



Universidade de Brasília
Programa de Pós-Graduação
em Biologia Animal



**Atividade Antimicrobiana do novo peptídeo Synoeca-MP isolado da
peçonha de *Synoeca surinama* frente a bactérias resistentes**

Daniel Oliveira Freire

Área de concentração:

Fisiologia

Linha de pesquisa:

Farmacologia, toxicologia e produtos naturais.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Márcia Renata Mortari

Brasília-DF



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Atividade Antimicrobiana do novo peptídeo Synoeca-MP isolado da
peçonha de Synoeca surinama frente a bactérias resistentes**

Daniel Oliveira Freire

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma dissertação para obtenção do título de mestrado pelo programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, sob a orientação da Professora Dr^a Márcia Renata Mortari.

Brasília-DF

DEDICATÓRIA

Aos meus pais: João Freire e Maria de Lourdes
Aos amigos: Dr. Luzitano Brandão e Dra. Izabel Silva

AGRADECIMENTOS

- A Deus, que esteve sempre ao meu lado;
- A minha orientadora Dra. Márcia Mortari, pela paciência e dedicação;
- Aos meus irmãos, pelo apoio e carinho nos momentos difíceis;
- Aos meus sobrinhos queridos;
- Ao pastor Flamarion, a pastora Isailde, pastor Sandro e a pastora Eurimar pela força, carinhos e as orientações espirituais;
- Aos amigos da Faculdade LS, por me ajudarem nas horas mais difíceis;
- As amigas Valdelia e Marilen, que foram uma ancora, sempre me mantendo com os pés no chão;
- Aos colegas do Ltx, em especial a Jaqueline e Andreia, sempre prontas a ajudar;
- Aos técnicos do Ltx, pelo apoio;
- Aos meus alunos.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| LISTA DE FIGURAS..... | I |
| LISTA DE TABELAS..... | II |
| LISTA DE ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS..... | III |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | IV |
| RESUMO..... | V |
| ABSTRACT..... | VI |
| 1- INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 Era dos antibióticos <i>versus</i> era das resistências..... | 14 |
| 1.2 Principais bactérias patogênicas..... | 16 |
| 1.3 Peptídeos antimicrobianos..... | 20 |
| 1.4 Mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos..... | 22 |
| 1.5 Peptídeos Antimicrobianos de Artrópodos..... | 26 |
| 1.6 Vespas <i>Synoecca surinama</i> | 29 |
| 2- OBJETIVO..... | 32 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 32 |
| 2.2 Objetivo específico..... | 32 |
| 3 – MATERIAIS E METODOS..... | 33 |
| 3.1 Coleta do material biológico..... | 33 |
| 3.2 Preparação das amostras..... | 33 |
| 3.3 Separação por cromatografia líquida de alta eficiência..... | 34 |
| 3.4 Espectrometria de massas e seqüenciamento dos peptídeos..... | 34 |
| 3.5 Síntese do peptídeo | 35 |
| 3.6 Ensaio antimicrobiano..... | 35 |
| 3.6.1 Preparação das frações e dos peptídeos..... | 35 |
| 3.6.2 Inoculo..... | 35 |
| 3.6.3 Preparação dos antimicrobianas padrão..... | 36 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.6.4 | Preparação dos meios de cultura..... | 37 |
| 3.6.5 | Preparação do teste em placas..... | 37 |
| 3.6.6 | Leitura das placas..... | 38 |
| 3.6.7 | Interpretação dos dados..... | 38 |
| 3.7 | Ensaio hemolítico..... | 38 |
| 4 | - RESULTADOS..... | 40 |
| 4.1 | Ensaio antimicrobiano preliminar com peptídeo natural..... | 42 |
| 4.2 | Espectrometria de massa e sequenciamento da fração 3..... | 45 |
| 4.3 | Resultados com peptídeo sintético | 48 |
| 5 | - DISCUSSÃO | 57 |
| 6 | - CONCLUSÃO..... | 61 |
| 7 | - BIBLIOGRAFIA | 62 |

Lista de Figuras

- Figura 1.** - Estruturas tridimensionais de AMPs. p.21
- Figura 2.** - Representação do mecanismo de modelo de carpete . p. 23
- Figura 3.** - Representação do mecanismo de formação de Barril. p.22
- Figura 4.** - Representação do mecanismo de formação de poros toroidal p. 24
- Figura 5.** - Modo de ação de peptídeos no modelo SMH. p.24
- Figura 6.** - Representação do modelo detergente. p.26
- Figura 7.** - Ninho da vespa visualizado no Centro Olímpico da UnB. p.30
- Figura 8.** - Exemplares da vespa, com enfoque em sua coloração escuro metálica. p.31
- Figura 9** – Perfil cromatográfico da separação em fase reversa gerando um total de 90 frações. A linha central de crescimento progressivo indica a concentração de acetonitrila (5-85%).p.41
- Figura 10** – Perfil cromatográfico após a separação em coluna analítica fase reversa do peptídeo 10, gerando um total de 3 frações. A linha azul indica a concentração de acetonitrila (5-85%).p.42
- Figura 11:** O espectro de massa da fração 3 obtido pelo equipamento MALDI/TOF. p.43
- Figura 12:** Taxa de inibição de crescimento de bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC (29213), utilizando-se a fração 3. p.44
- Figura 13:** Taxa de inibição de crescimento de bactérias *Escherichia coli* (25922), utilizando-se a fração 3.p.43
- Figura 14:** Determinação da sequência de aminoácidos do peptídeo correspondente à fração 3 Realizado no MALDI-TOF/TOF .p.45
- Figura 15:** O espectro de massa do peptídeo sintético que revelou a presença de um único composto, contendo os íons $(M+3H^+) = 533,39$ e $(M+2H^+) = 799,54$.p.48
- Figura 16-** Porcentagem de inibição do peptídeo Synoeca-MP contra as bactérias *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes. p. 51
- Figura 17-** Porcentagem de inibição do peptídeo Synoeca-MP contra as bactérias *Escherichia coli* sensíveis e resistentes p.52
- Figura 18-** Porcentagem de inibição do peptídeo Synoeca-MP contra as bactérias *E. faecalis* sensíveis e resistentes. p.53
- Figura 19-** Porcentagem de inibição do peptídeo Synoeca-MP contra as bactérias *P. auruginosa* sensíveis e resistentes. p.54
- Figura 20-** Porcentagem de inibição do peptídeo Synoeca-MP contra as bactérias *K. pneumoniae* sensíveis e resistentes. p.55
- Figura 21:** Ensaio hemolítico usando diferentes concentrações do peptídeo Synoeca-MP. p.56

Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Descrição das estruturas primárias de peptídeos antimicrobianos isolados da peçonha de vespas nesta última década. p.27
- Tabela 2:** Sequencia primaria de mastoparano isolados de peçonha de vespas. p 47.

Tabela 3: Relação das doses do peptídeo Synoeca-MP, em μM , testadas para os grupos. p.49

Tabela 4: Comparação entre os MIC_{50} e MIC_{90} obtidos por regressão não-linear do peptídeo Synoeca-MP em Cepas Padrão ATCC (μM) .p. 50.

Lista de Abreviações

ABL- Antibióticos do Brasil

ACN- Acetonitrila

AMP- Peptídeos Antimicrobianos

ATCC: American Type Culture Collection

BHI - Brain Heart Infusion

CA-MRSA – Community associated *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina .

CDC - Centers for Disease Control and Prevention (Centro de controle e prevenção de doenças).

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

ESBLs - Extended-Spectrum β -Lactamase (β -Lactamase de espectro estendido)

GRSA - *Staphylococcus aureus* resistente aos glicopeptídeos

HPLC - High Performance Liquid Chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IrAS - Infecções Relacionados com a Assistência de Saúde

KPC - *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

MALDI - Matrix-assisted laser desorption/ionization

MIC - Concentração Inibitória Mínima

MRSA - *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina

MS - mass spectrometry (espectrometria de massa)

OMS - Organização Mundial de Saúde

SMH - Shai-Matsuzaki-Huang

TFA - ácido trifluoracético

VRE – *Vancomycin Resistant Enterococci*,

VRSA - *Staphylococcus aureus* Resistente a Vancomicina

Lista de abreviaturas dos aminoácidos

| Nome | Símbolo | Abreviatura |
|-----------------|----------------|--------------------|
| Glicina | Gly | G |
| Alanina | Ala | A |
| Leucina | Leu | L |
| Valina | Val | V |
| Prolina | Pro | P |
| Fenilalanina | Phe | F |
| Isoleucina | Ile | I |
| Serina | Ser | S |
| Treonina | Thr | T |
| Cisteína | Cys | C |
| Tirosina | Tyr | Y |
| Asparagina | Arg | R |
| Ácido aspártico | Asp | D |
| Ácido glutâmico | Glu | E |
| Arginina | Asn | N |
| Glutamina | Gln | Q |
| Histidina | His | H |
| Triptofano | Trp | W |

RESUMO

Nas últimas décadas, a busca por novos antimicrobianos tem despertado o interesse dos pesquisadores pelos Peptídeos Antimicrobianos (AMPs). Os AMPs apresentam em média de 10 a 100 resíduos de aminoácidos e, em geral, fazem parte do sistema de defesa inato dos organismos vertebrados e invertebrados ou de secreções, promovendo uma proteção contra uma variedade de microrganismos. Os AMPs por sua característica catiônica são atraídos pela superfície aniônica das membranas bacterianas, e após a interação, estes peptídeos sofrem mudanças conformacionais, causando uma perturbação na estrutura da bicamada lipídica. Atualmente, um número expressivo de estudos tem identificado da peçonha de vespas diversos peptídeos bioativos classificados por suas estruturas químicas e por suas atividades biológicas, em especial, as ações antimicrobianas. *Synoeca surinama* é uma vespa social que compõe um pequeno gênero com cinco espécies descritas: *S. chalibea*, *S. virginea*, *S. surinama*, *S. septentrionalis* e *S. cyanea*. Frente ao desafio do crescente número de cepas resistentes e à potencialidade dos peptídeos como precursores para a descoberta de novos fármacos antimicrobianos, este trabalho visou buscar novas alternativas para o tratamento de infecções bacterianas. Os ninhos da vespa *S. surinama* foram coletados na área de mata do Centro Olímpico da UnB (Universidade de Brasília). Para a separação dos constituintes da peçonha por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a peçonha foi liofilizada e ressuspendida em água deionizada com 5% de acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoroacético. A avaliação da ação antimicrobiana foi realizada pela técnica de microdiluição em placas para determinação do MIC (Concentração Inibitória Mínima). Um peptídeo da classe dos mastoparanos foi isolado apresentando uma massa molecular de 1594,8 Da. O peptídeo foi sequenciado em por MALDI/TOF no modo linear refletido. A sequência foi determinada como I/L-N-W-I/L-K-I/L-G-K-K-I/L-I/L-A-S-I/L-NH₂. Trata-se de peptídeo inédito, pois não foi encontrado nos bancos de dados referências desta sequência. O peptídeo foi, então, denominado *Synoeca-MP* e foi sintetizada pela AminoTech Pesquisa e Desenvolvimento Ltda. O peptídeo *Synoeca-MP* foi testado contra 10 cepas ATCC nas doses: 62,5; 31,5; 15,6, 6,25; 3,12; 1,5 e 0,62 µM. O *Synoeca-MP* apresentou uma excelente ação antimicrobiana, para as doses testadas o MIC₅₀ variou de 1,97 µM a 10,8 µM e o MIC₉₀ variou de 1,24 µM a 17,8 µM. Os valores dos MICs foram calculados estatisticamente por regressões não-lineares sigmoidais. O EC₅₀ calculado para a atividade hemolítica do peptídeo foi de 185µM, que representa 17 vezes a dose antimicrobiana efetiva mais alta realizada nos ensaios. Sendo assim, o *Synoeca-MP* pode ser considerado um promissor fármaco antimicrobiano.

Palavra chave: peçonha, peptídeos , antimicrobianos, resistência bacteriana, *Synoeca surinama*

ABSTRACT

In recent decades, the search for new antimicrobials has piqued the interest of researchers for Antimicrobial peptides (AMPs). The AMPs have on average 10 to 100 amino acid residues and usually are part of the innate defense of vertebrate and invertebrate organisms or secretion system, providing a protection against a variety of microorganisms. The MPAs by its cationic character are attracted to the anionic surface of bacterial membranes, and after the interaction, these peptides undergo conformational changes, causing a disturbance in the structure of the lipid bilayer. Currently, a significant number of studies have identified the wasp venom of many bioactive peptides ranked by their chemical structures and their biological activities, in particular, the antimicrobial actions. *Synoeca surinama* is a social wasp which makes up a small genus with five species are described: *S. chalibea*, *virginea*, *S. surinama*, *S. septentrionalis* and *S. cyanea*. Forward to the challenge of the increasing number of seem quite resistant strains and potential of peptides as precursors for the discovery of new antimicrobial drugs, this work aims to seek new alternatives for the treatment of bacterial infections. Wasp Nests *S. surinama* were collected in the forested area of the Olympic Centre at UNB (University of Brasilia). For the separation of the constituents of the venom by high performance liquid chromatography (HPLC), the venom is lyophilized and resuspended in deionized water with 5% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid. The evaluation of the antimicrobial activity was performed by microdilution plates for determination of MIC (Minimum Inhibitory Concentration). A class of peptide was isolated mastoparanos having a molecular mass of 1594.8 Da. The peptide was sequenced by MALDI / TOF reflected in the linear mode. The sequence was determined as I/LNWI/LKI/LGKKI/LI/LASI/L-NH₂. This is unheard of peptide because it was not found in the data banks of references this sequence. The peptide was then called *Synoeca* - MP and was synthesized by Aminotech Research and Desenvolvimento Ltda. The *Synoeca* - MP peptide was tested against 10 strains ATCC doses: 62.5; 31.5; 15.6, 6.25; 3.12; 1.5 and 0.62 mM. The *Synoeca* - MP presented an excellent antimicrobial activity for the MIC₅₀ doses tested ranged from 1.97 mM to 10.8 mM and MIC₉₀ ranged from 1.24 mM to 17.8 mM. The MIC values were calculated statistically by a sigmoidal non-linear regression. The EC₅₀ calculated for the hemolytic activity of the peptide was 185 μM, which is 17 times the highest effective dose antimicrobial held in rehearsals. Thus, the *Synoeca* -MP could be considered a promising antimicrobial drug.

Keyword: venom, peptides, antibiotics, bacterial resistance, *Synoeca surinama*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Era dos antibióticos *versus* a era da resistência

Ao longo da sua existência, os seres humanos têm travado uma batalha diária no controle à multiplicação de microrganismos patogênicos. Nos anos 30, teve início a era dos antibióticos; o Dr. Alexandre Fleming descobriu, acidentalmente, o que seria o primeiro antibiótico natural. No início de 1940, a penicilina isolada pelo Dr. Fleming torna-se disponível para o uso clínico, mas o que parecia ser uma arma potente na luta contra as doenças infecciosas, teve um curto período de glória (Singh e Pandeya, 2011). Quase ao mesmo tempo da implantação do uso de fármacos antimicrobianos, as bactérias passaram a expressar fenótipos de resistência pela produção de enzimas, como as beta-lactamases (Tenover, 2006).

As bactérias habitam a terra há mais de 3,8 bilhões de anos e apresentam uma grande diversidade genética e metabólica. Na luta pela sobrevivência, elas desenvolveram mecanismos para responder à pressão seletiva e aos desafios na competição por nichos ecológicos (Thomson e Bonomo, 2005). O uso de fármacos antimicrobianos tem sido também um instrumento de pressão seletiva, e em resposta a esta ofensiva, as bactérias vêm expressando mecanismos de resistência naturais ou adquiridos (Giedraitiene *et al.*, 2011; Toledo *et al.*, 2012).

No início do século 20, as pesquisas avançaram, possibilitando a descoberta de muitos novos antimicrobianos e também de técnicas de controle de infecção, dando vantagens aos seres humanos na luta contra os microrganismos patogênicos (Nathan, 2004).

Com o uso de novos fármacos antimicrobianos nas terapias, o nível e a complexidade dos mecanismos de resistência bacteriana aumentaram de forma alarmante, tornando-se, um grave problema de saúde pública em todo mundo (Tenover, 2006).

As doenças causadas por bactérias ocupam o segundo lugar nas causas de morte em todo o mundo e o terceiro lugar nos países desenvolvidos (Byarugaba, 2009). Em 1994, a *World Health Organization's Scientific Working Group on Antibiotic Resistance* declarou que a resistência aos antimicrobianos é um grave problema de saúde pública atingindo todos os continentes, ocorrendo em países desenvolvidos ou em desenvolvimento (Hanconk, 1997), e até hoje este status não foi alterado.

Em julho de 2004, a *Infectious Disease Society of America* informou que 2 milhões de pessoas eram infectadas por ano com bactérias com expressão de resistências aos fármacos de uso rotineiro em hospitais, e que somente nos Estados Unidos 90.000 morreram como resultado destas infecções. Números considerados alarmantes pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Barrett, 2005).

Um amplo estudo realizado por Klevens e colaboradores (2007) estimou que em 2005, somente nos Estados Unidos, 94.360 pacientes apresentaram infecção por MRSA

(*Staphylococcus aureus* Resistente a *Meticilina*), destes casos, 18.650 resultaram em óbitos, o que equivale a aproximadamente 20% dos pacientes.

Em 2011, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) publicou uma nova versão do plano de ação de saúde pública para combater o aumento da resistência aos antimicrobianos (*A public health action plan to combat antimicrobial resistance*). Neste documento, a aflição dos órgãos de controle com a velocidade de surgimento de novos fenótipos de resistências e a escassez de novos agentes antimicrobianos foram relatadas com grande preocupação (CDC, 2011).

Hassan e colaboradores (2010) demonstraram que os Estados Unidos da América, gasta cerca de 2 bilhões de dólares por ano com internações e tratamentos de pacientes portadores de infecções causadas por bactérias resistentes (Hassan, *et al.*, 2010). No Brasil, os dados sobre os gastos com Infecções Relacionadas com a Assistência de Saúde (IrAS), ainda são raros, mas estudos realizados com foco na prevalência das IrAS apresentam uma taxa variando de 34,7% a 46,5%, apresentando um grande predomínio de infecções provocadas por bactérias com expressão de resistência (Lisboa, 2007).

Apesar deste panorama, em especial do grande número de mortes e dos altos custos para o tratamento dos pacientes com as infecções bacterianas, somente duas novas classes de antimicrobianos foram lançados no mercado nos últimos 10 anos, linezolid (oxazolidinona) e daptomycin (lipopeptídeo), indicados para o tratamento por infecções causadas por cepas gram-positivas. Para as cepas Gram-negativas não há relatos de introdução de novos fármacos neste mesmo período, mesmo representando equitativamente um problema emergente, pois também tem-se verificado um aumento de expressões de resistências aos antimicrobianos de uso convencional, sendo necessário a busca de novos compostos com ação inibitória efetiva contra Gram -negativas (Wenzel, 2004).

O mecanismo de resistência intrínseca ou natural é expresso por genes localizados no cromossomo da bactéria, faz parte de sua herança genética, sendo transmitida verticalmente aos descendentes sem perda da característica. (Tenover, 2006). Estes mecanismos de resistência podem ser expressos por um processo de indução, por exemplo, em resposta à utilização de um determinado antimicrobiano, ou normalmente, quando esta espécie já apresenta fatores de resistência aos antimicrobianos, como no caso de organismos do gênero *Enterobacter*, naturalmente resistentes a cefoxitina, sendo tal fenótipo oriundo da produção de uma β -lactamase, AmpC cromossômica (Cavallo *et al.*, 2008).

As resistências extrínsecas ou adquiridas ocorrem por mutações e/ou rearranjo genético, quando há o aparecimento de resistência em uma espécie bacteriana anteriormente sensível ao fármaco, resultante da mutação de genes reguladores ou estruturais e também por aquisição de genes de resistência veiculados por elementos genéticos móveis, plasmídeos e transposons, ou da combinação entre eles (Toledo *et al.*, 2012; Barros *et al.*, 2008).

A resistência bacteriana tem se tornado uma preocupação permanente para os departamentos de controle de doenças infecciosas. Bactérias resistentes, particularmente *Staphylococcus*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas spp*, *Enterococcus spp* e *Escherichia coli*, estão se tornando comuns no ambiente hospitalar, levando a consequências graves, como os altos índices de óbitos (Alicia *et al.*, 2008).

1.2 Principais bactérias patogênicas

Algumas bactérias são frequentemente encontradas, nos isolados clínicos, colonizando os pacientes ou causando processos infecciosos. Um número expressivo destes isolados apresenta mecanismos de resistência aos antimicrobianos de uso convencional. Dentre os mais importantes estão os *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* e *Klebsiella pneumoniae*.

***Staphylococcus aureus*:**

Staphylococcus aureus é um importante agente patogênico associado às IAS, com uma prevalência importante em países desenvolvidos, bem como nos países em desenvolvimento. A infecção por este agente pode aumentar o risco de mortalidade de 20 a 50%, além de tornar o tratamento mais demorado e com alto custo (Lawer *et al.*, 2012).

A espécie *S. aureus* é bem distinta das outras cepas do mesmo gênero, apresentando algumas características bastante peculiares, tais como: colônias com cor dourada, a produção das enzimas coagulase e a desoxirribonuclease (DNAse), características também usadas na identificação da espécie (Collee *et al.*, 1993).

Este patógeno pode produzir infecções oportunistas em pacientes em situações de risco, como no caso de internações hospitalares, procedimentos invasivos e imunossupressão. Nestes casos, esta bactéria pode causar diferentes processos infecciosos, desde uma infecção cutânea até uma infecção sistêmica grave (Koneman *et al.*, 2001).

A partir da década de 70, o *S. aureus* passou a ser um importante patógeno nas infecções relacionadas com a assistência de saúde. Neste período, as cepas isoladas apresentavam resistência a metilina, um beta-lactâmico com maior estabilidade que os outros antimicrobianos da mesma classe. Logo, as cepas com este perfil de resistência foram denominadas de MRSA (*Methicillin Resistance Staphylococcus aureus*), e apresentam resistência a todos os betas-lactâmicos comerciais (Murray *et al.*, 2007).

Com a rápida disseminação das cepas MRSA nos ambientes hospitalares, o fármaco de escolha passou a ser os antimicrobianos da classe dos glicopeptídeos, a vancomicina e a teicoplanina. Estes são fármacos eficientes no tratamento de infecções por MRSA, mas com efeitos nefrotóxicos severos (Machado *et al.*, 2005). Em 1997, no Japão, foi isolada cepas de

S. aureus com resistência também aos glicopeptídeos, denominada como GRSA ou VRSA (*Staphylococcus aureus* resistente aos glicopeptídeos ou *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina) (Santos *et al.*, 2007).

Os mecanismos de resistência de *S. aureus* são resultado de mutações em genes dos sítios de ligação dos antimicrobianos ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie ou mesmo de espécies diferentes, sendo transmitidas por plasmídeos ou transposons (Bernard, *et al.*, 2004).

Nos últimos 10 anos, as cepas de MRSA, que eram restritas ao ambiente hospitalar, passaram a ser isoladas em pacientes com infecção de pele na comunidade, sem relato de internação nos últimos meses. Esta nova cepa foi denominada de CA-MRSA (*Community-associated MRSA*) (Benoit *et al.*, 2008).

Escherichia coli.

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa da família *Enterobacteriaceae* que faz parte da microbiota intestinal normal do ser humano e dos animais. No entanto, algumas cepas desta espécie são patogênicas e associadas a uma grande variedade de infecções intestinais e extra-intestinais (Nataro e Kaper, 1998).

Em especial, as infecções do trato urinário são uma das principais formas de patogênese das cepas de *E. coli*, podendo levar a um quadro grave de pielonefrites, meningites e sepse. As formas mais graves das infecções são observadas em pacientes com um longo período de internação. Frequentemente as cepas de *E. coli* isoladas nas IrAS apresentam fenótipos de resistência aos antimicrobianos da classe das aminopenicilinas (Donnenberg e Whittam, 2001).

Os mecanismos de resistência geralmente encontrados para esta cepa são mediados por aquisição de genes de resistência plasmidiais, tais como TEM1, TEM2 e SHV1, os quais expressam enzimas que hidrolisam os fármacos antimicrobianos (Murray *et al.*, 2007). Algumas cepas também apresentam resistência por expressão de mecanismos ESBLs (*Extended-Spectrum β -Lactamase*), por mutação dos genes TEM e SHV (Lautenbach *et al.*, 2001; Mallik *et al.*, 2013).

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa é o patógeno mais frequente nas infecções em pacientes imunocomprometidos e em ambiente hospitalar, sendo considerado um importante agente infeccioso por apresentar um número de fatores de virulência superior às cepas comunitárias (Livermore, 2002). Todos os equipamentos hospitalares podem servir de reservatório, mesmo nos líquidos utilizados como antissépticos, e em umidificadores de equipamentos de ventilação mecânica. Estes fatores facilitam a sua disseminação e, em consequência, ocasiona um

número maior de IrAS (Paviani *et al.*, 2004). Além disso, um número considerável de isolados clínicos apresentam um perfil de multirresistência, aspecto temido pelos profissionais de saúde, pois leva ao agravamento do quadro clínico e a possível falência clínica (Paviani *et al.*, 2004).

As cepas de *P. aeruginosa* apresentam resistência intrínseca, como a proporcionada pelo gene AmpC para beta-lactamase, um gene induzível, passando a ser expresso na presença de antimicrobianos da classe beta-lactâmicos (Tenover, 2006).

Enterococcus faecalis

Os *Enterococcus* são cocos Gram-positivos que fazem parte da microbiota resistente do trato gastrointestinal. No entanto, podem significar um risco para pacientes com histórico de longos períodos de internação, causando endocardite, infecção do trato urinário, sepse neonatal e infecção em feridas abertas (Moellering, 1998). Os *Enterococcus* com perfis de resistência tornaram-se importantes agentes patógenos humanos na década de 80. A partir deste período, observou-se um aumento considerável na ocorrência de infecções por VRE (Vancomycin-Resistant Enterococci), estas cepas apresentam resistência a elevadas concentrações de glicopeptídeos, dificultando o tratamento (Harbarth *et al.*, 2002).

Os mecanismos de resistência destas bactérias são mediados por genes plasmidiais ou em transposons, os fenótipos Van A, Van B e Van C podem conferir às cepas portadoras resistência a vancomicina e a teicoplanina. O gene Van A proporciona uma alta resistência à vancomicina (Koneman *et al.*, 2001). O gene Van A em VRE desperta uma grande preocupação, pois este gene está em uma região de transposon que pode ser transferido para outras cepas de *Enterococcus* ainda não resistentes ou para outras espécies de bactéria, como no caso de *Staphylococcus aureus*. Neste último caso, a presença do gene Van A confere resistência aos glicopeptídeos em cepas *Staphylococcus aureus*. (Bhavnani *et al.*, 2000).

Klebsiella pneumoniae

K. pneumoniae é um bacilo Gram-negativo amplamente distribuído na natureza e no trato gastrointestinal. Trata-se de uma bactéria oportunista, podendo causar pneumonias primárias em indivíduos debilitados, como alcoolistas, diabéticos e associadas a outras doenças pulmonares (Ben-David *et al.*, 2011).

As pneumonias causadas por *K. pneumoniae* são formas graves, marcadas por uma necrose extensa e hemorragias pulmonares, levando a destruição do tecido. Estas cepas podem causar também infecções extrapulmonares, como sepse, meningites e infecções do trato urinário (Yigit *et al.*, 2012).

Durante as últimas décadas, observou-se um aumento na propagação de perfis de resistência ESBL (*Extended-Spectrum β -Lactamase*), em *K. pneumoniae*. E então, para o controle das infecções passou-se a fazer uso, em larga escala, de antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos, tais como imipenem e meropenem (Hawkey, 1997).

As cepas CRKP (*Carbapenem-resistant K. pneumoniae*) ou KPC tiveram os seus primeiros relatos de isolamento em 2001. Hoje são encontradas com grande frequência em unidades hospitalares em todo o mundo. A resistência aos carbapenêmicos está associada, principalmente, com a presença das beta-lactamases, que pode ser Metalo-beta-lactamase, mediada pelos genes (IMP ou VIM), oxacilinases de espectro estendido (OXA) ou enzimas KPC (Naseer et al, 2009).

Todas estas bactérias citadas anteriormente ocupam o ranking principal na escala dos patógenos mais frequentes nas infecções relacionadas a assistência de saúde e demandam um elevado custo para o controle e tratamento dos pacientes colonizados ou infectados por estes microrganismos.

1.3 Peptídeos antimicrobianos

Nas últimas décadas, a busca por novos antimicrobianos tem despertado o interesse dos pesquisadores pelos Peptídeos Antimicrobianos (**AMPs**), uma vez que recentes estudos demonstram que os AMPs são modelos adequados e promissores para novas classes de antimicrobianos (Lv. et al., 2014).

Os AMPs apresentam em média de 10 a 100 resíduos de aminoácidos e fazem parte do sistema de defesa inato dos organismos vertebrados e invertebrados ou de secreções produzidas e promovem uma proteção contra uma variedade de microrganismos a que são expostos (Tossi et al.,2000; Toke, 2005; Song et al., 2012).

Pesquisas realizadas nos últimos 20 anos conseguiram identificar e isolar cerca de 1.200 AMPs, com sequências de aminoácidos variados, mas com características comuns, como por exemplo, os AMPs são peptídeos catiônicos, apresentam carga molecular positiva, devido a grande quantidade de resíduos de lisina, arginina e histidina e são hidrofóbicos ou anfipáticos (Nakatsuji e Gallo, 2012). Resíduos hidrofóbicos, como triptofano e valina podem perfazer de 30 a 50% das estruturas dos AMPs, e desempenham um papel vital na interação com a membrana das bactérias (Hwang et al., 1998; Huang, 2000).

Os AMPs têm sido classificados pela sua composição, tamanho e suas estruturais conformacionais. São divididos em categorias, como: peptídeos α -hélice, peptídeos com estrutura folha- β , e a estrutura estendida, sendo as duas primeiras as mais comuns (figura 1) (Nyuyen et al, 2011 ; Huang et al., 2010; Tossi et al., 2000;).

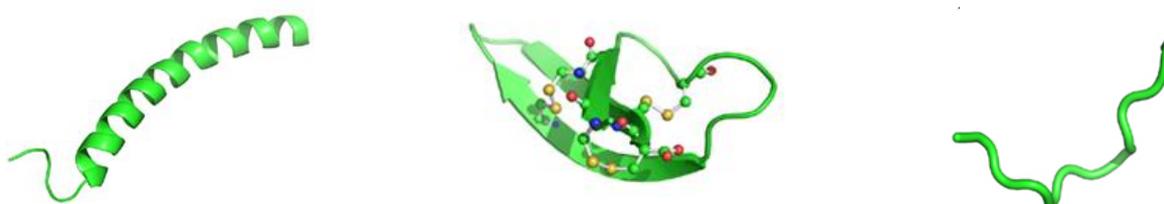


Figura1 – Estruturas tridimensionais de AMPs.

(A) Estrutura α -hélice; (B) Estrutura folha β ; (C) Estrutura estendida.

A

B

C

Os peptídeos antimicrobianos, na sua maioria, interagem com a superfície da membrana das células bacterianas, causando a destruição da integridade estrutural da membrana, além disso, alguns peptídeos podem atuar em alvos no interior do citoplasma bacteriano (Lohner e Prenner, 1999). Uma vez que o folheto exterior da membrana plasmática de mamíferos consiste quase exclusivamente de fosfolípidos neutros, o presente nas bactérias tem um elevado teor de fosfolípidos carregados negativamente, fator predominante para a interação dos AMPs com as membranas destas bactérias (Prossnigg, 2010; Jin et al. 2005).

Os fosfolípidos mais abundantes na membrana bacteriana são os fosfatidilglicerol e difosfatidilglicerol (cardiolipina), e também são encontrados nas células eucarióticas compondo a membrana mitocondrial (Han *et al.*, 2006). Os fosfolípidos cardiolipinas são isolados em grandes quantidades em membranas de cepas Gram-positivas (Sanderson, 2005; Huang, *et al.*, 2010; Wimley, 2010).

Em contraste, as membranas celulares de eucariotos apresentam a maioria da carga negativa no folheto interno da bicamada de fosfolípidos, dificultando a interação dos AMPs com este tipo de membrana (Matsuzaki, 1999; Brogden, 2005; Wiesner e Vilcinskas, 2010).

Como indicado acima, os AMPs, por sua característica catiônica, são atraídos pela superfície aniônica das membranas bacterianas, e após a interação, os AMPs sofrem mudanças conformacionais, causando uma perturbação na estrutura da bicamada lipídica (Zasloff, 2002^a; Melo *et al.*, 2009).

1.4 Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos

Diversos trabalhos realizados têm indicado que os AMPs apresentam modos diversificados de ação nas células bacterianas. Como descrito anteriormente, independentemente do modo de ação, os AMPs dependem da sua interação com a membrana celular bacteriana (Giangaspero, *et al.*, 2001; Hancock, 2002).

O mecanismo de alteração da permeabilidade da membrana bacteriana e consequente ação antimicrobiana dos AMPs, ainda não estão bem elucidados (Shai, 2002; Bechinger e Lohner, 2006; Hernández *et al.*, 2010). Diferentes modelos são propostos para explicar como

os peptídeos se inserem na bicamada lipídica da membrana bacteriana, resultando na alteração da permeabilidade da membrana (Jenssen *et al.*, 2006).

Provavelmente, o modo de ação pode estar ligado ao tipo de estrutura conformacional dos AMPs (Findlay *et al.*, 2010; Hancox, 1997; Huang, *et al.*, 2010; Wimley, 2010). Os mecanismos que os AMPs podem apresentar são classificados como: formação de tapetes (*Carpet-like*), formação de barril (*Barrel-stave*), poros toroidais (*Toroidal model*), modelo de SMH (Shai-Matsuzaki-Huang) e o mais recente denominado modelo detergente (*Detergent-like*) (Verly, 2010).

O modelo de tapete foi proposto pela primeira vez, em 1999 por Shai, que estudava a ação do Dermaseptina S, um peptídeo antimicrobiano isolado da secreção da pele de sapos do gênero *Phyllomedusa* (Elgar *et al.*, 2006). Neste modelo, os peptídeos se ligam de forma paralela na superfície externa da membrana bacteriana (Figura 2), e vários peptídeos são atraídos para a superfície da membrana formando uma estrutura similar a um tapete. A presença destes peptídeos, causa uma reorganização dos fosfolípidos, desestabilizando a membrana e promovendo a alteração da fluidez (Reddy *et al.*, 2004).

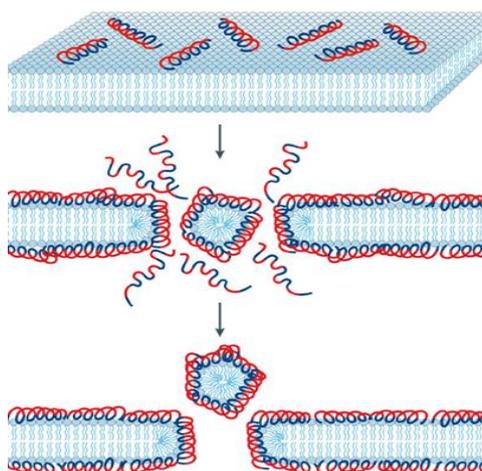


Figura 2. – Representação do mecanismo de modelo de tapete, Adaptada de Brogden, 2005.

Um pequeno grupo de AMPs, como o Alametina isolado de um fungo, apresentam como mecanismo a formação de barril (Figura 3) (Verly, 2010). Neste modelo, os AMPs se orientam na superfície da membrana, ligando-se aos grupamentos fosfatos dos fosfolípidos. A formação dos poros na membrana é um processo dinâmico, os peptídeos se agregam e inserem-se de forma perpendicular nas camadas de fosfolípidos da membrana, devido a uma interação da região hidrofóbica do peptídeo com a região hidrofóbica da membrana, resultando na formação de poros, e deixando exposta a região hidrofílica, facilitando assim, a saída de moléculas pequenas e íons (Sanderson, 2005).

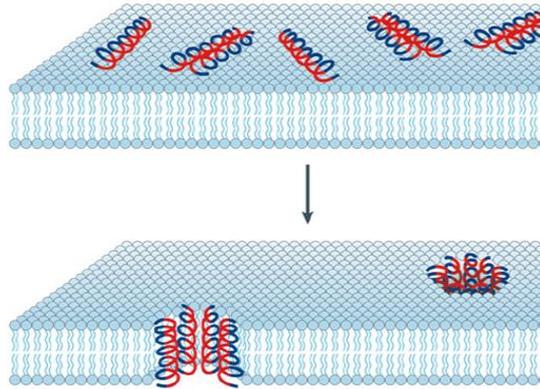


Figura 3. – Representação do mecanismo de formação de Barril, adaptada de Brogden, 2005.

O modelo de poros toroidais foi observado pela primeira vez em um estudo com peptídeos da classe da Magainina, isolado da pele de rãs do gênero *Xenopus* (Elgar *et al.*, 2006). Neste mecanismo, os peptídeos induzem o dobramento das cabeças dos fosfolípidos, que são hidrofílicas, formando poros por onde a água e os íons saem da célula. (Figura 4) (Yeaman e Yount, 2003).

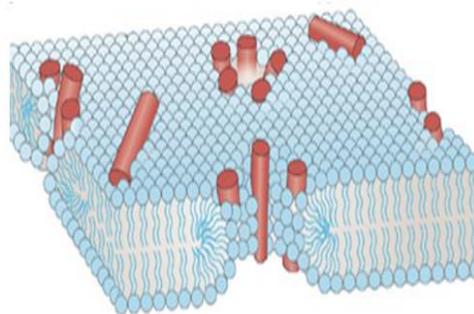


Figura 4. – Representação do mecanismo de formação de poros toroidal, adaptada de Melo, *et al.*, 2009.

A grande maioria dos peptídeos antimicrobianos apresenta mecanismos incluídos no modelo SMH (Shai-Matsuzaki-Huang) (Figura 5), mesmo os menores peptídeos (Sanderson, 2005). Este modelo é uma união dos outros modelos apresentados acima, ou seja, é uma combinação de interações na superfície com a formação de poros. Os AMPs interagem com a membrana celular bacteriana formando um tapete, após esta interação os peptídeos deslocam os fosfolípidos, causando uma desordem na membrana. Esta ação permite a entrada de peptídeos no interior da célula bacteriana, que atingem alvos intracelulares (Shai, 2002; Huang, 2000). A desordem provocada pelos AMPs pode levar ao rompimento da membrana (Wang *et al.*, 2005).

O esquema na Figura 5 representa o modo de ação dos peptídeos no modelo SMH. O peptídeo está representado em α -hélice. A estrutura carregada positivamente está representada pela cor vermelha e a região hidrofóbica está em verde.

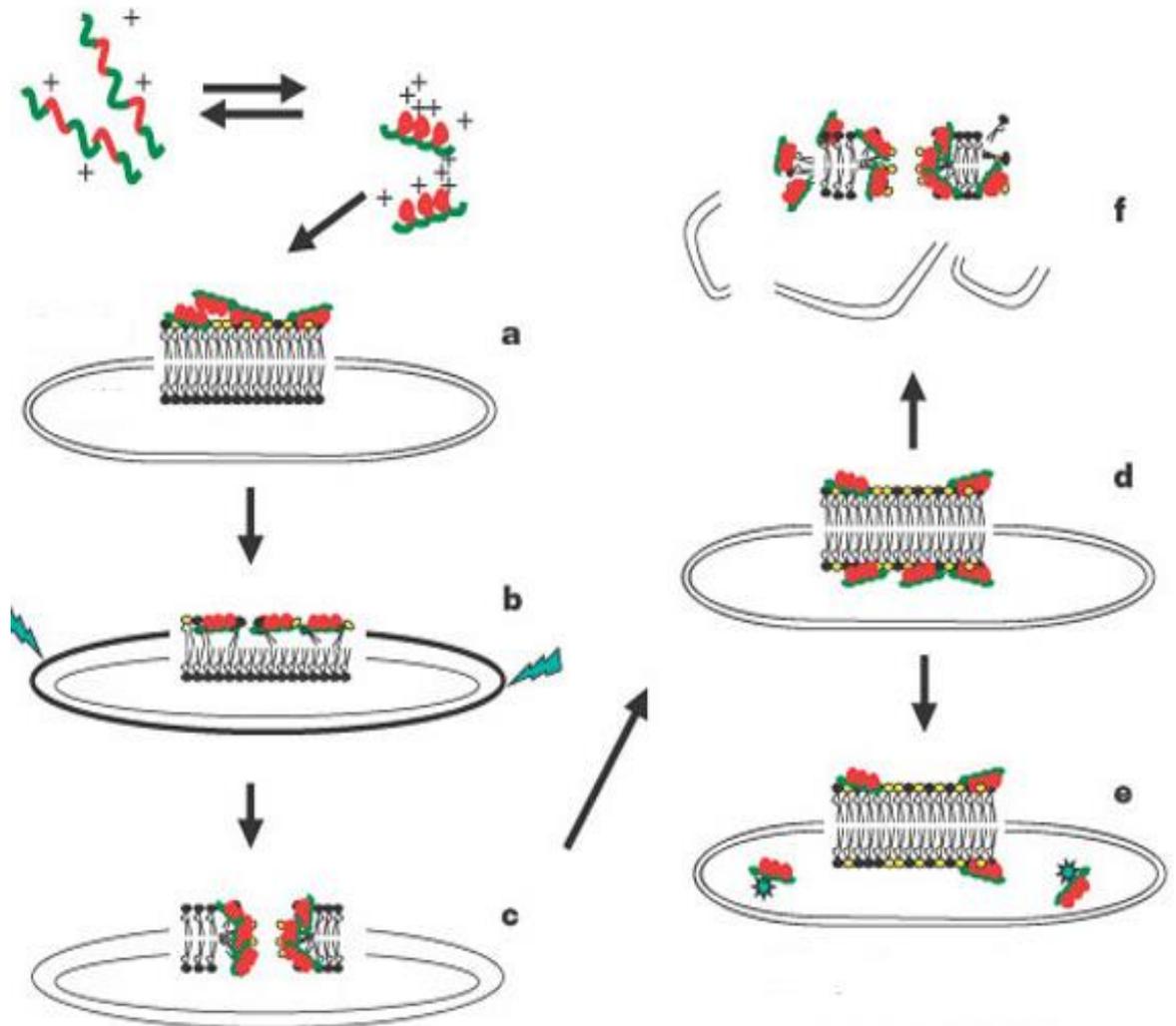


Figura 5: Modo de ação de peptídeos no modelo SMH. -a. Representa as interações das regiões catiônicas dos peptídeos com a camada externa da membrana celular. Em b. Observa-se a adsorção do peptídeo na membrana, tornando a camada externa mais fina e uma desorganização da camada lipídica. c. Representa a formação de poros. d. Ocorre a penetração de peptídeos se ligando na camada interna da membrana. e. Este esquema representa a ação de alguns peptídeos que podem interagir com alvos internos. f. Desintegração da membrana. Retirada e modificada de Zasloff (2002).

No modelo detergente, os peptídeos se intercalam na bicamada lipídica formando micelas complexas. Os AMPs se agregam dando origem a estruturas oligoméricas, estas estruturas interagem de forma diferentes com a membrana. A forma de ação dos peptídeos, neste modelo, é dependente da concentração, ou seja, quanto maior a concentração, melhor é a interação com a membrana (Madden e Cullis, 1982). As estruturas oligoméricas formadas

interagem com a membrana e retiram algumas moléculas de fosfolipídeos, o que leva a formação de micelas complexas (Figura 6) (Bechinger e Lohner, 2006).

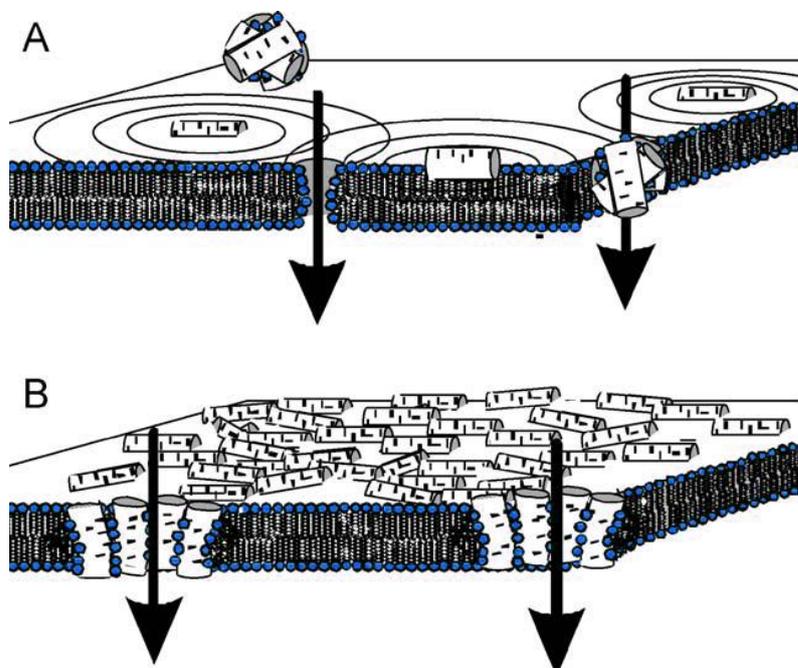


Figura 6 – Representação do modelo detergente. Retirada e modificada de Bechinger e Lohner, 2006 .

1.5 Peptídeos Antimicrobianos de Artrópodes

Em resposta ao contato com microrganismos invasores, os artrópodes evoluíram um complexo arranjo de peptídeos antimicrobianos que podem destruir ou inibir o crescimento de um quantidade variada de patógenos (Nentwig, 2003; Sadd e Hempel, 2006). Devido a necessidade de se defender, os artrópodes desenvolveram os sistemas de glândulas de peçonha, item usado também para subjugar as presas (Jeyashree e Devi, 2011). As peçonhas de artrópodes apresentam uma mistura complexa de compostos, como íons, aminoácidos, acilpoliaminas, neurotoxinas, peptídeos e enzimas, sendo fontes ricas de substâncias bioativas (Konno *et al.*, 2000; Kozlov *et al.*, 2006) .

Insetos sociais são mais susceptíveis à ocorrência de doenças endêmicas, pois suas colônias apresentam vários indivíduos convivendo muito próximos e apresentam também uma variabilidade genética muito reduzida, fatores que contribuem para o desenvolvimento de doenças infecciosas (Zasloff, 2002b; Schmid-Hempel, 2005). Por isso, é comum se isolar da peçonhas destes insetos, um número expressivo de peptídeos antimicrobianos (Baracchi, 2011).

As peçonhas de artrópodes, e em especial, a peçonha de vespas, tem atraído a atenção de pesquisadores por serem uma fonte de substâncias bioativas, apresentando uma grande variedade de peptídeos de baixa massa molecular e proteínas com ações diversas (Chen *et al.*, 2010, Mortari *et al.*, 2012).

Um número expressivo de estudos realizados isolaram da peçonha de vespas diversos peptídeos bioativos, que têm sido classificados por suas estruturas químicas e por suas atividades biológicas, em especial, as ações antimicrobianas (Cabrera *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2004; Argiolas e Pisano 1983). Estes peptídeos antimicrobianos são representantes potenciais para a criação de novas classes de antibióticos contra bactérias com expressão de resistência aos antimicrobianos convencionais (Toke, 2005; Cerovsky *et al.*, 2008).

Tabela 1: Descrição das estruturas primárias de peptídeos antimicrobianos isolados da peçonha de vespas nesta última década.

Fonte: *The antimicrobial Peptide Database*, acesso em 24 de fevereiro de 2013.

| Peptídeo | Sequência | Espécie de vespa | Referência |
|-----------------------|-------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Eumenitina-R | LNLKGLIKKVASLLN | <i>Eumenes rubrofemoratus</i> | Rangelet <i>et al.</i> , 2011. |
| Eumenitina-F | LNLKGLFKKVASLLT | <i>Eumenes fraternus</i> | Rangel <i>et al.</i> , 2011. |
| EMP-ER | FDIMGLIKKVGAL-NH2 | <i>Eumenes rubrofemoratus</i> | Rangel <i>et al.</i> , 2011. |
| EMP-EF | FDVMGIKKIAGAL-NH2 | <i>Eumenes fraternus</i> | Rangel <i>et al.</i> , 2011. |
| Pd mastoparano A | INWKKIFEKVKNLV | <i>Polistes dorsalis dorsalis</i> | Cerovský <i>et al.</i> , 2008. |
| Pd_mastoparano B | INWLKLGKKILGAL | <i>Polistes dorsalis dorsalis</i> | Cerovský, <i>et al.</i> , 2008. |
| Mp_mastoparano | INWLKLGKKMMSAL | <i>Mischocyttarus phthisicus</i> | Cerovský, <i>et al.</i> , 2008. |
| Pm_mastoparano PMM | INWKKIASIGKEVLKAL | <i>Polistes major major</i> | Cerovský, <i>et al.</i> , 2008. |
| Decoralina | SLLSLIRKLIT | <i>Oreumenes decoratus</i> | Konno, <i>et al.</i> , 2007. |
| Dominulina A | INWKKIAEVGGKILSSL | <i>Polistes dominulus</i> | Turillazzi, <i>et al.</i> , 2006. |
| Dominulina B | INWKKIAEIGKQVLSAL | <i>Polistes dominulus</i> | Turillazzi, <i>et al.</i> , 2006. |
| Eumenitina | LNLKGIFKKVASLLT | <i>Eumenes rubronotatus</i> | Konno, <i>et al.</i> , 2006. |
| Polybia-MP1 | IDWKKLLDAAKQIL | <i>Polybia paulista</i> | Souza, <i>et al.</i> , 2005. |
| Mastoparano-AF | INLLKIAKGIKSL | <i>Agelaia flavomarginatum micado</i> | Cabrera, <i>et al.</i> , 2004. |
| Protonectina | ILGTILGLLKGL | <i>Agelaia pallipes pallipes</i> | Mendes, <i>et al.</i> , 2004 |

Rangel e colaboradores (2011) isolaram quatro peptídeos de vespas solitárias, *Eumenes rubrofemoratus* e *Eumenes fraternus*, identificados como Eumenitina-R, EMP-ER, Eumenitina-F e EMP-EF, respectivamente. No teste antimicrobiano, os peptídeos isolados apresentaram resultados similares, com atividade antimicrobiana, com baixo valor de MIC (concentração inibitória mínima) para bactérias Gram-positivas variando de 60 a 7,5 µM e para Gram-negativos de 60 a 15 µM, e interessantemente também apresentaram baixa atividade hemolítica.

Em 2008, foram caracterizados quatro novos AMPs da família dos mastoparanos, isolados da peçonha de três vespas sociais: *P. dorsalis dorsalis*, *Mischocyttarus phthisicus* e *Polistes major major*, estes AMPs foram nomeados como: Pd mastoparano A, Pd_mastoparano B, Mp_mastoparano e Pm_mastoparano PMM. Os quatro peptídeos isolados foram testados contra as cepas de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, apresentando atividade antimicrobiana com MICs variando de 60 a 7,5 μ M (Cеровský, *et al.*, 2008).

Dois AMPs isolados da peçonha de vespas sociais *Polistes dominulus*, os Dominulina A e B, representam um importante elemento na defesa contra ataques de bactérias em colônias destas vespas. Os peptídeos foram isolados em indivíduos em variadas fases de desenvolvimento, desde os ovos até a fase adulta. Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram realizados testes de difusão em ágar e foi determinado o MIC. Nos dois testes, os AMPs apresentaram uma boa atividade inibitória contra cepas de *E. coli* e *B. subtilis* (Turillazzi, *et al.*, 2006).

Mendes e colaboradores (2004), trabalhando com a peçonha da vespa neotropical *A. pallipes pallipes*, isolaram e purificaram dois peptídeos, o Agelaia-MP e o Protonectina. O primeiro não apresentou atividade antimicrobiana significativa, com MIC de 382 μ g/ml e uma alta atividade hemolítica. Em contra partida, o segundo peptídeo apresentou uma potente atividade antimicrobiana, com MICs variando de 1,7 a 25 μ g/ml para as cepas Gram-negativas e de 3,1 a 12,5 μ g/ml para Gram-positivas, além disso a atividade hemolítica neste peptídeo foi baixa.

O peptídeo Polybia-MP1, isolado da peçonha da vespa *Polybia paulista*, apresentou atividade antimicrobiana, mas também apresentou uma potente atividade hemolítica. Outro AMP da família dos mastoparanos com um bom espectro de atividade antimicrobiana é o Mastoparano-AF, isolado da peçonha da vespa solitária *A. flavomarginatum micado*, e apresenta baixa atividade citolítica sobre eritrócitos humanos (Cabrera, *et al.*, 2004).

Da peçonha da vespa solitária *Oreumenes decoratus* foi isolado o peptídeo nomeado como Decoralina. Este AMP foi avaliado contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, *Candida* e promastigoto de *Leishmania major*. Esta avaliação comprovou que o peptídeo apresenta uma atividade antimicrobiana de amplo espectro e uma baixa ação hemolítica (Konno *et al.*, 2007). Konno e colaboradores (2006) também isolaram um peptídeo, nomeado como Eumenitina da peçonha da vespa solitária *Eumenes rubronotatus*. Este peptídeo, quando testado contra cepas de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, apresentou uma atividade antimicrobiana de amplo espectro, com MICs variando de 60 a 6 μ M e com baixa atividade hemolítica em eritrócitos humanos (Konno *et al.*, 2006).

Diante do desafio de vencer a progressão dos fenótipos de resistência bacteriana aos antimicrobianos, os peptídeos, em especial, os pertencentes a classe dos mastoparanos, se tornaram foco de investigações em laboratórios de vários países. O grande potencial destes compostos é devido principalmente por apresentarem uma ação antimicrobiana ampla e bastante efetiva e variáveis graus de indução de hemólise (Souza *et al.*, 2005). Os

mastoparanos são tetradecapeptídeos isolados apenas na peçonha de vespas (Cerovsky *et al.*, 2008; Konno *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2005).

1.6 Vespas *Synoeca surinama*

Synoeca surinama é uma vespa social que compõe um pequeno gênero com cinco espécies descritas: *S. chalybea*, *S. virginea*, *S. surinama*, *S. septentrionalis* e *S. cyanea*. (Adena *et al.*, 2009). Ocorre geralmente nas florestas tropicais, comum nas Américas, e são encontradas desde o México até a Argentina (Richards, 1978).

Os ninhos são construídos sobre uma superfície plana e inclinada, nos troncos das árvores, a uma altura média de 4,5 m (Santos, 2009). Além disso, os ninhos podem apresentar uma ou mais câmaras com uma cobertura semelhante à couraça de um tatu (*Dasypus sp*) com uma única saída (Figura 8), e por este motivo são conhecidas no Brasil, como “Marimbondo Tatu” (Castellón, 1980). Os indivíduos apresentam um tamanho de 1,5 a 3,5 cm, em média, e geralmente apresentam uma cor metálica (Figura 7).

Em relação à peçonha, não existem relatos na literatura do estudo da composição e de bioprospecção de compostos isolados desta peçonha.



Figura 7 – Ninho da vespa visualizado no Centro Olímpico da UnB, Campus Darcy Ribeiro – Brasília-DF.



Figura 8 – Exemplos da vespa, com enfoque em sua coloração escuro metálica.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Frente ao desafio do crescente número de cepas resistentes ao antimicrobianos convencionais e à potencialidade dos peptídeos como precursores para a descoberta de novos fármacos antimicrobianos, este trabalho visa buscar novas alternativas para o tratamento da infecções bacterianas isolados da peçonha de vespas sociais.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar novos peptídeos com perfil antimicrobiano da peçonha da vespa social da espécie *S. surinama*.
- Testar os peptídeos isolados da peçonha contra bactérias de interesse clínico, com e sem expressão de resistência aos antimicrobianos convencionais.
- Avaliar o efeito hemolítico dos peptídeos antimicrobianos isolados da peçonha de vespas sociais.
- Identificar a estrutura primária dos peptídeos com perfil antimicrobiano.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta do material biológico

Dois ninhos da vespa *S. surinama* foram coletados na área de mata do Centro Olímpico da UnB (Universidade de Brasília), localizado entre as coordenadas 15°46' S e 47°50'W, após a obtenção da licença de coleta e manutenção ICMBio SISBIO número 21723-1.

A identificação da espécie foi gentilmente feita pela Dr. Fernando B. Noll do departamento de Zoologia e Botânica da Universidade Estadual Paulista (UNESP) do campos de Botucatu. Os exemplares enviados para a identificação foram depositados na Coleção de Hymenoptera da UNESP.

Com uma escada, foi realizado o acesso aos ninhos e a coleta foi realizada utilizando sacos de coleta pretos, teve-se o cuidado de se retirar somente parte dos ninhos, sempre a parte anterior, próximo a entrada do ninho, possibilitando assim a reconstrução dos mesmos.

Os materiais coletados, imediatamente, foram colocados em caixa térmica com gelo, mantendo os animais com baixa atividade. Após a coleta, os exemplares foram levado para o Laboratório de Toxinologia da UnB e armazenado no freezer até o momento da preparação das amostras.

3.2 Preparação das amostras

As vespas foram eutanasiadas pelo método de congelamento, 250 exemplares que apresentavam os aparelhos de inoculação íntegros foram selecionados para a extração das glândulas e reservatórios de peçonha.

As glândulas e os reservatórios retirados com o auxílio de uma pinça, foram macerados em microtubos , tipo eppendorf, de 2 ml, com com um pistilo de vidro em 200 µl de água deionizada / acetonitrila a 50%. Após a maceração dos reservatórios, a mistura foi centrifugada a 10000 xg e o sobrenadante transferido para outro microtubo. Este processo foi repetido por 3 vezes, e todo o material retirado foi concentrado em um único microtubo.

A peçonha concentrada foi ultrafiltrada utilizando um filtro Microcon (Millipore), reservando o filtrado que apresentava apenas compostos com massas moleculares inferiores a 3000Da.

3.3 Separação por cromatografia líquida de alta eficiência

Foram realizadas duas cromatografias, uma da peçonha ultrafiltrada para a separação dos componentes da peçonha e a segunda para a purificação da fração que apresentou a melhor atividade antimicrobiana nos testes preliminares.

A peçonha ulfiltrada liofilizada foi ressuspendida em água deionizada com 5% de acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoracético, para a separação por cromatografia líquida de alta

eficiência (CLAE), do inglês *high performance liquid chromatography (HPLC)*, realizada para o isolamento dos compostos.

Para a separação foi utilizada uma coluna de fase reversa semi-preparativa (C18, 218TP510, 5µm, 250 x 10 mm, Phenomenex®, USA) com os solventes A (água deionizada com 0,1% de ácido trifluoracético) e B (acetonitrila com 0,1% de ácido trifluoracético), eluição com 5% do solvente B por 20 minutos e, em seguida, com 5% até 100% do solvente B em 60 min, e fluxo de 2 ml/min. A absorbância foi monitorada de 214 a 280 nm. As frações obtidas nesta separação foram coletadas, liofilizadas e quantificadas.

A segunda cromatografia foi utilizada uma coluna de fase reversa analítica (C18, 218TP510, 5µm, 250 x 10 mm, Phenomenex®, USA) com os solventes A (água deionizada com 0,1% de ácido trifluoracético) e B (acetonitrila com 0,1% de ácido trifluoracético), eluição com 5% até 85% do solvente B em 60 min, e fluxo de 1 ml/min. A absorbância foi monitorada de 214 a 280 nm. As frações obtidas nesta separação foram coletadas, liofilizadas e quantificadas.

3.4 Espectrometria de massa e seqüenciamento dos peptídeos

Para a identificação das massas moleculares, as frações cromatográficas foram submetidas à espectrometria de massa por MALDI TOF/TOF (UltraFlex III, Bruker Daltonics, Alemanha). As frações já ressuspendidas em água deionizada foram adicionadas a uma matriz de ácido alfa-cyano-4-hidroxi-cinâmico. Ao final, essa mistura foi aplicada em triplicata em uma placa Buker MPT Massive e após a cristalização, as amostras estavam prontas para análise

As seqüências primárias obtidas foram comparadas com outras seqüências disponíveis em bancos de dados por meio dos programas Fasta3 sob o servidor Expasy (Expasy Molecular Biology server; <http://www.expasy.org>) e BLASTP (ALTSCHUL *et al.*, 1997 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Os sequenciamentos foram realizados em colaboração com o Prof. Octavio Franco da Universidade Católica de Brasília (UCB), com o auxílio do Aluno Nelson Junior.

3.5 Síntese do peptídeo

O peptídeo foi sintetizado em fase sólida (F-MOC) pela empresa Aminotech Desenvolvimento e Tecnologia Ltda com base na seqüência obtida por espectrometria de massa.

3.6 Ensaio antimicrobiano

3.6.1 Preparo das frações e dos peptídeos

A verificação da ação antimicrobiana frente às bactérias foi realizada com a técnica de microdiluição em placas para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC), de cada fração selecionada após a cromatografia, do peptídeo purificado e do peptídeo sintético.

Após a quantificação das frações por pesagem os peptídeos foram ressuspensas em 1mL de água deionizada, formando soluções estoque de cada amostra em suas respectivas concentrações.

As frações foram diluídas em 1ml de água deionizada, as concentrações iniciais foram calculadas conforme o peso de cada fração, da solução estoque, de cada fração, foram realizadas diluições em que resultassem em uma concentração final variando de 62,5 a 0,62 μ M por poço.

3.6.2 Inóculo

Foram selecionadas 10 cepas de bactérias ATCC, divididas em dois grupos, um sem expressão de resistência e o outro com expressão de resistência conhecida: *Staphylococcus aureus* (29213s), *Staphylococcus aureus* (33591r), *Enterococcus faecalis* (29212s), *Enterococcus faecalis* (51299r), *Escherichia coli* (25922s), *Escherichia coli* (35218r), *Pseudomonas aeruginosa* (27853s), *Pseudomonas aeruginosa* (496193r), *Kebsiella pneumoniae* (BAA 1705s) e *Kebsiella pneumoniae* (BAA 1705r).

As cepas utilizadas foram cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ.

As cepas liofilizadas foram hidratadas com meio BHI (*Brain Heart Infusion*) e crescidas por 18 horas. Após o crescimento, foram realizados cinco repiques em placas de ágar sangue. As colônias, características das espécies, foram isoladas em meio BHI líquido e foram realizados testes de coloração de Gram para verificação da pureza e especificidade das cepas.

Os inóculos foram preparados com o crescimento das cepas incubadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) por duas horas. A concentração foi ajustada pela turbidez de 0,5 na escala de Mcfarland, apresentando aproximadamente 1×10^8 UFC/ml, conforme orientação da CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2012).

Foram realizadas diluições de 1:20, das culturas na concentração de 0,5 na escala de Mcfarland, em caldo Mueller Hinton, resultando em uma concentração final de 1×10^6 UFC/ml.

3.6.3 Preparação dos antimicrobianos padrão

Nos controles positivos de inibição foram utilizadas os fármacos padronizados pelo manual M100S22 CLSI/2012.

Para as cepas Gram-positivas, utilizou-se o cloridrato de vancomicina do laboratório ABL (Antibióticos do Brasil), lote 104562, com uma potência de 95%.

Para as cepas Gram-negativas, utilizou-se o cloridrato de cefepima do laboratório Novafarma indústria farmacêutica, lote 2490283, com potência de 100,8%.

Os fármacos padrões foram diluídos em caldo Mueller Hinton (MH), em uma solução estoque na concentração de 64µg/ml. Cada poço da placa de ELISA recebeu 50 µl da solução estoque do fármaco padrão, 20 µl do inóculo bacteriano e 130 µl de caldo MH, resultando em uma concentração final de 16µg/ml.

3.6.4 Preparação do meio de cultura

Para o crescimento inicial das cepas foi utilizado o meio BHI (*Brain Heart Infusion*) over-night, obtendo-se um melhor crescimento por se tratar de um meio rico em nutrientes. O meio foi preparado conforme a indicação do fabricante, sendo realizado o ajuste de pH quando necessário.

Para o teste de microdiluição em placas, o meio utilizado foi o Mueller Hinton (HIMEDIA), em concordância ao que determina a CLSI/2012.

3.6.5 Preparação dos testes em placas

Os ensaios foram realizados em microplacas de ELISA, de fundo chato, em triplicata. Cada fração da peçonha ultrafiltrada, separada na cromatografia, foi testada contra as duas cepas ATCCs. Cada poço recebeu 80 µl de caldo Mueller Hinton com DMSO (*Dimetilsulfóxido*) a 2,5%, 100 µl de solução das frações da peçonha indicadas e 20 µl do inóculo ajustado para a concentração de 1×10^6 UFC/ml, resultando em uma concentração final de 1×10^5 UFC/ml, por poço. Cada poço apresenta um volume final de 200µl.

No controle positivo de inibição de crescimento, utilizou-se os fármacos padrões diluídos em meio MH na concentração de 16 µg/ml por poço. Da solução estoque foi transferido 50 µl para cada poço, completando o volume com 130 µl de caldo MH e DMSO 2,5% e 20 µl do inóculo na concentração de 1×10^6 UFC/ml.

No controle negativo de inibição, cada poço recebeu 180µl de caldo MH e DMSO 2,5% e 20 µl do inóculo na concentração de 1×10^6 UFC/ml.

No controle colorimétrico do caldo, foram colocados 200µl de caldo MH com DMSO 2,5%.

3.6.6 Leitura das placas

As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas em estufa bacteriológica. A leitura foi realizada em leitora de microplaca Multiskan, com comprimento de onda de 595 nm.

3.6.7 Interpretação dos dados

Os dados da leitura de absorbância foram obtidos na leitora de microplacas e a porcentagem de células viáveis foi calculada através da fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(DO \text{ obtida} - DO \text{ contr. Negativo})}{(DO \text{ contr. positivo} - DO \text{ contr. negativo})} \times 100$$

Os resultados obtidos foram subtraídos de 100, resultando no percentual de inibição do crescimento.

Os valores de inibição foram analisados no software GraphPad 5, determinado o MIC₅₀ e MIC₉₀, para cada fração e dos peptídeos puros frente às duas cepas.

3.7 Ensaio hemolítico

A determinação da atividade hemolítica do peptídeo sintético foi realizada segundo o protocolo de Rangel *et al.*, 1997.

Em um tubo de ensaio foram colocados 2 ml de sangue de camundongo e acrescentado a solução de Krebs (113 mM NaCl , 1,2 mM KH₂PO₄, 4,0 mM KCl , 1,2 mM MgSO₄ , 2,5 mM CaCl₂ , 25 mM NaHCO₃, 11,1 mM Glicose para 500ml de solução) com agitação suave, a solução resultante foi distribuída em microtubos, e seguiu-se a uma centrifugação por 5 minutos a 5000 xg, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1ml de solução de Krebs. Este procedimento foi repetido por mais 3 vezes, realizando uma lavagem das hemácias. Após a última lavagem, o concentrado de hemácias foi transferido para um tubo de ensaio e diluído para uma concentração de 4% de hemácias.

Cada tubo recebeu 50 µl de solução de hemácias a 4% e 50 µl de solução dos peptídeos nas seguintes concentrações: 1000, 800, 400, 200, 100, 90, 80, 70 e 60 µM.

O controle negativo de hemólise foi realizado com 50 µl de solução de Krebs e 50µl de solução de hemácias a 4%. No controle positivo, 50 µl da solução de hemácias a 4% foram adicionados em 50 µl solução de Triton X-100 a 1%.

Os tubos com as soluções foram mantidos em temperatura ambiente por 1 hora. Após decorrido o tempo determinado, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 5000 xg. Em seguida, 50 µl do sobrenadante foram transferidos para poços de uma microplaca. A leitura foi realizada em uma leitora de microplaca Multiskan, com comprimento de onda de 540 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata, e em 3 ensaios independentes.

4. RESULTADOS

Após a ultrafiltração, o material resultante foi liofilizado resultando em um quantitativo de 0,01822g de compostos de baixa massa molecular da peçonha da vespa *Synoeca surinama*.

O perfil cromatográfico padrão está ilustrado na Figura 10. As frações foram separadas e coletadas, resultando em 90 frações, destas foram separadas 23 frações que apresentaram eluição após 40 minutos do início do protocolo. Esta seleção foi realizada com o intuito de avaliar a atividade dos peptídeos com perfis mais hidrofóbicos, característica observada nos AMPs já descritos.

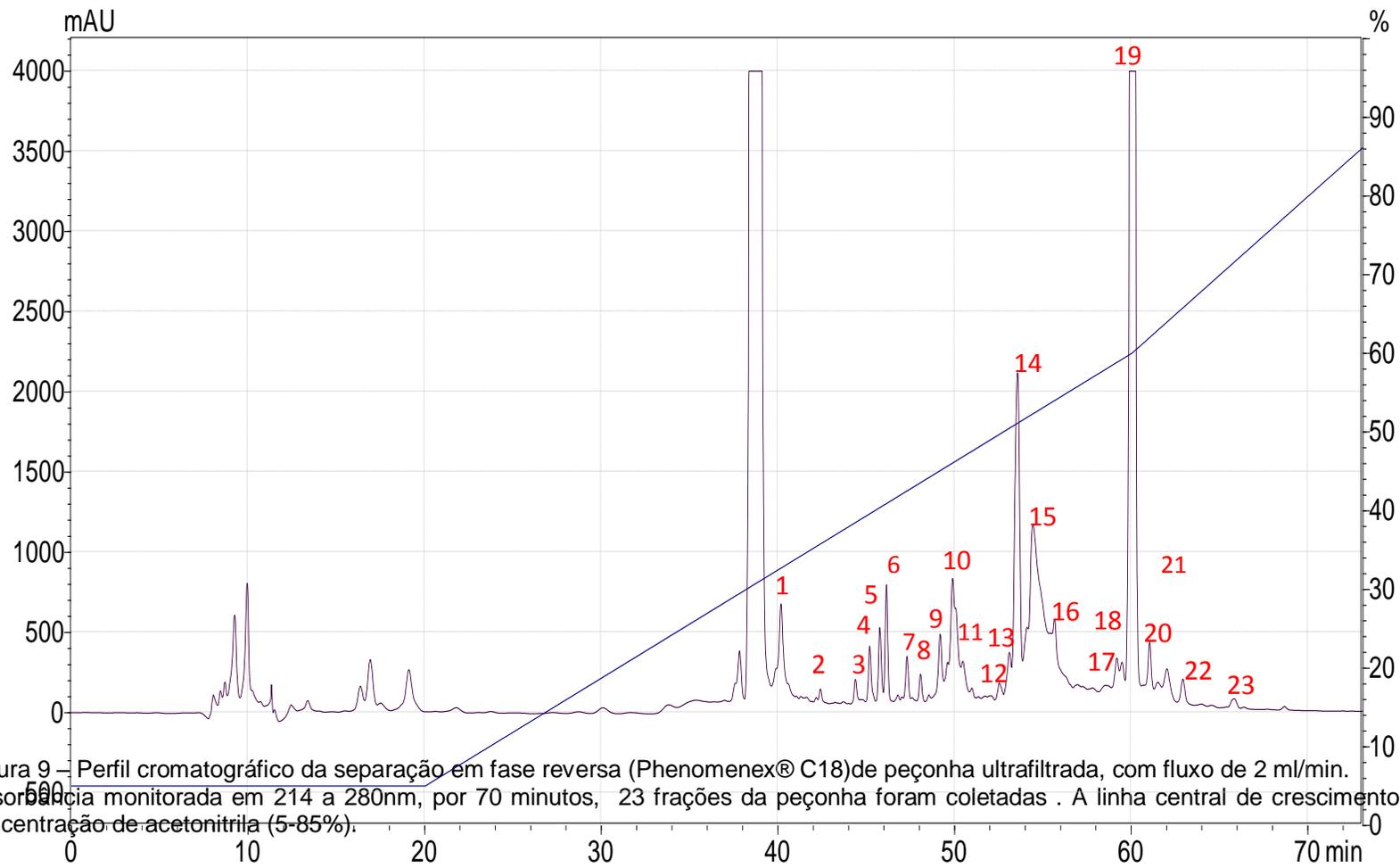


Figura 9 – Perfil cromatográfico da separação em fase reversa (Phenomenex® C18) de peçonha ultrafiltrada, com fluxo de 2 ml/min. Absorbância monitorada em 214 a 280nm, por 70 minutos, 23 frações da peçonha foram coletadas. A linha central de crescimento progressivo indica a concentração de acetonitrila (5-85%).

4.1. Ensaio antimicrobiano preliminar com o peptídeo natural

As frações de 1 a 23, conforme mostrado na figura 10, foram testadas frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC (29213) e *Escherichia coli* (25922).

Nos ensaios preliminares foram usadas as doses: 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1µg/ml. Nesta fase não foram calculados os valores em micromolar, pois ainda não era conhecida a massa molecular das frações.

A fração 10, com eluição em 50 minutos, foi a que apresentou a melhor atividade antimicrobiana frente as cepas testas nos ensaios preliminares. Observando uma inibição de 100% do crescimento das cepas. As demais frações apresentaram inibição de 0 a 30%.

Uma recromatografia da fração 10 foi realizada com a finalidade de obter um melhor isolamento.

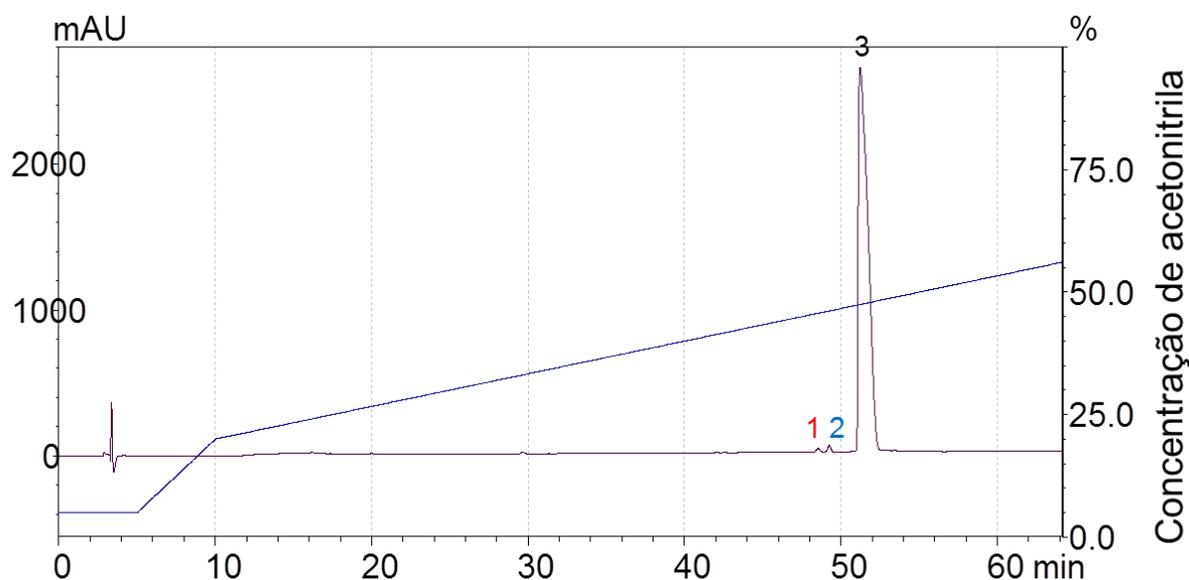


Figura 10 – Perfil cromatográfico após a separação em coluna analítica fase reversa (Phenomenex® C18) da fração 10, com fluxo de 1 ml/min. Absorbância foi monitorada de 214 a 280nm, gerando um total de 3 frações. A linha azul indica a concentração de acetonitrila (5-85%).

Devido a quantidades mínimas das frações separadas, apenas para fração 10.3 da recromatografia foi realizado o espectro de massa (MS), que mostrou a presença de um composto majoritário, com m/z 1617.861($M+Na^+$) (figura 11).

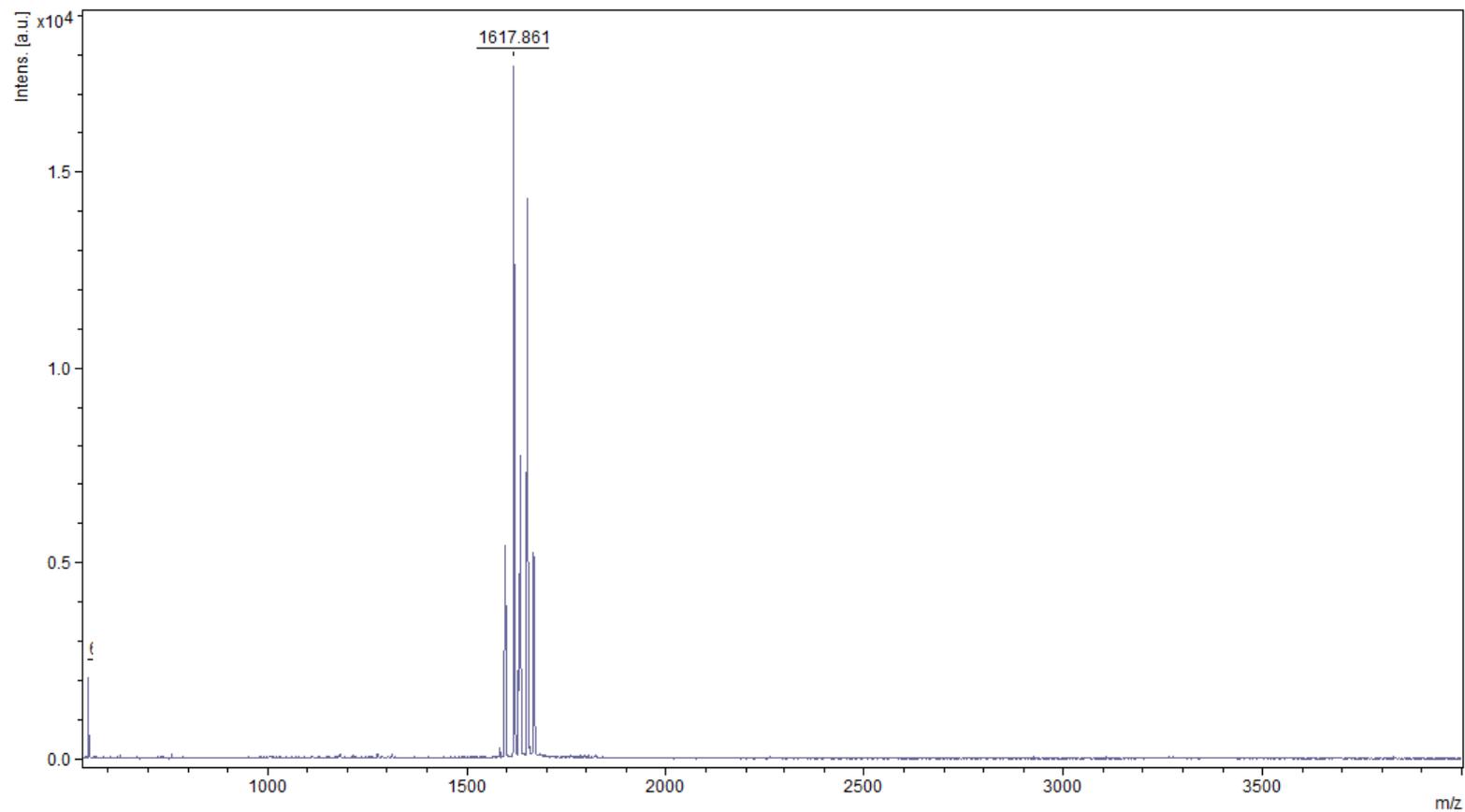


Figura 11: O espectro de massa da fração 10.3 obtido pelo equipamento MALDI/TOF revelou a presença do composto majoritário , contendo o íon $(M+Na^+) = 1617.861$ Aquisição por MALDI/TOF no modo linear refletido

A partir da determinação da massa da fração 3, foram realizados testes contra as cepas padrões, nas concentrações variando de 62,5 a 0,62 μM .

A figura 12 apresenta o desempenho da fração 3 contra o crescimento das bactérias da cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC (29213), podendo-se observar, que este peptídeo apresenta efeito inibitório sobre o crescimento desta bactéria.

1. Nas doses de 62,5 a 1,5 μM ., para *S. aureus*, ocorreu uma inibição do crescimento em torno de 99% e de 50% na dose de 0,62 μM .

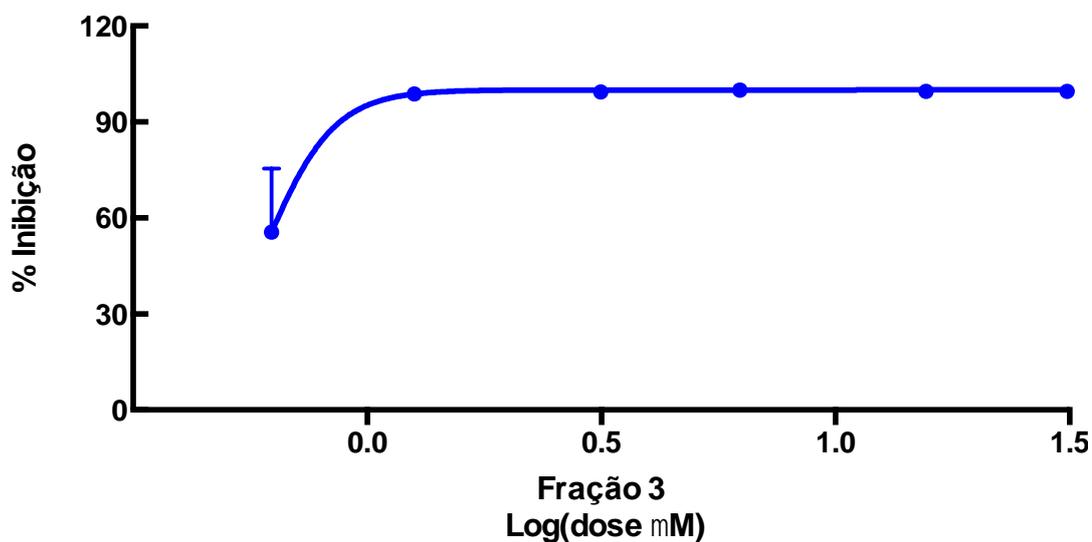


Figura 12: Taxa de inibição de crescimento de bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC (29213), utilizando-se a fração 10.3 da recromatografia, isolada da peçonha da vespa *Synoeca surinama*. R2= 0,8064.

A figura 13 apresenta o desempenho da fração 3 contra o crescimento das bactérias da cepa de *Escherichia coli* (25922). O efeito inibitório foi inferior ao observado para a cepa Gram-positiva.

Nas doses de 62,5 a 3,12 μM , para *E. coli*, observou-se uma inibição do crescimento em torno de 99% e de 50% na dose de 1,5 μM .

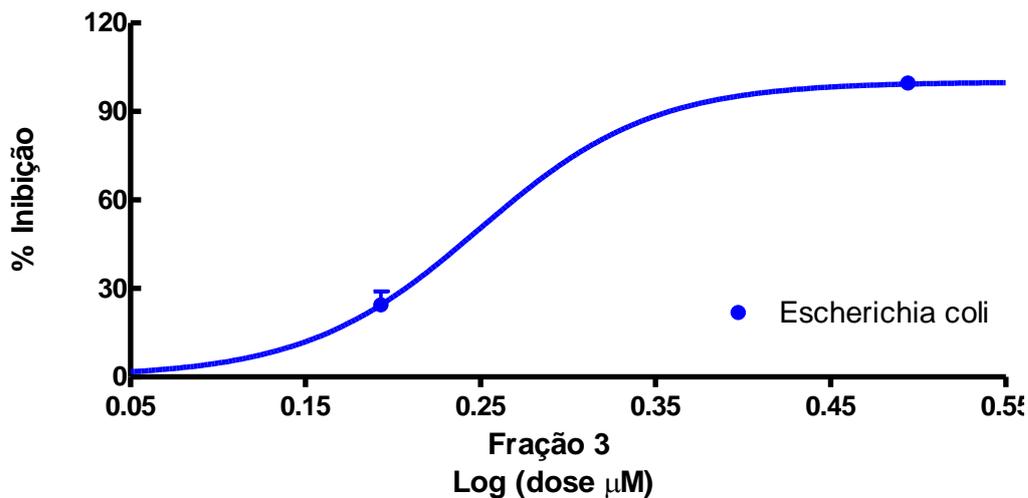


Figura 13: Taxa de inibição de crescimento de bactérias *Escherichia coli* (25922), utilizando-se a fração 10.3 da recromatografia, isolada da peçonha da vespa *Synoeca surinama*. $R^2= 0,8673$.

Os resultados do ensaio antimicrobiano preliminares demonstraram que a fração selecionada tem uma boa ação antimicrobiana para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

4.2 Espectrometria de Massa e Sequenciamento da fração 10.3

Após a verificação de atividade antimicrobiana da fração 3, foi realizada a espectrometria de massa MALDI TOF/TOF para a determinação da massa molecular (MS) e o sequenciamento para a identificação da sequência dos aminoácidos (MS/MS) da fração 10.3 (Figura 14).

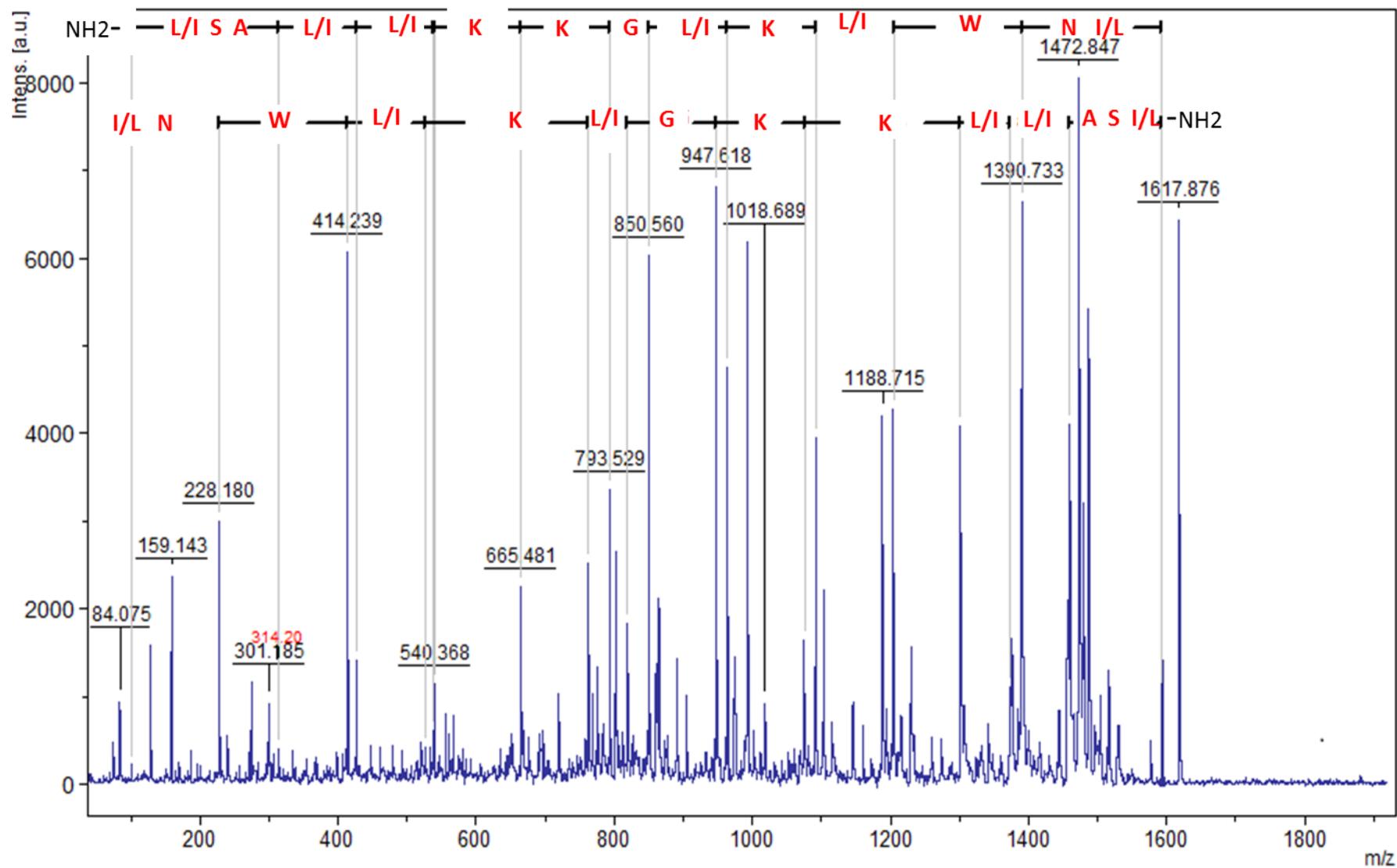


Figura 14: Determinação da sequência de aminoácidos do peptídeo correspondente à fração 10.3 Realizado no MALDI-TOF/TOF .

O peptídeo isolado apresenta massa molecular de 1594,8Da e é composto por 14 resíduos de aminoácidos (Figura 14).

A sequência peptídica da fração 10.3 foi determinada como I/L-N-W-I/L-K-I/L-G-K-K-I/L-I/L-A-S-I/L-NH₂, com amidação da região C-terminal.

Após uma comparação com bancos de dados, pode-se verificar que se trata de um peptídeo novo, mas com similaridade aos peptídeos mastoparanos isolados da peçonha de vespas.

Na Tabela 2 está mostrada uma lista dos principais mastoparanos isolados de peçonhas de vespas, com as respectivas sequências primárias.

Tabela 2 – Sequencia primaria de mastoparano isolados de peçonha de vespas

| Peptídeo | Sequência | Especie de Vespa | Referência |
|--------------------|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| EMP-ER | FDIMGLIKKVAGAL-NH ₂ | <i>E. rubrofemoratus</i> | Rangel et al 2011. |
| EMP-EF | FDVMGIIKKIAGAL-NH ₂ | <i>Eumenes fraternus</i> | Rangel et al 2011. |
| Pd mastoparano A | INWKKIFEKVKNLV | <i>P. dorsalis dorsalis</i> | Cerovský, et al 2008. |
| Pd_mastoparano B | INWLKLGKKILGAL | <i>P. dorsalis dorsalis</i> | Cerovský, et al 2008. |
| Mp_mastoparano | INWLKLGKKMMSAL | <i>Mischocyttarus phthisicus</i> | Cerovský, et al 2008. |
| Pm_mastoparano PMM | INWKKIASIGKEVLKAL | <i>Polistes major major</i> | Cerovský, et al 2008. |
| Polybia-MP1 | IDWKKLLDAAKQIL | <i>Polybia paulista</i> | Souza, et al 2005. |
| Mastoparano-AF | INLLKIAKGIKSL | <i>A. flavomarginatum micado</i> | Cabrera, et al 2004. |
| Mastoparano A | IKWKAILDAVKKVL | <i>Vespa analis</i> | Nakajina et al.,1986 |
| Mastoparano B | LKLKSIESWAKKVL | <i>Vespa basalis</i> | Ho e Hwang ,1991 |
| Mastoparano | INLKALAALAKKIL | <i>Vespula lewisii</i> | Hirai et al., 1979 |
| Mastoparano-M | INLKAIAALAKKLL | <i>Vespa mandarina</i> | Hirai et al., 1981 |
| Mastoparano-T | INLKAIAFAKKIL | <i>Vespa tropica</i> | King et al.,2003 |
| HR-I | INLKALAALVKKVL | <i>Vespa orientalis</i> | Tuichibaev et al., 1988 |
| Mastoparano-II | INLKALLAVAKKIL | <i>Vespa orientalis</i> | Nazimov et al., 1980 |
| Mastoparano-X | INWKGIAAMAKKLL | <i>Vespa xanthoptera</i> | Hirai et al., 1979 |
| Mastoparano-C | INWKALLAVAKKIL | <i>Vespa crabro</i> | Argiolas e Pisano, 1984 |
| Protonectarina-MP | INWKALLDAAKVL | <i>Protonectarina sylveirae</i> | Dohtsu et al., 1993 |
| Parapolybia-MP | INWKKMAATALKMI | <i>Parapolybia indica</i> | Toki et al., 1988 |
| Polybia-MP I | IDWKKLLDAAKQIL | <i>Polybia paulista</i> | Mendes et al.,2005 |

| | | | |
|----------------|--------------------------------------|---|----------------------|
| EMP-AF | INLLKIAKGIKSL | <i>Anterhychium flvomarginatum micado</i> | Konno et al.,2000 |
| P-13 | INWLKLGKKVSAIL | <i>Protopolybia sedula</i> | Nakajina et al.,1986 |
| Mastoparano-V | INWKGIAAMAKKLL | <i>Vespa affinis</i> | Lin et al., 2011 |
| Mastoparano-AF | INLKAIAALAKKLF | <i>Vespa velutina</i> | Lin et al., 2011 |
| Synoeca-MP | INWLKLGKKIIASL-NH₂ | <i>Synoeca surinama</i> | - |

O peptídeo foi então denominado Synoeca-MP e foi sintetizada pela AminoTech Pesquisa e Desenvolvimento Ltda, que enviou a análise da pureza do peptídeo por espectrometria de Massa (figura 15). Este espectro mostra a presença de duas massas com cargas protonadas com 2 e 3 H⁺, com massas de 759.54 e 533.39 Da, respectivamente.

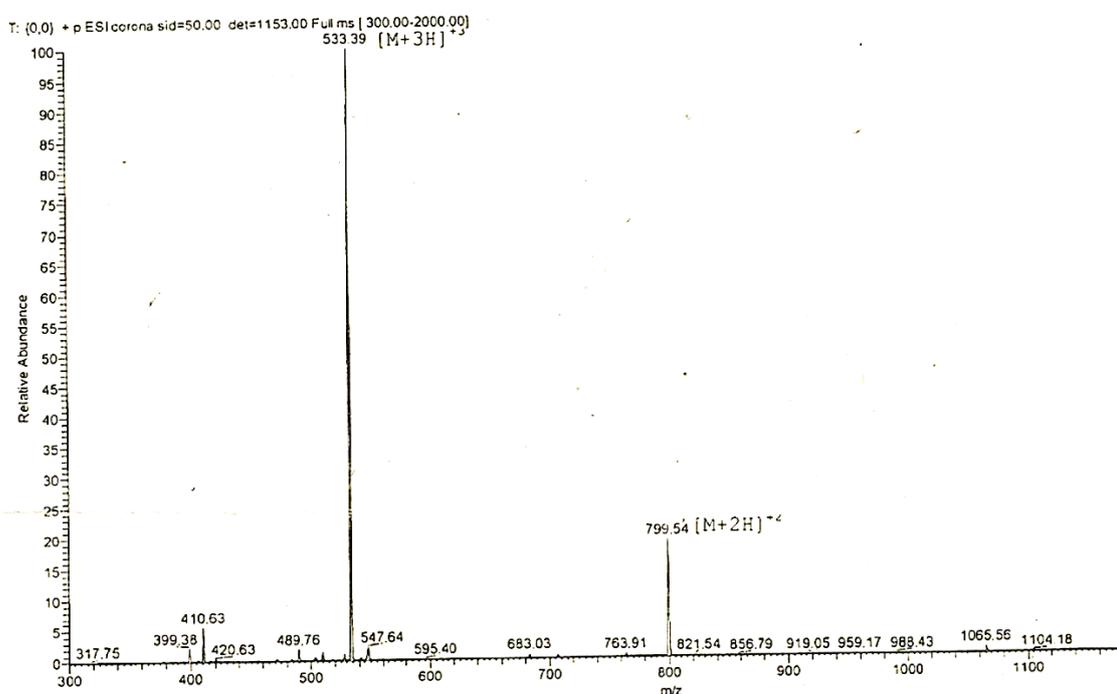


Figura 15: O espectro de massa do peptídeo sintético que revelou a presença de um único composto, contendo os íons (M+3H⁺) = 533,39 e (M+2H⁺) = 799,54.

4.3 Resultado dos testes com peptídeo sintético

O peptídeo sintético recebeu a nomenclatura, similar ao natural, de Synoeca-MP, por se tratar de um AMP da classe dos mastoparanos, com a mesma sequência do peptídeo isolado da peçonha da vespa social *Synoeca surinama*.

Todos os testes foram realizados em triplicatas e em 3 ensaios independentes, cada cepa teve um controle negativo de inibição e um controle positivo de inibição.

Após a observação dos efeitos no ensaio preliminar com uma cepa Gram-positiva e uma Gram-negativa, percebeu-se que era necessário determinar doses diferentes para cada grupo. O experimento foi realizado seguindo as concentrações relativas a cepa testada.

Tabela 3: Relação das doses do peptídeo Synoeca-MP, em μM , testadas para os grupos.

| Cepas | Doses (μM) |
|--|--|
| <i>Staphylococcus aureus</i> sensível | 2,50; 2,18; 2,12; 2,06; 2,00; 1,93; 1,88; 1,50 e |
| <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA. | 1,25 μM |
| <i>Escherichia coli</i> sensível, <i>Escherichia coli</i> ESBL, | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> sensível | 28,10; 21,90; 18,75; 15,62; 12,50; 9,37; 6,25 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> VRE | e 3,10 μM |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sensível | 9,37; 6,25; 5,93; 5,62; 5,31; 5,00; 4,70; |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR* | 4,40 μM |
| <i>Kebsiella pneumoniae</i> sensível | |
| <i>Kebsiella pneumoniae</i> KPC. | |

*Multirresistente, sensível somente a polimixina.

Os valores de MIC₅₀ e MIC₉₀ que demonstram a ação do Synoeca-MP contra as cepas padrão ATCC podem ser visualizados na tabela 04.

Tabela 4: Comparação entre os MIC₅₀ e MIC₉₀ obtidos por regressão não-linear do peptídeo Synoeca-MP em Cepas Padrão ATCC (μM).

| MIC | Cepa Sensível | Cepas Resistentes |
|-------------------|--|---|
| MIC ₅₀ | <i>S. aureus</i> (29213s) 2,188 (2.072 - 2.310) | <i>S. aureus</i> (33591r) 1,977 (1.924 - 2.031) |
| MIC ₉₀ | 2,195 (2.085 - 2.310) | 2,283 (2.147 - 2.427) |
| MIC ₅₀ | <i>E. coli</i> (25922s), 1,976 (1.898 - 2.057) | <i>E. coli</i> (35218r) 2,079 (1.982 - 2.180) |
| MIC ₉₀ | ~ 1.241 | ~ 1.212 |
| MIC ₅₀ | <i>E. faecalis</i> (29212s), 10,710 (9.935 - 11.54) | <i>E. faecalis</i> (51299r) 8,370 (7.366 - 9.511) |
| MIC ₉₀ | 17,860 (13.56 - 23.52) | 17,150 (13.24 - 22.21) |
| MIC ₅₀ | <i>P. aeruginosa</i> (27853s) 4,876 (4.828 - 4.924) | <i>P. aeruginosa</i> (496193r) 5,281 (5.165 - 5.400) |
| MIC ₉₀ | ~ 5.011 | 5,910 (5.643 - 6.189) |
| | <i>K. pneumoniae</i> (BAA 1705s) | <i>K. pneumoniae</i> (BAA 1705r) |

| | | |
|-------------------------|------------------------|------------------------|
| MIC₅₀ | 5,335 (5.200 to 5.474) | 3,596 (2.705 to 4.782) |
| MIC₉₀ | 6,354 (5.740 to 7.033) | ~ 4.884 |

A ação antimicrobiana observada foram significativas para todas as cepas testadas, com o MIC₅₀ variando de 1,97 µM a 10,8 µM e com um MIC₉₀ variando de 1,24 µM a 17,8 µM. Os valores dos MICs foram calculados estatisticamente por regressões não-lineares sigmoidais pelo software GraphPad 5.

Os testes com as cepas *S. aureus* (29213s) e *S. aureus* (33591r) nas doses de 2,50 a 1,25 µM mostraram que o peptídeo foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, apresentando respostas similares para cepas sensível e para as resistentes.

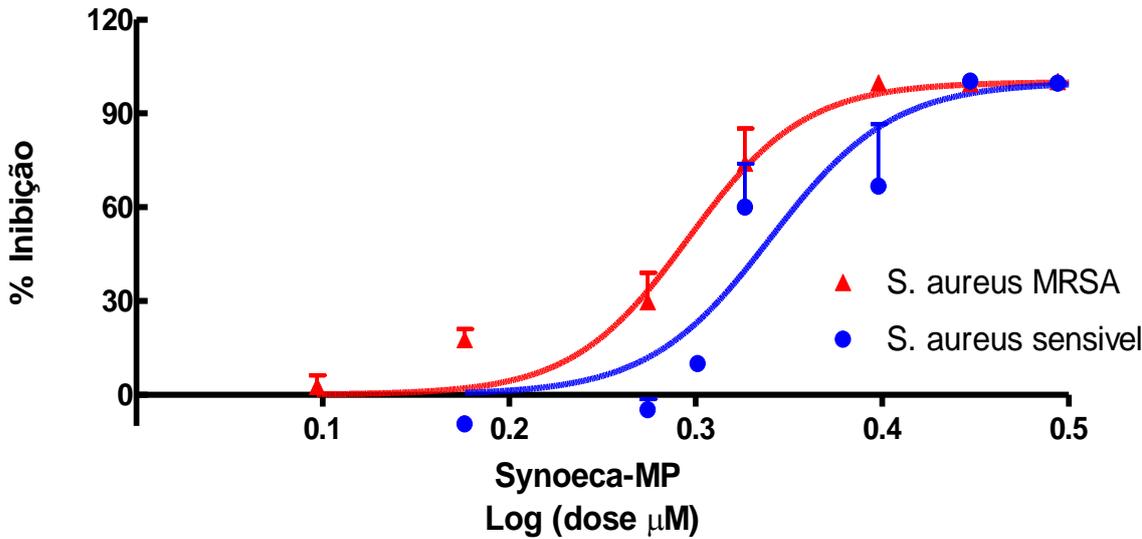


Figura 16- Porcentagem de inibição do peptídeo Synoeca-MP contra as bactérias *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes ATCC 25923 e 33591. $R_2= 0,7397$ e $R_2=0,8933$, respectivamente.

Para os testes com as cepas *E. coli* (25922s) e *E. coli* (35218r), nas mesmas doses do teste de *S. aureus*, o peptídeo também inibiu do crescimento bacteriano, apresentando inibição para cepas sensíveis com doses mais baixas que as utilizadas para a cepa resistente.

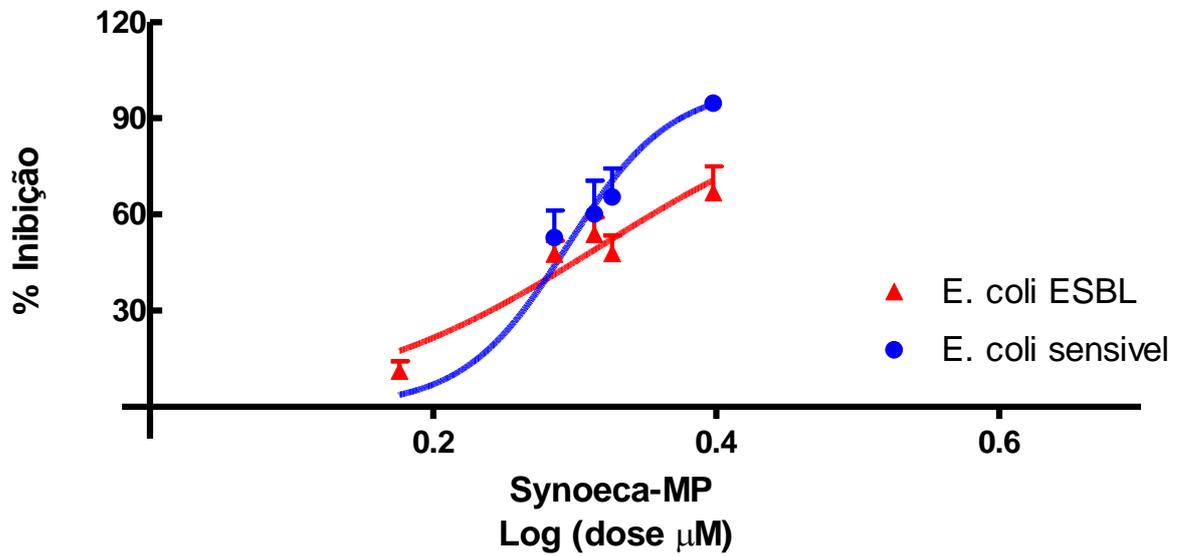


Figura 17- Porcentagem de inibição do peptídeo Synoeca-MP contra as bactérias *Escherichia coli* sensíveis e resistentes ATCC (25922s) e (35218r). $R_2= 0,7402$ e $R_2=0,5722$, respectivamente.

Nos testes com as cepas *E. faecalis* (29212s), *E. faecalis* (51299r), as doses variaram de 28,10 a 3,10 μM . Estas cepas apresentaram uma maior resistência ao peptídeo Synoeca-MP, sendo, então, necessário utilizar outros valores de doses. Neste ensaio, foram necessários valores mais altos do peptídeo. Nas doses utilizadas, observa-se a inibição do crescimento bacteriano similar para as duas cepas.

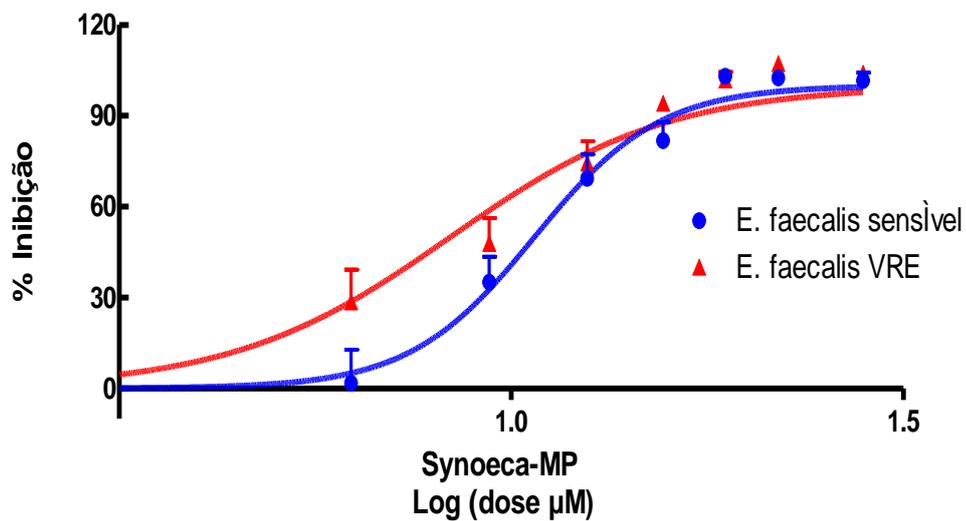


Figura 18- Porcentagem de inibição do peptídeo Synoeca-MP contra as bactérias *E. faecalis* sensíveis e resistentes ATCC (29212s) e (51299r). $R_2 = 0,8061$ e $R_2 = 0,6316$, respectivamente.

Nos testes com as cepas *P. aeruginosa* (27853s), *P. aeruginosa* (496193r), as doses variaram de 9,37 a 4,40 μ M. Estas cepas apresentaram um perfil de inibição diferenciado. A cepa sensível apresentou inibição de 100% com as doses mais baixas de 5,3 μ M, enquanto a cepa resistente apresentou inibição de 100% nas doses acima de 9,37 μ M.

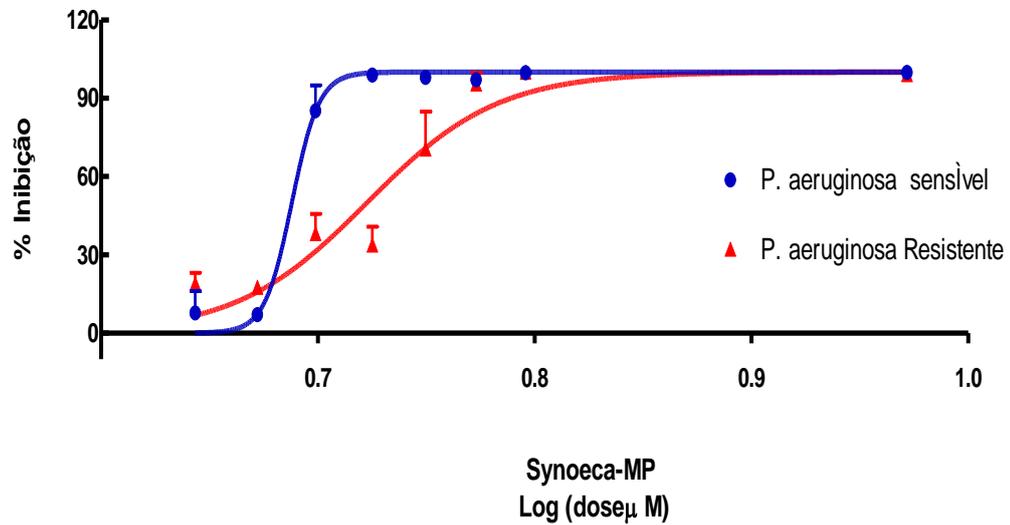


Figura 19- Porcentagem de inibição do peptídeo Synoeca-MP contra as bactérias *P. aeruginosa* sensíveis e resistentes ATCC , (27853s) e (496193r). $R^2 = 0,8994$ e $R^2 = 0,7467$, respectivamente.

Para o teste com as cepas *K. pneumoniae* (BAA 1705s) e *K. pneumoniae* (BAA 1705r), as doses variaram de 9,37 a 4,40 μM , as mesmas utilizadas para o teste com *P. aeruginosa*. A cepa com perfil de resistência ESBL, se mostrou mais sensível ao peptídeo Synoeca-MP, apresentando inibição de 100% nas doses acima de 4,7 μM . A cepa sensível apresentou inibição de 100% com as doses acima de 6,4 μM .

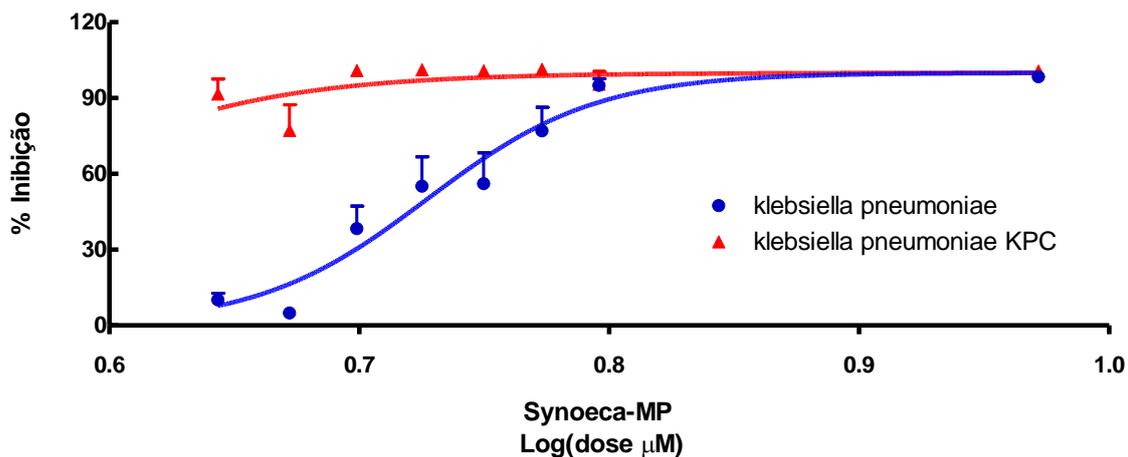


Figura 20- Porcentagem de inibição do peptídeo Synoeca-MP contra as bactérias *K. pneumoniae* sensíveis e resistentes ATCC (BAA 1705s) e (BAA 1705r). $R_2 = 0,6685$ e $R_2=0,2216$, respectivamente.

O ensaio com o peptídeo Synoeca-MP para avaliar a ação hemolítica apresentou um EC_{50} de $185\mu\text{M}$, que representa uma dose 17 vezes maior que a dose mais alta usada no teste de inibição de bactérias.

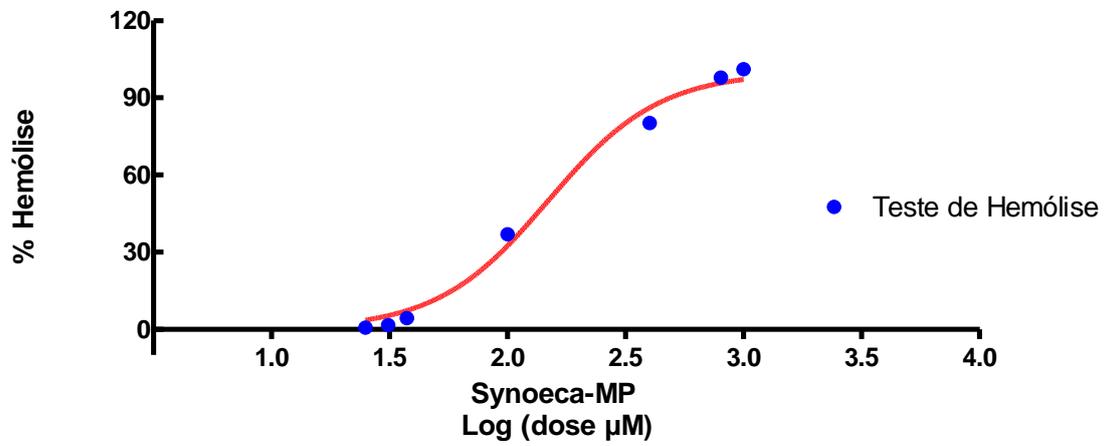


Figura 21: Ensaio hemolítico usando diferentes concentrações do peptídeo Synoeca-MP em solução de hemácias de camundongos a 4%. $R_2 = 0,9973$

5-DISCUSSÃO

Hoje, as doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortes de indivíduos hospitalizados, sem que a causa de internação tenha sido por processos infecciosos. Durante a internação, o paciente é exposto a situações de risco, por se tratar de um ambiente hostil e com muitas possibilidades de contaminação, tais como: exames invasivos, procedimentos terapêuticos, o contato com equipe de saúde, uso de drogas imunossupressoras e pelo estresse da internação. Estes fatores associados tem sido responsáveis pelo alto índice de ocorrência da IrAS (Benoit, 2008).

As bactérias isoladas no ambiente hospitalar, relacionadas com as infecções ou com a colonização de sítios anatômicos, de pacientes e funcionários, vem apresentado uma alta frequência de mecanismos de resistência aos antimicrobianos de uso convencional (Singh *et al.*,2011). Os órgãos governamentais, envolvidos no combate e controle de cepas resistentes, em todo mundo, vêm desenvolvendo e implementando estratégias para atingirem seus objetivos, em especial o controle das bactérias multiresistentes. Dentre estas estratégias de combate às bactérias resistentes, há um grande esforço dos grupos de pesquisa em desenvolverem novos fármacos com ação antimicrobiana (Barrett, 2005).

Nas últimas décadas, poucos fármacos antimicrobianos foram liberados para o uso terapêutico em humanos, dificultado o combates das doenças infecciosas. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs), isolados dos mais variados organismos eucariontes multicelulares, fazem parte do rol dos fármacos promissores para o desenvolvimento de novos antimicrobianos de uso clínico (Gottlieb *et al.*, 2008).

Os AMPs são compostos de baixa massa molecular formado por uma quantidade restrita de aminoácidos. Apresenta uma característica catiônica, possibilitando uma atração com os fosfolipídios da membrana celular das bactérias, formadas por fosfolipídios do tipo fosfatidilglicerol e difosfatidilglicero (cardiolipina), que apresentam uma característica aniônica (Han *et al.*, 2006).

A interação dos AMPs com as membranas das bactérias causa uma desordem nas camadas lipídicas, promovendo uma alteração na permeabilidade celular. Os mecanismos envolvidos nesta alteração ainda não são bem elucidados, embora muitos trabalhos têm apresentado modelos para tentar explicar os mecanismos de ação dos AMPs em membranas de bactérias (Hernández *et al.*, 2010). Os mecanismos propostos nos estudos atuais são: formação de tapetes (Carpet-like), formação de barril (Barrel-stave), poros toroidais (Toroidal model), modelo de SMH (Shai-Matsuzaki-Huang) e o mais recente denominado modelo detergente (Detergent-like) (Verly,2010). Os AMPs podem ter ação no interior das células

bacterianas, alterando as atividades de organelas ou interferindo em vias metabólicas (Park *et al.*, 2011).

Estes peptídeos antimicrobianos são considerados potenciais fármacos antimicrobianos, pois apresentam mecanismos de ação, que não sua maioria, ainda não tem relação com os mecanismos de resistência bacteriana conhecida (Yount e Yeaman 2005).

O desenvolvimento deste estudo corrobora com os esforços para o controle e combate das cepas bacterianas relacionadas às IrAS, com ou sem expressão de mecanismos de resistência, através da bioprospecção de peptídeos de baixa massamolecular, isolados da peçonha de vespas.

O potencial do AMPs, isolados da peçonha de vespas, sociais ou solitárias, já são bem conhecidos e descritos na literatura. Nas últimas décadas, vários compostos bioativos foram descritos e classificados, principalmente por sua ação antimicrobiana contra bactérias, protozoários e fungos.

Para este estudo, buscou-se o isolamento de peptídeos da peçonha da vespa social *Synoeca surinama*. Esta espécie ocorre geralmente nas florestas tropicais, comum nas Américas, e são encontradas desde o México até a Argentina (Richards, 1978). No Brasil, podem ser encontradas facilmente no bioma do cerrado. As vespas formam seus ninhos em locais mais altos, dificultando o acesso de predadores, são geralmente, espécies de vespa sociais muito agressivas e com a presença de aparelhos de inoculação da peçonha.

A peçonha coletada foi liofilizada e mantida sob refrigeração para amenizar os efeitos de degradação dos componentes. Após o fracionamento da peçonha, por cromatografia líquida de alta eficiência, as frações resultantes foram testadas contra cepas bactérias com perfil de resistência conhecido. Dos peptídeos isolados, o *Synoeca-MP* foi o que apresentou uma melhor atividade de inibição do crescimento das bactérias testadas.

As bactérias selecionadas para os testes representam as cepas frequentemente isoladas nas unidades de internação, sendo o principal foco da preocupação dos pesquisadores voltados ao controle das infecções.

O peptídeo *Synoeca-MP*, foi sequenciado e sintetizado para a realização de ensaios com as dez cepas selecionadas. Foram realizados três ensaios independentes para cada cepa e em cada ensaio o teste foi realizado em triplicatas, possibilitando uma análise estatística confiável.

O sequenciamento do peptídeo demonstrou a presença de 14 resíduos aminoácidos e uma característica padrão dos mastoparanos, classe de peptídeos já isolados em várias outras espécies de vespa.

Mastoparanos são peptídeos catiônicos constituídos de vários aminoácidos hidrofóbicos, apresentam uma conformação do tipo α -helice. Estudo realizado com a finalidade

de isolamento de AMPs em peçonha de vespas demonstra a presença destes peptídeos nas mais variadas espécies. Em 1979, pela primeira vez um mastoparano foi isolado da peçonha de *Vespulas lewissii* (Lin *et al.*, 2011).

No estudo realizado em 2011, por Lin e colaboradores, utilizando mastoparanos isolados de seis espécies de vespas foram testados contra bactérias com perfil de resistência e sem perfil de resistência, similar ao realizado neste trabalho. Para alguns mastoparanos as cepas com perfil de resistência foram mais sensíveis aos peptídeos. No teste com Synoeca-MP algumas cepas com perfil de resistência conhecido apresentaram MICs menores que as sem perfil de resistência. No presente trabalho, as cepas de *K. pneumoniae* (BAA 1705r), com perfil de resistência KPC, foram mais sensíveis que as cepas *K. pneumoniae* (BAA 1705s) sem resistência.

Cerovsky (2008), isolou quatro mastoparanos da peçonha de vespas *Polistes major major*, *P. dorsalis dorsalis* e *Mischocyttarus phthisicus* que foram sintetizados e testados contra bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas*, não tendo sido relatado no trabalho o uso de bactérias com perfil de resistência. Nos resultados apresentados verificou-se que os MIC para *E. coli* foi de 7,5µM para o mastoparano PDD-A, enquanto neste trabalhos observou-se um MIC de 1,2 µM, tanto para as cepas sensíveis quanto para a cepa com resistência ESBL. A ação inibição de *E.coli* foi mais eficiente nos ensaios com uso de Synoeca-MP.

Rangel e colaboradores (2007), testou quatro peptídeos isolados da peçonha de duas vespas solitárias, *Eumenes rubrofemaratus* e *Eumenes fraternulus*. Os MICs observados tiveram variações de 60 a 7.5 µM para as cepas Gram-positivas e Gram-negativas, valores maiores que os observados nos ensaios com Synoeca-MP, que vários MICs estão entre de 2,2 a 17,8 µM, mostrando-se um potente inibidor de crescimento para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Os mastoparanos não apresentam somente atividade antimicrobiana, mas podem, pela sua composição, apresentar atividade hemolítica. Um AMP com boa atividade antimicrobiana, mas que apresente uma atividade hemolítica torna-se inviável para a produção de novos fármacos, pois o uso deste AMP hemolítico trará danos às células eucariontes. Neste trabalho, o peptídeo Synoeca-MP foi testado contra um concentrado de hemácias de sangue de camundongos.

Nos ensaios realizados para a determinação da possível atividade hemolítica, o Synoeca-MP apresentou uma baixa atividade hemolítica com o EC₅₀ de 185µM, um valor muito acima dos valores aferidos para a atividade antimicrobiana. Desta forma, este peptídeo poder ser reconhecido como um promissor fármaco antimicrobiano.

6. CONCLUSÕES

- Foi isolado um novo peptídeo antimicrobiano da peçonha de vespa sociais *Synoeca surinama*,
- O peptídeo isolado que se destacou por sua atividade antimicrobiana, contra cepas Gram-positivas e Gram-negativa foi o Synoeca-MP, apresentou MICs baixos para as cepas sensível ou com perfil de resistência;
- O peptídeo apresenta atividade hemolítica somente em doses 17 vezes maiores que as efetivas como antimicrobianos;
- O peptídeo pode ser considerado um bom modelo de fármaco antimicrobiano.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Andena, Sergio R., Carpenter, James M. and Noll, Fernando B. (2009). A phylogenetic analysis of *synoeca* de saussure, 1852, a neotropical genus of social wasps. *Entomologica Americana* 115(1):81–89.

Argiolas, A. e Pisano, J. J. (1984.) Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and cabrolin, from venom of the european hornet, *Vespa cabro*. *J. Biol. Chem.* Washington, 59(16):101-106,

Argiolas, Antonio and Pisano, John J. (1983). Facilitation of Phospholipase A2 Activity by Mastoparans, a New Class of Mast Cell Degranulating Peptides from Wasp Venom. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 258 Nº 22 : 13697-13702.

Baracchi, David, et al. (2012). From individual to collective immunity: The role of venom as antimicrobial agent in the *Stenogastrinae* wasp societies. *Journal of Insect Physiology* 58:188-193.

Barrett, J. F. (2005) Can biotech deliver new antibiotics ? *Current Opinion in Microbiology*. 8. 498-503.

Bechinger B, Lohner K. (2006a). Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. *Biochim Biophys Acta*. Sep;1758 (9):1529-39.

Bechinger, Burkhard and Lohner, Karl (2006b). Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. Volume 1758, Issue 9: 1529–1539.

Benoit, S. R. (2008). Community Strains of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* as potential cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002-2004. *Emerging Infectious Diseases*. V.14, n.8. p. 1216-1222.

Bernard, L. et al. Comparative analysis and validation of different assays for glycopeptide susceptibility among MRAS strains (2004). *J Microbiol Meth*, v 57, p231-9.

Bhavnani, S. M., J. A. Drake, A. Forrest, J. A. Deinhart, R. N. Jones, D. J. Biedenbach, and C. H. Ballow. 2000. A nationwide, multicenter, case control study comparing risk factors, treatment, and outcome for vancomycin-resistant and -susceptible enterococcal bacteremia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 36:145–158.

Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?". *Nature Reviews Microbiology*, v.3, n.3, p.238-250.

Byarugaba, Denis K. (2009). Mechanisms of Antimicrobial Resistance. Chapter 2. Antimicrobial Resistance in Developing Countries. Springer Science.15-24.

C.D.C (2011). (2009-2010) PROGRESS TOWARDS IMPLEMENTATION OF: A public health action plan to combat antimicrobial resistance. Interagency Task Force on Antimicrobial Resistance. Co-Chairs: Centers for Disease Control and Prevention, Food and Drug Administration and National Institutes of Health.

Cabrera, M. P. dos Santos. *et al.* (2008). Selective in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1..Eur Biophys J. 37. 879-891.

Cabrera, M.P. dos Santos. *et al.* (2004). Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. J. Peptide Res. 64:95-103.

Carl Nathan. (2004) Antibiotics at the crossroads. Nature 431, 899-902

Caroline Trebbien Gottlieb, Line Elnif Thomsen, Hanne Ingmer, Per Holse Mygind, Hans-Henrik Kristensen and Lone Gram.(2008). Antimicrobial peptides effectively kill a broad spectrum of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* strains independently of origin, sub-type, or virulence factor expression. BMC Microbiology 8:205 doi:10.1186/1471-2180-8-205.

Castellón, E.G. (1980). Orientação, arquitetura e construção dos ninhos de *Synoeca surinama* (L) (Hymenoptera; Vespidae). Acta Amazonica 10(4); 883-896.

Cavallo, J. D., *et al.* (2008) Comité del Antibiógramme de la Société Française de Microbiologie. Paris. France.

Cerovsky, V. *et al.* (2008) New potent antimicrobial peptides from the venom of Polistinae wasp and their analogs. Peptides 29. 992-1003.

Chen, L.; Chen, W; Yang, H ; Lai, R. (2010).A novel bioactive peptide from wasp venom. J Venom. 1, 43-47.

Collee, J.G, Duguid, J.P, Fraser, A.G, Marmion, B.P.(1993). Microbiologia Médica. 6ª ed. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.

D. Ben-David, R. Kordevani, N. Keller, I. Tal, A. Marzel, O. Gal-Mor, Y. Maor and G. Rahav. (2011). Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections.Clin Microbiol Infect 2012; 18: 54–60.

Dhriti Mallik, Akash Kumar, Sujoy Kumar Sarkar, and Anindya S. Ghosh (2013). Multiple Resistance Mechanisms Acting in Unison in an *Escherichia coli*.Clinical Isolate Current Microbiology (2013) 67: 748.

Dohtsu, K.; Okumura, K.; Palma, M. S.; Nakajima T.(1993) Isolation na sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (Himenoptera –Vespidae). Natural Toxins, New York,1:271-6,.

Ebbing Lautenbach, Jean Baldus Patel, Warren B. Bilker, Paul H. Edelstein, and Neil O. Fishman (2001). Extended-Spectrum b-Lactamase–Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors for Infection and Impact of Resistance on Outcomes. Clinical Infectious Diseases 2001 32: 1162-1171.

Elgar, Dale; Johan Du Plessis and Lissinda Du Plessis (2006). Cysteine-free peptides in scorpion venom: geographical distribution, structure-function relationship and mode of action. African Journal of Biotechnology 5, 25, 2495—2502

Findlay, Brandon. *et al.* (2010). Cationic Amphiphiles, a New Generation of Antimicrobials Inspired by the Natural Antimicrobial Peptide Scaffold. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 4049-4058.

- Gianguaspero, Anna. Sandri, Luca and Tossi, Alessandro. (2001). Amphipathic helical antimicrobial peptides: A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. *Eur. J. Biochem.* 268, 5589–5600 .
- Giedraitiene, Agnė. *et al.* (2011) Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. *Medicina(Kaunas)* 47(3):137-146.
- Han, Xianlin, Kui Yang, Jingyue Yang, Hua Cheng, Richard W. Gross (2006). Shotgun lipidomics of cardiolipin molecular species in lipid extracts of biological samples. *J Lipid Res.* 2006 April; 47(4): 864–879.
- Hancock, E.W; Bowdish, D.M.E.; Davidson, D.J. A. (2005). Re-evaluation of the Role of Host Defence Peptides in Mammalian Immunity. *Peptide Science*, 6.35-51.
- Hancock, R. E., and A. Rozek. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 206:143–149.
- Hancock, Robert E. W. (1997). Peptide antibiotics. *Lancet*; 349: 418-422.
- Hancock, Robert E. W. and Lehrer, Robert. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Tibtech* vol. 16: 82-88.
- Hassan, Mahmud. *et al.* (2010). Cost of Hospital-Acquired Infection. *Hospital Topics*.Volume 88, Issue 3: 82-89.
- Hawkey, P. M. 1997. Resistance to carbapenems. *J. Med. Microbiol.* 46:451–454.
- Hernández , C. A. *et al.* Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus*. 2010. *Toxicon*, 57. 84-92.
- Hirai, Y.; Yasuhara T.; Yoshida, H.; Nakajima, T. (1979) A new mast cell degranulation peptide “mastoparan” in the venom of *Vespula lewisii*. *Chem Pharm Bull. Tokyo*, 27(8):1942-1944,.
- Ho, C. L.; Hwang, L. L. (1991) Structure and biological activities of a new mastoparan isolated from the venom of the hornet *Vespa basalis*. *Biochem J* 274 (Pt 2):453-6,.
- Huang, Huey W. (2000). Action of Antimicrobial Peptides: Two-State Model. *Biochemistry*, 2000, 39 (29): 8347–8352
- Huang, Yibing, et al. (2010). Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein Cell.* 1(2):143-152.
- Hwang, Peter M and Vogel, Hans J. (1998). Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochemistry and Cell Biology*, Vol. 76, No. 2-3 : 235-246.
- Jenssen, H., Pamela Hamill, and Robert E. W. Hancock. (2006). Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, July, p. 491–511 Vol. 19, No. 3.
- Jeyashree, Ravi C. and Devi, Renuka. (2011). Antimicrobial Peptides from Insects: An Overview. *Research in biotechnology* 2(5): 01-07.
- Jin, Yi. *et al.* (2005). Antimicrobial Activities and Structures of Two Linear Cationic Peptide Families with Various Amphipathic β -Sheet and α -Helical Potentials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Dec. p. 4957–4964 Vol. 49, No. 12.
- Klevens, R. Monina. (2007). Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. *JAMA*, Vol 298, No. 15 1763- 1771.
- Konno, K. *et al.* (2007). Decoralin, a novel linear cationic alpha-helical peptide from the venom of solitary eumenine wasp *Oreumenes decorates*. *Peptides* 28(12)2320-2327.

Konno, Katsuhiko, *et al.* (2000). Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). *Toxicon*. Volume 38, Issue 11, 1 November 2000, Pages 1505–1515.

Konno, Katsuhiko. *et al.* (2006). Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. *Peptides* 27: 2624-2631.

Kozlov, Sergey A. *et al.* (2006). Latacins, Antimicrobial and Cytolytic Peptides from the Venom of the Spider *Lachesana tarabaevi* (*Zodariidae*). *The journal of biological chemistry* vol. 281, N^o. 30, 20983–20992.

Krause RM. The origin of plagues: old and new. *Science*. 1992;257:

Laverty, Garry; *et al.* (2011). The Potential of Antimicrobial Peptides as Biocides. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 6566-6596.

Lawes T, Edwards B, López-Lozano JM, Gould I. (2012). Trends in *Staphylococcus aureus* bacteraemia and impacts of infection control practices including universal MRSA admission screening in a hospital in Scotland, 2006-2010: retrospective cohort study and time-series intervention analysis. *MJ Open*. 2012 Jun 8;2(3).

Lin, C.; Hou, R. F.; Shyu, C.; Shia, W.; Lin, C.; Tu, W. (2012). In vitro activity of mastoparan-AF alone and in combination with clinically used antibiotics against multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates from animals. *Peptides* Volume 36, Issue 1, 114–120

Lisboa, Thiago., *et al.* (2007). The Prevalence of nosocomial infection in Intensive Care Units in the State of Rio Grande do Sul. *RBTI*. 19:4:414-420.

Livermore, David M (2002). Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clinical Infectious Diseases* 2002 34: 634-640.

Lohner, Karl and Prenner, Elmar J. (2006). Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. Volume 1758, Issue 9, Pages 1529–1539

Lv Y, Wang J, Gao H, Wang Z, Dong N, *et al.* (2014) Antimicrobial Properties and Membrane-Active Mechanism of a Potential α -Helical Antimicrobial Derived from Cathelicidin PMAP-36. *PLoS ONE* 9(1): e86364.

Machado, A. *et al.* (2005). Cost-effective of linezolid versus vancomycin in mechanical ventilation-associated nosocomial pneumonia caused by MRSA. *Braz J Infect Dis*, v. 9, n.3, p.191-202.

Madden, T. D. and Cullis, P. R. (1982). "Stabilization of bilayer structure for unsaturated phosphatidylethanolamines by detergents". *Biochimica et Biophysica Acta*, v.684: 149-153.

Marr, Alexandra K., Gooderham, William J. and Hancock, Robert E.W. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*. Volume 6, Issue 5, October. Pages 468–472.

Matsuzaki K. (1999). Why and how is peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta*; 1462:1-10.

Melo, Manuel N., Ferre, Rafael e Castanho, Miguel A. R. B. (2009). Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nature Reviews Microbiology* 7, 245-250.

Mendes, Maria A. *et al.* (2004). Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. *Toxicon* 44:67-74.

Michael S. Donnenberg and Thomas S. Whittam (2001). Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. The Journal of Clinical Investigation v.107. n. 5. P. 539-548.

Mortari, Márcia Renata. *et al.* (2012). Pharmacological characterization of *Parachartergus fraternus* venom: An aggressive social wasp widely distributed in the neotropical region. Toxicon 59:163-170.

Nakatsuji, Teruaki and Gallo, Richard L. (2012). Antimicrobial peptides: Old Molecules with New Ideas. J.Invest Dermatol. 132(3): 887-895.

Nannette Y. Yount and Michael R. Yeaman. (2005). Immunocontinuum: Perspectives in Antimicrobial Peptide Mechanisms of Action and Resistance. Protein and Peptide Letters, 12, 49-67 49

Nataro, J. P.; Kaper, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, Washington, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

Nazimov, I. V.; Snezhkova, L. G.; Miroshnikov, A. T. (1980). Structure and properties of mastoparan II. Na oligopeptide from the venom of *Vespa orientalis* hornet. Proc. 3d Symp. Chem. Pept. Prot.: USSR.

Nentwig, Kuhn L. (2003). Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. CMLS, Cell. Mol.life Sci. 60: 2651-2668.

Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Trends Biotechnol. 2011 Sep;29(9):464-72.

Paviani ER, Stadnik CB, Heinek I. (2004). Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa*. Infarma 15: 66-70.

Prossnigg, Florian, Andrea Hickel, Georg Pabst, and Karl Lohner (2010). Packing behaviour of two predominant anionic phospholipids of bacterial cytoplasmic membranes. Biophys Chem. 2010 August; 150(1-3): 129–135.

Rangel, M. *et al.* (2011). Chemical and biological characterization of four new linear cationic α -helical peptides from the venoms of two solitary eumenine wasps. Toxicon. Volume 57, Issues 7-8, 1081-1092

Rangel, M., Malpezzi E.L.A., Susini S.M.M. Freitas J.C. (1997). Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. Toxicon, v. 35, p. 305-309.

Ravi, C., Jeyashree, A. and Renuka Devi, K. (2011). Antimicrobial Peptides from Insects: An Overview. Research in Biotechnology, 2(5): 01-07.

Reddy, K.V.R. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. International Journal of Antimicrobial Agents. Volume 24, Issue 6: 536–547.

Ribeiro, S. P *et al.* (2004) Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. Peptides.25.20-2078.

Richards, O. W. (1978) The social wasps of the Americas. British Museum (Nat. History). London VII: 580.

Robert C. Moellering, Jr. (1998). Vancomycin-Resistant Enterococci Clinical Infectious Diseases 26: 1196-1199.

Sadd BM, Schmid-Hempel P. (2006). Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. Biol. 20;16(12):1206-10.

Samuelson O, Naseer U, Tofteland S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, (2009). Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother.*;63:654

Sanderson , John M (2005). Peptide–lipid interactions: insights and perspectives *Org. Biomol. Chem.* , 2005, 3 , 201–212.

Santos, A. L, et al. (2007). *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J. Bras. Patologia Med Lab.* V.43 n. 6 p. 413-423.

Santos, Carlos Alberto dos. (2009). *Biologia comportamental de Synoeca surinama: enxameio e interações sociais (Hymenoptera: Vespidae; Epiponini)*. São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.

Schmid-Hempel, Paul (2005). Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual Review of Entomology*. Vol. 50: 529-551.

Seong-Cheol Park, Yoonkyung Park, and Kyung-Soo Hahm.(2011). The Role of Antimicrobial Peptides in Preventing Multidrug-Resistant Bacterial Infections and Biofilm Formation. *Int Jor Mol sci.* 12(9) 5971-5992

Shai, Yechiel. (2002) "Mode of action of membrane active antimicrobial peptides." *Biopolymers* 66.4: 236-248.

Singh, Girija S. and Pandeya, Surendra N. (2011). Natural products in discovery of potential and safer antibacterial agents. *Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, 63-101.

Song, Ru , Wei, Rong-Bian , Luo, Hong-Yu and Wang, Dong-Feng (2012). Isolation and Characterization of an Antibacterial Peptide Fraction from the Pepsin Hydrolysate of Half-Fin Anchovy (*Setipinna taty*). *Food and Bioprocess Technology*. July, Volume 5, Issue 5, pp 1979-1989

Souza, B. M, Mendes MA, Santos LD, Marques M. R, Cesar LM, Almeida RN, Pagnocca FC, Konno K, Palma MS (2005). Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides* 26:2157–2164.

Tenover, Fred C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine* 119(6A), S3-S10.

Thomson, M. J; Bonomo, R.A. (2005). The heart of resistance in gram-negative pathogenic bacteria: B-lactams in peril. *Current Opinion in microbiology*. 8. 518-524.

Toke, Orsolya. (2005). *Antimicrobial Peptides: New Candidate in Fight Against Bacterial Infections*. Wiley InterScience. 80. 717-735.

Toledo PV, Arend LN, Pilonetto M, Costa Oliveira JC, Luhm KR. (2012). Surveillance programme for multidrug-resistant bacteria in healthcare-associated infections: an urban perspective in South Brazil. *J Hosp Infect.* ;80 (4):351-353.

Tossi, Alessandro. *et al.* (2000). Amphipathic, α -Helical Antimicrobial Peptides. *Peptides Science*, vol. 55: 4-30.

Tuichibaev, M.U.; Akhmedova, N. U. Kazako, I. Korneev, A. S.; Gagel`Gans, A. I. (1988). Low molecular weight peptides from the venom of the giant hornet *Vespa orientalis*. Structure and function. *Biokhimiia*. 53(2):219-26,

Turillazzi, Stefano, *et al.* (2005). Dominulin A and B: Two New Antibacterial Peptides Identified on the Cuticle and in the Venom of the Social Paper Wasp *Polistes dominulus* Using MALDI-

TOF, MALDI-TOF/TOF, and ESI-Ion Trap. American Society for Mass Spectrometry. Elsevier. 11.017.

Varkey, J.; Singh, S.; Nagaraj, R.(2006). Antibacterial activity of peptides spanning the carboxy-terminal β -sheet of arthropod defensins. *Peptides* 27. 2614-2623.

Verly, Rodrigo Moreira (2010). Peptídeos antimicrobianos: síntese, ensaios biológicos, estudos termodinâmicos e análise estrutural por RMN em meios biomiméticos. V521p.

Wang, Ting *et al.* (2005). Maximins S, a novel group of antimicrobial peptides from toad *Bombina maxima*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Volume 327, Issue 3, 945–951.

Wenzel, R.P. (2004). The antibiotic pipeline--challenges, costs, and values. *N Engl J Med*. 5;351(6):523-6

Wiesner, Jochen and Vilcinskas, Andreas . (2010). Antimicrobial peptides The ancient arm of the human immune system. *Virulence* 1:5, 440-464.

Wimley, William C. (2010). Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *ACS Chem Biol*. 15;5(10): 905-917.

Xu X, Yang H, Yu H, Li J, Lai R. (2006). The mastoparanogen from wasp. *Peptides*. 27(12):3053-7

Yeaman, Micael R. and Yount, Nannette. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Rev*. 55:27-55.

Yigit, Hesna *et al.* (2001). Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2001, 45(4):1151.

Zaslloff M. (2002a). Antimicrobial peptides in health and disease. *N Engl J Med*. Oct 10;347(15):1199-200.

Zaslloff M. (2002b). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.

Alicia I. Hidron, MD; Jonathan R. Edwards, MS; Jean Patel, PhD; Teresa C. Horan, MPH; Dawn M. Sievert, Daniel A. Pollock, MD; Scott K. Fridkin, MD (2008) Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infection control and hospital epidemiology* , vol. 29, no. 11: 997-1011.