

ISOLAMENTO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE ANUROS DA FAUNA BRASILEIRA.

Daniele Gordillo Fernandes e Patrick Jack Spencer
Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

O aparecimento de cepas microbianas com resistência aos antibióticos comumente usados é um problema mundial e constitui um sério problema de saúde pública, estimulando a busca por novos compostos antimicrobianos para os quais a resistência ainda não foi adquirida [1]. A secreção cutânea de várias espécies de anuros (rãs, sapos e pererecas) é uma rica fonte de peptídeos com amplo espectro de atividade antibacteriana e antifúngica, com potencial para desenvolvimento de fármacos [2]. O mecanismo pelo qual estas moléculas induzem morte microbiana não envolve a ligação a receptores específicos da membrana celular, mas uma interação inespecífica com os fosfolípidos de membrana. Consequentemente, o desenvolvimento de resistência à ação destes peptídeos ocorre em taxas que estão várias ordens de magnitude abaixo das observadas para antibióticos convencionais [3].

OBJETIVO

O presente trabalho visa a investigação da presença de agentes antimicrobianos na secreção cutânea de pererecas do gênero *Trachycephalus*.

METODOLOGIA

A secreção foi obtida por estimulação mecânica dos animais imersos em água deionizada, sendo o líquido resultante congelado e liofilizado. A seguir foram realizados testes de solubilidade em diversos solventes (ácido fórmico, ácido trifluoroacético (TFA), acetonitrila e

metanol), partindo de 1 mg de secreção. Após centrifugação estas amostras foram usadas para testes de atividade antimicrobiana em placas de Petri previamente semeadas com *Aeromonas hydrophyla*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ou *Pseudomonas aeruginosa*. Para tal foram depositados discos de papel de filtro, dispostos na placa em sextantes (um disco a cada 60 graus de arco). A seguir foram aplicados 10 µL de cada solução nas placas e as mesmas foram incubadas por 16 horas em estufa bacteriológica a 37 °C. A atividade antimicrobiana foi então avaliada observando-se o halo de inibição de crescimento dos microorganismos ao redor dos discos. Após os testes microbianos foi possível visualizar halos nos discos que continham o veneno de *Trachycephalus resinifictrix*. Tendo essa espécie apresentado melhores resultados de inibição o mesmo foi submetido a uma cromatografia em fase reversa. Nesta etapa foi utilizado uma coluna Source 15 RPC 4.6/150, monitorando a absorvância em 280 e 220 nm.

Nessa coluna foram injetados 100 µL do veneno de *Trachycephalus resinifictrix* com uma seringa de 1 mL. Foram coletados 7 picos de 1 mL cada. Posteriormente foram colocados em tubos de 15 mL e liofilizados.

RESULTADOS

Os resultados obtidos até o momento indicam que o produto liofilizado tem maior solubilidade em solventes aquosos, acidificados e que a secreção de *Trachycephalus resinifictrix* aparenta ser a mais eficaz na inibição do crescimento

microbiano. As figuras 1 e 2 mostram a inibição microbiana pelo veneno do anuro.

A figura 3 mostra a cromatografia em fase reversa da secreção de *Trachycephalus resinifictrix*.

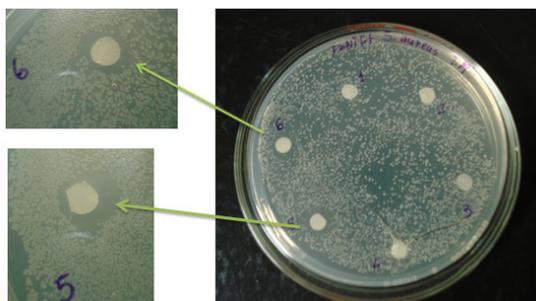


Figura 1: Placa de *Staphylococcus aureus* com o veneno de *Trachycephalus resinifictrix*. ; Número 5: veneno em ácido fórmico; 6: ácido fórmico.

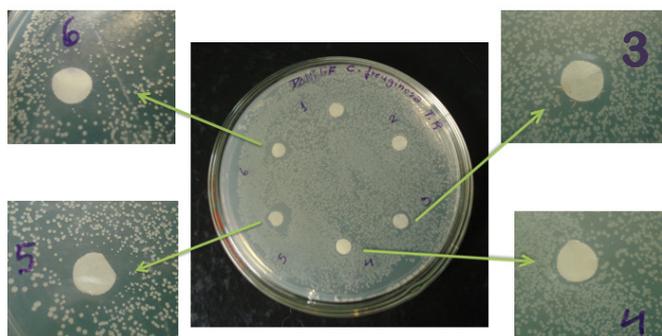


Figura 2: Placa de *Citrobacter freundii* com o veneno de *Trachycephalus resinifictrix*.

Número 3: veneno em TFA; 4: TFA; 5: veneno em ácido fórmico; 6: ácido fórmico.

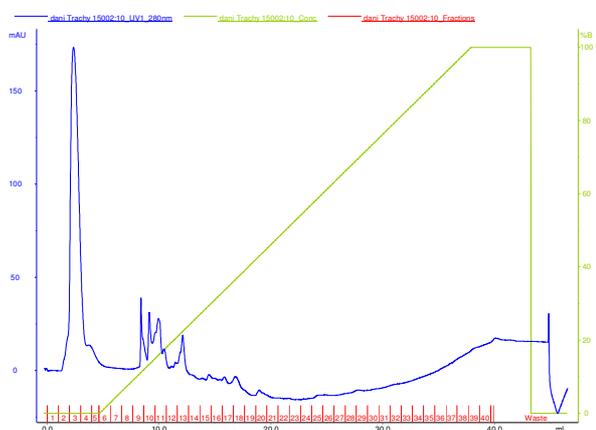


Figura 3: Cromatografia em fase reversa do veneno de *Trachycephalus resinifictrix*.

CONCLUSÕES

Com o uso da metodologia descrita foi possível visualizar a formação de halos de inibição na placa que continha o veneno da espécie *Trachycephalus resinifictrix* com as bactérias Gram-negativa *Citrobacter freundii* e Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Após separação por cromatografia de fase reversa, pudemos observar que o pico 6, apesar da baixa concentração no veneno total, apresentou significativa ação antimicrobiana, sendo o maior halo de inibição no modelo com bactéria Gram-negativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Conlon, J.M. & Sonnevend A. - Antibacterial peptides in frog skin secretions. *Methods Mol Biol.* **618** (2010), pp. 3-14.
- [2] Pál T., Abraham B., Sonnevend A., Jumaa P. & Conlon M.J.- Brevinin-1BYa: a naturally occurring peptide from frog skin with broad-spectrum antibacterial and antifungal properties. *International Journal of Antimicrobial Agents* **27**, (2006), pp. 525-529.
- [3] Zasloff M., Antimicrobial peptides in health and disease, *N. Engl. J. Med.* **347** (2002), pp. 1199–1200.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq-PIBIC, CNEN, IPEN