

Prospecção de peptídeos miméticos PLAS-VP e PLAS-AK de veneno de serpente do gênero *Bothrops* contra bactérias formadoras de biofilme *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

Prospecting of PLAS-VP and PLAS-AK mimetic peptides from snake venom of the genus *Bothrops* against biofilm-forming bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*

DOI:10.34117/bjdv8n7-372

Recebimento dos originais: 23/05/2022

Aceitação para publicação: 30/06/2022

Daiany Soares Rufatto

Acadêmica do Curso de Enfermagem

Instituição: Centro Universitário São Lucas (UniSL)

Endereço: Rua Alexandre Guimarães, 1927, Areal, Porto Velho - RO, CEP: 76805-846

E-mail: daianyrufatto@gmail.com

Letícia Schirmer Calcagnotto

Mestra em Biologia Experimental pela Universidade Federal de Rondônia (UNIR)

Instituição: Centro Universitário São Lucas (UniSL)

Endereço: Rua Alexandre Guimarães, 1927, Areal, Porto Velho - RO, CEP: 76805-846

E-mail: farma.lesca@gmail.com

Flávio Augusto de Souza Oliveira

Mestre em Biologia Experimental pela Universidade Federal de Rondônia (UNIR)

Instituição: Universidade Federal de Rondônia (UNIR)

Endereço: Av. Pres. Dutra, 2965, Olaria, Porto Velho - RO, CEP: 76801-058

E-mail: oliveira.fas@gmail.com

Rafaela Lucas Costa de Araújo

Acadêmica do Curso de Enfermagem

Instituição: Centro Universitário São Lucas (UniSL)

Endereço: Rua Alexandre Guimarães, 1927, Areal, Porto Velho - RO, CEP: 76805-846

E-mail: rafaela_araujo1@outlook.com

Juliana Vieira Frezza Bernardes Cohen

Mestra em Biologia Odontológica pela Universidade em Taubaté (UNITAU)

Instituição: Centro Universitário São Lucas (UniSL)

Endereço: Rua Alexandre Guimarães, 1927, Areal, Porto Velho - RO, CEP: 76805-846

E-mail: julianafrezza@yahoo.com.br

Leonardo de Azevedo Calderon

Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade de Brasília (UnB)

Instituição: Universidade Federal de Rondônia (UNIR)

Endereço: Av. Pres. Dutra, 2965, Olaria, Porto Velho - RO, CEP: 76801-058

E-mail: calderon@unir.br

Christian Collins Kuehn

Doutor em Biociências Aplicada à Farmácia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (USP)
Instituição: Universidade Federal de Rondônia (UNIR)
Endereço: Av. Pres. Dutra, 2965, Olaria, Porto Velho - RO, CEP: 76801-058
E-mail: christian.collins@unir.br

Flávia Serrano Batista

Doutora em Biologia Experimental pela Universidade Federal de Rondônia (UNIR)
Instituição: Centro Universitário São Lucas (UniSL)
Endereço: Rua Alexandre Guimarães, 1927, Areal, Porto Velho - RO, CEP: 76805-846
E-mail: flavia.serranob@gmail.com

RESUMO

Introdução: A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um grave problema de saúde pública. Este fato associado à formação de biofilmes dificulta o tratamento de infecções provocadas por estes microrganismos. Entre os candidatos mais promissores frente a resistência bacteriana estão os peptídeos e proteínas bioativas, em especial as serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops*. O veneno de serpente constitui uma ampla fonte de moléculas bioativas, contendo proteínas, peptídeos e enzimas. Dentre estes componentes, destacam-se as fosfolipases A2 (PLA2), a qual possui uma grande variedade de atividades biológicas. **Objetivo:** Prospecção *in vitro* dos peptídeos miméticos PLAS-VP e PLAS-AK de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* contra bactérias formadoras de biofilme. **Materiais e Métodos:** A técnica de poço-difusão foi realizada em placas de petri com a adição dos peptídeos e sementeira das cepas bacterianas Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC) em dupla camada de meio Mueller Hinton (MH). Os testes para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado em placas de 96 poços a 37 °C por 24 horas em triplicata, nas concentrações de 200 a 1,56 µg/mL, tendo o imipenem como controle positivo. **Resultados:** Os peptídeos PLAS-VP e PLAS-AK, não apresentaram halos de inibição nas concentrações testadas. Entretanto os resultados de ambos os peptídeos apresentaram crescimento microbiano nas concentrações utilizadas quando comparados ao controle positivo. **Discussão:** Dentre as perspectivas iniciais do projeto, consideramos a hipótese de uma ação antagônica quando comparado a inibição microbiana. Devido à presença de bioativos ainda não elucidados que proporcionaram o crescimento das unidades formadoras de colônia bacteriana. **Conclusão:** Os peptídeos não demonstraram atividades antimicrobiana, entretanto, os resultados demonstram expressivo desenvolvimento microbiológico, prospectando assim um potencial bioativo como insumo para a ação proliferativa de bactérias relacionado a biotecnologia médica.

Palavras-chave: Peptídeos PLAS-VP / PLAS-AK, Análise *in vitro*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Introduction: Bacterial resistance to antimicrobials is a serious public health problem. This fact associated with the formation of biofilms makes it difficult to treat infections caused by these microorganisms. Among the most promising candidates against bacterial resistance are peptides and bioactive proteins, especially snakes belonging to the *Bothrops* genus. Snake venom constitutes a wide source of bioactive molecules, containing proteins, peptides and enzymes. Among these components, phospholipases A2

(PLA2) stand out, which has a wide variety of biological activities. Objective: In vitro prospection of PLAS-VP and PLAS-AK mimetic peptides from Bothrops snake venoms against biofilm-forming bacteria. Materials and Methods: The well-diffusion technique was performed in petri dishes with the addition of peptides and seeding of Gram-negative bacterial strains (*Escherichia coli* ATCC and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC) in a double layer of Mueller Hinton (MH) medium. The tests to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) were performed in 96-well plates at 37 °C for 24 hours in triplicate, at concentrations from 200 to 1.56 µg/mL, with imipenem as a positive control. Results: PLAS-VP and PLAS-AK peptides did not show inhibition halos at the concentrations tested. The results of both peptides showed microbial growth at the concentrations used when compared to positive and negative controls correspondingly. Discussion: Among the initial perspectives of the project, we consider the hypothesis of antagonistic action against microbial inhibition. Conclusion: The peptides did not demonstrate antimicrobial activities, however, the results demonstrate significant bacterial microbiological development, thus prospecting a bioactive potential as an input for the proliferative action of bacteria related to medical biotechnology

Keywords: PLAS-VP / PLAS-AK peptides, *In vitro* analysis, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

1 INTRODUÇÃO

O conjunto de dois ou mais resíduos de aminoácidos ligados de modo covalente através de uma ligação amida substituída, são denominadas moléculas de peptídeos e apresentam ação diversificada em processos fisiológicos (PIRES; BEMQUERER; DO NASCIMENTO, 2014), podendo assim, ser alvo de possíveis aplicações tecnológicas, tais como atividade antimicrobiana (HANCOCK, SCOTT, 2000), antitrombótica (MENEZES et al, 2011), opióide (GOLDBERG, 2010) e antioxidante (ZHANG, FALA, 2009).

O conhecimento amplo destas biomoléculas em suas atividades naturais demonstra a relevância para o ambiente em que operam e a possibilidade de transformá-las ou utilizá-las como uma fonte de ferramenta para o desenvolvimento de novas drogas (BROGDEN, 2005).

O uso de ferramentas de tecnologia da informação se mostra favorável ao desenvolvimento racional de peptídeos e têm gerado oportunidades e futuros direcionamentos científicos, com novas descobertas de potenciais candidatos a fármacos, através de projetos racionais de peptídeos, baseados em métodos de bioinformática ou técnicas de modelagem molecular (ZHOU et al 2013; FOSGERAU, HOFFMANN, 2015).

O gênero *Bothrops* possui uma alta distribuição de resíduos básicos e hidrofóbicos responsáveis pelo mecanismo de miotoxicidade destas proteínas a exemplo, região C-terminal das PLA₂s. A região N-terminal não possui características de toxicidade (LOMONTE, RANGEL, 2012). No entanto, estas “proteínas” PLA₂s e peptídeos miméticos inspirados nas regiões C-terminais e N-terminais apresentam propriedades multifuncionais que podem ser de interesse no desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra parasitas, bactérias, câncer e doença de Alzheimer (COSTA et al, 2008; SMITH et al, 2016).

Assim, o cenário atual demonstra um crescente aumento no número de microrganismos multirresistentes como *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosas*) entre os mais comuns (OMS, 2014; OSTOJIC; HUKIC, 2015; ANVISA, 2017). Este problema associado à formação de biofilmes e a baixa produção de novos compostos pela indústria farmacêutica evidencia a emergência global da produção de antibióticos (HENRIQUES et al., 2013; AGGA et al., 2015).

E. coli possui resistência a múltiplos antibióticos e historicamente, foi uma das primeiras classes a demonstrar resistência a penicilina, pela produção de enzimas denominadas β-lactamases (WRIGHT, 2004; CARNEIRO, 2006). Estas são uma família de enzimas que possuem atividade hidrolítica, ou seja, atuam degradando os anéis betalactâmicos presentes em diversos antibióticos de uso comum, entre eles: penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (WRIGHT, 2004; CARNEIRO, 2006).

E. coli apresenta-se extremamente envolvida em surtos de infecções hospitalares e diversas cepas apresentam resistência a múltiplos antibióticos em decorrência da produção de β-lactamases de espectro estendido conhecida como (ESBL) (FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009).

Outro patógeno já destacado como importante agente infeccioso oportunista aproveitando-se do sistema imunológico debilitado dos portadores é o *Pseudomonas aeruginosa* (WOODS, 1980; RYBTKE, 2015). Assim, as maiores incidências de mortalidade atribuída a *P. aeruginosa* ocorrem paralelamente a outras doenças, principalmente sendo as principais enfermidades respiratórias como fibrose cística e pessoas acometidas de queimaduras (WOODS, 1980; SALA et al., 2016).

P. aeruginosa também é um dos patógenos mais comuns associados à colonização de pessoas internadas com quadros graves de queimaduras (REMPEL; TIZZO; VASCO, 2011; RYBTKE et al., 2015). Essa bactéria possui resistência natural e adquirida a diversas classes de antimicrobianos dentre este, cefalosporinas de primeira e segunda

geração, tetraciclina, cloranfenicol e macrolídeos (ÁLVAREZ et al., 2005; PANGHAL et al., 2015).

Todos esses mecanismos de resistência associados à colonização de imunossuprimidos torna este um dos principais microrganismos em infecções humanas (STRATEVA; YORDANOV, 2009).

Desta forma, todos os anos são gastos milhões de dólares em medicamentos no tratamento de infecções bacterianas. Este fato tem pressionado a seleção natural de microrganismos capazes de resistir cada vez mais aos tratamentos disponíveis (CHEN et al., 2014).

Assim, os peptídeos antimicrobianos sintéticos têm ocupado o posto de moléculas promissoras no combate dessas infecções, bem como potenciais terapias adjuvantes uma vez que apresentam resultados satisfatórios em testes *in vitro* (CALDERON et al., 2011; RAJA et al., 2013).

Estas moléculas apresentam características interessantes como rápido mecanismo de ação e amplo espectro, sendo efetivo no combate de microrganismos gram-positivos e negativos, além de apresentarem baixa probabilidade de resistência. Cabe ressaltar que os peptídeos interagem de maneira sinérgica com antibióticos já existentes, potencializando assim seu mecanismo de ação (HUANG; HUANG; CHEN, 2010; BROGDEN et al., 2005).

2 MÉTODOS

As sínteses dos peptídeos possuem o N-terminal amidado e foram produzidas sinteticamente pela empresa Aminotech Pesquisa e Desenvolvimento Ltda, Diadema, São Paulo e disponibilizada pelo Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas a Saúde – CEBio – RO.

Para a realização dos testes antimicrobianos *in vitro*, os peptídeos PLAS-AK e PLAS-VP foram solubilizados nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 µg/mL por solvente dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) na concentração máxima de 0,5%. Todas as soluções foram preparadas no dia da realização dos experimentos, evitando o risco de perda da atividade dos compostos em contato com o solvente. Logo, os compostos previamente solubilizados foram submetidos aos ensaios biológicos.

Para realização dos experimentos científicos foram utilizadas espécies bacterianas ATCC's de *Escherichia coli* (25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (27853). Tais cepas

bacterianas foram utilizadas no Centro Microbiológico e Parasitológico (CEMiP) da Fundação Universidade Federal de Rondônia – UNIR.

A preparação do inóculo bacteriano utilizado nas técnicas de poço-difusão e Concentração Inibitória Mínima (CIM) teve como base o método de crescimento, conforme consta no protocolo M07-A9 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

Com auxílio de swab, colônias mantidas em ágar nutriente, foram inoculadas em tubos contendo caldo BHI e colocadas em estufa a 37 °C por 24 horas, com o intuito de promover o crescimento bacteriano até o meio ficar completamente turvo. Em seguida, a cultura em caldo, foi ajustada com solução fisiológica 0,9% e previamente autoclavada, a fim de obter uma turbidez comparável ao padrão de turvação 0,5 na escala de McFarland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

A concentração ajustada do inóculo pela escala de McFarland, foi aplicada como sementeira em placa de Petri, para triagem antimicrobiana dos peptídeos, bem como utilizada na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

2.1 MÉTODO DE POÇO-DIFUSÃO

Para realização da técnica de poço-difusão os ensaios tiveram seu desenvolvimento como proposto por Grove e Randall (1955) e no protocolo M02-A11, seção 9.1 (CLSI, 2012), com modificações.

Inicialmente foi preparado em um Erlenmeyer o meio Mueller Hinton (MH), com proporção de 37 gramas de meio para 1 Litro de água destilada e foi levado em autoclave por 15 minutos. Após o período de autoclave em placas de petri de poliacrilamida 90 x 15 mm estéreis, foram adicionados 10 mL do meio, aguardando por 10 minutos. Seguido a solidificação, foi adicionada mais 15 mL de meio MH para posterior obtenção de uma dupla camada. Após o preparo das placas, com o auxílio de uma pipeta pasteur de vidro estéril de 10 mL, foram realizadas as perfurações dos poços no meio, para adição das amostras testadas, respeitando o limite da primeira camada de ágar. A partir do inóculo ajustado ao padrão 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), com o auxílio de um swab de algodão, as cepas bacterianas foram semeadas sobre a dupla camada de MH. Em seguida, o peptídeo foi diluído em água Mili-Q[®] em concentrações de (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56 µg/mL) e adicionado 40 µL nos respectivos poços correspondentes as concentrações. Como controle positivo para inibição do crescimento celular, foi utilizado imipenem 200 µg/mL diluído em água Mili-Q[®]. Após o término, as placas foram

encaminhadas para estufa à 37 °C por 24 horas e a atividade antimicrobiana do peptídeo foi verificada através da formação de halos de inibição ao redor dos poços. Os ensaios foram realizados em triplicata e a medição dos halos foi realizada com halômetro e aplicada em milímetros (mm).

2.2 MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO: CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

O método de microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado com base no protocolo M07-A9 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) com modificações.

Inicialmente, o peptídeo PLAS-VP e PLAS-AK foi diluído em caldo BHI ajustado em concentração de 400 µg/mL. A concentração inicial obtida, possuiu 2X as concentrações finais esperadas, visto que ocorreu diluição 1:2 da amostra, quando adicionado o volume equivalente de inóculo. Em placas estéreis de 96 poços fundo em U, foram adicionados 200 µL do peptídeo na primeira coluna e 100 µL de BHI nas colunas subsequentes e foram realizadas diluições seriadas em concentrações de 200 a 1,56 µg/mL. Em seguida, em seus respectivos testes, foram adicionados 100 µL dos inóculos bacterianos ATCCs de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* a $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) correspondente a 0,5 na escala de McFarland, sendo o volume final de 200 µL em cada poço. Como controle positivo, utilizou-se o imipenem 200 µg/mL, e controle negativo somente caldo BHI mais a concentração de uso bacteriana. Como branco, foi utilizado somente caldo BHI. Após 24 horas incubadas em estufa a 37 °C as placas de 96 poços foram levadas ao microleitor de placas e lidas em comprimento de ondas de 450 nm. A técnica experimental foi realizada em duas placas (duplicata) com dias alternados e as análises estatísticas sobre a média das triplicatas experimentais.

2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas, assim como os cálculos matemáticos envolvidos nos experimentos de Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi utilizado o software *GraphPad Prism* versão 7.0, complementado pelo Pós-teste de *Tukey* para determinação dos níveis de significância dos resultados e comparação das médias obtidas.

3 RESULTADOS

3.1 MÉTODO DE POÇO-DIFUSÃO

A avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do peptídeo PLAS-VP e PLAS-AK foi realizada por meio do método de poço-difusão e os peptídeos foram diluídos em concentrações de 200 a 1,56 µg/mL e avaliados pela capacidade de formação de halo de inibição expressos em milímetros (mm).

Após aplicação do método e análise dos experimentos, foi observado a não formação de halos de inibição bacteriana frente as cepas celulares de *E. coli* e *P. aeruginosa* ATCCs em nenhuma das concentrações dos peptídeos. Diferentemente do controle positivo (imipenem 200 µg/mL), pois o mesmo apresentou halo > 30 mm em ambas as cepas, conforme exemplificado na tabela 1 e 2

Tabela 1 – Resultado da atividade antimicrobiana dos peptídeos PLAS-VP e PLAS-AK frente à cepa de *E. coli* ATCC (25922) pela técnica de poço-difusão.

CEPA BACTERIANA	CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	TAMANHO DOS HALOS DE INIBIÇÃO (mm)		CONTROLE
		PLAS-VP	PLAS-AK	IMIPENEM (200 µg/mL)
<i>Escherichia coli</i> ATCC (25922)	200	-	-	> 30 mm
	100	-	-	
	50	-	-	
	25	-	-	
	12,5	-	-	
	6,25	-	-	
	3,12	-	-	
	1,56	-	-	

Bactéria *E.coli* ATCC frente aos peptídeos PLAS-VP e PLAS-AK de serpente do gênero *Bothrops* em concentrações de (200 à 1,56 µg/mL); Imipenem – Controle Positivo para inibição de crescimento bacteriano em concentração de 200 µg/mL.

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 2 – Resultado da atividade antimicrobiana dos peptídeos PLAS-VP e PLAS-AK frente à cepa de *P. aeruginosa* ATCC (27853) pela técnica de poço-difusão.

CEPA BACTERIANA	CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	TAMANHO DOS HALOS DE INIBIÇÃO (mm)		CONTROLE
		PLAS-VP	PLAS-AK	IMIPENEM (200 µg/mL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC (27853)	200	-	-	> 30 mm
	100	-	-	
	50	-	-	
	25	-	-	
	12,5	-	-	
	6,25	-	-	
	3,12	-	-	
	1,56	-	-	

Bactéria *P. aeruginosa* ATCC frente aos peptídeos PLAS-VP e PLAS-AK de serpente do gênero *Bothrops* em concentrações de (200 a 1,56 µg/mL); Imipenem – Controle Positivo para inibição de crescimento bacteriano em concentração de 200 µg/mL).

Fonte: dados da pesquisa.

3.2 MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO: CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

O método de microdiluição em caldo foi realizado para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente às cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa* ATCCs.

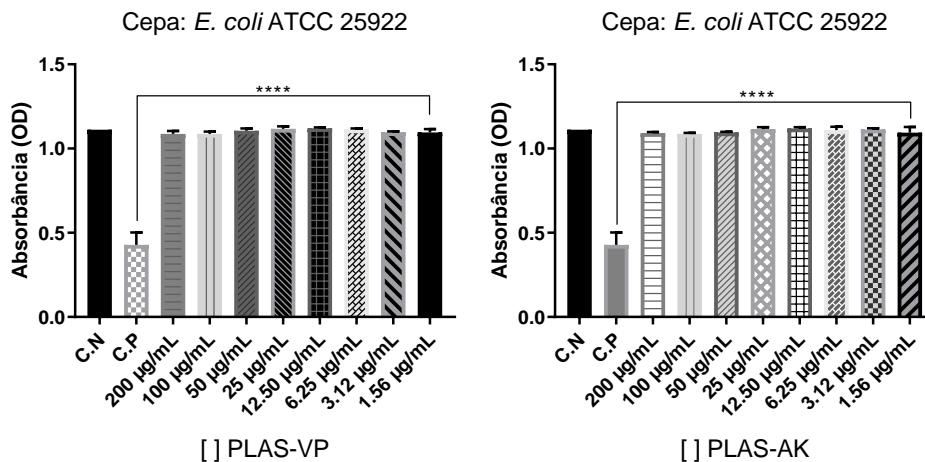
Foram realizadas inspeções visuais dos experimentos com o intuito de verificar se houve formação de turbidez, a qual é característica do crescimento bacteriano e posteriormente, foram realizadas as leituras em turbimetria (DO) a 450nm. Foi utilizado como método para demonstração de inibição do crescimento bacteriano a comparação estatística entre os grupos de Controle Negativo (CN) e Controle Positivo (CP) para inibição do crescimento celular. Também foram realizadas comparações entre as diferentes concentrações dos peptídeos.

Na inspeção visual foram detectados precipitados bacteriano nos poços, nas concentrações de ambos os peptídeos, assim como nos poços do controle negativo, demonstrando que houve desenvolvimento microbiano das cepas. Visualmente, o controle positivo (imipenem 200 µg/mL) apresentou ação antimicrobiana, pois inibiu o crescimento bacteriano, não apresentando turvação nos poços.

Em seguida, a leitura turbidimétrica a 450 nm, foi realizada nas amostras. Os peptídeos PLAS-VP e PLAS-AK foram testados nas concentrações (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56 µg/mL) e não apresentaram inibição do crescimento da bactéria

gram negativa *E. coli* em 24 h. Os resultados nas concentrações de (200 a 1,56 µg/mL) demonstram que os peptídeos tiveram ação semelhante ao controle negativo, potencializando a ação proliferativa de atividade microbiológica, como pode ser observado na figura 1.

Figura 1 – Determinação in vitro da Concentração Inibitória Mínima (CIM), do peptídeo PLAS-VP e PLAS-AK, frente a cepa de *Escherichia coli* ATCC.



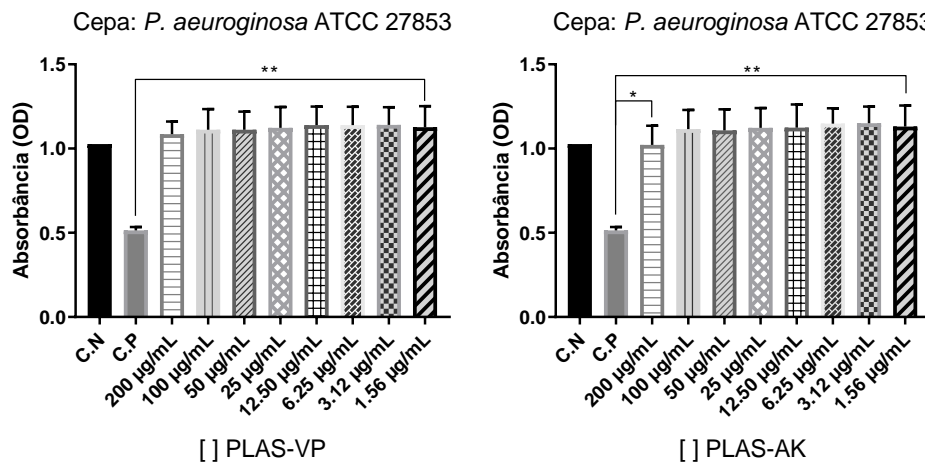
Absorbância das médias obtidas em turbidimetria com leitura de 450nm de comprimento de onda. Quanto maior o valor de absorbância (DO), maior o crescimento ou viabilidade bacteriana frente a amostra testada. Controle Negativo (CN), Controle Positivo (CP). Os resultados obtidos demonstraram diferença estatisticamente significativas comparadas ao grupo CP nas concentrações de 200 a 1,56 µg/mL com nível de significância de ****P<0.0001. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados expressos como a média (±) desvio padrão das absorbâncias.

Fonte: dados da pesquisa.

A cepa de *P. aeruginosa* ATCC pelo peptídeo PLAS-VP na leitura de 24 h nas concentrações de 200 a 1,56 µg/mL, não demonstrou atividade inibitória em nenhuma das concentrações testadas, entretanto apresentou desenvolvimento bacteriano quando comparado ao controle positivo.

Os ensaios do peptídeo PLAS-AK com cepas de *P. aeruginosa* ATCC demonstraram, diferença estatística em relação ao controle positivo (imipenem 200 µg/mL) com *P<0.5 e **P<0.01 devido ao crescimento exponencial bacteriano nas concentrações de 200 a 1,56 µg/mL. Os resultados de ambos os peptídeos estão exemplificados na figura 2.

Figura 2 – Determinação *in vitro* da Concentração Inibitória Mínima (CIM), do peptídeo PLAS-VP e PLAS-AK, frente a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC.



Absorbância das médias obtidas em turbidimetria com leitura de 450nm de comprimento de onda. Quanto maior o valor de absorbância (DO), maior o crescimento ou viabilidade bacteriana frente a amostra testada. Controle Negativo (CN), Controle Positivo (CP). Os resultados obtidos demonstraram diferença estatisticamente significativas comparadas ao grupo CP nas concentrações de 200 a 1,56 µg/mL com nível de significância de *P<0.5 e **P<0.01. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados expressos como a média (±) desvio padrão das absorbâncias.

Fonte: dados da pesquisa.

Contudo, compreende-se que ambos os peptídeos, PLAS-VP e PLAS-AK, frente as cepas bacterianas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* ATCCs, não obtiveram uma concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano em comparação ao controle negativo (CN).

4 DISCUSSÃO

Atualmente o grande desafio relacionado a assistência de saúde, são as doenças infecciosas, pois estão entre as 10 principais causas de mortalidade no mundo (WHO, 2015; PARISI et al., 2017). Este desafio tem sido reforçado pelo incremento da resistência antimicrobiana (AMR – *Antimicrobial resistance*) que se tornou uma grave ameaça à saúde pública global por uma variedade crescente de infecções causadas por diferentes patógenos resistentes ao tratamento clínico convencional (WHO, 2014).

Assim, a prevalência de resistência bacteriana aos antimicrobianos têm promovido um intenso processo de prospecção, voltado a moléculas ou componentes bioativos, que sirvam como fortes candidatos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Conforme Castillo, et al. (2012), a atividade microbicida de fosfolipases A₂ (PLA₂s) de serpentes do gênero *Bothrops* tem sido amplamente estudada, pois tais proteínas apresentam muitas propriedades farmacológicas, dentre estas, atividades neurotóxicas, miotóxicas, anticoagulantes, hipotensivas e indução de edema.

Neste estudo, inicialmente foi verificada a atividade antimicrobiana através da técnica de poço-difusão. Tal atividade é avaliada pela presença de halo de inibição bacteriana maior que 8 mm. Contudo, os peptídeos PLAS-VP e PLAS-AK não exerceram ação antimicrobiana sobre as cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa* ATCCs utilizadas nos testes, pois os peptídeos testados não inibiram o crescimento bacteriano e consequentemente não houve formação de halos de inibição.

Entretanto, fatores como o tamanho e a polaridade da molécula podem ser decisivos para o aparecimento de halo de inibição, característicos de atividade antimicrobiana. Assim, estes fatores podem impedir que tais compostos expressem sua real atividade antimicrobiana (ESTRELA et al., 2000; TOIT; RAUTENBACH, 2000; MORENO et al., 2006).

Por outro lado, tão importante quanto os testes de poço-difusão são os testes de microdiluição, pois estes são essenciais para verificação e validação de peptídeos como futuros fármacos, corroborando como uma importante ferramenta de prospecção científica microbiológica (ALVES et al., 2008).

Para obtenção de resultados da atividade antimicrobiana dos peptídeos, após a realização dos ensaios preliminares de difusão em ágar, também foi realizado teste de microdiluição para verificar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os resultados de CIM de ambos os peptídeos apresentaram ação antagônica ao esperado, ou seja, não demonstraram atividade antimicrobiana, mas expressivo crescimento bacteriano quando comparado ao controle positivo.

Costa et al (2008) verificaram que peptídeos sintéticos catiônicos derivados da C-terminal de PLA₂s do veneno de *Bothrops brazili* obtiveram efeitos microbicidas contra *Escherichia coli*, tornando-se um forte candidato como biomolécula antimicrobiana. Entretanto, a ação C-terminal de PLA₂s contrapõe-se aos resultados dos peptídeos PLAS-VP e PLAS-AK da região N-terminal, pois os mesmos demonstraram desenvolvimento bacteriano contras cepas gram-negativas analisadas neste estudo.

Conforme Lomonte e Rangel (2012), a região N-terminal não possui características de toxicidade, como comumente encontrada na região C-terminal. Segundo Borges et al (2017), a região C-terminal das PLA₂s do gênero *Bothrops* possui uma alta distribuição de resíduos básicos e hidrofóbicos, responsáveis pelo mecanismo de miotoxicidade destas proteínas. Já a região N-terminal, não possui características miotóxicas.

Rotineiramente encontram-se estudos da região C-terminal, comprovando a sua ação antibacteriana e alta capacidade de toxicidade. Entretanto, quando direcionamos essa pesquisa a região N-terminal, não temos o mesmo resultado. Além da escassez de estudos da região N-terminal se comparada a região C-terminal, os estudos encontrados identificam efeitos proliferativos e/ou inibidores voltados a ação de agentes infecciosos e parasitários, não trazendo evidências da sua ação bacteriana.

Assim, este estudo corrobora para que novos experimentos avaliem a capacidade que os peptídeos, PLAS-VP e PLAS-AK, possuem como insumos, seja para a linhagem médica ou laboratorial.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com este trabalho, revelam que os peptídeos PLAS-VP e PLAS-AK das serpentes do gênero *Bothrops* spp., não demonstraram potencial antimicrobiano frente as cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa*, em relação a formação de halo de inibição no método de poço-difusão. Tais peptídeos, demonstraram não possuir atividades antimicrobiana pela técnica de microdiluição (Concentração Inibitória Mínima - CIM) nas concentrações de 200 a 1,56 µg/mL, frente as espécies bacterianas testadas. Entretanto, os resultados demonstram expressivo desenvolvimento microbiológico bacteriano, com perspectivas futuras para um bioativo, utilizado como insumo na ação proliferativa de bactérias relacionado a biotecnologia médica. Assim, este estudo corrobora para que novos experimentos avaliem a capacidade que os peptídeos, PLAS-VP e PLAS-AK, possuem como instrumentos, seja para aplicação médica ou laboratorial.

AGRADECIMENTOS E FINANCIAMENTO

Centro Universitário São Lucas (Programa de Apoio à Pesquisa – PAP / UniSL); Centro Microbiológico e Parasitológico (CEMiP) da Fundação Universidade Federal de Rondônia – UNIR; Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas a Saúde –CEBio.

REFERÊNCIAS

1. ALVES, Raquel de Melo et al. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 151, n. 4, p. 542-550, dec. 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1095643308010404>> Acesso em: 03 jul. 2020.
2. BRASIL. Mecanismos de Resistência bacteriana aos antimicrobianos. 2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/mec_animacao.html
3. BORGES, R. J.; CARDOSO, F. F.; FERNANDES, C. A. H.; DREYER, T. R.; DE MORAES, D. S.; FLORIANO, R. S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; FONTES, M. R. M. Functional and structural studies of a Phospholipase A2-like protein complexed to zinc ions: Insights on its myotoxicity and inhibition mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1861, n. 1, p. 3199–3209, 2017.
4. BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005.
5. CALDERON, L.A.; SILVA, A.A.E.; CIANCAGLINI, P. e STÁBELI, R.G. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. **Amino Acids**, v.40, p.29-49, 2011.
6. CALDERON, L. A.; SOARES, A. M.; STÁBELI, R. G. Anuran Antimicrobial Peptides: An alternative for the development of nanotechnological based therapies for multi- drug-resistant infections. **SOAJ of Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, 2012.
7. CASTILLO, J. C. Q.; VARGAS, L. J.; SEGURA, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; PÉREZ, J. C. A. In vitro antiplasmodial activity of phospholipases A2 and a phospholipase homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxins**, v. 4, n. 12, p. 1500–1516, 2012.
8. COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; OLIVEIRA, C. Z.; SANTOS-FILHO, N. A.; TEIXEIRA, S. S.; NOMIZO, A.; FULY, A. L.; MONTEIRO, M. C.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; STÁBELI, R. G.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops* brazil snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29, n. 10, p. 1645–1656, 2008.
9. FALAGAS, M.E.; KARAGEORGOPOULOS, D.E. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, p. 345-354, 2009.
10. FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: Current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122–128, 2015.
11. GOLDBERG, J. S. Stereochemical basis for a unified structure activity theory of aromatic and heterocyclic rings in selected opioids and opioid peptides. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 2010, n. 4, p. 1–10, 2010.

12. HANCOCK, R. E. W.; SCOTT, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 16, p. 8856–8861, 2000.
13. HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. Importância dos biofilmes nas infecções Nosocomiais. **Arquivos de Medicina**, v.27, n.1. fer. 2013.
14. HUANG, Y.; HUANG, J.; CHEN, Y. Protein & Cell REVIEW Alpha-helical cationic antimicrobial peptides : relationships of structure and function. **Protein & Cell**, v. 1, n. 2, p. 143–152, 2010.
15. Hudault S, Guignot J & Servin AL (2001). *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germ-free mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut*, 49: 47-55.
16. KAPER, James B.; NATARO, James P; MOBLEY, Harry LT. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, n. 2, p. 123-140, 2004.
17. LOMONTE, B.; RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A2 to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 520–530, 2012.
18. MENEZES, M. C.; DE OLIVEIRA, A. K.; MELO, R. L.; LOPES-FERREIRA, M.; RIOLI, V.; BALAN, A.; PAES LEME, A. F.; SERRANO, S. M. T. Disintegrin-like/cysteine-rich domains of the reprolysin HF3: Site-directed mutagenesis reveals essential role of specific residues. **Biochimie**, v. 93, n. 2, p. 345–351, 2011.
19. PARISI, Ortensia I. et al. Polymeric nanoparticle constructs as devices for antibacterial therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 36, p. 72-77, out. 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489217300851?via%3Dihub>> Acesso em: 16 set. 2019.
20. PIRES, D. A. T.; BEMQUERER, M. P.; DO NASCIMENTO, C. J. Some mechanistic aspects on Fmoc solid phase peptide synthesis. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 20, n. 1, p. 53–69, 2014.
21. REMPEL, L.C.T.; TIZZOT, M.R.P.A.; VASCO, J.F.M. Incidência de infecções bacterianas em pacientes queimados sob tratamento em hospital universitário de Curitiba. **Rev Bras Queimaduras**, v.10, n.1, p.3-9, 2011.
22. SAVAGI, D. C. MICROBIAL ECOLOGY OF THE GASTROINTESTINAL TRACT. **Ann Rev. Microbiol**, v.31, p. 107- 133, 1977.
23. SCHLEHECK, D.; BARRAU, N.; KLEBENSBERGER, J.; WEBB, J.S.; MCDUGALD, D.; RICE, S.A.; KJELLEBERG, S. *Pseudomonas aeruginosa*. PAO1 Preferentially Grows as aggregates in Liquid Batch Cultures and Disperses upon Starvation. **Plos ONE**, v.4, n.5, p. 5513-5517, 2009.
24. SMITH, A. I.; RAJAPAKSE, N. W.; KLEIFELD, O.; LOMONTE, B.; SIKANYIKA, N. L.; SPICER, A. J.; HODGSON, W. C.; CONROY, P. J.; SMALL, D. H.; KAYE, D. M.; PARKINGTON, H. C.; WHISSTOCK, J. C.; KURUPPU, S. N-terminal domain of Bothrops asper Myotoxin II Enhances the Activity of Endothelin

Converting Enzyme-1 and Neprilysin. **Scientific Reports**, v. 6, n. July 2015, p. 1–11, 2016.

25. STRATEVA, T; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v.58, p. 1133-1148, 2009.

26. WHO - World Health Organization. Severe malaria. *Tropical medicine & international health*, v. 19, n. supl 1, p. 1-131, 2014.

27. WOODS, D.E.; STRAUS, D, C.; JOHANSON, W.G.; BERRY, V.K. Role of Pili in Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to Mammalian Buccal Epithelial Cells. **infection and Immunity**, v. 29, n.3, p. 1146-1151, 1980.

28. ZHANG, L.; FALLA, T. J. Cosmeceuticals and peptides. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 5, p. 485–494, 1 set. 2009.

29. ZHOU, P.; WANG, C.; REN, Y.; YANG, C.; TIAN, F. Computational Peptidology: A New and Promising Approach to Therapeutic Peptide Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 15, p. 1985–1996, 2013.