



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
IMUNOLOGIA/ DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS - GENÉTICA/  
BIOTECNOLOGIA

**CAROLINA DOS SANTOS FERNANDES DA SILVA**

**PROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS BACTERIANOS COM ATIVIDADE  
ANTI-*LEISHMANIA***

JUIZ DE FORA  
2016

**CAROLINA DOS SANTOS FERNANDES DA SILVA**

**PROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS BACTERIANOS COM ATIVIDADE  
ANTI-*LEISHMANIA***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, na área de concentração Imunologia e Doenças Infecto-parasitárias, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutorado.

**Orientação:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vânia Lúcia da Silva (orientadora)**

**Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz (co-orientador)**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Soares Coimbra (co-orientadora)**

JUIZ DE FORA  
2016

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Carolina dos Santos Fernandes da.

Prospecção de peptídeos bacterianos com atividade antiLeishmania / Carolina dos Santos Fernandes da Silva. -- 2016. 160 p.

Orientadora: Vânia Lúcia da Silva

Coorientadores: Cláudio Galuppo Diniz, Elaine Soares Coimbra  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2016.

1. Peptídeos antimicrobianos. 2. Prospecção. 3. Substâncias bioativas. 4. Atividade antiLeishmania. I. Silva, Vânia Lúcia da, orient. II. Diniz, Cláudio Galuppo, coorient. III. Coimbra, Elaine Soares, coorient. IV. Título.

## **DESENVOLVIMENTO**

Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana (LFGMB)  
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

Núcleo de Estudos e Pesquisa em Parasitologia (NUPEP)  
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

## **COLABORAÇÃO**

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Aline Dias Paiva  
(Universidade Federal Triângulo Mineiro)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Carolina Morais Apolônio  
(Universidade Federal de Juiz de Fora)

## **APOIO**

FAPEMIG  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

CAPES  
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPq  
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

# PROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS BACTERIANOS COM ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA*

Aprovado em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

## BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Vânia Lúcia da Silva (Orientadora)  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Dra. Priscilla de Faria Pinto  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Dra. Clarice Abramo  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Dra. Aline Dias Paiva  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro- Uberaba

---

Dra. Juliana Alves Resende  
Universidade Federal do Espírito Santo- Alegre

Dedico este trabalho ao meu filho Rafael  
que veio iluminar a minha vida e me  
convidar a ser uma pessoa melhor a  
cada dia.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmã “*in memoriam*” pelos ensinamentos e exemplos. Uma separação precoce ainda na infância poderia ter deixado marcas de tristeza e amargura, mas resultou em gratidão a Deus por uma vida cheia de oportunidades.

Agradeço também aos quatro anjos que me acolheram em seus braços: minha avó Janete, meu avô Daniel, minha tia-mãe Maguinha e meu tio-pai Danival. A vocês minha eterna gratidão, pelo incentivo diário frente às dificuldades e pelo amor incondicional.

Agradeço ao meu esposo Anderson pela família que nós construímos, por abdicar de tantas coisas para que eu tivesse tempo, equilíbrio e foco para realizar o projeto de doutorado, principalmente depois da chegada do nosso Rafael. Obrigada por cuidar de mim, por cuidar dele e de tudo mais enquanto eu precisava estar reclusa nos estudos. Obrigada pelo seu amor, por sua compreensão pelas diversas noites e finais de semana estudando. Somos melhores juntos e esta conquista também é sua.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, através do programa de pós-graduação em Ciências Biológicas.

Ao departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da UFJF, na figura de cada professor no qual eu tive o prazer de aprender o exercício da minha profissão, conhecer os meus orientadores e ter a oportunidade de crescer cientificamente. Serei eternamente grata.

À minha orientadora professora Vânia Silva por sua amizade, por confiar em mim e ver aptidão para executar este projeto de pesquisa. E ao meu co-orientador e seu esposo, professor Cláudio Diniz, pela confiança, tolerância nos momentos de dificuldade e pelos vastos ensinamentos compartilhados.

À minha co-orientadora, professora Elaine Coimbra, por compartilhar os seus conhecimentos de parasitologia sempre com um olhar muito carinhoso. Obrigada por ceder seu laboratório. Agradeço também todo o treinamento e atenção das alunas Patrícia e Luciana que muito me auxiliaram na parasitologia, assim como as funcionárias do NUPEP.

Agradeço a todos os professores e colaboradores que de alguma forma puderam contribuir para a discussão ou execução deste projeto de doutorado,

principalmente a professora Aline Dias Paiva que mesmo de longe nunca hesitou em me auxiliar, bem como a todos os funcionários da UFJF pela ajuda sempre que necessária.

Aos meus amigos queridos da vida Manu, Vane, Vítor, Leandro, Lívia, Bruna, Luciano, Cacá e Reuzymar, pela amizade, pelo companheirismo, pelos abraços apertados, por compreenderem muitas vezes o meu afastamento e pela parceria de vida que estabelecemos com os nossos: Rafael, Juju, Gaby e Amelie.

Às microamigas Claudinha, Alessandra, Michele, Aline, Juliana e Laura por esses anos compartilhando emoções e alegrias, amor pela microbiologia, chateações experimentais no laboratório, o espaço físico, e as “boquinhas”. E ao meu microamigo, Thiagon, por ser um amigo peculiar, com sentimentos verdadeiros e ações únicas.

Aos demais amigos queridos da UFJF ou que passaram por ela: Thais, Francis, Dani, Vanessa, Andressa, Alice, Pollyanna, Marjorie, Ivna, Thais Gama, Gizele, Fred Daibert, Betânia, Dionéia.

Aos queridos alunos de iniciação científica que muito contribuíram para os avanços deste projeto: Pedro, Suzane, Guilherme, Anselmo e Dani. Obrigada por toda ajuda.

Aos demais familiares e amigos de coração que mesmo de longe vibraram positivamente por mim.

Às agências de Fomento pelo aporte financeiro do projeto.

À Universidade Presidente Antônio Carlos- UNIPAC/JF agradeço à oportunidade de exercer minha profissão, a todos os coordenadores pelo carinho, incentivo e confiança nos dias tumultuados, e aos meus alunos por permitirem aprendizado frequente.



## RESUMO

Peptídeos antimicrobianos são um grupo diverso de moléculas bioativas produzidas naturalmente por uma variedade de organismos procariotos e eucariotos, e que tem atividade antimicrobiana. Tendo em vista que o Brasil representa o país de maior incidência de leishmaniose no continente americano e a inexistência de peptídeos bacterianos com atividade neste parasito, o objetivo desde trabalho foi a prospecção de peptídeos produzidos por bactérias com ênfase na atividade anti-*Leishmania*. Foram utilizadas 466 amostras bacterianas para a obtenção de extratos brutos extracelulares, investigados quanto a atividade antimicrobiana total, utilizando como células-alvo culturas de bactérias (Gram-positivas e negativas), leveduras (*Candida* sp) e *Leishmania* sp. Esta avaliação da atividade antimicrobiana total permitiu definir as amostras produtoras de substâncias bioativas, bem como a caracterização do espectro de ação da substância antimicrobiana. E somente os extratos que tiveram atividade anti-*Leishmania* foram submetidos a precipitação protéica para avaliação da produção de peptídeos antimicrobianos. Quanto à caracterização da amostra produtora, foram realizados testes morfo-tintoriais, genéticos e metabólicos para garantia da pureza da cultura e determinação do melhor momento fisiológico de produção da substância antimicrobiana. Em relação ao espectro de ação, 222 extratos tiveram atividade antagônica ao crescimento bacteriano; 05 extratos tiveram atividade antagônica à *Candida* sp.; e 20 extratos tiveram atividade antagônica ao crescimento de *Leishmania* sp., totalizando 51 % de amostras positivas para produção de substâncias antimicrobianas. Quanto à atividade anti-*Leishmania*, os valores médios de inibição de extratos a 20 mg/mL em formas promastigotas do parasito pelo método do MTT foi de 33 % em *L. braziliensis* e *L. chagasi*, 30,7 % em *L. major* e 29 % em *L. amazonensis*. A redução da viabilidade de formas amastigotas também foi observada para o extrato bruto a 40 mg/mL de *Staphylococcus epidermidis* (CGP360), com valor de 60 %. E esse mesmo extrato não apresentou toxicidade para macrófagos peritoneais, resultado importante para novas drogas de uso sistêmico. Quanto à caracterização da amostra produtora, observou-se que a produção da substância antagonista com maior atividade anti-*Leishmania* ocorreu em extratos advindos de culturas crescidas em meios TSB e BHI e provenientes da fase estacionária de crescimento. Estudos adicionais devem ser realizados para uma melhor compreensão da interação dos extratos bacterianos em espécies de *Leishmania*, mas os resultados descritos neste trabalho são promissores e inéditos na literatura científica.

**Palavras-chave:** peptídeos antimicrobianos, AMPs, *Leishmania* sp., antagonismo, relação ecológica.

## ABSTRACT

Antimicrobial peptides are a diverse group of bioactive molecules naturally produced by a variety of prokaryotic and eukaryotic organisms with antimicrobial activity. Brazil represents the highest incidence country of leishmaniasis in the American continent, so the objective of this work was prospect bacteria peptides with anti-*Leishmania* activity. A total of 466 bacterial samples were used to produce extracellular crude extracts to evaluate antimicrobial activity against bacterial cells (Gram-positive and negative bacteria), yeast (*Candida* sp) and *Leishmania* sp. and characterize antimicrobial spectrum of action. Only *Leishmania* activity extracts were submitted to protein precipitation and tested to peptides production. The producing sample were characterized by genetic, morphologic and metabolic tests, and the best physiological moment of peptides production was determinate. The results showed that 222 extracts had bacterial activity, 05 extracts had *Candida* activity, and 20 extracts had *Leishmania* activity, summarizing 51 % of positive samples to antimicrobial substances production. For promastigote *Leishmania* activity, 20 mg/ mL extracts showed inhibition values by MTT method of 33 % in *L. braziliensis* and *L. chagasi*, 30.7 % in *L. major* and 29 % in *L. amazonensis*. The amastigote forms viability was observed for 40 mg/mL crude extract of *Staphylococcus edpidermidis* (CGP360), with a reduction value of 60 %. And this same extract did not have toxicity to peritoneal macrophages, an important result for new drugs of systemic use. Concerning the characterization of the producing sample, it was observed that the production of the antagonistic substance with the highest anti-*Leishmania* activity occurred in TSB and BHI media extracts coming from stationary phase. Additional studies should be performed to better understand the interaction of bacterial extracts in *Leishmania* species, but the results described in this paper are promising and unpublished in the scientific literature.

**Key-words:** antimicrobial peptides, AMPs, *Leishmania* spp., antagonism, ecological relationship.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Estrutura dos peptídeos antimicrobianos segundo conformação da molécula	08
<b>Tabela 1.</b>	Classificação dos peptídeos antimicrobianos	07
<b>Figura 2.</b>	Interação dos peptídeos antimicrobianos segundo composição lipídica da membrana celular	08
<b>Figura 3.</b>	Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos na membrana plasmática	09
<b>Figura 4.</b>	Modelo Shai-Matsuzaki-Huang de mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos	11
<b>Figura 5.</b>	Modo de ação intracelular de peptídeos antimicrobianos usando <i>Escherichia coli</i> como célula alvo	13
<b>Figura 6.</b>	Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i> , com fase promastigota no inseto vetor e fase amastigota intracelular em células fagocíticas do hospedeiro vertebrado	23
<b>Fluxograma 1.</b>	Esquema representativo dos passos experimentais no estudo de prospecção de peptídeos antimicrobianos	31
<b>Tabela 2.</b>	Amostras bacterianas usadas como reveladoras no antagonismo bacteriano	33
<b>Figura 7.</b>	Esquema representativo do teste de antagonismo bacteriano pelo método da sobrecamada	34
<b>Tabela 3.</b>	Linhagens de <i>Candida</i> sp. utilizadas no teste de antagonismo	34
<b>Figura 8.</b>	Esquema representativo do teste de antagonismo em fungo leveduriforme pelo método da sobrecamada	36
<b>Tabela 4.</b>	Espécies de <i>Leishmania</i> utilizadas no teste de antagonismo	37
<b>Fluxograma 2.</b>	Esquema representativo dos passos experimentais no estudo de prospecção de peptídeos bacterianos com atividade anti- <i>Leishmania</i>	39
<b>Figura 9.</b>	Organograma representativo da prospecção de	48

peptídeos antimicrobianos *in vitro*

<b>Tabela 5.</b>	Amostras bacterianas produtoras de substância antagonista as bactérias testadas	51
<b>Tabela 6.</b>	Amostras bacterianas produtoras de substância antagonista a <i>Candida</i> sp.	55
<b>Tabela 7.</b>	Eventos de inibição das amostras produtoras de substância antagonista a <i>Candida</i> sp.	55
<b>Tabela 8.</b>	Amostras bacterianas produtoras de substância antagonista contra <i>Leishmania</i> sp.	60
<b>Figura 10.</b>	Diagrama representativo de espécimes produtoras de substância antagonista que resultaram em testes positivos de inibição frente ao grupo de células alvo avaliadas	63
<b>Figura 11.</b>	Potencial anti- <i>Leishmania</i> de extratos bacterianos brutos extracelulares em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. chagasi</i> e <i>L. major</i> após 72 horas de tratamento.	64
<b>Tabela 9.</b>	Valores de inibição das melhores candidatas em promastigotas de <i>Leishmania</i> sp.	65
<b>Tabela 10.</b>	Valores médios de inibição do crescimento de <i>L. amazonensis</i> por extratos bacterianos provenientes de variação nutricional	69
<b>Figura 12.</b>	Avaliação da expressão de substância antagonistas com atividade em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , a partir de extratos brutos livres de células obtidos de culturas de <i>E. coli</i> em meio TSB ao longo da curva de crescimento.	73
<b>Figura 13.</b>	Avaliação da expressão de substância antagonistas com atividade em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , a partir de extratos brutos livres de células obtidos de culturas de <i>Enterococcus</i> sp em meio TSB ao longo da curva de crescimento.	74
<b>Figura 14.</b>	Avaliação da expressão de substância antagonistas com atividade em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , a partir de extratos brutos livres de células obtidos de culturas de <i>S. epidermidis</i> em meio BHI ao longo da curva de crescimento.	75

<b>Tabela 11.</b>	Comparação da atividade do extrato bruto de amostras bacterianas selecionadas e suas frações precipitadas em sulfato de amônio em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> em diferentes tempos de tratamento	76
<b>Figura 15.</b>	Fotografias representativas do tratamento de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> com extrato bacteriano da amostra CGP360 e suas frações precipitadas com sulfato de amônio, após coloração com Giemsa e observados em microscopia de luz (40x)	79
<b>Figura 16.</b>	Fotografias representativas do tratamento de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> com extrato bacteriano da amostra CGP360 e suas frações precipitadas com sulfato de amônio, após coloração com Giemsa e observados em microscopia de luz (100x)	80
<b>Tabela 12.</b>	Efeito do extrato bruto precipitado (fração E-40) de CGP360 m macrófagos peritoneais de camundongos e formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	81
<b>Figura 17.</b>	Fotografias representativas do tratamento de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> com extrato bacteriano da amostra CGP360, após coloração com Giemsa e observados em microscopia de luz (100x)	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPs – da sigla em inglês para peptídeos antimicrobianos (*antimicrobials peptides*)

MDR – microrganismos resistentes a várias drogas, do termo em inglês *Multi-drug resistant*

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

LFGMB- Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana

NUPEP- Núcleo de Pesquisa e estudo em Parasitologia

DNA- ácido desoxirribonucléico

BGN- bastonete Gram-negativo

CGP- cocos Gram-positivos

BHI- Brain Heart Infusion, infusão de cérebro e coração

TSA-Tryptic Soy Agar, ágar tripticase e soja

PBS- tampão fosfato

UFC- unidades formadoras de colônia

DO- densidade óptica

MTT- dimetiltiazol difenil tetrazólico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>4</b>
2.1 Peptídeos Antimicrobianos	5
2.2 Características e classificação dos peptídeos antimicrobianos	6
2.3 Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos	9
2.4 Peptídeos antimicrobianos como ferramentas terapêuticas potenciais	14
2.4.1 Atividade Antibacteriana	15
2.4.1.1 Bacteriocinas de bactérias Gram-negativas	17
2.4.1.2 Bacteriocinas de bactérias Gram-positivas	19
2.4.2 Atividade Antifúngica	20
2.4.3 Atividade Antiparasitária	21
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
4.1 Desenho experimental	31
4.2 Amostras bacterianas para avaliação da atividade antagonista	32
4.3 Avaliação da atividade antagonista ao crescimento de bactérias	32
4.4 Avaliação da atividade antagonista ao crescimento de <i>Candida</i> sp	35

<b>4.5 Avaliação da atividade antagonista ao crescimento de <i>Leishmania</i> sp</b> .....	<b>38</b>
4.5.1 Obtenção de extratos brutos bacterianos.....	39
4.5.2 Teste de atividade anti- <i>Leishmania</i> em formas promastigotas.....	41
<b>4.6 Avaliação da composição do meio de cultura e tempo de crescimento na produção de composto com atividade em <i>Leishmania amazonensis</i></b> .....	<b>42</b>
4.6.1 Obtenção de extratos brutos após cultivo bacteriano em meio de cultura.....	43
4.6.2 Obtenção de extratos brutos ao longo do crescimento in vitro.....	43
<b>4.7 Precipitação protéica dos extratos provenientes da melhor condição experimental</b> .....	<b>44</b>
<b>4.8 Avaliação da toxicidade sobre macrófagos peritoneais.....</b>	<b>44</b>
<b>4.9 Teste de atividade em formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>4.10 Análise Estatística. ....</b>	<b>47</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>5.1 Produção de compostos antimicrobianos por bactérias.....</b>	<b>49</b>
5.1.1 Atividade antagonista contra bactérias.....	52
5.1.2 Atividade antagonista contra <i>Candida</i> sp.....	56
5.1.3 Atividade antagonista contra <i>Leishmania</i> sp.....	59
5.1.4 Sobreposição do espectro de ação e perfil antagonista.....	63
<b>5.2 Avaliação da inibição de formas promastigotas de <i>Leishmania</i> sp.....</b>	<b>64</b>
<b>5.3 Avaliação do meio de cultura na produção de composto antagonista.....</b>	<b>68</b>
<b>5.4 Efeito inibitório do extrato bacteriano proveniente da melhor condição de</b>	



<b>cultivo.....</b>	<b>72</b>
<b>5.5 Precipitação proteica das amostras na melhor condição de cultivo. ....</b>	<b>75</b>
<b>5.6 Avaliação da toxicidade em macrófagos e testes em amastigotas. ....</b>	<b>81</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>85</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>87</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>90</b>
<b>9 APÊNDICE .....</b>	<b>107</b>
<b>10 ANEXOS.....</b>	<b>142</b>

# Introdução

---

# 1 INTRODUÇÃO

O fenômeno da resistência microbiana associada às terapias convencionalmente utilizadas na prática clínica tem despertado preocupação na comunidade científica. Sem dúvida, os antibióticos foram a grande conquista do século XX e mudaram a forma de lidar com as doenças infecciosas graves, melhorando a qualidade de vida dos pacientes e sua sobrevivência. No entanto, o uso abusivo dos mesmos na saúde humana e animal, contribuiu para a disseminação de genes de resistência no ambiente e entre os organismos. Atualmente, segundo a Organização Mundial de Saúde, estamos entrando na chamada era pós-antibiótica, onde infecções comuns, de pouca injúria, que foram tratadas com sucesso por décadas, podem novamente vir a causar mortes.

Associado a isso, o arsenal terapêutico utilizado no tratamento de algumas patologias é considerado caro, de tempo prolongado e com elevada toxicidade celular, o que impulsiona cada vez mais a busca por novos agentes antimicrobianos. Nos últimos anos, estudos globais de prospecção de moléculas bioativas em organismos procariotos e eucariotos têm sido realizados, com relatos na literatura científica sobre o isolamento e caracterização de substâncias de ação antimicrobiana diversa.

Dentre as moléculas bioativas os peptídeos antimicrobianos vêm ganhando destaque, por serem considerados uma forma altamente organizada de sistema de defesa de organismos procariotos e eucariotos, unicelulares e pluricelulares, como fungos, plantas, invertebrados, anfíbios, peixes, aves e mamíferos, incluindo o homem.

No que se refere à microbiologia, existe na literatura científica uma diversidade de trabalhos sobre peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias, com atividade contra espécies bacterianas filogeneticamente relacionadas ou não, substâncias estas chamadas bacteriocinas. O estudo destas substâncias mostra a possibilidade do seu uso na medicina como antibióticos tópicos, além do uso como conservadores de alimentos, o que já é uma realidade. No entanto, estudos que avaliem o potencial antagonista destes e de outros

peptídeos bacterianos frente a organismos como fungos e protozoários ainda são escassos.

Programas de incentivo e fomento a pesquisas nacionais vem sendo conduzidos no sentido de se estudar doenças que são consideradas pela Organização Mundial de Saúde "negligenciadas", devido ao grande número de pessoas infectadas vivendo principalmente em áreas tropicais e regiões de pobreza. Entretanto, muitas vezes, não existe o interesse das grandes corporações farmacêuticas na pesquisa e desenvolvimento de novas drogas, visto que as mesmas não representam retorno financeiro. Ressalta-se que menos de 1% do arsenal terapêutico dos últimos 30 anos foi direcionado para o tratamento das doenças tropicais negligenciadas. As leishmanioses, incluídas neste cenário, têm como reflexo o número limitado de drogas disponíveis para tratamento e falhas de políticas públicas sítio-dirigidas.

O tratamento de primeira linha para leishmaniose, os antimoniais pentavalentes, são utilizados há mais de 60 anos e apresentam uma série de inconvenientes, os quais incluem a via parenteral, tempo longo de tratamento, eficácia diminuída, pelo aparecimento de protozoários resistentes isolados de espécimes clínicos, somado ao fato destes compostos causarem efeitos colaterais severos ao longo do tratamento.

Assim, considerando-se: (i) a importância de novas estratégias terapêuticas dirigidas ao tratamento de doenças infecto-parasitárias, em especial as leishmanioses, pelo limitado arsenal de drogas disponíveis; (ii) e a crescente resistência às drogas e estratégias terapêuticas disponíveis, observada em algumas regiões geográficas, foi proposto a prospecção de compostos antagonistas produzidas por bactérias, com ação anti-*Leishmania*, em uma parceria entre os Laboratórios de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana e o Núcleo de Pesquisa em Parasitologia (NUPEP) do ICB/UFJF.

# Revisão da Literatura

---

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (*antimicrobial peptides* - AMPs) são um grupo diverso de moléculas biológicas produzidas por uma variedade de organismos, tais como bactérias, fungos, plantas e animais (REDDY, YEDERY e ARANHA, 2004; JENSSEN, HAMILL e HANCOCK, 2006; BROGDEN e BROGDEN, 2011; HASSAN et al., 2012; GURALP et al., 2013; TAVARES et al., 2013).

Apresentam extrema diversidade em relação ao tamanho, estrutura e mecanismo de ação, mas no geral são moléculas pequenas (<10 KDa), que contém de 20 a 50 resíduos de aminoácidos, carregados positivamente e com alta anfipaticidade (BROWN e HANCOCK, 2006; TAVARES et al., 2008; SANG e BLECHA, 2012; PUSHPANATHAN, GUNASEKARAN e RAJENDHRAN, 2013; PAIVA et al., 2013). Podem ser expressos constitutivamente ou de forma induzida, endógena ou heteróloga, o que desperta o interesse biotecnológico desta molécula e a promessa de serem utilizados como alternativa aos antibióticos (SACHETTO-MARTINS et al., 2000; GUANÍ-GUERRA et al., 2010; HASSAN et al., 2012).

Alguns desses peptídeos têm ação antimicrobiana, o que pode sugerir que eles fazem parte da primeira linha de defesa de organismos, como animais e plantas, ou que conferem uma vantagem adaptativa à célula produtora, como em bactérias (ZASLOFF, 2002; MARSHALL e ARENAS, 2003; COX e WRIGHT, 2013). O principal mecanismo de ação dos AMPs é a formação de poros na membrana plasmática, apesar de já ter sido demonstrado outras formas de interação com a célula-alvo (CARVALHO, 2011; SANG e BLECHA, 2012).

Desde que Zasloff (1987) relatou a descoberta do primeiro AMP extraído da secreção da pele do sapo africano *Xenopus laevis*, peptídeo este chamado de magainina, diversos outros peptídeos vem sendo relatados na literatura, e aproximadamente 2730 AMPs de diferentes origens podem ser encontrados na base de dados <http://aps.unmc.edu/AP/main.php/> (WANG, LI e WANG, 2009;

GUANÍ-GUERRA et al., 2010; PUSHPANATHAN, GUNASEKARAN e RAJENDHRAN, 2013), mais de 5547 sequências de AMPs na base de dados *Lamp*, do termo em inglês *Linking Antimicrobials Peptides*, <http://biotechlab.fudan.edu.cn/database/lamp/>, sendo destes 3904 peptídeos naturais e 1643 peptídeos sintéticos (ZHAO et al., 2013; LAMP, 2016), e mais de 8164 sequências depositadas na base de dados <http://www.camp.bicnirrh.res.in/> (WAGHU et al., 2015) .

## **2.2 Características e classificação dos peptídeos antimicrobianos**

Os AMPs podem ser agrupados considerando-se diferentes características, tais como: o organismo produtor; o mecanismo de ação; características físico-químicas, como o tamanho, a estrutura secundária, hidrofobicidade e carga líquida; atividade antimicrobiana, dentre outras (Tabela 1) (BROGDEN, 2005; JENSSEN, HAMILL e HANCOCK, 2006; PUSHPANATHAN, GUNASEKARAN e RAJENDHRAN, 2013).

Apesar de várias características serem usadas na descrição dos AMPs, existem alguns trabalhos que consideram que as duas mais importantes seriam aquelas baseada na estrutura secundária do peptídeo e na carga líquida, características que afetam diretamente sua ligação à célula alvo e sugere seu mecanismo de ação (TAVARES et al., 2013).

Em relação a estrutura secundária, os peptídeos podem conter ou não pontes dissulfeto entre as cadeias polipeptídicas, que é o que vai defini-lo como sendo de estrutura estendida (estrutura primária linear), linear com  $\alpha$ -hélice (onde uma cadeia polipeptídica se enrola sobre ela mesma formando uma estrutura secundária), em formas de folhas  $\beta$  ou em alça (formas tridimensionais com pontes dissulfeto entre as cadeias polipeptídicas) (Figura 1) (JENSSEN, HAMILL e HANCOCK, 2006).

**Tabela 1.** Divisão dos peptídeos antimicrobianos

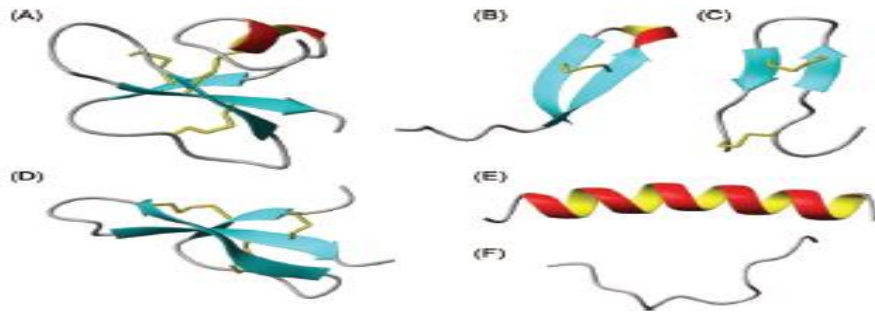
<b>Característica</b>	<b>Classificação</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Fonte</b>
<b>Estrutura da Molécula</b>	$\alpha$ -hélice	Magainina, cecropina	Zheng e Zheng, 2002
	Folhas $\beta$	$\beta$ -defensinas,	Zasloff, 2002
	Estrutura em alça	Dermaseptina	Vizioli e Salzet, 2003
	Peptídeo estendido	Tanatina, gramicidina Indolicidina, histatina	Andreu e Rivas, 1998 Rokitskaya et al., 2011
<b>Carga líquida</b>	Catiônicos	Defensinas, Catelicidina	Nakajima et al., 2001
	Não- catiônicos	Secretolitina, dermicidina	Schittek et al., 2001
<b>Organismo produtor</b>	Procariotos	Nisina, microcina	Brumfitt et al., 2002
	Insetos	Drosomicina, melitina	Kamysz, Okrój e Lukasiak, 2003
	Plantas	Tionina	Castro e Fontes, 2005
	Humanos	$\alpha$ e $\beta$ -Defensinas	Jensen, Hamill e Hancock, 2006
	Sapos	Magainina, dermaseptina	Rinaldi et al., 2002
<b>Mecanismo de ação</b>	Ação na membrana	Defensinas, magainina	Brown e Hancock, 2006
	Ação intracelular	Histatina, lactoferrina	Chen e Harrison, 2007
<b>Atividade antimicrobiana</b>	Antibacteriana	Mersacidina, nisina	Brogden, 2005
	Antiparasitária	Bombina, temporina A e B	Alberola et al., 2004
	Antifúngica	Calipeltina A, discodermina	Barbault et al., 2003
	Antiviral	Lactoferrina, dermaseptina	Belaid et al., 2002

Adaptado de PUSHPANATHAN, GUNASEKARAN e RAJENDHRAN, 2013

Em relação a carga líquida do peptídeo, os resíduos de aminoácidos presentes na molécula caracterizam o peptídeo como catiônico ou aniônico (MARSHALL e ARENAS, 2003).

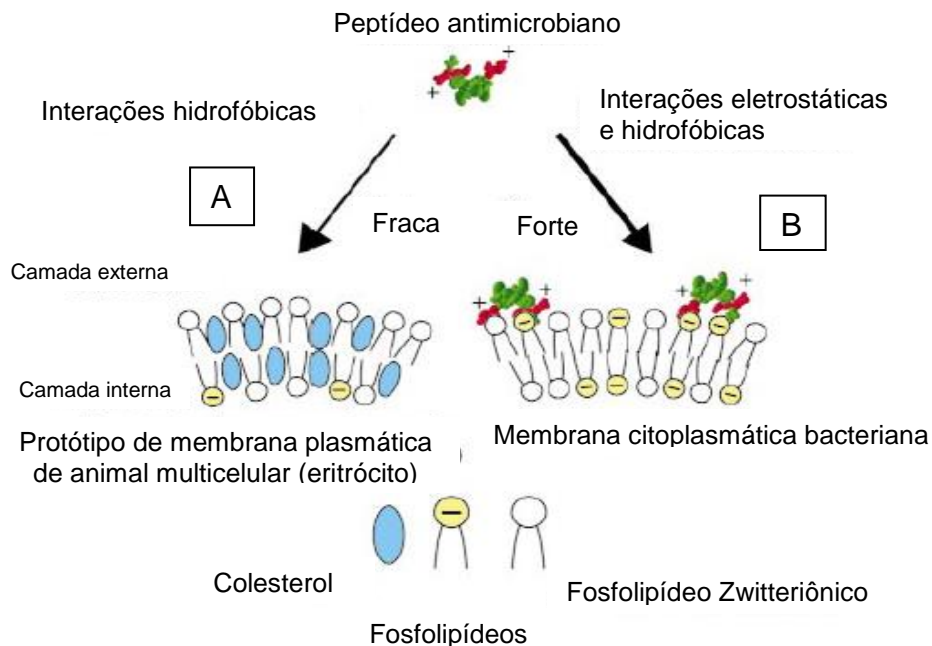
A determinação das características físico-químicas dos AMPs permite não só uma compreensão das suas propriedades bioquímicas, mas também o delineamento de sua especificidade celular, onde sua capacidade de permeabilizar seletivamente as membranas irá sugerir o seu mecanismo de ação (ZASLOFF, 2002).





**Figura 1.** Estrutura dos peptídeos antimicrobianos segundo conformação da molécula. (A) e (D)- peptídeo em folha  $\beta$ ; (B) e (C)- peptídeo em alça ou grampos; (E)-  $\alpha$ -hélice e (F)-estendido. **Fonte:** JENSSEN, HAMILL e HANCOCK, 2006.

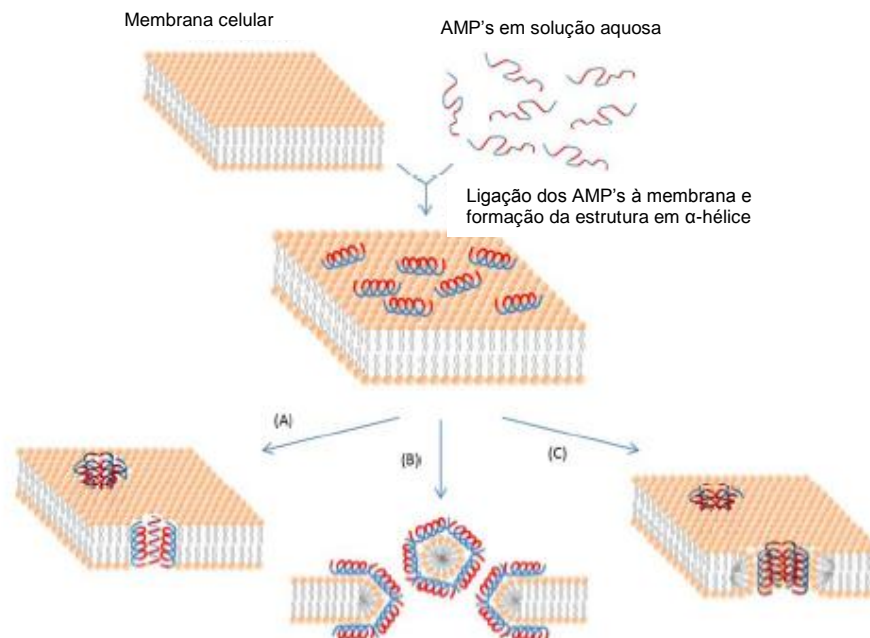
Quando o peptídeo tem estrutura catiônica, com resíduos de aminoácidos como arginina e prolina, por exemplo, sabe-se que a interação com a membrana plasmática de células procariotas torna-se mais fácil, uma vez que esta é carregada negativamente. Já a membrana de organismos multicelulares se ligue com interações fracas aos lipídios de membrana (figura 2) (ZASLOFF, 2002).



**Figura 2.** Interação dos peptídeos antimicrobianos segundo composição lipídica da membrana celular. (A) organismos multicelulares eucariotas e (B) organismo procarionte. **Fonte:** ZASLOFF, 2002.

### 2.3 Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos

O principal mecanismo de ação descrito para os AMPs é a ação na membrana plasmática (JENSSEN, HAMILL e HANCOCK, 2006; BROGDEN e BROGDEN, 2011; PUSHPANATHAN, GUNASEKARAN e RAJENDHRAN, 2013). Os AMPs podem interagir com as membranas de três diferentes maneiras: modelo carpete, modelo em barril e modelo de poro toroidal (Figura 3) (BROGDEN, 2011; PAIVA et al., 2012; PUSHPANATHAN, GUNASEKARAN e RAJENDHRAN, 2013; BAHAR e REN, 2013; TAVARES et al., 2013).



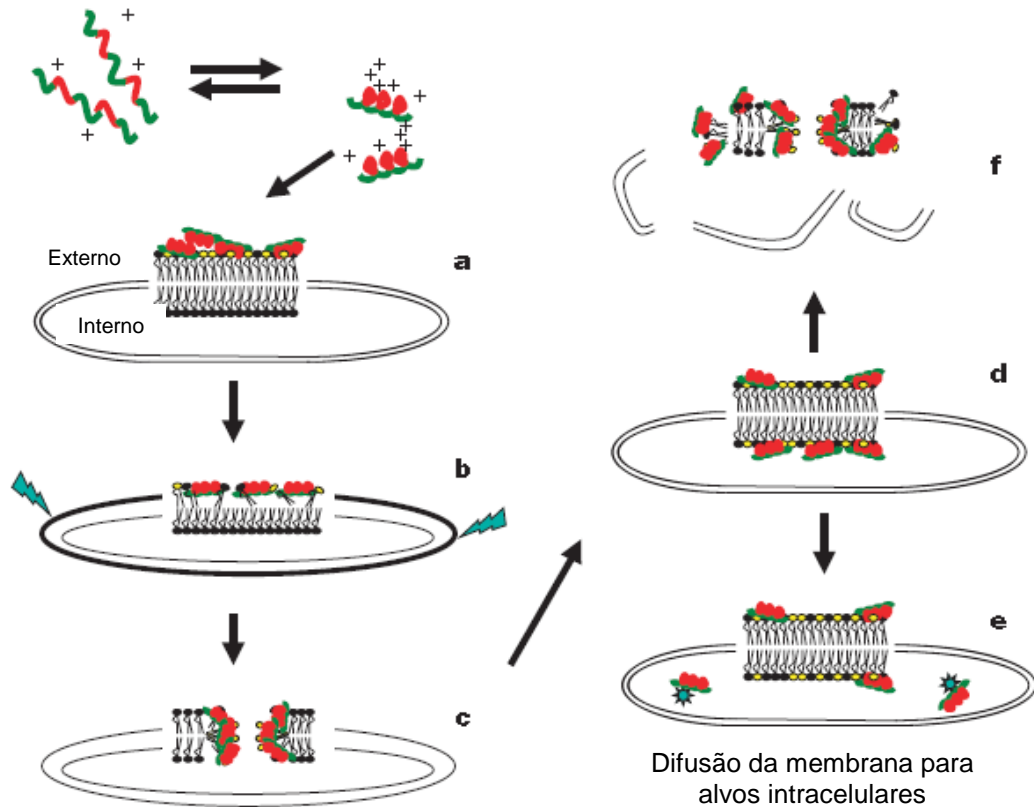
**Figura 3.** Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos na membrana plasmática. Em azul a parte hidrofóbica do peptídeo e em vermelho a parte hidrofílica do peptídeo. (A)- modelo em barril; (B)- modelo carpete; (C)- modelo de poro toroidal. **Fonte:** BAHAR e REN, 2013.

- **Modelo carpete:** Este modelo é usado para definir o mecanismo de ação onde os peptídeos se acumulam na superfície da membrana, de maneira tal que, quando observados, se assemelham a um carpete (TAVARES et al., 2013). Os peptídeos interagem eletrostaticamente com grupos aniônicos

cobrindo a superfície da membrana e, dependendo da concentração, isto é, em altas concentrações de peptídeo, eles podem romper a membrana lipídica de uma forma semelhante a um detergente, eventualmente levando a formação de micelas (DE PAULA, 2010).

- **Modelo em Barril:** O modelo tipo barril descreve o mecanismo de ação onde os peptídeos se ligam e agregam à membrana pelas regiões hidrofóbicas do peptídeo que interagem com o núcleo lipídico da membrana. A face hidrofílica fica voltada para o lúmen do poro, formando uma estrutura parecida com um barril, onde o centro do barril é formado pelas regiões hidrofílicas do peptídeo (ZHANG, ROZEK e HANCOCK, 2001).
- **Modelo de Poro Toroidal:** No modelo de poro toroidal, os peptídeos antimicrobianos se alinham perpendicularmente à estrutura da bicamada e a parte polar do peptídeo se associa com as cabeças polares dos lipídios, e suas regiões hidrofílicas ficam voltadas para o poro (BROGDEN, 2005). O modelo de poro toroidal difere do modelo em barril, porque os peptídeos estão sempre associados com as cabeças polares dos lipídios de membrana e não pela parte apolar, mesmo quando eles estão perpendicularmente inseridos na bicamada (DE PAULA, 2010).

De maneira geral, estes mecanismos propostos não interferem somente na permeabilidade seletiva e no transporte de nutrientes da célula. Em procariotos, onde a membrana desempenha várias funções, como a respiração celular, biossíntese da parede celular, de ácidos nucleicos e a secreção de proteínas, danos gerados nesta estrutura podem comprometer todo o metabolismo celular, a força próton motora, a cadeia transportadora de elétrons e por consequência a geração de ATP, resultando muitas vezes na morte da célula alvo (figura 4) (BAHAR e REN, 2013; FALICO, 2014).



**Figura 4.** Modelo Shai-Matsuzaki-Huang de mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos. A, B, C, F- interação com danos na membrana; D, E- interação na membrana com danos intracelulares. **Fonte:** ZASLOFF, 2002.

Segundo Cézard e colaboradores (2011), os mecanismos de ação propostos vão se diferenciar, em suma, pela etapa de ligação e inserção do peptídeo, onde ligações eletrostáticas iniciais não específicas direcionam a ancoragem do AMP. Os autores citam como exemplo a ligação de um peptídeo catiônico na membrana de uma bactéria Gram-negativa, onde a ligação vai ocorrer via grupamentos fosfatos aniônicos da camada de lipopolissacarídeos da membrana externa (LPS). Já em bactérias Gram-positivas a ligação ocorreria a partir da superfície do grupo de ácidos teicóicos presentes no peptidoglicano.

Alguns autores sugerem que mesmo se o mecanismo de ação do peptídeo for um alvo intracelular, uma interação inicial com a membrana da célula é

requerida para a atividade antimicrobiana do peptídeo, de maneira que esta interação determina o espectro de alvos celulares (Figura 4). Além disto, a interação eletrostática não termina na fase inicial de ligação. A parte hidrofóbica do AMP ajuda a inserir a molécula dentro da membrana celular, como já mostrado na Figura 3 (BAHAR e REN, 2013).

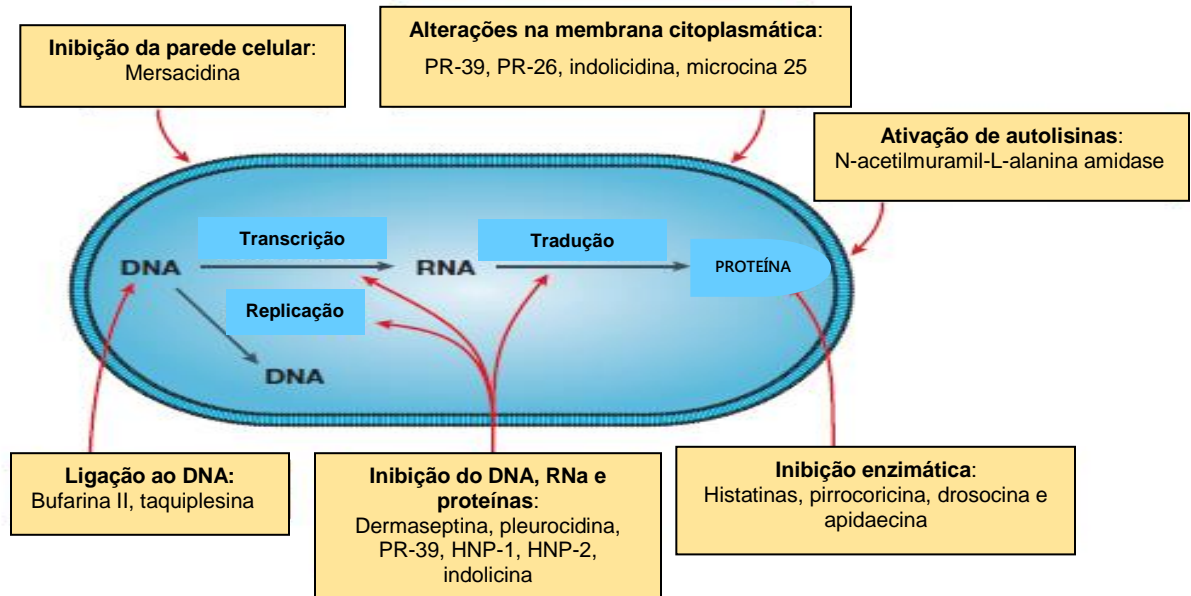
Além destes mecanismos de ação para os AMPs já descritos, com ação na superfície celular, foram relatados também outros mecanismos de interação destas substâncias com estruturas intracelulares, tanto em procariotos quanto em eucariotos. Neste sentido, acredita-se que os AMPs possam interagir também com proteínas, DNA, RNA, mitocôndria, peptidoglicano, glicocálice, lisossomo, dentre outros (BROGDEN, 2005; JENSSEN, HAMILL e HANCOCK, 2006; CHEN e HARRISON, 2007; TORRENT et al., 2012; BAHAR e REN, 2013).

Peptídeos antimicrobianos, como buforinas, dermaseptinas, HNP-1, pleurocidina, indolicidina, pirrocidina e mersacidina, são exemplos de moléculas que atravessam a membrana celular e inibem processos celulares essenciais, enquanto peptídeos como a melitina, histatina, papiliocina e lactoferrina exercem o seu papel antimicrobiano pela formação de espécies reativas de oxigênio (PUSHPANATHAN, GUNASEKARAN e RAJENDHRAN, 2013).

Outro peptídeo encontrado na saliva humana, a histatina 5 (Hst5), tem como alvo a mitocôndria fungos e de parasitos, como *Leishmania* sp., induzindo a alterações mitocondriais e colapso bioenergético (ORTEGA et al., 2008). Trabalhos realizados com AMPs catiônicos  $\alpha$ -hélice mostraram-se efetivos na ligação e destruição da membrana de lisossomos celulares (TORRENT et al., 2012). Este mesmo grupo de pesquisa também já evidenciou ativação da via das caspases e morte do organismo por apoptose.

Danos intracelulares como a inibição do DNA e da síntese proteica foram pesquisados por Nicolas (2009) que concluiu que mesmo quando o dano é intracelular é mediado ou passa pela membrana citoplasmática, que pode levar a maior ou menor translocação do peptídeo dependendo dos resíduos de aminoácidos presentes nele. Outros alvos intracelulares, como a inibição de proteases do hospedeiro, já tinham sido evidenciados em 1991 por Nishikata e

colaboradores para o peptídeo histatina de saliva humana. Em 2005, Brogden relatou a interação de diferentes peptídeos em alvos bacterianos de *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, entre outros, com ação em autolisinas e fosfolipases, alteração na formação do septo, inibição da síntese protéica e de ácidos nucleicos (Figura 5).



**Figura 5.** Modo de ação extracelular e intracelular de peptídeos antimicrobianos usando *Escherichia coli* como célula alvo. **Fonte:** BROGDEN, 2005.

Segundo Reddy e colaboradores (2004), além da formação de canal iônico, peptídeos como a seminalplasma, isolada a partir do plasma seminal de bovinos, levam a ativação de moléculas da cascata de autólise celular em bactérias. Segundo estes autores, outros peptídeos como PP-39 e apidaecina mostraram-se efetivos na morte bacteriana pela degradação de proteínas requeridas no processo de replicação do DNA, bem como no transporte e metabolismo energético da célula bacteriana.

## 2.4 Peptídeos antimicrobianos como ferramentas terapêuticas potenciais

O comportamento de microrganismos frente às drogas antimicrobianas tem despertado o interesse de pesquisadores em todo o mundo a compreender melhor este fenômeno, e muitos trabalhos são publicados na literatura científica sobre a interação droga- microrganismo- resistência (WRIGHT, 2010; COX e WRIGHT, 2013; MISHRA et al., 2013; ANDERSSON, HUGHES E KUBICEK-SUTHERLAND, 2016).

Estudos sobre o resistoma microbiano tem contribuído para uma melhor compreensão da interação do ambiente e da pressão seletiva sobre a modulação da expressão gênica e manutenção desses genes de resistência nos reservatórios naturais, tais como o solo (TAVARES et al., 2013).

Mesmo com os avanços da biologia molecular na compreensão do fenômeno da resistência microbiana, o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas ainda se faz necessário. Substâncias que tenham novos sítios-alvo, diferentes mecanismos de ação e que sejam menos tóxicas para a célula do hospedeiro, diminuindo assim alguns efeitos colaterais indesejados, vem sendo desenvolvidas (DENNISON, HARRIS e PHOENIX, 2007). E é neste cenário que surgem os estudos de prospecção de peptídeos antimicrobianos.

Uma ferramenta molecular que otimizou o estudo do resistoma microbiano foi o uso da metagenômica, que mostra uma relação direta e indireta da presença de cassetes de genes de resistência em bactérias não patogênicas do solo (RIESENFELD et al., 2004). Além disso, estudos metagenômicos tem sido usado para identificação de genes que codificam AMPs e também para predição, por programas como o AMPPred, que fazem inferências baseadas em similaridade (CASTRO, FERNANDES e FRANCO, 2014).

Vários AMPs têm se mostrado eficientes contra microrganismos multirresistentes, os chamados MDRs, sigla do termo em inglês *multi-drug resistant*, e com menor propensão ao desenvolvimento de resistência, provavelmente em função do peculiar mecanismo de ação a que eles estão

envolvidos, que é diferente daqueles amplamente conhecidos das drogas utilizadas no tratamento de doenças infecciosas (TAVARES et al., 2013).

De modo geral, vários trabalhos vem relatando o potencial de uso dos AMPs como uma nova opção terapêutica, destacando seu papel antiviral, antifúngico, antibacteriano e antiparasitário (BROGDEN, 2005; JENSSEN, HAMILL e HANCOCK, 2006; SANG e BLECHA, 2008; McGWIRE e KULKARNI, 2010; COBB e DENNY, 2010; GUANÍ-GUERRA et al., 2010; SILVA e MACHADO, 2012; TORRENT et al., 2012; BAHAR e REN, 2013; FARUCK, YUSOF e CHOWDHURY, 2015).

#### 2.4.1 Atividade Antibacteriana

Vários AMPs produzidos por células eucariotas também tem como alvo células bacterianas. Magainina, cepropina A, melitina, indolicidina, buforina II, PR-39, LL-37, polifemusina são exemplos de peptídeos produzidos por anfíbios, abelhas, células da imunidade inata do homem e por suínos, que atuam induzindo a desestabilização da membrana, conexão aos ácidos nucléicos, o que pode levar à inibição do DNA, RNA e proteínas, e afeta o metabolismo do cálcio (JENSSEN et al., 2006, TAVARES et al., 2013).

De particular importância são as interações competitivas entre os membros de uma comunidade microbiana, por meio da produção de substâncias que inibem o crescimento de outros microrganismos (JACK et al., 1995; PESCHEL e SAHL, 2006). Estas substâncias incluem produtos finais do metabolismo, como ácidos e peróxido de hidrogênio, antibióticos clássicos, como bacitracina e polimixina B, que são sintetizadas por complexos multienzimáticos, enzimas bacteriolíticas semelhantes à lisozima, e um grupo de substâncias antagonistas conhecidas como bacteriocinas (JENSSEN, HAMILL e HANCOCK, 2006).

O primeiro relato documentado sobre a produção de um agente antibiótico por bactéria foi publicado em 1925, por Gratia, ao observar que uma amostra de *Escherichia coli* produzia, em meio líquido de cultura, uma substância termoestável e dializável, capaz de inibir, em baixas concentrações, o crescimento



de outra amostra da mesma espécie. Em 1946, este agente antibiótico recebeu de Gratia e Frederic, o nome genérico de “colicina” (MAYR-HARTING et al., 1972).

Assim surgiu o termo “bacteriocina”, para designar AMPs produzidos por bactérias e que atuam contra outras bactérias, inibindo ou interagindo com espécies correlacionadas (curto espectro de ação) ou não (amplo espectro de ação) (SANG e BLECHA, 2008).

Desde então, novas bacteriocinas e substâncias bacteriocina-like foram relatadas na literatura (CLEVELAND et al., 2001; GILLOR et al., 2005; APOLÔNIO et al., 2008). Embora já tenha sido descrita a produção de bacteriocinas por muitas bactérias tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas, as mais estudadas são bacteriocinas produzidas por bactérias ácido-lácticas (LAB) e as colicinas, as quais já estão bem caracterizadas em relação às propriedades bioquímicas e modo de ação (GILLOR et al., 2005; CASCALES et al., 2007). Peptídeos catiônicos lineares em  $\alpha$ -hélice e em folhas  $\beta$  também tem sido relatado na literatura, e exibem efeito tanto contra bactérias Gram-positivas, quanto Gram-negativas (JENSSEN, HAMILL e HANCOCK, 2006).

A maioria das bacteriocinas apresenta em comum uma fração protéica em sua molécula, sintetizada no ribossomo (PAIVA et al., 2012). Estas substâncias são geralmente codificadas por genes localizados em plasmídios, que podem ser transferidos para outros microrganismos por mecanismos de recombinação bacterianos. Entretanto, já foram descritas algumas bacteriocinas que tem seus genes localizados no cromossomo, como, por exemplo, a produzida por *Serratia marcescens*. Geralmente, o operon das bacteriocinas codifica três proteínas: a bacteriocina, a proteína imune e a proteína liberadora de bacteriocina (VAN DER WAL et al., 1995).

Pouco se conhece sobre os fatores que influenciam a produção de bacteriocinas na natureza. Em alguns casos, não há bacteriocina detectável antes da indução e, em outros casos, a indução aumenta o nível de substância produzida (MAYR-HARTING et al., 1972). Konisky, em 1978, observou que, apesar de muitos estudos descreverem condições para otimização da produção de

bacteriocinas em culturas puras, estes eram muito empíricos e pouco esclareciam sobre a biossíntese destas substâncias.

Alguns dos fatores que, reconhecidamente, podem influenciar na produção de bacteriocinas *in vitro* são: pH, potencial de oxi-redução, temperatura, composição do meio de cultivo e fase de crescimento do microrganismo. Com relação à composição do meio de cultura, geralmente a produção é maior em meios complexos que em meios mais simples, havendo, contudo, exceções. No entanto, as proteínas presentes nestes meios podem apresentar características semelhantes às bacteriocinas, confundindo-se com estas. Além disso, as bacteriocinas produzidas em meio sólido podem não o serem em meios líquidos, e a produção pode não ser constante (MAYR-HARTING et al., 1972).

O mecanismo de ação das bacteriocinas, de modo geral, pode ser dividido em três etapas: a de ligação a receptores específicos no envelope celular; o transporte das moléculas de bacteriocinas através da membrana externa, ou, em alguns casos, via membrana citoplasmática; e a morte celular, via alterações bioquímicas específicas (RILEY e WERTZ, 2002). No entanto já foram verificados mecanismos de ligações dessas substâncias à membrana de modo inespecífico e sem ligação à receptores (PAIVA et al., 2012).

#### 2.4.1.1 Bacteriocinas de bactérias Gram-negativas

Bacteriocinas de bactérias Gram-negativas foram as primeiras caracterizadas em detalhe. As mais conhecidas destas são as colicinas, produzidas por *E. coli* (RILEY e WERTZ, 2002; GILLOR et al., 2005; CASCALES et al., 2007). As colicinas constituem um grupo diverso de proteínas antibacterianas. São proteínas grandes e complexas, de 29-90 kDa, com domínios estruturais característicos envolvidos no ataque às células-alvo, translocação e atividade reconhecidamente bactericida (RILEY e GORDON, 1999; RILEY e WERTZ, 2002; KIM, TARR e PENFOLD, 2014) e, geralmente, não sofrem nenhum processamento pós-tradução, com exceção daquelas que perdem o resíduo de metionina N-terminal.

De acordo com o mecanismo de liberação da célula produtora, as colicinas são divididas em dois grupos, A e B. Em geral, colicinas do grupo A são liberadas no meio, enquanto as colicinas do grupo B não são secretadas. Entretanto, algumas colicinas que normalmente pertencem a um grupo podem apresentar homologia com colicinas do outro grupo, como é o caso das colicinas 5 e 10. Existem duas classes de plasmídeos colicinogênicos (pCol): tipo I e tipo II. Os plasmídeos tipo I são pequenos, de 6 a 10kb, presentes nas células em número de aproximadamente 20 cópias. Estes podem ser amplificados e são mobilizáveis na presença de plasmídeos conjugativos. Codificam, principalmente, colicinas do grupo A e têm sido largamente utilizados na engenharia genética e biotecnologia (CASCALES et al., 2007).

Os plasmídeos tipo II são grandes plasmídeos de cópia única, de, aproximadamente, 40kb, e codificam, usualmente, colicinas do grupo B. São conjugativos e promovem a transferência horizontal do material genético entre a célula doadora e receptora (CASCALES et al., 2007; GILLOR et al., 2005).

De modo geral, a ação das colicinas pode acontecer por dois mecanismos: formação de poros na membrana, provocando a dissipação do seu potencial eletroquímico, perda de íons e outros componentes celulares, e por atividade enzimática de endonucleases, degradando DNA cromossômico (DNAses), ou RNA (RNAses), com consequente inibição da síntese protéica (CASCALES et al., 2007).

A proteína de imunidade das colicinas formadoras de poros está localizada na membrana interna da célula produtora, bloqueando a ação de colicina, sendo secretada de forma independente da colicina. Em contraste, a proteína de imunidade das colicinas com mecanismo de ação de nucleases é sintetizada no citoplasma e forma complexos com a colicina, neutralizando sua atividade catalítica. É este complexo que é liberado e só se dissocia durante a ação da colicina na célula sensível (BRAUN et al., 1994; KIM, TARR e PENFOLD, 2014).

Os genes envolvidos na produção das colicinas estão organizados em um operon que contém, em geral, três genes: o gene estrutural, um gene que codifica a proteína de imunidade e um gene que codifica a proteína responsável pela

secreção da colicina. A síntese da maioria das colicinas é controlada pelo sistema “SOS” de regulação, responsável pelo controle dos genes envolvidos em sua regulação e sua expressão pode ser induzida por situações de estresse celular (SANTOS, 2001).

Colicina codificada por cromossomos já foi relatada em *Serratia marcescens*, sendo umacolicina com bastante homologia a colicinas formadoras de poros. Neste caso, o gene estrutural da colicina não está associado aos genes das proteínas de imunidade e liberação, em contraste ao observado para as colicinas codificadas por plasmídeos (SOUSA et al., 2013).

Segundo Cotter e colaboradores (2013), o sistema de classificação para as bacteriocinas de Gram-negativos está dividido em dois grupos: o grupo das bacteriocinas pequenas, as microcinas, e o grupo das bacteriocinas grandes, as colicinas.

#### 2.4.1.2 Bacteriocinas de bactérias Gram-positivas

Bacteriocinas de bactérias Gram-positivas são abundantes e mais diversificadas quando comparadas àquelas encontradas em bactérias Gram-negativas (TAGG et al., 1976; GILLOR et al., 2005; PAIVA, 2007).

Por definição, como mencionado, as bacteriocinas tem como componente essencial para sua atividade uma proteína ou um peptídeo. Embora as bacteriocinas de algumas bactérias Gram-positivas sejam de alto peso molecular e termolábeis, as descritas até o momento são, em sua maioria, pequenos peptídeos catiônicos, termoestáveis, estruturalmente bem diferentes das colicinas (GILLOR et al., 2005).

As bacteriocinas de bactérias Gram-positivas melhor estudadas pertencem ao grupo de bactérias de ácido láctico (LAB). Estas moléculas são formadas, inicialmente, como pré-peptídeos que, após sofrerem processamento e serem separados do peptídeo líder, formam a molécula biologicamente ativa. Parece que a função da seqüência líder N-terminal é impedir que a bacteriocina tenha atividade

dentro da célula produtora, além de ser um sinal de reconhecimento para o sistema de transporte (NES et al., 1996; OGAKI, FURLANETO e MAIA, 2015).

Assim como relatado para classificação de bacteriocinas de Gram-negativos, o sistema de classificação dessas moléculas bioativas em Gram-positivos também mudou. Na classificação mais atual, de Cotter et al. (2013), as bacteriocinas de Gram-positivos foram separadas das bacteriocinas de Gram-negativos, sendo que as bacteriocinas de Gram-positivos foram agrupadas apenas nas classes I e II, sendo excluídas as classes III e IV. Na classe I, ficaram os peptídeos modificados, isto é, peptídeos que sofrem extensas modificações pós-traducionais. Na classe II, temos os chamados peptídeos não-modificados/cíclicos, isto é, as bacteriocinas que não sofrem modificações e também as que sofrem modificações modestas, como a formação de pontes dissulfeto, a circularização ou a adição de N-formilmetionina. Neste grupo temos a subclasse IIa- tipo pediocina, a subclasse IIb- bacteriocinas de dois peptídeos, a subclasse IIc- peptídeos cíclicos e a subclasse IId- as bacteriocinas de único peptídeo, que contém serina (s) na região C-terminal, modificação pós-traducional tipo sideróforo, além dos peptídeos lineares e tipo não-pediocina (OGAKI, FURLANETO e MAIA, 2015).

Dentre as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas, destacam-se a nisina (*Lactococcus lactis* subsp *lactis*), as estafilococinas (*Staphylococcus* sp) e as enterococinas (*Enterococcus* sp).

A produção de bacteriocinas em bactérias Gram-positivas é, geralmente, associada com a transição de crescimento do microrganismo da fase logarítmica para a estacionária, não sendo necessário induzir sua produção (JACK et al., 1995; RILEY e WERTZ, 2002).

#### 2.4.2 Atividade Antifúngica

A incidência de infecções oportunistas por leveduras tem se tornado cada vez mais crescente. Isso pode estar relacionado a fatores como a maior agressividade no tratamento de neoplasias, transplante de órgãos, síndrome da

imunodeficiência adquirida (AIDS), tuberculose e antibioticoterapia prolongada. O gênero *Candida* se destaca neste contexto por se tratar de uma levedura pertencente à microbiota residente do ser humano e, uma vez instalada uma situação de desequilíbrio da microbiota, *Candida* pode causar infecções oportunistas de difícil tratamento (MACÊDO et al., 2009).

O desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de micoses graves causadas por *Candida* sp. busca moléculas que possam interagir com a célula fúngica de forma seletiva, sem interferências à célula do hospedeiro. Neste sentido, a parede celular fúngica é um bom alvo de ação, já que é essencial para a sobrevivência do fungo e não está presente nas células humanas (PEREZ e RIBAS, 2004).

A parede celular do fungo é constituída de resíduos de N-acetilglucosamina  $\beta$ 1-4 ligados, formando a quitina, estrutura responsável pela rigidez e forma da célula. Quando a síntese da quitina é interrompida, a parede celular torna-se desorganizada e a célula fúngica sofre deformações e instabilidade osmótica (FALICO, 2013).

Nos últimos anos, o conhecimento sobre os peptídeos antifúngicos vem aumentando e vários mecanismos de ação tem sido proposto além da interferência em membrana. O uso do peptídeo Pn-AMP1, por exemplo, leva à despolarização da actina do citoesqueleto e a lise da parede celular. Danos na mitocôndria também já foram relatados com o uso de histatina. A ação da cecropina leva a sua ligação ao ergosterol/ colesterol de membrana e sua desestabilização e a lise desta já foi relatada pela magainina e brevinina-1 (JESSEN et al., 2006).

#### 2.4.3 Atividade Antiparasitária

Dentre as infecções parasitárias, as leishmanioses, que são doenças causadas pelo parasita protozoário *Leishmania* sp., são responsáveis por um grande problema de saúde pública mundial (OPAS, 2008).

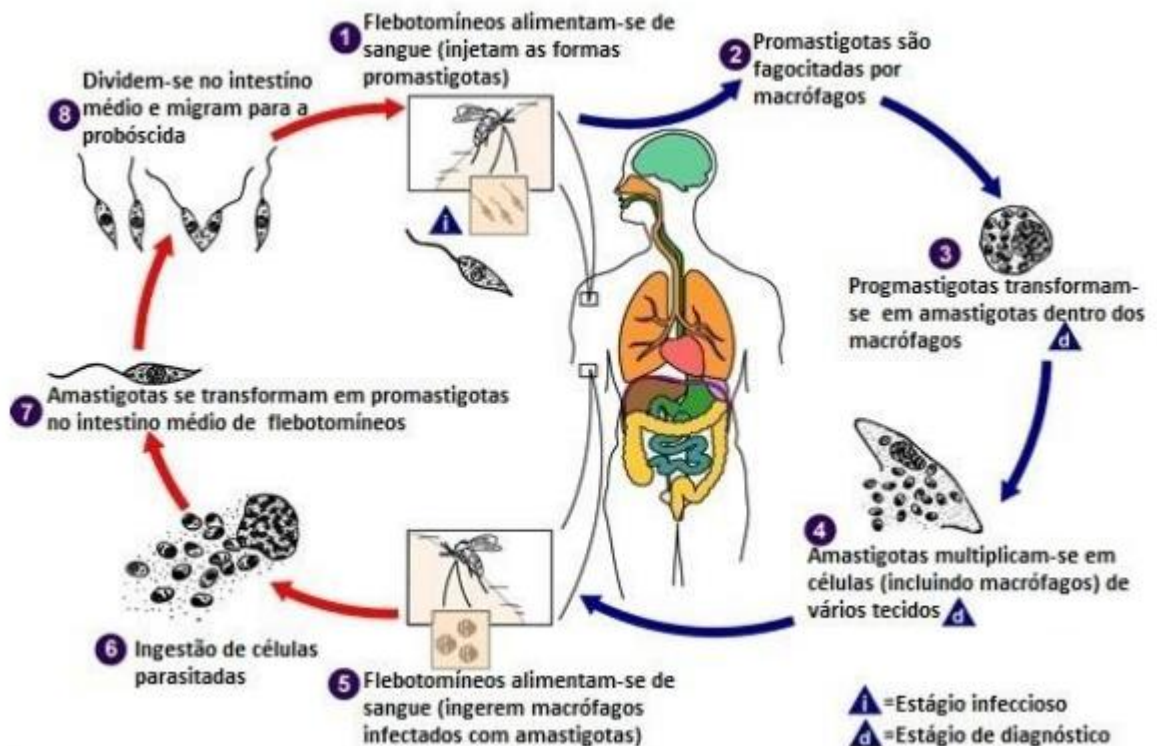
Acredita-se que mais de 20 espécies de *Leishmania* podem infectar o homem e uma das características marcantes para estas doenças é a grande variedade de sinais clínicos. Classicamente, elas podem ser sub-divididas em duas manifestações clínicas: leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral. A primeira inclui manifestações cutâneas ou de mucosa; a segunda acomete órgãos como baço, fígado e medula óssea e é considerada como a forma mais grave da doença, sendo fatal se não tratada (SANTOS et al., 2008; CRUZ et al., 2009). A patogênese das leishmanioses, suas manifestações clínicas e o curso da infecção são dependentes de complexas interações entre a virulência das diferentes espécies do gênero e a resposta imunológica mediada por células do hospedeiro (DEANE, 1985; GRIMALDI et al., 1993).

Estima-se que aproximadamente 12 milhões de indivíduos estejam infectados com esta parasitose e a incidência anual é de 2 milhões de novos casos, com 350 milhões vivendo em áreas de risco (WHO, 2010). No continente americano, o Brasil constitui o país de maior incidência da doença, e dados recentes mostram que nos últimos 20 anos estas doenças vêm apresentando franco crescimento em todas as regiões do Brasil, tanto no número de casos como em expansão geográfica, observando-se um aumento no número de surtos epidêmicos (BRASIL 2013a, b).

A partir de 2003, foi confirmada a autoctonia da leishmaniose tegumentar em todos os estados brasileiros, e o número de casos confirmados tem variado de 20.000 a 30.000 anuais, sendo que no ano de 2015 foram registrados 20.187 casos (Ministério da Saúde, DATASUS 2016a).

No caso da leishmaniose visceral, os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a periurbanização e a urbanização da doença, destacando surtos ocorridos em várias capitais brasileiras, incluindo Belo Horizonte (MG) e outras cidades de médio a grande porte nas várias regiões brasileiras (BRASIL 2013a, b). O número de casos tem variado entre 2.000 a 4.000 novos casos anualmente, sendo que em 2015 foram notificados 3.319 casos de leishmaniose visceral (Ministério da Saúde, DATASUS 2016b). Estes dados alarmantes reforçam o grande desafio ainda a ser vencido para o controle destas doenças.

Apesar do grande número de espécies de *Leishmania* que podem infectar o homem, todas têm um ciclo similar, consistindo de uma forma imóvel do parasito, amastigota, encontrada no hospedeiro mamífero (parasitando células do sistema fagocítico) e a forma promastigota flagelada no inseto vetor (trato digestivo), as quais são transmitidas durante o repasto sanguíneo por espécies de flebotomíneos, principalmente aqueles pertencentes ao subgênero *Lutzomyia* nas Américas (Figura 6) (LAINSON e SHAWI., 1992; MONZOTE, 2009).



**Figura 6.** Ciclo de vida do parasito *Leishmania*, com fase promastigota no inseto vetor e fase amastigota intracelular em células fagocíticas do hospedeiro vertebrado. **Fonte:** Adaptado de CDC, 1998.

Desde 1940, os antimoniais pentavalentes vêm sendo os medicamentos de primeira escolha para o tratamento de todas as manifestações clínicas das leishmanioses (SANTOS et al., 2008; CRUZ et al., 2009; FRÉZARD et al., 2000, ELMAHALLAWY e AGIL 2015, WHO, 2016). Os antimoniais usados na clínica são



complexos de Sb<sup>+5</sup> com N-metil- D glucamina (antimoniato de meglumina ou Glucantime®) ou com gluconato de sódio (estibogluconato de sódio ou Pentostam®) (FRÉZARD et al., 2000). Estas drogas apresentam efeitos indesejáveis, tais como longo período de terapia, efetividade diminuída em alguns casos, sendo que a única forma de administração é a parenteral (SANTOS et al., 2008; CRUZ et al., 2009; FRÉZARD et al., 2000, ELMAHALLAWY e AGIL, 2015). A ineficácia deste tratamento é observada particularmente na co-infecção HIV-*Leishmania* (MONZOTE, 2009). Além disto, os antimoniais apresentam alto custo, girando em torno de 200 US\$ por paciente, o que é altamente dispendioso para o sistema de saúde pública de países em desenvolvimento (SUNDAR e RAI, 2002). É interessante também ressaltar que, apesar do longo tempo de uso clínico dos antimoniais e do avanço de técnicas para caracterização molecular, a estrutura exata destes compostos, o metabolismo e o mecanismo de ação ainda não estão bem esclarecidos (FRÉZARD et al., 2000).

Pentamidina e anfotericina B constituem as drogas de segunda escolha para o tratamento das leishmanioses, entretanto, ambas são muito tóxicas (MONZOTE, 2009, WHO 2016). Formulações lipídicas de anfotericina ou de antimoniais têm sido desenvolvidas no intuito de minimizar os efeitos tóxicos (SANTOS et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008; MONZOTE, 2009). Contudo, o alto custo limita o uso deste medicamento, principalmente em países mais pobres (SANTOS et al., 2008). Miltefosina, utilizado inicialmente como anticancerígeno, tem sido apresentado como o mais novo tratamento alternativo por via oral, utilizado com sucesso em pacientes imunocompetentes e imunossuprimidos (RICHARD e WERBOVETZ, 2010).

Além dos efeitos adversos, incluindo o potencial teratogênico, pesquisas realizadas na América Central e do Sul apontam variações de sensibilidade de espécies de *Leishmania* do Novo Mundo (TEMPONE et al. 2011).

Nas últimas duas décadas, vários trabalhos vêm sendo realizados na busca por AMPs com atividade leishmanicida (ALBEROLA et al., 2004; COBB e DENNY, 2010; McGWIRE e KULKARNI, 2010; TELLERIA et al., 2013; SOUZA et al., 2013).

O primeiro AMP descrito para *Leishmania* com implicação terapêutica foi a temporina A e B, um AMP com 13 aminoácidos, isolado da secreção cutânea de *Rana temporaria*, rã vermelha da Europa. Por ser um peptídeo pequeno e com o menor número de aminoácidos carregados positivamente (uma única lisina/arginina), Mangoni e colaboradores (2005) mostraram um efeito leishmanicida considerável pela ação do peptídeo que mantinha sua função biológica no soro. O mecanismo envolvido no efeito inibitório envolvia a permeação da membrana plasmática, o que levava ao rápido colapso do potencial de membrana, bem como a redução dos níveis de ATP intracelular e danos morfológicos na membrana do parasito (MANGONI et al., 2005).

Antes disso outros peptídeos já haviam sido isolados de anfíbios com efeito anti-parasitário, como a dermaseptina (FEDER, DAGAN e MOR, 2000), dermatoxina (AMICHE et al., 2000) e filoxina (PIERRE et al., 2000), da secreção cutânea da perereca *Phyllomedusa* sp., bombininas (MANGONI et al., 2007) isoladas de *Bombina* sp e mangainina (ZASLOFF, 1987) da secreção cutânea do anfíbio africano *Xenopus laevis*, todos demonstrando interações com a membrana do parasito. Além de anfíbios, AMPs com ação leishmanicida já foram extraídos de outros animais, como a gomesina extraída de hemócitos da aranha tarântula *Acanthoscurria gomesiana* (SILVA, DAFFRE e BULET, 2000).

Peptídeos sintéticos também vêm sendo estudados para leishmaniose canina, como o peptídeo acilado Oct-CA(1-7)-M(2-9), pesquisado por JENSSEN et al. (2006) e que tem ação na membrana do parasito de forma promissora.

Mais recentemente, Torrent e colaboradores (2012) mostrou o mecanismo de ação de diferentes peptídeos antimicrobianos contra os parasitos *Leishmania* e *Plasmodium*. A revisão realizada pelos autores evidencia não só o mecanismo de ação na membrana do parasito com dissipação do potencial de membrana e danos celulares, mas também o papel da proteases de membrana como a Gp63, no efeito protetivo contra AMPs.

Diante do exposto, e frente aos desafios atuais de contenção e tratamento de doenças infecto-parasitárias, percebe-se a necessidade de buscar por novas tecnologias ou opções para a terapêutica destes patógenos. A prospecção de

AMPs pode resultar em moléculas promissoras com potencial utilização na terapia destas doenças, em especial as leishmanioses, pelo limitado arsenal de drogas disponíveis.

# Objetivos

---

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Prospecção de peptídeos bacterianos extracelulares obtidos do extrato bruto com atividade anti- *Leishmania*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção de compostos bacterianos com atividade antagonista contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do ICB/ UFJF;
- Avaliar a produção de compostos bacterianos com atividade antagonista contra o crescimento do fungo leveduriforme, *Candida* sp.;
- Avaliar a produção de compostos no extrato bruto bacteriano com atividade antagonista contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania major* e *Leishmania chagasi*;
- Avaliar o espectro de ação dos compostos bacterianos que mostraram atividade antagonista contra bactérias, *Candida* e *Leishmania*;
- Selecionar amostras bacterianas que produziram compostos com atividade anti-*Leishmania* exclusivamente para caracterização parcial;
- Definir a fase de crescimento bacteriano na qual são produzidas compostos com a maior atividade antagonista contra formas promastigotas de *L. amazonensis*;

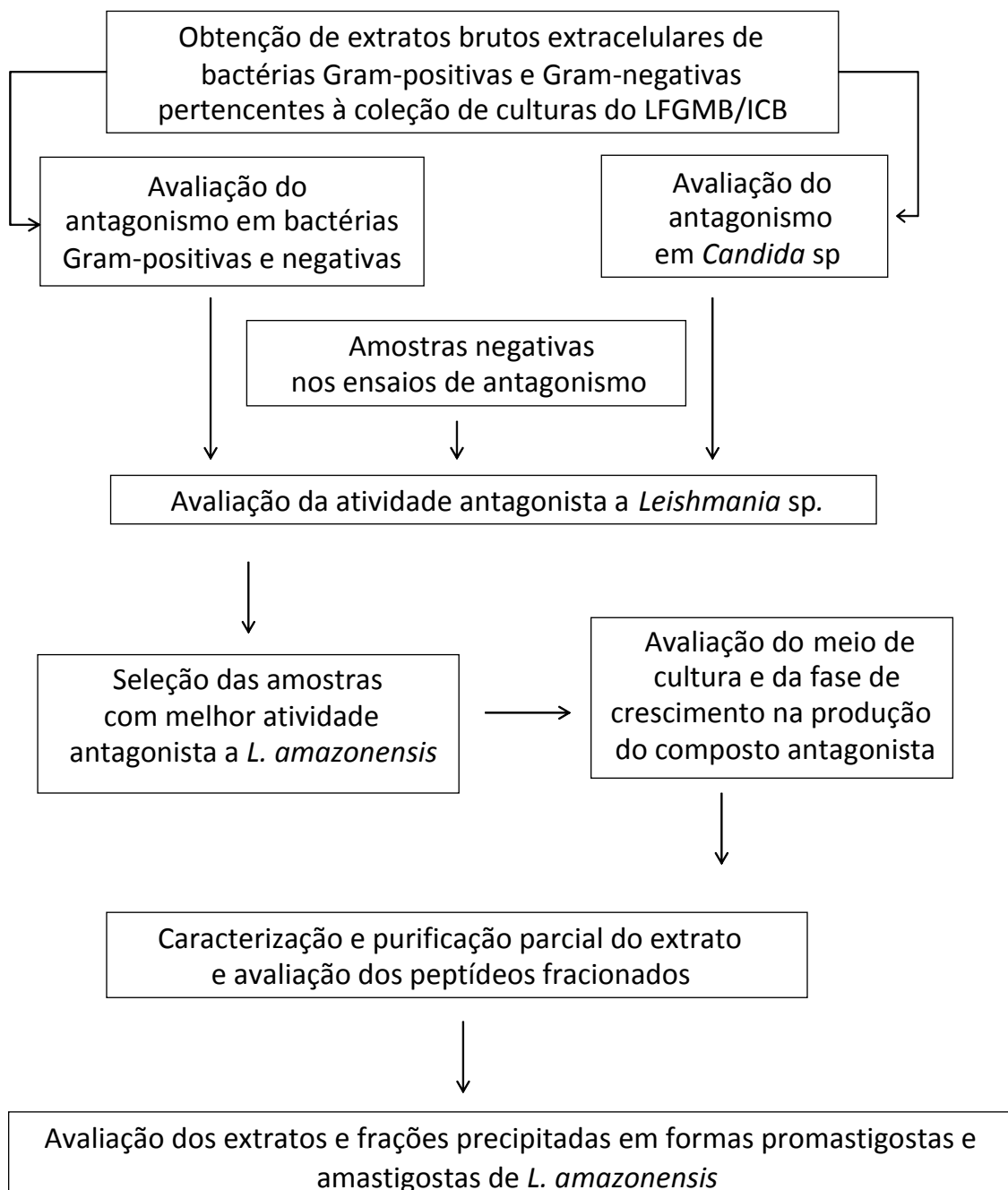
- Avaliar a influência da composição do meio de cultura sobre a produção de compostos antagonistas contra formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- Determinar a natureza proteica e purificar parcialmente os compostos bacterianos com antagonismo contra formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- Comparar o efeito inibitório do composto bacteriano do extrato bruto e da fração precipitada (peptídeos) em formas amastigotas de *L. amazonensis*;
- Avaliar a toxicidade do composto bacteriano do extrato bruto e da fração precipitada (peptídeos) em macrófagos peritoneais de camundongos.

# Material e Métodos

---

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Desenho experimental



**Fluxograma 1.** Esquema representativo dos passos experimentais no estudo de prospecção de peptídeos bacterianos.



## 4.2 Amostras bacterianas para avaliação da atividade antagonista

Um total de 466 amostras bacterianas pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Genética e Fisiologia Molecular Bacteriana do ICB/ UFJF foi utilizado na prospecção de compostos antagonistas, sendo 368 cocos Gram-positivos (CGP), pertencentes aos gêneros *Staphylococcus* (fezes de pombo, queijo minas frescal e leite humano) e *Enterococcus* (fezes de pombos) (Apêndice 2); e 98 bastonetes Gram-negativos (BGN) entre representantes da família *Enterobacteriaceae* e BGN não-fermentadores, de origem animal (fezes de pombos), secreção humana (leite materno) e de alimento (queijo minas frescal) (Apêndice 3).

Dentre as amostras testadas, foram utilizadas ainda linhagens bacterianas de referência de *Escherichia coli* (ATCC 11229 e ATCC 35218), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13866), *Serratia marcescens* (CDC 4133), *Salmonella enterica* Tiphly (CFP/ IAL 1472), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter aerogenes* (CDC 1680), *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591, ATCC 25923 e ATCC 29213), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Enterococcus faecium* (ATCC 35667), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341) e *Micrococcus luteus* (ATCC 10240) (Apêndices 2 e 3).

Os microrganismos foram rotineiramente cultivados em caldo BHI (Caldo infusão de cérebro e coração, Himedia, Mumbai, India) a partir de estoques mantidos criopreservados no laboratório. Todos os microrganismos repicados foram submetidos a testes bioquímicos fisiológicos para confirmação da identidade bacteriana (Apêndice 4).

## 4.3 Avaliação da atividade antagonista ao crescimento de bactérias

A investigação da atividade antagonista frente a linhagens bacterianas foi realizada pelo método da sobrecamada, segundo metodologia proposta por Romeiro (1989), que consiste em confrontar uma amostra bacteriana teste,

chamada de produtora, com amostras possivelmente sensíveis, chamadas de reveladoras.

Para isso, as 466 amostras testes (368 CGP e 98 BGN) foram estriadas em ágar peptona de caseína e soja (TSA- Tryptic Soy Agar, Himedia, Mumbai, India) e incubadas a 36 °C por 24 horas, para obtenção de massa celular. Com auxílio de uma alça bacteriológica, parte da massa celular obtida foi solubilizada em 1 mL de solução salina 0,9 % estéril, para obtenção de padrão de suspensão correspondente a 0,5 na escala *MacFarland*, e a partir desta diluição, 200µL foram distribuídos nos poços do Replicador de *Steers* (STEERS, 1959) e carimbadas na superfície do TSA. As placas foram incubadas a 36 °C por 24 horas.

Passado o período de incubação, foi adicionado 1 mL de clorofórmio P.A. (Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro) na face interior da tampa da placa de Petri, e estas foram deixadas fechadas e com a tampa para baixo, por 30 minutos, à temperatura ambiente, com intuito de gerar a morte bacteriana por vapor de clorofórmio. Após este período, as placas foram deixadas por 30 minutos entreabertas em capela de fluxo laminar para evaporação do clorofórmio residual.

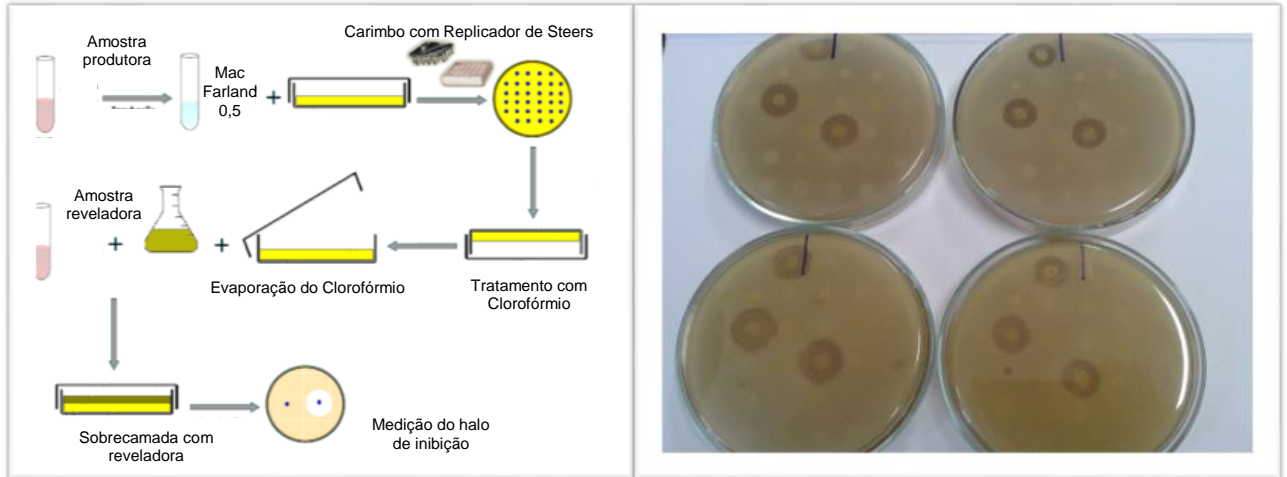
Paralelamente, 200 µL de cultura da amostra reveladora (Tabela 2) foram adicionados e homogeneizados a 4 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Himedia, Mumbai, Índia) acrescido de 0,7 % de ágar-ágar, previamente deixados no banho-maria a 70 °C e homogeneizados. A mistura então foi vertida sobre as amostras carimbadas em TSA, de forma que todas as colônias das produtoras tivessem uma sobrecamada com a amostra reveladora. As placas foram incubadas por 24 horas a 36 °C. Com o auxílio do replicador de *Steers*, foi possível a avaliação de pelo menos 32 amostras bacterianas contra uma amostra de bactéria reveladora por experimento.

A atividade antagonista foi avaliada pela presença de halos de inibição do crescimento da amostra reveladora ao redor do inóculo da amostra produtora carimbada, sendo o valor do diâmetro do halo medido em milímetros (Figura 7). De acordo com o tipo de bactéria inibida, o antagonismo foi classificado em amplo espectro de ação (inibição de microrganismos filogeneticamente não relacionados à amostra produtora) ou de estreito espectro de ação (inibição de microrganismos

filogeneticamente relacionados à amostra produtora). Como controle negativo, foi utilizado o meio BHI (Himedia) sem inóculo, contendo 0,7 % de ágar-ágar. Todos os testes foram realizados com uma duplicata técnica e uma duplicata biológica.

**Tabela 2.** Amostras bacterianas usadas como reveladoras no antagonismo bacteriano. BGN (bastonetes Gram-negativos) e CGP (cocos Gram-positivos).

<b>CÓDIGO AMOSTRA</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO</b>	<b>ORIGEM</b>
CGP1	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo
CGP6	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo
CGP11	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo
CGP19	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo
CGP23	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo
CGP27	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo
CGP162	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo
CGP165	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo
CGP183	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo
CGP235	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo
CGP248	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas
CGP269	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas
CGP289	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas
CGP302	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano
CGP313	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano
CGP329	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano
CGP337	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano
CGP360	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	ATCC
CGP362	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	ATCC
BGN1	<i>Pseudomonas putida</i>	Leite humano
BGN3	<i>Pseudomonas</i> sp.	Leite humano
BGN8	<i>A. baumannii calcoaceticus</i>	Queijo minas
BGN9	<i>Enterobacter amnigenus</i>	Queijo minas
BGN10	<i>Enterobacter</i> sp.	Queijo minas
BGN93	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	ATCC
BGN94	<i>E. coli</i> ATCC35218	ATCC
BGN95	<i>Salmonella</i> Typhi CFP/IAL 1472	ATCC
BGN96	<i>Enterobacter aerogenes</i> CDC 1680	CDC
BGN97	<i>E. coli</i> ATCC 11229	ATCC



**Figura 7.** Esquema representativo do teste de antagonismo bacteriano pelo método da sobrecamada, segundo ROMEIRO (1989). **Fonte:** arquivo pessoal.

#### 4.4 Avaliação da atividade antagonista ao crescimento de *Candida* sp

Foram utilizadas oito linhagens de *Candida* na investigação da atividade antagonista, as quais foram gentilmente cedidas pelo laboratório de Micologia do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (Tabela 3).

**Tabela 3.** Amostras de *Candida* sp. usadas como reveladoras no teste de antagonismo.

CÓDIGO AMOSTRA	IDENTIFICAÇÃO	ORIGEM
CA1	<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	ATCC
CA2	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	ATCC
CA3	<i>Candida albicans</i>	Isolado clínico
CP	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	ATCC
CK	<i>Candida krusei</i> ATCC 20228	ATCC
CT	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	ATCC
CD	<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 28	ATCC
CG	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	ATCC

A investigação da atividade antagonista foi realizada pelo método da sobrecamada, segundo metodologia descrita por Mayr-Hartin (1972), que consiste em confrontar uma amostra bacteriana teste, designada produtora, com amostras de leveduras designadas reveladoras.

As amostras de *Candida* foram avaliadas quanto a pureza de acordo com a característica macroscópica das colônias e pela característica morfotintorial, pelo método de Gram. Assim, cada amostra foi inoculada em placas contendo ágar Sabouraud 4 % (Himedia, Mumbai, India) por meio de alça bacteriológica e, em seguida, as placas foram incubadas à 36 °C por até 48 horas.

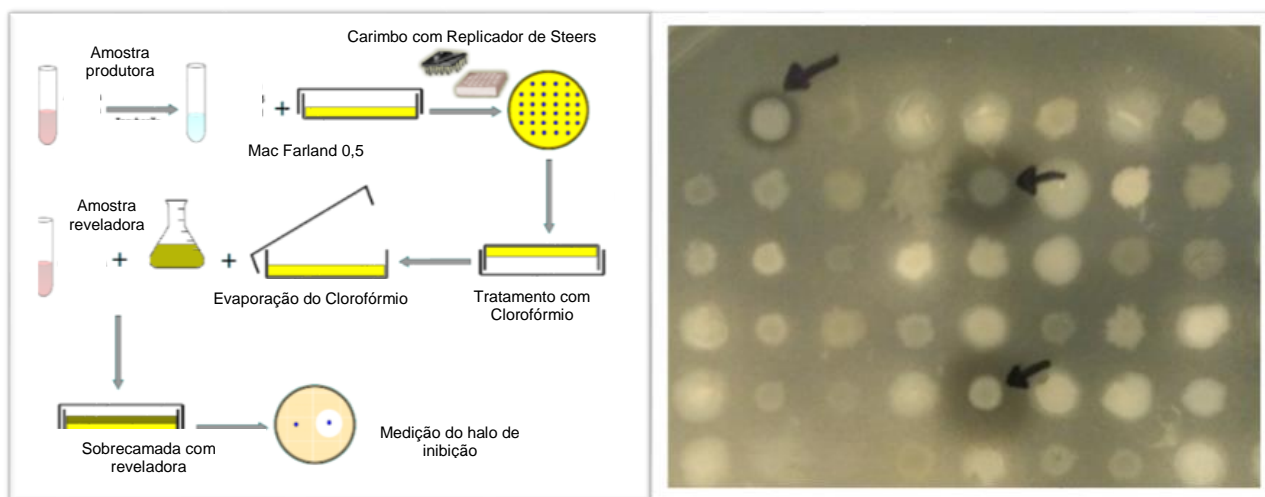
Para serem utilizadas como reveladoras, as amostras de *Candida* crescidas no ágar Sabouraud 4% tiveram parte da sua massa celular coletada com auxílio de uma alça bacteriológica e solubilizadas em 1 mL de solução salina 0,9 %, estéril, para obtenção de um padrão de suspensão correspondente a 0,5 na escala *MacFarland*.

As 466 amostras testes de bactéria (Apêndices 2 e 3) foram estriadas em ágar TSA - peptona de caseína e soja (Himedia, Mumbai, India) e incubadas a 36 °C por 24 horas, para obtenção de massa celular. Com auxílio de uma alça bacteriológica, parte da massa celular obtida foi solubilizada em 1 mL de solução salina 0,9% estéril, para obtenção de padrão de suspensão correspondente a 0,5 na escala *MacFarland* e, a partir desta diluição, 200 µL foram distribuídos nos poços do Replicador de *Steers* (STEERS, 1959) e carimbadas na superfície do TSA. Foram utilizados também um controle positivo (Anfotericina B a 5 mg/mL) e um controle negativo (salina 0,9 %). As placas foram incubadas a 36 °C por 24 horas.

Passado o período de incubação, foi adicionado um 1 mL de clorofórmio P.A. (Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro) na face interior da tampa da placa de Petri, e estas foram deixadas fechadas e com a tampa para baixo, por 30 minutos, à temperatura ambiente, com intuito de gerar a morte bacteriana por vapor de clorofórmio. Após este período, as placas foram deixadas por 30 minutos entreabertas em capela de fluxo laminar para evaporação do clorofórmio residual.

Paralelamente, 200 µL das amostras reveladoras de *Candida* padronizadas a 0,5 da escala de *MacFarland* foram adicionadas e homogeneizadas em 4 mL de caldo Sabouraud acrescido de 0,7 % de ágar-ágar (Himedia), previamente deixadas no banho-maria a 70 °C. A mistura então foi vertida sobre as amostras carimbadas em TSA, de forma que todas as colônias das produtoras tivessem uma sobrecamada com a amostra reveladora. As placas foram incubadas por 24 horas a 36 °C. Com o auxílio do Replicador de *Steers*, foi possível a avaliação de pelo menos 32 amostras bacterianas produtoras contra uma levedura reveladora por experimento.

A atividade antagonista foi avaliada pela presença de halos de inibição do crescimento da amostra reveladora ao redor do inóculo da amostra teste carimbada, sendo o valor do diâmetro do halo medido em milímetros (Figura 8). Como controle negativo, foi utilizado o caldo Sabouraud contendo apenas 0,7 % de ágar-ágar. Todos os testes foram realizados com uma duplicata técnica e uma duplicata biológica.



**Figura 8.** Esquema representativo do teste de antagonismo em fungo leveduriforme pelo método da sobrecamada segundo MAYR-HARTIN (1972). As setas indicam halos de inibição **Fonte:** arquivo pessoal.

#### 4.5 Avaliação da atividade antagonista ao crescimento de *Leishmania* sp

Após a realização dos testes de avaliação da atividade antagonista contra bactérias e *Candida* sp., as 466 amostras bacterianas foram divididas em dois grupos: (i) amostras positivas para a produção de composto antagonista; (ii) amostras negativas nos ensaios de antagonismo. Esta separação inicial teve objetivo de comparar se as amostras produtoras de compostos antagonistas ao crescimento de bactérias e/ou *Candida* também seriam capazes de inibir o crescimento de *Leishmania*, verificando assim uma possível sobreposição do espectro de ação da substância antagonista.

Neste estudo, foram utilizadas quatro espécies de *Leishmania*, gentilmente cedidas pelo Núcleo de Estudos e Pesquisa em Parasitologia, do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (Tabela 4).

**Tabela 4.** Espécies de *Leishmania* utilizadas no teste de antagonismo.

<b>CÓDIGO AMOSTRA</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO</b>	<b>ORIGEM</b>
AMA	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. amazonensis</i> IFLA/Br/67/PH8
BRA	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> MHOM/Br/75/M2903
CHA	<i>L. chagasi</i>	<i>L. chagasi</i> MHOM/Br/PP75
MAJ	<i>L. major</i>	<i>L. major</i> MRHO/Su/59/P

Considerando-se as particularidades de condições de cultivo de parasitos em relação ao cultivo de bactérias, as metodologias tradicionalmente descritas na literatura e utilizadas para investigação de antagonismo leveduriforme e bacteriano por compostos produzidos por bactérias durante seu crescimento em meios de cultura, não puderam ser aplicadas para *Leishmania*, para se ter uma padronização do método.

A metodologia padrão-ouro na pesquisa da atividade antagonista de compostos bioativos em parasitos é a descrita por Mossman (1983), onde se utiliza a cultura do parasito em meio líquido, soro bovino fetal, o composto bioativo e um indicador de óxido-redução, geralmente o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólico (MTT). Outra diferença no método é a utilização de microplacas de poliestireno com 96 poços ao invés de placas de meio de cultura sólidos.

Em relação a atividade antagonista, as amostras bacterianas crescidas em meio de cultura líquido tiveram que ser centrifugadas e filtradas em filtros bacteriológicos para obtenção de um extrato bruto livre de células, para que então somente os compostos advindos do seu crescimento, antimicrobianos em potencial, pudessem ser acrescentados ao sistema teste (Fluxograma 2).

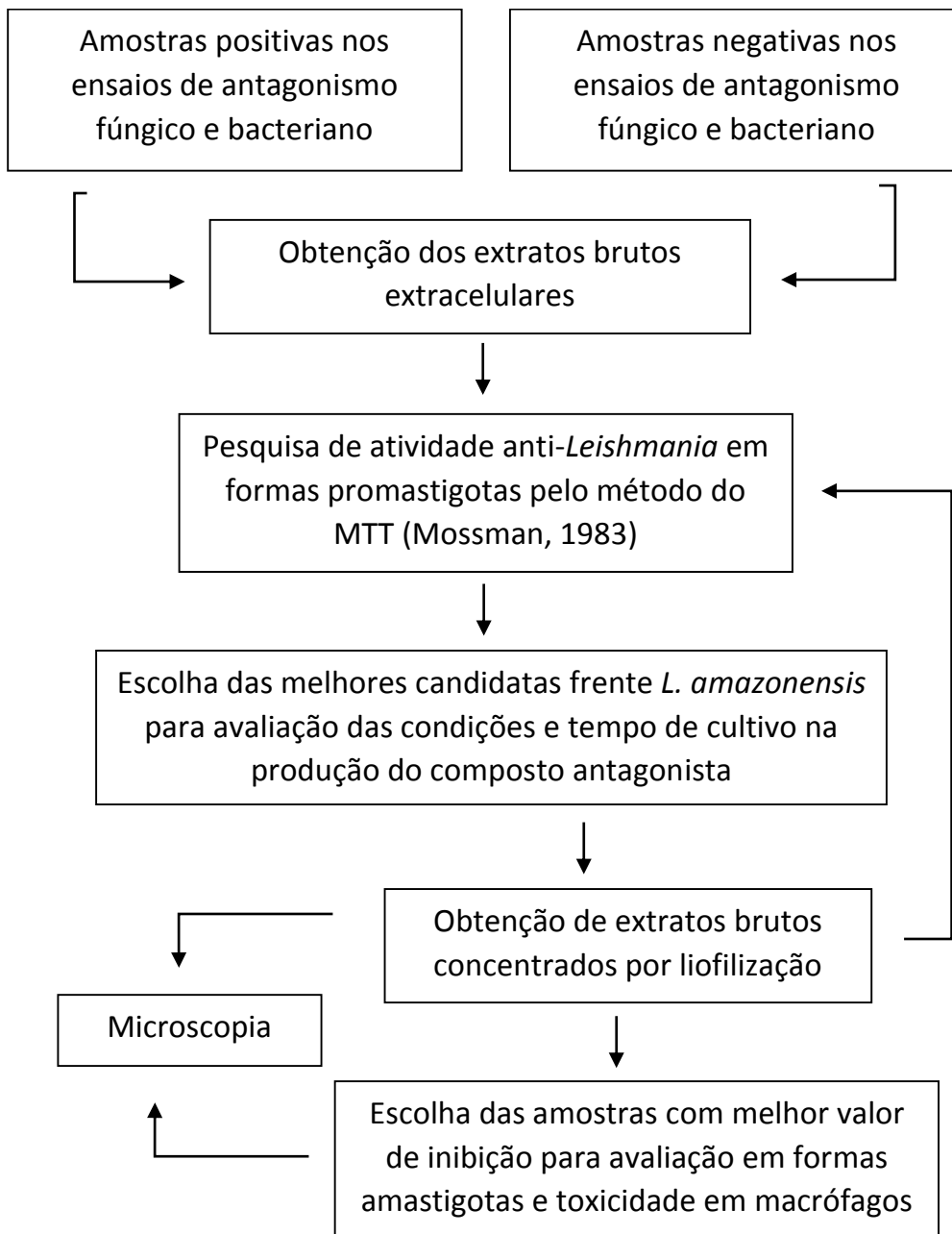
#### 4.5.1 Obtenção de extratos brutos bacterianos

As 466 amostras bacterianas foram cultivadas em 50 mL de caldo BHI (Himedia), em estufa bacteriológica a 36 °C, por 24 horas. Após o período de incubação, esfregaços foram realizados em lâmina e coloração de Gram foi realizada para confirmação da pureza das culturas. A seguir, o extrato extracelular foi obtido pela precipitação da cultura por centrifugação a 4500x g (Centrífuga Marca Eppendorff 5804R) por 15 minutos, a 4 °C, para separação do sobrenadante das massas celulares.

Os extratos brutos extracelulares foram filtrados em membranas de 0,22 µm (TPP, Zurich, Switzerland), para remoção de células bacterianas remanescentes, congelados em biofreezer a -80 °C por 72 h, e liofilizados por até 72 h, condições finais 60 µHg, -51 °C (Liofilizador Liotop L101, São Paulo, Brasil).

Para a avaliação da atividade anti-*Leishmania*, os extratos liofilizados foram pesados, e suspensões de concentrações de 300 e 600 mg/mL foram obtidas utilizando-se água destilada estéril.





**Fluxograma 2.** Esquema representativo dos passos experimentais no estudo de prospecção de compostos bacterianos com atividade anti-*Leishmania*.

#### 4.5.2 Teste de atividade anti-*Leishmania* em formas promastigotas

O teste anti-*Leishmania* foi realizado inicialmente em formas promastigotas e a atividade leishmanicida foi analisada pelo método colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico; Sigma-Aldrich) em diferentes espécies do parasito (*L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. major* e *L. chagasi*) (MOSSMAN, 1983). O método do MTT consiste na avaliação da atividade das enzimas desidrogenases encontradas nas mitocôndrias metabolicamente ativas (células viáveis), as quais convertem o MTT, um sal de cor amarela e solúvel em água em formazan, um produto insolúvel e de cor púrpura (MOSMMAN, 1983). As amostras que se destacaram no teste de forma promastigota foram investigadas quanto ao índice de toxicidade em macrófagos peritoneais e também em formas amastigotas.

Formas promastigotas de *Leishmania* foram cultivadas em diferentes meios de cultura, dependendo da espécie, conforme rotina estabelecida no NUPEP/ ICB/ UFJF: para *L. amazonensis*, meio Warren; para *L. major* e *L. braziliensis*, meio BHI e para *L. chagasi*, meio LIT (*Liver Infusion Triptose*- Infusão de fígado e triptose), todos suplementados com 10 % de soro bovino fetal (SBF), e antibiótico (penicilina 10.000UI/MI e estreptomicina 10 mg/MI, Cf= 10 µg/mL) a 24 °C (BRAGA et al. 2007, MACHADO et al. 2012). Para os testes anti-promastigotas, os parasitos, em fase exponencial de crescimento, foram contados em câmara de Neubauer e inoculados à razão de  $2 \times 10^6$  células/ mL (*L. amazonensis*) e de  $3 \times 10^6$  células/ mL (*L. braziliensis*, *L. major* e *L. chagasi*), em placa de 96 poços estéreis, na presença de 10 µL dos extratos bacterianos, em duplicata, e incubados a 24 °C. O experimento foi feito em triplicata para que se pudesse tirar uma placa após 24 horas de interação, após 48 horas e após até 72 horas. Os extratos brutos usados neste ensaio nas concentrações de 300 e 600 mg/mL assumiam como concentrações finais 20 e 40 mg/mL, respectivamente, nos poços da microplaca.

Como controles negativos, foram utilizados os meios de cultura suplementados com SBF, o diluente dos extratos bacterianos, e o meio de cultura utilizado para o crescimento das bactérias, concentrado da mesma maneira como

na preparação dos extratos bacterianos. Como controle positivo, foi utilizado anfotericina B (Cristália-Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil), droga de referência para tratamento das leishmanioses.

Após 24, 48 e 72 h de incubação foi adicionado 10 µL do MTT (5 mg/mL) em cada poço da placa, e incubado durante quatro horas. A reação foi interrompida pela adição de isopropanol/ácido clorídrico (0,7 % v/v), e a leitura realizada em espectrofotômetro à 570 nm (Termo Multiskan EX- Vantaa, Finland). A atividade antagonista dos extratos foi expressa em porcentagem de inibição do crescimento de *Leishmania* em relação ao controle, sem extrato. A partir deste ensaio, foi determinada a concentração inibitória mínima de cada extrato proteico. Os ensaios foram realizados em duplicatas e os resultados representam a média de três experimentos em dias diferentes.

Para a visualização morfológica de formas promastigotas na presença ou ausência do extrato bacteriano, após 24 horas de incubação, foram coletados 5 µL do meio de interação para confecção de esfregaço em lâmina de vidro. Após secos, os esfregaços foram cobertos por álcool etílico absoluto (VETEC) e deixados por 20 minutos para fixação dos mesmos. Passado este período, as lâminas foram cobertas por Giemsa e deixadas por 20 minutos. Após secas, as lâminas de promastigotas representativas foram observadas em microscopia de luz em microscópio com captura de imagem (OLYMPUS, DP73, UTV05X0-3, Tokyo, Japan).

#### **4.6 Avaliação da composição do meio de cultura e tempo de crescimento na produção de compostos com atividade em *Leishmania amazonensis***

As amostras bacterianas cujos extratos tiveram os melhores valores de inibição de formas promastigotas de *L. amazonensis* foram avaliadas quanto ao tempo de crescimento e meio de cultivo, para a produção de compostos anti-*Leishmania*.

#### 4.6.1 Obtenção de extratos brutos após cultivo bacteriano em diferentes meios de cultura

As bactérias produtoras foram cultivadas nos meios: caldo BHI (Himedia), caldo TSB (Tryptic Soy Broth- Himedia), caldo Brucela (Merck), caldo Nutriente (Biolab) e água peptonada. As amostras foram incubadas à 36 °C por 24 horas, e em seguida foram centrifugadas a 20800 g (Centrífuga Marca Eppendorff 5804R), 4 °C, por 15 min. O sobrenadante livre de células foi coletado por filtração em membrana de 0,22 µm (TPP), e o extrato extracelular de cada amostra foi congelado em biofreezer -80 °C por 72 horas e liofilizado nas mesmas condições relatadas no ítem 4.5.1 para obtenção dos extratos à 600 mg/mL.

A atividade antagonista contra formas promastigotas foi avaliada pela porcentagem de inibição do crescimento da mesma, pelo método do MTT.

Os meios que permitiram as maiores porcentagens de inibição foram selecionados para avaliação da produção da substância antagonista e porcentagem de inibição de *Leishmania* ao longo da curva de crescimento bacteriano *in vitro*.

#### 4.6.2 Obtenção de extratos brutos ao longo do crescimento bacteriano *in vitro*

As amostras bacterianas candidatas foram cultivadas em 50 mL de caldo BHI, a 36 °C, por 24 h. Posteriormente, os 50 mL foram transferidos para 450 mL do mesmo meio de cultivo, e incubados nas mesmas condições por até 30 h.

A densidade óptica da cultura foi avaliada em intervalos de 6 h (DO=600nm em Espectrofotômetro AJX-3002 PC Micronal) a partir de alíquotas de 3 mL da cultura. Além disso, foi retirado nos intervalos de tempo, um mililitro da amostra para plaqueamento e contagem de UFC/mL e cerca de 50 mL para obtenção dos extratos brutos extracelulares de cada tempo, usados para determinação da atividade anti-*Leishmania* pelo composto bioativo produzido pela bactéria ao longo

do seu crescimento. Os dados obtidos foram utilizados para a construção da curva de crescimento bacteriano (Apêndice 5 e 7).

#### **4.7 Precipitação protéica dos extratos provenientes da melhor condição experimental**

Na melhor condição de cultivo determinada (tempo e meio), as bactérias candidatas foram repicadas em volumes de 1000 mL e, logo em seguida, submetidas à centrifugação para coleta do sobrenadante (5500 RPM, à 4 °C, por 20 min). O sobrenadante foi então filtrado em membrana de 0,22 µm (TPP), com auxílio da bomba de vácuo, e o sobrenadante livre de células foi medido em proveta para determinação do volume e cálculo do sulfato de amônio (VETEC) a ser utilizado para a precipitação protéica.

O extrato bruto extracelular de cada bactéria selecionada foi precipitado em três concentrações de sulfato de amônio (0-40 %, 40-70 % e de 70-100 % p/v), sob agitação constante e lenta em banho de gelo. Os precipitados de cada fração foram coletados após centrifugação a 10.000g, a 4 °C, por 20 minutos e dissolvidos em PBS, pH 7,4. As frações obtidas foram exaustivamente dialisadas contra o mesmo tampão em baixa temperatura (7 °C) por 24 horas. Desta forma, foram obtidas frações extracelulares E40, E70 e E100. Estas frações foram avaliadas quanto ao potencial inibitório das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

#### **4.8 Avaliação da toxicidade sobre macrófagos peritoneais**

Para a avaliação da citotoxicidade dos extratos bacterianos, macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos BALB/c previamente estimulados com 2 mL de meio tioglicolato (Sigma-Aldrich, USA) a 3 % estéril para indução de uma resposta inflamatória e recrutamento dos macrófagos para a cavidade peritoneal. Após 72 horas, os animais foram eutanasiados por asfixia em câmara de CO<sub>2</sub> (Insight, São Paulo) e injetou-se 5 mL de solução de Hank`s fria (Sigma-Aldrich,

USA) na região abdominal dos camundongos. O aspirado contendo as células residentes do peritônio foi centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm (Thermo Scientific, USA), o precipitado foi ressuspenso em 2 mL de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA) e as células foram contadas em câmara de Neubauer.

Em seguida, em cada poço da placa de 96 poços, adicionou-se 100 µL de uma suspensão de  $2 \times 10^6$  células/mL ( $2 \times 10^5$  células/poço) em meio RPMI-1640 suplementado com 10 % de SBF e 0,5 % de penicilina/estreptomicina, e as placas permaneceram por 1 hora em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C para que os macrófagos aderissem. Em seguida cada poço foi lavado com PBS estéril para a retirada de macrófagos não aderidos e mantidos por 24 horas, em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C, em meio RPMI-1640 contendo 10 % de SBF. Após este período, foram adicionados os extratos bacterianos, nas mesmas concentrações usadas no teste anti-promastigota (extratos brutos com concentração inicial de 300 e 600 mg/mL concentrações finais de 19.0 e 38.0 mg/mL, respectivamente), e a placa novamente incubada em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 48 horas.

Posteriormente, foi adicionado 10 µL de MTT a 5 mg/mL e, após 2 horas, a reação foi interrompida com adição de 100 µL de isopropanol/HCl (0,4 %) e a leitura realizada em espectrofotômetro a 570 nm (Spectramax 190, Molecular Devices). Os testes foram realizados em duplicatas e poços sem extrato foram utilizados como controle negativo. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle a partir da média de dois experimentos realizados em dias diferentes. Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios de ética no uso animal e aprovado previamente pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UFJF (CEUA 054/2013). O protocolo foi anexado ao final deste trabalho (Anexo 2).

Os extratos bacterianos que mostraram baixa toxicidade para estas células foram utilizados nos testes de atividade em formas amastigotas de *L. amazonensis*.

#### **4.9 Teste de atividade em formas amastigotas de *L. amazonensis***

Os ensaios de inibição amastigota foram realizados de acordo com a rotina já previamente estabelecida no NUPEP/ ICB/ UFJF. Macrófagos peritoneais foram obtidos, como descrito no item 4.8, após obtenção do lavado peritoneal de camundongos.

Posteriormente, essas células foram distribuídas sobre lamínulas de vidro de 13 milímetros de diâmetro, em placas de 24 poços, onde em cada poço foram adicionados 300  $\mu$ L de suspensão celular, na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL, em meio RPMI-1640 contendo 10 % SBF e 0,5 % de penicilina/estreptomicina. A placa foi incubada por 1 hora à 37 °C em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub> para que os macrófagos aderissem à lamínula. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS estéril para a retirada das células não aderidas.

Após 16 horas, as células foram lavadas com PBS estéril e foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento (razão de 5 promastigotas: 1 macrófago) em meio RPMI-1640 contendo 10 % SBF e deixadas interagir por 3 horas a 37 °C com células hospedeiras. Em seguida, cada poço foi lavado com PBS estéril para retirar os parasitos que não foram fagocitados e os compostos foram adicionados nas mesmas concentrações do teste anti-promastigota.

Após 72 horas de tratamento, em estufa de CO<sub>2</sub> a 33 °C, as células foram fixadas com álcool absoluto e coradas com Giemsa, e observadas em microscópio óptico com captura de imagem (OLYMPUS, DP73, UTV05X0-3, Tokyo, Japan). Os testes foram realizados em duplicatas e poços sem extrato foram utilizados como controle negativo. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle a partir da média de dois experimentos realizados em dias diferentes. Como controle positivo, foi utilizada a anfotericina B (Cristália-Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil), droga de referência para tratamento das leishmanioses.

O efeito antiparasitário dos extratos bacterianos foi avaliado a partir da contagem de amastigotas dentro dos macrófagos, com a contagem de 500

macrófagos/ lamínula. Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios de ética no uso animal e aprovado previamente (Anexo 1).

#### **4.10 Análise estatística**

A análise estatística dos dados obtidos nos ensaios promastigotas foi realizada por meio da análise de variância (one-way-ANOVA).

Para comparação dos valores médios de inibição das amostras, considerando o extrato precipitado proveniente da melhor condição experimental, foi utilizado o teste T de Student.

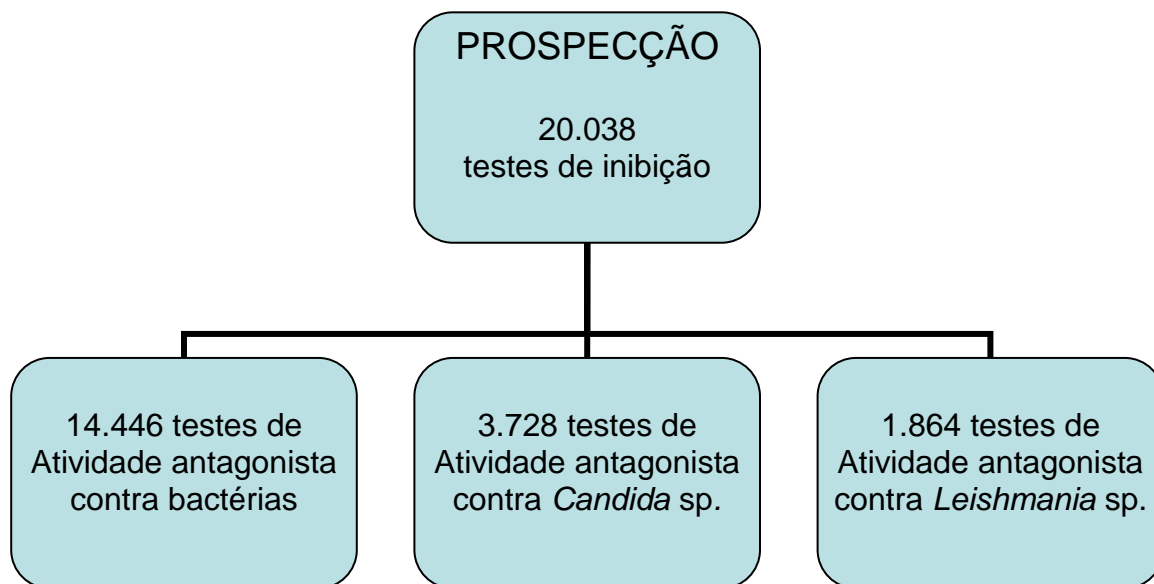


# **Resultados e Discussão**

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Produção de compostos antimicrobianos por bactérias

A produção de compostos antimicrobianos pelas 466 amostras bacterianas pesquisadas levou a 20.038 ensaios de antagonismo, como mostrado na figura 9.



**Figura 9.** Organograma representativo da prospecção de peptídios antimicrobianos *in vitro*.

A avaliação da produção de compostos com atividade antagonista contra bactérias totalizou 14.446 ensaios dos quais 6.744 foram realizados entre bactérias filogeneticamente não-relacionadas (BGN x CGP), e 7.702 entre bactérias filogeneticamente relacionadas (BGN x BGN ou CGP x CGP). Não foram observados eventos de auto-inibição, com os reveladores testados.

Para avaliação da produção de compostos com atividade antagonista contra amostras de *Candida* sp., 3.728 testes foram realizados, no entanto, devido

a perda de viabilidade de 23 amostras durante a prospecção, consideramos apenas 3.544 eventos de inibição confirmados.

A avaliação da produção de compostos com atividade antagonista contra espécies de *Leishmania* resultou em 1.864 testes de inibição, considerando as 466 amostras bacterianas testadas frente 4 amostras do parasito usadas como reveladoras. Dos testes preliminares, apenas 472 apresentaram homogeneidade nos resultados de inibição e puderam ser confirmados, onde 51 ensaios foram referentes a inibição de *L. braziliensis*, 36 referentes a inibição de *L. major*, 24 referentes a inibição de *L. chagasi* e 361 referentes a inibição de *L. amazonensis*.

A prospecção de substâncias bioativas muitas vezes é exaustiva, dispendiosa, necessita de muitas repetições técnicas e biológicas, e cuja padronização da metodologia e dos observadores depende de muitas etapas de treinamento e análise. Especialmente, considerando-se os objetivos propostos neste estudo, é de se levar em conta que *Leishmania* são parasitos que exigem constantes passagens em camundongos para verificar sua infecciosidade, e também da cultura de macrófagos, para a avaliação das formas amastigotas, o que demanda uma atenção especial às passagens celulares nas fontes de cultivo utilizadas (ROCHA, 2009). Além disso, devido a impossibilidade de cultivo desses parasitos em meios de cultura sólidos, como rotineiramente realizado para bactérias e fungos, e o ineditismo da proposta sem relatos metodológicos prévios na literatura disponível, optou-se por fazer a investigação da atividade anti-*Leishmania* inicialmente em formas promastigotas do parasito. Ambas as formas do parasito são consideradas ferramentas essenciais para avaliação do potencial de novas drogas em *Leishmania* (COBB e DENNY, 2010) e, assim, os ensaios em promastigotas serviram como triagem para seleção dos compostos bioativos (TEZUKA, 2015).

Outro fator importante na prospecção é busca pela compreensão de fatores internos e externos, químicos e físicos, que influenciam na produção natural de substâncias bioativas por diferentes tipos celulares. Na literatura científica são encontrados trabalhos de prospecção de substâncias bioativas a partir de organismos muito diversos, tais como plantas (BESSA et al., 2013; PORCU e

XAVIER, 2014), fungos (GUBIANI, 2015), bactérias (LEÃES, 2012), anuros (SOUZA, 2008), carrapatos (SILVA, 2007), dentre outros, sendo relatados diferentes fatores interferentes para cada perfil celular, o que culmina em diferentes problemas metodológicos.

A que se considerar também que apesar dos microrganismos terem contribuído muito nesta busca por novas drogas, sabe-se que apenas 1% deles são cultiváveis por técnicas tradicionalmente utilizadas nos laboratórios de microbiologia. Assim, alguns autores têm considerado que abordagens como a metagenômica apareceriam como uma ferramenta alternativa de prospecção, uma vez que permitiriam a geração de coleções de compostos bioativos naturais e sintéticos por estes microrganismos não cultiváveis e o acesso à clusters de genes associados a vias biossintéticas silenciadas (BÉRDY, 2005; GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010).

Assim, além de ser uma solução para a prospecção de substâncias bioativas em microrganismos viáveis, porém não cultiváveis, a análise *in silico* vem sendo relatada como uma alternativa também à redução de custos e ensaios laboratoriais, já que inicialmente utiliza-se de técnicas de sequenciamento de nova geração para varredura de genomas de amostras candidatas, buscando-se assim a presença de regiões codificadoras para substâncias bioativas (BELARMINO et al., 2010; SALLES, 2012; TAVARES et al., 2013; TAVARES, 2015).

A análise transcriptômica (MATULOVA et al., 2013) e proteômica (LUNA-RAMIREZ et al., 2013) para predição de aminoácidos e peptídeos de interesse também já é uma realidade na prospecção de AMPs. Isso sem considerar a prospecção de compostos lipídicos e fenólicos (SILVA et al., 2010).

### **5.1.1 Atividade antagonista contra bactérias**

Um total de 222 amostras bacterianas mostraram-se capazes de inibir o crescimento bacteriano, perfazendo 47,6 % de casos positivos, dos quais 17,1 % (n=38) associados a BGN e 82 % (n=184) associados a CGP.

Dentre os isolados que produziram compostos antagonistas, observou-se a presença de espécies clinicamente relevantes, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus* sp. (Tabela 5).

**Tabela 5.** Amostras bacterianas produtoras de compostos antagonistas contra as bactérias testadas. BGN (bastonetes Gram-negativos) e CGP (cocos Gram-positivos).

<b>Amostras de BGN produtores (n=38)</b>	<b>Amostras de CGP produtores (n=184)</b>
<i>E. coli</i> (n=32)	<i>Staphylococcus</i> sp. (n=108)
<i>Pseudomonas</i> sp.(n=4)	<i>Enterococcus</i> sp. (n= 76)
<i>Acinetobacter</i> sp.(n=1)	
<i>Serratia marcescens</i> (n=1)	

Dos 38 BGN produtores de compostos antagonistas, 84 % (n=32) corresponderam a *Escherichia coli*, seguidos de membros do gênero *Pseudomonas*, que representaram 10,5 % das amostras (n=4) (Tabela 4). A porcentagem elevada de *E. coli* dentre as linhagens produtoras de antagonismo bacteriano já era esperado, uma vez que, na literatura, diferentes trabalhos relatam a produção de substância antagonista por representantes dessa espécie (CURSINO et al., 2002; GORDON e O'BRIEN, 2006; MAJEED et al., 2011).

Dentre as substâncias antagonistas produzidas por bactérias Gram-negativas, e mais especificamente por *E. coli*, as bacteriocinas colicinas e microcinas são as mais estudadas, sendo isoladas com frequência de amostras provenientes da microbiota intestinal (O'SHEA et al., 2012). Flach, Vecchia e Corção (2001) analisando amostras de água de abastecimento no município de Porto Alegre observaram a produção de colicina por *E. coli* numa frequência de 10 %. Em nosso estudo, a frequência observada de produção de substância

antagonista por *E. coli* foi de 41 % (n=32, de 78 amostras), o que reafirma a importância do estudo desta espécie, dentre as bactérias Gram-negativas, como eficiente produtora de compostos bioativos.

Em relação à origem, a maioria das amostras positivas para o antagonismo bacteriano foram isoladas de fonte animal (79 %), seguidas daquelas de fonte alimentar (13 %) e das linhagens de referência (8 %). Não foi observada a produção de substância antagonista por bactérias isoladas de leite humano.

Acredita-se que bactérias associadas a ecossistemas altamente competitivos, tais como o trato gastrointestinal de pombos urbanos, possam estar relacionadas, mais frequentemente, com a expressão de atividade antagonista (BARBOSA et al., 2011). Essa capacidade poderia atuar como vantagem importante para controlar os níveis populacionais de outras espécies no ecossistema, bem como evitar o crescimento exacerbado da microbiota do hospedeiro (COX e WRIGHT, 2013).

Ao se analisar apenas as amostras bacterianas Gram-negativas como produtoras, foram observados 84 % de eventos de inibição frente a espécies não relacionadas filogeneticamente com a amostra produtora, como a inibição de amostras do gênero *Enterococcus*. Essa relação antagônica sugere um mecanismo de ação de amplo espectro. A produção de bacteriocinas por bactérias Gram-negativas é muito estudada, principalmente colicinas de *E. coli*, e evidencia que nessas moléculas a produção geralmente é mediada por resposta do sistema SOS a estresse, envolvendo genes plasmidiais que codificam a proteína de inibição (colicina), a proteína de imunidade e algumas vezes a proteína de lise (CURSINO et al., 2002; GORDON e O'BRIEN, 2006; BENITEZ, 2010; O'SHEA et al., 2012). Além de *E. coli*, o presente estudo também evidenciou a produção de substância antagonista por amostras de *Serratia marcescens* (BGN98) e *Pseudomonas* sp. (BGN4, BGN11 e BGN93, Apêndice 3), que também encontra respaldo na literatura científica, onde trabalhos como o de Rebuffat (2011) relataram a produção de piocinas por *P. aeruginosa* e marcescinas por *S. marcescens*. O mecanismo de ação de bacteriocinas de Gram-negativos geralmente envolve a ligação da proteína a um receptor de superfície da célula

alvo seguido de inibição da síntese de proteínas, degradação do DNA ou formação de poros na membrana citoplasmática (SMAJS et al., 1997; RILEY e WERTZ, 2002, CASCALES et al., 2007).

Os resultados obtidos aqui corroboram com os de Cavalcante e colaboradores (2013), que testaram amostras bacterianas de diferentes ambientes e observaram a capacidade antagonista de um isolado de *P. aeruginosa* contra bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Apolônio e colaboradores (2007) também observaram atividade antagonista de amplo espectro de ação em isolados de *Eikenella corrodens*, da cavidade bucal humana, com perfil de inibição contra linhagens como *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus* e *Peptostreptococcus anaerobius*.

Em nosso estudo, foram observados também eventos de antagonismo mais restritos, que totalizaram 16 % dos casos positivos, cujo efeito de inibição foi sobre espécies mais proximamente relacionadas às células produtoras, como amostras de *Salmonella* sp. e *Pseudomonas* sp.

Dos 368 cocos Gram-positivos avaliados, 184 amostras (50 %) foram capazes de inibir o crescimento de pelo menos uma das amostras reveladoras testadas. O tamanho dos halos de inibição foi bastante variável, destacando-se algumas amostras de *Staphylococcus* isolado de fezes de pombo (CGP60 e CGP64, Apêndice 2), que foram capazes de inibir 21 amostras reveladoras, com halos de inibição que chegaram a 29 mm de diâmetro. Halos maiores indicam maior efeito do composto sobre o crescimento da amostra reveladora, mostrando que o tamanho de 29 mm indica a maior redução observada. Dentre as amostras que tiveram o seu crescimento inibido, encontram-se amostras de *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus* MRSA, *Pseudomonas* e *E. coli*.

As bacteriocinas de bactérias Gram-positivas são relatadas na literatura como mais abundantes e diversificadas que as de Gram-negativas, são menores (até 8 kDa) e cujo mecanismo de liberação envolve sistema específico de transporte, não envolvendo assim dano a célula produtora, como ocorre nas Gram-negativas (FERREIRA, 2007).

Quanto à origem, as amostras provenientes de fonte animal foram as que mostraram mais atividade antagonista (80 %), seguidas daquelas isoladas de secreção humana (16 %), e de origem alimentar (2 %).

Em relação ao espectro de ação, 41,5 % dos testes relacionaram-se com antagonismo a espécies não relacionadas filogeneticamente, como *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp. e *Shigella* sp., sugerindo um espectro de ação mais abrangente. Por outro lado, 58,5 % dos eventos mostraram um espectro de ação mais restrito, agindo sobre espécies mais proximamente relacionadas, como *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus* sp.

Das amostras produtoras, houve uma prevalência na produção de substância antagonista contra representantes do gênero *Staphylococcus*, que somaram 58,7 % das amostras positivas, seguidos de 41,3 % por amostras do gênero *Enterococcus*. Os representantes do grupo de *Micrococcus* sp. e *Kokuria* sp. não produziram substância antagonista ativas contra as bactérias reveladoras testadas neste trabalho.

A capacidade de produção de bacteriocinas por *Staphylococcus* foi avaliada por Nascimento e colaboradores (2005), que obtiveram um percentual de 5,8% de linhagens produtoras, valor muito inferior ao encontrado neste trabalho. O trabalho não deixou claro a quantidade de amostras reveladoras usadas, o que pode ter influenciado no resultado da pesquisa.

Na literatura científica existem relatos de várias substâncias antagonistas produzidas por estes dois gêneros, destacando-se a produção de estafilococcinas, aureocina A53, A70, 4185 e hycina 3682 por estafilococos (CEOTO et al., 2012) e enterococcinas por enterococos (NASCIMENTO et al., 2010).

### **5.1.2 Atividade antagonista contra *Candida* sp.**

O resultado da avaliação da produção de compostos antagonistas contra *Candida* está apresentado na tabela 6.



**Tabela 6.** Amostras bacterianas produtoras de compostos antagonistas contra *Candida* sp. BGN (bastonetes Gram-negativos) e CGP (cocos Gram-positivos).

<b>Amostras de BGN produtores (n=1)</b>	<b>Amostras de CGP produtores (n=4)</b>
<i>E. coli</i> (BGN54)	<i>Staphylococcus</i> sp. (CGP31)
	<i>Staphylococcus</i> sp. (CGP41)
	<i>Staphylococcus</i> sp. (CGP60)
	<i>Staphylococcus</i> sp. (CGP259)

Um total de 443 amostras bacterianas foram confrontadas às 8 linhagens de *Candida* usadas como reveladoras e 5 amostras bacterianas foram capazes de inibir o crescimento de *Candida* sp. (Tabela 7).

**Tabela 7:** Eventos de inibição das amostras produtoras de compostos antagonistas contra *Candida* sp. BGN (bastonetes Gram-negativos) e CGP (cocos Gram-positivos).

<b>Amostras</b>	<b>CA1</b>	<b>CD</b>	<b>CG</b>	<b>CK</b>	<b>CT</b>
CGP31	-	-	+	-	-
CGP41	-	+	+	+	+
CGP60	+	+	-	+	-
CGP259	-	-	+	-	-
BGN54	-	-	+	-	-

CA1= *C. albicans*; CD= *C. dubliniensis*; CG= *C. glabrata*; CK= *C. krusei*; CT= *C. tropicalis*

(+) positivo: presença de halo de inibição; (-) negativo: ausência de halo de inibição

As amostras reveladoras CA2 (*Candida albicans* ATCC10231), CA3 (*Candida albicans* de isolamento clínico) e CP (*Candida parapsilosis* ATCC 22019) não foram inibidas por nenhuma amostra produtora testada neste estudo.

Os testes de atividade antagonista revelaram a inibição de cinco espécies de *Candida* por quatro cocos Gram-positivos e um bastonete Gram-negativo. Em estudo semelhante, Yadav e colaboradores em 2006 demonstraram a inibição de *Candida albicans* e de *Aspergillus* sp. por uma linhagem bacteriana pertencente à família *Enterobacteriaceae*, no entanto, o método utilizado foi disco difusão e microdiluição. O resultado apresentado no nosso trabalho corrobora também com o obtido por Hasslof et al. (2010) que demonstraram pelo método da sobrecamada a inibição de *Candida albicans* por linhagens de *Lactobacillus* sp., bactéria Gram-positiva, e que compartilha o mesmo perfil de produção de substâncias antagonistas.

Dentre as espécies produtoras, destaca-se a amostra CGP41, um estafilococo isolado de fonte animal, que foi capaz de inibir o crescimento de quatro espécies de *Candida*. A inibição do crescimento fúngico por peptídeos bacterianos vem sendo relatada na literatura científica desde o surgimento dos primeiros antibióticos. De Lucca e Walsh (1999) relataram a inibição do crescimento de *Candida* sp. pelos peptídeos iturina A e syringomicina E, produzidos respectivamente por *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas syringae*. O mecanismo de ação da iturina A está associado a alterações na tensão superficial da membrana celular, o que causa a formação de poros com perda de  $K^+$  e outros íons vitais, levando a morte da célula. Já syringomicina E aumenta o fluxo de  $K^+$ ,  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$  e do potencial de membrana em leveduras, o que resulta na alteração da fosforilação proteica e atividade da  $H^+$ ATPase (De Lucca e Walsh, 1999).

Shekh e colaboradores (2011) evidenciaram que linhagens de *Enterococcus faecium* isolados de pinguim foram capazes de inibir o crescimento de seis linhagens de *Candida albicans*. Os mesmos autores, em 2012, mostraram a capacidade de linhagens de *Enterococcus faecalis* em produzir fator anti-*Candida*.

Em nosso trabalho não foram identificadas amostras de enterococos e nem de *Pseudomonas* sp. produtores de substância antagonista contra as amostras testadas.

A expressão e produção de compostos bioativos por bactérias é bastante variável segundo a literatura científica, uma vez que atuam como estratégia de defesa e podem ser expressos constantemente ou após a exposição a algum fator externo, como por exemplo, outros microrganismos (O'DRISCOLL et al., 2013). Estes compostos podem ser codificados por genes presentes em plasmídeos, que poderiam ser facilmente transferidos entre microrganismos, ou muitas vezes perdidos no ambiente (FORTES et al., 2012).

Assim, o fato de algumas linhagens bacterianas não terem mostrado resultados positivos de inibição sugere a possibilidade de que talvez fosse necessário um contato prévio com outros microrganismos para ativação da cascata transcricional de seus metabólitos via indutiva, de forma que uma bactéria poderia tanto deixar de produzir compostos antifúngicos, como começar a produzi-los após o contato com outros microrganismos (YADAV et al., 2010).

As leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por cerca de 80 % das infecções por fungos em hospitais e podem se apresentar como superficiais ou invasivas, sendo que as superficiais acometem pele e mucosas inclusive de indivíduos saudáveis, diferente das invasivas, que estão associadas a pacientes críticos (COLOMBO et al., 2003). Outro dado importante é que de acordo com o CDC (2015), linhagens de *Candida* estão ficando cada vez mais resistentes aos medicamentos de primeira e segunda escolha, o que reforça ainda mais a necessidade e importância da pesquisa de substâncias bioativas contra este grupo.

Trabalhos mostram a produção de peptídeos antifúngicos produzidos por insetos, plantas, anfíbios e bactérias com atividade antimicrobiana (DAFFRE et al., 2001; YADAV et al., 2010; O'BRIEN e WRIGHT, 2011; DEUS et al., 2011). Stom e colaboradores (2002) investigaram um isolado de *Lactobacillus plantarum* quanto a produção de substâncias bioativas e observaram uma ampla atividade antagônica contra *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*, assim como Hasslof e colaboradores (2010) demonstraram pelo método da sobrecamada que isolados de *Lactobacillus* sp. foram capazes de inibir diferentes linhagens de *Candida albicans*.

É importante salientar que o principal fator de virulência das linhagens de *Candida* sp. é a sua capacidade de formar biofilme quando em processo de candidíase invasiva (NASCIMENTO, 2013). Estudos realizados por Bhattacharyya e colaboradores (2014) observaram a capacidade reduzida de linhagens de *Candida* sp. para formação de biofilme quando tratadas com filtrados de cultura de *Staphylococcus epidermidis*.

Levando em conta que o número de infecções causadas por fungos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, e, neste contexto, as infecções por *Candida* figuram como as mais prevalentes (KAUR et al., 2015), a busca por substâncias bioativas merece ser destacada como uma possível alternativa para os tratamentos convencionais nestes microrganismos eucariotos.

### **5.1.3 Atividade antagonista contra *Leishmania* sp.**

Inicialmente, foram utilizadas quatro espécies de *Leishmania*: *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. major* e *L. chagasi*, sendo as três primeiras relacionadas à leishmaniose cutânea e *L. chagasi* (sinonímia de *L. infantum*) responsável pela forma visceral da doença nas Américas, considerada de manifestação clínica mais grave e fatal quando não tratada (SANTOS et al. 2008). Dos 1.864 testes realizados para avaliação da produção de substância antagonista pelas amostras bacterianas, foram observados 472 eventos de inibição confirmados (25,3 %) sendo destes: 51 (10,8 %) contra formas promastigotas de *L. braziliensis*, 36 (7,6 %) contra formas promastigotas de *L. major*, 24 (5 %) contra formas promastigotas de *L. chagasi* e 361 (76,5 %) contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, considerando as réplicas técnicas e biológicas. Observa-se com estes resultados que a *L. amazonensis* foi a espécie mais sensível aos compostos bacterianos e *L. braziliensis* a menos sensível. Estes resultados já eram esperados, visto que diferenças de sensibilidade entre as espécies de *Leishmania* têm sido previamente reportado para várias drogas, incluindo as de referência para o tratamento das leishmanioses, tais como os antimoniais pentavalentes, anfotericina B e miltefosina (MINODIER e PAROLA 2007; DE MORAIS-TEIXEIRA et al., 2011).

As leishmanioses, doenças causadas pelas espécies acima relatadas do parasito, são doenças tropicais negligenciadas, o que significa dizer que menos de 1 % das novas drogas produzidas são destinadas ao tratamento desta parasitose (OPAS, 2008). Os resultados aqui apresentados com esses primeiros eventos de inibição do crescimento de *Leishmania* pelas amostras candidatas investigadas reforça a hipótese do nosso trabalho em se considerar a produção de substâncias bioativas de amplo espectro de ação produzidas por bactérias, provenientes de diferentes origens, contra parasitos tripanossomatídeos.

Diferentemente do que foi realizado para bactérias e fungos, os ensaios de prospecção com *Leishmania* necessitaram de vários ajustes metodológicos, como a concentração dos sobrenadantes das culturas bacterianas, antes testadas em unidades arbitrárias/mL e após a concentração por liofilização, em extratos extracelulares de 300 e 600 mg/mL com a concentração final nos testes de *Leishmania* sp. de 20 e 40 mg/mL.

A escolha destes valores levou em consideração a concentração de uso de bacteriocinas em testes de prospecção com uso da técnica da sobrecamada, uma vez que não existe na literatura científica o relato de substâncias bioativas produzidas por bactérias com ação em *Leishmania* (COBB e DENNY, 2010).

Assim, considerando o exposto sobre as dificuldades de cultivo do parasito e a necessidade de concentração das amostras, um total de 20 bactérias candidatas (Tabela 8), dos 472 casos positivos, foram selecionadas para os eventos seguintes de inibição de *Leishmania*, o que resultou em 38 eventos de antagonismo.

**Tabela 8.** Amostras bacterianas produtoras de compostos antagonistas contra espécies de *Leishmania* sp. BGN (bastonetes Gram-negativos) e CGP (cocos Gram-positivos).

<b>Amostras de BGN produtores (n=7)</b>	<b>Amostras de CGP produtores (n=13)</b>
<i>E. coli</i> (n=3)	<i>Staphylococcus</i> sp. (n=7)
<i>Pseudomonas</i> sp. (n=2)	<i>Enterococcus</i> sp. (n= 5)
<i>Salmonella Typhi</i> (n=1)	<i>Micrococcus luteus</i> (n=1)
<i>A. baumannii calcoaceticus Typhi</i> (n=1)	

Quanto à origem, sete amostras (35 %) vieram de fonte animal, duas (10 %) de fonte humana, três (15 %) de fonte alimentar e oito (40 %) amostras de referência (Apêndice 1, 2 e 8). Das sete amostras de BGN que mostraram atividade contra *Leishmania* apenas duas amostras de *E. coli* (BGN68 e BGN69) também apresentaram atividade contra bactérias. Dos 13 CGP produtores de compostos antagonistas, três amostras de estafilococos (CGP363, CGP364 e CGP27) e uma amostras de enterococos (CGP183) também inibiram o crescimento bacteriano. Nenhuma das amostras testadas que apresentaram inibição ao crescimento de *Leishmania* mostrou inibição em *Candida*.

Quanto a linhagem de *Leishmania* que sofreu inibição, 15 das 20 amostras bacterianas testadas apresentaram atividade contra *L. braziliensis*, 11 contra *L. major*, 13 contra *L. amazonensis* e 8 contra *L. chagasi*.

Assim como para o descrito em relação ao potencial de inibição de bactérias, as amostras que se mostraram positivas nos testes com *Leishmania* poderiam sugerir a aleatoriedade do fenômeno considerando-se a ubiquidade bacteriana e sua habilidade de colonizar diferentes ambientes, nos quais, muitas vezes, a expressão de antagonismo poderia garantir vantagens ecológicas às bactérias produtoras, o que garantiria sua sobrevivência (RELMAN et al., 2009).

Por exemplo, o trabalho realizado por Cavalcanti e colaboradores (2004) mostraram infecção fúngica e bacteriana em lesões de cães diagnosticados com leishmaniose visceral canina, tendo sido isolado das lesões cutâneas desses animais *Staphylococcus* sp. e *Aspergillus* sp. Os autores consideraram que a presença de estafilococos está associada ao fato dele fazer parte da microbiota residente da pele do animal. Já a presença do bolor foi considerada como contaminação, uma vez que este é um fungo ambiental e saprófita e que pode fazer parte da microbiota transitória da pele. No entanto, os autores concluíram que a simples presença destes microrganismos nas lesões da leishmaniose indicariam que, quando em condições favoráveis, estes poderiam tornar-se agentes etiológicos de dermatites e agravar o quadro do animal.

Vera e colaboradores (2001) reforçaram o fato de que a prevalência de bactérias nas úlceras leishmanióticas é bastante comum, mas pouco relatada, e que dados clínicos (EDRISSIAN et al., 1990) mostraram que esta associação chega a 35,7 % das lesões de pacientes com suspeita clínica de leishmaniose cutânea. Dentre os observados, a presença de *S. aureus* é a mais relatada, o que corrobora com os dados de Oster e colaboradores (1985), Fontes e colaboradores (2005) e Gonçalves et al. (2009).

A análise de 31 pacientes com diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana para investigação de microrganismos nas lesões leishmanióticas revelou a presença de *S. aureus* em 95,2 % dos pacientes (FONTES et al., 2005). Esses mesmos autores detectaram a presença de *E. coli* (4,8 %), *Pseudomonas* sp. (4,8 %) e *Candida* sp. (14,3 %) nas lesões, e concluíram que a presença da *Leishmania* nas lesões induz a um efeito supressivo local que permitiria a sobrevivência de ambos, mas sugeriram que a relação entre os microrganismos pode não ser sempre sinérgica.

Estudos semelhantes foram realizados por Gonçalves e colaboradores (2009), que detectaram uma prevalência de 60 % de estafilococos nas lesões leishmanióticas e Layegh e colaboradores (2015), que observaram a presença de *S. aureus* em 52,3 % das amostras e *S. epidermidis* em 9,5 %. Estes últimos autores enfatizaram que uma das maiores complicações nos casos de

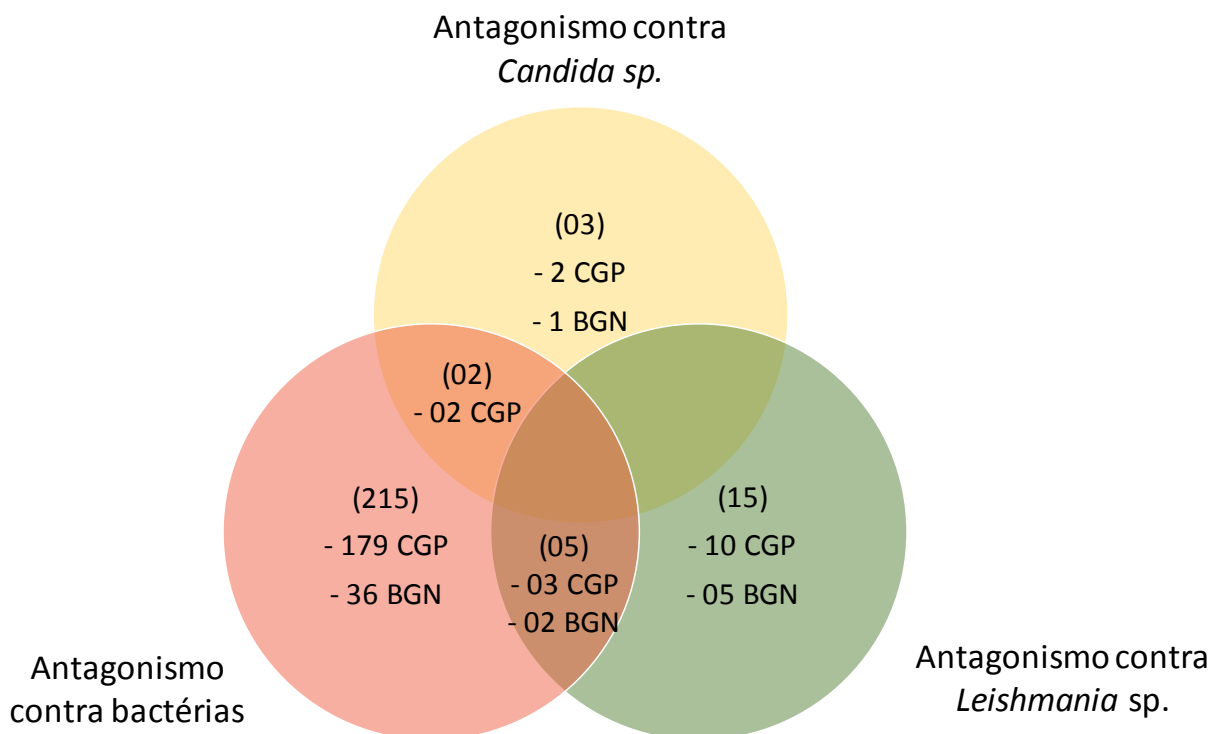
leishmaniose cutânea é a infecção bacteriana secundária, que pode prolongar a duração da doença, aumentar a destruição do tecido e resultar em cicatrizes. No estudo de Ziaei et al. (2008), a presença de *S. aureus* foi relatada em 69,3 % das amostras e indicaram uma incidência elevada de lesões ulceradas em relação as não-ulceradas nos pacientes com infecção bacteriana secundária.

#### **5.1.4 Sobreposição do espectro de ação e perfil antagonista**

Analisando os três ensaios de antagonismo (bacteriano, fúngico e parasitário) para caracterização inicial do espectro de ação das amostras testadas, foi possível observar um total de 252 amostras positivas, o equivalente a 54% do que foi investigado, sendo que duas amostras de CGP (CGP41 e CGP60) produziram antagonismo tanto para bactérias como para *Candida*; outras três amostras de cocos (CGP27, CGP363 e CGP364) mostraram-se antagonistas ao crescimento bacteriano e à *Leishmania* sp. Não observamos amostras de CGP com espectro de ação contra *Candida* e *Leishmania* ao mesmo tempo. Dentre os BGN, não observamos amostras capazes de inibir bactérias e fungos ao mesmo tempo, assim como também não observamos antagonismo combinado em *Candida* e *Leishmania*. No entanto, duas amostras de BGN (BGN68 e BGN69) foram capazes de inibir tanto o crescimento de bactérias quanto o do parasito. Não foram observadas amostras com perfil antagônico aos três grupos de células-alvo testadas (Figura 10).

Um total de 226 amostras foram negativas quanto a produção de substância antagonista nas condições experimentais utilizadas.



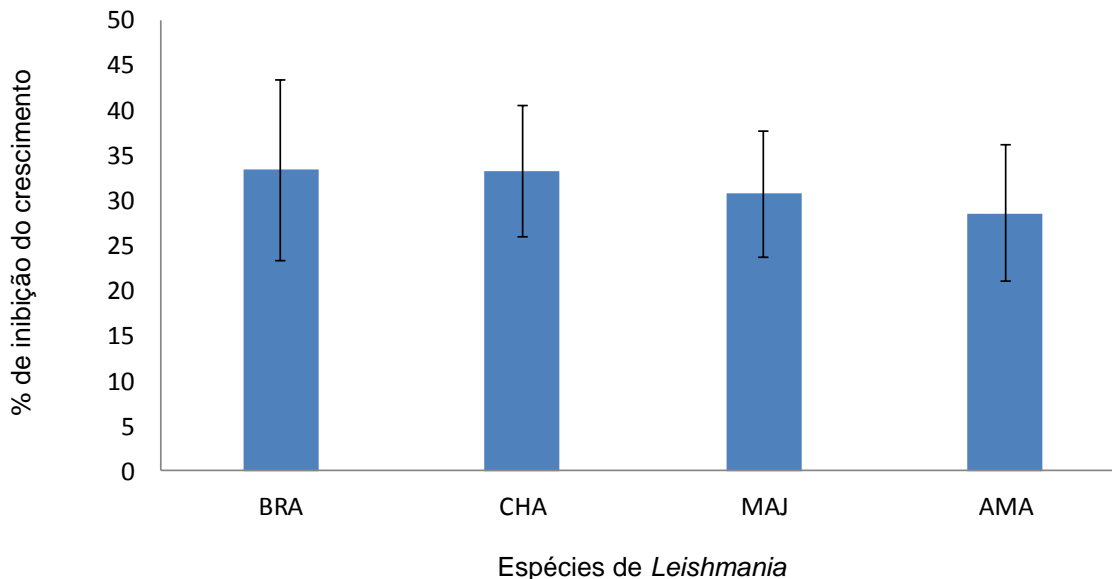


**Figura 10.** Diagrama representativo de espécimes produtoras de compostos antagonistas que resultaram em testes positivos de inibição frente ao grupo de células alvo avaliadas.

Trabalhos na literatura também evidenciam a produção de compostos inibitórios produzidos por células com antagonismo a mais de um microrganismo alvo, corroborando aos achados do nosso estudo e mostrados na figura 10. A interação do AMP pode variar conforme tamanho da molécula, anfipaticidade e mecanismo de ação (McGUIRE e KULKARNI, 2010).

## 5.2 Avaliação da inibição de formas promastigotas de *Leishmania sp.*

Os resultados de inibição dos extratos brutos provenientes das 20 amostras bacterianas selecionadas em formas promastigotas das quatro espécies de *Leishmania* estão apresentados no Apêndice 8 e compilados na Figura 11.



**Figura 11.** Potencial anti-*Leishmania* de extratos bacterianos brutos extracelulares (Cf= 20.0 mg/mL) em promastigotas de *L. amazonensis* (AMA), *L. braziliensis* (BRA), *L. chagasi* (CHA), *L. major* (MAJ), após 72 horas de tratamento.  $p=0,6071$  (one-way-ANOVA).

Não foram observadas diferenças significativas entre a comparação dos valores médios da porcentagem de inibição de *Leishmania* pelos extratos bacterianos testados ( $p= 0,6071$ ). O valor médio de inibição para BRA foi de 33 %, assim como para CHA, seguidos de MAJ (30,7 %) e AMA (29 %).

Dentre as amostras bacterianas testadas, os extratos provenientes das amostras CGP162, CGP360 e BGN97 (Apêndices 2 e 3) se destacaram por apresentar valores médios de inibição mais satisfatórios que as demais amostras testadas (Apêndice 8). Refere-se como satisfatório a amostra bacteriana que gerou antagonismo ao crescimento de *Leishmania* nos ensaios de inibição, bem como aquelas que tiveram uma produção constitutiva da substância antagônica, isto é, aquelas que durante todo o ensaio de prospecção foram capazes de manter a atividade anti-*Leishmania* nas réplicas biológicas independente de fatores de indução.

Os valores médios de inibição em formas promastigotas de *Leishmania* estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Valores de inibição das amostras bacterianas escolhidas para os ensaios contra formas promastigotas de *Leishmania* sp.

Espécies de <i>Leishmania</i>	% de Inibição do crescimento de <i>Leishmania</i> sp. pelos extratos bacterianos <sup>b/c</sup> após 72 horas de incubação		
	CGP162 <sup>a</sup>	CGP360 <sup>a</sup>	BGN97 <sup>a</sup>
AMA	28,0	24,00	24,12
BRA	26,68	32,57	s/a <sup>*</sup>
CHA	12,34	13,47	14,14
MAJ	13,85	24,32	18,16

AMA= *L. amazonensis*; BRA= *L. braziliensis*; CHA= *L. chagasi*; MAJ= *L. major*

Os testes foram feitos em duplicata em dias diferentes

<sup>\*</sup> Teste de inibição sem atividade detectada pelo método MTT- s/a

<sup>a</sup> concentração dos extratos- 20 mg/mL

<sup>b</sup> controle positivo – anfotericina B- 0,01 mg/ml (IC50)

<sup>c</sup> controle negativo – meio de cultura Warren

O isolado CGP162 refere-se a uma amostra de *Enterococcus* sp. isolada de fezes de pombo (SILVA et al., 2012). A candidata CGP360 refere-se a uma amostra de referência de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e o BGN97 é uma amostra de referência de *Escherichia coli* ATCC 11229. Embora essas amostras bacterianas não tenham apresentado atividade antagonista contra outras bactérias e *Candida* sp., existem relatos na literatura da atividade bacteriocinogênica por outras amostras destas mesmas espécies (NETZ et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2010; CEOTTO et al., 2012).

Em nosso estudo, a frequência de produção de substância antagonista por *Enterococcus* apresentou percentual de inibição contra *L. amazonensis* com um índice médio de 33 % (n=2), quando testado o extrato na concentração de 20 mg/mL e 27,6 % (n=2) quando testada à 40 mg/mL.

Os enterococos são bactérias encontradas principalmente associadas ao trato gastrointestinal do homem e de animais (SILVA et al., 2012). São patógenos oportunistas com importância considerável em pacientes imunodeprimidos e de unidades de tratamento intensivo, cujo fenômeno da resistência intrínseca aos antimicrobianos gera preocupação na comunidade científica (ANVISA, 2007). Na literatura já foram relatados peptídeos antimicrobianos produzidos por este gênero, como as enterococcinas com ação em linhagens bacterianas não correlacionadas (NASCIMENTO et al., 2010). Assim, em nosso trabalho, a observação de um índice médio de inibição de 30% reforça a importância destes microrganismos como potenciais veículos na produção de substâncias bioativas.

Dentre as substâncias bioativas produzidas por enterococos destaca-se a produção de enterococcinas, cuja atividade antagonista contra diferentes bactérias é bastante conhecida, principalmente em *Listeria* sp. (ANANOU et al., 2005; NES et al., 2007; TULINI, GOMES e DE MARTINIS, 2011). No entanto, não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que descreva a produção de substâncias bioativas por este gênero com perfil de ação em parasitos.

A candidata BGN97 refere-se a uma amostra de referência de *Escherichia coli*. Representante da família *Enterobacteriaceae*, a *E. coli* talvez seja a bactéria mais bem estudada no mundo todo. Encontrada no trato gastrointestinal do ser humano e de outros animais, é responsável por vários quadros infecciosos e se destaca por produzir um arsenal de substâncias antagonistas, como as colicinas, as primeiras bacteriocinas descobertas. Trabalhos mostram que dentre uma população de *E. coli*, pelo menos 30 % produz algum tipo de colicina (CURSINO et al., 2002; GORDON e O'BRIEN, 2006). No nosso estudo a frequência de observação de produção de substância antagonista por *E. coli* com atividade contra *Leishmania* variou de 5 a 27 % (n=2) quando utilizada a concentração de 20 mg/mL (apêndice 6) e índices de inibição de 52 % (n=2) quando concentrados a 40 mg/mL.

A candidata CGP360 é uma amostra de referência de *S. epidermidis*. Os estafilococos são um grupo de bactérias de interesse clínico-microbiológico (NASCIMENTO et al., 2009) cuja produção de bacteriocinas e substâncias

antagonistas está geralmente associada à presença de plasmídeos (NASCIMENTO et al., 2005). Dentre as linhagens de *Leishmania*, o maior percentual de inibição foi observado para *L. braziliensis* (32%, n=2), seguidas de *L. amazonensis* e *L. major* com 24 % (n=2), quando testados os extratos a 20 mg/mL, e de 27,8 % (n=2) em *L. amazonensis* quando testados os extratos a 40 mg/mL.

Quando analisado os valores médios de inibição, por tipo de *Leishmania*, independente do extrato, o valor de  $p$  foi igual a 0,5798 e, portanto, não significativo, o que justifica e enfatiza a análise de prospecção nas diferentes linhagens de *Leishmania*. Quando analisado cada extrato quanto ao seu perfil antagonista, a análise de variância mostrou valores de  $p= 0,044431$ , demonstrando que houve diferença significativa dos valores médios de inibição entre os extratos das três candidatas, o que nos fez pensar na escolha de um único extrato para as próximas etapas de prospecção.

Considerando o potencial de aplicação biotecnológica das substâncias antimicrobianas no tratamento das leishmanioses e levando em consideração a facilidade de cultivo e crescimento do parasito de forma satisfatória na maioria das passagens em meio de cultivo, optou-se por dar segmento aos experimentos de inibição com a espécie de *L. amazonensis*.

### **5.3 Avaliação do meio de cultivo na produção do composto antagonista**

Foram avaliados cinco diferentes meios de cultivo bacteriano para verificar a influência de seus componentes na produção da substância antagonista ao crescimento da espécie *L. amazonensis*. Os resultados referentes ao crescimento bacteriano nos diferentes meios de cultivo estão apresentados no Apêndice 5 e os dados de inibição de formas promastigotas de *L. amazonensis* nos respectivos meios na Tabela 10.

**Tabela 10.** Valores médios de inibição de *L. amazonensis* por extratos bacterianos obtidos após crescimento da bactéria produtora em diferentes meios de cultura

Meios de cultivo	% de Inibição de crescimento de <i>L. amazonensis</i> IFLA/Br/67/PH8 <sup>b/c</sup> após 72 horas de incubação		
	CGP162 <sup>a</sup>	CGP360 <sup>a</sup>	BGN97 <sup>a</sup>
BHI	23,80	31,62	25,53
TSB	32,97	21,45	36,20
NUT	0,33	4,25	10,27
BRU	s/a*	s/a	3,92
APT	s/a	s/a	s/a

BHI (Caldo infusão cérebro coração); TSB (Caldo triptose e soja); NUT (Caldo nutriente); BRU (Caldo Brucella); APT (Água peptonada)

Os testes foram feitos em duplicata em diferentes dias.

\*Teste de inibição sem atividade detectada pelo método do MTT- s/a

<sup>a</sup> concentração dos extratos- 40 mg/mL

<sup>b</sup> controle positivo – anfotericina B- 0,01 mg/ml (IC50)

<sup>c</sup> controle negativo – meio de cultura Warren

Diante dos resultados, foi possível verificar que os meios que ofereceram as melhores condições nutricionais para produção da substância antagonista ao crescimento de *L. amazonensis* foi o caldo BHI, com taxas de inibição que variaram de 23,8 a 31,62 %, e o caldo TSB, com taxas de 21,45 a 36,20 %. Já na água peptonada (APT) não se observou crescimento bacteriano, sendo a densidade óptica à 600 nm neste meio constante durante todo o período de investigação (dados não mostrados).

A produção de AMPs por bactérias é dependente de vários fatores, tais como meios de cultivo, metabolismo celular, método de detecção, entre outros (KRIER et al., 1998; NASCIMENTO, MORENO e KUAYE, 2008), o que pode levar a oscilações na cinética de produção desses peptídeos (SCHULZ et al., 2003) e a não detecção de atividade antagonista nos ensaios iniciais. Além disso, a estabilidade do AMP pode ser influenciada pelo pH, temperatura e a presença de proteases (DAVIES et al., 1998; KRIER et al., 1998; SCHULZ et al., 2003).

Em estudo realizado por Aasen e colaboradores (2000), a produção da bacteriocina sakacina por *Lactobacillus sakei* CCUG 42687 se mostrou altamente dependente do tipo e da suplementação utilizada para crescimento do microrganismo, tendo sua produtividade aumentada em  $0,1\text{mg l}^{-1} \text{t}^{-1}$  quando se utilizou suplementação com farelo de soja em comparação com o meio de referência. Esses dados corroboram com o nosso trabalho, que observou uma maior atividade antagonista quando as células são crescidas em meios ricos como o caldo BHI, em comparação com meios mais pobres como o caldo nutriente e diluentes, como a água peptonada.

Na investigação realizada por Ribeiro-Ribas *et al.* (2009), foi avaliada a estabilidade da bacteriocina produzida por um isolado de *Fusobacterium nucleatum*, e os resultados evidenciaram melhor estabilidade da atividade antagonista em pH 7 e 8 (37 °C por 2 horas) e às temperaturas de 37 °C por 48 horas e 4 °C por 72 horas. Mas, ainda assim, observou-se uma queda de 4 e 8 vezes, respectivamente, na atividade da bacteriocina em unidades arbitrárias por mililitro quando comparadas ao controle. Estes mesmos autores avaliaram também o efeito da bacteriocina após tratamento com as proteases papaína, quimio-tripsina, tripsina e proteinase K, e em todas as avaliações observaram a perda da atividade antagonista. Em estudo semelhante, Sousa e colaboradores (2013) avaliaram a expressão de uma bacteriocina produzida por *Shigella sonnei*, e encontraram estabilidade da fração intracelular precipitada a 75 % com sulfato de amônio por até 25 dias em pH 5 e 6 (37 °C) e por um período de tempo superior a 24 meses quando a mesma foi armazenada a -80 °C. Lima *et al.* (2009) também inferiram sobre a estabilidade de uma bacteriocina produzida por *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* em função do pH, temperatura e proteases e observaram a manutenção da atividade antagonista quando submetida a tratamento com pH 7 e 8 e a 37 °C por 48 horas.

Além dos fatores relatados acima (disponibilidade de nutrientes, pH e temperatura), Alves e colaboradores (2005) mostraram a influência de enzimas produzidas por *L. amazonensis* durante fase inicial de crescimento promastigota, como as proteinases cisteína-proteinases, metalo-proteinases, aspártico-

proteínases e serina-proteínases. Assim, a presença de proteínases solúveis de *L. amazonensis* no meio de interação com os extratos bacterianos testados, considerando que a atividade antagonista é proveniente de possíveis peptídeos, poderia explicar a sua degradação e a falta de atividade em alguns ensaios realizados.

Dentre as proteases produzidas por *Leishmaniasp.*, destaca-se a metalo-protease zinco dependente gp63, uma leishmanolisina de 63 kDa produzida por todas as espécies de *Leishmania*, principalmente na forma promastigota e que totaliza 1 % da proteína total produzida por esse parasito (SILVA-LOPES, 2010). Olivier e colaboradores (2012) afirmaram que gp63 é um importante fator de virulência de *Leishmania* e que está envolvida na proteção do parasito contra resposta de macrófagos e a proteínas do sistema complemento como c3b. Lynn *et al.* (2011) avaliaram o efeito do peptídeo sintético BMAP-28 em promastigotas e amastigotas de *L. major* e o papel da leishmanolisina na sobrevivência do parasito, e observaram que o peptídeo na isoforma D-BMAP-28 reduziu em 30 % a viabilidade das células quando usados a 0,5 µM, se comparado ao BMAP-28, que não interferiu na viabilidade celular. Além disso, os autores concluíram que o peptídeo e suas isoformas não foram afetados pela atividade proteolítica da leishmanolisina de *Leishmania*.

A concentração da substância antagonista é outro fator que influencia na prospecção de substâncias bioativas (SCHULZ *et al.*, 2003). A literatura relata diferentes concentrações de uso dos AMPs, incluindo aqueles antiparasitários, mas em quase todos os relatos, o peptídeo antimicrobiano já se encontra purificado ou semi-purificado (ALBEROLA *et al.*, 2004; BROGDEN, 2005; BRAND *et al.*, 2006; SANG e BLECHA, 2008; KUCKELHAUS *et al.*, 2009; KULKARNI *et al.*, 2009). Possivelmente um AMP presente, mas em concentrações diferentes a cada cultivo microbiano, poderia resultar em falta de homogeneidade dos resultados. As amostras bacterianas testadas nestes ensaios foram submetidas à liofilização, o que poderia resultar na concentração do peptídeo e uma melhor observação da atividade antagonista. Entretanto, a alta concentração dos extratos pode também ter uma influência negativa, pois com a liofilização outras

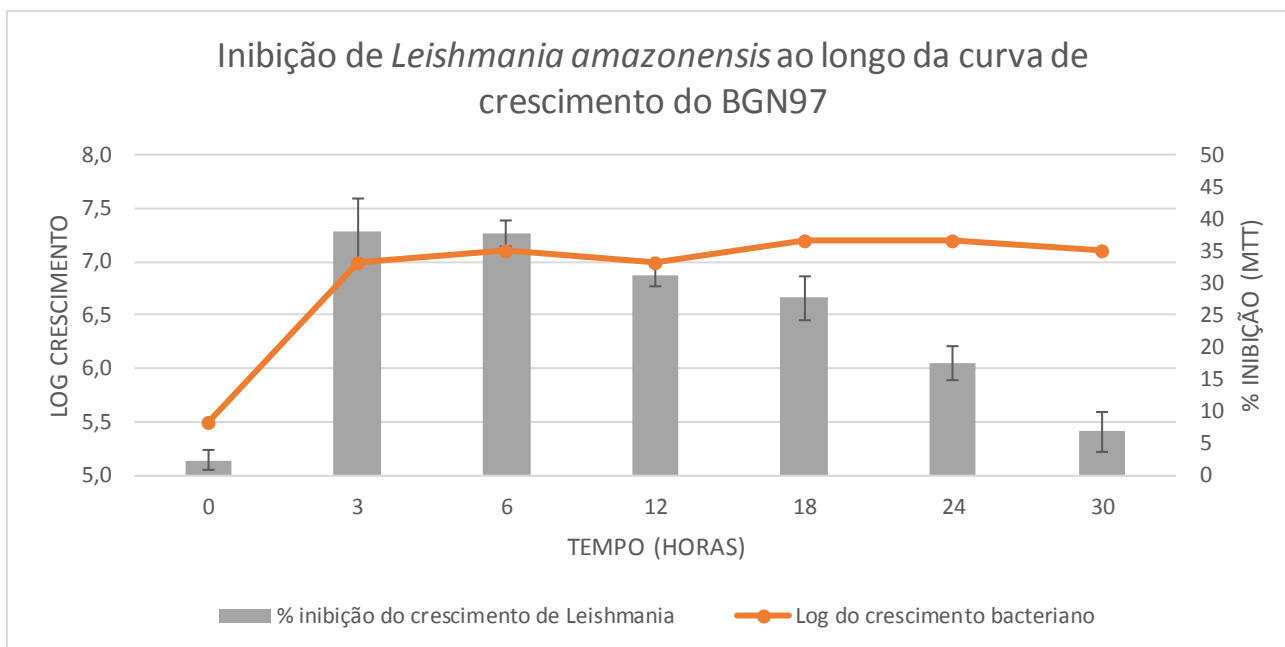


substâncias interferentes também podem ser concentradas, o que poderia reduzir seu efeito biológico (SCHULZ et al., 2003).

#### **5.4 Efeito inibitório do extrato bacteriano proveniente da melhor condição de cultivo**

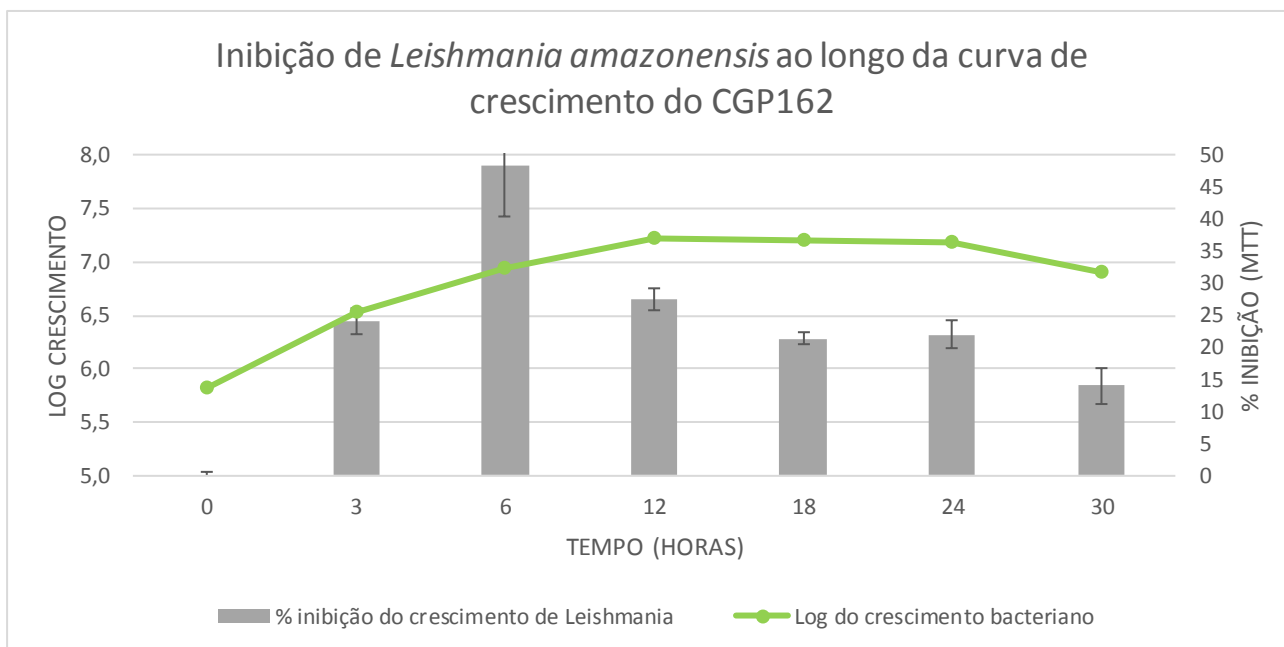
De maneira geral, entre todas as amostras bacterianas avaliadas em relação à produção de compostos antagonistas contra *Leishmania*, três linhagens mostraram maior potencial inibitório, com medidas de índice de inibição de crescimento promastigota de 58,95 % (BGN97) a 300 mg/mL, 48,75 % (CGP162) a 300 mg/mL e 32,99 % (CGP360) a 600 mg/mL (Apêndice 9). A facilidade de usar as amostras provenientes de linhagens de referência é que as informações genéticas e fisiológicas já foram bem descritas na literatura. Para estas linhagens de bactérias com potencial anti-*Leishmania*, extratos extracelulares foram obtidos ao longo da curva de crescimento bacteriano. Vários trabalhos mostram a produção diferencial de AMPs produzidos por bactérias no fim da fase logarítmica e no início da fase estacionária de crescimento (RILEY e WERTZ, 2002).

Os extratos obtidos ao longo da curva de crescimento da BGN97 foram capazes de inibir o crescimento de *L. amazonensis*, em taxas que variaram entre 5 e 38 %, sendo os melhores valores obtidos para o tempo de 3 e 6 horas de crescimento, que coincide com o final da fase logarítmica de crescimento da bactéria analisada (Figura 12). Esses dados corroboram com os relatados na literatura científica sobre a produção de bacteriocinas por bactérias Gram-negativas ativamente reguladas pelo operon SOS em resposta a escassez nutricional (KIM, TARR e PENFOLD, 2014).



**Figura 12.** Avaliação da produção de substâncias antagonistas com atividade em formas promastigotas de *L. amazonensis*, a partir de extratos brutos livres de células obtidos de cultura de *E. coli* (BGN97) em meio TSB, ao longo da curva de crescimento bacteriano. As barras indicam os valores médios referentes às taxas de morte da população de *Leishmania* (%); a linha indica os valores log UFC/mL de crescimento bacteriano.

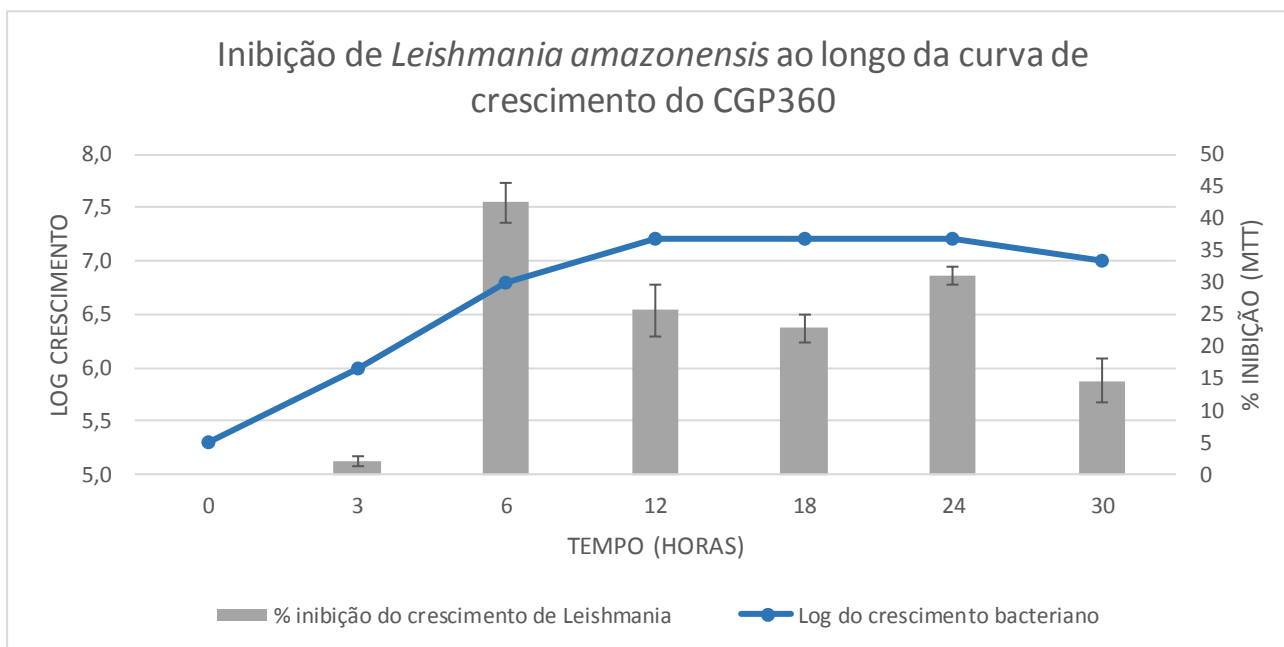
Os extratos obtidos ao longo da curva de crescimento da amostra CGP162 foram capazes de levar a morte *L. amazonensis*, em taxas que variaram entre 13 e 48 %, sendo o melhor valor obtido para o tempo de 6 horas de crescimento (Figura 13).



**Figura 13.** Avaliação da produção de substâncias antagonistas com atividade em formas promastigotas de *L. amazonensis*, a partir de extratos brutos livres de células obtidos de cultura de *Enterococcus* sp. (CGP162) em meio TSB, ao longo da curva de crescimento. As barras indicam os valores médios referentes às taxas de morte da população de *Leishmania* (%); a linha indica os valores log UFC/mL de crescimento bacteriano.

Esses dados corroboram com a literatura sobre uma possível mudança na expressão de genes que estão associados à escassez nutricional e produção de substâncias antagonistas no final da fase logarítmica e na fase estacionária de crescimento (BHUGALOO-VIAL et al., 1996; PAPAGIANNI, 2003; SALEEM et al., 2009).

Os extratos obtidos ao longo da curva de crescimento do CGP360 foram capazes de inibir o crescimento de *L. amazonensis*, em taxas que variaram entre 2 e 45 %, sendo o melhor valor obtido para o tempo de 6 horas de crescimento (Figura 14).



**Figura 14.** Avaliação da produção de substâncias antagonistas com atividade em formas promastigotas de *L. amazonensis*, a partir de extratos brutos livres de células obtidos de cultura de *Staphylococcus epidermidis* (CGP360) em meio BHI, ao longo da curva de crescimento. As barras indicam os valores médios referentes às taxas de morte da população de *Leishmania* (%); a linha indica os valores log UFC/mL de crescimento bacteriano.

### 5.5 Precipitação proteica das amostras na melhor condição de cultivo

As três amostras bacterianas selecionadas foram cultivadas nas melhores condições (meio de cultura e tempo de crescimento) e fracionadas com sulfato de amônio em três faixas consecutivas de precipitação (40, 70 e 100%) e avaliadas quanto a atividade em formas promastigotas de *L. amazonensis* pela técnica do MTT em diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 horas).

A precipitação de proteínas com o sulfato de amônio é uma metodologia clássica e amplamente utilizada como purificação parcial de extratos proteicos

complexos (BALCIUNAS *et al.*, 2013; WINGFIELD, 2016), como é o caso de um extrato bacteriano. A comparação da atividade do extrato bruto de amostras bacterianas e suas frações precipitadas em sulfato de amônio estão apresentados na tabela 10 e os resultados representam a média de inibição de três experimentos independentes, realizados em duplicata, após 24, 48 e 72 horas de tratamento. Como pode ser observado, a capacidade de inibição ao crescimento de *L. amazonensis* dos extratos precipitados e concentrados das amostras CGP162, CGP360 e BGN97 permaneceu ativa, apesar de parcial, após a etapa de precipitação, sugerindo que a substância inibidora tem caráter proteico. No geral, houve variação da atividade anti-*Leishmania* das amostras em todos os tempos e frações analisados, não sendo possível estabelecer padrões, tais como tempo ou precipitação dependentes.

**Tabela 11.** Comparação da atividade do extrato bruto de amostras bacterianas selecionadas e suas frações precipitadas em sulfato de amônio em formas promastigotas de *L. amazonensis* em diferentes tempos de tratamento.

Faixa de precipitação (fração)	% de Inibição de crescimento de <i>L. amazonensis</i> IFLA/Br/67/PH8 <sup>b/c</sup>								
	CGP162			CGP360			BGN97		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
0-40% (E-40) <sup>a</sup>	25,66	28,43	21,61	60,66	27,08	14,0	14,93	32,96	15,06
40-70% (E-70) <sup>a</sup>	21,22	16,31	21,10	29,94	15,77	15,66	6,38	29,27	14,82
70-100% (E-100) <sup>a</sup>	11,67	31,24	26,21	31,39	39,25	2,79	8,63	34,03	22,89
<b>Extrato Bruto</b> <sup>a</sup>	41,92	67,7	70,68	28,39	30,53	27,76	54,37	66,90	41,60

<sup>a</sup> concentração dos extratos- 20 e 40 mg/mL

<sup>b</sup> controle positivo – anfotericina B - 0,01 mg/ml (IC50 após 72 horas de tratamento)

<sup>c</sup> controle negativo – meio de cultura Warren

Os valores representam a média de três experimentos realizados em duplicata.

O fracionamento das amostras em faixas de precipitação graduais não conferiu às frações valores de inibição superiores aos relatados anteriormente

para formas promastigotas, com exceção do valor de inibição da fração E-40 da amostra CGP360 com leitura após 24 horas (60,66 %), cujo valor de inibição foi mais do que o dobro do observado anteriormente (28,39 %). Isso pode ser explicado em função de uma mesma proteína poder ser precipitada em diferentes faixas de concentração com este sal, como já descrito por Lopes e Fernandes (2006). Outro fator que poderia justificar menores taxas de inibição do extrato precipitado em relação ao extrato bruto é o fato de que algumas proteínas poderiam atuar de forma sinérgica (LIMA, 2010), ou trabalhar em sinergismo com outros componentes do metabolismo bacteriano, como os ácidos graxos, por exemplo, e cuja etapa de fracionamento com sulfato de amônio poderia inferir na redução da atividade antagonista.

A concentração da substância antagonista após o fracionamento proteico também pode ter influenciado nas taxas de inibição encontradas, uma vez que a substância bioativa pode não estar presente na mesma concentração nas faixas de precipitação, se comparado ao extrato bruto total.

Classicamente, os testes de avaliação de atividade antagonista bacteriana envolvem testes iniciais em substratos sólidos de avaliação qualitativa onde halos de inibição bacteriana ou fúngica são observados (ROMEIRO, 1989). A natureza do sistema (meios de cultura sólidos) permite a caracterização inicial da natureza química da ou das substâncias relacionadas ao fenômeno, bem como a modulação do efeito pela variação nos tamanhos dos halos de inibição e condições de cultivo das amostras produtoras (FURTADO, 2010). Esse tipo de controle experimental pode não ter sido alcançado pela natureza dos sistemas de teste anti-*Leishmania* que envolvem solubilidade, estabilidade das moléculas bioativas, fatores interferentes de origem bacteriana e de culturas de *Leishmania*, dentre outros. Todos esses fatores interferentes, não avaliados neste estudo preliminar, poderiam contribuir para a variabilidade nos resultados observados.

De qualquer forma, apesar de notada uma variação nas taxas de inibição de *Leishmania*, em todas as repetições temporais do ensaio de prospecção foi percebida a redução do crescimento do parasito na presença dos três extratos

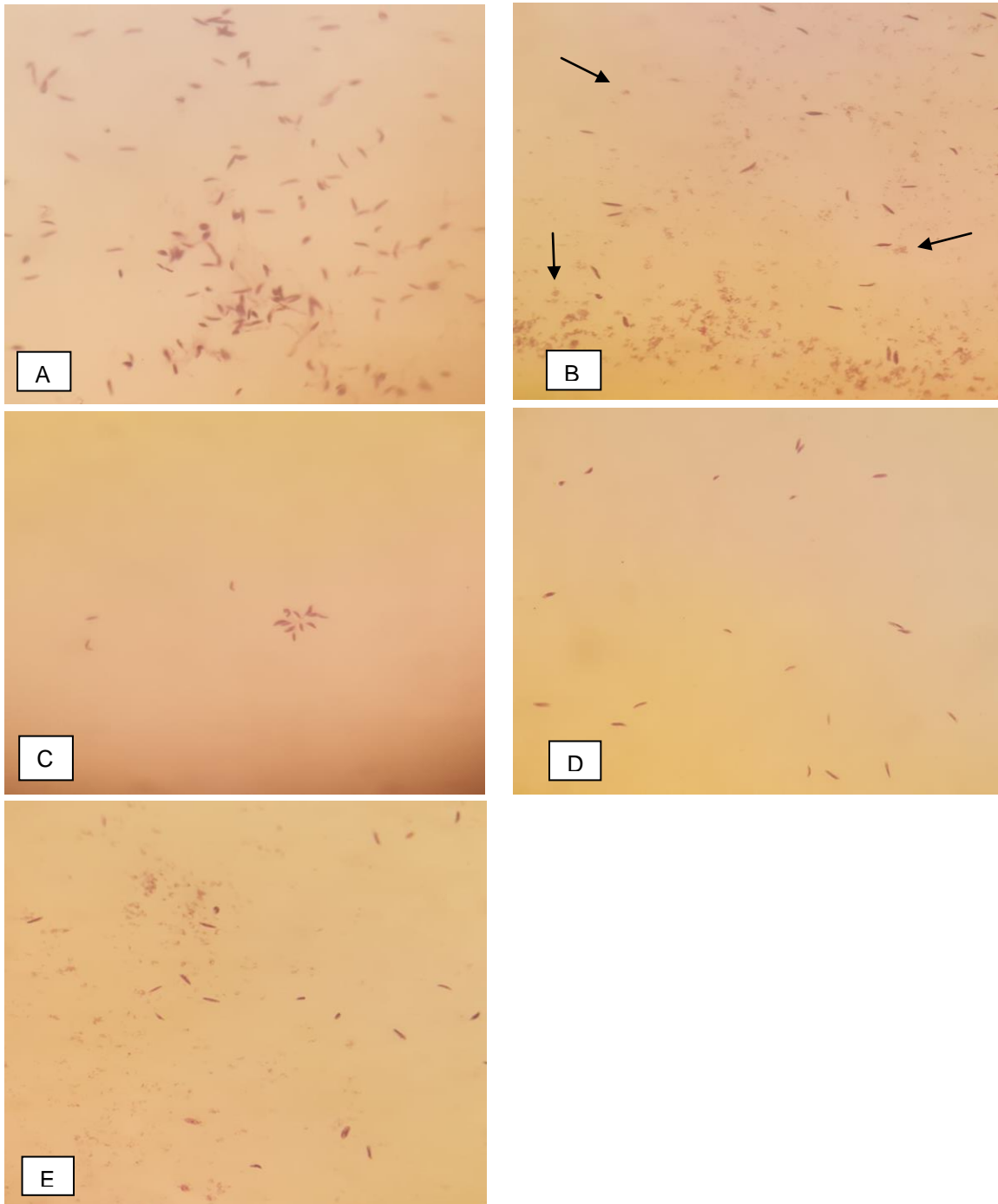
bacterianos candidatos (CGP162, CGP360 e BGN97) em relação ao controle, o que confirma o seu caráter antagonista de ação.

Diante do panorama de inibição apresentado nas Tabelas 8 e 10 e levando em consideração que a candidata CGP360 é uma amostra de referência, isto é, com fisiologia bem caracterizada, sequência do genoma já descrito na literatura (ZHANG et al., 2003), e boa reprodutibilidade nos testes anti-*Leishmania*, optou-se por dar segmento aos experimentos de inibição com esta amostra. O que facilitaria futuros ensaios de predição do peptídeo em bancos de dados e sua caracterização total, como realizado por Amaral et al., 2012.

O efeito inibitório das frações precipitadas sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* também foi observado por microscopia de luz, em paralelo ao teste do MTT (Figuras 15 e 16). Quando as formas promastigotas do parasito foram crescidas na presença do extrato bruto bacteriano (40 mg/ml) observou-se um arredondamento das células (setas nas Figuras 15 B e 16 B), com perda de morfologia característica e a presença de muitos debríds celulares, em todas as triplicatas e réplicas realizadas. Sugere-se que essas alterações sejam em função da atividade antagonista do composto bacteriano, uma vez que não foram observadas no controle não tratado (Figura 15 A e Figura 16 A).

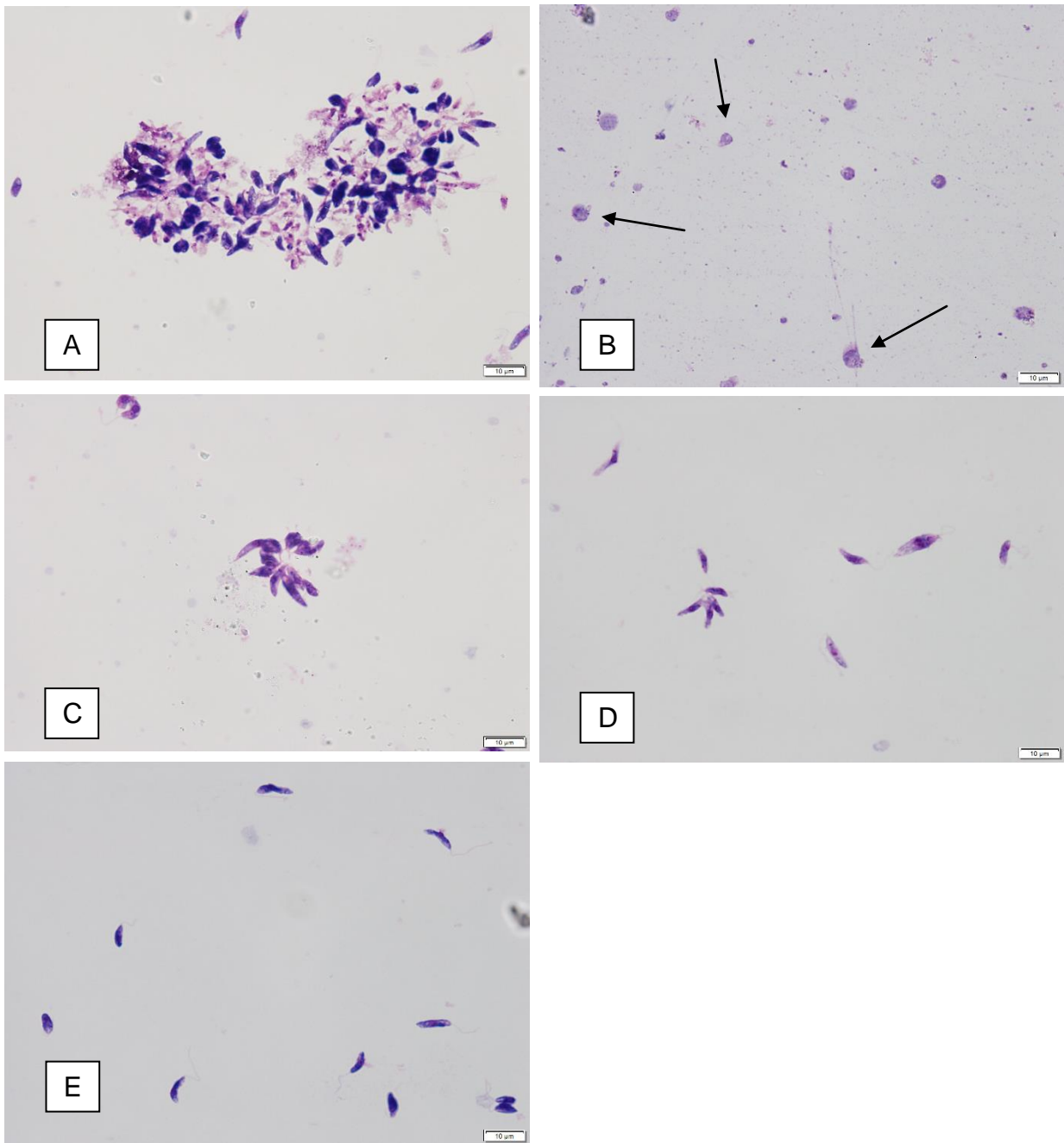
A literatura descreve que a principal ação de peptídeos bacterianos ocorre na membrana plasmática das células (TEMPONE et al., 2011), levando ao rompimento da mesma ou à perda intensa do gradiente eletrolítico. Nossos dados são preliminares e sem a caracterização total do peptídeo bacteriano não é possível afirmar tal mecanismo de ação, mas ensaios posteriores com marcadores fluorescentes tais como iodeto de propídeo ou por microscopia eletrônica de transmissão poderão fornecer maiores informações sobre o efeito do composto bacteriano neste parasito.

Dentre as frações precipitadas (Figuras 15 C-E, Figuras 16 C-E), as alterações morfológicas, apesar de existirem, foram menos evidentes em comparação com os parasitos tratados com o extrato bruto, mas é possível observar ligeira turgidez nas formas promastigotas em relação ao controle negativo.



**Figura 15.** Fotografias representativas do tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* com extrato bacteriano da amostra *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (CGP360) a 40 mg/ml e frações precipitadas com sulfato de amônio (40 mg/ml), após 24 horas de tratamento, corados com Giemsa e observados em microscopia de luz (aumento 40x). **A-** representa o controle negativo (sem adição de extratos ou frações precipitadas); **B-** tratamento com extrato bruto (seta indica arredondamento da forma promastigota); **C-** tratamento com a fração precipitada E-40; **D-** tratamento com a fração precipitada E-70 e **E-** tratamento com a fração precipitada E-100.





**Figura 16.** Fotografias representativas do tratamento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* com extrato bacteriano da amostra de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (CGP360) a 40 mg/ml e frações precipitadas com sulfato de amônio (40 mg/ml), após 24 horas de tratamento, corados com Giemsa e observados em microscopia de luz (aumento 100x, barra=10 µm). **A-** representa o controle negativo (sem adição de extratos ou frações precipitadas); **B-** tratamento com extrato bruto (seta indica arredondamento da forma promastigota); **C-** tratamento com a fração precipitada E-40; **D-**tratamento com a fração precipitada E-70 e **E-**tratamento com a fração precipitada E-100.

## 5.6 Avaliação da toxicidade em macrófagos e testes em amastigotas

Visto que a fração precipitada E-40 da amostra CGP360 apresentou a melhor atividade anti-*Leishmania* em formas promastigotas de *L. amazonensis*, a mesma foi submetida para avaliação da toxicidade em macrófagos peritoneais e avaliação de inibição de formas amastigotas. Os resultados preliminares estão apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12.** Efeito do extrato bruto e precipitado (fração E-40) de CGP360 em macrófagos peritoneais de camundongos e em formas amastigotas de *L. amazonensis*

Extrato CGP360	% toxicidade à macrófagos peritoneais (N=2)		% inibição de formas amastigotas (N=2)	
E-40 <sup>a</sup>	31,05	62,79	0	0
E-40 <sup>b</sup>	0	0	0	0
Bruto <sup>a</sup>	25,27	0	55,8	69,90
Bruto <sup>b</sup>	0	0	52,24	28,77

<sup>a</sup>Extrato a 40 mg/mL; <sup>b</sup>Extrato a 20 mg/mL (concentração final)

N=2 refere-se as réplicas biológicas do experimento

Como pode ser observado, o extrato bruto da amostra CGP360 apresentou elevado percentual de inibição das formas amastigotas de *L. amazonensis*, além de apresentar uma toxicidade diminuída ou nenhuma em macrófagos peritoneais. Isto aponta para a seletividade do extrato bruto, sendo muito mais tóxico para os parasitos intracelulares do que para os macrófagos, consideradas as principais células hospedeiras para *Leishmania* (SEIFERT et al. 2010).

Entretanto, a fração E-40 não apresentou atividade de inibição das formas amastigotas, e, além disso, apresentou alta toxicidade em macrófagos. Convém ressaltar que no caso dos ensaios em formas amastigotas de *L. amazonensis*,

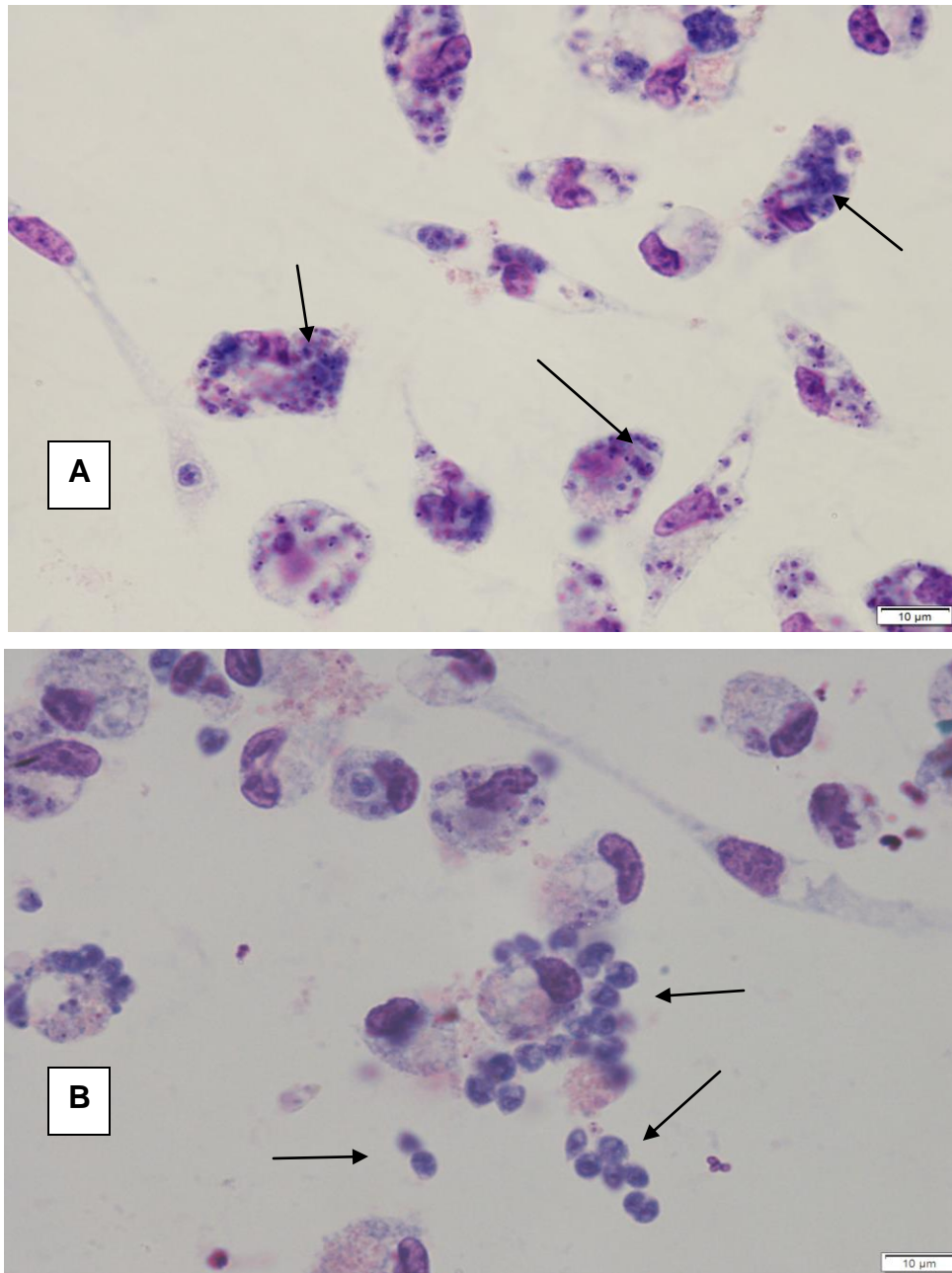
foram observadas diferenças de níveis de infecção entre os dois experimentos aqui relatados, sendo que no segundo, houve um maior número de macrófagos infectados quando comparados com o primeiro teste. Níveis de infecção e cargas parasitárias podem influenciar o efeito de novos compostos sobre os amastigotas intracelulares de *Leishmania* (NEAL e CROFT 1984; SEIFERT et al. 2010).

Testes em formas amastigotas de *Leishmania* são muito mais árduos e laboriosos, pois os parasitos são intracelulares obrigatórios e requerem uma célula hospedeira (MONTE-ALEGRE et al. 2006). Entretanto, ensaios com estas formas do parasito são considerados como modelo-ouro para a pesquisa *in vitro* de novos compostos biologicamente ativos em *Leishmania* (VERMEERSCH et al. 2009).

São necessários experimentos adicionais no intuito de melhor definir o efeito do extrato extracelular de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (CGP360) e da fração E-40 em formas amastigotas de *L. amazonensis*, mas os resultados aqui obtidos demonstram o potencial efeito inibitório de compostos bacterianos neste protozoário, abrindo perspectivas para novos estudos.

A observação das lâminas de formas amastigotas ao microscópio de luz (Figura 17) permitiu evidenciar um número reduzido de amastigotas nos macrófagos quando tratados com o extrato bruto, tanto na concentração de 40 quanto de 20 mg/mL (Figura 17- B, com setas indicando formas amastigotas fora dos macrófagos), se comparado ao controle positivo (Figura 17- A, com setas indicando os macrófagos infectados). No entanto, o tratamento com a fração E-40 nas duas concentrações testadas, evidenciou muitos amastigotas por campo e com alteração parcial da morfologia dos macrófagos peritoneais, sugerindo toxicidade celular (fotos não mostradas).

No trabalho de revisão apresentado por Cobb e Denny (2010), 20 peptídeos antimicrobianos com ação em *Leishmania* sp. foram descritos pelos autores, sendo que destes, apenas sete foram testados também em formas amastigotas, evidenciando que o perfil de ação dos AMPs pode atuar sobre uma forma e não necessariamente sobre a outra.



**Figura 17.** Fotografias representativas do tratamento de amastigotas de *Leishmania amazonensis* com extrato bacteriano da amostra CGP360, após coloração com Giemsa e observados em microscopia de luz (aumento 100x, barra=10 µm). **A-** representa o controle negativo (macrófago infectado, não tratado, com setas indicando a presença de formas amastigotas); **B-** tratamento com extrato bruto a 20 mg/mL (setas indicando a presença de formas amastigotas fora dos macrófagos).

Diante do exposto, é notória a capacidade antagonista de peptídeos antimicrobianos isolados de diferentes fontes frente a parasitos como *Leishmania* sp., destacando-se principalmente aqueles isolados de secreção de anfíbios, crustáceos, insetos, plantas e de células humanas (ALBEROLA et al., 2004). Mas até o presente trabalho não existe na literatura científica a descrição de peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias com ação anti-parasitária, o que confirma que os achados encontrados até o momento merecem continuidade e novas investigações, a fim de elucidar melhor o fenômeno antagonista.

# Considerações Finais

---

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, diante do desafio no tratamento de doenças infecto-parasitárias, mediante o fenômeno cada vez mais crescente da resistência microbiana, somado ao fato dos fármacos disponíveis serem altamente tóxicos ou apresentarem efeito teratogênico, faz-se necessária a busca por substâncias bioativas de diferentes origens que possam oferecer alternativas no futuro, como moléculas antibióticas de interesse clínico-microbiológico.

Sabendo-se que menos de 1% dos novos fármacos desenvolvidos no mundo é destinado ao tratamento das doenças negligenciadas, onde as leishmanioses se enquadram, e a observação da atividade antagonista bacteriana, relacionada à produção de peptídeos antimicrobianos com potencial de inibição do crescimento de formas promastigotas do parasito vem sustentar o compromisso deste trabalho em demonstrar um potencial biotecnológico ainda não relatado na literatura científica, e que apesar de preliminar, alavanca a busca pela compreensão desse fenômeno antagonista.

Considerando-se também que os ensaios de prospecção foram realizados com amostras bacterianas provenientes de diferentes ambientes, com diferentes pressões seletivas, a observação da produção de substâncias antagonistas *in vitro* demonstra uma enorme plasticidade fenotípica que esses microrganismos têm para se adaptar à ambientes competitivos e diversos.

Assim, novos trabalhos devem ser realizados para caracterização detalhada destes peptídeos bacterianos com potencial atividade antagonista contra *Leishmania*, bem como determinação de seu mecanismo de ação.

# Conclusões

---



## 7 CONCLUSÕES

- O ensaio de prospecção de substâncias antagonistas evidenciou 242 amostras com potencial atividade inibitória ao crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, 10 amostras com potencial atividade em *Candida* sp. e 20 amostras com potencial atividade em *Leishmania* sp.;
- Nenhuma das amostras demonstrou antagonismo simultâneo para os três grupos de células alvo testadas. No entanto, observou-se que duas amostras tiveram inibição em espécimes bacterianos e *Candida* sp. e cinco amostras tiveram inibição em espécimes bacterianos e *Leishmania* sp.
- Dentre as espécies produtoras de substância antagonista estão representantes dos gêneros *Staphylococcus* e *Enterococcus* e da espécie *Escherichia coli*.
- *Candida glabrata* foi a espécie que teve mais inibições observadas no perfil antifúngico, assim como *Leishmania amazonensis* no perfil anti-parasitário.
- Não houve diferença significativa no perfil inibitório dos extratos de amostras bacterianas contra espécies de *Leishmania* quando comparados a porcentagens médias de inibição de extratos a 20 mg/mL.
- A precipitação de proteínas com sulfato de amônio a partir do extrato bruto extracelular e a manutenção do percentual inibitório de promastigotas de *L. amazonensis* sugere o caráter proteico da substância antagonista.
- Dentre as frações precipitadas obtidas a partir das três amostras bacterianas selecionadas (CGP162, CGP360 E BGN97), a que teve a faixa de inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* mais constante e com valores médios mais altos foi a fração E40, seguida da E100 e da E70 de CGP360. O extrato bruto destas amostras inibiu em média 47,76 % de *L. amazonensis*.
- A fração do extrato bruto obtido a partir de CGP360 e precipitada a 40 % da amostra CGP360 apresentou valor de inibição duas vezes superior nas formas promastigotas de *L. amazonensis* após 24 horas de tratamento quando comparada ao extrato bruto.

- Os ensaios de citotoxicidade em macrófagos mostraram que apesar de promissora atividade anti-*Leishmania* em formas promastigotas de *L. amazonensis*, a fração E-40 não inibiu o crescimento de formas amastigotas nas concentrações de 20 e 40 mg/mL, e, ainda, se mostraram tóxicas à macrófagos peritoneais na maior concentração de uso, com média de toxicidade de 47 %. No entanto, o extrato bruto da amostra CGP360 concentrado a 40 mg/mL mostrou-se promissor em formas amastigotas, uma vez que não apresentou toxicidade para macrófagos peritoneais e ainda apresentou média de inibição de 60 % nas formas intracelulares do parasito.

# Referências

---

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aasen I. M.; Mùretrù, Á T; Katla, Á T; Axelsson, Á L., Storrù, I. Influence Of Complex Nutrients, Temperature and pH on Bacteriocin Production By *Lactobacillus Sakei* Ccug 42687. **Appl Microbiol Biotechnol**, 53: 159-166, 2000.

Alberola, J.; Rodriguez, A.; Francino, O.; Roura, X.; Rivas, L.; Andreu, D. Safety and efficacy of antimicrobial peptides against naturally acquired Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n°2, p.641-43, 2004.

Amaral, AC; Silva, ON; Mundim, NCCR; Carvalho, MJA; Migliolo, L; Leite, JRSA; Prates, MV; Bocca, AL; Franco, OL; Felipe, MSS. Predicting antimicrobial peptides from eucaryotic genomes: *In silico* strategies to develop antibiotics. **Peptides**, 37, 301-308, 2012.

Amiche, M.; Seon, AA.; Wroblewski, H.; Nicolas, P. Isolation of dermatoxin from frog skin, anantibacterial peptide encoded by a novel member of the dermaseptin genes Family. **Eur. J. Biochem.**, 267 (14), 4583-4592, 2000.

Apolônio AC, Carvalho MA, Bemquerer MP, Santoro MM, Pinto SQ, Oliveira JS, Santos KV, Farias LM. Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by *Eikenella corrodens*. **J Appl Microbiol**. 104(2):508-514, 2008.

Andersson D.I.; D. Hughes, J.Z. Kubicek-Sutherland. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Drug Resistance Updates**, 26, 43–57, 2016.

Bahar, AA; Ren, D. Antimicrobial Peptides. **Pharmaceuticals**, 6, 1543-1575, 2013.

Balciunas, E.M; Martinez, FAC; Todorov, SD; Franco, BDG; Converti, A; Oliveira, RPS. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. **Food Control**, 32, 134-142, 2013.

Benitez, LB. **Caracterização de peptídeos antimicrobianos de *Bacillus amyloliquefaciens* com atividade antibacteriana, antifúngica e amebicida.** Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

Braga FG, Bouzada MLM, Fabri RL et al. Anti-Leishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **J Ethnopharmacol.** 111:396-402, 2007.

Brand, G.D. Leite, J.R.; De Sá Mandel, S.M. et AL. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 347, 739-746, 2006.

Braun V, Pilsel H, Gross P. Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. **Arch Microbiol.** 161(3):199-206, 1994.

Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat. Rev. Microbiol.**3, 238–250, 2005.

Brogden, K.A. Perspectives and peptides of the next generation, in **Prokaryotic Antimicrobial Peptides.** From Genes to Applications, eds D. Driderand S. Rebuffat (NewYork,NY:Springer), 423–439, 2011.

Brogden, N.K; Brodgen, K.A. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals. **Int.J. Antimicrob. Agents** 38, 217–225, 2011.

Bhugaloo-vial, P. et al. Purification and amino acid sequences of piscicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 62, n. 12, p. 4410-4416, Dec. 1996.

Brown KL.; Hancock REW. Host defense peptides from invertebrates– emerging antimicrobial strategies. **Immunobiology**. V. 211, p. 315-322, 2006.

Carvalho, AC., **Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos isolados das secreções cutâneas de anuros dos gêneros *Proceratophys*, *Physalaemus* e *Hypsiboas***. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)- Fundação Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Lloubès R, Postle K, Riley M, Slatin S, Cavard D. Colicin biology. **Microbiol Mol Biol Rev.** 71(1):158-229, 2007.

Castro, AP; Fernandes, GR; Franco, OL. Insights into novel antimicrobial compounds and antibiotic resistance genes from soil metagenomes. **Front. Microbiol.**, 5:489,2014.

Cavalcante, MP. et al. Investigação de substância tipo bacteriocinas em amostras não humanas e ambientais. **Facider-Revista Científica**, v.3, n.3, 2013.

Cavalcanti, MP; Faustino, MAG; Alves, LC; Borba, MAC; Silva, LBG; Mota, RA. Infecções micóticas e bacterianas em lesões cutâneas de cães parasitologicamente positivos para *Leishmania chagasi*. **Rev. Bras. Cien. Vet.**, v.11, n.3, p.160-162, set/dez, 2004.

Ceoto, H. et al. *Staphylococcus* spp.: eles nem sempre são os vilões. **Microbiologia in Foco**, v. 18, p. 28-31, 2012.

Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int J Food Microbiol.** 71(1):1-20, 2001.

Cobb, S.L.; Denny, P.W. Antimicrobial peptides for leishmaniasis. **Current opinion in investigational drugs**, 11 (8), p 868-875, 2010.

Colombo, A. L.; Guimarães, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599–607, 2003.

Costa, FG. **Caracterização do efeito antifúngico de peptídeos presentes na peçonha de escorpiões em linhagens de *Cryptococcus neoformans***. Tese (Em Biologia Molecular)- Universidade de Brasília, 2014.

Cox, G., Wright, G.D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. **Int. J. Med. Microbiol.** 303, 287–292. 2013.

Cruz AK, De Toledo JS, Falade M, Terrão MC, Kamchonwongpaisan S, Kyle DE, Uthaipibull C. Current treatment and drug discovery against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: a review. **Curr Drug Targets.**10:178-92, 2009.

Cursino, L; Šmarda, J; Chartone-Souza, E; Nascimento, Andréa MA. Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. **Brazilian Journal of Microbiology** 33:185-195, 2002.

Daffre, S. et al. Peptídeos antibióticos produzidos por aracnídeos. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 23, 2001.

De Lucca, A; Walsh, TJ. Antifungal peptides: Novel Therapeutic compounds against emerging pathogens. **Ant Age and Chem**, vol 43, n1, 1-11, 1999.

De Paula VS. Descrição das Propriedades Dinâmicas de Defensinas utilizando RMN: Múltiplos Movimentos Associados na Interação com Membrana. **Tese de Doutorado**, UFRJ, 2010.

Dennison, SR; Harris, F; Phoenix, DA. **Langmuir–Blodgett Approach to Investigate Antimicrobial Peptide–Membrane Interactions**. Capítulo 3. 2007.

Doulah, M. S. Mechanism of disintegration of biological cells in ultrasonic cavitation. **Biotechnol. Bioeng.** 19: 649-60, 1977.

Faruck, MO; Yusof, F.; Chowdhury, S. An overview of antifungal peptides derived from insect. **Peptides**, 2015.

Feder, R.; Dagan, A.; Mor, A. Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. **J. Biol. Chem.**, 275 (6) , 4230–4238, 2000.

Ferreira, A.E. Estudos de bacteriocinas produzidas por espécies de *Enterococcus*. **Tese de Doutorado**, UFRGS, 2005.

Fontes, CO; Carvalho, MAR; Nicoli, JR; Hamdan, JS; Mayrink, W; Genaro, O; Carmo, LS; Farias, LM. Identification and antimicrobial susceptibility of microorganisms recovered from cutaneous lesions of human tegumentary leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, 54, 1071-1076, 2005.

Frézard F, Michalick MS, Soares CF, Demicheli C. Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. **Braz J Med Biol Res.** 33:841-846, 2000.



Gillor O, Nigro LM, Riley MA. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. **Curr Pharm Des.** 11(8):1067-1075, 2005.

Gonçalves, EGR; Reis Filho, SA; Oliveira, EG; Pareira, ALN; Silva, AR; Costa, JML. Infecção bacteriana na leishmaniose cutânea: padrão brasileiro e sensibilidade a antibióticos. **Rev Soc Bra Med Trop**, 42 (2):219-221, 2009.

Guaní-Guerra, E.; Santos-Mendoza, T.; Lugo-Reyes, S.O.; Teráh, L.M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. **Clinical Immunology**, 135, 1-11, 2010.

Guerreiro, J; Ribeiro, S; Carvalho, E.M; Badaró, R; Rocha, H. Infecção bacteriana em pacientes portadores de Leishmaniose Visceral. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, vol 80 (4): 447- 452, 1985.

Guralp, S.A., Murgha, Y.E., Rouillard, J.-M., Gulari, E. From design to screening: a new antimicrobial peptide discovery pipeline. **PLoS ONE**, 8:e 59305, 2013.

Hancock, R.E., Sahl, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat. Biotechnol.** 24, 1551–1557, 2006.

Hassan, M., Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B., and Lotfipour, F. Natural Antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. **J. Appl. Microbiol**, v. 113, p.723–736, 2012.

Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiol Rev**, v.59, n.2, p.171-200,1995.

Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, RE. Peptide antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**v.19, p. 491–511, 2006.

Kaur, H. et al. Antifungal activity of Phyto-extracts of *Piper longum*, *Aloe vera*, and *Withania somnifera* against human fungal opportunistic pathogen *Candida albicans*. **Journal of Undergraduate Research and Innovation**, n. Mic, p. 107–115, 2015.

Kinosky J. The Bacteriocins. In: Ornston LN and Sokatch JR. **The bacteria**. Vol. 6, London: Academic Press Inc., 1978.

Krier, F.; Revol-junellis, A. M.; Germain, P. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. FR52 during batch fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 50, n. 3, p. 359-362, 1998.

Kuckelhaus, AS; Leite, JR; Muniz-Junqueira, ML et AL. Antiplasmodial and anti-Leishmanial activities of phyloseptin-1, an antimicrobial peptide from the skin secretion of *Phylomedusa azurea* (Amphibia). **Exp. Parasitology**, v.123, p. 11-16, 2009.

Kulkarni, MM; McMaster, WR; Kamysz, W; McGuire, BS. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *Leishmania* results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, 284, 15496-15504, 2009.

Lamp. A database linking antimicrobial peptide. 2016. Disponível em: <http://biotechlab.fudan.edu.cn/database/lamp>. Acessado: 11/10/2016.

Layegh, P; Ghazvini, K; Moghiman, T; Hadian, F; Zabolinejad, N; Pezeshkpour, F. Bacterial contamination in cutaneous Leishmaniasis: its effect on the lesion's healing course. **Indian J Dermatol**, 60 (2):211, 2015.

Lehninger (ed). **Princípios da bioquímica**. Editora Artmed, 5ªed, 2011.

Lima, FL; Carvalho, MAR; Apolônio, ACM; Bemquerer, MP; Santoro, MM; Oliveira, JS; Alviano, CS; Farias, LM. Actinomycetemcomitin: a new bacteriocin produced by *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 35:103–110, (2008).

Lynn, MA; Kindrachuk, J; Marr, AK; Jenssen, H; Panté, N; Elliott, MR; Napper, S; Hancock, RE; McMaster, WR. Effect os BMAP-28 antimicrobial peptides on *Leishmania major* promastigote and amastigote growth: role of Leishmanolysin in parasite survival. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, vol 5, 5, e1141, 2011.

Macêdo, DPC; Farias, AMA; Lima Neto, RG; Silva, VKA; Leal, AFG; Neves, RP. Infecções oportunistas por leveduras e perfil enzimático dos agentes etiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.2, p.188-191, 2009.

Mangoni, ML; Saugar, JM; Dellisanti, M; Barra, D; Simmaco, M; Rivas, L. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. **The Journal os Biological Chemistry**, vol. 280 (2), 14, p. 984-990, 2005.

Mangoni, ML.; Marcellini, HG.; Simmaco, M. Biological characterization and modes of action of temporins and bombinins H, multiple forms of short and mildly cationic anti-microbial peptides from amphibian skin. **J Pept Sci**, 13, 603-613, 2007.

Marshall SH, Arenas G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. **Electronic Journal of Biotechnology**. V. 6, p. 271-284, 2003.

Mayr-Harting A, Hedges AJ, Berkeley RCW. Methods for studing bacteriocinas. In: **Methods in Microbiology**. Cap. 7A, New York: Academic Press, Inc. pp. 315-422, 1972.

Mayrink W, Botelho AC, Magalhaes PA et al. Immunotherapy, immunochemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Rev Soc Bras Med Trop**. V.39, p.14-21, 2006.

McGwire, B.S.; Kulkarni, M.M. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and *Trypanosomes* and their functional role in host parasitism. **Exp. Parasitology**,v.126, p. 397-405, 2010.

Ministério da Saúde, DATASUS 2016a. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>. Acessado em 10/10/2016.

Ministério da Saúde, DATASUS 2016b. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>. Acessado em: 10/10/2016.

Mishra, B et al. A novel antimicrobial peptide derived from modified N-terminal domain of bovine lactoferrin: design, synthesis, activity against multidrug-resistant bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1828, 677-686, 2013.

Monte-Alegre A, Ouaiissi A, Sereno D. *Leishmania* amastigotes as targets for drug screening. **Kinetoplastid Biol Dis**, 5:6-9, 2006.

Monzote L. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. **The Open Antimicrobial Agents Journal**.1:9-19, 2009.

Mossmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **J. Immunol. Methods**.V.65, p.55-63, 1983.

M'Bongo N, Loiseau PM, Lawrence F, Bories C, Craciunescu DG, Robert-Gero M. In vitro sensitivity of *Leishmania donovani* to organometallic derivatives of pentamidine. **Parasitol Res.** v. 83, p. 515-517, 1997.

Nascimento, J. S. *et al.* Genomic fingerprinting of bacteriocin-producer strains of *Staphylococcus aureus*. **Research in Microbiology**, v. 156, p.837-842, 2005.

Nascimento, ACCMS. **Avaliação biológica da secreção cutânea da rã *Leptodactylus ocellatus*: Peptídeos citolíticos e proteases.** Tese (Doutorado em Biologia Molecular)- Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

Nascimento, TC; WA, Januzzi, Leonel, M. Silva, VL; Diniz, CG. Ocorrência de bactérias clinicamente relevantes nos resíduos de serviços de saúde em um aterro sanitário brasileiro e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 42(4):415-419, jul-ago, 2009.

Nascimento, M. S.; Moreno, I.; Kuaye, A. Y. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 against gram-positive pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 74-81, 2010.

Neal RA, Croft SL. An in-vitro system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. **J Antimicrob Chemother**, 14: 463–75, 1984.

Nes IF, Diep DB, Håvarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, Holo H. Biosynthesis of bacteriocinas in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek.** v.70, n. 2-4, p.113-28, 1996.

Netz, D. J. A. *et al.* Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 311, p. 939-949, 2001.

Nguyen, L.T., Haney, E.F., Vogel, H.J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends Biotechnol.** v.29, p.464–472, 2011.

Nicolas, P. Multifunctional host defense peptides: Intracellular-targeting antimicrobial peptides. **FEBS J.**v. 276, p. 6483–6496, 2009.

Nishikata, M.; Kanehira, T.; Oh, H.; Tani, H.; Tazaki, M.; Kuboki, Y. Salivary histatin as an inhibitor of a protease produced by the oral bacterium *Bacteroides gingivalis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 174, p. 625–630, 1991.

Olivier, M; Atayde, VD, Isnard, A; Hassani, K; Shio, MT. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**, v.14 p.1377-1389, 2012.

OPAS - **Organização Pan-Americana da Saúde**. REDE Interagencial de Informação para a Saúde Indicadores básicos para a saúde no Brasil: conceitos e aplicações / Rede Interagencial de Informação para a Saúde - Ripsa. – 2. ed. – Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2008.

Ogaki, MB; Furlaneto, MC; Maia, LF. Revisão: aspectos gerais das bacteriocinas. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas v. 18, n. 4, p. 267-276, out./dez, 2015.

Okamoto, A. S.; Filho, R. L. A.; Lima, E. T. de. Avaliação do potencial inibitório de substâncias antimicrobianas e amônia quaternária na desinfecção de ovos comerciais experimentalmente contaminados com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 2, p. 267–274, 2010.

Ortega, JRL.; Hof, WV.; Veerman, ECI.; Saugar, JM.; Rivas, L. Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in *Leishmania*. **The FASEB jornal**, v.22, n.6, 2008.

Paiva, AD. **Produção de anticorpos policlonais para detecção de bovicona HC5 por ensaios imunoenzimáticos**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

Paiva, AD; Irving, N; Breukink, E; Mantovani, HC. Interaction with Lipid II Induces Changes in Bovicin HC5 Conformational Structure. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 56, n.9, p.4586, 2012.

Paiva, AD; Breukink, E. Antimicrobial Peptides Produced by Microorganisms. In: Hiemstra, P.S; Zaat, S.A.J. (eds.) **Antimicrobial Peptides and Innate Immunity**, Progress in Inflammation Research, Springer Basel, 2013.

Papagianni, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: byosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnol. Adv. Thessaloniki**, v. 21, n.1, p. 465-499, 2003.

Pierre, TN.; Seon, AA.; Amiche, M.; Nicolas, P. Phylloxin, a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobial/opioid peptide precursors. **Eur. J. Biochem.**, 267 (2), 370-378, 2000.

Pushpanathan, M.; Gunasekaran, P; Rajendhran, J.; Rajendhran, J.; Antimicrobial Peptides: Versatile Biological Properties. **International Journal of Peptides**, article ID 675391, 2013.

Reddy, K.V.R; Yedery, R.D; Aranha, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents** 24, 536–547, 2004.

Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology and application. **Annu. Rev. Microbiol**, 56:117-137, 2002a.

Seifert, K, Escobar P, Croft SL. In vitro activity of anti-Leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. **J Antimicrob Chemother.** Mar;65(3):508-11, 2010.

Saleem, F; Ahmad, S; Yaqoob, Z; Rasool, SA. Comparative study of two bacteriocins produced by representative indigenous soil bacteria. **Pak. J. Pharm. Sci.**, vol.22, n.3, p.252-258, 2009.

Sang, Y; Blecha,F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional Antibiotics. **Animal Health Research Reviews**, v 9, special issue 02, p227 235,2008.

Santos, J. A. L., Belo, I., Mota, M., e Cabral, J. M. S. Freeze/thawing and sonication of *Escherichia coli* TB1 cells for cytochrome b5 recovery. **Bioseparation.** 6: 81-89, 1996.

Santos DO; Coutinho CE; Madeira MF et al. *Leishmaniasis* treatment-a challenge that remains: a review. **Parasitol Res.**, v. 4, p. 21-32, 2008.

Schulz, D.; Pereira, M.A.; Bonelli, R.R.; Nunes, M.M.; Batista, C.R.V. Bacteriocins: mechanism of action and use in food preservation. **Alim. Nutr., Araraquara**, v. 14, n.2, p. 229-235, 2003.

Shekh, R. M.; Roy, U. Biochemical characterization of an anti-*Candida* factor produced by *Enterococcus faecalis*. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 132, 2012.



Silva, MLC; Costa, RS; Santana, AS; Koblitz, MGB. Compostos Fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v.31, n.3, p. 669-682, jul- set, 2010.

Silva, VL.; Caçador, N C.; Silva, CSF.; Fontes, CO.; Garcia, GD.; Nicoli, JR.; Diniz, CG. Occurrence of Multidrug-Resistant and Toxic-Metal Tolerant Enterococci in Fresh Feces from Urban Pigeons in Brazil. **Microbes Environ.** Vol. 27, No. 2, 179–185, 2012.

Silva, P. I., Jr., Daffre, S., and Bulet, P. Isolation and characterization of gomesin, na 18-residue-cysteine-rich defense peptide from spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin Family. **J. Biol. Chem.** 275, 33464–33470, 2000.

Sousa, MAB; Farias, LM; Oliveira, PL; Moreira, JS; Apolônio, ACM; Oliveira, JS; Santoro, MM; Mendes, EM; Magalhães, PP. Antagonistic activity expressed by *Shigella sonnei*: identification of a putative new bacteriocin. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 108(6): 724-729, 2013

Souza, GS; Nascimento, VV; Carvalho, LP; Melo, EJT; Fernandes, KV; Machado, OLT; Retamal, CA; Gomes, VM; Carvalho, AO. Activity of recombinant and natural defensins from *Vigna unguiculata* seeds against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v.135,p.116–125, 2013.

Steers E., Foltz E.L., and Graves B.S. An inoculating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. **Antibiot. Chemother.**v. 9, p.307-311, 1959.

Sundar S, Rai M. Advances in the treatment of leishmaniasis. **Curr Opin Infect Dis.**v. 15, n.6, p. 593-8, 2002.

Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram-positive bacteria., *Bacteriol Rev.* v. 40, n.3, p.722-56, 1976.

Tavares, L.S., Santos, M.O., Viccini, L.F., Moreira, J.S., Miller, R.N.G., Franco, O.L. Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides*, 29, 1842–1851, 2008.

Tavares, LS; Silva, CSF; Souza, VC; Silva, V L; Diniz, CG; Santos, MO. Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, n. 412, p.1-11, 2013.

Richard JV, Werbovetz KA. New antileishmanial candidates and lead compounds. *Curr Opin Chem Biol*, 14:1-9, 2010.

Tempone AG, Martins de Oliveira C, Berlinck RG. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Med*, 77::572-585, 2011.

Torrent,M.,Nogués,M.V.,andBoix,E. Discoveringnew in silico tools for antimicrobial peptide prediction. *Curr.DrugTargets*v.13, p.1148–1157, 2012.

Tulini, F. L.; Gomes, B. C.; Martinis, E. C. P. Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* 130 isolated from mozzarella cheese. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 31, n. 1, p. 155-159, 2011.

Van der Wal FJ, Luirink J, Oudega B. Bacteriocin release proteins: mode of action, structure, and biotechnological application. *FEMS Microbiol Rev.* v.17, n. 4, p.381-99, 1995.

Vera, LA; Santos, JB; Macêdo, VO; Magalhães, AV; Ciuffo, IA; Santos, CG. Avaliação da influência da infecção bacteriana secundária na evolução da Leishmaniose Cutânea em corte de pedra, Bahia. **Rev Soc Bras Med Trop**, 34(3): 233-237, 2001.

Vermeersch M, da Luz RI, Toté K, Timmermans JP, Cos P, Maes L. 2009. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. **Antimicrob Agents Chemother**, 53:3855-3859.

Wang,G.,Li,X.,andWang,Z. APD2: the up dated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acid Res.**v. 37, p. 933–937, 2009.

Wingfield, PT. Protein precipitation using Ammonium sulfate. **Curr. Protoc. Protein Sci.**, appendix 3, may- 2001.

WHO- **World Health Organization.** Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en>. Acessado em 02/02/2013.

Wright, GD. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic. **Curr. opin. Microbiol.** v.13, p. 589–594, 2010.

Yadav, V. et al. 2006

Yadav, V. et al. An antifungal protein from *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, n.5, p. 637-644, 2007.

Yadav, V. et al. Characterization of the *Escherichia coli* Antifungal Protein PPEBL21. **International journal of microbiology**, v. 2010, p. 196-363, 2010.

Zhao, X; Wu, H; Lu, H; Li, G; Huang, Q. Lamp: A database linking antimicrobial peptides. **PLoS One**, 8, e66557, 2013.

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

Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389–395, 2002.

Zhang, L.; Rozek, A.; Hancock, R.E. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 35714–35722, 2001.

# Apêndices

---



# Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides

Letícia S. Tavares<sup>1</sup>, Carolina S. E. Silva<sup>2</sup>, Vinicius C. de Souza<sup>1</sup>, Vânia L. da Silva<sup>2</sup>, Cláudio G. Diniz<sup>2</sup> and Marcelo O. Santos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

<sup>2</sup> Department of Microbiology, Immunology and Infectious Diseases, University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

## Edited by:

Octavio L. Franco, Universidade Católica de Brasília, Brazil

## Reviewed by:

Giovanna Cenacchi, Alma Mater Università di Bologna, Italy  
Jorge W. A. Valencia, Universidad del Atlántico, Colombia

## \*Correspondence:

Marcelo O. Santos, Department of Biology, University of Juiz de Fora, ICB, Martelos, Juiz de Fora 36036-900, Brazil  
e-mail: marcelo.santos@ufjf.edu.br

The increasing number of antibiotic resistant bacteria motivates prospective research toward discovery of new antimicrobial active substances. There are, however, controversies concerning the cost-effectiveness of such research with regards to the description of new substances with novel cellular interactions, or description of new uses of existing substances to overcome resistance. Although examination of bacteria isolated from remote locations with limited exposure to humans has revealed an absence of antibiotic resistance genes, it is accepted that these genes were both abundant and diverse in ancient living organisms, as detected in DNA recovered from Pleistocene deposits (30,000 years ago). Indeed, even before the first clinical use of antibiotics more than 60 years ago, resistant organisms had been isolated. Bacteria can exhibit different strategies for resistance against antibiotics. New genetic information may lead to the modification of protein structure affecting the antibiotic carriage into the cell, enzymatic inactivation of drugs, or even modification of cellular structure interfering in the drug-bacteria interaction. There are still plenty of new genes out there in the environment that can be appropriated by putative pathogenic bacteria to resist antimicrobial agents. On the other hand, there are several natural compounds with antibiotic activity that may be used to oppose them. Antimicrobial peptides (AMPs) are molecules which are wide-spread in all forms of life, from multi-cellular organisms to bacterial cells used to interfere with microbial growth. Several AMPs have been shown to be effective against multi-drug resistant bacteria and have low propensity to resistance development, probably due to their unique mode of action, different from well-known antimicrobial drugs. These substances may interact in different ways with bacterial cell membrane, protein synthesis, protein modulation, and protein folding. The analysis of bacterial transcriptome may contribute to the understanding of microbial strategies under different environmental stresses and allows the understanding of their interaction with novel AMPs.

**Keywords:** resistome, transcription, genetic, molecular modeling, antimicrobial peptides, NGS applications

## INTRODUCTION

According to our recent history, human activity has markedly enhanced the evolution and distribution of resistant bacteria worldwide both in hospitals, human, and animal communities, and in the open environment, although this human activity is not necessarily the only, or even the proximate, cause for antimicrobial resistance phenomenon (Josephson, 2006; Wright, 2010). In this regard, most of the scientific research in antibiotic resistance over the past six to seven decades has been focused on association of drug-resistance with pathogenic bacteria. Given what we now know about the dispersal of resistance genes in nonpathogenic bacteria, this focus on pathogens actually neglects the majority of genes associated with resistance (D'Costa et al., 2006).

Since its use as a therapeutic tool to fight infectious diseases was proposed, antimicrobial drugs have reduced the mortality, but not the persistency of infectious diseases. Due to their

use and misuse, these drugs have stimulated bacterial evolution toward the development of resistance, as an adaptive mechanism to the environment. While the selective pressure is maintained, adaptive mechanisms are transmitted to new generations, through the genetic flow. The phenomenon has acquired considerable importance in public health (Levy, 1998). The resistance may be associated with chromosomal mutations or imported genes through genetic recombination. In antimicrobial resistant microorganisms, resistance genes such as plasmids, transposons, and integrons can be inserted into the chromosome or extra-chromosomal genome. Resistance may also be associated with a general impermeability of the bacterial cell envelope (El-Halfawy and Valvano, 2012).

The development of microbial resistance to antimicrobials had been going on in nature long before antibiotics were made available to chemotherapy. It is recognized that bacteria, including

human pathogens, may acquire resistance genes in natural environments, particularly in soils (Josephson, 2006; Wright, 2007). Taking the recent methodological approaches, the concept of the antibiotic resistome has been advanced to serve as a framework for understanding the ecology of resistance on a global scale (Wright, 2007).

The resistome consists of a collection of all antibiotic resistance genes including those circulating in pathogenic bacteria, antibiotic producers, and benign non-pathogenic organisms found either free living in the environment or as commensals of other organisms (D'Costa et al., 2006). Most of the so called antibiotic producers live in soils, and as an ecological consequence, most of the susceptible bacteria in their vicinity, including human pathogens, die off, but some develop resistance to these natural products thought of control the microbial population (Wright, 2010; Cox and Wright, 2013).

The limited number of antibacterial classes and the common occurrence of cross-resistance within and between classes have also reinforced the urgent need to discover new compounds targeting novel cellular functions not yet targeted by currently used drugs (Chung et al., 2013). Bacteria are known to employ different strategies for antibiotic resistance. Resistance may be acquired by spontaneous mutation in the coding gene of the target protein resulting in no or reduced affinity to the antibiotic or by horizontal transfer of antibiotic resistance genes from other bacteria (Hassan et al., 2012).

An antibiotic-resistance gene product may act by enzymatic degradation of the antibiotic, by altering the antibiotic target site or by pumping the incoming antibiotic out of the cell by a transport mechanism. Such processes make infection treatment very difficult as we face sophisticated, highly resistant and often multi-resistant pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* (Paterson, 2006), *Escherichia coli* (Overbye and Barrett, 2005), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Reynolds et al., 2004) and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* (Karchmer, 2004).

The antimicrobial peptides (AMPs) is a class of molecules that may be used to overcome the bacterial resistance challenge. Their occurrence is a wide-spread phenomenon in all forms of life, from multi-cellular organisms to bacterial cells. In higher organisms, AMPs contribute to innate immunity and are part of the first defense line against harmful micro-organisms. In bacteria, production of AMPs provides a competitive advantage for the producer in certain ecological niches because the peptide mediates the killing of other bacteria (Hassan et al., 2012). They are constitutively expressed or induced by endogenous or exogenous elicitors, such as developmental stage or pathogen predation (Sachetto-Martins et al., 2000). AMPs are small proteins 20–50 amino acid residues long, often having common properties such as the small number of amino acid residues, cationicity, and amphipathicity (Tavares et al., 2008). The AMPs interact with membranes in different ways, but in general three different models have been used to define their mode of actions in model membrane systems. In the barrel-stave mechanism, peptides integrate into the membrane and form membrane-spanning pores. In the toroidal-pore mechanism, AMPs form membrane-spanning pores together with intercalated lipids. And in the carpet

mechanism, peptides accumulate on the membrane surface in a carpet-like manner and at a threshold density so that they dissolve the membrane without forming transmembrane channels (Pietiainen et al., 2009; Brogden, 2011). However, membrane damage is not the single mechanism whereby AMPs cause cell death. They may also affect functions of several other cell components and act as metabolic inhibitors of cellular processes including biosynthesis of the cell wall, nucleic-acids and proteins. In these cases, the cell death can be the result of multiple inhibitory effects (Brogden, 2005).

AMPs show broad-spectrum antimicrobial activities against various microorganisms, including Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi, and viruses. Many AMPs are effective against multi-drug resistant (MDR) bacteria and possess low propensity for developing resistance probably due to their distinguished mode of action (Seo et al., 2012). AMPs could be very diverse in sequence and structure but most of them are positively charged, allowing their interaction with the bacterial envelope. These peptides are active at very low concentrations (micromolar to nanomolar range) and most of them kill their target microorganism via a non-receptor mediated mechanism involving permeation of the target membrane (Guralp et al., 2013).

AMPs can be classified into four groups based on their structures:  $\alpha$ -helical peptides,  $\beta$ -sheet peptides, extended peptides, and loop peptides (Nguyen et al., 2011; Fjell et al., 2012). Understanding the structure-activity relationships (SAR) of AMPs is essential for the design and development of novel antimicrobial agents with improved properties. In particular, the atomic level structures of AMPs can provide versatile information for all stages of drug development, including the peptide design and modification for pharmaceutical application (Seo et al., 2012).

Microbial pathogens have evolved different systems to resist the effect of antimicrobial peptides. These mechanisms can involve the destruction of antimicrobial peptides (by proteolytic digestion), change of antimicrobial peptide target (i.e., the microbial membrane), and removal of antimicrobial peptides from their site of action (through efflux pumps or by alteration of the cell surface composition) (Rio-Alvarez et al., 2012). The modifications of lipopolysaccharide (LPS) to mask the negative charges that allow interaction with AMP are one of the main responses to these compounds in many Gram-negative bacteria (Costechareyre et al., 2013).

Some bacteria such as *Staphylococcus enterica* serovar typhimurium exhibit a regulatory system controls virulence that is involved in the regulation of  $Mg^{2+}$  uptake systems, survival in macrophages and resistance to antimicrobial peptides (AMP). Several enzymes, encoded by *pagP*, *pagO*, *pmrC*, *pmrG*, *lpxO*, *pmrHFIJKLM*, modify LPS, mostly by adding or modifying palmitate, phosphoethanolamine or 4-aminoarabinose to mask negative charges that allow interaction with cationic AMPs (Costechareyre et al., 2013). Costechareyre et al. (2013) using *Dickeya dadantii*, which is an insect and plant pathogen, to understand the regulation of genes involved in response to AMPs, observed that through transcriptome different genes are involved in response to AMPs

when the bacteria infect the aphid (*Acyrtosiphon pisum*) and plant.

Antimicrobial peptides (AMPs), particularly the so-called bacteriocins produced by bacteria, may be an important contributor in this context as they often have a relatively narrow killing spectrum which comprises mostly bacteria closely related to the producers (Hassan et al., 2012).

Many hundreds of different peptides, differing in size, charge, hydrophobicity, conformation, primary structure, as well as in post-translational modifications, have been demonstrated in frog defensive skin secretions (Evaristo et al., 2013).

The knowledge about AMP action mode and resistance mechanisms shared by different microorganisms may point the direction for discovery and design of new drugs.

### NEW APPROACHES TO AMPs RESISTANCE

The knowledge acquired in the last two decades concerning the evolution of antimicrobial resistance to widely prescribed drugs, and the search for new antimicrobial candidates such as AMPs, thought to be natural barriers against bacteria, eukaryotic parasites, viruses, and fungi, has resulted in a better understanding of how microorganisms have become resistant to these proteins (Marshall and Arenas, 2003; Wilcox, 2004; Hancock and Sahl, 2006; Perron et al., 2006).

The variety of already described antimicrobial peptides related to the different sequences, shows that the same peptide sequence is rarely associated with two different species, even closely related. Several multicellular organisms express a collection of peptides of different chemical structures, as a local defensin (Zasloff, 2002). However, despite the structural diversity, most of the already sequenced antimicrobial peptides show at least 50% hydrophobic amino acid residues and a low proportion of both neutral polar and negatively charged amino acids (Hancock and Chapple, 1999). It is accepted that this structural skeleton may explain why the majority of AMPs persists at water-lipid interfaces and then disturb microbial membrane components (Ruissen et al., 2001). Membrane damage is considered the primary antimicrobial mechanism of the so called cationic antimicrobial peptides (CAMPs) or ribosomally synthesized antimicrobial peptides (RAMPs) (Perron et al., 2006), and requires interaction with microbial membrane lipids and hydrophobic properties to enable integration of the peptide into the hydrophobic core of the membrane (Peschel and Sahl, 2006).

Studies with CAMPs thrombocidins, defensins, and cathelicidins show a potential use as skin and epithelia protectors against invading microorganisms, such as *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica*, by reducing the net negative charge of the bacterial cell envelope through covalent modification of anionic molecules (e.g., teichoic acids, phospholipids, and lipid A) resulting in repulsion of CAMPs. Other mechanisms have also been reported such as expelling CAMPs through energy-dependent pumps, altering membrane fluidity and CAMPs cleavage with proteases (Peschel, 2002; Marshall and Arenas, 2003).

Although nonspecific targets led researchers to suggest that it would be difficult for the bacteria to develop resistance to some peptides (Ge et al., 1999a,b; Schroder, 1999; Zasloff, 2002; Boman, 2003; Jenssen et al., 2006), molecular mechanisms of

resistance to CAMPs have been suggested in several groups (Zasloff, 2002). In *S. aureus*, changes in the cell wall appear to involve the operon *dltABCD*, which results in carriage of positively charged D-alanine from the cytoplasm to anionic teichoic acids (Peschel et al., 1999; Kristian et al., 2003; Nizet, 2006). Perron et al. (2006) have studied the effects of resistance to pexiganan, CAMP analog of magainin, in different bacterial strains (mutants for *mutS* and *mutL* genes—*Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli*) and observed MIC50 increased in both mutant strains. They also observed a reduction in the lag phase after subsequent growth in pexiganan presence. The contribution of these resistance mechanisms in bacterial pathogenesis may be confirmed by studies with mutants. It is accepted that such prospective investigations are of extreme relevance, since these potential AMPs are thought to be an alternative to well established antibiotics used in chemotherapy against multiresistant bacteria (Nizet, 2006; Brogden and Brogden, 2011; Maróti et al., 2011). Mechanisms such as peptidases production, down regulation of host AMP production, and cellular filamentation have also been related (Nizet, 2006; Maróti et al., 2011).

AMPs may interact with intracellular targets, binding to DNA, RNA and protein, or even interfering with the characterized *FtsZ* gene, responsible for bacterial cell division septum or with protein synthesis such as DNA gyrase and DnaK (Brogden, 2005; Chauhan et al., 2006; Handler et al., 2008; Maróti et al., 2011). Genetic markers related to the defensins and cathelicidin mediated AMPs resistance include *kasB* in *Mycobacterium marinum* (Gao et al., 2003), *sak* in *S. aureus* (Jin et al., 2004)—for defensins; and *emmI* in Group A *Streptococcus* (Lauth et al., 2009).

Additionally, some AMPs have non-protein targets such as the peptidoglycan precursor lipid II and ATP (Hilpert et al., 2010; Sass et al., 2010). Modifications on cell surface have also been correlated with the AMPs resistance and several genetic markers have already been described, such as *mprF/lysS* in *S. aureus* (Peschel et al., 2001; Nishi et al., 2004), *dlt* operon in Group B *Streptococcus* and *Listeria monocytogenes* (Abachin et al., 2002; Poyart et al., 2003), *htrP* in *Haemophilus influenzae* (Starner et al., 2002), *pmr* in *Pseudomonas aeruginosa* (Moskowitz et al., 2004).

The active efflux of AMPs has already been observed and might be related to different genetic markers in various bacteria species, such as *mtr* in *Neisseria gonorrhoeae* (Jerse et al., 2003), *sap/sapA* operon in *S. enterica* and *H. influenzae* (Parra-Lopez et al., 1994; Mason et al., 2005) and *qacA* in *S. aureus* (Kupferwasser et al., 1999).

Moreover, the degradation of AMPs has been correlated to several genetic markers: *lasB* in *P. aeruginosa* (Schmidtchen et al., 2002), *gelE* in *Enterococcus faecalis* (Schmidtchen et al., 2002), *zapA* in *Proteus mirabilis* (Schmidtchen et al., 2002), *speB/ideS* in Group A *Streptococcus* (Schmidtchen et al., 2002), *aur* gene in *S. aureus* (Sieprawska-Lupa et al., 2004), *degP* in *Escherichia coli* (Ulvatne et al., 2002), and *rgpA/B* in *Porphyromonas gingivalis* (Devine et al., 1999).

The use of AMPs as pharmaceuticals will promote selective pressure for bacterial strains that are resistant also to the repertoire of host-defense peptides in the human body (Bell and Gouyon, 2003; Nizet, 2006). In this context, the bacterial resistance must also consider endogenous housekeeping genes which



may interact with the AMPs. To select genetic markers related to the bacterial resistome in this holistic point of view remains as an important challenge (Islam et al., 2001; Taggart et al., 2003; Wright, 2007). To illustrate the role of the housekeeping genes in the AMPs resistance, several authors have reported the importance of regulatory genes such as *phoP/phoQ* in *S. enterica* and *P. aeruginosa*, *pmrB* in *P. aeruginosa*, and *rpoE* in *S. enterica* (MacFarlane et al., 2000; Ernst et al., 2001; McPhee et al., 2003; Crouch et al., 2005).

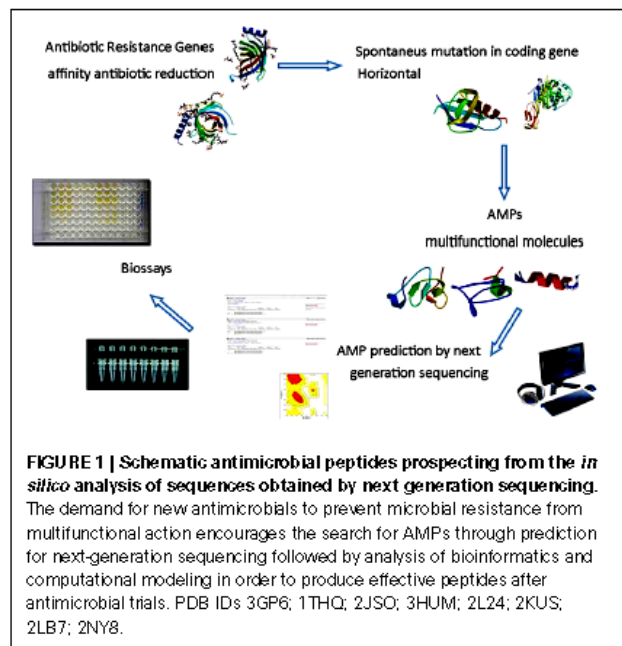
Considering different organisms, such as fungi, a lot is known about the mechanism of resistance to antimicrobial drugs, but there are few reports on AMPs resistance. So far, AMPs in these organisms include modification of *erg11/mdr1* gene and *pdr5* locus, over expression of specific drug efflux pumps, alteration in sterol biosynthesis and alteration in AMP target, AMP inactivation and reduction in the intracellular concentration of target enzymes (Ghannoun and Rice, 1999; Balkis et al., 2002; Gulshan and Moye-Rowley, 2007). As observed for bacteria, antifungal drug resistance is quickly becoming a major problem, especially considering the expanding population of immunocompromised patients who have contributed to an increased incidence of opportunistic and systemic fungal infections.

With regards to the antifungal drug resistance mechanisms, the genetic markers codifying for multidrug efflux pumps and their upregulation have been highlighted (Balkis et al., 2002; Gulshan and Moye-Rowley, 2007). Jabra-Rizk et al. (2004) described two different types of efflux pumps in *C. albicans* and *C. dubliniensis*: adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) transporters encoded by the *cdr* genes (*CDR1* and *CDR2*) and major facilitators encoded by the *mdr* genes.

Overall, it is accepted that further prospective studies on antimicrobial resistance are needed to enable a better understanding of the microbial genetic diversity that underlies resistance. Such knowledge will help and guide our efforts to develop new potential drugs to overcome the resistance phenomenon (Wright, 2007).

### NEXT GENERATION SEQUENCING AND AMP PREDICTION

The next generation sequencing technologies have opened the opportunity to access genomes and transcriptomes at high throughput level allowing the researchers to understand a wide variety of physiological response of various types of organism. As a consequence new tools are available for antimicrobial discovery and design (Figure 1). The knowledge of host resistance mechanisms vs. susceptibility is important to the development of new approaches to prevent and/or treat human infectious diseases (Teles et al., 2013). The innate immune response in different organisms has the potential to reveal new and/or novel molecules for antimicrobial purpose. During transcriptome analysis of the oral chicken *Salmonella* infection four steps were observed and none of the genes was directly involved in bacterial infection, but associated with inflammatory response (Matulova et al., 2013). On the other hand persistence of *Salmonella* in several other niches is observed by resistance to AMPs and its sensibility is increased by adrenaline, down regulating the promoter of the *pmr operon* that controls resistance genes to AMPs (Karavolos et al., 2008). The combination of transcriptome and proteomic



strategies were used to study the Australian scorpion, revealing that the molecular weight found for proteomics analysis was not completely adjusted to amino acid sequence deduced from cDNA cloned genes. Some reasons are pointed out by the authors: the level of gene expression is not necessarily the same information obtained from the cDNA, posttranslational modifications, or sample preparation (Luna-Ramírez et al., 2013). Regardless of problems encountered, some potential therapeutically peptides were identified in those samples. In ladybird *Harmonia axyridis* the successful invasive behavior was revealed by 454 sequencing. The two layer innate immune system is composed of a chemical weapon, mediated by the secondary metabolite harmonine, associated with a wide range of AMPs resulting from multiple gene duplication and divergence events (Vilcinskas et al., 2013). In the scorpion *Heterometrus petersii* its venom showed four families of antimicrobial and cytolyc peptides identified by 454 sequencing platform (Ma et al., 2010). In *Spodoptera exigua* larvae upon AcMNPV infection the 454 analysis demonstrated that some genes, including genes encoding for AMPs, are down regulated (Choi et al., 2012). Summarizing, the association of transcriptome and proteomics technologies offers new points of view for AMP mode of action in different organisms, showing different potential and different strategies for prospecting. In the bivalve mollusk *Ruditapes philippinarum*, for example the use of 454 platforms allowed the identification of 36 AMP sequences (Moreira et al., 2012). The analysis of transcriptome of the American dog tick infected with different microorganisms allowed the researcher to identify a novel elicited defensin in the Arachnids immune system response transcripts (Jaworski et al., 2010). Facing up to the high diversity of organisms, various tissues and physiological approaches, the number of novel and new AMPs derived from biodiversity is a vast field for research.

## PREDICTION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE FROM DNA/RNA LIBRARY

### ANTIMICROBIAL PEPTIDES SEARCH TOOLS

The antimicrobial peptides are directly related to the innate and acquired immune response of organisms, and their potential to kill microorganisms resistant to many antibiotics has attracted the interest of the pharmaceutical industry. In this aspect tools to find and produce antimicrobial peptides have created a revolution in research for new drugs. According to Belarmino et al. (2010), the development of bioinformatics tools for predicting patterns in biological sequences has already allowed a routine search in databases of ESTs (Expressed Sequence Tags) of plants by defensins and a subsequent validation by antimicrobial testing.

The APD2 (Antimicrobial Peptide Database Second Version) is one of the main databases of antimicrobial peptides, allowing users to search for families of peptides, post translational modified peptides, among other options (Wang et al., 2009). APD provides an option to calculate and to predict AMPs in order to extract important information about peptides such as total charge, hydrophobic rate, in addition to providing an alignment with deposited sequences (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). The information provided can be linked to the data on the hydrophobic moment calculated by the web-program HydroMcalc (Tossi et al., 2002) available at <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/HydroCalc/HydroMCalc.html>, allowing the prediction of antimicrobial peptides.

In addition to the APD, another database of AMPs is the CAMP (Collection of Antimicrobial Peptides) available at <http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial>. Such tools provide information related to the sequence, definition of protein biological activity, taxonomy of the source organism, target organisms—indicating the MIC (minimum inhibitory concentration), hemolytic activity of the peptide and links to external databases such as SwissProt, PDB, PubMed and the NCBI Taxonomy (Thomas et al., 2010). The iAMP-2L, available at <http://www.jci-bioinfo.cn/iAMP-2L>, is a web-server used for the prediction of uncharacterized sequences as antimicrobial. Once the subject sequence is identified as an antimicrobial, the server indicates to which class (antibacterial, anticancer, antifungal, anti-HIV and anti-viral) the peptide belongs. Peptides are promiscuous molecules (Franco, 2011) and are invariably classified in more than one class and family (Xiao et al., 2013). All of these characteristics reinforce how these new technologies can make available an unlimited source for new drugs and biologically active molecules. Tools of bioinformatics for modeling are fundamental for development of this research area.

### TYPES OF MODELING AND PREDICTING STRUCTURES APPLIED TO ANTIMICROBIAL PEPTIDE

In the following steps we present a summary of a method to develop such peptides that can predict the structure of peptides and proteins in two ways: experimentally, through methods such as nuclear magnetic resonance (NMR), X-ray diffraction and crystallography, and theoretically, by computational modeling methods, which involve *comparative modeling*, *threading (folding) modeling* and *ab initio (de novo)*. Experimental methods of peptide prediction and modeling have typical difficulties. The lack

of structural conformation of plant bactericidal peptides prevents more detailed classification of AMPs (Porto and Franco, 2013). The use of computational tools and methods has become an important strategy in the search for bioactive peptides. However, there are still some limitations in this prediction method, such as the difficulty of developing a general method for predicting the nature and activity of antimicrobial peptides, due to low homology sequences that can occur (Lata et al., 2007; Torrent et al., 2012).

### Comparative modeling

Comparative homology modeling is a method based on the structures similarity, i.e., similar amino acid sequences tend to have a very similar secondary structure. Thus, it is possible to use as a template structures solved by experimental means, in order to predict the 3D conformation of peptides and proteins using computational algorithms. In comparative modeling, the alignment of the sequence to be predicted and the template must present an identity of at least 30% (Baker and Sali, 2001), a large number of cases with alignments with low identity between target and template can lead to better models of 3D structure (Rayan, 2009). In fact the identity of the alignment can be put aside when we are in a situation of functionality. For example, imagine a protein A having 90% identity to another protein B, but a different function, and also a protein C that has 70% identity and the same function as B. In this case protein C would be the best template and B is not the shape desired. The alignment score should also be considered when working with whole proteins, since in certain programs, such as BLAST, alignments may appear above 30%, but still low coverage.

The *in silico* prediction method by homology modeling is divided into four main steps: (1) identification of structures and selection of templates, (2) alignment of the target sequence with the chosen model structure, (3) generation of models for the target structure, using information about the structure of the template; (4) validation of the models generated for the target (Marti-Renom et al., 2000). It can also be interesting to implement a fifth step which is the model of refinement by energy minimization, which is important in the context that during the production of the geometric errors can occur in regions of the main chain (Vyas et al., 2012).

The first two steps to create and predict a three-dimensional model of a protein or peptide involve query of database structures experimentally determined by crystallography techniques, X-ray diffraction or nuclear magnetic resonance (Kiefer, 2012). First, research tools in the databases such as BLAST (Basic Local Alignments Search Tool) that allow local alignment. Searching sequence of regions similar to other regions of sequence is an essential step to find sequence templates. The BLAST minimizes the time spent on research, discarding alignments in which regions between the query and subject sequences have few chances to exceed a pre-determined score (Altschul et al., 1990). During the search for similar sequences in databases, attention should be given to the best method, i.e., one that is both sensitive (able to identify sequences related bit) and selective (relations between the query and subject sequences are true). At this point it is worth mentioning one of the most used tools in the search for

similar sequences, PSI-BLAST (Position-Specific Iterated Basic Local Alignment Tool) from NCBI, which differs from conventional BLAST due to its higher accuracy and greater statistical sensitivity (Li et al., 2011).

After choosing sequences of templates that will be used in the second stage, the optimal alignment between this sequence and the target is required to build three-dimensional models (Centeno et al., 2005). The main strategies used are: progressive alignment between the sequences using the software Clustal W (Larkin et al., 2007), the sequence-profile alignment, HMM-based method (HIDDEN MARKOV MODEL) between query and profile of families of templates, using up the database profiles Pfam (Pinn et al., 2010) and HMMER web server (Pinn et al., 2011) one can still perform profile-profile alignment, from building a profile for the target and matching with the profile templates in a database of profiles (Centeno et al., 2005; Ramachandran and Dokholyan, 2012; Venclovas, 2012).

The models are generated based on the structural information provided by the template and the sequence alignment between them and predicted (Kiefer, 2012). Currently there are several programs and web servers that can be used to build models of proteins and peptides, the main one is Modeler, developed by Sali and Blundell (1993). The Modeler is used to compare the target structure by satisfaction of spatial constraints involving restrictions on atomic distances, angles dihedral, and stereochemistry. The information modeler generated is also combined with the statistical calculation preferences of constraints derived from the sequence template homology (Eswar et al., 2003; Vyas et al., 2012). Another tool also used in model building by homology is SwissModel, which unlike the modeler searches in a homologous target database with the BLAST protein and then determines a three dimensional model, finding the core backbone and modeling loops and chain laterals (Schwede et al., 2003).

In homology modeling each step is directly linked to the previous, so in the event of accidental errors, these can be propagated. Thus, it becomes necessary to validate the final model and interpretation of the target. The generated model can be validated as a whole or for individual regions (Marti-Renom et al., 2000), the basic need is for a good model built on good stereochemistry (Hillisch et al., 2004). The main tools for analysis and validation of models generated by comparative modeling are: Procheck (Laskowski, 1993) and Molprobit (Chen et al., 2009), both for quality analysis stereochemistry; Whatcheck (Hooft et al., 1996) and Qmean (Benkert et al., 2009) used to evaluate the quality of the model, and the ProsaWeb (Wiederstein and Sippl, 2007) used in the analysis of interaction energy between the model residuals. According to Marti-Renom et al. (2000), the most common errors that may occur during modeling are positioning errors of side chain distortions in regions aligned, regions with an inefficient mold alignment and wrong choice of template.

The refinement of the model in general uses methods of molecular dynamics calculations of force fields, the most common being the CHARMM (Brooks et al., 1983) and GROMOS (Schuler et al., 2001). A refinement process can be defined as walking on the surface of covalent and hydrogen bonds in the model, the search for a better minimum energy than the energy of departure, therefore, a difficult task (Gront et al., 2012). The

energy minimization can promote excessive deviation of the model structure, compared to the original, which actually is not ideal; therefore, you should keep the number of cycles of minimization to a minimum, which is sufficient for improved stereochemistry of the model (Peitsch, 2002).

### ***b*-Threading modeling**

The modeling threading or by folding pattern recognition is a method of predicting three dimensional structures by looking for folding patterns, applying the combination-linear alignments profile and adjusting the profile structure of the target reference frames (obtained from folding profile libraries).

The LOMENTS is a meta-server which includes nine major servers threading (PPA-I, SP3, PPA-II, sparks2, PROSPECT2, FUGUE, HHSEARCH, PAINT, SAM-T02), allowing the selection of models through research for 30 models for each of the individual servers, excluding short alignments, and defining models of greater structural similarity (Wu and Zhang, 2007). It is an important tool for the study of structures in modeling template folding. Among commonly used tools in modeling protein folding are the ROSETTA (Kaufmann et al., 2010) and I-TASSER (Wu et al., 2007; Roy et al., 2010). Such tools have their operation based on either amino acid sequence of the target and information about structures in the template experimentally resolved, or using predictors of secondary structure and folding as mentioned above, with libraries of fragments.

### ***c*-Ab initio modeling**

This method of predicting three-dimensional structures ignores in principle the use of reference structures solved experimentally. Prediction *ab initio* (*de novo*) makes use of the energy minimized functions and research of spatial conformations that the target can take, and this is important for the use of force fields and methods of molecular dynamics and Monte Carlo simulations (Lee et al., 2009). According to Helles (2008), the three factors that make *ab initio* interesting for homology modeling, are that this does not provide accurate information about how a given protein or peptide acquires structure, many proteins and peptides do not have sufficient (> 30%) experimentally solved homology molecules, and even if the target presents high similarity with templates, it does not mean they will present the same structural profile.

*ab initio* Software such as ROSETTA and I-Tasser, cited above, have been used as *de novo* prediction programs (Wu et al., 2007; Kaufmann et al., 2010). However, by considering information frames of reference they are not actually *ab initio* techniques. A tool that is completely is LINUS (Local Independently Nucleated Units of Structure), which does not make use of structures or reference sequences, initiating the construction of the target from the extended chain as a result. The simulation performed by the software promotes the disruption of conformations of three randomly chosen residues, and evaluates the energy, using Monte Carlo procedure to validate the favorable conformation predicted (Srinivasan and Rose, 2002). Another tool also used currently is the QUARK (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/>), a tool that builds models from small fragments (residues 1–20) using Monte Carlo simulations (Xu and Zhang, 2012).

The intensive growth of research of AMPs and development of robust databases the discovering of novel and new biological active peptides (Amaral et al., 2012). The development of antimicrobial peptides from genomic and transcriptome databases can be an alternative strategy to the studies with research and development of AMPs.

## MODIFICATION MEDICINES

As long as antimicrobials were made available in the 1940s, there were no concerns related to the antimicrobial resistance mechanisms. However, the discovery of other antimicrobial agents and even the modification of those already described were not able to stop microbial evolution, such as the rapid emergence of  $\beta$ -lactamase-producing *Staphylococcus aureus* strains (Spellberg, 2009; Theuretzbacher, 2009; Choffnes et al., 2010).

The accelerated increase and global expansion of bacterial resistance made it necessary the search for new fighting agents (Spellberg, 2009; Choffnes et al., 2010). One of the main factors associated with this increasing antimicrobial resistance was the misuse of antimicrobials (Gwynn et al., 2010).

Driven by high profitability, the pharmaceutical industry has focused its production on blockbuster drugs (or global FMCG)—such as those used in the treatment of chronic diseases such as cancer or sexual dysfunction, for example—rather than the development of antimicrobial drugs used for short term treatment of acute infectious diseases (Theuretzbacher, 2009).

The economic advantages offered by blockbuster drugs coupled with the high cost of production and the low economical income related to the antimicrobial production, if compared to the profitability of other drug production, led to a lack of investment in the development of new antimicrobial agents in the 1990s (Spellberg, 2009; Theuretzbacher, 2009). In this regard, the production of new antibiotics becomes, now, very expensive due to the rationale and steps of manufacturing and preclinical testing and clinical trials, up to their insertion in the market. The searches for new agents has to overcome the mechanisms of bacterial resistance, and therefore, are based on the search for new routes of administration, new targets or mechanisms of action toward the same target, which ends up limiting the production of effective potential agents (Gwynn et al., 2010). Add to that the availability of generic formulations and the development of drugs kept to treat only severe diseases to avoid quick bacteria resistance development, further also contributed to the economical failure related to new antimicrobial releases (Spellberg, 2009). In this point of view the *in silico* prediction of antimicrobial peptides becomes an advantage for industry due to low cost and time consumption.

Furthermore, the wide use of broad-spectrum antimicrobials has contributed to the need for new drugs given the emergence of the so called multi-drug resistant bacteria (MDR) (Choffnes et al., 2010; Gwynn et al., 2010). The decline in production of new agents was compounded by the loss of effectiveness of existing antimicrobials without a concomitant replacement by new therapeutic options. In a study by Shlaes and Moellering (2002), the medical community was alerted to the lack in new drug discovery, and the authors concluded that the development of new antibacterial agents was even lower than that related to hyperactivity disorder and male erectile dysfunction (Spellberg, 2009).

Within the current scenario of increasing bacterial resistance, however, it becomes necessary to resume production of new antimicrobial agents, or discussion of new strategies for the use of the available drugs. This discussion has motivated and encouraged scientific research on the subject, in order to decrease the cost of production within large pharmaceutical companies (Spellberg, 2009). For example, while other drugs require 15 candidates to yield one FDA-approved product, antibiotics require 72 candidates to yield an FDA-approved product, which currently costs 400–\$ 800 million per approved agent (Spellberg et al., 2008; Forsyth, 2013; IDSA, 2013). The production of antimicrobials is not profitable also because: the drugs are used for a short period of time (7–14 days), sold for low price and prescription controlled market (Forsyth, 2013). As a result, it is estimated that about two million Americans per year develop hospital infections, mostly caused by multidrug-resistant bacteria pathogens, which increases treatment costs in about U\$ 21 million to U\$ 34 billion, compared to antibiotic-susceptible pathogens (Roberts et al., 2009; Spellberg et al., 2011). Nosocomial infections such as pneumonia and sepsis, killed about 50,000 Americans in 2006 and cost to the US health care system more than U\$ 8 billion (Eber et al., 2010).

To encourage the production of new antimicrobials, Government policies have been issued, such as the GAIN (Generating Antibiotics Incentives Now) Act, which states: (i) warranty for new approved drugs protection from competition in the marketplace by limiting FDA approval of similar drugs during the a certain exclusivity period; (ii) review and fast-track approval priority for qualified antimicrobial drugs, antibiotic applications will be eligible for both priority review and fast-track approval through the FDA new drug application process; and (iii) study of incentives for Qualified Infectious Diseases Biological Products, to encourage research, development, and marketing for qualified infectious disease biological products (Forsyth, 2013). Besides this, proposals have been discussed for new ways of using drugs already known and established for the microorganisms which have been made resistant (Spellberg, 2009).

In this regard, considering the evolution of bacterial pathogens associated with infectious diseases today, the need to develop new agents to control multiresistant bacteria is presumed, or to prospect new ways of using the inefficient well-established antimicrobial arsenal, aiming to overlap the existing limitation in antibacterial chemotherapy (Rai et al., 2009; Spellberg, 2009; Choffnes et al., 2010).

With regards to the AMPs and their eventual modifications as an alternative strategy to overcome the need of new drugs, it is important to undergo a retrospective analysis of the co-evolution of antimicrobial peptides and bacterial resistance. Initially several peptides had been reported in the scientific literature and among them, cationic peptides called attention by their mechanisms of action: using positively charged molecules, amphiphilic, with affinity to bacterial membranes. However, during initial *in vitro* and in preclinical trials, resistant strains have been noticed. Overall, variations in the peptide sequences are proposed leading to conjugate molecules (Peschel and Sahl, 2006).

Obtaining AMPs can be performed in three different ways: direct isolation of the producer, by chemical synthesis or

recombinant expression (Li et al., 2010; Parachin et al., 2012). Modifications in AMP composition, structure and function are being used to create more stable molecules. Six distinctive new classes of AMPs have already been reported (Brogden, 2011; Brogden and Brogden, 2011; Tossi, 2011). The first class includes mimetic peptides, which are non-peptidic, synthetic molecules, which mimic the natural properties of AMPs. Its structure requires a different composition such as peptoids, arylamides oligomers,  $\beta$ -peptides, or phenylene ethynyls (Rotem and Mor, 2009). The second class includes hybrid peptides, AMPs constructed of the active regions of two to three peptides, such as cecropinA-melittin (CEME/ CEMA/ CP26/ CP29) (Piers and Hancock, 1994). The potential benefits of each individual fragment are combined to increase antimicrobial activity, reduce antimicrobial spectrum of activity or reduce cytotoxicity for host cells. The third class includes peptide congeners, a chemical compound closely related to another in composition, such as congeners of CAP18, LL-37, SMAP28, ovispirin, and Q25. They may contain changes in tertiary structure, change of specific amino acids in the sequence to load change, among other characteristics. The fourth class includes cyclotides and stabilized AMPs. Cyclotides are cyclopeptides with a head-to-tail cyclic backbone, containing 30 amino acid residues with three conserved disulfide bonds (i. e., cyclized angiotensin and cyclic diastereomeric lysine ring) (Ireland et al., 2010). The fifth class includes peptide conjugates which is connected to micelles, liposomes, antibodies, steroids or fatty acids, such as lactoferrin—lauric acid (Chu-Kung et al., 2010), and the sixth class includes immobilized peptides via incorporation into distinct materials or absorbed to a variety of surfaces where they still retain their ability to bind and kill bacteria. These groups of new peptides have a variety of potential medical and industrial applications in many different areas (medicine, veterinary, agriculture, pharmaceutical, food) (Costa et al., 2011).

In conclusion, the misuse of antibiotics lasting recent decades has increased the spread of mutations allowing the development of multidrug resistant microbes. The antimicrobials were neglected due to economic interest. Thus, for infectious diseases the development of new antimicrobial with low cost and broad spectrum of action becomes of great importance, because the lifetime of such molecules is very short and a wide range of molecules is important to overcome the novel resistant pathogens. The molecular modeling of AMPs from transcriptome has arisen in current times as an important alternative for drug development.

## FINANCIAL SUPPORT

Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

## REFERENCES

- Abachin, E., Poyart, C., Pellegrini, E., Milohanic, E., Fiedler, F., Berche, P., et al. (2002). Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 43, 1–14. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02723.x
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Amaral, A. C., Silva, O. N., Mundim, N. C., de Carvalho, M. J., Migliolo, L., Leite, J. R., et al. (2012). Predicting antimicrobial peptides from eukaryotic genomes: *in silico* strategies to develop antibiotics. *Peptides* 37, 301–308. doi: 10.1016/j.peptides.2012.07.021
- Baker, D., Sali, A. (2001). Protein structure prediction and structural genomics. *Science* 294, 93–96. doi: 10.1126/science.1065659
- Balkis, M. M., Leidich, S. D., Mukherjee, P. D., and Ghannoum, M. A. (2002). Mechanisms of fungal resistance. *Drugs* 62, 1025–1040. doi: 10.2165/00003495-200262070-00004
- Belarmino, L. C., Capriles, P. V. S. Z., Crowella, S., Dardenne, L. E., and Benko-Iseppon, A. M. (2010). EST-database search of plant defensins—an example using sugarcane, a large and complex genome. *Curr. Protein Pept. Sci.* 11, 248–254. doi: 10.2174/138920310791112048
- Bell, G., and Gouyon, P. H. (2003). Arming the enemy: the evolution of resistance to self-proteins. *Microbiology* 149, 1367–1375. doi: 10.1099/mic.0.26265-0
- Benkert, P., Künzli, M., and Schwede, T. (2009). QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Res.* 37, 510–514. doi: 10.1093/nar/gkp322
- Boman, H. G. (2003). Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J. Intern. Med.* 254, 197–215. doi: 10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 238–250. doi: 10.1038/nrmicro1098
- Brogden, K. A. (2011). "Perspectives and peptides of the next generation," in *Prokaryotic Antimicrobial Peptides. From Genes to Applications*, eds D. Drider and S. Rebuffat (New York, NY: Springer), 423–439.
- Brogden, N. K., and Brogden, K. A. (2011). Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals. *Int. J. Antimicrob. Agents* 38, 217–225. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.05.004
- Brooks, B. R., Brucoleri, R. E., Olafson, B. D., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983). CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* 4, 187–217. doi: 10.1002/jcc.540040211
- Centeno, N. B., Planas-Iglesias, J., and Oliva, B. (2005). Comparative modelling of protein structure and its impact on microbial cell factories. *Microb. Cell Fact.* 4, 20–31. doi: 10.1186/1475-2859-4-20
- Chauhan, A., Madiraju, M. V., Fol, M., Lofton, H., Maloney, E., Reynolds, R., et al. (2006). *Mycobacterium tuberculosis* cells growing in macrophages are filamentous and deficient in *fts Z* rings. *J. Bacteriol.* 188, 1856–1865. doi: 10.1128/JB.188.5.1856-1865.2006
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., et al. (2009). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. Biol. Crystallogr.* 66, 12–21. doi: 10.1107/S0907444909042073
- Choffnes, E. R., Reisman, D. A., and Mack, A. (2010). "Antibiotic resistance: implications for global health and novel intervention strategies," in *Forum on Microbial Threats: Institute of Medicine, IOM (Institute of Medicine)*, (Washington, DC: National Academies Press), 1–38.
- Choi, J. Y., Roh, J. Y., Wang, Y., Zhen, Z., Tao, X. Y., Lee, J. H., et al. (2012). Analysis of gene expression of *Spooptera exigua* larvae upon AcMNPV infection. *PLoS ONE* 7:e42462. doi: 10.1371/journal.pone.0042462
- Chu-Kung, A. F., Nguyen, R., Bozzelli, K. N., and Tirrell, M. (2010). Chain length dependence of antimicrobial peptide–fatty acid conjugate activity. *J. Colloid Interface Sci.* 345, 160–167. doi: 10.1016/j.jcis.2009.11.057
- Chung, P. Y., Chung, L. Y., and Navaratnam, P. (2013). Identification, by gene expression profiling analysis, of novel gene targets in *Staphylococcus aureus* treated with betulinaldehyde. *Res. Microbiol.* 164, 319–326. doi: 10.1016/j.resmic.2013.01.005
- Costa, F., Carvalho, I. F., Montelaro, R. C., Gomes, P., and Martins, M. C. (2011). Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomater.* 7, 1431–1440. doi: 10.1016/j.actbio.2010.11.005
- Costechareyre, D., Chich, J. F., Strub, J. M., Rahbe, Y., and Condemine, G. (2013). Transcriptome of *Dickeya dadantii* infecting *Acyrtosiphon pisum* reveals a strong defense against antimicrobial peptides. *PLoS ONE* 8:e54118. doi: 10.1371/journal.pone.0054118
- Cox, G., and Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 287–292. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.009
- Crouch, M. L., Becker, L. A., Bang, I. S., Tanabe, H., Ouellette, A. J., and Fang, F. C. (2005). The alternative sigma factor sigma is required for resistance of *Salmonella enterica* serovar typhimurium to antimicrobial peptides. *Mol. Microbiol.* 56, 789–799. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04578.x
- D'Costa, V., McGrann, K. M., Hughes, D. W., and Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311, 374. doi: 10.1126/science.1128080

- Devine, D. A., Marsh, P. D., Percival, R. S., Rangarajan, M., and Curtis, M. A. (1999). Modulation of antibacterial peptide activity by products of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella* spp. *Microbiology* 145, 965–971. doi: 10.1099/13500872-145-4-965
- Eber, M. R., Laxminarayan, R., Perencevich, E. N., Malani, A. (2010). Clinical and economic outcomes attributable to health care-associated sepsis and pneumonia. *Arch. Intern. Med.* 170, 347–353. doi: 10.1001/archinternmed.2009.509
- El-Halfawy, O. M., and Valvano, M. A. (2012). Non-genetic mechanisms communicating antibiotic resistance: rethinking strategies for antimicrobial drug design. *Expert Opin. Drug Discov.* 7, 923–933. doi: 10.1517/17460441.2012.712512
- Emst, R. K., Guina, T., and Miller, S. I. (2001). *Salmonella typhimurium* outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes Infect.* 3, 1327–1334. doi: 10.1016/S1286-4579(01)01494-0
- Eswar, N., John, B., Mirkovic, N., Fiser, A., Ilyin, V. A., Pieper, U., et al. (2003). Tools for comparative protein structure modeling and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31, 3375–3380. doi: 10.1093/nar/gkg543
- Evaristo, G., Pinkse, M., Wang, L., Zhou, M., Wu, Y., Wang, H., et al. (2013). The chains of the heterodimeric amphibian skin antimicrobial peptide, distinctin, are encoded by separate messenger RNAs. *J. Proteomics* 78, 245–253. doi: 10.1016/j.jprot.2012.09.016
- Finn, R. D., Clements, J., and Eddy, S. R. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res.* 39, 29–37. doi: 10.1093/nar/gkr367
- Finn, R. D., Misty, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J. E., et al. (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 38, 211–222. doi: 10.1093/nar/gkp985
- Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock R. E. W., and Schneider, G. (2012). Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 37–51. doi: 10.1038/nrd3591
- Forsyth, C. (2013). Repairing the antibiotic pipeline: can the gain act do it? *Wash. J. Law Tech. Arts* 9, 1–53. Available online at: <http://hdl.handle.net/1773.1/1267>
- Franco, O. L. (2011). Peptide promiscuity: an evolutionary concept for plant defense. *FEBS Lett.* 585, 995–1000. doi: 10.1016/j.febslet.2011.03.008
- Gao, L. Y., Laval, F., Lawson, E. H., Groger, R. K., Woodruff, A., Morisaki, J. H., et al. (2003). Requirement for *kasB* in *Mycobacterium mycolic acid* biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. *Mol. Microbiol.* 49, 1547–1563. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03667.x
- Ge, Y., MacDonald D. L., Henry, M. H., Hait, H. I., Nelson, K. A., Lipsky, B. A., et al. (1999a). *In vitro* susceptibility to pexiganan of bacteria isolated from infected diabetic foot ulcer. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 45–53. doi: 10.1016/S0732-8893(99)00056-5
- Ge, Y., MacDonald D. L., Holroyd, K., Thornsberrry, C., Wexler, H., and Zasloff, M. (1999b). *In Vitro* antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 782–788.
- Ghannoum, M. A., and Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 501–517.
- Gront, D., Kmiecik, S., Blaszczyk, M., Ekonomik, D., and Koliński, A. (2012). Optimization of protein models. *Wiley Interdiscipl. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2, 479–493. doi: 10.1002/wcms.1090
- Gulshan, K., and Moye-Rowley, W. S. (2007). Multi drug resistance in fungi (mini reviews). *Eukaryot. Cell* 6, 1933–1942. doi: 10.1128/EC.00254-07
- Guralp, S. A., Murgha, Y. E., Rouillard, J.-M., Gulari, E. (2013). From design to screening: a new antimicrobial peptide discovery pipeline. *PLoS ONE* 8:e59305. doi: 10.1371/journal.pone.0059305
- Gwynn, M. N., Portnoy, A., Rittenhouse S. F., and Payne, D. J. (2010). Challenges of antibacterial discovery revisited. *Antimicrob. Ther. Rev.* 1213, 5–19. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05828.x
- Hancock, R. E. W., and Chapple, D. S. (1999). Peptides antibiotics (mini review). *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1317–1323.
- Hancock, R. E., and Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24, 1551–1557. doi: 10.1038/nbt1267
- Handler, A. A., Lim, J. E., and Losick, R. (2008). Peptide inhibitor of cytokinesis during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 68, 588–599. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06173.x
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B., and Lotfipour, F. (2012). Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* 113, 723–736. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x
- Helles, G. (2008). A comparative study of the reported performance of *Ab Initio* protein structure prediction algorithms. *J. R. Soc. Interface* 5, 387–396. doi: 10.1098/rsif.2007.1278
- Hillisch, A., Pineda, L. F., and Hilgenfeld, R. (2004). Utility of homology models in the drug discovery process. *Drug Discov. Today* 9, 659–669. doi: 10.1016/S1359-6446(04)03196-4
- Hilpert, K., McLeod, B., Yu, J., Elliott, M. R., Rautenback, M., Ruden, S., et al. (2010). Short cationic antimicrobial peptides interact with ATP. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4480–4483. doi: 10.1128/AAC.01664-09
- Hoof, R., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E. (1996). Errors in protein structures. *Nature* 381, 272–272. doi: 10.1038/381272a0
- Infectious Diseases Society of America (IDSA). (2013). *Statement of the Infectious Diseases Society of America Promoting Anti-Infective Development and Antimicrobial Stewardship through the U.S. Food and Drug Administration Prescription Drug User Fee Act (PDUFA) Reauthorization Before the House Committee on Energy and Commerce's Subcommittee on Health*. IDSA.ORG. Available online at: [http://www.idsociety.org/uploads/files/idsa/policy\\_and\\_advocacy/current\\_topics\\_and\\_issues/advancing\\_product\\_research\\_and\\_development/bad\\_bugs\\_no\\_drugs/statements/idsa%20pdufa%20gain%20testimony%20030812%20final.pdf](http://www.idsociety.org/uploads/files/idsa/policy_and_advocacy/current_topics_and_issues/advancing_product_research_and_development/bad_bugs_no_drugs/statements/idsa%20pdufa%20gain%20testimony%20030812%20final.pdf)
- Ireland, D. C., Clark, R. J., Daly, N. L., and Craik, D. J. (2010). Isolation, sequencing, and structure-activity relationships of cytodites. *J. Nat. Prod.* 73, 1610–1622. doi: 10.1021/np1000413
- Islam, D., Bandholtz, L., Nilsson, J., Wiggzell, H., Christensson, B., Agerberth, B., et al. (2001). Down regulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat. Med.* 7, 180–185. doi: 10.1038/84627
- Jabra-Rizk, M. A., Falkler, W. A., and Meiller, T. F. (2004). Fungal biofilms and drug resistance. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1. doi: 10.3201/eid1001.030119
- Jaworski, D. C., Zou, C., Zou, Z., Bowen, C. J., Wasala, N. B., Madden, R., Wang, Y., et al. (2010). Pyrosequencing and characterization of immune response genes from the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (L.). *Insect Mol. Biol.* 19, 617–630. doi: 10.1111/j.1365-2583.2010.01037.x
- Jenssen, H., Hamill, P., and Hancock, R. E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 491–511. doi: 10.1128/CMR.00056-05
- Jerse, A. E., Sharma, N. D., Simms, A. N., Crow, E. T., Snyder, L. A., and Shafer, W. M. (2003). A gonococcal efflux pump system enhances bacterial survival in a female mouse model of genital tract infection. *Infect. Immun.* 71, 5576–5582. doi: 10.1128/IAI.71.10.5576-5582.2003
- Jim, T., Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins, J., and Tarkowski, A. (2004). *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J. Immunol.* 172, 1169–1176. Available online at: <http://www.jimmunol.org/content/172/2/1169>
- Josephson, J. (2006). The microbial resistome. *Environ. Sci. Technol.* 11, 6531–6534. doi: 10.1021/es063006i
- Karavolos, H. S., Bulmer, D. M., Thompson, A., Winzer, K., Williams, P., Hinton, J. C. D., et al. (2008). Adrenaline modulates the global transcriptional profile of *Salmonella* revealing a role in the antimicrobial peptide and oxidative stress resistance responses MH. *BMC Genomics* 9:458. doi: 10.1186/1471-2164-9-458
- Kardner, A. W. (2004). Increased antibiotic resistance in respiratory tract pathogens: PROTEKT US—an update. *Clin. Infect. Dis.* 39, 142–150. doi: 10.1086/421352
- Kaufmann, K. W., Lemmon, G. H., DeLuca, S. L., Sheehan, J. H., and Meiler, J. (2010). Practically useful: what the Rosetta protein modeling suite can do for you. *Biochemistry* 49, 2987–2998. doi: 10.1021/bi902153g
- Kiefer, F. (2012). *Modeling of Tertiary and Quaternary Protein Structures by Homology*. Freiburg: Basel University Press.
- Kristian, S. A., Lauth, X., Nizet, V., Goetz, F., Neumeister, B., Peschel, A., et al. (2003). Alanylation of teichoic acids protects *Staphylococcus aureus* against Toll-like receptor 2-dependent host defense in a mouse tissue cage infection model. *J. Infect. Dis.* 188, 414–423. doi: 10.1086/376533
- Kupferwasser, L. I., Skurray, R. A., Brown, M. H., Firth, N., Yezman, M. R., and Bayer, A. S. (1999). Plasmid mediated resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein in staphylococci: role of the *qacA* locus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2395–2399.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404

- Laskowski, R. A. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291. doi: 10.1107/S0021889892009944
- Lata, S., Sharma, B. K., and Raghava, G. P. S. (2007). Analysis and prediction of antimicrobial peptides. *BMC Bioinform.* 8:263. doi: 10.1186/1471-2105-8-263
- Lauth, X., Ködritz-Bliedwe, M., McNamara, C. W., Myskowski, S., Zinkernagel, A. S., Beall, B., et al. (2009). M1 protein allows group A streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition. *J. Innate. Immun.* 1, 202–214. doi:10.1159/000203645
- Lee, J., Wu, S., and Zhang, Y. (2009). "Ab initio protein structure prediction," in *From Protein Structure to Function With Bioinformatics*, ed D. J. Rigden (Netherlands: Springer), 3–25. doi: 10.1007/978-1-4020-9058-5\_1
- Levy, S. B. (1998). The challenge of antibiotic resistance. *Sci. Am.* 278, 32–39. doi: 10.1038/scientificamerican0398-46
- Li, C., Blendske, H. M., Paulsen, V., Haug, T., and Stensvag, K. (2010). Powerful workhouses for antimicrobial peptide expression and characterization. *Bioeng. Bugs* 1, 217–220. doi: 10.4161/bbug.1.3.11721
- Li, Y., Chia, N., Lauria, M., and Bundschuh, R. (2011). A performance enhanced PSI-BLAST based on hybrid alignment. *Bioinformatics* 27, 31–37. doi: 10.1093/bioinformatics/btq621
- Luna-Ramírez, K., Quintero-Hernández, V., Vargas-Jaimes, L., Batista, C. V. T., Winkel, K. D., and Possani, L. D. (2013). Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodeas yaschenkoi*: molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity. *Toxicon* 63, 44–54. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.11.017
- Ma, Y., Liu, C., Liu, X., Wu, J., Yang, H., Wang, Y., et al. (2010). Peptidomics and genomics analysis of novel antimicrobial peptides from the frog, *Rana nigrovittata*. *Genomics* 95, 66–71. doi: 10.1016/j.ygeno.2009.09.004
- MacFarlane, E. L., Kwasnicka, A., and Hancock, R. E. (2000). Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-phoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. *Microbiology* 146, 2543–2554. Available online at: <http://mic.sgmjournals.org/content/146/10/2543.full.pdf>
- Maróti, G., Kereszt, A., Kondorosi, E., and Mergaert, P. (2011). Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Res. Microbiol.* 162, 363–374. doi: 10.1016/j.resmic.2011.02.005
- Marshall, S. H., and Arenas, G. (2003). Antimicrobial peptides: a natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electron. J. Biotechnol.* 6, 271–284. doi: 10.2225/1471-2225/vol6-issue3-fulltext-1
- Martí-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., and Šali, A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 291–325. doi: 10.1146/annurev.biophys.29.1.291
- Mason, K. M., Munson, R. S., Jr., and Bakaletz, L. O. (2005). A mutation in the *sap* operon attenuates survival of non typeable *Haemophilus influenzae* in a chinchilla model of otitis media. *Infect. Immun.* 73, 599–608. doi: 10.1128/IAI.73.1599-608.2005
- Matulova, M., Varmuzova, K., Sisak, F., Havlicekova, H., Babak, V., Stejskal, K., et al. (2013). Chicken innate immune response to oral infection with *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *Vet. Res.* 20, 37. doi: 10.1186/1297-9716-44-37
- McPhee, J. B., Lewenza, S., and Hancock, R. E. (2003). Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 50, 205–217. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03673.x
- Moreira, R., Balseiro, P., Planas, J. V., Fuste, B., Beltran, S., Novo, B., et al. (2012). Transcriptomics of *in vitro* immune-stimulated hemocytes from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing. *PLoS ONE* 7:e35009. doi: 10.1371/journal.pone.0035009
- Moskowitz, S. M., Ernst, R. K., and Miller, S. I. (2004). PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J. Bacteriol.* 186, 575–579. doi: 10.1128/JB.186.2.575-579.2004
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., and Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* 29, 464–472. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.05.001
- Nishi, H., Komatsuzawa, H., Fujiwara, T., McCallum, N., and Sugai, M. (2004). Reduced content of lysylphosphatidylglycerol in the cytoplasmic membrane affects susceptibility to moenomycin, as well as vancomycin, gentamicin, and antimicrobial peptides, in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4800–4807. doi: 10.1128/AAC.48.12.4800-4807.2004
- Nizet, V. (2006). Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr. Issues Mol. Biol.* 8, 223–238. Available online at: <http://www.horizonpress.com/cimb/v/v8/02.pdf>
- Overbye, K. M., and Barrett, J. F. (2005). Antibiotics: where did we go wrong. *Drug Discov. Today* 10, 45–52. doi: 10.1016/S1359-6446(04)03285-4
- Parachin, N. S., Mulder, K. C., Viana, A. A. B., Dias, S. C., and Franco, O. L. (2012). Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides* 38, 446–456. doi: 10.1016/j.peptides.2012.09.020
- Parra-Lopez, C., Lin, R., Aspedon, A., and Groisman, E. A. (1994). A *Salmonella* protein that is required for resistance to antimicrobial peptides and transport of potassium. *EMBO J.* 13, 3964–3972.
- Paterson, D. L. (2006). The epidemiological profile of infections with multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin. Infect. Dis.* 43, 43–48. doi: 10.1086/504476
- Peitsch, M. C. (2002). About the use of protein models. *Bioinformatics* 18, 934–938. doi: 10.1093/bioinformatics/bt8.7.934
- Perron, G. G., Zasloff, M., and Bell, G. (2006). Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proc. Biol. Sci.* 273, 251–256. doi: 10.1098/rspb.2005.3301
- Peschel, A. (2002). How do bacteria resist human antimicrobial peptides. *Trends Microbiol.* 10, 179–196. doi: 10.1016/S0966-842X(02)02333-8
- Peschel, A., Jack, R. W., Otto, M., Collins, L. V., Staubitz, P., Nicholson, G., et al. (2001). *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J. Exp. Med.* 193, 1067–1076. doi: 10.1084/jem.193.9.1067
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G., and Gotz, F. (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* 274, 8405–8410. doi: 10.1074/jbc.274.13.8405
- Peschel, A., and Sahl, H. G. (2006). The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 529–536. doi: 10.1038/nrmicro1441
- Piers, K. L., and Hancock, R. E. W. (1994). The interaction of a recombinant cecropin/melittin hybrid peptide with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 12, 951–958. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb01083.x
- Pietiläinen, M., François, P., Hyyryläinen, H. L., Tangomo, M., Sass, V., Sahl, H. G., et al. (2009). Transcriptome analysis of the responses of *Staphylococcus aureus* to antimicrobial peptides and characterization of the roles of *vraDE* and *vraSR* in antimicrobial resistance. *BMC Genomics* 10:429. doi: 10.1186/1471-2164-10-429
- Porto, F. W., and Franco, L. O. (2013). Theoretical structural insights into the *snakin*/GASA family. *Peptides* 44, 163–167. doi: 10.1016/j.peptides.2013.03.014
- Poyart, C., Pellegrini, E., Marceau, M., Baptista, M., Jaubert, F., Lamy, M. C., et al. (2003). Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Mol. Microbiol.* 49, 1615–1625. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03655.x
- Rai, M., Yadav, A., and Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* 1, 76–78. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.002
- Ramachandran, S., and Dokholyan, N. V. (2012). "Homology modeling: generating structural models to understand protein function and mechanism," in *Computational Modeling of Biological Systems*, ed N. V. Dokholyan (Chapel Hill: Springer), 97–116.
- Rayan, A. (2009). New tips for structure prediction by comparative modeling. *Bioinformation* 3, 263–267. doi: 10.6026/97320630003263
- Reynolds, R., Potz, N., Colman, M., Williams, A., Livermore, D., and MacGowan, A. (2004). Antimicrobial susceptibility of the pathogens of bacteraemia in the UK and Ireland 2001–2002: the BSAC Bacteraemia Resistance Surveillance Programme. *J. Antimicrob. Chem.* 53, 1018–1032. doi: 10.1093/jac/dkh232
- Rio-Alvarez, I., Rodríguez-Herva, J. J., Cuartas-Lanza, R., Toth, I., Pritchard, L., Rodríguez-Palenzuela, P., et al. (2012). Genome-wide analysis of the response of *Dickeya dadantii* 3937 to plant antimicrobial peptides. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 523–533. doi: 10.1094/MPMI-09-11-0247
- Roberts, R. R., Hota, B., Ahmad, I., Scott, R. D., Foster, S. D., Abbasi, F., et al. (2009). Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: implications for antibiotic stewardship. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1175–1184. doi: 10.1086/605630

- Rotem, S., and Mor, A. (2009). Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1582–1592. doi: 10.1016/j.bbame.2008.10.020
- Roy, A., Kuokkural, A., and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* 5, 725–738. doi: 10.1038/nprot.2010.5
- Ruissen, A. L. A., Grosnick, J., Helmerhorst, E. J., Walgreen-weterings, E., Van't hof, W., Veerman, E. C. I., et al. (2001). Effects of Histatin 5 and derived peptides on *Candida albicans*. *Biochem. J.* 356, 361–368. doi: 10.1042/0264-6021.3560361
- Sachetto-Martins, G., Franco, O. L., and Oliveira, D. E. (2000). Plant glycine-rich proteins: a family of just proteins with a common motif. *Biochem. Biophys. Acta* 1492, 1–14. doi: 10.1016/S0167-4781(00)00064-6
- Sali, A., and Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779–815. doi: 10.1006/jmbi.1993.1626
- Sass, V., Schneider, T., Wilmes, M., Korner, C., Tossi, A., Novikova, N., et al. (2010). Human  $\beta$ -defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in *Staphylococci*. *Infect. Immun.* 78, 2793–2800. doi: 10.1128/IAI.00688-09
- Schmidtchen, A., Frick, I. M., Andersson, E., Tapper, H., and Björck, L. (2002). Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol. Microbiol.* 46, 157–168. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03146.x
- Schroder, J. M. (1999). Epithelial peptide antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* 57, 121–134. doi: 10.1016/S0006-2952(98)00226-3
- Schuler, L. D., Daura, X., and Van Gunsteren, W. F. (2001). An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *J. Comput. Chem.* 22, 1205–1218. doi: 10.1002/jcc.1078
- Schwede, T., Kopp, J., Gueix, N., and Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31, 3381–3385. doi: 10.1093/nar/gkg520
- Seo, M. D., Won, H. S., Kim, J. H., Tsogbadrakh, M. O., and Lee, B. J. (2012). Antimicrobial peptides for their therapeutic applications: a review. *Molecules* 17, 12276–12286. doi: 10.3390/molecules171012276
- Shlaes, D. M., and Moellering, R. C. (2002). The United States Food and Drug Administration and the end of antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 34, 420–422. doi: 10.1086/334577
- Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wojcik, K., Paklo, M., Lupa, B., et al. (2004). Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus* derived proteinases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4673–4679. doi: 10.1128/AAC.48.12.4673-4679.2004
- Spellberg, B. (2009). *The Antibacterial Pipeline: Why is it Drying Up, and What Must be Done About it. Antibiotic Resistance: Implications for Global Health and Novel Intervention Strategies*. Washington, DC: National Academies Press.
- Spellberg, B., Blaser, M., Guidos, R. J., Boucher, H. W., Bradley, J. S., Eisenstein, B. I., et al. (2011). Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. *Clin. Infect. Dis.* 52, 397–428. doi: 10.1093/cid/air153
- Spellberg, B., Guidos, R., Gilbert, D., Bradley, J., Boucher, H. W., Scheld, W. M., et al. (2008). The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 46, 155–164. doi: 10.1086/524891
- Srinivasan, R., and Rose, G. D. (2002). *Ab initio* prediction of protein structure using IJNUS. *Proteins* 47, 489–495. doi: 10.1002/prot.10103
- Starner, T. D., Swords, W. E., Apicella, M. A., and McCray, P. B. Jr. (2002). Susceptibility of nontypeable *Haemophilus influenzae* to human beta-defensins is influenced by lipooligosaccharide acylation. *Infect. Immun.* 70, 5287–5289. doi: 10.1128/IAI.70.9.5287-5289.2002
- Taggart, C. C., Greene, C. M., Smith, S. G., Levine, R. L., McCray, P. B. Jr., O'Neill, S., et al. (2003). Inactivation of human beta-defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins. *J. Immunol.* 171, 931–937. Available online at: [www.jimmunol.org/content/171/2/931](http://www.jimmunol.org/content/171/2/931)
- Tavares, L. S., Santos, M. O., Vicini, L. F., Moreira, J. S., Miller, R. N. G., and Franco, O. L. (2008). Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides* 29, 1842–1851. doi: 10.1016/j.peptides.2008.06.003
- Teles, R. M., Graeber, T. G., Krutzik, S. R., Montoya, D., Schenk, M., Lee, D. J., et al. (2013). Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human antimicrobial responses. *Science* 339, 1448–1453. doi: 10.1126/science.1233665
- Theuretzbacher, U. (2009). Future antibiotics scenarios: is the tide starting to turn. *Int. J. Antimicrob. Agent* 34, 15–20. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.02.005
- Thomas, S., Karnik, S., Barai, R. S., Jayaraman, V. K., and Idicula-Thomas, S. (2010). CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res.* 38, 774–780. doi: 10.1093/nar/gkp1021
- Torrent, M., Nogués, M. V., and Boix, E. (2012). Discovering new *in silico* tools for antimicrobial peptide prediction. *Curr. Drug Targets* 13, 1148–1157. doi: 10.2174/138945012802002311
- Tossi, A. (2011). "Design and engineering strategies for synthetic antimicrobial peptides." in *Prokaryotic Antimicrobial Peptides. From Genes to Applications*, eds D. Drider and S. Rebuffat (New York, NY: Springer), 81–98. doi: 10.1007/978-1-4419-7692-5\_20
- Tossi, A., Sandri, L., and Giangaspero, A. (2002). "New consensus hydrophobicity scale extended to non-proteinogenic amino acids." in *Peptides 2002: Proceedings of the Twenty-Seventh European Peptide Symposium*, (Napoli: Edizioni Zino), 416–417. Available online at: [apps.sanbi.ac.za/dampd/paper/HydroScale-2002.pdf](http://apps.sanbi.ac.za/dampd/paper/HydroScale-2002.pdf)
- Ulvatne, H., Haukland, H. H., Samuelsen, O., Kramer, M., and Vorland, L. H. (2002). Proteases in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* confer reduced susceptibility to lactoferricin B. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 461–467. doi: 10.1093/jac/dkf156
- Vendovas, C. (2012). "Methods for sequence-structure alignment." in *Homology Modeling*, eds A. J. W. Orry and R. Abagyan (San Diego: Humana Press), 55–82.
- Vilcinskas, A., Mukherjee, K., and Vogel, H. (2013). Expansion of the antimicrobial peptide repertoire in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Proc. Biol. Sci.* 280, 20122113. doi: 10.1098/rspb.2012.2113
- Vyas, V. K., Ukawala, R. D., Ghate, M., and Chintha, C. (2012). Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives. *Indian J. Pharm. Sci.* 74, 1–17. doi: 10.4103/0250-474X.102537
- Wang, G., Li, X., and Wang, Z. (2009). APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acid Res.* 37, 933–937. doi: 10.1093/nar/gkn823
- Wiederstein, M., and Sippl, M. J. (2007). ProSa-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acid Res.* 35, 407–410. doi: 10.1093/nar/gkm290
- Wilcox, S. (2004). The new antimicrobials: cationic peptides. *Biotech. J.* 2, 88–91. Available online at: <http://www.biotech.ubc.ca/Journal/V02I01/cationicpeptides.htm>
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 175–186. doi: 10.1038/nrmicro1614
- Wright, G. D. (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 589–594. doi: 10.1016/j.mib.2010.08.005
- Wu, S., Skolnick, J., and Zhang, Y. (2007). *Ab initio* modeling of small proteins by interactive TASSER simulations. *BMC Biol.* 5:17. doi: 10.1186/1741-7007-5-17
- Wu, S., and Zhang, Y. (2007). LOMETS: a local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic Acid Res.* 35, 3375–3382. doi: 10.1093/nar/gkm251
- Xiao, X., Wang, P., Lin, W. Z., Jia, J. H., and Chou, K. C. (2013). iAMP-2L: a two-level multi-label classifier for identifying antimicrobial peptides and their functional types. *Anal. Biochem.* 436, 168–177. doi: 10.1016/j.ab.2013.01.019
- Xu, D., and Zhang, Y. (2012). *Ab initio* protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. *Proteins* 80, 1715–1735. doi: 10.1002/prot.24065
- Zaslouf, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395. doi: 10.1038/415389a

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 02 October 2013; accepted: 15 December 2013; published online: 31 December 2013.

Citation: Tavares LS, Silva CSF, de Souza VC, da Silva VL, Diniz CG and Santos MO (2013) Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides. *Front. Microbiol.* 4:412. doi: 10.3389/fmicb.2013.00412

This article was submitted to *Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, a section of the journal *Frontiers in Microbiology*.

Copyright © 2013 Tavares, Silva, de Souza, da Silva, Diniz and Santos. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



**Apêndice 02.** Distribuição das amostras de bactérias Gram-positivas utilizadas nos experimentos de antagonismo.

COCOS GRAM-POSITIVOS						
CÓDIGO TESE	ESPÉCIMES TESTADOS	IDENTIFICAÇÃO	ORIGEM	ANTAGONISMO-BACTERIANO	ANTAGONISMO-CANDIDA <i>sp</i>	ANTAGONISMO-LEISHMANIA <i>sp</i>
CGP1*	A1C1	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP2	A1C10	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP3	A1C11	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP4	A1C14	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP5	A1C17	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP6*	A1C18	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP7	A1C21	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP8	A1C22	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP9	A1C23	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP10	A1C25	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP11*	A1C26	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP12	A1C27	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP13	A1C28	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP14	A1C3	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP15	A1C31	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP16	A1C32	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP17	A1C33	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP18	A1C34	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP19*	A1C35	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP20	A1C36	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP21	A1C37	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP22	A1C38	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP23*	A1C39	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP24	A1C40	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP25	A1C41	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP26	A1C42	<i>Staphylococcus sp.</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não

CGP27*	A1C46	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Sim
CGP28	A1C47	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP29	A1C48	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP30	A1C5	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP31	A1C51	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Sim	Não
CGP32	A1C52	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP33	A1C53	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP34	A1C54	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP35	A1C57	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP36	A1C58	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP37	A1C6	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP38	A1C60	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP39	A1C61	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP40	A1C62	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP41	A1C63	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Sim	Não
CGP42	A1C64	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP43	A1C65	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP44	A1C66	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP45	A1C67	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP46	A1C69	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP47	A1C7	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP48	A1C70	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP49	A1C71	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP50	A1C72	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP51	A1C73	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP52	A1C74	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP53	A1C75	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP54	A1C76	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP55	A1C77	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP56	A1C78	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP57	A1C79	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não

CGP58	A1C8	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP59	A1C80	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP60	A1C81	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Sim	Não
CGP61	A1C82	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP62	A1C84	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP63	A1C87	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP64	A1C90	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP65	A1C91	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP66	A4C10	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP67	A4C100	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP68	A4C101	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP69	A4C102	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP70	A4C103	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP71	A4C104	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP72	A4C105	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP73	A4C106	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP74	A4C107	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP75	A4C108	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP76	A4C109	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP77	A4C11	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP78	A4C110	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP79	A4C111	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP80	A4C112	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP81	A4C113	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP82	A4C114	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP83	A4C115	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP84	A4C116	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP85	A4C117	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP86	A4C118	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP87	A4C119	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP88	A4C12	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não

CGP89	A4C120	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP90	A4C121	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP91	A4C122	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP92	A4C123	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP93	A4C124	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP94	A4C125	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP95	A4C126	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP96	A4C127	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP97	A4C128	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP98	A4C129	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP99	A4C13	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP100	A4C130	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP101	A4C131	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP102	A4C132	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP103	A4C133	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP104	A4C134	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP105	A4C135	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP106	A4C136	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP107	A4C137	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP108	A4C138	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP109	A4C139	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP110	A4C14	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP111	A4C140	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP112	A4C141	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP113	A4C142	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP114	A4C143	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP115	A4C144	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP116	A4C145	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP117	A4C146	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP118	A4C147	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP119	A4C148	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não

CGP120	A4C149	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP121	A4C15	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP122	A4C150	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP123	A4C151	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP124	A4C152	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP125	A4C153	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP126	A4C154	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP127	A4C155	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP128	A4C156	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP129	A4C157	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP130	A4C158	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP131	A4C159	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP132	A4C16	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP133	A4C160	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP134	A4C161	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP135	A4C162	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP136	A4C163	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP137	A4C164	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP138	A4C165	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP139	A4C166	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP140	A4C167	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP141	A4C168	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP142	A4C169	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP143	A4C17	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP144	A4C170	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP145	A4C171	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP146	A4C172	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP147	A4C173	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP148	A4C174	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP149	A4C175	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP150	A4C176	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não

CGP151	A4C177	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP152	A4C178	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP153	A4C179	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP154	A4C18	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP155	A4C180	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP156	A4C181	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP157	A4C182	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP158	A4C183	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP159	A4C184	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP160	A4C185	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP161	A4C19	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP162*	A4C2	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Sim
CGP163	A4C20	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP164	A4C21	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP165*	A4C22	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP166	A4C23	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP167	A4C24	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP168	A4C25	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP169	A4C26	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP170	A4C27	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP171	A4C28	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP172	A4C29	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP173	A4C3	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP174	A4C30	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP175	A4C31	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP176	A4C32	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	NR	Não
CGP177	A4C33	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	NR	Não
CGP178	A4C34	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	NR	Não
CGP179	A4C35	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	NR	Não
CGP180	A4C36	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	NR	Não
CGP181	A4C37	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	NR	Não

CGP182	A4C38	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Sim
CGP183*	A4C39	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Sim
CGP184	A4C4	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP185	A4C40	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP186	A4C41	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP187	A4C42	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP188	A4C43	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP189	A4C44	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP190	A4C45	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP191	A4C46	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP192	A4C47	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP193	A4C48	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP194	A4C49	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP195	A4C5	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP196	A4C50	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP197	A4C51	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP198	A4C52	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP199	A4C53	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP200	A4C54	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP201	A4C55	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP202	A4C56	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP203	A4C57	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP204	A4C58	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP205	A4C59	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP206	A4C6	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP207	A4C60	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP208	A4C61	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP209	A4C62	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP210	A4C63	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP211	A4C64	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP212	A4C65	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não

CGP213	A4C66	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP214	A4C67	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP215	A4C68	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP216	A4C69	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP217	A4C7	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP218	A4C70	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP219	A4C71	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP220	A4C72	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP221	A4C73	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP222	A4C74	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	NR	Não
CGP223	A4C77	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	NR	Não
CGP224	A4C78	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	NR	Não
CGP225	A4C79	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	NR	Não
CGP226	A4C8	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	NR	Não
CGP227	A4C80	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	NR	Não
CGP228	A4C81	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	NR	Não
CGP229	A4C82	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	NR	Não
CGP230	A4C83	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP231	A4C84	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP232	A4C85	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP233	A4C86	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP234	A4C87	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP235*	A4C88	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Sim
CGP236	A4C89	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP237	A4C9	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP238	A4C90	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP239	A4C91	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP240	A4C92	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP241	A4C93	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP242	A4C94	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP243	A4C95	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não



CGP244	A4C96	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP245	A4C97	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP246	A4C98	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Não	Não	Não
CGP247	A4C99	<i>Enterococcus</i> sp.	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
CGP248*	AL1C1	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Sim
CGP249	AL1C10	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP250	AL1C11	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP251	AL1C12	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP252	AL1C13	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP253	AL1C14	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP254	AL1C15	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	NR	Não
CGP255	AL1C18	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	NR	Não
CGP256	AL1C19	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	NR	Não
CGP257	AL1C2	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	NR	Não
CGP258	AL1C20	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	NR	Não
CGP259	AL1C21	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Sim	Não
CGP260	AL1C25	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP261	AL1C26	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP262	AL1C27	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP263	AL1C28	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP264	AL1C3	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP265	AL1C30	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP266	AL1C32	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP267	AL1C33	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP268	AL1C34	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP269*	AL1C35	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	NR	Não
CGP270	AL1C36	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	NR	Não
CGP271	AL1C37	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	NR	Não
CGP272	AL1C38	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	NR	Não
CGP273	AL1C39	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP274	AL1C4	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não

CGP275	AL1C40	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP276	AL1C41	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP277	AL1C42	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP278	AL1C45	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Sim	Não	Não
CGP279	AL1C46	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP280	AL1C47	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP281	AL1C48	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP282	AL1C49	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP283	AL1C50	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP284	AL1C50	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP285	AL1C52	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP286	AL1C53	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP287	AL1C55	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP288	AL1C57	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP289*	AL1C58	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP290	AL1C6	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP291	AL1C60	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP293	AL1C62	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Sim	Não	Não
CGP294	AL1C63	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Sim	Não	Não
CGP295	AL1C64	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP296	AL1C65	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP297	AL1C66	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP298	AL1C7	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP299	AL1C8	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP300	AL1C9	<i>Staphylococcus</i> sp.	Queijo minas	Não	Não	Não
CGP301	H1C1	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP302*	H1C10	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP303	H1C11	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP304	H1C12	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP305	H1C13	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP306	H1C14	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não

CGP307	H1C15	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP308	H1C16	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP309	H1C17	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP310	H1C18	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP311	H1C19	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP312	H1C2	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP313*	H1C20	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP314	H1C21	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP315	H1C22	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP316	H1C23	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP317	H1C24	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP318	H1C25	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP319	H1C26	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP320	H1C27	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP321	H1C28	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP322	H1C29	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP323	H1C3	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP324	H1C30	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP325	H1C31	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP326	H1C32	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP327	H1C33	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP328	H1C34	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP329*	H1C35	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP330	H1C36	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP331	H1C37	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP332	H1C38	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP333	H1C39	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP334	H1C4	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP335	H1C40	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP336	H1C41	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP337*	H1C42	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Sim

CGP338	H1C43	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP339	H1C44	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP340	H1C45	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP341	H1C47	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP342	H1C49	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP343	H1C5	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP344	H1C50	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP345	H1C51	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP346	H1C52	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP347	H1C53	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP348	H1C54	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP349	H1C55	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Não	Não	Não
CGP350	H1C56	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP351	H1C57	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP352	H1C58	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP353	H1C59	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP354	H1C6	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP355	H1C60	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP356	H1C7	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP357	H1C8	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP358	H1C9	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP359	H1C48	<i>Staphylococcus</i> sp.	Leite humano	Sim	Não	Não
CGP360*	ATCC 3	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	ATCC	Não	Não	Sim
CGP361	ATCC4	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	ATCC	Não	Não	Sim
CGP362*	ATCC 5	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	ATCC	Não	Não	Sim
CGP363	ATCC 6	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	ATCC	Sim	Não	Sim
CGP364	ATCC 7	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	ATCC	Sim	Não	Sim
CGP365	ATCC 8	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	ATCC	Sim	Não	Não
CGP367	ATCC 19	<i>Kokuria rhizophila</i> ATCC 9341	ATCC	Não	Não	Não
CGP368	ATCC 22	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 35667	ATCC	Não	Não	Sim

\*Amostras testadas como reveladoras também

**Apêndice 03.** Distribuição das amostras de bactérias Gram negativas utilizadas nos experimentos de antagonismo.

BASTONETES GRAM NEGATIVOS						
CÓDIGO TESE	ESPÉCIMES TESTADOS	IDENTIFICAÇÃO	ORIGEM	ANTAGONISMO-BACTÉRIA	ANTAGONISMO-FUNGO	ANTAGONISMO-LEISHMANIA
BGN1*	H3C5	<i>Pseudomonas putida</i>	Leite humano	Não	Não	Sim
BGN2	H3C13	<i>Pseudomonas sp.</i>	Leite humano	Não	Não	Não
BGN3*	H3C23	<i>Pseudomonas sp.</i>	Leite humano	Não	Não	Não
BGN4	AL3C13	<i>Pseudomonas sp.</i>	Queijo minas	Sim	Não	Não
BGN5	AL3C20	<i>Aeromonas sp.</i>	Queijo minas	Não	Não	Não
BGN6	AL3C22	<i>Enterobacter sp.</i>	Queijo minas	Não	Não	Não
BGN7	AL3C24	<i>A. baumaniicalcoaceticus</i>	Queijo minas	Sim	Não	Não
BGN8*	AL3C25	<i>A. baumaniicalcoaceticus</i>	Queijo minas	Não	Não	Sim
BGN9*	AL3C40	<i>Enterobacter amnigenus</i>	Queijo minas	Não	Não	Não
BGN10*	AL3C52	<i>Enterobacter sp.</i>	Queijo minas	Não	Não	Não
BGN11	AL3C61	<i>Pseudomonas sp.</i>	Queijo minas	Sim	Não	Não
BGN12	AL3C66	<i>Pseudomonas sp.</i>	Queijo minas	Não	Não	Não
BGN13	AL3C77	<i>Pseudomonas sp.</i>	Queijo minas	Não	Não	Não
BGN14	AL3C79	<i>Pseudomonas sp.</i>	Queijo minas	Não	Não	Não
BGN15	AL3C98	<i>Pseudomonas putida</i>	Queijo minas	Não	Não	Não
BGN16	AL3C99	<i>E. coli</i>	Queijo minas	Sim	Não	Não
BGN17	AL3C108	<i>E. coli</i>	Queijo minas	Não	Não	Não
BGN18	AL3C118	<i>E. coli</i>	Queijo minas	Sim	Não	Não
BGN19	A3C2	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN20	A3C3	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN21	A3C4	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN22	A3C5	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN23	A3C6	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN24	A3C7	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN25	A3C8	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN26	A3C9	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não

BGN27	A3C10	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN28	A3C11	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN29	A3C12	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN30	A3C13	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN31	A3C14	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN32	A3C15	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN33	A3C16	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN34	A3C17	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN35	A3C18	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN36	A3C19	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN37	A3C20	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN38	A3C21	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN39	A3C22	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN40	A3C23	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN41	A3C24	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN42	A3C25	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN43	A3C26	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN44	A3C27	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN45	A3C28	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN46	A3C29	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN47	A3C30	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN48	A3C31	<i>Leccrercia adecarboxylata</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN49	A3C32	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN50	A3C33	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN51	A3C34	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN52	A3C35	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN53	A3C36	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN54	A3C37	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Sim	Não
BGN55	A3C38	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN56	A3C39	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN57	A3C40	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não

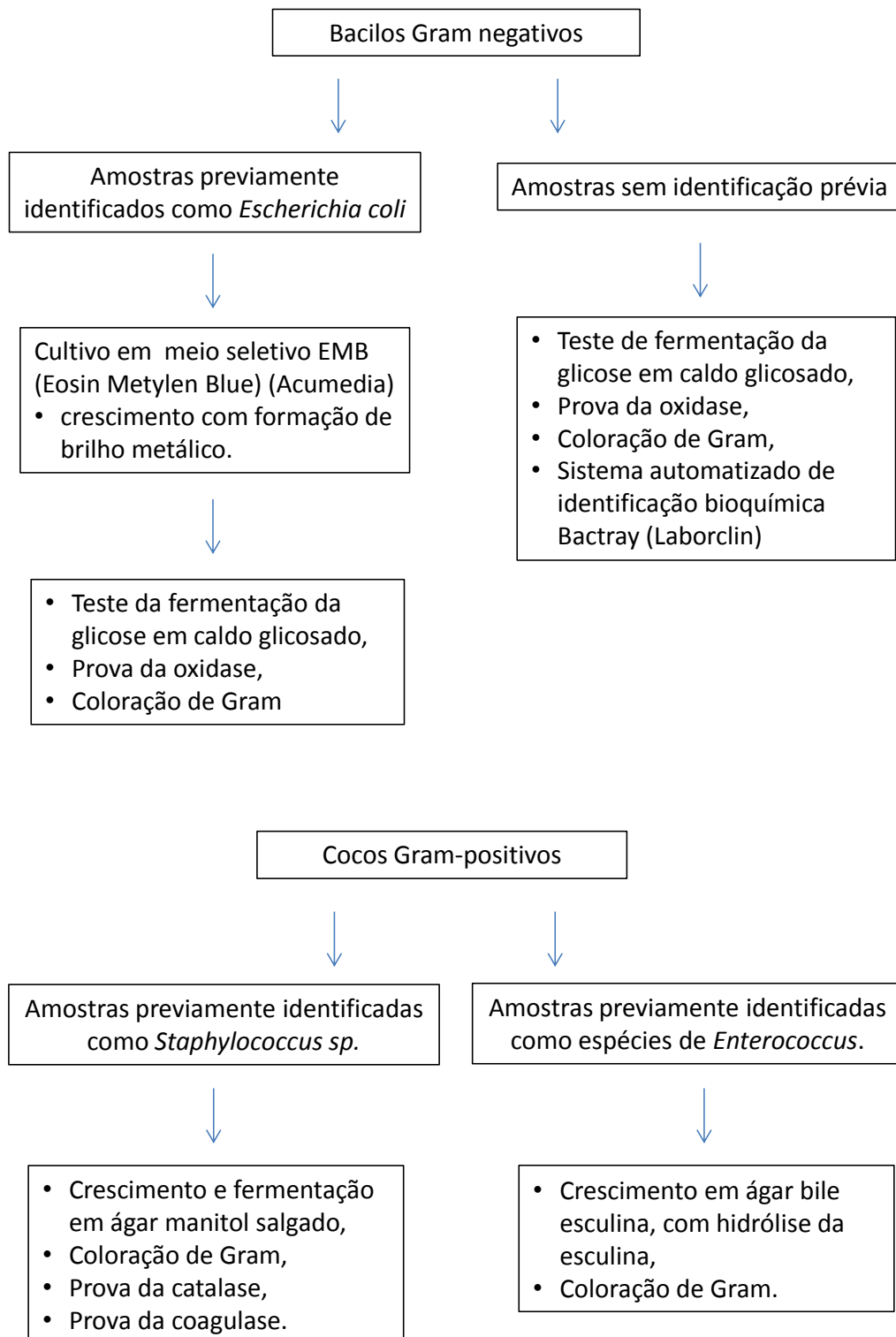
BGN58	A3C41	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN59	A3C42	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN60	A3C43	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN61	A3C44	<i>E. coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN62	A3C45	<i>E. coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN63	A3C46	<i>E. coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN64	A3C47	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN65	A3C48	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN66	A3C49	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN67	A3C50	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN68	A3C51	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Sim
BGN69	A3C52	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Sim
BGN70	A3C53	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN71	A3C54	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN72	A3C55	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN73	A3C56	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN74	A3C57	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN75	A3C58	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN76	A3C59	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN77	A3C60	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN78	A3C61	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN79	A3C62	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN80	A3C63	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN81	A3C64	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN82	A3C65	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN83	A3C66	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN84	A3C67	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN85	A3C68	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN86	A3C69	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN87	A3C70	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN88	A3C71	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não

BGN89	A3C72	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Sim	Não	Não
BGN90	A3C73	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN91	A3C74	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN92	A3C75	<i>E.coli</i>	Fezes de pombo	Não	Não	Não
BGN93*	ATCC 1	<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>	ATCC	Sim	Não	Não
BGN94*	ATCC 2	<i>E. coli ATCC35218</i>	ATCC	Não	Não	Não
BGN95*	ATCC 14	<i>Salmonella Typhi CFP/IAL 1472</i>	ATCC	Não	Não	Sim
BGN96*	ATCC 13	<i>Enterobacter aerogenes CDC 1680</i>	CDC	Não	Não	Não
BGN97*	ATCC 15	<i>E. coli ATCC 11229</i>	ATCC	Não	Não	Sim
BGN98	ATCC 18	<i>Serratia marcescens CDC 4133</i>	CDC	Sim	Não	Não
BGN99	AL3C47	<i>Pseudomonas sp.</i>	Queijo minas	Não	Não	Sim

\*Amostras testadas como reveladoras também.



**Apêndice 04.** Fluxograma utilizado na confirmação da identidade dos microrganismos pertencentes à coleção de cultura do laboratório e utilizados como amostras produtoras.



**Apêndice 05.** Dados do crescimento bacteriano (contagem UFC/mL e log da contagem) das amostras com melhor atividade antagonista contra *Leishmania amazonensis* no teste de inibição do crescimento desta pelo método do MTT.

tempo crescimento (hs)	Contagem*	log	% INIBIÇÃO
0	6,6X10 <sup>5</sup>	5,8	0
3	3,4X10 <sup>6</sup>	6,5	24,2
6	8,6X10 <sup>6</sup>	6,9	48,5
12	1,7X10 <sup>7</sup>	7,2	27,4
18	9,4X10 <sup>6</sup>	7,2	21,4
24	1,5X10 <sup>7</sup>	7,2	22
30	7,3X10 <sup>6</sup>	6,9	14,02

tempo crescimento	Contagem**	log	% INIBIÇÃO
0	1,9x10 <sup>5</sup>	5,3	0
3	9,7X10 <sup>5</sup>	6	2,13
6	6,4x10 <sup>6</sup>	6,8	42,5
12	1,6x10 <sup>7</sup>	7,2	25,7
18	2,2x10 <sup>7</sup>	7,2	22,8
24	1,7x10 <sup>7</sup>	7,2	31,05
30	8,8x10 <sup>6</sup>	7	14,66

tempo crescimento	Contagem***	log	% INIBIÇÃO
0	3x10 <sup>5</sup>	5,5	2,2
3	8,9x10 <sup>6</sup>	7	38,13
6	1,2x10 <sup>7</sup>	7,1	37,78
12	1,1x10 <sup>7</sup>	7	31,11
18	5,6x10 <sup>7</sup>	7,2	27,66
24	1,7x10 <sup>7</sup>	7,2	17,5
30	1,2x10 <sup>7</sup>	7,1	6,79

\**Enterococcus* sp. (CGP162) em meio TSB

\*\**S. epidermidis* ATCC 11228 (CGP360) em meio BHI

\*\*\**E. coli* ATCC12229 (BGN97) em meio TSB

**Apêndice 06.** Dados do crescimento bacteriano ao longo de 30 horas de cultivo, no melhor meio de cultura para produção de substância antagonista contra *Leishmania amazonensis* avaliada pelo método do MTT.

Meio de cultura	Tempo (h) <sup>d</sup>	% de Inibição de crescimento de <i>L. amazonensis</i> IFLA/Br/67/PH8 <sup>b/c</sup>								
		CGP162 <sup>a</sup>			CGP360 <sup>a</sup>			BGN97 <sup>a</sup>		
		24	48	72	24	48	72	24	48	72
BHI	0	-	-	-	s/a	s/a	s/a	-	-	-
	3	-	-	-	2,13	0,57	2,75	-	-	-
	6	-	-	-	42,50	19,57	4,38	-	-	-
	12	-	-	-	25,7	s/a	s/a	-	-	-
	18	-	-	-	22,8	2,45	0,54	-	-	-
	24	-	-	-	31,05	s/a	14,09	-	-	-
	30	-	-	-	14,66	4,23	s/a	-	-	-
TSB	0	s/a	1,2	0,13	-	-	-	2,20	0,67	S/a
	3	24,2	13,40	s/a	-	-	-	38,13	46,45	2,27
	6	48,5	17,48	0,27	-	-	-	37,78	27,5	s/a
	12	27,4	10,2	1,3	-	-	-	31,11	4,03	0,29
	18	21,4	9,20	s/a	-	-	-	27,66	s/a	s/a
	24	22,0	4,33	s/a	-	-	-	17,5	4,20	0,46
	30	14,02	s/a	29,4	-	-	-	6,79	s/a	s/a

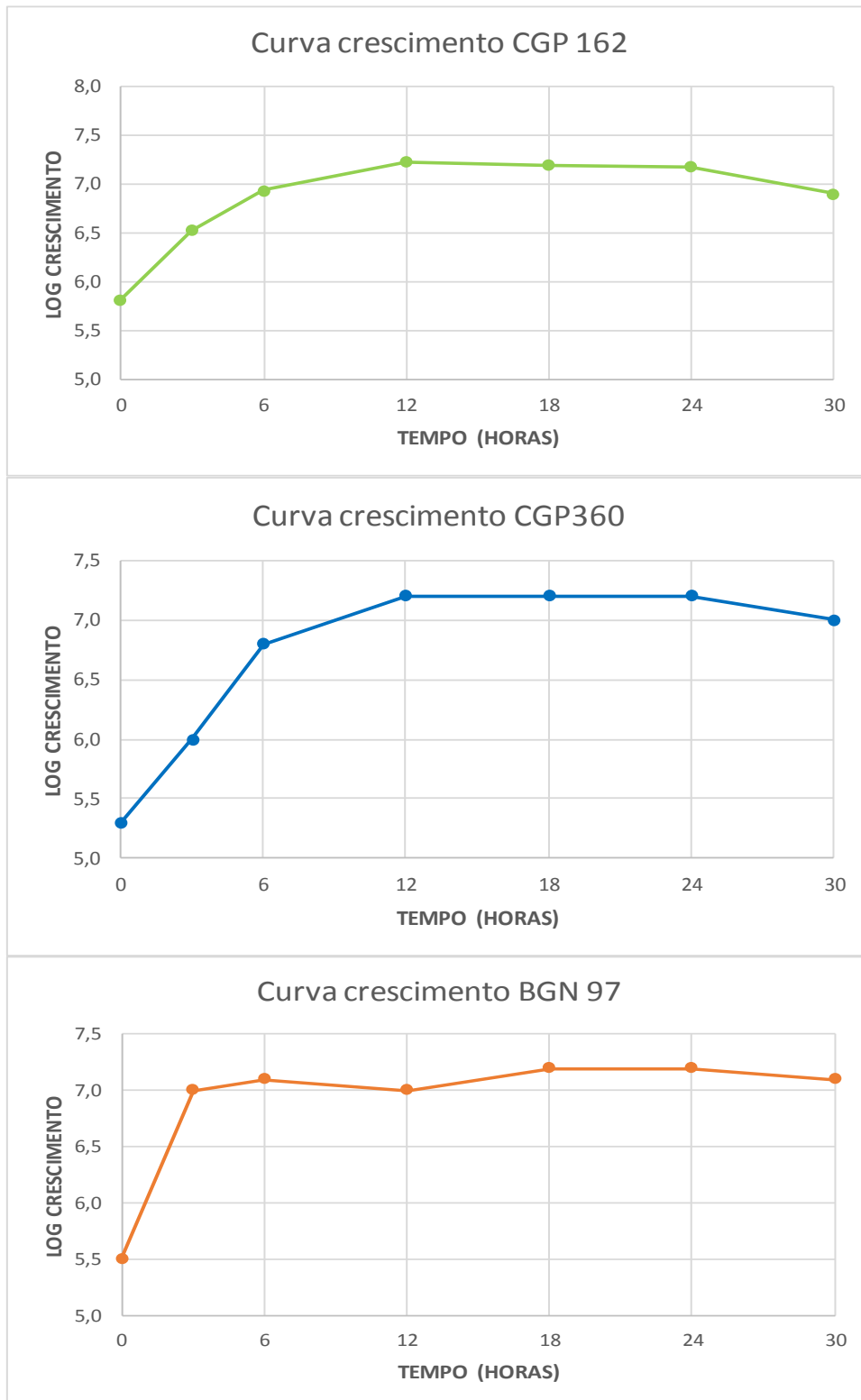
\* Teste de inibição sem atividade detectada pelo método do MTT na concentração de uso- s/a

<sup>a</sup> concentração dos extratos- 40 mg/mL

<sup>b</sup> controle positivo – anfotericina B 0,01 mg/ml (IC50)

<sup>c</sup> controle negativo – meio de cultura Warren

**Apêndice 07.** Curva de crescimento bacteriano no melhor meio de cultura para avaliação da produção de substância antagonista ao longo do tempo.



**Apêndice 08.** Valores brutos de Inibição do crescimento de *Leishmania* sp. por amostras bacterianas na prospecção para seleção de candidatas.

PROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS BACTERIANOS COM AÇÃO EM <i>Leishmania</i> sp.				
LINHAGENS TESTADAS	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. chagasi</i>	<i>L. major</i>	<i>L. amazonensis</i>
	LEITURA MTT % (FAIXA DE INIBIÇÃO APÓS 72 HORAS)			
CGP363	20,17	NR	0,00	s/a
CGP364	23,40	NR	0,00	s/a
CGP361	2,27	NR	0,00	5,06
<b>BGN97</b>	0,56	0,11 - 14,14	0,78 - 18,16	13,12– 58,95
<b>CGP360</b>	15,82 - 49,32	0 - 26,95	18,07 - 30,57	14,47 - 32,99
CGP368	0,12 - 11,35	0 - 5,0	0 - 2,83	s/a
CGP337	0 - 12,38	0 - 10,54	0 - 22,83	0 - 4,36
BGN1	25,49	NR	23,56	0 - 30,75
BGN68	10,97	NR	0,00	24,20
BGN69	17,50	NR	8,98	32,13
CGP235	24,34	NR	11,44	s/a
CGP183	0 - 6,81	0 - 24,19	15,7 - 30,13	8,55 - 19,19
<b>CGP162</b>	25,27 - 28,10	0 - 24,68	9,34 - 18,38	17,38 – 48,75
CGP182	5,33	NR	0,00	s/a
CGP248	0 - 5,74	0 - 8,29	0 - 1,84	0,44 - 14,50
BGN8	18,81	NR	0,00	s/a
BGN99	s/a	0 - 28,24	0 - 12,34	5,66
CGP27	s/a	s/a	s/a	14,39 - 17,3
CGP362	s/a	s/a	s/a	5,84 - 25,47
BGN95	s/a	s/a	s/a	s/a

\*s/a = sem atividade

\*\* NR= teste não realizado

\*\*\* Todos os extratos bacterianos testados estavam a 300 mg/mL (Cf=20 mg/mL)

**Apêndice 09.** Valores de Inibição do crescimento de *Leishmania amazonensis* pelas amostras bacterianas candidatas ao longo do tempo de crescimento do parasito.

AMOSTRA BACTERIANA	CONCENTRAÇÃO DE USO (CIM)	%INIBIÇÃO (N=2)	DESVIO PADRÃO	TEMPO DE CONTATO (HS)
CGP162- EB	40 mg/mL	33,5	2,4466	72 hs
CGP162- EB	40 mg/mL	27,6	8,3226	72 hs
CGP162- EB	20 mg/mL	48,8	1,2374	72 hs
CGP162- EB	20 mg/mL	33,0	22,1819	72 hs
CGP162- EB	40 mg/mL	51,9	20,3647	24 hs
CGP162- EB	40 mg/mL	59,4	0,9687	48 hs
CGP162- EB	40 mg/mL	52,8	17,1544	72 hs
CGP162- E40	40 mg/mL	38,9	5,8478	24 hs
CGP162- E40	40 mg/mL	35,1	9,4257	48 hs
CGP162- E40	40 mg/mL	25,4	10,6561	72 hs
CGP162- E70	40 mg/mL	s/a	0,0000	24 hs
CGP162- E70	40 mg/mL	25,2	7,1064	48 hs
CGP162- E70	40 mg/mL	22,4	11,2006	72 hs
CGP162- E100	40 mg/mL	17,6	6,8307	24 hs
CGP162- E100	40 mg/mL	31,3	3,7595	48 hs
CGP162- E100	40 mg/mL	42,9	24,0770	72 hs
CGP360- EB	40 mg/mL	37,2	5,7558	24 hs
CGP360- EB	40 mg/mL	36,4	5,3245	48 hs
CGP360- EB	40 mg/mL	27,8	12,5653	72 hs
CGP360- E40	40 mg/mL	32,7	1,3930	24 hs
CGP360- E40	40 mg/mL	36,1	14,5805	48 hs
CGP360- E40	40 mg/mL	26,2	15,9382	72 hs
CGP360- E70	40 mg/mL	40,1	7,5802	24 hs
CGP360- E70	40 mg/mL	28,9	26,1135	48 hs
CGP360- E70	40 mg/mL	23,4	14,8280	72 hs
CGP360- E100	40 mg/mL	56,5	46,3084	24 hs
CGP360- E100	40 mg/mL	55,6	52,3047	48 hs
CGP360- E100	40 mg/mL	52,2	61,9284	72 hs
BGN97- EB	40 mg/mL	60,1	6,9084	24 hs
BGN97- EB	40 mg/mL	70,3	6,0953	48 hs
BGN97- EB	40 mg/mL	48,9	8,7893	72 hs
BGN97- E40	40 mg/mL	22,4	2,7860	24 hs
BGN97- E40	40 mg/mL	34,1	1,6617	48 hs
BGN97- E40	40 mg/mL	16,3	2,2698	72 hs
BGN97- E70	40 mg/mL	9,6	13,5411	24 hs
BGN97- E70	40 mg/mL	33,9	7,4741	48 hs
BGN97- E70	40 mg/mL	10,7	1,7183	72 hs
BGN97- E100	40 mg/mL	13,0	5,0912	24 hs
BGN97- E100	40 mg/mL	42,0	30,8440	48 hs
BGN97- E100	40 mg/mL	25,0	0,2192	72 hs

\*EB= extrato bruto

\*\*E40= extrato precipitado a 40 % com sulfato de amônio

\*\*\*E70= extrato precipitado a 70 % com sulfato de amônio

\*\*\*\*E100= extrato precipitado a 100 % com sulfato de amônio

s/a= sem atividade

# Anexos

---

**Anexo 01.** Parecer do Comitê de ética para uso de formas amastigotas.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
Comissão de Ética no Uso de Animais

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 056/2013 – CEUA sobre “Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos infectados com *Leishmania sp* - lotes 2014-2015”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de ELAINE SOARES COIMBRA, com a colaboração de PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO, LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI e DANIELA TRIVELATO DA SILVEIRA DE PAULA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 03/12/2013. Para o desenvolvimento da pesquisa serão liberados 576 camundongos (576 fêmeas), da linhagem Balb/c, conforme solicitado e que serão entregues no período de 01/01/2014 a 31/12/2015.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº. 056/2013 - CEUA about “Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos infectados com *Leishmania sp* - lotes 2014-2015” under responsibility of ELAINE SOARES COIMBRA, with collaboration of PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO, LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI and DANIELA TRIVELATO DA SILVEIRA DE PAULA - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 03/12/2013. For the development of this research 576 mice (576 female) of the Balb/c lineage, will be released as requested and they will be delivered in the period of 01/01/2014 to 31/12/2015.

**Juiz de Fora, 04 de dezembro de 2013.**

Presidente  
CEUA

Vice-presidente  
CEUA



**Anexo 02. Parecer do Comitê de ética para uso de macrófagos peritoneais.**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
Comissão de Ética no Uso de Animais

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 054/2013 – CEUA sobre “Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c - lotes 2014-2015”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de ELAINE SOARES COIMBRA, com a colaboração de PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO, LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI e DANIELA TRIVELATO DA SILVEIRA DE PAULA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 03/12/2013. Para o desenvolvimento da pesquisa serão liberados 144 camundongos (144 fêmeas), da linhagem Balb/c, conforme solicitado e que serão entregues no período de 01/02/2014 a 31/12/2015.

**CERTIFICATE**

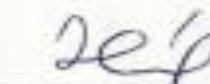
We certify that the protocol nº. 054/2013- CEUA about “Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c - lotes 2014-2015”, under responsibility of ELAINE SOARES COIMBRA, with collaboration of PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO, LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI and DANIELA TRIVELATO DA SILVEIRA DE PAULA - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 03/12/2013. For the development of this research 144 mice (144 female) of the Balb/c lineage, will be released as requested and they will be delivered in the period of 01/02/2014 to 31/12/2015.

Juiz de Fora, 04 de dezembro de 2013.



---

Presidente  
CEUA



---

Vice-presidente  
CEUA