiva ou induzível a clindamicina mediada pelo gene <i>erm</i> promove a metilação do RNA ribossomal 23S
Resistência aos betalactâmicos	Mediado pelo grupo de enzimas denominado β-lactamases capazes de hidrolisar o anel β-lactâmico nos fármacos da classe β-lactâmicos

FONTE: Adaptado de Oplustil *et al.* (2020).

Perry e colaboradores (2016) consideram o ambiente como uma fonte de genes de resistência para as bactérias. A maioria dos antibióticos de uso médico ou agrícola são originalmente produzidos de forma natural pelos Actinomicetos, bactérias encontradas no solo. Alguns Actinomicetos são resistentes ao metabólito antimicrobiano que produzem. Dessa maneira, os autores ressaltam que os Actinomicetos produtores de antibióticos podem ser fonte original para muitos dos genes de resistência disseminados. O fato de a resistência ter origem no ambiente, se reforça por estudos como o de D'COSTA et al. (2011), que apontam o gene de resistência a β -lactâmicos em amostras de 30.000 anos.

Devido a essa grande diversidade, Yang e colaboradores (2020) fizeram um levantamento entre bancos de dados de genes de resistência bacteriana disponíveis, com o objetivo de criar uma referência para a seleção e o uso de antibióticos com base nestes bancos. Levando em consideração ferramentas universais, como National Center for Biotechnology Information (NCBI) e Swiss-Prot, após a fusão de dados e eliminação da redundância, chegou-se a um total de cerca de 4.554 grupos completos de genes de resistência. O QUADRO 2 traz as principais classes de resistência de importância clínica.

1.2.1 Resistência aos β -lactâmicos

A resistência aos β -lactâmicos ganha destaque por ser a classe de antimicrobianos mais utilizada. Em um conceito generalista, as β -lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico, sítio ativo dos fármacos da classe. A enzima se associa não covalentemente ao anel β -lactâmico que é atacado pela hidroxila livre do lado do sítio ativo, resultando na formação de um grupo acil-éster. A hidrólise libera a enzima ativa e o antibiótico hidrolisado inativo, formando como produto final água e ácido penicilóico. As β -lactamases podem ser de espectro estreito, as quais são capazes de hidrolisar penicilinas e algumas cefalosporinas. Essas enzimas são chamadas, de forma geral, de penicilinases. Podem ainda ser do tipo ESBL (β -lactamases de espectro estendido), capazes de hidrolisar todas as penicilinas, incluindo as associadas a inibidores da β -lactamase, quase todas as cefalosporinas e o Aztreonam. As β -lactamases capazes de degradar antibióticos carbapenêmicos são chamadas também carbapenemases (CRISTINA DA SILVA; LINCOPAN, 2012; ABRANTES; NOGUEIRA, 2017).

QUADRO 3 – CLASSIFICAÇÃO DAS β -LACTAMASES

Enzima	Bush-Jacoby-Medeiros	Ambler
AmpC CMY e ADC Serina β -lactamases	Grupo I	Classe molecular C
ESBL (enzimas do tipo TEM, KPC, NCM, IMI, SME, GES, SHV e CTX-M) Serina β -lactamases	Grupo II	Classe molecular A
ESBL (enzimas do tipo NDM e VIM, SPM, IMP, AIM) Metallo- β -lactamases	Grupo III	Classe molecular B
(ESBL do tipo OXA-oxacilinase) Serina β -lactamases	Grupo II	Classe molecular D
Penicilinasas	Grupo IV	*

FONTE: Adaptado de Abrantes; Nogueira (2017); * Não existe classificação correspondente.

As ESBL tornaram-se um problema de saúde pública no que diz respeito às infecções nosocomiais e comunitárias por membros da família *Enterobacteriaceae* (CRISTINA DA SILVA; LINCOPAN, 2012). Por se tratar de um grupo amplo de enzimas, surgiram esquemas de classificação. Dois sistemas estão em uso: o sistema de Bush-Jacoby-Medeiros e o sistema de Ambler. O esquema proposto por Bush-Jacoby-Medeiros, baseia-se na preferência de substrato da enzima e na inativação diante de inibidores específicos. O esquema de classificação de Ambler considera a similaridade entre as cadeias de aminoácidos das enzimas e classifica as enzimas nos grupos A, B, C e D. O QUADRO 3 traz as principais enzimas classificadas de acordo com Bush-Jacoby-Medeiros e Ambler (CRISTINA DA SILVA; LINCOPAN, 2012; ABRANTES; NOGUEIRA, 2017).

As classes A, C e D são enzimas de sítio ativo serina chamadas serina β -lactamases (SBLs). A classe B compreende um grupo heterogêneo de metaloenzimas de zinco chamadas Metallo- β -lactamases (MBLs) (ABRANTES; NOGUEIRA, 2017).

2 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

De acordo com Primon-Barros e Macedo (2017), a descoberta de peptídeos antimicrobianos em organismos multicelulares teve início com a observação da atividade antimicrobiana a partir da hemolinfa de pupas das mariposas *Samia isulph* e *Hyalophora cecropia*, na década de 1970. A cecropina foi o primeiro AMP purificado, na década de 1980. A partir da descoberta, mais de 150 AMPs foram identificados a partir de insetos. Esses peptídeos, de modo geral, fazem parte da defesa natural desses organismos contra patógenos bacterianos (YI *et al.*, 2014). Embora não haja uma definição formal para o termo peptídeo, é comum caracterizá-los como sequências de aminoácidos não longas (de até 50 aminoácidos) com pouca estrutura secundária. Moléculas com maior número de aminoácidos, passam a ser denominadas proteínas. Esses aminoácidos, estão ligados entre si por meio de ligações peptídicas. Devido ao fato de conter aminoácidos de tipos diferentes e em diferentes sequências, cada peptídeo possui uma característica exclusiva. A diversidade de aminoácidos e as diversas possibilidades de combinações são características que fazem com que os peptídeos tornem-se atraentes para estudos bio-orgânicos e moleculares, inclusive como antimicrobianos (NUTI *et al.*, 2017). Na última década, houve um crescente interesse por peptídeos com ação antimicrobiana natural, que podem estar presentes nos organismos vivos. Estes antimicrobianos podem potencialmente auxiliar no tratamento de grande número de infecções causadas por bactérias, fungos, parasitas e vírus. Alguns desses peptídeos encontram-se em uso clínico e em estudos bastante avançados. Além disso, cerca de dez dos antibióticos em uso atualmente possuem natureza peptídica (RIBEIRO, 2016).

Os peptídeos antimicrobianos (PAM) podem ser naturais ou sintéticos. Naturalmente, são produzidos por células específicas como mecanismo de defesa contra patógenos e são encontrados principalmente nos órgãos com maior exposição a agentes infecciosos como, por exemplo, a pele. De modo bastante geral, os PAMs apresentam como característica, natureza anfipática com carga positiva em pH fisiológico. São conhecidas quatro estruturas secundárias para os PAMs, a saber, estendida, loop, folha β , e hélice α (NUTI *et al.*, 2017). Acredita-se que a maioria dos peptídeos age atacando a membrana plasmática da célula bacteriana, o que faz com que ocorra a morte celular em um tempo relativamente curto. Podem ser citados três principais modelos do mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos, o modelo

barril, o de tapete e o modelo de poro toroidal. No modelo barril ocorre a interação entre a face hidrofóbica dos peptídeos com os lipídeos da membrana da célula alvo, de modo a ocorrer o processo de formação de um canal transmembrana com estrutura semelhante a um barril formando poros (CARVALHO; MACHINI, 2013). Como exemplo de drogas peptídicas que possuem ação por esse mecanismo, estão a ceratotoxina e alamectina. Esse modelo foi proposto primeiramente por Ehresntein e Lecar em 1977 (NUTI *et al.*, 2017). A ceratotoxina A (CtxA) é um peptídeo antimicrobiano derivado de inseto. É composta por 36 resíduos de aminoácidos, que formam poros com estado de condutância bem definidos (MAYER *et al.*, 2019). A alamectina é uma sequência de 19 aminoácidos e sua ação baseia-se na formação de feixes helicoidais que atravessam a membrana (MEMARIANI *et al.*, 2020; SALNIKOV *et al.*, 2016). No modelo de tapete, ocorre a interação entre os PAMs carregados positivamente com a membrana de carga negativa. Os peptídeos acumulam-se na superfície da membrana celular formando um “tapete” e, ao atingirem determinada concentração, penetram na membrana causando lise celular. O modelo de poro toroidal, sugere que ocorre uma interação eletrostática onde os PAMs se unem paralelamente a membrana da célula. O peptídeo então separa as cabeças dos fosfolipídeos e induz a monocamada lipídica superior a dobrar-se através do poro. Neste modelo, o interior do poro é formado por moléculas de peptídeos intercaladas às cabeças dos fosfolipídeos (CARVALHO; MACHINI, 2013). Uma das principais diferenças em relação ao modelo barril é que no modelo de tapete existe uma interação do peptídeo carregado positivamente com a membrana de carga negativa. Um quarto modelo proposto para uma pequena porção dos peptídeos antimicrobianos são as proteínas como alvo, onde estes fragmentos podem ter ação por meio de inibição da síntese de proteínas vitais para o funcionamento da célula (NUTI *et al.*, 2017).

Apesar de necessitarem de aprimoramento, os peptídeos microbianos são moléculas bastante promissoras. Possuem imunogenicidade inferior quando comparados às proteínas ou anticorpos recombinantes, além de terem maior capacidade de penetração associada ao seu tamanho reduzido. Devido aos seus mecanismos de ação inespecíficos, são menos vulneráveis ao desenvolvimento de resistência. Esses são alguns dos pontos positivos que impulsionam o interesse nos estudos dos PAMs enquanto opções terapêuticas (MAYER *et al.*, 2019). Porém, ainda

existem barreiras a serem ultrapassadas no que diz respeito ao uso dos PAMs como alternativa de tratamento. Existe indução de toxicidade da célula hospedeira, baixa estabilidade e sua produção em larga escala demanda alto investimento. São extremamente sensíveis a proteases, apresentam alta depuração renal e hepática, e possuem baixa biodisponibilidade, o que se torna um problema para administração oral. Sua inespecificidade também acaba sendo um problema quando existe necessidade de alvos direcionados (MEMARIANI *et al.*, 2020). Os pontos mencionados, abrem ampla janela à bioengenharia com objetivo de melhoramento e otimização destas moléculas. Um exemplo são os conjugados com a finalidade de aumentar sua eficácia (MAYER *et al.*, 2019).

Nas últimas décadas, surgiu o interesse em explorar os venenos de animais como fonte de moléculas biologicamente ativas para desenvolvimento de novas terapias, uma vez que os venenos consistem em uma mistura de moléculas complexa (PRIMON-BARROS; JOSÉ MACEDO, 2017). Peptídeos antimicrobianos derivados de veneno de aranhas e escorpiões foram identificados pela primeira vez na década de 1990. As liotoxinas I e II são os primeiros PAMs de aranha, isolados do veneno da aranha-lobo, *Lycosa carolinensis*. Shin e colaboradores (2016) propõem que esses peptídeos desempenhem papel duplo. Primeiramente, auxiliam no processo predatório como toxinas e, como uma segunda função, auxiliam na proteção dos animais contra infecções agindo como antimicrobianos. De acordo com os dados, nenhum dos peptídeos mostra ação contra *Mycobacterium* spp., assim como não constam registros de peptídeos isolados das aranhas do gênero *Loxosceles* spp.

Com o crescente interesse em torno do tema, houve o desenvolvimento e aprimoramento de ferramentas e a criação de bancos de dados específicos (YI *et al.*, 2014). O *Antimicrobial Peptide Database* (APD), é um banco de dados de peptídeos antimicrobianos que conta com 3.283 peptídeos registrados até o momento. De acordo com os dados levantados a partir deste banco, existem atualmente 44 peptídeos de veneno de aranha, os quais foram listados no QUADRO 4. De acordo com informação disponível em <<https://aps.unmc.edu/home>> a última atualização do banco de dados foi em 18 de outubro de 2021 (WANG; LI; WANG, 2016).

QUADRO 4 – PEPTÍDEOS DERIVADOS DO VENENO DE ARANHA

Ano	Peptídeos	Gênero e espécie de origem	Espectro de ação	Referência
1998	Lycotoxins I e II	<i>Lycosa carolinensis</i>	Anti-Gram + e Gram -, antifúngico, candidacida, inseticida, anti-MRSA, inibidor de enzima	YAN; ADAMS., 1998
2000	Gomesin (2S – S)	<i>Acanthoscurria gomesiana</i>	Anti-Gram + e Gram -, antifúngico, candidacida, antiparasitário, antimalárico, hemolítico, anticâncer	SILVA; DAFFRE; BULET., 2000
2002	Cupiennins 1 ^a -1d	<i>Cupiennius salei</i>	Anti-Gram + e Gram -, antiparasitário, inseticida, hemolítico, anticâncer	KUHN-NENTWIG <i>et al.</i> , 2002
	Oxiopinin 1, 2 ^a -2d	<i>Oxyopes kitabensis</i>	Anti-Gram + e Gram -, hemolítico	CORZO <i>et al.</i> , 2002
2003	Acanthoscurrin 1 e 2 (rico em Gly)	<i>Acanthoscurria gomesiana</i>	Anti-Gram -, antifúngico, candidacida	LORENZINI <i>et al.</i> , 2003
2004	Lycocitin 1 e 2	<i>Lycosa singorensis</i>	Anti-Gram + e Gram -, antifúngico	BUDNIK <i>et al.</i> , 2004
	Psalmopeotoxinas I e II (3S – S)	<i>Psalmopoeus cambridgei</i>	Antiparasitário, antimalárico	CHOI <i>et al.</i> , 2004
2006	Latarcins	<i>Lachesana tarabaevi</i>	Anti-Gram + e Gram -, antiviral, antifúngico, hemolítico	KOZLOV <i>et al.</i> , 2006
2008	Cyto-insetotoxin 1 ^a	<i>Lachesana tarabaevi</i>	Anti-Gram + e Gram -, inseticida	VASSILEVSKI <i>et al.</i> , 2008
2010	LyeTx I	<i>Lycosa erythrognatha</i>	Anti-Gram + e Gram -, antifúngico	SANTOS <i>et al.</i> , 2010
	Ctenidinas 1 e 2	<i>Cupiennius salei</i>	Anti-Gram -	BAUMANN <i>et al.</i> , 2010
2011	Oxyopinin 4 ^a (1S-S)	<i>Oxyopes takobius</i>	Anti-Gram + e Gram -, hemolítico	DUBOVSKII <i>et al.</i> , 2011
	Oh-defensina (3S – S)	<i>Ornithoctonus hainana</i>	Anti-Gram + e Gram -, antifúngico, candidacida	ZHAO <i>et al.</i> , 2011
2012	Lycosin I	<i>Lycosa singorensis</i>	Anti-Gram + e Gram -, antifúngico, candidacida, antiparasitário, hemolítico, anticâncer	LIU <i>et al.</i> , 2012
	Rondonin	<i>Eurypelma californicum</i> e <i>Acanthoscurria gomesiana</i>	Antiviral, antifúngico, candidacida	RICILUCA <i>et al.</i> , 2012
	Juruin (3S-S)	<i>Avicularia juruensis</i>	Antifúngico, candidacida	AYROZA <i>et al.</i> , 2012
2013	Iatartoxin 1 ^a (4S – S)	<i>Lachesana tarabaevi</i>	Anti-Gram +, inseticida	KUZMENKOV <i>et al.</i> , 2013
	Spiderine OtTx1a (5S – S)	<i>Oxyopes takobius</i>	Anti-Gram + e Gram -, inseticida	VASSILEVSKI <i>et al.</i> , 2013
2016	Lycosin II	<i>Lycosa singorensis</i>	Anti-Gram + e Gram -	WANG <i>et al.</i> , 2016

FONTE: A autora (2021).

2.1 ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles* COMO FONTE INEXPLORADA DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

As aranhas do gênero *Loxosceles* são popularmente conhecidas no Brasil como aranha marrom. Estão amplamente distribuídas ao redor do mundo compreendendo cerca de 140 espécies. O gênero de forma geral não é agressivo, mas, ainda assim, há registros de casos de acidentes envolvendo picadas em humanos. O quadro clínico em função do envenenamento que decorre da picada da aranha do gênero *Loxosceles* é chamado loxoscelismo, e é caracterizado por lesão dermonecrotica com propagação gravitacional, podendo ocorrer manifestações sistêmicas que incluem disfunções renais e hematológicas. Estudos com exposição de pele de coelho ao veneno bruto revelam um quadro de necrose coagulativa asséptica (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2020).

Com base na análise proteômica e transcriptômica, os venenos são compostos principalmente de peptídeos de baixa massa molecular, proteínas e glicoproteínas enriquecidas com moléculas de peso molecular na faixa de 5–40 kDa (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2019). As esfingomielinases-D (SMD) de *Loxosceles*, mais tarde referidas como fosfolipases-D (PLDs), são conhecidas por serem um dos principais componentes dos venenos de *Loxosceles*, e são a família de toxinas mais bem caracterizada em venenos de aranha marrom. Outros dois grupos significativamente presentes no veneno são as metaloproteases semelhantes à astacina e os peptídeos *Inhibitor Cystine Knot* (ICK). As fosfolipases-D representam um alvo para a descoberta de drogas contra o loxoscelismo. As metaloproteases semelhantes a astacina apresentam atividade proteolítica e estão ligadas aos efeitos hemostáticos no loxoscelismo. Por fim os peptídeos ICK são caracteristicamente neurotóxicos e estão ligados ao fato de paralisar a presa ou predadores (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2017). Os venenos de aranha, em particular aqueles do gênero *Loxosceles*, vêm sendo pesquisados em diferentes frentes de aplicação geral, exemplificadas no QUADRO 5.

QUADRO 5 – APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DO VENENO DA ARANHA *Loxosceles* spp.

Proposta	Aplicação	Referência
ARACHnase (Hemostasis Diagnostics International Co., Denver, CO)	Plasma contendo um extrato de veneno da aranha <i>Loxosceles reclusa</i> , que imita a presença de um anticoagulante lúpico (AL)	MCGLASSON <i>et al.</i> , 1993
Antissoro	Produção do soro hiperimune usado como antissoro para vítimas de acidentes.	BARBARO; EICKSTEDT; MOTA., 1994
Diagnóstico de loxoscelismo	Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para detecção de antígenos do veneno da aranha <i>Loxosceles intermedia</i>	CHÁVEZ-OLÓRTEGUI <i>et al.</i> , 1998
Bioinseticida	Investigação da presença de toxinas inseticidas no veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> contra o inseto <i>Spodoptera frugiperda</i>	DE CASTRO <i>et al.</i> , 2004
Ferramenta de pesquisa em biologia celular	Utilizado como modelo de lesão de tecido	LUCIANO <i>et al.</i> , 2004

FONTE: A autora (2021).

A necessidade de novas alternativas para o tratamento de doenças infecciosas, somado a dificuldades de descoberta de novas classes de antimicrobianos, são incentivos para a busca de novas abordagens como a pesquisa e desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos. A metodologia pode ser facilitada pelas ferramentas *in silico*, disponíveis em bancos de dados e algoritmos de previsão. O fato do veneno da aranha *Loxosceles intermedia*, uma espécie amplamente distribuída na América Latina, inclusive no Brasil, não ter sido explorado como fonte de peptídeos antimicrobianos abre um leque de possibilidades que foram exploradas neste trabalho. A pesquisa que teve como resultado a patente “Peptídeo sintético P.LOX5 com ação antibacteriana” está descrita no Capítulo 2.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, J. A.; NOGUEIRA, J. M. R. Utilização de testes fenotípicos para a pesquisa de carbapenamases em enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [s. l.], v. 49, n. 3, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21877/2448-3877.201700607>.
- AYROZA, G. *et al.* Juruin: an antifungal peptide from the venom of the Amazonian Pink Toe spider, *Avicularia juruensis*, which contains the inhibitory isulphi knot motif. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 3, p. 324, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00324>
- BAUMANN, T. *et al.* Ctenidins: antimicrobial glycine-rich peptides from the hemocytes of the spider *Cupiennius salei*. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, Switzerland, v. 67, n. 16, p. 2787–2798, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0364-0>
- BARBARO, K. C.; EICKSTEDT, V. R.D.; MOTA, I. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles (araneae)* species in Brazil. **Toxicon**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 113–120, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90027-2)
- BUDNIK, B. A. *et al.* De novo sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolf spider *Lycosa singoriensis*. **Journal of mass spectrometry: JMS**, England, v. 39, n. 2, p. 193–201, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jms.577>
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tuberculose 2021. Boletim Epidemiológico**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 44, 2021.
- CARVALHO, L. A. C.; MACHINI, M. T. Hemocidinas derivadas da hemoglobina: Estruturas, propriedades e perspectivas. **Química Nova**, [s. l.], v. 36, n. 7, p. 1021–1029, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000700017>
- CHAVES-MOREIRA, D. *et al.* Brown Spider (*Loxosceles*) Venom Toxins as Potential Biotoools for the Development of Novel Therapeutics. **Toxins**, [s. l.], v. 11, n. 6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins11060355>.
- CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. *et al.* ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. **Toxicon**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 563–569, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00159-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00159-1)
- CHOI, S. *et al.* Isolation and characterization of Psalmopeotoxin I and II: two novel antimalarial peptides from the venom of the tarantula *Psalmopoeus cambridgei*. **FEBS letters**, England, v. 572, n. 1–3, p. 109–117, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.019>
- CORZO, G. *et al.* Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the venom of

the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 277, n. 26, p. 23627–23637, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M200511200>

CRISTINA DA SILVA, K.; LINCOPAN, N. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Brazil: clinical impact and implications for agribusiness. **Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 91–99, 2012. Disponível em: <http://doi.org/10.1590/s1676-24442012000200004>.

D’COSTA, V. M. *et al.* Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, [s. l.], v. 477, n. 7365, p. 457–461, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature10388>.

DE CASTRO, C. S. *et al.* Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 273–280, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.028>

DE OLIVEIRA, D. M. P. *et al.* Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 1–49, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>.

DUBOVSKII, P. V. *et al.* Novel lynx spider toxin shares common molecular architecture with defense peptides from frog skin. **The FEBS journal**, England, v. 278, n. 22, p. 4382–4393, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08361.x>

FADER, R. C.; ENGELKIRK, P. G.; DUBEN-ENGELKIRK, J. **Burton Microbiologia para as Ciências da Saúde**. 11. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

GOLAN, D. E. *et al.* **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia**. 3. Ed. [S. l.]: Guanabara Koogan, 2018.

HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 51, p. 72–80, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.

JACOBS, M. G.; PINTO-JUNIOR, V. L. Caracterização da tuberculose drogarresistente no Brasil, 2014. **Epidemiologia e Saúde**: revista do Sistema © de Saude do Brasil, [s. l.], v. 28, n. 3, p. e2018294, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742019000300014>.

KOZLOV, S. A. *et al.* Latareins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaei* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 281, n. 30, p. 20983–20992, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M602168200>

KUHN-NENTWIG, L. *et al.* Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 277, n. 13, p. 11208–11216, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111099200>.

KUZMENKOV, A. I. *et al.* Cysteine-rich toxins from *Lachesana tarabaevi* spider venom with amphiphilic C-terminal segments. **Biochimica et biophysica acta**, Netherlands, v. 1828, n. 2, p. 724–731, 2013. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.10.014>

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 13. Ed. Porto Alegre: AMDH editora, 2016.

LORENZINI, D. M. *et al.* Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*.

Developmental and comparative immunology, United States, v. 27, n. 9, p. 781–791, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(03\)00058-2](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(03)00058-2)

LUCIANO, M. N. *et al.* Experimental Evidence for a Direct Cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown Spider) Venom in Renal Tissue. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 455–467, 2004. Disponível em:

<https://doi.org/10.1177/002215540405200404>

LIU, Z *et al.* A novel spider peptide toxin suppresses tumor growth through dual isulphide pathways. **Current molecular medicine**, Netherlands, v. 12, n. 10, p. 1350–1360, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/156652412803833643>

MCGLASSON, D. L. *et al.* Arachnase an evaluation of a positive control for platelet neutralization procedure testing with seven commercial activated partial thromboplastin time reagents. **American Journal of Clinical Pathology**, n. 100, p. 576–578, 1993. Disponível em: doi: 10.1093/ajcp/100.5.57

LOPES, P. H. *et al.* Clinical aspects, diagnosis and management of *Loxosceles* spider envenomation: literature and case review. **Archives of toxicology**, Germany, v. 94, n. 5, p. 1461–1477, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02719-0>.

LORENZINI, D. M. *et al.* Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Developmental and comparative immunology**, United States, v. 27, n. 9, p. 781–791, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(03\)00058-2](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(03)00058-2).

MANAVALAN, B. *et al.* AtbPpred: A Robust Sequence-Based Prediction of Anti-Tubercular Peptides Using Extremely Randomized Trees. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 17, p. 972–981, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.06.024>.

MAYER, S. F. *et al.* Targeting specific membranes with an azide derivative of the pore-forming peptide ceratotoxin A. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, [s. l.], v. 1861, n. 10, p. 183023, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.07.011>.

MCGLASSON, D. L. *et al.* 1 1 2 3. [s. l.], p. 576–578, 1993.

MEMARIANI, H. *et al.* Anti-Staphylococcal and cytotoxic activities of the short anti-

microbial peptide PVP. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 36, n. 11, p. 1–14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02948-6>.

MORSE, S. S. Factors in the emergence of infectious diseases. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 7–15, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid0101.950102>

NUTI, R. *et al.* Antimicrobial Peptides: A Promising Therapeutic Strategy in Tackling Antimicrobial Resistance. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 24, n. 38, p. 4303–4314, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0929867324666170815102441>.

OPLUSTIL, C. P. *et al.* **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 4. Ed. São Paulo: Sarvier, 2020.

PERRY, J.; WAGLECHNER, N.; WRIGHT, G. The prehistory of antibiotic resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 1–8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025197>.

PRIMON-BARROS, M.; JOSÉ-MACEDO, A. Animal Venom Peptides: Potential for New Antimicrobial Agents. **Current topics in medicinal chemistry**, United Arab Emirates, v. 17, n. 10, p. 1119–1156, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1568026616666160930151242>.

PUENTES, P. R. *et al.* Design, screening, and testing of non-rational peptide libraries with antimicrobial activity: In silico and experimental approaches. **Antibiotics**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 1–41, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120854>.

RIBEIRO, R. R. **Biotecnologia aplicada à Saúde: fundamentos e aplicações**. 3. Ed. São Paulo: Blusher, 2016.

RICILUCA, K. C. T. *et al.* Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. **Results in immunology**, [s. l.], v. 2, p. 66–71, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rinim.2012.03.001>

SALNIKOV, E. S. *et al.* Alamethicin Supramolecular Organization in Lipid Membranes from 19F Solid-State NMR. **Biophysical Journal**, [s. l.], v. 111, n. 11, p. 2450–2459, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.09.048>.

SANTOS, D. M. *et al.* LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. **Amino acids**, v. 39, n. 1, p. 135–144, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0385-x>

SHIN, J. M. *et al.* Biomedical applications of nisin. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 120, n. 6, p. 1449–1465, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.13033>.

SILVA, P. I.; DAFFRE, S.; BULET, 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**, United States, v. 275, n. 43, p. 33464–33470, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M001491200>.

TOOKE, C. L. *et al.* β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 431, n. 18, p. 3472–3500, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>.

TREVISAN-SILVA, D. *et al.* A multi-protease, multi-dissociation, bottom-up-to-top-down proteomic view of the *Loxosceles intermedia* venom. **Scientific data**, [s. l.], v. 4, p. 170090, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sdata.2017.90>.

VASSILEVSKI, A. A. *et al.* Cyto-insectotoxins, a novel class of cytolytic and insecticidal peptides from spider venom. **The Biochemical journal**, England, v. 411, n. 3, p. 687–696, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj20071123>

VASSILEVSKI, A. A. *et al.* Spider toxins comprising β -disulphide-rich and linear amphipathic domains: a new class of molecules identified in the lynx spider *Oxyopes takobius*. **The FEBS journal**, England, v. 280, n. 23, p. 6247–6261, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/febs.12547>

VERNON, G. Syphilis and Salvarsan. **British Journal of General Practice**, [s. l.], v. 69, n. 682, 2019. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.3399%2Fbjgp19X702533>.

WAGHU, F. H. *et al.* CAMPR3: A database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. D1, p. 1094–1097, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1051>.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. D1, p. 1087–1093, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. D1, p. D1087–D1093, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>

World Health Organization (WHO). The top 10 causes of death. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

YAHAV, D. *et al.* New β -lactam– β -lactamase inhibitor combinations. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 1–61, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00115-20>.

YAN, L.; ADAMS, M. E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 273, n. 4, p. 2059–2066, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2059>.

YANG, B. *et al.* Overview of antibiotic resistance genes database. **Shengwu Gongcheng Xuebao/Chinese Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 36, n. 12, p.2582–2597, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.13345/j.cjb.200375>.

YI, H. Y. *et al.* Insect antimicrobial peptides and their applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 98, n. 13, p. 5807–5822, 2014.

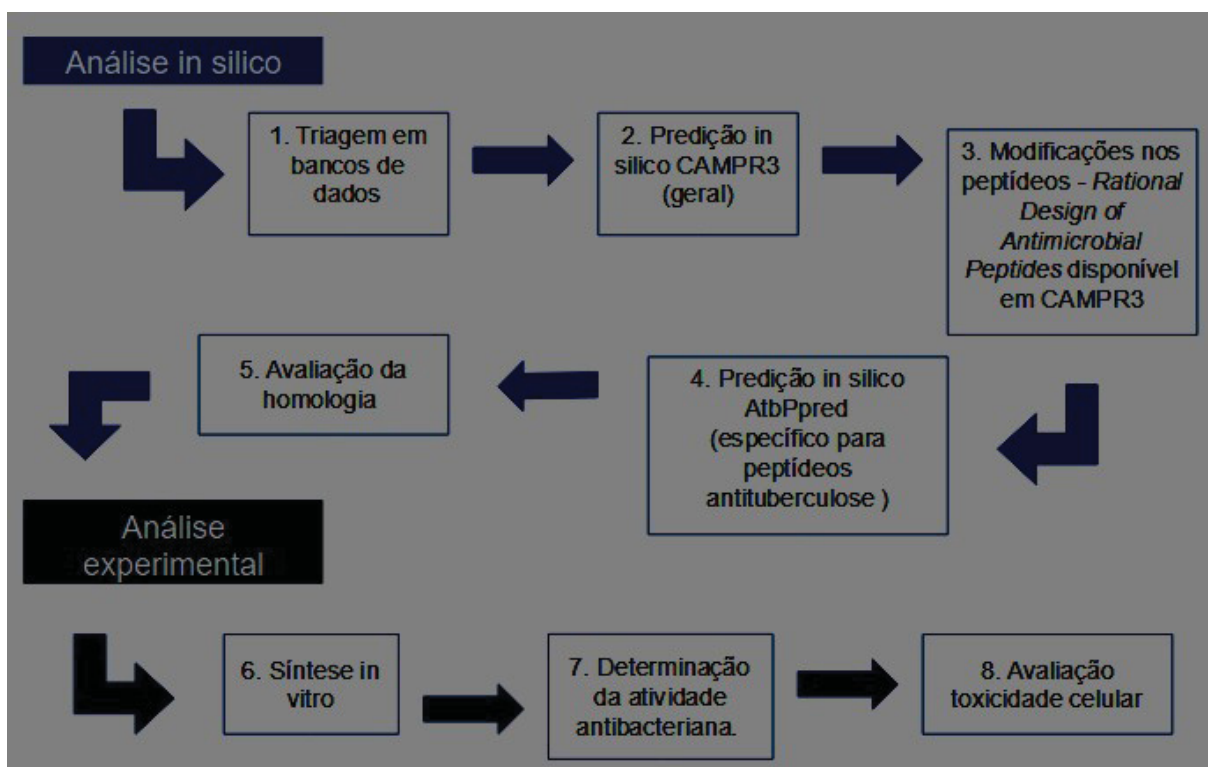
ZAHAA.; FERREIRA H. B.; PASSAGLIA L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ZHAO, H. *et al.* A defensin-like antimicrobial peptide from the venoms of spider, *Ornithoctonus hainana*. **Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society**, England, v. 17, n. 7, p. 540–544, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/psc.1370>

CAPÍTULO 2: METODOLOGIAS E RESULTADOS

Para melhor compreensão neste capítulo será apresentada a metodologia usada para a seleção de peptídeos. As análises estão divididas em duas fases. A primeira delas é a **análise in silico**, na qual foram selecionados os peptídeos promissores como antibacterianos. Na fase dois, **análise experimental**, os peptídeos foram sintetizados e testados frente a linhagens bacterianas. A Figura 1 mostra o fluxograma empregado no trabalho.

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA DE METODOLOGIA DE ANÁLISE



FONTE: A autora (2021).

1 ANÁLISE IN SILICO

Como consequência do avanço das pesquisas em peptídeos antimicrobianos, surgiram ferramentas de triagem in silico específicas como facilitadoras nas primeiras etapas. Entre as ferramentas existem abordagens racionais e não racionais. Três são os métodos principais para o design racional. O primeiro deles é o Model-based Design (MDB), que visa adicionar seletividade ou aumentar a atividade de uma

sequência de peptídeo conhecida, por meio da inclusão de aminoácidos ou alterando a posição dos mesmos. O segundo método, trata-se do projeto físico-químico, que gera análogos com diferentes propriedades físico-químicas de sequências conhecidas. O terceiro, denominado Método *de novo* cria novos peptídeos baseados na identificação de padrões de sequência, posições de resíduos cruciais e frequências de aminoácidos em peptídeos antimicrobianos conhecidos. No presente trabalho foram utilizados três recursos de pesquisa *in silico* (PUENTES *et al.*, 2020).

O primeiro recurso utilizado foi a busca realizada na biblioteca de proteínas do NCBI – National Center for Biotechnology Information, disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Por meio do site, o NCBI promove a ciência e a saúde, fornecendo acesso a informações biomédicas e genômicas. A biblioteca de proteínas reúne os dados das seguintes bases de dados APO, GenBank, UniProtKB/Swiss-Prot. Com este recurso foram selecionadas as sequências, descritas no QUADRO 1, a partir das quais foram desenvolvidas as etapas posteriores.

QUADRO 1 – SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS DE *Loxosceles intermedia*.

(continua)

Tamanho da sequência de aminoácidos	Proteína	Identificação
105	Toxina 2	AAT85611.1
243	Toxina 3 de metaloprotease semelhante a Astacina	ACV52011.1
400	Hialuronidase	AGH25912.1
256	Prec. Da toxina 2 de metaloprotease semelhante à Astacina	ACT52010.1
264	Toxina 1 de metaloprotease tipo Astacina	ABK20019.1
		(continuação)
Tamanho da sequência	Proteína	Identificação

306	Loxtox i1	ABU43329.1
310	Loxtox i5	ABU43333.1
86	U2-sicaritoxina-Li1a (Toxina 3)	AAT85612.1
101	U1-sicaritoxina-Li1a (Toxina 1)	AAT85610.1
306	Toxina dermonecrótica LiSicTox-alphaA1a (isoforma da toxina dermonecrótica 1)	ABA62021.1
285	Toxina dermonecrótica LiSicTox-alphaA2aai (isoforma 2 da toxina dermonecrótica)	ABB69098.1
305	Dermonecrotic toxin LiSicTox-alpha11 (Dermonecrotic toxin isoform 4)	ABD91846.1
305	Dermonecrotic toxin LiSicTox-beta1D (dermonecrotic toxin isoform 5)	ABD91847.1
299	Dermonecrotic toxin LiSicTox-alphaVA1 (dermonecrotic toxin isoform 7)	AGN52903.1
304	Dermonecrotic toxin LiSicTox-beta1A1 (dermonecrotic toxin isoform 3)	ABB71184.1
81	U1-sicaritoxin-Li1c (toxin 4)	ABD48090.1
307	Dermonecrotic toxin LiSicTox-alphaV1 (dermonecrotic toxin isoform 6)	ABO87656.1
256	astacin-like metalloprotease toxin 2 precursor	ACV52010.1
33	35 kda dermonecrotic toxin	AAB50795.1
299	Dermonecrotic toxin LiSicTox-alphaVA1 (dermonecrotic toxin isoform 7)	AGN52903.1
306	Dermonecrotic toxin LiSicTox-alphaA1bi	P0CE81.1
		(continuação)
Tamanho da sequência	Proteína	Identificação

302	Dermonecrotic toxin LiSicTox-alphaA1bii (loxtox i4)	ABU43332.1
306	Dermonecrotic toxin LiSicTox-alphaA2ai	P0CE83.1
3105	Dermonecrotic toxin LiSicTox-alphaA2aiii (loxtox i3)	ABU43331.1
302	Dermonecrotic toxin LiSicTox-alphaA2bii (loxtox i2)	ABU43330.1
304	dermonecrotic protein-like II	ABD48089.1
	Dermonecrotic toxin LiSicTox-betaA1ii (loxtox i7)	ABU43335.1
33	Dermonecrotic toxin LiSicTox-alpha-1	P0C2L0.2
86	U2-sicaritoxin-Li1b	P0DMD8.1

FONTE: A autora (2021).

As sequências selecionadas foram triadas por meio da ferramenta *Prediction for Antimicrobial Peptide – Predict Antimicrobial region within Peptides* disponível de forma gratuita no site Camp R3 – *Collection of Anti-Microbial Peptides*, disponível em < <http://www.camp.bicnirrh.res.in/index.php>>. Essa ferramenta permite a previsão de AMP ou uma região antimicrobiana dentro de peptídeos. Trata-se de uma ferramenta racional que faz projeções gerando combinações para uma sequência definida pelo usuário. Para cada sequência o algoritmo determina um score que vai de 0.000 até 1.000 e classifica como antimicrobiano (AMP) ou não antimicrobiano (NAMP).

Foram realizadas substituições de resíduos únicos para melhorar a atividade antimicrobiana, nas sequências dos peptídeos naturais selecionados. As modificações foram selecionadas a partir do recurso *Rational Design of Antimicrobial Peptides* disponível em CampR3 (WAGHU *et al.*, 2016). As sequências selecionadas passaram por uma terceira fase de triagem na ferramenta AtbPpred disponível em <<http://thegleelab.org/AtbPpred/index.html>>. Foram selecionados intencionalmente peptídeos entre 5 e 25 aminoácidos devido a limitação na etapa de síntese. O AtbPpred é um servidor com base na Web para previsão de antimicrobianos específico para peptídeos antituberculose. De acordo com Manavalan e

colaboradores (2019), as diferenças entre peptídeos com ação anti-bacteriana ou não, podem ser mostradas por fatores nas sequências de aminoácidos, incluindo perfis, composição, permutação e modos de combinação de aminoácidos e propriedades físico-químicas. Esses fatores podem ser identificados por ferramentas de bioinformática chamadas de codificações de recurso, como por exemplo, composição de aminoácidos (AAC), que mostra a ocorrência de aminoácidos padrão; Composição dipeptídica (DPC), que mostra a composição de um par de resíduos (por exemplo, Ala-Ala, Ala-Cys) ocorrendo em um determinado peptídeo; Composição de tripeptídeo agrupado (GTPC), onde os aminoácidos são divididos em categorias de acordo com suas propriedades físico-químicas. No servidor AtbPpred foram utilizadas nove diferentes codificações. Os resultados obtidos na classificação de recursos foram aplicados em árvores extremamente aleatórias (ERT), outra ferramenta de bioinformática, que se trata basicamente de um método de aprendizado de máquinas para classificação.

A partir dos resultados obtidos por meio de ferramentas de triagem in silico, TABELA 1, os cinco peptídeos com melhor resultado na soma do score obtido no AtbPpred, foram selecionados para seguir para as etapas seguintes. Os peptídeos selecionados foram os de número 7, 9, 10, 13 e 15. Para a continuidade do trabalho os peptídeos foram identificados de forma que o peptídeo 7 passou a ser P.1, o peptídeo 9 passou a ser P.2, o peptídeo 10 passou a ser P.3, o peptídeo 13 passou a ser P.4 e o peptídeo 15 passou a ser P.5.

TABELA 1 – SCORE DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS A PARTIR DAS FERRAMENTAS DE TRIAGEM IN SILICO.

(continua)

Número	Camp R3 Score	AtbPpred Score		
		AntiTB – RD	AntiTB – MD	Soma
1	0,958	0,858	0,514	1.372
2	0,982	0,587	Non-AtbP	0,587
3	0,988	0,606	Non-AtbP	0,606

(continuação)

Número	Camp R3	AtbPpred Score		
--------	---------	----------------	--	--

	Score	AntiTB – RD	AntiTB – MD	Soma
4	0,988	0,605	Non-AtbP	0,605
5	0,942	0,839	0,507	1.346
6	0,958	0,858	0,514	1.379
7	0,777	0,535	0,882	1.417
8	0,985	0,504	Non-AtbP	0,504
9	0,898	0,793	0,771	1.564
10	0,993	0,863	0,707	1.570
11	0,829	0,503	Non-AtbP	0,503
12	0,942	0,839	0,507	1.346
13	0,931	0,864	0,546	1.410
14	0,958	0,858	0,514	1.372
15	0,949	0,85	0,539	1.389

FONTE: A autora (2021).

Na etapa seguinte os peptídeos foram avaliados quanto a homologia, relação da sequência de aminoácidos a outras patentes por meio do algoritmo BLASTp (ALTSCHUL, 1997) na base de dados “Sequência de proteínas patenteadas (pataa)”

TABELA 2.

TABELA 2 – SIMILARIDADE COM SEQUÊNCIAS JÁ PATENTEADAS

(continua)

Número da sequência	Descrição	Cobertura	Identidade
	Sequência 13 – patente US8287860	97%	73,47%
Sequência 7	Sequência 11 – patente US8287860	97%	79,39%
	Sequência 30 – patente US8287860	97%	79,39%
	Sequência 30 – patente US8287860	96%	75,00%
Sequência 9	Sequência 11 – patente US8287860	96%	75,00%

(continuação)

Número da sequência	Descrição	Cobertura	Identidade
----------------------------	------------------	------------------	-------------------

Sequência 9	Sequência 28 – patente US8287860	96%	75,00%
	Sequência 189 – patente US8431128	57%	87,50%
Sequência 10	Sequência 13 – patente US5955258	57%	87,50%
	Sequência 6557 – patente US6617156	57%	87,50%
	Sequência 13 – patente US8287860	100%	92,00%
Sequência 13	Sequência 30—patente US8287860	100%	88,00%
	Sequência 11 – patente US8287860	100%	88,00%
Sequência 15	Corresponde ao P.LOX5 (Capítulo 3)		

FONTE: A autora (2021).

A patente US8287860 protege a tecnologia de isolamento, caracterização e expressão de fragmentos de DNA que codificam as esfingomielinases D de *Loxosceles boneti*, *Loxosceles reclusa* e *Loxosceles lateae* os seus toxóides. Também a produção de esfingomielinases D ativas e seus toxóides usando meios recombinantes e o uso das mesmas como um imunógeno para a produção, em vertebrados, de anticorpos neutralizantes do veneno correspondente. Uso de esfingomielinases D recombinantes como parte de uma matriz de antígeno que pode ser usada na imunopurificação de anticorpos e seus fragmentos ou como parte de qualquer dispositivo de diagnóstico usado para obter confirmação clínica de que o agente causal de envenenamento em um paciente é uma aranha do gênero *Loxosceles*. A invenção inclui também vetores moleculares para a expressão dos fragmentos de DNA, cepas compreendendo os mesmos, que podem expressar *Esfingomielinases D* de *Loxosceles* e métodos para expressão. A patente US6617156 protege polipeptídeos isolados e sequências de ácido nucleico derivadas de *Enterococcus faecalis* que são úteis no diagnóstico e terapia. A patente US5955258 protege um material polimérico, sendo totalmente discrepante em relação a esta pesquisa. A patente US8431128 protege a tecnologia referente a antígenos hiperimunes obtidos a partir de *Enterococcus faecalis*. O presente trabalho propõe um peptídeo antibacteriano desenvolvido a partir de proteína do veneno de *Loxosceles intermedia*, e inclui em seu espectro ação contra *Mycobacterium tuberculosis*. Nenhuma das patentes mencionadas reivindica peptídeos derivados especificamente do veneno de *Loxosceles intermedia* ou mesmo ação contra *M. tuberculosis*.

Os peptídeos foram avaliados quanto a homologia, em relação a sequências naturais por meio da ferramenta BLASTp na base de dados “Sequências de proteínas não redundantes (nr)”. A TABELA 3 traz o resultado da busca mostrando as três sequências naturais com maior similaridade que variou de 72,92 a 96%.

TABELA 3 – SIMILARIDADE COM SEQUÊNCIAS NATURAIS

Número da sequência	Organismo	Cobertura	Identidade
	<i>Loxosceles intermedia</i>	100%	91,84%
Sequência 7	<i>Loxosceles apachea</i>	100%	75,51%
	<i>Loxosceles spadicea</i>	97%	72,92%
	<i>Loxosceles intermedia</i>	100%	96,00%
Sequência 9	<i>Loxosceles arizonica</i>	100%	80,00%
	<i>Loxosceles similis</i>	100%	80,00%
	<i>Loxosceles intermedia</i>	100%	92,86%
Sequência 10	<i>Bacili bacterium</i>	78%	81,82%
	<i>Manduca sexta</i>	78%	81,82%
	<i>Loxosceles intermedia</i>	100%	96,00%
Sequência 13	<i>Loxosceles arizonica</i>	100%	96,00%
	<i>Loxosceles intermedia</i>	100%	96,00%
Sequência 15	Corresponde ao P.LOX5 (Capítulo 3)		

FONTE: A autora (2021).

2 ANÁLISE EXPERIMENTAL

2.1 SÍNTESE QUÍMICA

Na primeira etapa da análise experimental foi realizada a síntese automatizada dos cinco peptídeos selecionados na etapa in silico. A síntese

automatizada é baseada na técnica de síntese em suporte sólido (MERRIFIELD, 1963) utilizando o sintetizador automatizado MultiPep Rsi (Intavis). A biossíntese de proteínas nas células ocorre de modo que o grupamento amina, também chamado N-terminal, do aminoácido de entrada está ligado ao terminal carboxila © da cadeia de proteína (N-para-C) (RESENDE, 2016). Na síntese química de peptídeos ocorre a adição de C-para-N, pelo acoplamento do grupo carboxila do aminoácido de entrada para o N-terminal da cadeia peptídica em crescimento. A adição de aminoácidos na cadeia peptídica em crescimento ocorre de modo preciso, passo a passo, e de forma cíclica. A síntese química, ocorre por sucessivos ciclos de desproteção e acoplamento. Com o objetivo de evitar reações secundárias, ramificações de cadeia ou encurtamento, grupos químicos, estão ligados aos grupos reativos de aminoácidos, protegendo o grupo funcional de reação inespecífica. Na etapa de desproteção, os grupos químicos “protetores” são removidos quimicamente. O acoplamento de novos aminoácidos ocorre em função de reagentes de acoplamento que atuam no grupo carbonila, formando um intermediário altamente reativo, que é deslocado entre o grupo amino primário desprotegido no N-terminal da cadeia peptídica em crescimento, possibilitando o acoplamento do grupo carboxila do aminoácido de entrada, formando a ligação peptídica nascente. Na etapa final da síntese, ocorre a clivagem do peptídeo e a remoção dos grupos protetores remanescentes. (RIBEIRO, 2016)

Após a quantificação por meio do kit de análise de proteínas (Thermo Scientific™ MicroBCA™) obteve-se as concentrações que variaram de 1,220 a 1,959, TABELA 4.

TABELA 4 – QUANTIDADE DE PEPTÍDEO OBTIDO NA ETAPA DE SÍNTESE QUÍMICA.

Amostra	[µg/mL]
P.1	1959,232
P.2	1328,002
P.3	1439,001
P.4	1220,812
P.5	1804,402

FONTE: A autora (2021).

2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Para os cinco peptídeos sintetizados determinou-se a atividade antibacteriana, pelo método de microdiluição em caldo. Foi realizada triagem pelo método de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), definido como a concentração

mais baixa (em mg l⁻¹) do agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo. As condições experimentais seguiram condições definidas por WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008 e são dadas na TABELA 5. Com base nos resultados do teste de CIM, o peptídeo P.5 foi selecionado para testagem frente a outras cepas (para detalhes ver Capítulo 3).

TABELA 5 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Peptídeo	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> ATCC 25177	<i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> H37RV
P.1	R	R	R	R
P.2	R	R	MIC 64 µg/mL	MIC 64 µg/mL
P.3	R	R	R	R
P.4	R	R	R	R
P.5	CIM 32 µg/mL	CIM 64 µg/mL	CIM 16 µg/mL	CIM 16 µg/mL
Controles	AMP – CIM 4 µg/mL (alvo 4 µg/mL)	CLO – CIM 8 µg/mL (Alvo: 4-8 ug/mL)	INH – CIM 0,125 µg/mL (ponto de corte 0,25 µg/mL)	INH – CIM 0,125 µg/mL (ponto de corte 0,25 µg/mL)

R – Resistente. AMP – ampicilina. CLO – cloranfenicol. INH – Isoniazida.

FONTE: A autora (2021). Referência para valores dos controles BrCAST, 2021 e Brasil, 2008.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** V. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANDREAS, M. *et al.* *Enterococcus* antigens. Depositante: Wolf, Greenfield & Sacks, P.C. US8431128. Depósito: 12 dez. 2011.
- BRASIL. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias.** Brasília: Ministério da Saúde, 2008. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_laboratorial_tuberculose.pdf. Acesso em: 10 out. 2021.
- BrCAST. Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos. Controle interno de qualidade de rotina e estendido para a determinação. [s. l.], 2021.
- DOUCETTE-STAMM, L. A.; BUSH, David. Nucleic acid and amino acid sequences relating to enterococcus faecalis for diagnostics and therapeutics. Depositante: Genome Therapeutics Corporation. US6617156. Depósito: 13 ago. 1998.
- MANAVALAN, B. *et al.* AtbPpred: A Robust Sequence-Based Prediction of Anti-Tubercular Peptides Using Extremely Randomized Trees. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 17, p. 972–981, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.06.024>
- MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, 1963.
- PUENTES, P. R. *et al.* Design, screening, and testing of non-rational peptide libraries with antimicrobial activity: In silico and experimental approaches. **Antibiotics**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 1–41, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120854>
- QUEST INTERNATIONAL B.V. Process for the lysis of a culture of lactic acid bacteria by means of a lysin, and uses of the resulting lysed culture. Depositante: Pillsbury Madison & Sutro LLP. US5955258. Depósito: 22 abr. 1994.
- RIBEIRO, R. R. **Biotecnologia aplicada à Saúde: fundamentos e aplicações.** 3. Ed. São Paulo: Blusher, 2016.
- REZENDE, R. R.; SOCCOL, Carlos Ricardo; FRANÇA, Luiz Renato. **Biotecnologia aplicada à agro&indústria: Fundamentos e aplicações.** [S. l.: s. n.], 2016. *E-book*. Universidad Nacional Autónoma de México; Laboratorios Silanes S.A. de C.V. Immunogen and antivenom against violin spider venom. US8287860. Depositante: Reinhart Boerner Van Deuren P.C.. Depósito: 21 ju. 2011
- WAGHU, F. H. *et al.* CAMPR3: A database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. D1, p. 1094–1097, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1051>.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances.

Nature Protocols, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 163–175, 2008. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>

CAPÍTULO 3: PEPTÍDEO SINTÉTICO P.LOX5 COM AÇÃO ANTIBACTERIANA

RESUMO

A presente invenção trata de um peptídeo, desenhado e avaliado in silico e sintetizado quimicamente em suporte sólido. O novo peptídeo sintético P.LOX5 SEQ ID No 1 mostrou ação bactericida e bacteriostática contra cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos e *Mycobacterium tuberculosis* em veículos de administração diversos. Assim sendo, a presente invenção pleiteia a proteção do peptídeo P.LOX5 a ser empregado em diferentes formulações antibacterianas.

1 RELATÓRIO DESCRITIVO

1.1 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção reivindica a sequência do peptídeo sintético P.LOX5, SEQ ID No 01 desenhado in silico a partir de uma proteína do veneno de aranha (*Loxocles intermedia*) e seu uso como bactericida ou bacteriostático contra bactériascocos Gram positivos, bacilos Gram negativos e bactérias álcool ácido resistente, incluindo *Mycobacterium spp.*

1.2 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA

As bactérias estão presentes em todos os lugares, objetos inanimados e organismos vivos, inclusive em simbiose com seres humanos e animais compondo a microbiota natural. Alguns microrganismos específicos ou mesmo inofensivos em ambiente fisiológico são capazes de provocar doença quando expostos a determinadas condições. Quando o microrganismo é capaz de desencadear o processo de doença é denominado patógeno (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010).

Os patógenos podem ser classificados de acordo com seu formato e/ou a composição da parede celular quando corados por técnicas específicas. Essa classificação divide os microrganismos em grupos de importância clínica, entre eles, Gram positivos, Gram negativos e organismos álcool-ácido resistentes incluindo, por

exemplo, o gênero *Mycobacterium* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010).

A parede celular das bactérias Gram-positivas possui uma camada espessa de peptidoglicano. Além disso, algumas possuem ácido teicóico na composição da sua parede, componente não encontrado em bactérias Gram negativas. Os dois principais gêneros Gram positivos de importância médica são *Staphylococcus* e *Streptococcus* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010). No gênero *Staphylococcus* existem espécies como *Staphylococcus aureus* que apresentam potencial de resistência a antibióticos, como metilina e vancomicina. Outro gênero importante dentre os Gram positivos é *Enterococcus*. Essas bactérias se destacam nas infecções nosocomiais, principalmente as linhagens resistentes à vancomicina (VRE) (LEVINSON, 2016).

No caso dos microrganismos Gram-negativos, a parede celular é formada por camada fina de peptidoglicano, e uma membrana celular. Essa membrana contém na sua composição polissacarídeos, lipoproteínas e fosfolípidos. É no espaço periplasmático, entre a membrana externa e a membrana celular das bactérias Gram negativas, que se encontram as enzimas capazes de degradar antibióticos, o que confere aos microrganismos resistência aos agentes antimicrobianos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010).

Como exemplos de bactérias Gram negativas pode-se citar aquelas presentes no trato gastrointestinal, como *Salmonella* spp. que causa a salmonelose, e *Escherichia coli* que causa infecções do trato urinário (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010).

Entre os bacilos álcool-ácido resistentes o representante de maior importância clínica é o *Mycobacterium tuberculosis* causador da tuberculose. Sua parede celular possui uma fina camada de peptidoglicano e a parede externa é composta por camadas de ácido micólico, um lipídeo céreo e hidrofóbico (BERTOLLI, 2001).

A resistência bacteriana a múltiplas drogas é preocupante. De acordo com a Organização Mundial da Saúde em seu relatório de 2018, foram registrados 10 milhões de novos casos de tuberculose, e cerca de 1,5 milhão de pessoas morreram da doença com mais de 500.000 casos resistentes a multidrogas ou extensivamente resistentes (MARTÍN-GARCÍA; ESTEBAN, 2021).

Um ponto crítico quanto ao tratamento de doenças infecciosas é o desenvolvimento e introdução de novas drogas no mercado, que ocorre de forma desproporcional ao aumento das taxas de resistências a múltiplas drogas. Nas últimas quatro décadas apenas cinco (05) novas classes de antimicrobianos entraram no

mercado e foram adicionadas à prática clínica (GOLAN *et al.*, 2018).

Ao pesquisar sobre o desenvolvimento de medicamentos incluindo antimicrobianos, percebe-se que a natureza representa uma fonte excepcional para pesquisas e desenvolvimento de novos compostos com ações diversas.

Os peptídeos antimicrobianos ainda são pouco empregados principalmente na área clínica e são alvo do interesse de pesquisadores. Esses peptídeos podem ser de origem natural ou sintética e a maioria dos peptídeos age atacando a membrana plasmática da célula bacteriana. Desta forma ocorre a morte celular num tempo curto, o que levanta a hipótese de que são menos propensos à indução de resistência aos antibióticos convencionais (MEMARIANI *et al.*, 2020).

As defensinas são peptídeos de defesa do hospedeiro, e estão presentes em secreções de pele e hemolinfa de insetos. Estas poderiam ser outras fontes de substâncias contra bactérias patogênicas. Por exemplo, a peçonha de aranhas e escorpiões pode representar fonte a ser explorada para agentes antimicrobianos.

As aranhas do gênero *Loxosceles* são comuns na América do Sul, incluindo o Brasil. Seu veneno (ou defensina) foi pouco estudado quanto ao seu potencial antimicrobiano e desenvolvimento de novas moléculas. As aranhas do gênero *Loxosceles* compreendem cerca de 130 espécies, dentre elas, a *Loxosceles intermedia*. Os acidentes causados por esta aranha são relativamente comuns e causam reação local caracterizada por dermonecrose. Em raros casos pode haver uma reação sistêmica. Em geral o veneno destas aranhas é formado por peptídeos e glicoproteínas de baixo peso molecular (GREMSKI *et al.*, 2014).

O volume de veneno produzido por essa aranha varia em microlitros e contém de 20 a 200 µg de proteínas no total. A quantidade e conteúdo do veneno produzido dependerá de fatores como tamanho, sexo, estado nutricional e fatores ambientais relacionados à aranha. O grupo ICK compreende a maior parte dos compostos no veneno de *Loxosceles intermedia*, isto é, cerca de 95% das toxinas presentes no veneno (GREMSKI *et al.*, 2014).

Com a explosão dos estudos sobre peptídeos antimicrobianos percebeu-se a necessidade de aprimorar as metodologias até então usadas. A identificação experimental é um método caro e demorado, o que impulsionou o desenvolvimento de ferramentas de triagem in silico como os algoritmos CAMPR3 e AtbPpred, ferramentas utilizadas nesta pesquisa.

O algoritmo CAMPR3 fornece informações abrangentes sobre peptídeos

antimicrobianos, incluindo a previsão e o recurso de design racional de peptídeos antimicrobianos por meio da substituição de resíduos de aminoácidos no peptídeo de interesse (MANAVALAN *et al.*, 2019).

AtbPpred é uma ferramenta para a predição de peptídeos antituberculose baseado em um modelo de previsão de duas camadas (WAGHU *et al.*, 2016).

Visando buscar as inovações relacionadas a peptídeos antimicrobianos derivados de veneno de aranhas o estado da técnica foi avaliado por meio de busca de documentos patentários. As buscas patentárias foram realizadas nas bases de dados Patentscope e do INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial).

Na base Patentscope, quando realizada a busca por meio do termo “PEPTIDE [AND] ANTIMICROBIAL [AND] VENOM”, foram encontradas as patentes WO/2003/03567 e AU 2002363081, ambas relacionadas a peptídeos antimicrobianos do veneno da aranha *Cupiennius salei*. O documento WO/2003/03567 trata de um peptídeo inseticida e também bactericida com uma massa molecular de 3.701,25 Da que foi isolado do veneno de *C. salei* denominado CSTX-4. Os relatórios não divulgam nenhum dado de sequência aminoacídica. De acordo com o documento, a atividade antimicrobiana para o peptídeo CSTX-4 foi determinada por concentração inibitória mínima em microdiluição em caldo, frente às bactérias *E. coli* ATCC 25922; *S. aureus* ATCC 29213; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Na mesma base de dados, ao realizar a busca por meio do termo “ANTIBIOTIC [AND] PEPTIDE [AND] VENOM”, foram encontradas oito (08) patentes. A patente CN1683399 (KUNMING, 2005) descreve um peptídeo do veneno de vespa com atividade de inibição de bactérias, fungos, vírus e crescimento de células tumorais e com a vantagem de não apresentar atividade de hemólise. Os autores reivindicam seu uso na preparação de medicamentos para o tratamento de doenças infecciosas microbianas patogênicas e tumorais. Na patente CN1683399 (KUNMING, 2005) o peptídeo foi testado frente aos microrganismos *E. coli* ATCC25922, *S. aureus* ATCC 2592, *P. aeruginosa* CMCCB10104, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus magaterium* e *Bacillus subtilis*. Outro documento (SUZHOU-KANGTAI, 2007) descreve um peptídeo derivado da *Vespa magnifica* Smith com atividade antitumoral e antimicrobiana de amplo espectro, testada frente às bactérias *E. coli* ATCC25922, *S. aureus* ATCC 2592 e *P. aeruginosa* CMCCB10104, também está descrito seu método de preparação e de aplicação.

O depósito CN105456143 (GUANGZHOU, 2016) traz uma essência para remoção de acne contendo peptídeo antimicrobiano de veneno de cobra com base na atividade antimicrobiana de seus componentes que incluem peroxidase, fosfolipase A2, toxina de membrana e peptídeos antimicrobianos de catelicidina, identificando o peptídeo antibacteriano catelicidina-BF, derivada do veneno da cobra anelada dourada, com ação bactericida contra acne. O documento não traz uma avaliação específica da atividade antimicrobiana, apenas cita que a ação se dá contra o bacilo da acne.

O peptídeo RLL (N.A.U., 2020) do veneno de escorpião tem efeito inibitório altamente eficaz sobre *E. coli*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Salmonella typhimurium*, com atividade hemolítica baixa.

Vejevina (MX/a/2009009090) é um peptídeo isolado e purificado do veneno escorpião *Vaejovis mexicanus* que possui componentes neurotóxicos. A maioria dessas toxinas apresenta folha β pregueada, ligada a uma alfa-hélice anfipática e um fragmento emaranhado por pontes dissulfeto. A estrutura tridimensional é formada por três ou quatro dessas ligações dissulfeto, geralmente com atividade antibiótica. Porém, é tóxica para organismos diferentes por causarem danos às membranas biológicas às quais se ligam. Vejevina mostrou atividade antibiótica contra *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae* e *Pseudomonas* spp.

O peptídeo C55 (LOURIVAL *et al.*, 2011) foi isolado e purificado do veneno do escorpião *Centruroides suffusus suffusus*. O peptídeo foi testado contra *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Candida albicans*.

Existe ainda o peptídeo híbrido (POSTAY *et al.*, 2011) e suas variantes, sintetizado quimicamente a partir de análogos isolados do veneno do escorpião *Hadrurus gertschi* e *Vaejovis mexicanus* (POSTAY *et al.*, 2009) com modificações no que diz respeito ao número de aminoácidos e à natureza química dos mesmos. O documento não traz maiores informações em relação aos microrganismos em que o peptídeo foi testado.

Em relação a peptídeos antimicrobianos derivados de veneno com ação contra o gênero *Mycobacterium*, nenhum documento foi encontrado nas bases de patentes nacionais e internacionais.

Portanto, o estado da técnica no campo da presente inovação indica que foram desenvolvidas e protegidas formulações contendo peptídeos, sintéticos ou

naturais, provenientes de diversas fontes, inclusive do veneno de cobras e escorpiões. Porém, não há trabalhos indicando peptídeos sintéticos baseados em proteínas de aranhas, especialmente da aranha *Loxosceles intermedia*.

1.3 DESCRIÇÃO DA A BORDAGEM DO PROBLEMA TÉCNICO

A presente invenção inclui o peptídeo sintético P.LOX5 de sequência de aminoácidos (SEQ ID No 01) mimético ao da aranha *Loxosceles intermedia* e seu uso como agente antimicrobiano.

Desde a descoberta da penicilina, vêm surgindo linhagens bacterianas resistentes aos antibióticos disponíveis. O uso indiscriminado destes fármacos ao longo dos anos contribuiu para o surgimento destas linhagens.

Como alternativa para amenizar esse problema, o comércio de antibióticos passou a ser controlado por órgão regulador, sendo alguns antibióticos limitados ao uso hospitalar. Surgiram ainda comitês voltados ao estudo dos microrganismos frente aos antibióticos, com o objetivo de padronizar e dar direcionamento no tratamento de pacientes com doença infecciosa e no uso coerente destes fármacos pela classe médica.

Apesar dos esforços ao longo dos anos, a resistência antimicrobiana está cada vez mais presente inclusive em infecções na comunidade. Em contrapartida, o desenvolvimento de novos antimicrobianos é um processo oneroso e lento quando comparado à evolução da resistência nos perfis de susceptibilidade de microrganismos diversos.

Cada vez mais a busca por alternativas se mostra necessária e com isso se faz notório o desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos como uma opção no desenvolvimento de novos fármacos.

Esses peptídeos podem ser desenvolvidos a partir de sequências de proteínas conhecidas, obtidas por meio de bancos de dados, utilizando algoritmos especializados em predição de atividade antimicrobiana.

Esses peptídeos podem ser então produzidos por meio de síntese química utilizando equipamentos especializados, sendo possível a otimização do tempo no processo de análise e avaliação destas moléculas.

Os peptídeos apresentam ainda a vantagem de em geral serem molécula de baixa imunogenicidade devido ao tamanho pequeno, o que contribui para a redução

de efeitos colaterais quando utilizados como fármacos.

1.4 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao peptídeo sintético P.LOX5 (SEQ ID No 01) derivado de proteína presente no veneno da aranha *Loxosceles intermedia* apresentando atividade antimicrobiana.

A utilização do peptídeo P.LOX5 como antimicrobiano se dá preferencialmente contra espécies de bactérias.

O peptídeo foi desenvolvido a partir da triagem in silico das proteínas descritas no banco de dados Swiss-Prot por meio dos algoritmos CampR3 (WAGHU *et al.*, 2016.) e AtbPpred (MANAVALAN *et al.*, 2019).

O peptídeo foi desenvolvido a partir da predição in silico dos peptídeos antimicrobianos presentes na proteína loxtox i2 da família de proteínas loxtox de *Loxosceles intermedia* descrita no banco de dados Swiss-Prot.

O peptídeo desenvolvido foi avaliado frente a diferentes espécies de bactérias. Os resultados obtidos serão detalhados nos exemplos a seguir, de obtenção dos peptídeos (exemplos 1 e 2) e avaliações de atividade antimicrobiana (3) e de citotoxicidade (4).

1.4.1 Exemplo 1 – Método para obtenção e triagem do peptídeo

O peptídeo foi desenvolvido a partir da predição in silico dos peptídeos antimicrobianos presentes na proteína loxtox i2 da família de proteínas loxtox de *Loxosceles intermedia* descrita no banco de dados Swiss-Prot.

A escolha de *Loxosceles intermedia* se deu pelos fatos de ser um gênero amplamente distribuído na América do Sul, a espécie ser bastante comum na cidade de Curitiba onde foi realizada a pesquisa, e haver deficiência de estudos sobre peptídeos antimicrobianos derivados da espécie. O peptídeo foi desenvolvido por meio da predição in silico a partir da proteína loxtox i2. Trata-se de um fragmento composto por 25 aminoácidos com modificações nas posições 11, 12 e 23 o que faz com que não seja uma sequência natural (SEQ ID No 01).

Foi utilizada primeiramente a ferramenta *Predict Antimicrobial region within Peptides* disponível em CAMPR3 – *Collection of Anti-Microbial Peptides* (<http://www.camp3.bicnirrh.res.in/index.php>), um algoritmo de previsão de peptídeos

antimicrobianos (MANAVALAN *et al.*, 2019).

Foram realizadas modificações nas sequências dos peptídeos naturais com objetivo de melhorar a atividade antimicrobiana. As modificações foram selecionadas a partir do recurso *Rational Design of Antimicrobial Peptides* disponível em CampR3. Trata-se de um recurso de design racional de peptídeos antimicrobianos por meio da substituição de resíduos de aminoácidos no peptídeo de interesse.

Uma nova triagem específica foi realizada por meio das ferramentas AntiTB_MD e AntiTB_RD disponíveis em AtbPpred (<http://thegleelab.org/AtbPpred/index.html>) para a predição de peptídeos antituberculose baseado em um modelo de previsão de duas camadas (WAGHU *et al.*, 2016).

O peptídeo selecionado (SEQ ID No 01) foi denominado de P.LOX5.

P.LOX5 foi avaliado quanto a homologia, relação da sequência de aminoácidos a outras patentes por meio do algoritmo BLASTp (ALTSCHUL, 1997) na base de dados “Sequências de proteínas patenteadas (pataa)”. A sequência com maior similaridade apresentou 88% de identidade e 100% de cobertura (RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

A TABELA 1 mostra a similaridade com sequências patenteadas e traz o resultado da busca de cinco sequências com maior similaridade. Não existe homologia com nenhuma sequência, sendo o P.LOX5 um novo peptídeo ainda não patentado, com diversos aminoácidos modificados a partir da sequência natural visando aumentar a ação antimicrobiana.

TABELA 1 – Similaridade do peptídeo P.LOX5 com sequências já patenteadas.

Descrição	Cobertura	Valor de E	Identidade
Sequência 13 da patente US8287860	100%	5×10^{-12}	88%
Sequência 30 da patente US8287860	100%	3×10^{-08}	76%
Sequência 11 da patente US8287860	100%	3×10^{-08}	76%
Sequência 28 da patente US8287860	100%	3×10^{-08}	76%
Sequência 19 da patente US8287860	84%	5×10^{-04}	71,43%

FONTE: A autora (2021). Dados comparados com patente US8287860 (RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

O peptídeo artificial desenvolvido P.LOX5 (SEQ ID No 01) foi avaliado quanto à homologia em relação a sequências naturais por meio da ferramenta BLASTp na

base de dados “Sequências de proteínas não redundantes (nr)”. A sequência com maior similaridade apresentou 88% de identidade e 100% de cobertura. A TABELA 2 traz o resultado da busca mostrando as cinco sequências naturais com maior similaridade. Não existe homologia com nenhuma sequência, sendo o P.LOX5 um peptídeo não natural.

TABELA 2 – Similaridade com sequências naturais

Organismo	Cobertura	Identidade
<i>Loxosceles intermedia</i>	100%	88%
<i>Loxosceles intermedia</i>	100%	88%
<i>Loxosceles intermedia</i>	100%	88%
<i>Loxosceles intermedia</i>	100%	88%
<i>Loxosceles intermedia</i>	100%	88%

FONTE: A autora (2021).

1.4.2 Exemplo 2 – Método para obtenção do peptídeo

Foi realizada a síntese automatizada do peptídeo P.LOX5 baseada na técnica de síntese em suporte sólido (MERRIFIELD, 1963) utilizando o sintetizador automatizado MultiPep Rsi (Intavis). A síntese foi realizada em colunas descartáveis contendo resina derivatizada como suporte sólido e utilizando aminoácidos modificados com grupos funcionais de proteção Fmoc.

O peptídeo foi quantificado por meio do kit de análise de proteínas (Thermo Scientific™ MicroBCA™), que é uma formulação de ácido bicinconínico compatível com detergente para a detecção colorimétrica e quantificação de proteína total. Uma adaptação do Thermo Scientific™ BCA Protein Assay Kit. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

1.4.3 Exemplo 3 – Método para determinação da atividade antibacteriana

A determinação da atividade antibacteriana foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, avaliando a taxa de mortalidade celular, frente às linhagens *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 51299, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 e *M. tuberculosis*.

A cepa *E. faecalis* ATCC 51299 é resistente à vancomicina de acordo com certificado disponível em www.atcc.org/products/51299.

Para o coco Gram positivo *S. aureus* ATCC 25923 e para o bacilo Gram negativo *E. coli* ATCC 25922 foi utilizado caldo Mueller Hinton como diluente para o preparo de uma série de soluções do peptídeo antimicrobiano.

Foram preparadas diluições sequenciais usando o método de diluição dupla em uma placa de 96 poços, sendo que cada poço contém 100 µL da solução do peptídeo. As concentrações finais testadas foram 0,25 – 0,50 – 1,0 – 2,0 – 4,0 – 8,0 – 16,0 – 32,0 e 64,0 µg/mL. Para *M. tuberculosis* foram testadas as concentrações 8,0 – 16,0 – 32,0 e 64,0 µg/mL.

Em seguida, foi adicionado igual volume da solução bacteriana na concentração 1×10^8 células/mL, determinada de acordo com a escala nefelométrica de Mac Farland. Configurou-se como controle positivo do teste o cultivo (poço) que contém suspensão bacteriana, mas nenhum peptídeo antimicrobiano.

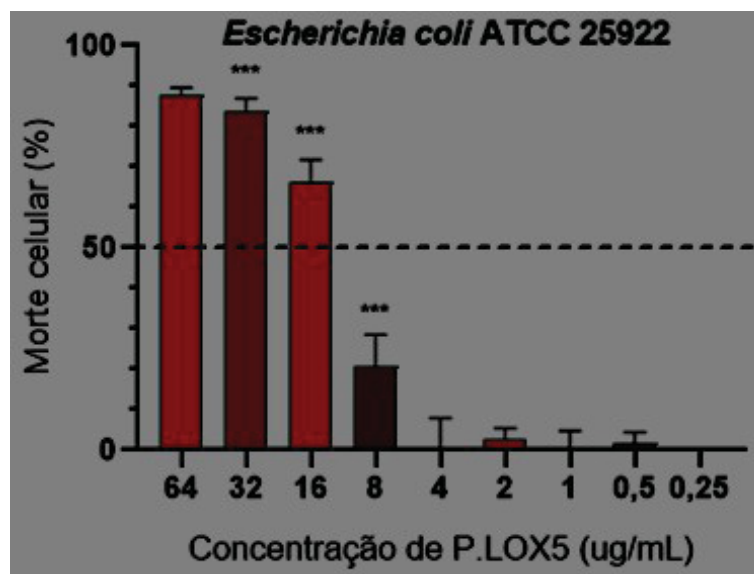
As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 18-24 h. Passado esse tempo, para determinação da viabilidade celular bacteriana por meio de revelador MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide), preparou-se uma solução de 5 mg/mL de MTT em água destilada, adicionou-se 10 µL da solução em cada poço e incubou-se a placa protegida da luz por 30 min para *S. aureus* ATCC 25923 ou *E. coli* ATCC 25922. Passados 30 minutos foi medido o valor da absorbância no comprimento de onda de 585 nm com auxílio de um leitor de microplaca.

Para *M. tuberculosis* cepa H37Rv utilizou-se caldo Middlebrook 7H9 suplementado com 10% v/v de OADC (ácido oleico-albumina-dextrose-catalase) como diluente para o preparo das soluções gradientes. As placas foram incubadas a 37 °C por sete dias. Passado esse tempo, para determinação da concentração inibitória mínima por meio de revelador MTT, foi preparada a solução de 5 mg/mL em água destilada, adicionados 10 µL da solução em cada poço e a placa foi incubada protegida da luz por 24 horas. O valor da absorbância foi medido a 585 nm com um leitor de microplaca para determinação da taxa de mortalidade celular (BRASIL, 2008).

A taxa de mortalidade de *E. coli* ATCC 25922 foi superior a 50% frente a P.LOX5 na concentração de 16 µg/mL (FIGURA 1). A taxa de mortalidade de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi superior a 50% frente a P.LOX5 na concentração de 16 µg/mL (FIGURA 2). A taxa de mortalidade de *S. aureus* ATCC 25923 foi superior a 50% frente a P.LOX5 na concentração de 32 µg/mL (FIGURA 3). A taxa de mortalidade de *E. faecalis* ATCC 51299 foi superior a 50% frente a P.LOX5 na concentração de 32 µg/mL (FIGURA 4). A taxa de mortalidade de *M. tuberculosis* H37RV foi superior a 50%

frente a P.LOX5 na concentração de 64 µg/mL (FIGURA 5).

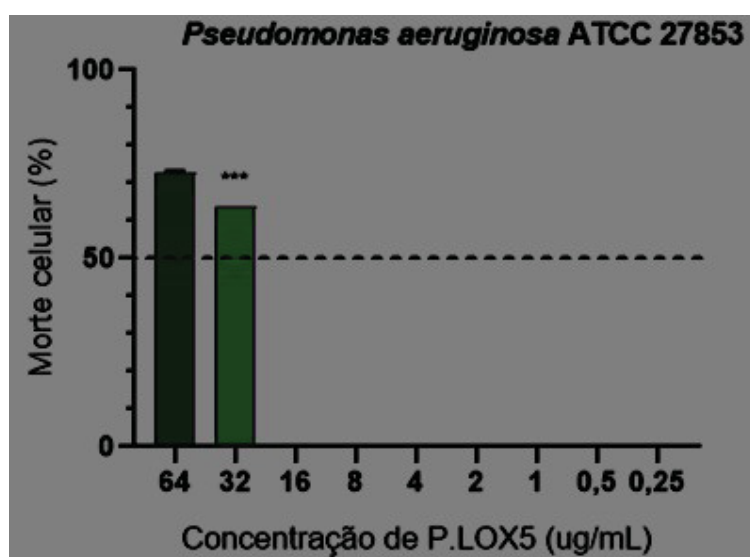
FIGURA 1 – AÇÃO DE P.LOX5 REPRESENTADA PELO PERCENTUAL DE MORTE CELULAR DE *Escherichia coli* ATCC 25922 FRENTE AO PEPTÍDEO P.LOX5



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: *** representa diferença estatística ($P < 0,0005$) em relação à concentração seguinte.

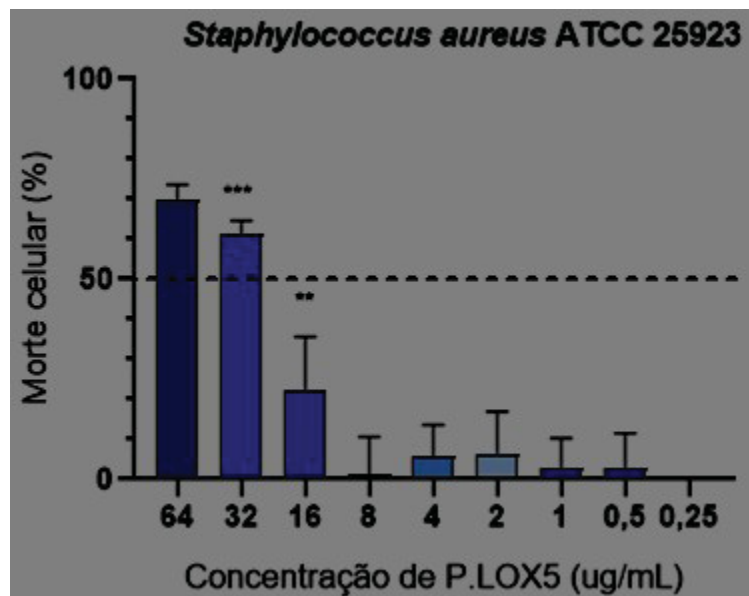
FIGURA 2 – AÇÃO DE P.LOX5 REPRESENTADA PELO PERCENTUAL DE MORTE CELULAR DE *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 FRENTE AO PEPTÍDEO P.LOX5



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: *** representa diferença estatística ($P < 0,0005$) em relação à concentração seguinte.

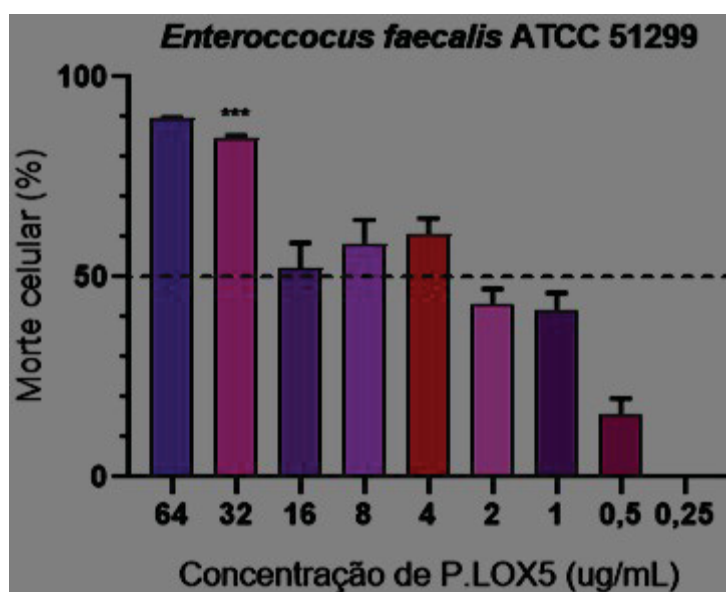
FIGURA 3 – AÇÃO DE P.LOX5 REPRESENTADA PELO PERCENTUAL DE MORTE CELULAR DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 FRENTE AO PEPTÍDEO P.LOX5



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: *** representa diferença estatística ($P < 0,0005$) em relação à concentração seguinte. ** representa diferença estatística ($P < 0,005$) em relação à concentração seguinte.

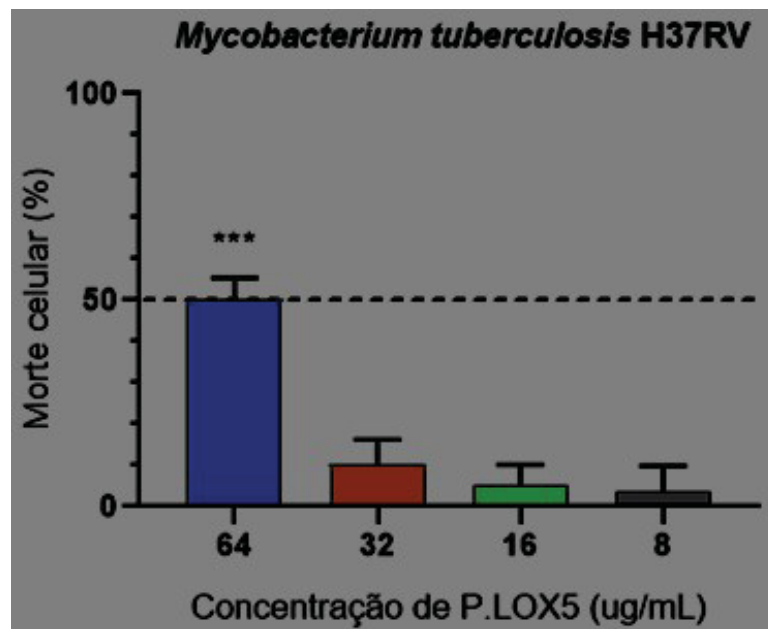
FIGURA 4 – AÇÃO DE P.LOX5 REPRESENTADA PELO PERCENTUAL DE MORTE CELULAR DE *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 FRENTE AO PEPTÍDEO P.LOX5



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: *** representa diferença estatística ($P < 0,0005$) em relação à concentração seguinte.

FIGURA 5 – AÇÃO DE P.LOX5 REPRESENTADA PELO PERCENTUAL DE MORTE CELULAR DE *Mycobacterium tuberculosis* H37RV FRENTE AO PEPTÍDEO P.LOX5



FONTE: A autora (2021).

LEGENDA: *** representa diferença estatística ($P < 0,0005$) em relação à concentração seguinte.

1.4.4 Exemplo 4 – Método para determinação da toxicidade celular

Visando identificar uma possível ação citotóxica da formulação contendo o peptídeo P.LOX5, avaliou-se a viabilidade celular pelo método com reagente MTT em modelo in vitro de linhagem celular HaCat.

Uma alíquota da linhagem celular HaCat mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi reativada e mantida em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Os cultivos foram incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em 5% CO_2 e atmosfera úmida ($> 80\%$).

Para manutenção do cultivo e subcultivo, o meio foi descartado e o cultivo aderido foi lavado com 10 mL de solução tampão fosfato-salina (PBS), em seguida, foram adicionados 3 mL de tripsina a 0,05%, incubando-se a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 min para despreendimento das células aderidas na garrafa de cultura. As células foram liberadas com auxílio de alça. O conteúdo do frasco de cultivo foi transferido para um tubo de centrifuga de 15 mL estéril e centrifugado por 5 minutos a 1.500 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o pellet contendo as células foi ressuspensionado em 1 mL de meio

RPMI (10% SFB). Semeou-se as células em novas garrafas de cultivo de 25 mL.

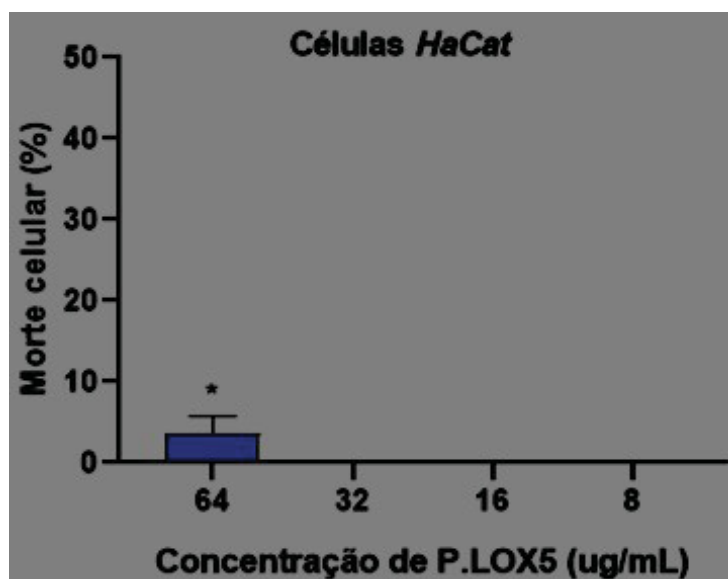
Quando as células atingiram até 90% de confluência, realizou-se o desprendimento e contagem celular em câmara de Neubauer em microscópio óptico. Foram inoculadas 1×10^3 células por poço em microplacas de 96 poços com volume final de 100 μ L por poço. O cultivo em microplaca foi mantido por 24 horas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após as 24 h de incubação as placas foram analisadas por microscopia de luz invertida para avaliar se houve crescimento e aderência das células.

Ao atingir o crescimento ideal, o sobrenadante foi retirado e as células aderidas foram lavadas com solução tampão PBS a 37 °C. Aos poços da microplaca foram adicionados 100 μ L de meio RPMI suplementado com 100 μ L da solução do peptídeo ou antibiótico teste para controle da morte celular. Obtendo-se concentrações finais de 64 μ g/mL, 32 μ g/mL, 16 μ g/mL e 8 μ g/mL. A placa foi incubada por 24 h.

Após as 24 h de incubação e exposição ao composto alvo, o sobrenadante foi removido e as células aderidas foram lavadas com PBS a 37 °C. Adicionou-se às cavidades da microplaca 100 μ L de solução de MTT a 5 mg/mL diluído em meio. Incubou-se por 30 min ao abrigo da luz em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e então foram adicionados 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO), homogeneizando-se em seguida. A absorbância foi medida em leitor de microplacas em comprimento de onda de 585 nm.

Calculou-se o percentual de morte celular relativo a uma viabilidade de 100% para o experimento controle sem tratamento (FIGURA 6). O percentual de morte celular avaliado mostrou toxicidade inferior a 10% para o peptídeo quando aplicado em células HaCat.

FIGURA 6 – TOXICIDADE CELULAR DE P.LOX5 REPRESENTADA PELO PERCENTUAL DE MORTE CELULAR DE CÉLULAS HaCat FRENTE AO PEPTÍDEO P.LOX5



FONTE: A autora (2021).

LEG

ENDA: * representa diferença estatística ($P < 0,05$) em relação à concentração seguinte.

1.5 DEFINIÇÕES

O termo “antimicrobiano” ou “antibacteriano” se refere a um agente que produz efeitos bactericidas ou bacteriostáticos. O termo “bactericida” refere-se a fármacos que matam bactérias. O termo “bacteriostático” refere-se a fármacos que inibem o crescimento da bactéria sem causar a sua morte (GOLAN *et al.*, 2018).

O termo “antibiótico” se refere a um produto natural com efeito antimicrobiano (FRANCO; KRIEGER, 2016).

2 REIVINDICAÇÕES

2 Peptídeo sintético caracterizado por consistir na sequência de amino ácidos SEQ ID No 01, identificado como P.LOX5, produzido por síntese química, biológica ou recombinante, e que apresenta atividade antimicrobiana.

3 Peptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por atuar como agente antibacteriano contra espécies de cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos e álcool-ácido resistentes.

4 Peptídeo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por atuar, mais especificamente, contra *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium tuberculosis*.

5 Uso do peptídeo sintético P.LOX5 (SEQ ID No 01) de acordo com as reivindicações 1 e 2 caracterizado pela aplicação no tratamento de doenças infecciosas causadas por patógenos bacterianos em humanos ou animais.

6 Uso do peptídeo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pela aplicação no tratamento de infecções bacterianas incluindo-se espécies de cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos e *Mycobacterium* spp.

7 Uso do peptídeo de acordo com as reivindicações 4 e 5, caracterizado pela aplicação de forma isolada ou como parte de composições farmacêuticas em veículos diversos.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, Stephen F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v. 25, p. 3389-3402, 1997.

BERTOLLI-FILHO, C. **História social da tuberculose e do tuberculoso: 1900-1950.** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2001.

BRASIL. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias.** Brasília: Ministério da Saúde, 2008. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_laboratorial_tuberculose.pdf. Acesso em: 10 out. 2021.

FRANCO, A.S.; KRIEGER, J. E. **Manual de Farmacologia.** São Paulo: Editora Manole, 2016

GOLAN, David E. *et al.* **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 2018.

GOLAN, David E. *et al.* **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 2018

GREMSKI, L. H. *et al.* Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, v. 83, p. 91–120, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.023>.

GUANGZHOU. **A kind of Eradicates acne Essences containing snake venom antibacterial peptide and preparation method thereof.** Depositante: Guangzhou Meili Cosmetics Co., Ltd.. CN105456143. Depósito em: 12 jan. 2016.

KALAPOTHAKISA, E. *et al.* The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. **Toxicon**, v. 50, p. 938-946, 2007.

KUNMING. **Wasp antibiotic peptide and its preparing method and use.** Depositante: Kunming Institute of Zoology of CAS. CN1683399. Depósito em: 23 fev. 2005.

LEVINSON, W. **Microbiologia e imunologia médicas.** 13. ed. Porto Alegre: AMGH, 2016.

LOURIVAL, D. P. P. *et al.* **Use of an antibiotic peptide from venoms of the scorpion *centruroides suffusus suffusus* and pharmaceutical compositions obtained from commercial antibiotics.** Depositante: Univ Nac Autónoma De México. MX343126. Depósito em: 19 maio 2011.

MANAVALAN, B. *et al.* AtbPpred: A Robust Sequence-Based Prediction of Anti-Tubercular Peptides Using Extremely Randomized Trees. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 17, p. 972–981, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.06.024>.

MARTÍN-GARCÍA, M.; ESTEBAN, J. Evaluating bedaquiline as a treatment option for multidrug-resistant tuberculosis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 22, n. 5, p. 535–541, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14656566.2020.1867538>.

MEMARIANI, H. et al. Anti-Staphylococcal and cytotoxic activities of the short antimicrobial peptide PVP. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1–14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02948-6>.

MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, 1963.

N.A.U., Northeast Agricultural University. **Antibacterial peptide derived from scorpion venom as well as preparation method and application thereof**. Depositante: Northeast Agricultural University. CN111423501. Depósito em: 30 mar. 2020.

POSTAY, Lourival D. P. *et al.* **Vejavine: an antibiotic peptide**. Depositante: Universidad Nacional Autónoma de México; Instituto Nacional de Salud Pública. MX2011007177. Depósito: 26 ago. 2009.

POSTAY, Lourival D. P. *et al.* **Nuevo peptido antibiotico hibrido y sus variantes**. Depositante: Universidad Nacional Autónoma de México. MX2011007177. Depósito: 01 jul. 2011.

RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. **Biotecnologia aplicada a agro & indústria: fundamentos e aplicações**. 4 ed. São Paulo: Blucher, 2016.

RODRIGUEZ, A. O. *et al.* **Immunogen and antivenom against violin spider venom**. Depositante: Universidad Nacional Autonoma de Mexico Laboratorios Silanes SA de CV. US8287860. Depósito: 31 ago. 2004.

SUZHOU-KANGTAI. Hornet anti-bacterial peptide, its preparing method and use. Depositante: Suzhou Kangtai Biological Pharmacy CO Ltd. CN101070340. Depósito em: 11 maio 2007.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

YAN, L.; ADAMS, M. E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 273, n. 4, p. 2059–2066, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2059>.

WAGHU, F. H. *et al.* CAMPR3: A database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. 1094–1097, 2016.

2 DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho utilizou como ferramentas de triagem para busca de novas substâncias bactericidas e bacteriostáticas recursos de bioinformática. O levantamento das proteínas foi realizado a partir dos bancos de dados NCBI e Swiss-Prot. Os dados foram processados utilizando ferramentas online que permitem realizar triagens direcionadas especificamente ao estudo de peptídeos com ação antimicrobiana. As ferramentas de bioinformática trazem como vantagem agilidade e baixo custo quando comparadas a metodologias experimentais convencionais. Essas ferramentas permitem também modificações a fim de melhorar o desempenho das sequências.

Dentre os peptídeos obtidos *in silico* e que mostravam possível ação bactericida e bacteriostática a sequência aminoacídica denominada P.LOX5 mostrou melhor desempenho de acordo com as análises *in silico*. Por esta razão foi selecionado para dar sequência à pesquisa. Ao realizar a análise de similaridade foi evidenciado que o peptídeo não possui homologia com nenhuma sequência já patenteada e depositada em bancos nacionais e internacionais. Foi realizada também análise de homologia com sequências naturais. O peptídeo possui cobertura de 100% em proteínas de *Loxosceles intermedia* e identidade inferior a 90% como mostrado na TABELA 2. Os estudos sobre peptídeos antimicrobianos de veneno de aranha tiveram início em 1988 de acordo com dados levantados em literatura (YAN; ADAMS, 1998). A partir de então houve descoberta de novos peptídeos, totalizando cerca de 44 descritos no total. Com base na literatura, este é o primeiro peptídeo com ação antimicrobiana derivado de proteínas do veneno da aranha *Loxosceles intermedia*, popularmente conhecida como aranha marrom, que apresenta atividade antimicrobiana. É também o primeiro antimicrobiano derivado de veneno testado contra *Mycobacterium tuberculosis*.

O peptídeo foi desenvolvido a partir da predição *in silico* dos peptídeos antimicrobianos presentes na proteína loxtox i2 da família de proteínas loxtox. O grupo loxtox possui como características gerais: ser expresso na glândula de veneno das aranhas do gênero *Loxosceles*; mostrar um nível significativo de identidade em toda a molécula com um ou mais representantes do grupo; tem massa molecular entre 30 e 33 kDa; a toxina madura possuir aproximadamente 280 resíduos de aminoácidos; e

exibir ação biológica dermonecrotica. As diferentes isoformas de toxinas do grupo refletem o processo evolutivo (KALAPOTHAKISA *et al.*, 2007).

O peptídeo P.LOX5 foi sintetizado quimicamente *in vitro* e então testado frente a diferentes bactérias Gram positivas e Gram negativas. A taxa de mortalidade de *E. coli* ATCC 25922 foi superior a 50% frente a P.LOX5 na concentração de 16 µg/mL (FIGURA 1). A taxa de mortalidade de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi superior a 50% frente a P.LOX5 na concentração de 16 µg/mL (FIGURA 2). Ambas as bactérias são Gram negativas e possuem membrana externa e uma camada de peptidoglicano mais fina quando comparadas às bactérias Gram positivas. A taxa de mortalidade de *S. aureus* ATCC 25923 foi superior a 50% frente ao novo peptídeo P.LOX5 na concentração de 32 µg/mL (FIGURA 3). A taxa de mortalidade de *E. faecalis* ATCC 51299 foi superior a 50% frente a P.LOX5 na concentração de 32 µg/mL (FIGURA 4). As duas bactérias são Gram positivas, possuem uma camada de peptidoglicano espessa em sua parede celular e não possuem membrana externa.

Para *M. tuberculosis* H37RV, a taxa de mortalidade foi superior a 50% frente a P.LOX5 na concentração de 64 µg/mL (FIGURA 5). Bactérias do gênero *Mycobacterium* são denominadas álcool-ácido resistentes e possuem uma parede celular rica em lipídeos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010).

Para finalizar, a avaliação mostrou que apesar de ser derivado de uma toxina, o peptídeo apresentou baixa citotoxicidade quando testado em células HaCat (queratinócitos imortalizados).

Os resultados aqui apresentados mostraram que o peptídeo sintético derivado de veneno de *L. intermedia* é promissor para o tratamento contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e álcool-ácido resistentes.

3 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível identificar um peptídeo com ação antimicrobiana derivado do veneno da aranha *Loxosceles intermedia* contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e, também, com ação contra o *Mycobacterium tuberculosis*.

- a) Os bancos de dados NCBI e Swiss-prot permitiram a pesquisa de peptídeos antimicrobianos em função do grande repertório de dados de proteínas.
- b) Os algoritmos CAMP R3 e AtbPpred são ferramentas gratuitas com recursos que permitiram a triagem in silico e a otimização de peptídeo por meio do recurso *Rational Design of Antimicrobial Peptides* disponível em CampR3.
- c) O peptídeo selecionado foi sintetizado quimicamente utilizando o sintetizador automatizado MultiPep RSi (Intavis) de forma eficiente.
- d) O peptídeo P.LOX5 mostrou ação antimicrobiana contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e contra *M. tuberculosis*.
- e) O peptídeo P.LOX5 não é uma sequência natural.
- f) O peptídeo P.LOX5 não possui homologia com sequências já patenteadas.
- g) O peptídeo P.LOX5 mostrou baixa toxicidade frente à linhagem de células HaCat.

Os dados sugerem que o P.LOX5 tem potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra infecções causadas por bactérias, incluindo *M. tuberculosis*. Esses resultados ressaltam a importância de se expandir os estudos acerca do potencial farmacológico de peptídeos como potenciais agentes antimicrobianos alternativos aos antibióticos convencionais. Os peptídeos sintéticos possuem ainda como vantagem a possibilidade de triagem e melhorias estruturais por meio de ferramentas in silico.

4 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

No presente trabalho foi evidenciada a ação antimicrobiana de um novo peptídeo. O efeito *in vivo* e o mecanismo de ação do P.LOX5 poderá ser determinado em nosso estudo futuro. Para a continuidade da pesquisa é necessário compreender melhor os aspectos químicos e o mecanismo de ação do peptídeo. É necessário também o aprofundamento de estudos farmacocinéticos para a perspectiva de modelos *in vivo* visando sua utilização como um fármaco em potencial.

REFERÊNCIAS

- DE OLIVEIRA, D. M. P. *et al.* Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 1–49, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>.
- FADER, R. C.; ENGELKIRK, P. G.; DUBEN-ENGELKIRK, J. **Burton Microbiologia para as Ciências da Saúde**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.
- HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 51, p. 72–80, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.
- KALAPOTHAKIS, E. *et al.* The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. **Toxicon**, [s. l.], v. 50, n. 7, p. 938–946, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.07.001>
- LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 13. ed. Porto Alegre: AMDH editora, 2016.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2017.
- TREVISAN-SILVA, D. *et al.* A multi-protease, multi-dissociation, bottom-up-to-top-down proteomic view of the *Loxosceles intermedia* venom. **Scientific data**, [s. l.], v. 4, p. 170090, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sdata.2017.90>.
- YI, H. Y. *et al.* Insect antimicrobial peptides and their applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 98, n. 13, p. 5807–5822, 2014.
- YAN, L; ADAMS, M E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 273, n. 4, p. 2059–2066, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2059>