



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ADSON ÁVILA DE SOUZA

***McLTP₁* (*Morinda citrifolia* **LIPID TRANSFER PROTEIN 1**): EFEITO
**ANTIMICROBIANO *IN VITRO* E ATIVIDADE PROTETORA SOBRE A SEPSE
INDUZIDA EM CAMUNDONGOS****

FORTALEZA - CE

2016

ADSON ÁVILA DE SOUZA

***McLTP₁ (Morinda citrifolia LIPID TRANSFER PROTEIN 1): EFEITO
ANTIMICROBIANO IN VITRO E ATIVIDADE PROTETORA SOBRE A SEPSE
INDUZIDA EM CAMUNDONGOS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira

FORTALEZA – CE

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S713m Souza, Adson Ávila de.
McLTP1 (Morinda citrifolia Lipid Transfer Protein 1) : efeito antimicrobiano in vitro e atividade protetora sobre a sepse induzida em camundongos / Adson Ávila de Souza. – 2016.
117 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.
1. Morinda citrifolia L.. 2. Proteínas transferidoras de lipídeos. 3. Propriedades antimicrobianas. 4. Sepses. I. Título.

CDD 572

ADSON ÁVILA DE SOUZA

***McLTP₁ (Morinda citrifolia LIPID TRANSFER PROTEIN 1): EFEITO
ANTIMICROBIANO IN VITRO E ATIVIDADE PROTETORA SOBRE A SEPSE
INDUZIDA EM CAMUNDONGOS***

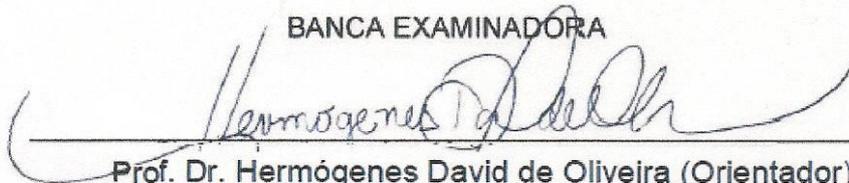
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira

Aprovada em: 28 / 01 / 2016.

BANCA EXAMINADORA



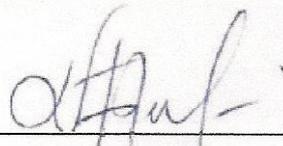
Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof^a. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof^a. Dra. Andreлина Noronha Coelho de Souza

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dedico com muito amor e gratidão a Deus, a meus pais e irmãos, e a todos da minha família!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a **DEUS** pela vida. Por me iluminar e abençoar nas minhas conquistas, e por me acalentar e conceder forças para que eu possa superar todas as dificuldades.

A meus pais, **José** e **Alândia**, por fazerem todos os esforços possíveis e impossíveis para assegurar aos filhos a educação. Por acompanhar cada etapa em nossas vidas com muita dedicação e afeto, sendo fundamental para nosso crescimento como homens.

A meus irmãos, **Alinson** e **Anderson**, pelos incentivos e conselhos nos meus estudos, e por serem fonte de exemplo para mim, o qual me espelho e inspiro.

A todos da **família**, em especial à minhas avós **Nely** e **Guiomar**, por se fazerem presentes em minha vida nos momentos mais difíceis, por me darem sempre as palavras certas para que eu prosseguisse com meus sonhos, e pelo amor incondicional dedicado me fazendo sempre feliz.

Ao meu orientador, **Dr. Hermógenes David de Oliveira**, pelo amor fraterno como “Pai científico”, dedicação e disponibilidade em me orientar. Por ter participado profundamente, sem medir esforços, na concretização dessa etapa em minha vida. Pelo seu carinho demonstrado em nossas conversas, e por ser esse exemplo de profissional sempre empenhado na pesquisa, tornando-se uma fonte de inspiração.

Aos professores membros da minha banca examinadora, **Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa** e **Profa. Dra. Andrelina Noronha Coelho de Souza** por dedicarem seu tempo em ler este trabalho, contribuindo para engrandecê-lo através de suas sugestões e críticas construtivas.

A todos os amigos do Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas (BioAP) que através dos momentos de descontração, auxílio experimental e palavras de estímulo que muito me fortaleceram, participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho: **Adrienne, Ana Márjory, Dyély, Andréa, Amanda, Chris**

e **Dyene**. Meu obrigado especial a **Vilmara** e **Camila** pela amizade, pelas conversas que me contagiaram de alegria e por me apoiarem nos momentos difíceis.

À **Profa. Dra. Marjory Lima Holanda**, por toda a dedicação e empenho na coordenação do BioAP e a todos seus estudantes, **Roberta, Áurea, Augusto**, e especialmente, ao **George** e **Acrísio**, pelas palavras de incentivo e momentos de alegrias.

À **Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro**, e aos demais **professores coordenadores do Centro Especializado de Micologia Médica**, pela receptividade e orientações nas atividades biológicas com fungos, e aos seus estudantes, em especial **Tony** e **Rosana**, pelo auxílio nos experimentos.

À **Profa. Dra. Nadia Accioly Pinto Nogueira** e aos seus estudantes do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada, em especial a **Andressa, Gleilton** e **Matheus**, pelas orientações e parceria nos experimentos com bactérias.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica, **Xavier, Thiago** e **Wallace**, pela cumplicidade e solidariedade.

Ao meu amor, **Andreza**, que me traz grandes felicidades e dedica um carinho enorme por mim. Por seu afeto, compreensão, paciência e palavras de conforto nos momentos difíceis.

Aos amigos de escola, de longa data, em especial, **Alan, Filipe** e **Mário Jr.**, pelos momentos de alegrias convividos e que vão ficar sempre guardados nas lembranças. E por serem sempre fonte de companheirismo, e de muitas felicidades.

À **Universidade Federal do Ceará**, e a todos os funcionários que fazem parte do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, por viabilizar as condições necessárias para que eu pudesse alcançar essa etapa com êxito, e condicionar uma formação de qualidade me tornando apto a superar os novos desafios que virão em relação minha vida acadêmica.

E a **todos os professores em minha vida**, dos tempos de escola, de graduação e mestrado, que mediaram todos os esforços para repassar uma parcela de seus conhecimentos, sem o qual certamente não teria chegado até aqui. Apesar da simplicidade de minhas palavras, grandes e eternos são os meus agradecimentos.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Os trabalhos experimentais que compõem esta dissertação foram realizados com o apoio dos seguintes Programas/Instituições:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - através das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica realizadas em parceria com o **Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas**, sob a coordenação do Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira e da Profa. Dra. Marjory Lima Holanda; **Centro Especializado de Micologia Médica**, sob a coordenação da Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro; e **Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada**, sob a coordenação da Profa. Dra. Nadia Accioly Pinto Nogueira.

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq) – através de concessão de bolsa de mestrado e de fomento à pesquisa.

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) e **FUNDAÇÃO CEARENSE DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (FUNCAP)** – através do apoio financeiro necessários na melhoria nas condições experimentais e formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

RESUMO

A resistência microbiana é um dos principais problemas de saúde pública deste século, e que tem levado ao aumento da preocupação dos quadros graves de sepse em unidades de tratamento intensivo. Diante da inespecificidade da terapia e inexistência de drogas aprovadas no tratamento da sepse, tem-se demandado novas abordagens terapêuticas. Dentre essas abordagens, peptídeos antimicrobianos vegetais têm se destacado como moléculas promissoras com possibilidade de intervenção terapêutica na saúde humana. Recentemente, nosso grupo de pesquisa isolou uma proteína transferidora de lipídeos do tipo 1 (*McLTP₁* - UniProt Accession Number: C0HJH5) das sementes de *Morinda citrifolia* L (noni). Este trabalho objetivou avaliar o potencial antibacteriano e antifúngico de *McLTP₁* sobre espécies de interesse clínico e investigar seu efeito protetor em camundongos submetidos à sepse. *McLTP₁* foi isolada através do fracionamento de proteínas do extrato total das sementes de noni com ácido tricloroacético 2,5% e ultrafiltração em membrana de 30 kDa. Propriedades antimicrobianas de *McLTP₁* foram avaliadas *in vitro* sobre crescimento planctônico e biofilmes de espécies de *Candida* spp. e de bactérias gram-positivas e gram-negativas em placas de 96 poços. Em adição, foi avaliado o efeito de *McLTP₁* sobre fatores de virulência bacterianos, e sua atividade moduladora sobre antimicrobianos da prática clínica. A sepse em camundongos foi induzida através do modelo de ligadura e perfuração do ceco, sendo avaliados a taxa de sobrevivência, peso corpóreo e peso fresco relativo dos órgãos, parâmetros hematológicos e efeito antipirético em animais tratados por via intraperitoneal e oral com *McLTP₁* (8 mg/kg). Embora *McLTP₁* não tenha sido capaz de inibir a formação de biofilmes de *Candida* spp., a natureza antifúngica de *McLTP₁* foi observada por meio da inibição do crescimento planctônico de *C. parapsilosis* na concentração de 25 µg/mL (52,72%; $p < 0,05$), e através da potencialização significativa do efeito de anfotericina B (0,06 µg/mL; 28,6% de inibição do crescimento de *C. parapsilosis*) quando no cotratamento com *McLTP₁* (50 µg/mL; 88,1% de inibição). Quanto à atividade antibacteriana, *McLTP₁* não inibiu o crescimento planctônico de bactérias gram-negativas, exibindo efeito contra bactérias gram-positivas do gênero *Staphylococcus*, sendo observadas inibições sobre células planctônicas variando entre 18,7% (0,78 µg/mL; $p < 0,05$) e 98,8% (800 µg/mL; $p < 0,05$), e sobre biofilmes

em 34,5%, (12,5 µg/mL; $p < 0,05$) a 73,6% (400 µg/mL). *McLTP₁* reduziu a atividade dos fatores de virulência bacterianos catalase e coagulase, e atuou em sinergismo com o antibiótico oxacilina. Em tratamentos profiláticos e terapêuticos na dose de 8 mg/kg pelas vias intraperitoneal e oral, *McLTP₁* aumentou a sobrevivência de animais com sepse, apresentando efeito antipirético já nas primeiras horas após a indução da sepse. Além disso, *McLTP₁* reduziu significativamente o quadro de leucocitose observado nos animais com sepse do grupo controle. Portanto, *McLTP₁* possui propriedades antimicrobianas e efeito protetor sobre animais com sepse promissores, fato este inédito para essa classe de proteínas, configurando-se como candidato terapêutico potencial desta síndrome.

Palavras-chave: *Morinda citrifolia* L.. Proteínas transferidoras de lipídeos. *McLTP₁*. Propriedades antimicrobianas. Sepse.

ABSTRACT

Microbial resistance is a major public health problem of this century, that has led to increased concern of severe sepsis cases in intensive care units. Due to the nonspecific therapy and the absence of drugs approved for sepsis treatment, new therapeutic approaches has been demanded. Among these approaches, plant antimicrobial peptides have emerged as promising molecules with a potential therapeutic intervention in human health. Recently, our research group isolated a lipid transfer protein type 1 (*McLTP₁* - UniProt Accession Number: C0HJH5) from *Morinda citrifolia* L. seeds (noni). This study aimed to evaluate the antibacterial and antifungal potential of *McLTP₁* against species of clinical concern and investigate its protective effect in mice subjected to sepsis. *McLTP₁* was isolated from noni seeds crude extract by protein fractionation with trichloroacetic acid 2.5% and ultrafiltration in 30 kDa membrane. *McLTP₁* antimicrobial properties were evaluated in vitro against planktonic cells and biofilm of *Candida* spp., gram-positive and gram-negative bacteria species in 96-well plates. In addition, it was evaluated the effect of *McLTP₁* on bacterial virulence factors and its modulatory properties on clinical antimicrobial drugs. Sepsis in mice was induced by cecal ligation and puncture model, being evaluated the survival rate, body weight and fresh organ weights, haematological parameters and antipyretic effect in animals treated intraperitoneally and orally with *McLTP₁* (8 mg/kg). Although *McLTP₁* was not able to inhibit *Candida* spp. biofilm formation, *McLTP₁* antifungal activity was observed through growth inhibition of *Candida parapsilosis* planktonic cells at 25 µg/mL (52.72%; $p < 0.05$), and through the potentiation effect of amphotericin B (0.06 µg/mL; 28.6% inhibition *C. parapsilosis* growth) when in the cotreatment with *McLTP₁* (50 µg/mL; 88.1 % inhibition). Regarding to the antibacterial activity, *McLTP₁* did not inhibit gram-negative bacteria planktonic cells growth, exhibiting effect only against gram-positive bacteria of *Staphylococcus* genus, being observed inhibitions on planktonic cells ranging from 18.7% (0.78 µg/mL, $p < 0.05$) to 98.8% (800 µg/mL; $p < 0.05$) and against biofilms from 34.5% (12.5 µg/mL; $p < 0.05$) to 73.6% (400 µg/mL). *McLTP₁* reduced the activity of bacterial virulence factors such as catalase and coagulase, and acted in synergism with the antibiotic oxacillin. In prophylactic and therapeutic treatments at a dose of 8 mg/kg by intraperitoneal and oral route, *McLTP₁* increased the survival of

animals with sepsis, showing antipyretic effect within the first hours after sepsis induction. Moreover, *McLTP*₁ significantly reduced leukocytosis condition observed to the animals of vehicle group with sepsis. In conclusion, *McLTP*₁ showed promising antimicrobial properties and protective effects on animals with sepsis, a new activity for this class of proteins, configured as a therapeutic potential candidate to this syndrome.

Keywords: *Morinda citrifolia* L.. Lipid Transfer Protein. *McLTP*₁. Antimicrobial properties. Sepsis.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------------|--|----|
| Figura 1- | Mecanismos de ação dos antibióticos e seus alvos. | 26 |
| Figura 2- | Distribuição geográfica de <i>Morinda citrifolia</i> L.. | 43 |
| Figura 3- | <i>Morinda citrifolia</i> L.: visão geral das características botânicas. | 44 |
| Figura 4- | Perfil eletroforético (PAGE-SDS 15%) em condições não redutoras de $McLTP_1$ obtida através do protocolo modificado. | 66 |
| Figura 5- | Inibição no crescimento de <i>Candida</i> spp. na presença de $McLTP_1$ | 67 |
| Figura 6- | Efeito de $McLTP_1$ sobre a formação de biofilmes de <i>Candida</i> spp. | 68 |
| Figura 7- | Efeito modulador de $McLTP_1$ sobre ITR e AMB frente ao crescimento planctônico de <i>Candida parapsilosis</i> . | 69 |
| Figura 8- | Efeito de $McLTP_1$ sobre o crescimento planctônico de bactérias gram-negativas e gram-positivas. | 71 |
| Figura 9- | Efeito de $McLTP_1$ sobre a formação de biofilmes de <i>S. aureus</i> . | 72 |
| Figura 10- | Efeito de $McLTP_1$ na sobrevida de animais com sepse induzida por CLP. | 77 |
| Figura 11- | Análise do peso corpóreo dos animais com sepse induzida por CLP tratados com $McLTP_1$. | 77 |
| Figura 12 A e B- | Efeito de $McLTP_1$ sobre parâmetros hematológicos dos animais com sepse induzida por CLP. (A) quantidade de leucócitos; (B) quantidade de granulócitos. | 84 |
| Figura 12 C e D- | Efeito de $McLTP_1$ sobre parâmetros hematológicos dos animais com sepse induzida por CLP. (C) quantidade de linfócitos; (D) quantidade de plaquetas. | 85 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Tabela 1- | Critérios de definição clínica da sepse. | 22 |
| Tabela 2- | Propriedades moleculares e antimicrobianas das diferentes classes de AMPs. | 32 |
| Tabela 3- | Diferenças entre nsLTP ₁ e nsLTP ₂ . | 36 |
| Tabela 4- | Propriedades antimicrobianas de LTPs. | 40 |
| Tabela 5- | Propriedades farmacológicas descritas para os extratos de <i>Morinda citrifolia</i> L. | 45 |
| Tabela 6- | Efeito sinérgico do cotratamento com McLTP ₁ e oxacilina frente ao crescimento planctônico de <i>Staphylococcus</i> spp. | 73 |
| Tabela 7- | Efeito de McLTP ₁ sobre a atividade de fatores de virulência em <i>Staphylococcus</i> spp. | 75 |
| Tabela 8- | Peso fresco relativo dos órgãos de animais tratados com McLTP ₁ após 72 horas da indução da sepse por CLP. | 78 |
| Tabela 9- | Efeito do pré-tratamento com McLTP ₁ sobre parâmetros hematológicos dos animais com sepse induzida por CLP após 24 horas. | 81 |
| Tabela 10- | Efeito do pré-tratamento com McLTP ₁ sobre parâmetros hematológicos dos animais com sepse induzida por CLP após 48 horas. | 82 |
| Tabela 11- | Efeito do pré-tratamento com McLTP ₁ sobre parâmetros hematológicos dos animais com sepse induzida por CLP após 72 horas. | 83 |
| Tabela 12- | Efeito antipirético mediado por McLTP ₁ em animais com sepse induzida por CLP. | 87 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------|---|
| ACCP | <i>American College of Chest Physicians</i> |
| AMB | Anfotericina B (do inglês, <i>Amphotericin B</i>) |
| AMP | Peptídeos antimicrobianos (do inglês, <i>Antimicrobial Peptides</i>) |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BHI | Infusão de Cérebro e Coração (do inglês, <i>Brain Heart Infusion</i>) |
| BSA | Albumina Sérica Bovina (do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>) |
| CI50 | Concentração inibitória de 50% |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CLSI | <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i> |
| CoNS | Estafilococcus Coagulase Negativo (do inglês, <i>Coagulase Negative Staphylococci</i>) |
| CoPS | Estafilococcus Coagulase Positivo (do inglês, <i>Coagulase Positive Staphylococci</i>) |
| CTAB | Brometo de Cetiltrimetilamônio |
| CV | Cristal Violeta |
| DC | Dicroísmo Circular |
| DO | Densidade Óptica |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DTT | Ditiotreitol |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FLU | Fluconazol |
| HCT | Hematócrito (do inglês, <i>haematocrit</i>) |
| HGB | Hemoglobina (do inglês, <i>haemoglobin</i>) |
| ICIF | Índice de Concentração inibitória Fracionada |
| IL | Interleucina |
| ITR | Itraconazol |
| MCH | Hemoglobina celular média (do inglês, <i>Mean Cell Haemoglobin</i>) |
| MCHC | Concentração de hemoglobina corpuscular média celular (do inglês, <i>Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration</i>) |
| MODS | Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (do inglês, <i>Multiple Organ Dysfunction Syndrome</i>) |

| | |
|-------|--|
| MOPS | 3-[N-morfolino] propano - ácido sulfônico (do inglês, <i>3-(N-morpholino) propanesulfonic acid</i>) |
| MRSA | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (do inglês, <i>Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>) |
| MCV | Volume corpuscular médio (do inglês, <i>Mean Corpuscular Volume</i>) |
| nsLTP | Proteínas Transferidoras de Lipídeos Não Específica (do inglês, <i>Non Specific Lipid Transfer Protein</i>) |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PES | Polietersulfona |
| RBC | Glóbulos vermelhos (do inglês, <i>Red Blood Cells</i>) |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RPMI | <i>Rosewel Park Memorial Institute</i> |
| SCCM | <i>Society of Critical Care Medicine</i> |
| SIRS | Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (do inglês, <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>) |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>) |
| TCA | Ácido tricloroacético (do inglês, <i>Trichloroacetic Acid</i>) |
| TEMED | N, N, N',N' - Tetrametiletilenodiamina |
| TNF | Fator de necrose tumoral (do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor</i>). |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 Doenças infecciosas de natureza bacteriana e fúngica | 18 |
| 1.2 Antimicrobianos: retrato histórico e contexto atual | 23 |
| 1.3 Resistência aos antimicrobianos e seus mecanismos | 28 |
| 1.4 Peptídeos antimicrobianos de plantas – estrutura, função e potenciais para uso clínico | 31 |
| 1.4.1 Proteínas Transferidoras de Lipídeos em plantas: uma visão holística dos aspectos bioquímicos e funcionais | 33 |
| 1.5 <i>Morinda citrifolia</i> L. – aspectos botânicos e farmacológicos | 41 |
| 2 OBJETIVOS | 51 |
| 2.1 Objetivo Geral | 51 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 51 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 52 |
| 3.1 Material biológico | 52 |
| 3.2 Antimicrobianos, meios de cultura e reagentes químicos | 53 |
| 3.3 Métodos | 54 |
| 3.3.1 Purificação de <i>McLTP</i>₁ | 54 |
| 3.3.2 Ensaio biológicos <i>in vitro</i> | 55 |
| 3.3.2.1 Atividade biológica sobre fungos de interesse clínico | 55 |
| 3.3.2.2 Atividade biológica com bactérias de interesse clínico | 57 |
| 3.3.3 Ensaio biológico <i>in vivo</i> em modelo de sepse | 62 |
| 3.3.3.1 Modelo de sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP) | 63 |
| 3.3.3.2 Avaliação da sobrevivência, peso corpóreo e fresco relativo dos órgãos | 64 |
| 3.3.3.3 Avaliação de parâmetros hematológicos | 64 |
| 3.3.3.4 Análise da temperatura corpórea de animais saudáveis ou com sepse induzida por CLP | 64 |
| 3.3.4 Análises estatísticas | 65 |
| 4 RESULTADOS | 66 |
| 4.1 Purificação de <i>McLTP</i>₁ | 66 |
| 4.2 Atividade antifúngica de <i>McLTP</i>₁ | 67 |
| 4.2.1 Sensibilidade de <i>Candida spp.</i> à <i>McLTP</i>₁ em crescimento planctônico | 67 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.2 Sensibilidade de <i>Candida spp.</i> à <i>McLTP₁</i> em formação de biofilme | 68 |
| 4.2.3 Efeito modulador de <i>McLTP₁</i> na atividade antifúngica de ITR e AMB | 68 |
| 4.3 Ensaio de atividade antibacteriana | 70 |
| 4.3.1 Efeito de <i>McLTP₁</i> sobre o crescimento planctônico de bactérias de interesse clínico | 70 |
| 4.3.2 Efeito de <i>McLTP₁</i> sobre a formação de biofilmes de <i>S. aureus</i> | 72 |
| 4.3.3 Efeito modulador de <i>McLTP₁</i> na atividade antibacteriana da gentamicina e oxacilina | 73 |
| 4.3.4 Efeito de <i>McLTP₁</i> sobre a atividade de fatores de virulência em <i>Staphylococcus spp.</i> | 73 |
| 4.4 Ensaio biológico <i>in vivo</i> em modelo de sepse | 75 |
| 4.4.1 Efeito do (pré) tratamento com <i>McLTP₁</i> sobre mortalidade, peso corpóreo e peso fresco relativo dos órgãos dos animais com sepse | 75 |
| 4.4.2 Efeito do (pré) tratamento com <i>McLTP₁</i> em parâmetros hematológicos de animais com sepse | 79 |
| 4.4.3 Efeito antipirético dos tratamentos profiláticos e terapêutico de <i>McLTP₁</i> em animais com sepse induzida por CLP | 85 |
| 5 DISCUSSÃO | 88 |
| 6 CONCLUSÃO | 101 |
| REFERÊNCIAS | 102 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças infecciosas de natureza bacteriana e fúngica

Ao longo do curso da história humana, dentre os diversos desafios associados à saúde, as doenças infecciosas têm recebido atenção especial, devido à sua capacidade de ocasionar profundo impacto ao ser humano (FAUCI; MORENS, 2012). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, bactérias, vírus, protozoários e fungos são microrganismos patogênicos associados a doenças infecciosas, podendo sua transmissão ser acometida indireta ou diretamente de um indivíduo para o outro. O estabelecimento de uma doença infecciosa requer a sobrevivência e multiplicação do patógeno em outro organismo, comumente maior, denominado hospedeiro. Como resultado da patogenia, geralmente surgem sinais e sintomas indesejados provenientes de danos aos tecidos e órgãos do hospedeiro, produto da ação do microrganismo infectante (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2004).

Anualmente, estima-se a ocorrência de aproximadamente 58 milhões de mortes de pessoas em todo o mundo, levando-se em consideração suas diversas causas, e desses casos, cerca de 25%, quase 15 milhões, são resultado de doenças infecciosas, não incluindo àquelas provenientes de doenças infecciosas secundárias em febre reumática e doença cardíaca reumática, câncer de fígado e cirrose, ou outras doenças crônicas. Juntamente com a guerra e a fome, as doenças infecciosas ranqueiam em primeiro lugar na lista das maiores ameaças à sobrevivência humana (FAUCI; MORENS, 2012; WU *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, as doenças infecciosas de natureza fúngica vêm crescendo significativamente, alcançando números bastante expressivos. Acredita-se que mais de 300 milhões de pessoas sofram de alguma doença fúngica resultando em mais de 1.350.000 mortes anualmente. Dos casos de mortes notificados atribuídos a fungos, mais de 90% são causados por microrganismos dos gêneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* ou *Pneumocystis* (BROWN *et al.*, 2012; COWEN *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2014). Desses, o gênero *Candida* representa as causas mais comuns de doenças infecciosas fúngicas em todo o mundo.

Candida spp. compreende microrganismos comensais humanos, habitando principalmente a pele, o trato gastrointestinal, o sistema geniturinário, a orofaringe e o trato respiratório superior não sendo responsáveis por danos em indivíduos saudáveis. No entanto, diante de quadros de comprometimento do sistema imune dos indivíduos, podem atuar como agentes oportunistas, causando patogenias, podendo provocar infecções superficiais, como nos casos de candidíase vulvovaginal, esofágica ou orofaríngea, bem como infecções sistêmicas, acarretando candidemia, e candidíase invasiva profunda dos tecidos (LUM *et al.*, 2015). Nesses quadros de infecções, os sintomas podem variar desde uma febre simples, como conduzir a um quadro grave de choque séptico, sendo intimamente associado a uma elevada taxa de mortalidade (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

Embora *Candida albicans* lidere o gênero como o principal patógeno na epidemiologia das doenças infecciosas fúngicas invasivas, sendo responsável por 42,5% das infecções, outras espécies têm sido evidenciadas com frequências cada vez maiores, particularmente, *Candida tropicalis* (27,3%), *Candida parapsilosis* (21,9%) e *Candida glabrata* (4,4%) (EL-AZIZI; FARAG; KHARDORI, 2015; LIU *et al.*, 2014). Essa crescente incidência de espécies “não-albicans” na epidemiologia das infecções fúngicas invasivas vêm sendo associada com o aumento da resistência às drogas terapêuticas da prática clínica, fato que preocupa cada vez mais as populações mundiais (SILVA, C. R. *et al.*, 2013).

Igualmente preocupantes são as doenças infecciosas causadas por bactérias, uma vez que têm sido comumente atreladas a elevadas taxas de morbidade e mortalidade, sendo as proporções de bactérias gram-positivas e negativas multiresistentes aos antibióticos disponíveis, crescentes e em condições aceleradas (LOS *et al.*, 2013).

Dentre as bactérias gram-negativas, destacam-se os membros da família Enterobacteriaceae como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., patógenos oportunistas frequentemente associados em quadros graves de infecções comumente do trato urinário, intra-abdominais, pneumonia nosocomial e infecções da corrente sanguínea em pacientes imunocomprometidos (KAYE; POGUE, 2015; PELEG; HOOPER, 2010). Adicionalmente, *Pseudomonas aeruginosa* tem sido apontado como um dos principais agentes envolvidos em pneumonia nosocomial, associados em 20% dos casos relatados, sendo um dos microrganismos mais difíceis de tratar nesses acessos infecciosos, levando a taxas de mortalidade em

torno de 40% em unidades de terapia intensiva. Além disso, *P. aeruginosa* é o segundo gram-negativo mais comum envolvido em infecções do trato urinário associado a catéteres, ficando atrás apenas de *E. coli*. (DOSLER; KARAASLAN, 2014; KAYE; POGUE, 2015; LU *et al.*, 2014; MARTIROSOV; LODISE, 2015).

Entre as bactérias gram-positivas, os estafilococos são os principais agentes causadores de infecções em ambientes comunitários e hospitalares. Apresentam uma distribuição bastante difusa na natureza, podendo ser encontrados no ar, poeira, alimentos, água, e essencialmente colonizando a superfície da pele e mucosas de mamíferos, inclusive do ser humano, sendo *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* as bactérias comensais mais comuns presentes no homem (JOO; OTTO, 2015; WIDERSTRÖM *et al.*, 2012).

O gênero *Staphylococcus* apresenta cerca de 40 espécies, sendo dividido em dois grupos: coagulase negativos (CoNS – “Coagulase Negative Staphylococci”) e coagulase positivos (CoPS – “Coagulase Positive Staphylococci”), dos quais encontram-se aqueles associados ao homem, *S. epidermidis* e *S. aureus*, respectivamente (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

Apesar de menos virulentos em relação às espécies coagulase positivas, bactérias coagulase negativas têm emergido como microrganismos oportunistas de importância clínica envolvidos em infecções na corrente sanguínea e provenientes de dispositivos médicos como catéteres e próteses, sendo *S. epidermidis* a principal espécie em infecções provocadas por CoNS (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014; CHERIFI *et al.*, 2013; WIDERSTRÖM *et al.*, 2012).

Em relação às bactérias coagulase positiva, *S. aureus* destaca-se como o mais versátil e virulento patógeno oportunista, sendo frequentemente associado a eventos de resistência aos antibióticos (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina – do inglês, “MRSA”), sendo motivo constante de preocupação à saúde pública. Anualmente, nos Estados Unidos, “MRSA” tem sido associado com 20000 casos de mortes superando, inclusive, números relatados para o HIV/AIDS (COREY, 2009; JOO; OTTO, 2015; TONG *et al.*, 2015; WOODFORD; LIVERMORE, 2009). A versatilidade atribuída a *S. aureus* traduz-se em sua capacidade de ocasionar um amplo espectro de infecções e síndromes, englobando infecções na pele e tecidos moles, doenças de origem alimentar, síndrome de choque tóxico, bacteremia, endocardite, osteomielite, fascíte necrotizante, pneumonia e sepse (RIGBY; DELEO, 2012).

Atualmente, uma das causas recorrentes de preocupação em unidades de tratamento intensivo são os quadros graves de sepse. A sepse pode ser definida como uma Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (“SIRS”, do inglês) que conduz a efeitos danosos no hospedeiro no combate a uma infecção. Essa definição foi descrita mediante consenso pela ACCP/SCCM (*American College of Chest Physicians e Society of Critical Care Medicine*), em 1991, e revisitada em 2001, permitindo o estabelecimento de critérios para a diferenciação de grupos de pacientes baseados na severidade da resposta em: sepse, sepse severa e choque séptico (**Tabela 1**) (COHEN, 2002; MARTIN, 2012; RAMACHANDRAN, 2014).

Recentemente, nos Estados Unidos, a incidência de sepse e sepse severa tem aumentado atingindo patamares de 250 e 300 casos por 100000 habitantes, respectivamente. Estimativas de custos hospitalares gerados no tratamento de pacientes com sepse tem alcançado cerca de 14 bilhões de dólares por ano (CAWCUTT; PETERS, 2014; RAMACHANDRAN, 2014). No Brasil, dados epidemiológicos acerca dos casos de sepse são bastante limitados. Em um desses estudos, conduzidos na região Nordeste entre 2005 e 2009, foram identificados 55.759 casos de sepse no Sistema Único de Saúde (SUS), dos quais, 20.334 levaram a óbito (SILVA, B. L. *et al.*, 2013).

Embora em grande parte atribuída à endotoxinas provenientes de bactérias gram-negativas, estudos recentes têm apontado para a crescente participação de bactérias gram-positivas na epidemiologia dos casos de sepse, com os seguintes agentes etiológicos comumente associados: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, dentre os gram-positivos, e *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Klebsiella* spp. dentre os gram-negativos (CAWCUTT; PETERS, 2014; RAMACHANDRAN, 2014).

Tabela 1 – Critérios de definição clínica da sepse.

| Condições de nomes ACCP/SCCM* | Definição de critérios |
|--------------------------------------|---|
| SIRS** | Temperatura corporal > 38°C ou < 36°C; Frequência cardíaca 90 bpm; respiração 20/min (ou pressão parcial de CO ₂ no sangue < 32 mmHg); glóbulos brancos 12000/μl ou 4000/ μl ou >10% de formas imaturas. |
| Sepse | Pelo menos dois critérios SIRS causados por uma infecção conhecida ou suspeita. |
| Sepse severa | Sepse com disfunção aguda do órgão (incluindo hipoperfusão e hipotensão) causado pela sepse. |
| Choque séptico | Sepse com hipotensão persistente ou refratária ou hipoperfusão tecidual apesar de reanimação adequada com fluidos. |
| MODS*** | A presença de disfunção de órgãos em um paciente gravemente doente de tal forma que a homeostase não pode ser mantida sem intervenção |

Fonte: MARTIN, 2012

* ACCP/SCCM – American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine;

** SIRS: Systemic inflammatory response syndrome;

*** MODS: Multiple organ dysfunction syndrome

Atualmente, o tratamento da sepse engloba estratégias diversas que envolvem a neutralização dos microrganismos e seus produtos, através da administração de antibióticos e agentes inativantes de endotoxinas; supressão da inflamação de forma não seletiva mediante corticóides ou ibuprofeno, e sobre mediadores inflamatórios tais como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1), fator ativador de plaquetas, óxido nítrico; aplicação intravenosa de fluidos como solução fisiológica ou albumina 4% para a manutenção da volemia, administração de drogas vasoconstrictoras, tais como vasopressina e noradrenalina; administração de agentes anti-coagulantes como a proteína C ativada, antitrombina, trombomodulina, ou heparina; e manutenção da função dos órgãos através de ventilação mecânica e terapia renal (DEUTSCHMAN; TRACEY, 2014; FINK; WARREN, 2014; MARSHALL, 2014). Assim, tendo em vista a inespecificidade da terapia e inexistência de drogas aprovadas no tratamento da sepse, e o fato de muitos agentes medicamentosos propostos que se encontram em fase clínica mostrarem-se ineficazes, tem-se demandado incessantemente novas abordagens

terapêuticas direcionadas ao tratamento da sepse (DEUTSCHMAN; TRACEY, 2014; SHUKLA *et al.*, 2014). Além disso, ao longo da evolução humana, o reconhecimento dos patógenos e suas doenças correlatas, e os dados epidemiológicos alarmantes, têm conduzido desde os primórdios das civilizações à busca por mecanismos de superar esses males, fato este que tem perdurado até os dias de hoje.

1.2 Antimicrobianos: retrato histórico e contexto atual

Relatos históricos, que datam de 3000 anos, já apontam para a utilização de antimicrobianos pelas civilizações humanas, sendo descritos o emprego de bolores por médicos chineses no tratamento de tumores e feridas infeccionadas, enquanto os sumérios indicavam a utilização de curativos embebidos por uma mistura de vinho, cerveja, zimbro e ameixas. Posteriormente, em descrições que remontam 1500 anos, médicos indianos propuseram o tratamento de disenterias através da ingestão de certos mofos, ao passo que índios norte americanos e os maias usavam fungos na cura de feridas, úlceras e infecções intestinais (RODRIGUES *et al.*, 2007).

Como é possível observar, desde tempos remotos, que antecedem inclusive a descoberta dos microrganismos e sua importância na gênese de muitas doenças, verifica-se a preocupação do homem no tratamento de enfermidades, sendo reconhecido o valor terapêutico de fungos (mofos e bolores) como alternativa na cura de infecções (RODRIGUES *et al.*, 2007). Do mesmo modo, a utilização de plantas medicinais pelas comunidades humanas com a mesma finalidade remonta milhares de anos, mesmo sem o conhecimento dos componentes químicos envolvidos na prevenção das doenças (SILVA; FERNANDES JÚNIOR, 2010).

Um marco importante e que revolucionou o desenvolvimento da ciência e da indústria química, ocorreu em 1820, através dos trabalhos de Pelletier e Caventou, os quais levaram ao isolamento de um alcaloide obtido a partir do pó das raízes da espécie vegetal do gênero *Cinchona*, pertencente à família Rubiaceae, denominado quinina, com notável atividade contra malária. Como resultado dessa descoberta, inúmeros métodos químicos foram desenvolvidos com vistas à purificação em maior escala para a comercialização do composto como medicamento. Apenas no século seguinte, em 1918, a síntese química da quinina foi proposta por Paul Rabe e Karl Kindler propiciando notório progresso à indústria química moderna (OLIVEIRA; SZCZERBOWSKI, 2009).

No início do século XX, mais precisamente em 1907, estudos conduzidos no laboratório de Paul Ehrlich levaram a descoberta de um derivado arsênico, diamino diidroxí arsenobenzol (asfenamina), comercializado com o nome Salvarsan® (1910), que se mostrou bastante promissor no tratamento da sífilis, uma doença endêmica e incurável naquele período. Posteriormente, um derivado mais solúvel, com menos taxas de arsênio e menos tóxico, foi produzido, Neosalvarsan®. Juntas essas drogas foram tidas como as mais prescritas durante um longo período, sendo superadas décadas depois pela penicilina (AMINOV, 2010; WILLIAMS, 2009).

Na década seguinte, em 1928, o doutor Alexander Fleming em seus trabalhos com *Staphylococcus aureus*, descobriu acidentalmente a penicilina. Fleming observou que culturas de *S. aureus* contaminadas por um agente, até então de natureza desconhecida, eram destruídas. Filtrados do contaminante levavam a lise das bactérias e não se mostraram tóxicos em animais. O contaminante foi identificado como *Penicillium notatum*, e o agente causal das mortes das culturas foi denominado como “penicilina”. A identificação e o isolamento desse composto foram dificultados devido sua instabilidade química, levando inclusive ao abandono do projeto por parte de Fleming. Apesar de descoberta em 1928, o isolamento e a caracterização da estrutura química da penicilina ocorreu apenas em 1940, por um grupo da Universidade de Oxford, liderado pelo químico Ernst B. Chain, fato que revolucionou a II Guerra Mundial, salvando milhões de vidas (KARDOS; DEMAIN, 2011).

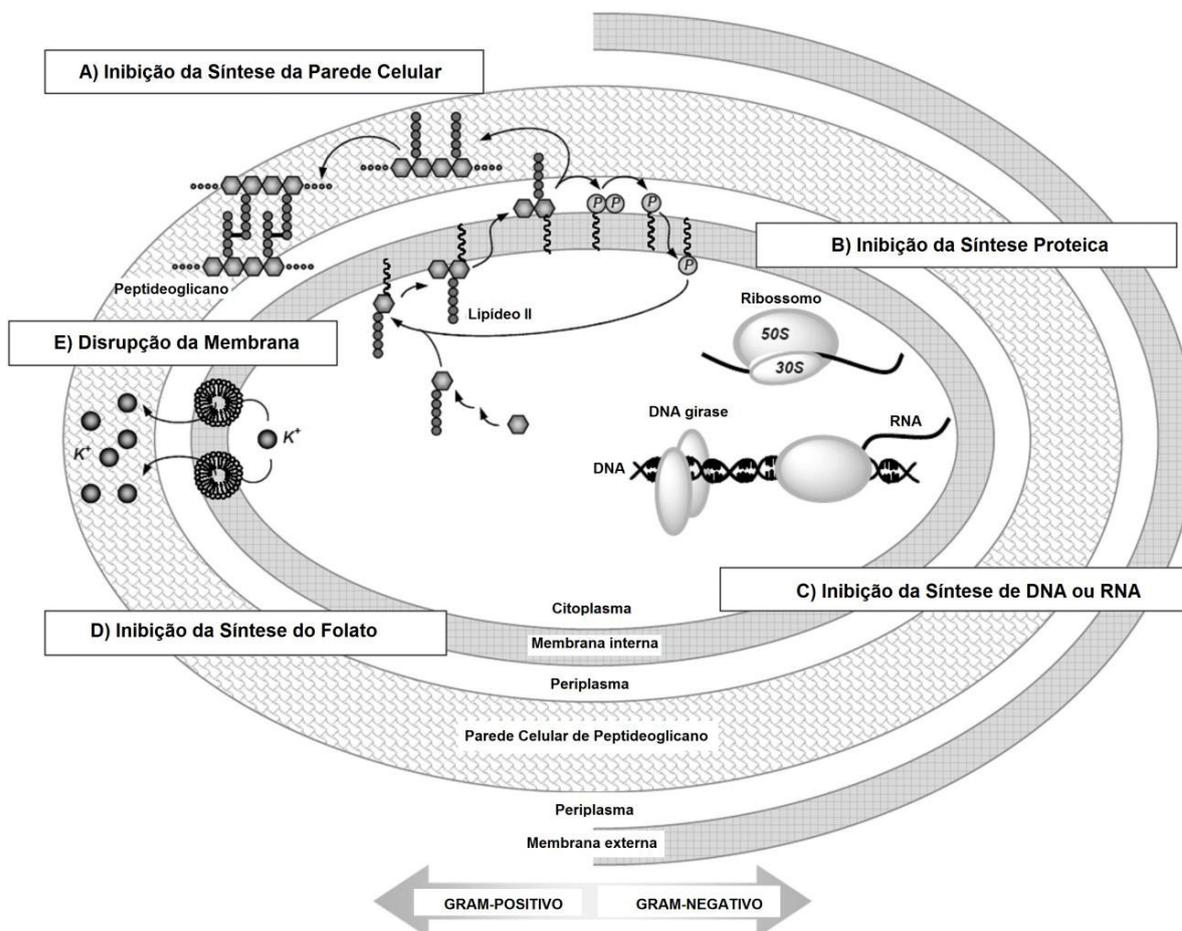
Os estudos conduzidos nesse período entre as décadas de 30 e 40, principalmente aqueles que mostraram as potencialidades das sulfas e da penicilina no tratamento das doenças infecciosas no homem e nos animais, configuraram-se como precursores fundamentais no estabelecimento de uma nova era na moderna quimioterapia (RODRIGUES *et al.*, 2007). No entanto, nesse período são relatados os primeiros casos de resistência bacteriana, em especial às sulfonamidas e bactérias resistentes à penicilina pertencentes ao grupo dos estreptococos e estafilococos, sendo este último atribuído à presença de uma enzima capaz de degradar a droga, a qual foi denominada penicilinase (TAVARES, 2000).

Como forma de superar esses eventos de resistência microbiana, foi conduzida uma “corrida” na busca por novos compostos antimicrobianos, a qual tem perdurado até os dias de hoje. As décadas subsequentes entre 40 a 60 (1940 – 1963) marcam um período de acelerada descoberta de novos quimioterápicos, sendo

considerada como a “Era de Ouro dos Antibióticos”. É desse período que uma série de compostos de fontes naturais e derivados sintéticos foram obtidos configurando as diversas classes de antibióticos hoje conhecidas, tais como os aminoglicosídeos, cloranfenicol, macrolídeos, tetraciclina, rifamicinas, glicopeptídeos, quinolonas, estreptograminas, oxazolidinonas e fidaxomicinas (LEWIS, 2013). Esse período extremamente promissor foi acompanhado por um excesso de confiança no tratamento e erradicação das doenças infecciosas. No entanto, a necessidade de elevados investimentos, atrelada à dificuldade de descoberta de novas drogas antimicrobianas com mecanismos de ação ainda não explorados diferentes daqueles já identificados, desencorajou as indústrias farmacêuticas conduzindo a uma desaceleração na busca por novas classes de antibióticos. Nesse contexto, passaram-se cerca de 40 anos desde a introdução do ácido nialidíxico, em 1962, e a inserção de novas classes de antibióticos, como das oxazolidinonas e dos lipopeptídeos, através das drogas linezolidina (descoberta em 1955 e aprovada clinicamente em 2000) e a daptomicina (descoberta em 1986, e aprovada clinicamente em 2003), respectivamente. Durante esse período, os antibacterianos disponibilizados no mercado eram provenientes de modificações daqueles já existentes (COATES *et al.*, 2002; LEWIS, 2013; WALSH; WENCEWICZ, 2014).

Apesar do grande número de moléculas descobertas e introduzidas no mercado, a terapêutica com antibióticos é considerada pobre em alvos, com os mecanismos de ação dessas drogas em bactérias bastante restritos, sendo validados clinicamente cinco tipos principais: A – aqueles atuantes na biossíntese da parede celular bacteriana, como os β -lactâmicos e a vancomicina (glicopeptídeos); B – antibióticos de ação sobre a biossíntese de proteínas, tendo como alvo principal os ribossomos, como a estreptomicina (aminoglicosídeo); C – bloqueio da replicação do DNA e na transcrição do RNA, principalmente através da atuação sobre a DNA girase e a RNA polimerase, como a ciprofloxacina (quinolonas); D – aqueles que atuam na via biossintética do ácido fólico, responsável por servir de fonte de carbono na biossíntese do DNA, as sulfonamidas agem sobre uma das enzimas da via (dihidropteroato sintase); e E – aqueles que levam à perda da integridade da membrana, como a daptomicina (**Figura 1**) (WALSH; WENCEWICZ, 2014).

Figura 1 - Mecanismos de ação dos antibióticos e seus alvos.



Fonte: adaptado de WALSH; WENCEWICZ, 2014.

Em um contexto paralelo, a história das drogas antifúngicas é um pouco mais recente àquela experimentada pelos antibióticos, com o desenvolvimento das formulações intravenosas poliênicas, como a anfotericina B (AMB) e a nistatina B, datando do final da década de 50, configurando-se como a primeira geração dos antifúngicos (SRINIVASAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014).

A AMB representa até os dias de hoje, uma das drogas convencionais mais difundidas no tratamento de diversas infecções fúngicas, incluindo, mas não se limitando, a candidíase esofágica, candidíase invasiva, aspergilose, histoplasmose, infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos. Diante do seu amplo espectro de ação, tem sido considerada “padrão de ouro” dentre os antimicóticos disponíveis (ARNOLD *et al.*, 2010; LARRU; ZAOUTIS, 2013). Seu mecanismo de ação é baseado na interação hidrofóbica de oito moléculas de AMB com o ergosterol presente na membrana dos fungos resultando em um complexo que leva à formação

de poros na membrana, ao conseqüente extravazamento dos componentes citoplasmáticos e, finalmente, à morte celular.

Apesar dos potentes efeitos mediados por AMB, têm sido observados casos de toxicidade associados ao seu uso, como febre e calafrios, hipocalcemia (quantidade baixa de potássio no sangue), anemia normocrômica e normocítica, muitas vezes acompanhada de trombocitopenia. Também têm sido atribuídos muitos casos de nefropatia, com a disfunção renal podendo ser irreversível dependendo do grau de comprometimento (DORA; SOUZA, 2005).

Como forma de superar essa propriedade tóxica, foram incentivadas as buscas por novas formulações alternativas à AMB convencional. Com isso, foram adotados sistemas de transporte de droga através do desenvolvimento de formulações de AMB que envolvem o uso de transportadores de lipídeos ou encapsulamento em lipossomos, vesículas com lipídeos catiônicos, complexos ou emulsões e surfactantes, as quais têm sido introduzidas no mercado. Alguns exemplos dessas formulações são: Abelcet® (complexo lipídico), Ambisome® (lipossomal) e Amphotec® (dispersão coloidal). É válido mencionar que tais preparações têm reduzido significativamente os efeitos adversos observados para a AMB convencional, bem como mantido o potencial terapêutico (ARNOLD *et al.*, 2010; CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006; DORA; SOUZA, 2005). Além disso, outra estratégia recém-utilizada tem sido o tratamento através da combinação de drogas antifúngicas, uma vez que ao atuarem em sinergismo viabilizam a administração de dosagens mais baixas, minimizando os efeitos adversos (TROSKIE, *et al.*, 2014).

Uma década após a descoberta dos derivados poliênicos no final da década de 60, foi obtida a primeira geração das drogas atuantes sobre a via de biossíntese do ergosterol, com os imidazóis N-substituídos, seguidos dos triazóis de primeira geração (fluconazol, itraconazol) da década de 90, e posteriormente os novos derivados triazóis de segunda geração no início deste século (voriconazol, ravuconazol, posaconazol e albaconazol) (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006).

A inibição da biossíntese do ergosterol mediada pelas drogas azólicas é decorrente da inibição da enzima lanosterol 1,4 α -desmetilase, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, provocando o aumento da permeabilidade celular, e conseqüentemente a morte do microrganismo (ARNOLD *et al.*, 2010). Dentre os azólicos, o itraconazol (ITR) destaca-se por seu amplo espectro de atividade quando comparado ao fluconazol, bem como pelo fato de ter sido o

primeiro quimioterápico biodisponível por via oral eficaz contra *Aspergillus* spp. (KATHIRAVAN *et al.*, 2012). Além da sua atividade contra o gênero *Aspergillus*, é eficaz contra *Candida* spp, incluindo cepas de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pseudallescheria boydii*, e dermatófitos (BRILHANTE *et al.*, 2012; LUMBRERAS; LIZASOAIN; AGUADO, 2003). Quanto aos efeitos adversos, embora menos tóxica em relação à anfotericina B, o uso do itraconazol acarreta frequentemente náuseas e vômitos, em decorrência da presença de ciclodextrina necessária para a solubilização do medicamento. Adicionalmente, em altas doses, pode levar a disfunções nos níveis de aldosterona, culminando com acessos de hipocalcemia, edema e hipertensão (ARNOLD *et al.*, 2010).

Do início do século XX, paralelamente ao desenvolvimento dos triazóis de segunda geração, provém a aprovação comercial pela *Food and Drug Administration* (FDA-USA) dos compostos caspofungina (2001), micafungina (2005) e anidulafungina (2006), pertencentes ao grupo de fármacos semi-sintéticos das equinocandinas, que apresentam mecanismo de ação únicos entre os antifúngicos, atuando através da inibição irreversível da enzima (1,3)- β -D-glicano sintase responsável pela biossíntese de um importante polissacarídeo presente na parede celular de diversas espécies de fungos do gênero *Candida* e *Aspergillus*, o (1,3)- β -D-glucano (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008; CHEN; SLAVIN; SORRELL, 2011).

Mesmo com o desenvolvimento de vários medicamentos nas últimas décadas, tem se condicionado um cenário de busca incessante por novas terapias no tratamento das doenças infecciosas, uma vez que são crescentes e alarmantes os casos de resistência microbiana aos antimicrobianos convencionais.

1.3 Resistência aos antimicrobianos e seus mecanismos

A resistência microbiana é um dos principais problemas de saúde pública deste século. O uso excessivo e incorreto dos antimicrobianos, as dificuldades na análise para determinação de um processo infeccioso, conduzindo a diagnósticos imprecisos, e a ausência de fiscalização na comercialização dos antimicrobianos tem levado a um cenário de seleção de microrganismos resistentes, como por

exemplo os casos de *S. aureus* resistentes à meticilina, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes, e cepas resistentes de *Candida* spp. à AMB e azólicos (ITR e FLU). Apenas nos EUA, estima-se que cerca de 23000 pessoas morrem anualmente vítimas de bactérias multiresistentes e outras 2 milhões são infectadas. Para a economia global, as estimativas chegam a 100 trilhões de dólares em gastos até 2050 para o custeio da crise humana gerada pela resistência aos antibióticos (ARIAS; MURRAY, 2015; HOEFLER *et al.*, 2006; TROSKIE, *et al.*, 2014).

A resistência microbiana pode ser entendida como um fenômeno de insensibilidade por parte de uma cepa ao antimicrobiano, sendo capaz de crescer mesmo em elevadas doses, inclusive àquelas utilizadas na prática terapêutica clínica habitual. Ela pode ser de dois tipos: resistência natural ou intrínseca e resistência adquirida ou extrínseca. A resistência natural está atrelada às características inerentes à biologia do microrganismo, tais como estruturas ou mecanismos que impeçam a atuação do agente antimicrobiano (não expressão de genes alvos ou codificação de genes que orientam a existência de receptores inativos da droga). A resistência adquirida envolve a aquisição de atributos que conferem resistência ao microrganismo primariamente sensível a um antimicrobiano, após sua exposição à droga (COWEN *et al.*, 2014; HOEFLER *et al.*, 2006).

Em se tratando de bactérias, os principais mecanismos que conferem resistência são baseados em quatro aspectos principais: (1) diminuição da entrada da droga ou restrição do seu acesso ao alvo de ação, como por exemplo, a presença de uma membrana externa em bactérias gram-negativas que envolvem a membrana plasmática e a parede celular, atuando como uma barreira física à entrada de compostos para o interior do microrganismo, ou modificações no número, tamanho e seletividade de canais captadores das drogas; (2) ativação de bombas de efluxo de drogas, mediante proteínas transmembranares capazes de reduzir a concentração dos antimicrobianos, inviabilizando seu efeito sobre a célula bacteriana; (3) clivagens enzimáticas ou modificações dos agentes antimicrobianos no ambiente intra ou extracelular, como aquela mediada pelas β -lactamases, que destroem o anel β -lactâmico na penicilina e cefalosporina, bem como através da acetilação, fosforilação e adenilação que levam à inativação de aminoglicosídeos e do cloranfenicol em bactérias gram-negativas e gram-positivas; (4) Modificação do alvo(s) antimicrobiano dentro da célula bacteriana, condicionando o não reconhecimento dos sítios de ação por parte das drogas, tendo-se como exemplo a

existência de mutações mediadas na DNA girase que têm levado a eventos de resistência a quinolonas em espécies de *S. aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (KUMAR; SINGH, 2013; LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015).

Embora, tradicionalmente, os estudos da resistência aos antibióticos tenham sido desenvolvidos em nível celular (células planctônicas), desde o final do século XX, pesquisas evidenciaram que as bactérias, em grande parte, vivem em comunidades denominadas biofilmes, que são mais resistentes às adversidades do ambiente, inclusive contra a presença de antibióticos (PENESYAN; GILLINGS; PAULSEN, 2015.).

Biofilmes configuram-se como comunidades altamente organizadas e estruturalmente complexas de microrganismos, os quais se dispõem embebidos por uma matriz extracelular polissacarídica, envolvendo os agregados celulares. A disposição em biofilmes assegura elevados níveis de nutrientes e oxigênio, bem como proteção à tensões físicas e químicas do ambiente. Biofilmes bacterianos conferem maior resistência aos antibióticos em relação às células planctônicas, por vezes, suportando concentrações 1000 vezes mais elevadas (HAAGENSEN *et al.*, 2015; PENESYAN; GILLINGS; PAULSEN, 2015; RAMAGE *et al.*, 2012).

A importância clínica dos biofilmes traduz-se nas inúmeras superfícies naturais ou de equipamentos e utensílios médicos nos quais são capazes de se originarem e se desenvolverem como: nos dentes, nas válvulas cardíacas, nos pulmões de pacientes com fibrose cística causando broncopneumonia crônica, no ouvido médio de pacientes com otite, na rinosinusite crônica, em infecções de próteses articulares e em catéteres intravenosos (HØIBY *et al.*, 2011).

Do mesmo modo, a formação de biofilmes também compreende um dos mecanismos de resistência fúngica aos antimicrobianos da prática clínica. Felizmente, apenas algumas poucas espécies patogênicas de fungos são capazes de formar biofilmes como *Cryptococcus neoformans*, *Pichia fabianii*, *Trichosporon asahii*, sendo as do gênero *Candida* as mais conhecidas e bem estudadas espécies capazes de integrarem-se em biofilmes (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). Também têm sido identificados biofilmes fúngicos nos ambientes hospitalares em dispositivos médicos, como catéteres intravenosos, catéteres urinários, próteses articulares e válvulas mecânicas cardíacas, aumentando os riscos de fungemia aguda e infecção disseminada (DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014; RAMAGE *et al.*, 2012).

Ademais, os outros mecanismos de resistência apresentados pelos fungos contra os agentes antimicrobianos, em geral, também seguem os mesmos princípios daqueles observados aos bacterianos, como: diminuição das drogas em seus alvos, através da superexpressão de bombas de efluxo condicionando uma concentração diminuta da droga no ambiente intracelular; alterações de alvos farmacológicos, como mutações em genes codificantes de enzimas alvos, levando a redução da afinidade dos antimicrobianos aos seus alvos; e a utilização de vias biossintéticas alternativas, como aquelas envolvidas na síntese do ergosterol de membrana (ANDERSON, 2005; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

Devido a essa crescente resistência adquirida pelos microrganismos patogênicos aos antimicrobianos da prática clínica, bem como os casos de toxicidade atribuídos a essas drogas convencionais, tem-se procurado fontes terapêuticas alternativas com vistas à superação dessa problemática. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 80 % da população mundial utilizam a medicina tradicional, principalmente plantas e seus subprodutos, no tratamento de doenças infecciosas (SILVA, C. R., *et al.*, 2013). Diante desse aspecto, diversos estudos têm reportado a identificação de vários compostos provenientes de plantas com propriedades antimicrobianas, incluindo as diversas classes de proteínas pertencentes ao grupo dos peptídeos antimicrobianos (AMP, do inglês “Antimicrobial Peptides”), cujas características como o baixo peso molecular, estrutura relativamente simples, restritos efeitos adversos, fácil absorção e possibilidade de administração por rotas diversas, têm os destacado em relação a outros agentes químicos (UPADHYAY *et al.*, 2014; YILI *et al.*, 2014).

1.4 Peptídeos antimicrobianos de plantas – estrutura, função e potenciais para uso clínico

Peptídeos antimicrobianos (AMP) estão presentes em todos os organismos vivos, desde microrganismos à plantas e mamíferos, atuando como componentes constitutivos ou induzíveis em suas linhas de defesas. Nas plantas, desde o isolamento do primeiro AMP, uma α purotionina de trigo, por Balls e colaboradores em 1942, muitos peptídeos antimicrobianos têm sido purificados a partir dos diversos órgãos vegetais, tais como raízes, caules, flores, frutos e sementes, os quais têm demonstrado um amplo espectro de ação contra microrganismos

fitopatogênicos, bem como àqueles patogênicos ao homem (HAMMAMI *et al.*, 2009; NAWROT *et al.*, 2014; YILI *et al.*, 2014).

Em relação ao aspecto bioquímico, os AMPs caracterizam-se, em sua grande maioria, como peptídeos catiônicos de baixa massa molecular (2 – 9 kDa), com estrutura em hélices ricas em cisteínas (4 – 8 resíduos), cujas pontes dissulfeto formadas em sua estrutura interna conferem uma conformação globular altamente estável. De acordo com a homologia na sequência primária, o padrão de distribuição das pontes dissulfeto e a estrutura tridimensional, os AMPs são classificados em nove classes: tioninas, defensinas, seferdinas, ciclotídeos, esnaquinas, heveinas, knotinas, lb-AMPs e proteínas transferidoras de lipídeos (**Tabela 2**) (CÂNDIDO *et al.*, 2014; YILI *et al.*, 2014).

Tabela 2 – Propriedades moleculares e antimicrobianas das diferentes classes de AMPs.

| Tipo | Número de resíduos de aminoácidos | Pontes Dissulfeto | Atividade biológica |
|--------------------|-----------------------------------|-------------------|---|
| seferdinas | 28~38 | 0 | Bactérias G ⁺ ; e fungos. |
| ciclotídeos | 28~37 | 3 | Bactérias G ⁻ e G ⁺⁺ ; e fungos |
| esnaquinas | 63~66 | 6 | Bactérias G ⁻ e G ⁺ ; e fungos |
| tioninas | 45~47 | 3 – 4 | Bactérias G ⁻ e G ⁺ ; e fungos |
| defensinas | 45~54 | 4 | Bactérias G ⁻ e G ⁺ ; e fungos |
| LTPs | 90~93 | 3 – 4 | Bactérias G ⁻ e G ⁺ ; e fungos |
| heveinas | 29~44 | 3 – 5 | Bactérias G ⁺ ; e fungos |
| knotinas | 35~37 | 3 | Bactérias G ⁺ ; e fungos |
| lb-AMPs | 20~33 | 2 | Bactérias G ⁺ ; e fungos |

Fonte: adaptado de YILI *et al.*, 2014.

* G⁻: gram-negativa

** G⁺: gram-positiva

Diversos estudos têm apontado para os efeitos antimicrobianos dos AMPs, como evidenciado para Cp-defensina II isolada de *Vigna unguiculata* (Cp – *Cowpea*)

que demonstrou atividade bactericida contra as espécies de *E. coli* e *S. aureus* apresentando CIM 50 de 12,2 e 24,4 μM , respectivamente. Outra defensina, PvD1 (*Phaseolus vulgaris* defensina 1), apresentou efeito inibitório sobre o crescimento das espécies de fungos *Candida albicans* e *Candida guilliermondii* com IC 50 entre 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ (FRANCO *et al.*, 2006; GAMES *et al.*, 2008).

Da classe dos ciclotídeos, cicloviolacina O2 de *Viola odorata* apresentou potencial bactericida contra as espécies de *Salmonella entérica* e *E. coli* nas concentrações de 8,7 e 2,2 μM , respectivamente. Enquanto da classe de lbAMPs, foi isolado das sementes de *Impatiens balsamina*, o peptídeo lbAMPs 1 cuja CIM foi de 2,4 e de 12,4 μM para *Enterococcus faecalis* e *S. aureus*, respectivamente (PRANTING *et al.*, 2010; TAILOR *et al.*, 1997).

Apesar de serem considerados promissores, e como estratégia alternativa como antimicrobianos, ainda não existe nenhum AMP aprovado clinicamente como droga. Entretanto, AMPs têm sido utilizados na indústria farmacêutica, na fabricação de aerossóis para pacientes com fibrose cística, sugerindo sua possibilidade de intervenção terapêutica na saúde humana (NAWROT *et al.*, 2014).

1.4.1 Proteínas Transferidoras de Lipídeos em plantas: uma visão holística dos aspectos bioquímicos e funcionais

Os lipídeos desempenham papéis fundamentais na manutenção estrutural e do metabolismo celular dos organismos vivos, através do armazenamento de energia em ligações de carbonos reduzidas, participam da compartimentalização intracelular como componentes de membranas biológicas e atuam na sinalização celular (biossíntese de hormônios). Em plantas, desempenham ainda papel na construção de camadas de cutículas, que fornecem proteção contra dessecação, bem como em respostas de estresse ao ambiente durante o crescimento e o desenvolvimento das plantas (LIU *et al.*, 2015; YEATS; ROSE, 2008). Devido a insolubilidade dessas biomoléculas em sistemas aquosos, como os ambientes intra e intercelular, faz-se necessário o auxílio através de transportadores que possam mediar o tráfego dos lipídeos entre membranas e compartimentos celulares. Puroindolinas e proteínas transferidoras de lipídeos (do inglês, Lipid Transfer Proteins - LTPs) são exemplos de moléculas envolvidas na ligação e transferências de lipídeos (CARVALHO; GOMES, 2007).

As proteínas transferidoras de lipídeos estão amplamente distribuídas entre os reinos, incluindo o reino Vegetal (TOUSHEH *et al.*, 2013). O papel de transporte de lipídeos *in vitro* por parte das LTPs tem sido investigado, sendo observada essa habilidade com uma grande variedade de moléculas hidrofóbicas, tais como ácidos graxos, acil-CoA graxos, fosfolipídeos, glicolipídeos, prostaglandina B2 e monômeros de cutina. Em virtude desse amplo espectro de atuação, esse grupo de proteínas é mais comumente denominado como proteínas transferidoras de lipídeos não-específica (Non Specific Lipid Transfer Proteins – nsLTPs) (DIZ *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2015). Evolutivamente no reino vegetal, LTPs têm sido encontradas apenas nas plantas terrestres, tanto naquelas sem flores (criptógamas) quanto naquelas com flores (fanerógamas), não se fazendo presentes nas algas, sugerindo uma importância dessas proteínas na adaptação ao ambiente terrestre (EDSTAM *et al.*, 2011). O primeiro isolamento de uma LTP de origem vegetal descrito na literatura foi a partir do tubérculo da batata, em 1975. Em anos posteriores, LTPs de diversas espécies vegetais também foram relatadas, dentre as quais pode-se citar as LTPs de milho, alho, arroz, mamona, feijão, cebola, repolho, espinafre, tangerina, rabanete, pêssigo, Arabidopsis, café, trigo, uva entre outras (MA *et al.*, 2013; NG *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012).

nsLTPs compreendem proteínas pequenas, ricas em cisteínas, comumente básicas com ponto isoelétrico variando entre 8 e 10, que pertencem ao grupo dos peptídeos antimicrobianos, juntamente com outras classes já descritas (CÂNDIDO *et al.*, 2014; ZAMAN; ABBASI, 2009). Elas constituem uma família multigênica que são diferencialmente expressas temporalmente e espacialmente nos tecidos vegetais (NG *et al.*, 2012). As diferentes isoformas são sintetizadas em sua forma imatura com a presença de um peptídeo sinal variando de 20 a 25 resíduos de aminoácidos direcionando-as para uma localização extracelular em plantas. Em adição, estudos recentes têm demonstrado evidências da localização intracelular de certos membros de LTPs (GIZATULLINA *et al.*, 2013; PAGNUSSAT *et al.*, 2012).

Tomando como base a massa molecular, Kader (1996) classificou as LTPs em dois tipos: 9 kDa (tipo 1) e 7 kDa (tipo 2). Através de estudos de cristalografia de raios X, ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia de infravermelho, a estrutura tridimensional de nsLTPs de ambos os tipos tem sido elucidada, e apesar da baixa identidade de sequência, comumente inferior a 70%, o enovelamento

estrutural e a composição na estrutura secundária tem se mostrado bastante similares (MARION; BAKAN; ELMORJANI, 2007; ZAMAN; ABBASI, 2009).

As LTPs são caracterizadas pela presença de uma assinatura com oito resíduos de cisteína ao longo de sua estrutura primária, representado na forma geral de C-X_n-C-X_n-CC-CXC-X_n-C-X_n-C, que formam pontes dissulfeto com padrões de disposição de acordo com o tipo. Em nsLTP₁, C1 forma ponte dissulfeto com C6 e C5 com C8, enquanto nsLTP₂ as pontes dissulfeto ocorrem entre os resíduos de cisteína C1 e C5 e C6 com C8. Os dois tipos diferenciam-se ainda quanto ao motivo CXC, onde X compreende um resíduo de aminoácido hidrofílico (por exemplo, asparagina) em nsLTP₁, enquanto X corresponde a um resíduo de aminoácido hidrofóbico (por exemplo, leucina ou fenilalanina) em nsLTP₂ (**Tabela 3**) (WANG *et al.*, 2012; WEI; ZHONG, 2014). As pontes dissulfeto são responsáveis por estabilizar a estrutura tridimensional, configurando uma característica bem evidente das nsLTPs, que é a formação de uma cavidade hidrofóbica interna, composta por 4 ou 5 α -hélices, ao qual é atribuída a propriedade de transferência de moléculas hidrofóbicas. Essa estrutura compacta e estável, confere às nsLTPs propriedades bioquímicas marcantes como a resistência a tratamentos térmicos elevados, por condições ácidas e até mesmo à proteólise, permitindo superar as condições encontradas no trato gastrointestinal (JAECKELS *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2013). Embora o enovelamento das nsLTPs apresente notável compactabilidade, a cavidade hidrofóbica exibe extraordinária plasticidade, sendo capaz de modificar a estrutura e a topologia do canal interno, permitindo inclusive o englobamento de duas moléculas hidrofóbicas simultaneamente. (NG *et al.*, 2012; SHI *et al.*, 2013).

Tabela 3: Diferenças entre nsLTP₁ e nsLTP₂

| Tipo | nsLTP ₁ | nsLTP ₂ |
|--|-----------------------------|-----------------------------|
| Massa molecular | 9 kDa | 7 kDa |
| Pontes dissulfeto | 4 pontes dissulfeto | 4 pontes dissulfeto |
| Diferença no motivo C ₆ XC ₈ | –C [resíduo hidrofílico] C– | –C [resíduo hidrofóbico] C– |
| Padrões das 8 Cys | | |
| Cavidade hidrofóbica | Grande | Pequena |
| Estrutura | | |

Fonte: adaptado de WANG *et al.*, 2012

Diante do interesse em torno da propriedade de transferência de lipídeos, ao longo dessas quatro décadas desde o isolamento da primeira LTP de origem vegetal, estudos genômicos, transcriptômicos e proteômicos conduziram à identificação e ao isolamento de inúmeras LTPs. Em um desses estudos, realizados através da análise do genoma de arroz, *Arabidopsis* e trigo foram detectados 52, 49 e 156 genes de nsLTPs, respectivamente (BOUTROT; CHANTRET; GAUTIER, 2008). Em outra investigação conduzida em 2012, foi proposta a criação de um banco de dados em que foram identificados um total de 595 nsLTPs provenientes de 121 espécies vegetais diferentes (WANG *et al.*, 2012).

Assim, tendo em vista a natureza multigênica dessa classe de proteínas e a diversidade de isoformas encontradas, outros sistemas de classificação têm sido propostos, além daquele estabelecido por Kader em 1996. Baseando-se na similaridade de sequências de LTPs de trigo, um novo tipo de LTP (tipo III) foi

determinado (BOUTROT *et al.*, 2005). Em 2008, no estudo supracitado de Boutrot e colaboradores, da análise do genoma de arroz, *Arabidopsis* e trigo, de acordo com o alinhamento de uma série de famílias de genes de LTPs das três espécies, a partir da homologia de sequência e o número de resíduos de aminoácidos presentes entre os motivos de cisteínas, as nsLTPs foram categorizadas em nove tipos (I – IX) (BOUTROT; CHANTRET; GAUTIER, 2008). Em investigação conduzida com 135 nsLTPs exclusivamente da família Solanaceae, a classificação foi baseada no sistema proposto por Boutrot em 2008, sendo agrupadas as nsLTPs em apenas cinco grupos (I, II, IV, IX e X), sendo este último inédito até a data (LIU *et al.*, 2010.) Apesar de levar em consideração, um grande número de LTPs, os sistemas anteriores não envolveram àquelas encontradas em plantas sem flores. Tal proposta foi realizada por Edstam *et al.* (2011), cuja classificação foi baseada além da similaridade de sequência e resíduos de aminoácidos espaçadores das cisteínas, em sítios de modificação de glicosilfosfatidilinositol e posição de íntrons, sendo determinados 10 grupos (tipos I, II, C, D, E, F, G, H, J e K).

Com base no estudo realizado por Wang *et al.* (2012), em que foram alinhadas LTPs da maior diversidade de espécies vegetais (121 espécies), apenas 5 grupos (I, II, III, IV e V) foram utilizados para categorizar essa classe de proteínas. Além dos sistemas anteriores, outras classificações foram propostas com base em LTPs de *Lotus japonicus* (TAPIA *et al.*, 2013) e *Brassica rapa* (LI *et al.*, 2014), sendo agrupadas em 7 tipos (I, II, III, IV, V, VIII e IX) e 9 tipos (I, II, III, IV, V, VI, VIII, IX e XI), respectivamente. Vale salientar que cada sistema proposto não invalida outro, e apesar dos esforços, estudos futuros são necessários para prover melhor compreensão à classificação das LTPs.

Paralelamente, a riqueza de LTPs encontradas em plantas tem apontado para uma ampla gama de propriedades funcionais *in vivo*, e apesar dos estudos intensos em torno dessa classe de proteínas, suas funções ainda não se encontram totalmente esclarecidas (LIU *et al.*, 2015). Devido a propriedade de transferência de lipídeos, inicialmente foram atribuídas às LTPs, os papéis biológicos na biossíntese de membranas e na regulação intracelular dos ácidos graxos (β -oxidação). No entanto, com estudos posteriores que levaram a identificação de peptídeos sinais nesse grupo de moléculas, indicando um destino secretório, novas funções foram atribuídas para essas proteínas, como a síntese de cutina e cera, embriogênese somática, adesão do pólen, defesa vegetal contra agentes fitopatogênicos, sinalização

celular, e adaptação vegetal contra condições ambientais adversas (seca, salinidade, baixas temperaturas entre outros) (CARVALHO; GOMES, 2007; DIZ *et al.*, 2011; NG *et al.*, 2012). Dentre os papéis supracitados, as propriedades em torno da defesa contra fungos e bactérias são os mais bem estabelecidos.

Estudos *in vivo*, através de técnicas de Biologia Molecular, tem mostrado o aumento da expressão de transcritos de LTPs em plantas expostas à elicitores de resposta de defesa vegetal, bem como ao ataque de organismos patógenos propriamente ditos, indicando o envolvimento dessa classe de proteínas com o papel de proteção (GIRAULT *et al.*, 2008; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). Em uma dessas investigações conduzidas com plantas de pimenta do reino infectadas por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Phytophthora capsici* e *Colletotrichum gloeosporioides*, os genes de três LTPs de *Capsicum annuum* (CALTPI, CALTPII e CALTPIII) foram fortemente expressos (JUNG; KIM; HWANG, 2003). Adicionalmente, estudos recentes de transformação genética tem evidenciado o aumento da resistência contra fitopatógenos intensificando a importância das LTPs no papel da defesa vegetal (ROY-BARMAN; SAUTTER; CHATTOO, 2006). A superexpressão de TdLTP4, uma proteína transferidora de lipídeos de *Triticum durum* (trigo), em plantas de *Arabidopsis* promoveu o aumento da resistência contra a infecção dos fungos fitopatógenos *Botrytis cinerea* e *Alternaria solani* evidenciadas pela redução de áreas lesionadas na superfície das folhas em comparação com plantas selvagens (SAFI *et al.*, 2015). Do mesmo modo, transgênicos de *Brassica napus* (colza), *Populus tomentosa* Carr. (álamo branco chinês) e *Nicotiana tabacum* (tabaco) transformadas com genes de proteínas semelhantes à proteína transferidora de lipídeos não específica (*LJAMP₁* e *LJAMP₂*) de *Leonurus japonicus*, apresentaram maior resistência à infecções fúngicas (*Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Sclerotinia sclerotiorum*) e bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) (JIA *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2007).

Abordagens *in vitro*, utilizando organismos fitopatogênicos têm ratificado os dados experimentais observados nos estudos *in vivo*, além disso, estudos com microrganismos de interesse na saúde humana e investigações dos possíveis mecanismos de ação também têm sido realizados como forma de aprofundar os conhecimentos acerca das propriedades antimicrobianas das LTPs.

Ace-AMP1, uma proteína transferidora de lipídeos isolada a partir de sementes de cebola (*Allium cepa*), é descrita como uma das mais potentes LTPs com efeitos antimicrobianos, sendo reportada sua atividade inibitória contra 12 fungos patogênicos de plantas (CI variando de 0,25 a 10 µg/mL), bem como 2 espécies de bactérias gram-positivas (CI de 0,8 e 8 µg/mL), não sendo evidenciado efeito sobre as 7 espécies de bactérias gram-negativas testadas (CAMMUE *et al.*, 1995). A inibição da germinação de esporos fúngicos por LTPs também tem sido relatada, a nomear tem-se Ha-AP10, uma proteína transferidora de lipídeos das sementes de *Helianthus annuus* (girassol) que apresentou efeito fungistático sobre esporos de *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* na concentração de 40 µg/mL (REGENTE; CANAL, 2000)

Em relação aos patógenos humanos, efeitos antifúngicos das LTPs têm sido explorados principalmente diante de espécies do gênero *Candida*, como aqueles observados para Cc-LTP₁ e Ca-LTP₁, duas proteínas transferidoras de lipídeos isoladas das sementes de *Coffea canephora* e *Capsicum annuum*, que se mostraram capazes de inibir o crescimento de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, respectivamente, na concentração de 400 µg/mL (DIZ *et al.*, 2011; ZOTTICH *et al.*, 2011).

Quanto à atividade contra bactérias, o crescimento de *Staphylococcus aureus* foi inibido pela LTP (300 µg) isolada de sementes de *Phaseolus mungo*, enquanto a LTP de *Pandanus amaryllifolius*, embora sem efeitos sobre o gram-positivo, apresentou atividade bacteriostática apenas sobre o gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa* (40 µg de proteína), não sendo capaz de interferir no crescimento de diversas outras espécies de bactérias gram-negativas, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio cholera*, *V. parahaemolyticus* e *Salmonella typhimurium* (OOI *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2004). Como se pode observar, apesar do potente efeito atribuído à alguns membros de LTPs, como aquele verificado para Ace-AMP1, outras LTPs apresentam uma baixa ou até mesmo são isentas de atividades antifúngicas, tais como duas LTPs presentes no milho e no trigo (CARVALHO; GOMES, 2007). O potencial antimicrobiano de algumas LTPs está sumarizado na **Tabela 4** a seguir.

Tabela 4: Propriedades antimicrobianas de LTPs.

| NsLTP | Espécies suscetíveis | Referência |
|--|--|----------------------------------|
| Ace-AMP1 de <i>Allium cepa</i> | <u>Fungos</u> : <i>Alternaria brassicola</i> , <i>Ascochyta pisi</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>pisii</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> , <i>Nectria kaematococca</i> , <i>Phoma betae</i> , <i>Pyrenopeziza tritici-repentis</i> , <i>Pyricularia oryzae</i> e <i>Verticillium dahliae</i> ; <u>Bactérias</u> : <i>Bacillus megaterium</i> e <i>Sarcina lutea</i> | Cammue <i>et al.</i> (1995) |
| Cw18 de <i>Hordeum vulgare</i> | <u>Fungo</u> : <i>Fusarium solani</i> ; <u>Bactéria</u> : <i>Pseudomonas solanacearum</i> | Molina <i>et al.</i> (1993) |
| LTP-a1 e LTP-a2 das folhas de <i>Arabidopsis</i> ; LTP-s1 e LTP-s2 de espinafre. | <u>Fungos</u> : <i>Fusarium solani</i> ; <u>Bactérias</u> : <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> e <i>Pseudomonas solanacearum</i> | Segura <i>et al.</i> (1993) |
| Ca-LTP ₁ de <i>Capsicum annuum</i> | <u>Fungos</u> : <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> e <i>Candida tropicalis</i> | Diz <i>et al.</i> (2011) |
| Ca-LTP ₁ de <i>Coffea canephora</i> | Fungos: <i>Candida albicans</i> e <i>Candida tropicalis</i> | Zottich <i>et al.</i> (2011) |
| LTP de trigo (Sumai3) | Fungos: <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Curvularia lunata</i> , <i>Alternaria</i> sp., <i>Bipolaris oryzae</i> , <i>Cylindrocladium scoparium</i> , <i>Botrytis</i> | Kirubakaren <i>et al.</i> (2008) |

cinerea, Sarocladium oryzae

| | | |
|---|---|------------------------------|
| LTP de <i>Pandanus</i> <i>amaryllifolius</i> | Bactéria: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Ooi <i>et al.</i> (2006) |
| LTP de sementes de <i>Phaseolus</i> <i>mungo</i> | Fungos: <i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> ; Bactéria: <i>Staphylococcus aureus</i> | Wang <i>et al.</i> (2004) |

Fonte: adaptado de NAWROT *et al.*, 2014 (contem as referências).

A notável propriedade antimicrobiana exibida pelos peptídeos antimicrobianos, incluindo as nsLTPs, tem ascendido o interesse da comunidade científica com vistas a aplicação desses compostos na saúde humana, em vertentes que envolvem a sua administração como antimicrobiano, em sistemas carreadores de drogas (“drug delivery”) ou como molde para o desenvolvimento de drogas antimicrobianas através de modelagens moleculares *in silico* (CÂNDIDO *et al.*, 2014; FJELL *et al.*, 2012; PATO *et al.*, 2001).

Do ponto de vista de mecanismo de ação da atividade antimicrobiana mediada pelas LTPs, devido a capacidade de interagir com lipídeos, tem se sugerido uma atuação sobre as membranas biológica que levaria a uma depleção da integridade conduzindo à sua permeabilização (DIZ *et al.*, 2011; REGENTE *et al.*, 2005). Esse mecanismo abre a perspectiva de exploração dessa classe de proteínas, bem como os demais peptídeos antimicrobianos descritos, na captação de drogas antimicrobianas convencionais no ambiente intracelular, podendo atuar em sinergismo levando à morte do microorganismo (SIMONE; SOUZA, 2002).

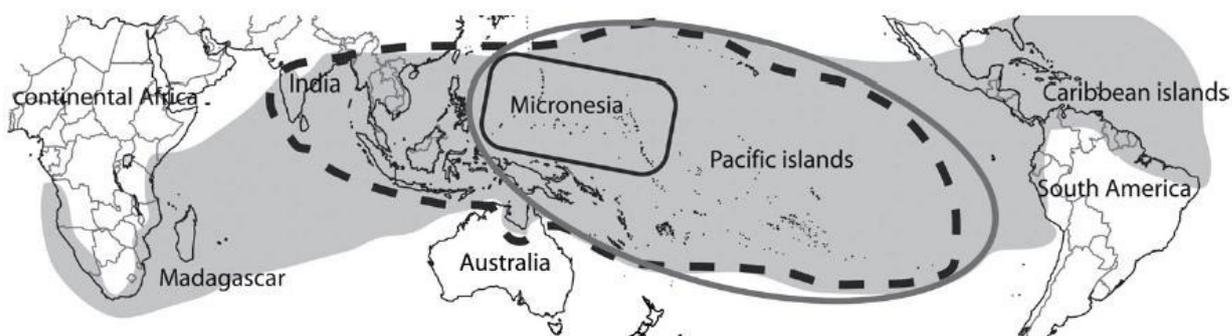
1.5 *Morinda citrifolia* L. – aspectos botânicos e farmacológicos

Morinda citrifolia L. é o nome científico da espécie vegetal pertencente à família Rubiaceae que é conhecida comercialmente como noni (ASSI *et al.*, 2015). O termo científico adotado é proveniente da integração de duas características encontradas na planta, sendo o gênero derivado da junção das palavras latinas *morus* (amora) e *indicus* (Índia) em virtude da similaridade com frutos da espécie

Morus alba L, enquanto o epíteto específico faz referência ao aspecto similar com a folhagem de alguns citros (SILVA, L. R., *et al.*, 2012.). De origem do sudeste da Ásia e Micronésia, *M. citrifolia* L. var *citrifolia* de frutos grandes, a variedade mais importante na fabricação de produtos comerciais, teve sua disseminação para regiões tropicais mediada pela atividade humana e intervenções naturais, em especial à dispersão das sementes através das correntes marítimas, viabilizadas em decorrência de sua anatomia dotada de uma câmara de ar interna e uma camada externa fibrosa tornando-a viável por longos meses nos oceanos (RAZAFIMANDIMBISON *et al.*, 2010; SINGH; SINGH; PETER, 2011). Adicionalmente, a autopolinização e a produção perene de flores e frutos contribuíram para a ampla distribuição para os trópicos (RAZAFIMANDIMBISON *et al.*, 2010).

Atualmente, são reconhecidas duas outras variedades além da variedade *citrifolia*: var. *bracteata* e var. *potteri*, sendo esta variedade encontrada no Pacífico e àquela no território Indo-Australiano. *M. citrifolia* L. var *citrifolia* apresenta-se ainda na forma dotada de frutos pequenos que são encontradas particularmente na Micronésia (RAZAFIMANDIMBISON *et al.*, 2010). No Brasil, o cultivo do noni é bastante recente, sendo sua introdução motivada pelo apelo comercial atribuído aos produtos derivados da planta e os benefícios atrelados ao seu consumo. É possível encontrar plantios de noni nos estados do Acre, São Paulo, Minas Gerais, Pará, Sergipe, Ceará, dentre outros (CORREIA *et al.*, 2011). Devido a distribuição pantropical dessa espécie vegetal, diversos nomes são atribuídos a planta a depender da região, sendo denominada de noni no Havaí, nono no Taiti, Indian Mulberry na Índia, Ba ji tian na China, cheesefruit na Austrália, dentre outros (**Figura 2**) (BROWN, 2012).

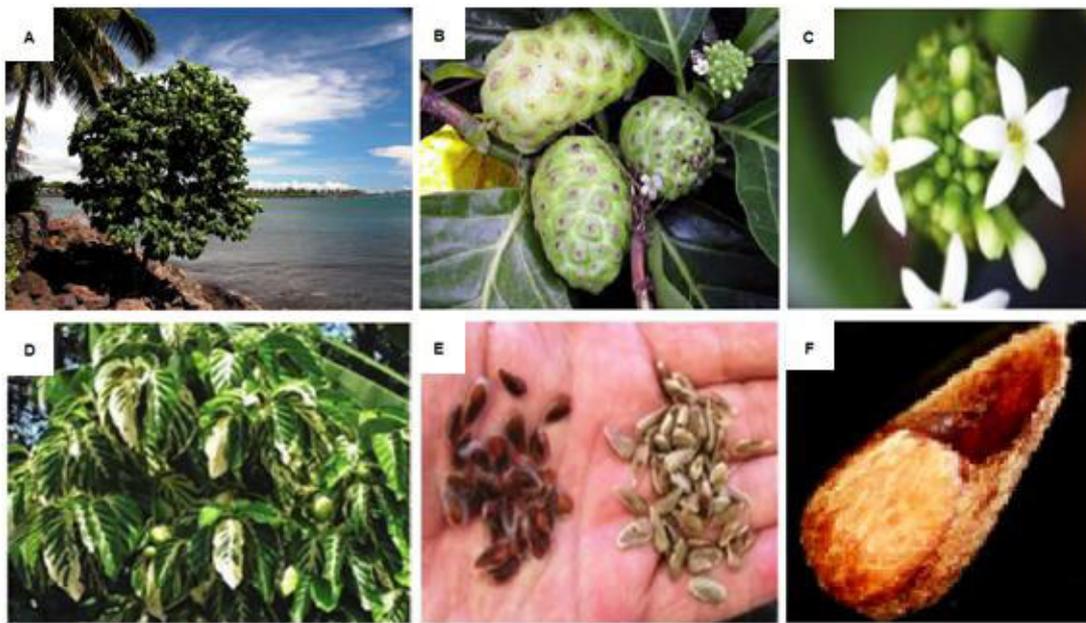
Figura 2 - Distribuição geográfica de *Morinda citrifolia* L.. A área cinza denota a distribuição geográfica atual de *M. citrifolia* L. e sua variedade *citrifolia* de frutos grandes. A linha tracejada preta delimita a área de *M. citrifolia* var. *bracteata*, enquanto a linha cinza delimita a região de *M. citrifolia* var. *potteri*, e a linha preta delimita a Micronésia, onde é encontrado *M. citrifolia* var. *citrifolia* de frutos pequenos.



Fonte: RAZAFIMANDIMBISON *et al.*, 2010.

Do ponto de vista botânico (**Figura 3**), o noni apresenta-se com um porte arbustivo-arbóreo variando em altura de 3 a 10 metros, dotado de um sistema radicular profundo e com vasta rede de raízes laterais, semelhantes às encontradas no café e citrus. As folhas são largas, simples e opostas, com formato elíptico ou elíptico-ovalada (5 - 17 cm de comprimento, 10 - 40 cm largura) e coloração verde escuro brilhante, sendo encontradas em abundância na planta. As flores são pequenas e com formato tubular, agrupadas em estrutura globosa no pedúnculo, que originam frutos múltiplos, carnosos, de forte cheiro e sabor desagradável devido à liberação de ácido butírico, em especial quando maduros. Os frutos de noni apresentam aspecto oval e semi-translúcido (3 - 10 cm de comprimento e 3 - 6 cm de largura) com coloração que varia de verde a amarelo esbranquiçado ao longo dos estágios de maturação, enquanto a polpa exibe a cor amarela ou branca e consistência firme nas etapas iniciais de desenvolvimento, adquirindo aspecto castanho e gelatinoso quando maduro. Os frutos possuem ainda uma aparência enrugada, provida de secções em forma poligonal, onde se encerram as sementes. As sementes exibem tamanho pequeno (cerca de 4 milímetros de comprimento) com coloração marrom avermelhada, sendo evidenciadas em abundância no fruto, aproximadamente 100 - 150 sementes (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2002; YASHASWINI *et al.*, 2014).

Figura 3 - *Morinda citrifolia* L.: visão geral das características botânicas. (A) Aspectos gerais da planta *Morinda citrifolia* L.; (B) frutos múltiplos e carnosos; (C) flores pequenas e tubulares arranjadas em estrutura globosa; (D) folhas largas, simples e opostas de aspecto elíptico; (E) aspecto geral das sementes; (F) semente em detalhe.



Fontes: NELSON, 2005; NELSON; ELEVITCH, 2006.

Morinda citrifolia L. tem sido consumida para fins nutricionais e terapêuticos há mais de dois milênios, sendo relatado o consumo dos frutos como fonte de nutrientes pelos ancestrais Polinésios em períodos de fome, bem como na medicina popular, sendo essa espécie vegetal considerada por esses povos a “cura de todos os males” (ALSAEED, 2013). Além dos frutos, há relatos de utilização das diversas partes da planta pelos Polinésios como raiz, caule, folhas e flores em preparações herbais, sendo reconhecidos 40 remédios produzidos (WANG *et al.*, 2002). Os benefícios à saúde humana descritos para o consumo do noni incluem: ações hipotensiva, antidiabética, analgésica, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antifúngica, antituberculosas, antioxidante, no tratamento de osteoporose e na melhora auditiva, na cicatrização de feridas, anticatarata, antigota, anti hipercolesterolemia, na proteção neuronal, antiúlcera gástrica e refluxo esofágico, anticancerígeno, antináusea e vômito pós-operatório (SAMINATHAN *et al* 2013).

Estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando extratos de diversas partes da planta têm comprovado os efeitos farmacológicos apontados na medicina popular para o consumo do noni, conforme apresentado na **Tabela 5** a seguir.

Tabela 5 - Propriedades farmacológicas descritas para os extratos de *Morinda citrifolia* L.

| Parte da planta | Atividade | <i>In vitro</i> | <i>In vivo</i> | Triagem clínica | Referências |
|------------------------|--|-----------------|----------------|-----------------|---|
| Fruto, folha e raiz | Antidislipidemia | | X | | (MANDUKHAIL; AZIZ; GILANI, 2010) |
| Fruto e folha | Antioxidante | X | | | (KRISHNAIAH, 2015; NERURKAR, 2008; SU <i>et al.</i> , 2005) |
| Fruto e raiz | Analgésica | | X | | (WANG <i>et al.</i> , 2002; YOUNOS <i>et al.</i> , 1990) |
| Fruto, folha e semente | Anti-inflamatória | X | X | X | (DUSSOSSOY <i>et al.</i> , 2011; FLETCHER, 2013; PALU, 2012; SU-C, 2001) |
| Fruto, folha e raiz | Anticancer | X | X | X | (GUPTA <i>et al.</i> , 2013; KAMIYA <i>et al.</i> , 2010; LV <i>et al.</i> , 2011; MASUDA <i>et al.</i> , 2012; NUALSANIT <i>et al.</i> , 2012) |
| Fruto e folha | Antiobesidade | X | | X | (PAK-DEK <i>et al.</i> , 2008; PALU; WEST; JENSEN, 2011) |
| Fruto | Hepatoprotetora | | X | | (LIN <i>et al.</i> , 2013) |
| Semente | Efeito antitrombótico | | X | | (MASUDA <i>et al.</i> , 2009) |
| Semente | Agente anti fotoenvelhecimento e antirugas | X | | | (MASUDA <i>et al.</i> , 2009) |
| Fruto | Antidiabética | | X | | (HORSFAL, 2008; NAYAK, 2011; NERURKAR, 2012; PURANIK, 2013) |
| Fruto | Osteoporose e problemas auditivos | | X | | (LANGFORD <i>et al.</i> , 2004) |
| Folha | Cicatrizante | X | X | | (PALU <i>et al.</i> , 2010) |

Fonte: adaptado de ASSI *et al.*, 2015 (contem as referências).

Atividades antimicrobianas também têm sido descritas em investigações envolvendo *Morinda citrifolia* L. Em um estudo conduzido com os extratos obtidos com acetato de etila, metanol ou etanol, a partir das folhas, frutos e caule do noni, foi demonstrada a atividade antibacteriana contra as espécies de *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter cloacae* e *Staphylococcus aureus*, sendo observado o efeito inibitório do crescimento das espécies estudadas em concentrações que variaram entre 25 e 50 mg/mL dos extratos (NATHEER *et al.*, 2012). Em uma abordagem similar realizada com seis extratos obtidos com éter de petróleo, clorofórmio, benzeno, acetato de etila, etanol ou água, a partir de folhas de *M. citrifolia* contra as espécies bacterianas de *E. coli* e *S. aureus*, a inibição do crescimento foi observada através do método de difusão em disco mediante a formação de halos com diâmetros entre 6 e 20 milímetros, sendo nestes casos equivalentes ao controle com o antibiótico gentamicina. Dentre os tratamentos testados, as respostas de inibição mais acentuadas de *S. aureus* e *E. coli* foram obtidas a partir dos extratos aquoso e com éter de petróleo, respectivamente, denotando a natureza polar e apolar de compostos antimicrobianos nas folhas do noni (USHA; SASHIDHARAN; PALANISWAMY, 2010).

A natureza antifúngica do suco dos frutos do noni foi identificada em um estudo realizado contra a espécie de *Candida albicans* em ensaio de diluição no meio, sendo a concentração fungicida mínima de 40 mg/mL por 90 minutos de contato ou com 50 mg/mL após 15 minutos de contato (JAINKITTIVONG; BUTSARAKAMRUHA; LANGLAIS, 2009). Do mesmo modo, *C. albicans* foi inibida pelos extratos obtidos com éter de petróleo e alcoólico a partir das folhas de *M. citrifolia* nas concentrações de 5 e 10 mg/mL, demonstrando halos de inibição (2 e 2,2 cm para o extrato obtido com éter de petróleo; 2 e 2,5 cm para o extrato alcoólico) comparáveis aos obtidos com o controle positivo tetraciclina na concentração de 10 µg/mL (2,9 cm de halo na zona de inibição). Adicionalmente, esses mesmos extratos foram capazes de inibir o crescimento do fungo fitopatogênico *Aspergillus niger* (2,5 e 2,6 para o extrato obtido com éter de petróleo; 2,7 e 2,9 cm para o extrato alcoólico), sendo a inibição mediada pelo mesmo controle positivo de 3,3 cm (KUMAR *et al.*, 2010).

Em adição às atividades anteriormente descritas, estudos com extratos de *M. citrifolia* L. têm apresentado ainda efeitos imunomodulatórios (NAYAK; MENGI,

2010; PALU *et al.*, 2008), cicatrizantes (NAYAK; SANDIFORD; MAXWELL, 2009), antivirais (RATNOGLIK *et al.*, 2014), antitubercular (SALUDES *et al.*, 2002), larvicida (KOVENDAN *et al.*, 2012), anti-helmíntica (KUMAR *et al.*, 2010), entre outros.

Diante dessa relação entre o noni e suas perspectivas de uso medicinal, foram conduzidos estudos fitoquímicos que datam de 100 anos, que culminaram com o isolamento de compostos químicos das diversas partes da planta, em sua grande maioria metabólitos secundários, de interesse para a saúde humana (PAWLUS; KINGHORN, 2007), como (+)-3,4,3',4' tetrahidroxi-9,7'R-epoxilignano-7R,9'-lactona e (+)-3,3'-bis dimetil tanegol, duas novas ligninas extraídas dos frutos de noni que promoveram uma potente atividade anti-inflamatória através da inibição de lipooxigenase 15 (DENG *et al.*, 2007). A partir dos frutos de noni foi também isolada uma fração rica em dois compostos iridoides, *ácido deacetilasperulosídico* e *ácido asperulosídico*, que mostraram atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (WEST *et al.*, 2012). Adicionalmente, o isolamento de metabólitos secundários de outras classes, como flavonoides, fenilpropanóides e triterpenóides e de metabólitos primários como ácidos graxos, sacarídeos e seus derivados, têm sido descritos compreendendo cerca de 200 compostos bioativos extraídos a partir dos diversos tecidos/órgãos da planta (ASSI *et al.*, 2015; LV *et al.*, 2011; PAWLUS; KINGHORN, 2007).

Em virtude desses múltiplos benefícios atribuídos ao noni, a compra de produtos provenientes dessa espécie vegetal pode ser facilmente realizada em lojas de alimentos naturais, farmácias, mercearias e através da Internet, sendo comercializados produtos derivados das folhas e dos frutos sob a forma de cápsulas, chá e suco. O suco dos frutos do noni é o produto que mais tem recebido atenção, sendo estimativas das vendas anuais variando em torno de 1,3 bilhões de dólares desde 2007 até os dias de hoje. Tal fato tem levado ao aumento do número de focos do cultivo do noni em regiões como a Índia, em ilhas do Pacífico (Tahiti e Havaí), Austrália e, inclusive, no Brasil (ASSI *et al.*, 2015; DIXON; MCMILLEN; ETKIN, 1999; McCLATCHEY, 2002; PAWLUS; KINGHORN, 2007; SINGH, 2012;).

Do processamento dos frutos para a obtenção do suco e demais produtos derivados, normalmente as sementes, que secas representam cerca de 2,5 % do peso total dos frutos, são descartadas (NELSON, 2005; WEST *et al.*, 2006). Nesse âmbito, estudos têm sido conduzidos de modo a desvendar as propriedades e potencialidades conferindo aplicabilidades às sementes. No entanto, a maioria dos

compostos isolados a partir das sementes são metabólitos secundários, cujos casos de toxicidade têm sido constantemente associados. Diante desse cenário, foi conduzida uma investigação inicial em nosso grupo de pesquisa que apontou para a existência de um teor proteico nas sementes de 9% com predomínio de proteínas do tipo albuminas e globulinas, sendo detectadas no extrato total atividades enzimáticas inibitória de tripsina, proteásica e peroxidásica (FRANÇA, 2013). Esse estudo culminou com o recente isolamento de um princípio ativo de natureza protéica com efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, que mostrou similaridade com proteínas transferidoras de lipídeos, denominada de *McLTP₁*, sendo a partir deste momento utilizada essa nomenclatura ao longo da dissertação (CAMPOS *et al.*, 2016).

Em se tratando de *McLTP₁*, a proteína transferidora de lipídeos de sementes de *Morinda citrifolia* L., recentemente isolada em nosso grupo de pesquisa, trata-se de uma proteína de baixa massa molecular (9,4 kDa) determinada por espectrometria de massas, termoestável e resistente à proteólise, cujos efeitos analgésico e anti-inflamatório mostraram-se bastante promissores, sendo capaz de reduzir significativamente, as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, em 81,39% e 89,54%, na dose de 8 mg/kg pelas via intraperitoneal e oral, respectivamente (CAMPOS *et al.*, 2016).

Dados bioquímicos adicionais acerca da estrutura de *McLTP₁* têm sido elucidados, como a sequência N-terminal determinada por degradação de Edman (*UniProt Accession Number*: C0HJH5), cujos 33 resíduos de aminoácidos apresentam 4 cisteínas das 8 presentes na assinatura de cisteínas ao longo da sequência primária, formadoras das pontes dissulfeto. Além disso, estudos de dicróismo circular (DC) apontaram para a presença de 26 % de α hélices e 49 % de estruturas não ordenada, formadoras de uma estrutura tridimensional altamente estável, tal como evidenciado em outras LTPs, cujos espectros de DC não foram alterados frente a diversas condições elevadas de temperatura, e diferentes faixas de pH, tratamentos com surfactantes catiônico (Brometo de Cetiltrimetilamônio - CTAB) e zwitteriônico (N-hexadecil-N, N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato - HPS). Apenas diante de elevadas concentrações de DTT e na incubação com o surfactante aniônico SDS (dodecil sulfato de sódio) houve maiores amplitudes nos máximos e mínimos de elipticidade molar. Ainda quanto aos dados estruturais de *McLTP₁*, análises por microscopia de força atômica demonstraram um padrão de oligomerização em que se observa a formação de agregados diméricos/tetraméricos

que delimitam um canal central com 4,4 nm de diâmetro (CAMPOS *et al.*, 2016; LUTIF, 2015).

Em estudos *in vitro*, Lutif *et al.* (2015) demonstraram atividades biológicas para $McLTP_1$, tais como: inibitória de tripsina ($767,10 \pm 8,36$ UIT/mgP), quimotripsina ($25,36 \pm 0,86$ UI/mgP), papaína ($65,419 \pm 0,152$ UI/mgP) e alfa-amilase (24,40%). Adicionalmente, outras propriedades biológicas têm sido descritas para $McLTP_1$, como o efeito citotóxico contra células de linhagens tumorais e seu potencial alergênico. Quando avaliada sobre células tumorais de cólon humano (HCT-116), leucemia humano (HL-60), glioblastoma humano (SF-295) e de câncer de ovário (Ovcar-8), $McLTP_1$ mostrou citotoxicidade seletiva apenas contra este último tipo de linhagem, apresentando CI_{50} de 16,6 μ g/mL. Em relação ao potencial alergênico, $McLTP_1$ induziu a produção de IgG e IgG₁ em camundongos imunizados pela via oral. Apesar disso em ensaios de toxicidade aguda e de doses repetidas (28 dias) em camundongos, nas doses de 80 e 8 mg/kg, respectivamente, a proteína não promoveu alterações em aspectos comportamentais ou mesmo na mortalidade, não sendo observados sinais de toxicidade, incluindo-se alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorréia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões e hiperexcitabilidade, bem como não alterou parâmetros hematológicos e bioquímicos, e portanto, não tendo sido possível concluir a importância clínica do estímulo alergênico mediado por $McLTP_1$ (COSTA, 2013; LUTIF, 2015).

Apesar dos resultados promissores obtidos em experimentos *in vitro* e *in vivo*, dados acerca das propriedades antimicrobianas de $McLTP_1$ permanecem ainda sem esclarecimentos. Diante do exposto foram realizados os seguintes questionamentos em torno do presente estudo:

- $McLTP_1$ é dotada de propriedades antimicrobianas, tal como observado em outras nsLTPs de outras fontes vegetais? Em caso positivo, seria seu espectro de ação diferente sobre fungos e bactérias de interesse clínico? E sobre bactérias gram-negativas e gram-positivas?

- $McLTP_1$ apresentaria potencial antimicrobiano sobre biofilmes bacterianos e fúngicos?

- $McLTP_1$ seria capaz de modular o efeito de drogas antimicrobianas da prática clínica?

- $McLTP_1$ apresentaria potencial profilático e/ou terapêutico em modelo de sepse induzida em camundongos?

Diante das perguntas efetuadas, foi elaborada a seguinte hipótese:

$McLTP_1$ apresenta propriedades antimicrobianas promissoras, atuando sobre o crescimento de microrganismos de interesse clínico, e em detrimento de seus efeitos anti-inflamatório e antimicrobianos é capaz de reduzir a mortalidade de camundongos com sepse.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial antibacteriano e antifúngico de *McLTP₁* em espécies de interesse clínico e investigar o efeito protetor de *McLTP₁* em camundongos submetidos a sepse.

2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar o protocolo de purificação de *McLTP₁*;
- Investigar o potencial antimicrobiano de *McLTP₁* sobre o crescimento planctônico de fungos do gênero *Cândida* e bactérias gram-positivas e gram-negativas de interesse clínico;
- Investigar a ação de *McLTP₁* sobre a formação de biofilmes de *Candida* spp. e bactérias de interesse clínico;
- Analisar o efeito modulador de *McLTP₁* na atividade de antimicrobianos convencionais sobre fungos e bactérias de importância clínica para o homem;
- Avaliar o efeito de *McLTP₁* sobre a atividade de fatores de virulência em bactérias;
- Verificar parâmetros de sobrevivência, peso corpóreo e peso fresco relativo dos órgãos de animais submetidos a sepse após tratamento profilático ou terapêutico com *McLTP₁* pelas vias intraperitoneal e oral;
- Analisar parâmetros hematológicos dos animais submetidos à sepse induzida por ligadura e perfuração do ceco (CLP) tratados com *McLTP₁* mediante pré e pós-tratamentos;
- Avaliar o efeito da administração de *McLTP₁* (i.p. e v.o.) em tratamentos profiláticos e terapêuticos sobre a temperatura corpórea de animais com sepse induzida por CLP.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

As sementes de *Morinda citrifolia* L. var. *citrifolia* foram obtidas junto à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical (CNPAT-EMBRAPA), Fortaleza – Ce, sendo então produzida uma farinha fina com auxílio de liquidificador e moinho de café. A farinha foi delipidada com éter de petróleo na proporção de 1:10 (m/v), à temperatura ambiente em capela de exaustão de gases, com trocas do solvente orgânico sendo realizadas em intervalos regulares de 2 horas até a manutenção do aspecto transparente do éter de petróleo que caracteriza a remoção dos lipídeos. Ao final do processo, a farinha delipidada foi disposta sobre papel filtro e mantida na capela para a completa evaporação do solvente orgânico e secagem do material, e a seguir acondicionada em recipiente fechado a -20 °C para os posteriores processos de extração de proteínas e purificação de *McLTP*₁.

Em relação aos ensaios da atividade antifúngica de *McLTP*₁, foram utilizados isolados clínicos de *Candida albicans* (01-05-005) e *Candida tropicalis* (03-2-048), e uma cepa padrão de *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), todos eles pertencentes à micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. As cepas encontravam-se estocadas em ágar batata-dextrose a 4 °C. Inicialmente, antes de todas as experimentações, as culturas foram repicadas em ágar batata e incubadas por até 48 horas a 35 °C.

Quanto aos ensaios com bactérias foram utilizadas 5 espécies, sendo uma cepa de *Escherichia coli* (ATCC 10536), uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), uma cepa de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e duas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P e ATCC 14458), as quais fazem parte da coleção de cultura do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará (LABMICRO-UFC). A manutenção das cepas puras foi realizada sob refrigeração em ágar estoque, sendo as mesmas ativadas antes de cada experimento através de repique para o meio de

cultura líquido infusão de cérebro e coração (caldo BHI – do inglês, *Brain Heart Infusion*) e incubadas a 37 °C *overnight*, e então utilizadas para o preparo dos inóculos para os ensaios biológicos *in vitro*.

Para os ensaios biológicos com animais, foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) machos, adultos (30 - 35 g) provenientes do Biotério Central da UFC. A aclimação dos animais foi realizada a 25 °C em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo os camundongos mantidos em caixas de polipropileno, recebendo água e ração *ad libitum*. No curso do experimento, para a coleta de sangue através do plexo retro-orbital, os animais foram anestesiados através de inalação de halotano, o qual também foi utilizado para a eutanásia dos animais ao final do protocolo experimental. Vale salientar que todos os procedimentos com animais foram conduzidos em conformidade com a diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2013), e submetidos à aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (CEUA – UFC n. 37/13).

3.2 Antimicrobianos, meios de cultura e reagentes químicos

Para os ensaios antifúngicos foram utilizados o itraconazol (ITR; Janssen Pharmaceutica, Bélgica) e a anfotericina B (AMB; Sigma Chemical Corporation, EUA), enquanto nos testes de sensibilidade em bactérias foram empregadas as drogas gentamicina e oxacilina (Sigma-Aldrich Co. LLC. - St Louis, MO, USA).

O meio de cultura RPMI foi obtido da Sigma-Aldrich Co. LLC. (St Louis, MO, USA). Ademais os meios de cultura Ágar Batata, Ágar Mueller-Hunton, Ágar *Plate-Count*, Caldo Infusão de Cérebro e Coração, Caldo *Tryptone-Soy* e ágar DNase Teste Base foram adquiridos da Himedia®.

Vivaspin™ com membrana de polietersulfona de *cut off* 30 kDa foi obtido da GE HealthCare Life Science. Ácido tricloroacético (TCA), albumina sérica bovina (BSA), dodecil sulfato de sódio (SDS), acrilamida, bis-acrilamida, persulfato de amônio, N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), Coomassie Brilliant Blue R-250 foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). Cristal violeta, peróxido de hidrogênio e ácido clorídrico foram obtidos da Laborclin LTDA. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

3.3 Métodos

3.3.1 Purificação de *McLTP1*

A purificação de *McLTP1* foi conduzida de acordo com protocolo estabelecido por Campos *et al.* (2016), com modificações. A extração de proteínas a partir da farinha delipidada das sementes de noni foi realizada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 adicionado de NaCl 150 mM na proporção de 1:5 (m/v), sob contínua agitação a 4 °C por 3 horas. Transcorrido o tempo, a suspensão foi filtrada em pano de trama fina, sendo o resíduo submetido à reextração no mesmo tampão de extração na proporção de 1:3 (m/v) sob contínua agitação a 4 °C por 2 horas e, então, novamente filtrado em pano de trama fina. Os filtrados foram unidos e centrifugados a 10.000 $\times g$, 30 min, 4 °C, e o sobrenadante (extrato total) utilizado nas etapas subsequentes para purificação de *McLTP1*.

As proteínas do extrato total foram fracionadas mediante a adição de solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% de modo a perfazer uma concentração final de 2,5%. A seguir, o extrato total contendo o ácido foi disposto em repouso por 30 minutos a 4 °C e então centrifugado a 10.000 $\times g$, 30 min, 4 °C. A fração solúvel em TCA 2,5% (sobrenadante) foi exaustivamente dialisada em membrana de *cut off* 3 kDa contra água destilada sob agitação a 4 °C até a completa remoção do TCA presente na amostra.

Alternativamente à cromatografia de exclusão molecular proposta no protocolo previamente estabelecido, foi realizada ultrafiltração em Vivaspin™ com membrana de polietersulfona de *cut off* 30 kDa, como etapa final no processo de purificação de *McLTP1*, sendo a proteína presente no filtrado de massa inferior a 30 kDa. A amostra foi liofilizada e armazenada a - 20 °C para posterior utilização nos ensaios biológicos.

A determinação de proteínas solúveis foi efetuada conforme metodologia proposta por Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A análise do grau de pureza da amostra foi verificada de acordo com Laemmli (1970) mediante PAGE SDS clássico em gel de 15%, sob condições não redutoras, sendo as proteínas coradas com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

3.3.2 Ensaios biológicos *in vitro*

3.3.2.1 Atividade biológica sobre fungos de interesse clínico

Todos os experimentos para avaliação do potencial antimicrobiano de *McLTP₁* sobre fungos de interesse clínico foram conduzidos junto ao Centro Especializado de Micologia Médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

3.3.2.1.1 Preparo dos antifúngicos e *McLTP₁*

As soluções de itraconazol (ITR) e anfotericina B (AMB) foram diluídas em meio RPMI em concentração estoque de 100 µg/mL e estocadas a - 20 °C. As concentrações das drogas testadas variaram de 0,03 a 0,5 µg/mL para o itraconazol e de 0,06 a 2 µg/mL para anfotericina B. Amostra liofilizada de *McLTP₁* foi solubilizada em água e, a seguir, esterilizada através de filtração em membrana de polietersulfona (PES) de 0,22 µm (TPP), sendo diluída em meio RPMI para concentração de acordo com o respectivo ensaio.

3.3.2.1.2 Preparo dos inóculos fúngicos

Para o preparo do inóculo, a partir dos isolados fúngicos previamente cultivados em ágar batata a 35 °C por 48 horas, foram preparadas suspensões fúngicas em solução salina estéril (0,9% de NaCl) até atingirem a turbidez correspondente à escala 0,5 de McFarland, que corresponde a 1 e 5 x 10⁶ células/mL. Posteriormente, foram realizadas duas diluições consecutivas, a primeira na proporção de 1:50 e a segunda de 1:20, em meio RPMI 1640, tamponado com MOPS 0,156 M, pH 7,0, para a obtenção de uma concentração final entre 1 e 5 x 10³ células/mL (*CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE*, 2008).

3.3.2.1.3 Teste de sensibilidade fúngico à *McLTP₁*

O teste de sensibilidade *in vitro* foi conduzido conforme a técnica de microdiluição em caldo, estabelecida no documento M27-A3 do *CLSI* (*CLINICAL*

LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008) sobre as cepas de *Candida albicans* (01-05-005), *Candida tropicalis* (03-2-048) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). Para realização do teste, foram utilizadas placas de 96 poços com capacidade de 200 μL , sendo McLTP_1 testada em diluições seriadas (1:2) a partir de 400 $\mu\text{g/mL}$ até 1,56 $\mu\text{g/mL}$, para isso, primeiramente foram adicionados 100 μL do meio RPMI em cada poço. Em seguida, foram acrescentados 100 μL de McLTP_1 na primeira coluna, em uma concentração 4 vezes maior (1600 $\mu\text{g/mL}$) que a concentração esperada no primeiro poço (400 $\mu\text{g/mL}$) e, posteriormente, a proteína foi diluída na proporção 1:2, até a décima coluna (1,56 $\mu\text{g/mL}$). Após a diluição da proteína, foram acrescentadas aos poços alíquotas de 100 μL dos inóculos correspondentes a cada cepa. A coluna 11 foi utilizada como controle da experimentação, contendo meio RPMI e inóculo fúngico, sem a presença de McLTP_1 , e a coluna 12 de cada placa foi utilizada como controle de esterilidade do teste, sendo adicionado apenas o meio de cultivo contendo McLTP_1 . Brancos da amostra foram realizados com poços contendo a proteína e o meio RPMI, nas mesmas concentrações testadas, na ausência do inóculo. As placas foram incubadas a 35 °C por até 48 horas, quando então foram feitas leituras de densidade óptica em leitor de microplacas a 630 nm, sendo os resultados avaliados através da capacidade de inibição do crescimento fúngico por McLTP_1 em comparação com o crescimento máximo obtido na ausência da proteína. Os ensaios foram conduzidos em triplicatas, sendo os dados expressos como a média ($\pm\text{DP}$).

3.3.2.1.4 Teste de inibição da formação de biofilme de *Candida* spp.

Para a avaliação frente à inibição da formação dos biofilmes mediada por McLTP_1 adotou-se a metodologia estabelecida por Cordeiro *et al.* (2015). Para tanto, alíquotas de 100 μL dos inóculos (1 e 5×10^6 células/mL) foram incubadas a 35 °C por até 48 h nos poços das microplacas de 96 poços de fundo chato. Após esse tempo, alíquotas de 100 μL de RPMI contendo McLTP_1 foram adicionados aos poços contendo os inóculos, perfazendo uma concentração final de 50 $\mu\text{g/mL}$ da proteína. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas. Em seguida, foram feitas análises de produção de biomassa nos biofilmes. Para a quantificação da biomassa dos biofilmes produzidos, utilizou-se a técnica colorimétrica com o Cristal Violeta (CV) segundo Cordeiro *et al.* (2015). Para isso, após o período de incubação, as placas

foram lavadas por duas vezes com PBS estéril e os biofilmes foram desidratados com adição de 200 µL de metanol puro durante 1 minuto, com as placas mantidas em temperatura ambiente. O metanol foi retirado e os poços das placas foram preenchidos com alíquotas de 200 µL de uma solução aquosa de CV a 0,03% (p/v) por 20 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com água destilada e os biofilmes descoloridos pela adição de 200 µL de ácido acético a 33%. A absorbância do corante desprendido foi mensurada em espectrofotômetro a 590 nm. Controles sem a proteína foram realizados, para análise da produção máxima de biofilmes e comparação com os biofilmes formados na presença de *McLTP₁*.

3.3.2.1.5 Ensaio de sinergismo *McLTP₁* e antifúngicos sobre *C. parapsilosis*

A interação de *McLTP₁* e as drogas antifúngicas ITR e AMB foi testada baseando-se na metodologia de Checkerboard (tabuleiro de xadrez), aplicando-se uma única concentração da proteína (JOHNSON *et al.*, 2004). O ensaio foi conduzido em microplacas de 96 poços de fundo chato, sendo realizado com a cepa de *C. parapsilosis*, a qual teve o inóculo preparado conforme exposto no item 3.3.2.1.2. *McLTP₁* na concentração final de 50 µg/mL (50 µL) foi combinada com concentrações seriadas (1:2) de ITR (50 µL; 0,03 a 0,5 µg/mL) e AMB (50 µL; 0,06 a 2 µg/mL). A seguir foi adicionado 100 µL do inóculo, sendo as placas incubadas por 48 horas a 35 °C. Controles sem adição das drogas e através de cada tratamento individual nas concentrações testadas também foram realizados. Os resultados foram avaliados por turbidimetria a 630 nm, sendo expressos como a média (±DP) de triplicatas, e analisados através da comparação entre as absorbâncias dos grupos na ausência de drogas, na presença de cada tratamento individualmente, e em combinação com *McLTP₁*.

3.3.2.2 Atividade biológica com bactérias de interesse clínico

Todos os ensaios para avaliação do potencial antimicrobiano de *McLTP₁* sobre bactérias de importância clínica foram conduzidos junto ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará (LABMICRO-UFC).

3.3.2.2.1 Preparo dos antibióticos e *McLTP*₁

As soluções de gentamicina (GEN) e oxacilina (OXA) foram diluídas em DMSO (1%) em concentração estoque de 50 µg/mL e estocadas a - 20 °C. Amostra liofilizada de *McLTP*₁ foi solubilizada em água destilada e, a seguir, esterilizada através de filtração em membrana de polietersulfôna (PES) de 0,22 µm (TPP), e igualmente diluída em água destilada estéril para concentração de acordo com o respectivo ensaio.

3.3.2.2.2 Preparo dos inóculos bacterianos

A partir das colônias previamente ativadas *overnight*, os inóculos foram obtidos através de incubação das colônias isoladas de cada cepa em caldo BHI à 37 °C até atingirem fase exponencial de crescimento. Decorrido esse tempo, foi realizado o ajuste de sua densidade celular de modo a se obter uma turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A seguir, a suspensão obtida foi diluída 100 vezes, em solução salina 0,85% estéril, perfazendo uma cultura com aproximadamente 10^6 UFC/mL.

3.3.2.2.3 Teste de sensibilidade em bactérias gram-positivas e gram-negativas de interesse clínico

O teste de sensibilidade das cepas bacterianas à *McLTP*₁ foi realizado de acordo com o método de microdiluição em caldo de cultura “Brain Heart Infusion” (BHI) conforme descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2009), em microplacas de 96 poços de fundo chato e estéreis, sobre as cepas de *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P e ATCC 14458).

Aos poços da microplaca foram adicionadas alíquotas de caldo BHI (100 µL), seguido da adição de 100 µL de *McLTP*₁ nos poços da primeira coluna (1600 µg/mL), efetuando-se diluições seriadas obtendo-se concentrações variando de 0,19 – 800 µg/mL, e finalmente, dispostos 5 µL da suspensão microbiana de aproximadamente 10^6 UFC/mL. As microplacas foram incubadas por 24 horas em

estufa bacteriológica a 37 °C. Após esse período foi realizada a inspeção visual do crescimento microbiano e a leitura das absorbâncias em leitor de microplacas Bio-Tek a 620 nm para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) que compreende a menor concentração de *McLTP*₁ responsável por inibir o crescimento das cepas testadas, constatado pela ausência de turvação visível do crescimento microbiano. Inóculos das cepas bacterianas na ausência de *McLTP*₁ foram utilizadas como controle de crescimento máximo. Para excluir a possível interferência da turvação determinada pela presença da *McLTP*₁, grupos contendo apenas o meio de cultura na presença das concentrações testadas da proteína foi utilizado como branco. Os ensaios foram conduzidos em triplicatas, sendo os valores de absorbâncias à 620 nm plotados como a média (\pm DP) para comparação dos grupos tratados e o controle de crescimento máximo das cepas bacterianas.

3.3.2.2.4 Teste de inibição da formação de biofilme sobre cepas de *S. aureus*.

A formação do biofilme foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Stepanovic *et al.*, (2000), sendo a massa de biofilme quantificada utilizando-se a técnica do cristal violeta (STEPANOVIĆ *et al.*, 2000).

Cepas de *S. aureus* (ATCC 6538P e ATCC 14458) foram cultivadas em caldo TSB, suplementado com 1% (p/v) de glicose e incubadas a 37°C por 24 horas, sendo preparadas culturas microbianas com aproximadamente 10⁶ UFC/mL de acordo com o item 3.3.2.2.1. Em seguida, foram adicionadas aos poços de microplacas, alíquotas de 100 μ L da cultura microbiana e 100 μ L em diluições seriadas de 1:2 de *McLTP*₁ (0,19 – 800 μ g/mL), sendo dispostas para a formação dos biofilmes a 35°C por 24 horas. Ao final desse período, os poços foram lavados três vezes com 250 μ L de solução salina 0,85% estéril, e as células aderidas fixadas com 200 μ L de metanol a 99%. Após 15 minutos em contato, o metanol foi removido e a placa seca a temperatura ambiente. Alíquotas de 200 μ L de solução de cristal violeta a 2% (v/v) foram adicionadas aos poços e ao final de 15 minutos, o excesso de cristal violeta (CV) foi removido lavando-se a placa três vezes com água ultrapura. Finalmente, o CV foi liberado pela adição de 160 μ L de ácido acético a 33% e a leitura da densidade óptica (DO) foi realizada, após 15 min, em leitor de microplacas (Bio-Tek), no comprimento de onda de 570 nm. Controles sem a

proteína foram realizados, para análise da produção máxima de biofilmes e comparação com os biofilmes formados na presença de *McLTP*₁.

3.3.2.2.5 Efeito modulador de *McLTP*₁ sobre antibióticos em *Staphylococcus* spp.

O efeito da interação entre *McLTP*₁ e as drogas gentamicina e oxacilina foram avaliados mediante o método de Checkerboard, de acordo com Cleeland e Squires (1991). Para isso, foram utilizadas microplacas de 96 poços de fundo chato, estéreis, às quais foram adicionadas alíquotas de 100 µL dos inóculos de *S. aureus* (ATCC 6538P e ATCC 14458) e *S. epidermidis* (ATCC 12228) de concentração aproximada de 10⁶ UFC/mL, sendo disposto igual volume de *McLTP*₁ (800 µg/mL) na primeira coluna, efetuando-se diluições seriadas obtendo-se poços com concentrações de 100 – 400 µg/mL. A seguir, 5 µL das drogas (gentamicina e oxacilina) foram distribuídos nos poços, encerrando uma concentração final equivalente a 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16 da CIM que foi de 1,56 para gentamicina e de 0,39, 3,125 e 0,012 para oxacilina, respectivamente para as cepas de *S. aureus* (ATCC 6538P), *S. aureus* (ATCC 14458) e *S. epidermidis* (ATCC 12228), como previamente estabelecido por Sales (2014). As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas, e então realizadas a avaliação do efeito mediante inspeção visual do crescimento microbiano e leituras de densidade óptica a 620 nm de triplicatas para a determinação da CIM dos cotratamentos (*McLTP*₁ + antibióticos), e posterior, cálculo do ICIF.

A análise da interação entre as drogas foi realizada conforme descrito por Shin e Lim (2004), através da determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), que é dado por:

$$\text{ICIF} = (\text{CIM Oxacilina ou Gentamicina combinação} / \text{CIM Oxacilina ou Gentamicina isolada}) + (\text{CIM } \textit{McLTP}_1 \text{ combinação} / \text{CIM } \textit{McLTP}_1 \text{ isolada}).$$

A interpretação do índice é realizada da seguinte maneira: ICIF ≤ 0,5: efeito sinérgico; 0,5 < ICIF ≤ 1,0: efeito aditivo ou indiferente; e ICIF > 1,0: efeito antagônico (EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2004).

3.3.2.2.6 Avaliação do efeito de *McLTP*₁ sobre a atividade de fatores de virulência em *Staphylococcus* spp.

A análise da alteração da atividade de fatores de virulência de *S. aureus* (ATCC 6538P e ATCC 14458) e *S. epidermidis* (ATCC 12228) mediada por *McLTP*₁ foi realizada através da exposição dos inóculos microbianos à proteína conforme os ensaios de sensibilidade descrito no item 3.3.2.2.1, em concentrações de 100 – 800 µg/mL, sendo a seguir avaliadas as atividades catalásica, coagulásica e DNásica dos grupos tratados, tendo como controle culturas não expostas à *McLTP*₁, conforme segue os itens a seguir.

3.3.2.2.5.7 Atividade catalase

A intensidade de degradação de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio foi utilizada como parâmetro na análise da atividade da enzima extracelular catalase. Para tanto, alíquotas de 100 µL de culturas microbianas de *S. aureus* e *S. epidermidis* previamente tratadas com *McLTP*₁ (35 °C por 24 horas) nas concentrações de 100 – 800 µg/mL foram dispostas em poços da microplaca, aos quais foram adicionados 100 µL de peróxido de hidrogênio 3%, sendo os resultados de triplicatas avaliados através da formação de bolhas imediatamente após o contato do peróxido de hidrogênio com a cultura microbiana. A formação de bolhas foi avaliada atribuindo escores a sua intensidade (- sem atividade; + fraca; ++ moderada; +++ intensa) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013).

3.3.2.2.5.8 Atividade da coagulase

A ocorrência de aglutinação foi avaliada mediante ensaio em lâmina e em tubo. O primeiro teste investiga coagulase ligada (ou fator aglutinante) “*clumping factor*” na superfície da parede celular, que reage com o fibrinogênio do plasma levando a sua coagulação, enquanto o segundo teste baseia-se na presença da coagulase livre que reage com um fator plasmático formando um complexo que atua sobre o fibrinogênio formando a fibrina (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013). No teste da coagulase em lâmina, alíquotas de 50 µL de cultura microbiana de *S. aureus* expostas por 24 horas (35°C) à *McLTP*₁ nas concentrações de 100 – 800 µg/mL foram dispostas juntamente com 50 µL de plasma sanguíneo, obtido junto ao Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), homogeneizado e avaliado o resultado após 10 segundos através da formação de

cordões de fibrina sob a forma de grumos visíveis. No ensaio de coagulase livre, foram adicionados em tubo de ensaio 100 µL da cultura microbiana de *S. aureus* pré tratadas, e 100 µL de plasma sanguíneo, e incubadas a 35 °C, e averiguado a formação de coágulos após 1, 4 e 24 horas de incubação. No presente ensaio, cepas de *S. epidermidis* não foram utilizados uma vez que se trata de uma espécie coagulase negativa. Ambos os testes foram conduzidos em triplicatas, sendo os resultados apresentados de forma qualitativa através da detecção ou não da atividade coagulásica.

3.3.2.2.5.9 Atividade DNase

A atividade DNásica foi detectada mediante a ação da enzima extracelular desoxirribonuclease na degradação do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) presente no meio de cultura ágar DNase Teste Base (HIMEDIA®). Alíquotas de 5 µL da cultura previamente exposta à *McLTP*₁ nas concentrações de 100 – 800 µg/mL, foram semeadas na superfície de ágar DNase Teste Base (HIMEDIA®). Após incubação a 37 °C por 24 horas, a superfície do ágar foi recoberta com uma solução de HCl 1 M, para visualização da atividade enzimática da DNase, através da formação de zonas opacas (atividade positiva). A ausência das zonas opacas representa atividade negativa, e portanto alteração da atividade DNásica. Do mesmo modo, cepas de *S. epidermidis* não foram utilizados uma vez que se trata de uma espécie DNase negativa. Os teste foi conduzido em triplicata, sendo os resultados apresentados de forma qualitativa através da detecção ou não da atividade DNásica (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013).

3.3.3 Ensaio biológico in vivo em modelo de sepse

A indução experimental de sepse foi realizada através do modelo por Ligadura e Perfuração do Ceco (CLP, do inglês *Cecal Ligation and Puncture*) como descrito por Wichtermann, Baue e Chaudry, (1980), sendo utilizado para a investigação do efeito protetor mediado por *McLTP*₁ na dose de 8 mg/kg tanto pela via intraperitoneal quanto pela via oral.

3.3.3.1 Modelo de sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP)

Antes do procedimento cirúrgico, todos os animais foram pesados e anestesiados com uma solução de cetamina (100 mg/kg) associada a xilazina (25 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.). Após a confirmação da anestesia, foi efetuada a tricotomia seguida de assepsia da região abdominal com álcool iodado.

A seguir, sob condições assépticas, os animais foram submetidos à laparotomia com incisão longitudinal mediana xifopúbica de aproximadamente 1,5 cm permitindo a exposição completa do ceco, sendo realizada uma ligadura não obstrutiva com fio de algodão 4-0 na região imediatamente abaixo da válvula ileocecal, e a seguir, uma única perfuração do ceco de maneira transfixante com agulha de 18 G. Após a perfuração, para permitir o extravasamento de uma pequena quantidade de conteúdo fecal, o ceco foi levemente pressionado e então recolocado na cavidade peritoneal. Posteriormente, a musculatura foi suturada com fio de náilon 3-0 através de ponto chuleio simples, e a seguir a pele por meio de pontos simples com fio de náilon 6-0, sendo a região abdominal assepsiada com álcool iodado. Ao final do procedimento cirúrgico, para a reposição de fluidos, foi administrada solução salina isotônica (50 mL/kg) via subcutânea (s.c.), em todos os animais. Para a recuperação da anestesia (60 a 120 minutos após o procedimento cirúrgico), os animais foram acondicionados em caixas devidamente aquecidas.

Os animais utilizados no experimento foram distribuídos aleatoriamente em um dos seguintes grupos e acompanhados ao longo de 72 horas:

- Grupo Sham (n = 6): animais submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, não sendo realizada a ligadura e perfuração do ceco;
- Grupo controle (n = 6): animais submetidos à indução de sepse por CLP, e não sujeitos a tratamento com a proteína, recebendo solução salina fisiológica estéril;
- Grupo *McLTP*₁ pré-i.p. (n = 6): animais submetidos à administração de *McLTP*₁ por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 8 mg/kg, 1 hora antes da indução de sepse por CLP;
- Grupo *McLTP*₁ pré-v.o. (n = 6): animais submetidos à administração de *McLTP*₁ na dose de 8 mg/kg, 2 horas antes da indução de sepse por CLP;
- Grupo *McLTP*₁ pós-v.o. (n = 6): animais que receberam a administração de *McLTP*₁ por via oral (v.o.) na dose de 8 mg/kg imediatamente após a indução de sepse por CLP, e, a seguir, a cada 6 horas, durante o período de 72 horas.

3.3.3.2 Avaliação da sobrevida, peso corpóreo e fresco relativo dos órgãos

Os grupos controles e tratados foram avaliados quanto à sobrevida a cada 12 horas, até 72 horas após a cirurgia, sendo realizada uma curva de sobrevida referente a cada grupo experimental. Além da sobrevivência, também foram avaliados os parâmetros de peso corpóreo e peso fresco relativo dos órgãos dos animais. Para isso, os animais de cada grupo foram pesados a cada 12 horas ao longo do experimento, e ao final das 72 horas do experimento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e abertos para a remoção do coração, fígado, rins e pulmões, os quais foram pesados em balança analítica.

3.3.3.3 Avaliação de parâmetros hematológicos

Para avaliação dos parâmetros hematológicos, nos intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas, os animais de cada grupo experimental foram anestesiados através de inalação de halotano, e tiveram o sangue coletado através do plexo retro-orbital, com auxílio de capilares heparinizados para eppendorfs também contendo heparina (20 µL), sendo analisados, glóbulos brancos, glóbulos vermelhos, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, o volume médio de hemoglobina das células e concentração do volume corpuscular médio da hemoglobina, em analisador automatizado de células.

3.3.3.4 Análise da temperatura corpórea de animais saudáveis ou com sepse induzida por CLP

O efeito protetor de $McLTP_1$ sobre camundongos induzidos com sepse foi também avaliado quanto o seu efeito antipirético. Para isso, a temperatura retal dos animais foi aferida com termômetro digital infantil, antes da indução da sepse para averiguar a temperatura basal, e a seguir imediatamente após a sepse induzida por CLP, sendo os animais acompanhados a cada 12 horas ao longo das 72 horas de experimento.

3.3.4 Análises estatísticas

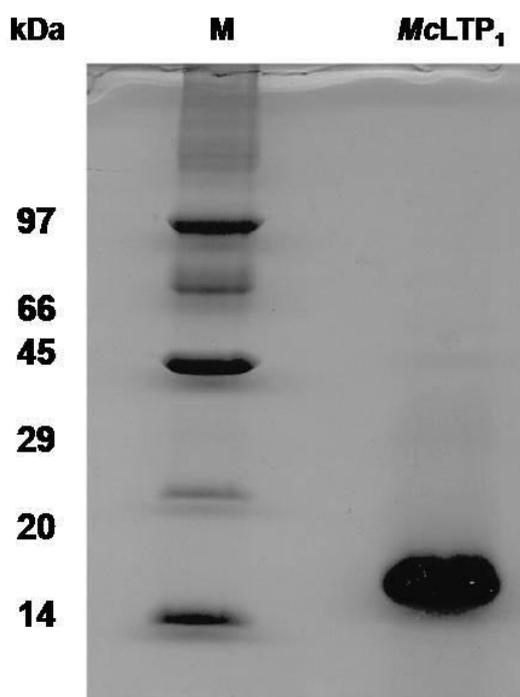
Os dados experimentais *in vitro* foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos conduzidos em triplicatas. As diferenças estatísticas entre os tratamentos foram avaliadas no software GraphPad Prism® 5, sendo as análises conduzidas através do teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido dos testes de comparações múltiplas de Tukey, sendo considerados significativas as diferenças com $p < 0,05$. O mesmo teste foi utilizado nas análises estatísticas com os dados experimentais obtidos *in vivo*.

4 RESULTADOS

4.1 Purificação de *McLTP*₁

*McLTP*₁ foi obtida através do protocolo estabelecido por Campos *et al.* (2016), com modificação, que consistiu na substituição da cromatografia de exclusão molecular proposta no protocolo original, por uma etapa de ultrafiltração em membrana de *cut off* de 30 kDa. Essa etapa alternativa não interferiu no rendimento proteico (dado não mostrado) proporcionando, no entanto, o acúmulo de *McLTP*₁ de maneira mais rápida, e igualmente de maneira homogênea e livre de contaminantes, conforme analisado através de gel de eletroforese PAGE-SDS 15% (**Figura 4**). Uma vez determinado o protocolo modificado de purificação de *McLTP*₁, este foi realizado continuamente viabilizando o acúmulo de amostra para os posteriores ensaios biológicos.

Figura 4 – Perfil eletroforético (PAGE-SDS 15%) em condições não redutoras de *McLTP*₁ obtida através do protocolo modificado . A raia 1 compreende ao marcador de massa molecular (kDa) e a raia 2 *McLTP*₁ (20 µg). As proteínas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

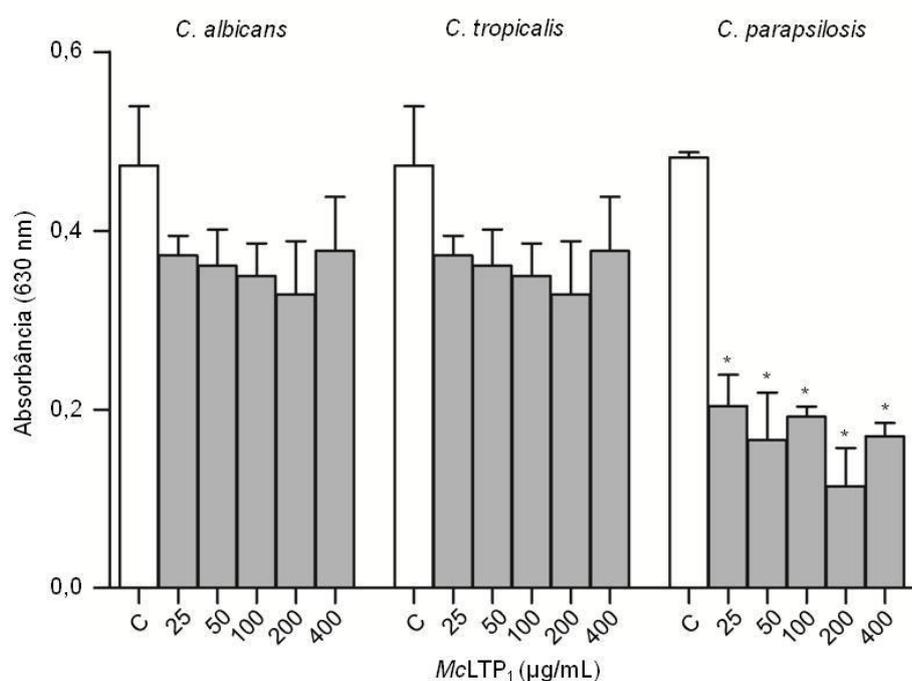


4.2 Atividade antifúngica de *McLTP*₁

4.2.1 Sensibilidade de *Candida* spp. à *McLTP*₁ em crescimento planctônico

*McLTP*₁ não foi capaz de inibir o crescimento planctônico das espécies de *Candida albicans* (01-05-005) e *Candida tropicalis* (03-2-048) nas concentrações testadas. Contudo, *McLTP*₁ inibiu significativamente o crescimento da espécie *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), já a partir da concentração de 25 µg/mL em 52,72% ($p < 0,05$). Para as demais concentrações inferiores a 25 µg/mL não foi observada inibição significativa em relação ao controle de crescimento máximo, e em concentrações superiores, *McLTP*₁ não exibiu um efeito dependente da concentração (**Figura 5**). Concentrações menores que 25 µg/mL não foram apresentadas no gráfico para melhor visualização.

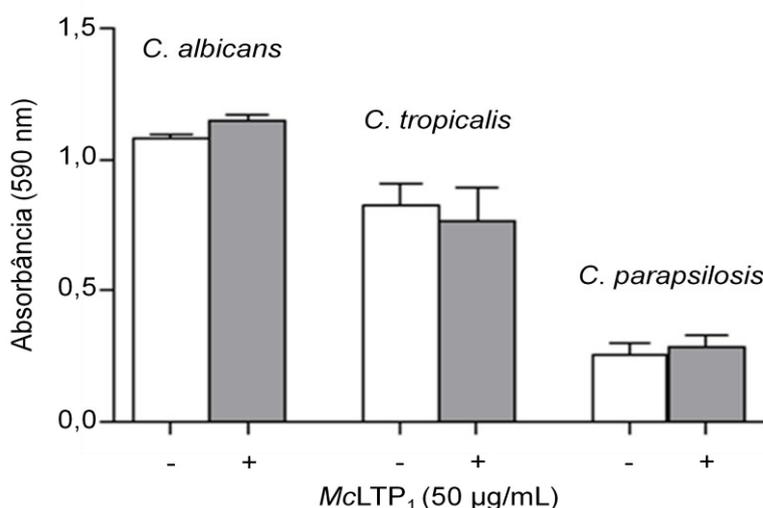
Figura 5 – Inibição no crescimento de *Candida* spp. na presença de *McLTP*₁. O efeito antifúngico de *McLTP*₁ foi avaliado através de leitura de DO (630 nm) após 48 horas de contato com os microrganismos. Os valores são expressos como a média (\pm DP) de triplicatas. * indica diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$), através de análise de Variância (One-way ANOVA) seguido de teste de comparação múltiplo de Tukey.



4.2.2 Sensibilidade de *Candida* spp. à *McLTP*₁ em formação de biofilme

A **figura 6** apresenta a quantificação das biomassas de biofilmes de *Candida* spp. na presença de *McLTP*₁ (50 µg/mL) em comparação com os controles de crescimento máximo na ausência de tratamentos. Para as três espécies de *Candida*, a proteína não foi capaz de interferir na formação dos biofilmes na concentração testada.

Figura 6 – Efeito de *McLTP*₁ sobre a formação de biofilmes de *Candida* spp.. A inibição da formação de biofilmes de *Candida* spp. por *McLTP*₁ foi avaliada mediante teste colorimétrico com CV através de leitura de DO em 590 nm. Os valores são expressos como a média (±DP) de triplicatas.



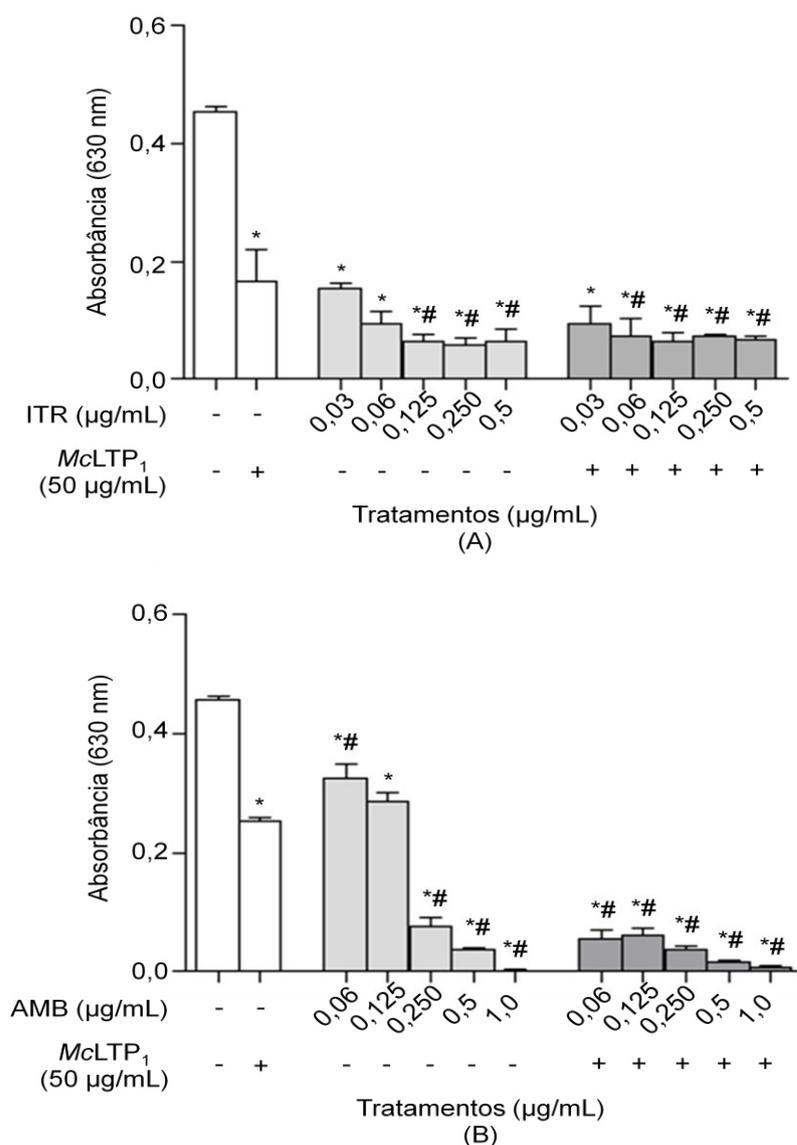
4.2.3 Efeito modulador de *McLTP*₁ na atividade antifúngica de ITR e AMB

Como parte integrante da avaliação do potencial antifúngico de *McLTP*₁, foi investigada a sua interação com os antimicrobianos itraconazol e anfotericina B. Uma vez que apenas *C. parapsilosis* mostrou-se sensível à *McLTP*₁, esse microrganismo foi utilizado nos estudos de modulação dos antimicóticos.

Em relação às combinações entre *McLTP*₁ (50 µg/mL) e ITR (0,03 – 0,5 µg/mL), não foram observadas diferenças significativas na inibição do crescimento de *C. parapsilosis* entre os tratamentos na presença de ITR isoladamente e em combinação com *McLTP*₁, como apresentado na **figura 7A**.

Por outro lado, $McLTP_1$ (também a 50 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de potencializar o efeito inibitório de AMB, mesmo quando esse antifúngico foi testado nas concentrações de 0,06 e 0,125 $\mu\text{g/mL}$. Nessas concentrações isoladamente, AMB inibiu o crescimento de *C. parapsilosis* em 28,6% e 37,4%, respectivamente. Na presença de $McLTP_1$ o efeito inibitório foi significativamente aumentado ($p < 0,05$) para 88,1% e 86,4% (estatisticamente sem diferença), sugerindo-se uma ação sinérgica entre as drogas, conforme mostrado na **Figura 7B**.

Figura 7 – Efeito modulador de $McLTP_1$ sobre ITR e AMB frente ao crescimento planctônico de *Candida parapsilosis*. A interação entre $McLTP_1$ e os antimicóticos foi avaliada através de leitura de DO (630 nm) sobre a inibição de *C. parapsilosis*. Os valores são expressos como a média (\pm DP) de triplicatas. * $p \leq 0,05$ v. controle sem drogas, e # $p \leq 0,05$ v. controle $McLTP_1$.



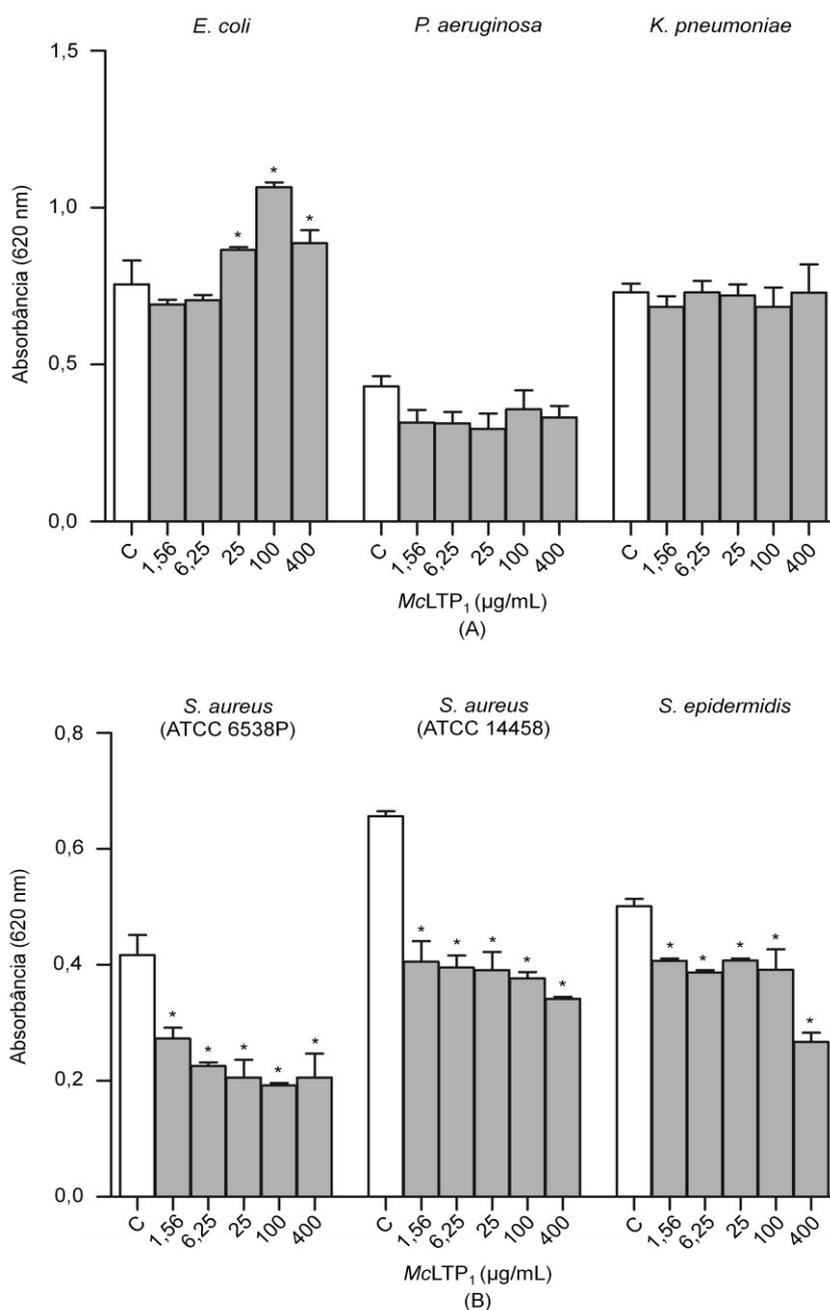
4.3 Ensaios de atividade antibacteriana

4.3.1 Efeito de *McLTP₁* sobre o crescimento planctônico de bactérias de interesse clínico

A investigação do potencial antibacteriano de *McLTP₁* foi conduzida com espécies bacterianas de interesse clínico pertencentes aos gram-negativos (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumonia*) e gram-positivos (*S. aureus* e *S. epidermidis*). Diante das bactérias gram-negativas, *McLTP₁* não exibiu efeito inibitório sobre o crescimento planctônico para nenhuma das espécies nas concentrações testadas (**Figura 8A**).

Diferentemente do efeito observado sobre as bactérias gram-negativas, *McLTP₁* foi capaz de inibir o crescimento dos gram-positivos. A inibição significativa do crescimento das bactérias gram-positivas foi evidenciada nas concentrações de 0,19 µg/mL para as cepas de *S. aureus* (ATCC 6538P e ATCC 14458) e 0,78 µg/mL para *S. epidermidis* (ATCC 12228), com percentuais de inibição de 23%, 32% e 18,7%, respectivamente. Ademais, a inibição mediada por *McLTP₁* sobre a cepa de *S. aureus* (ATCC 6538P) variou de 27,8% (0,39 µg/mL) a 46,7% (800 µg/mL). Em relação à cepa *S. aureus* (ATCC 14458), a variação foi bastante similar, com percentuais de 37,1% a 46,6% nas mesmas concentrações. Diante de *S. epidermidis* (ATCC 12228), nas concentrações mais elevadas de 400 e 800 µg/mL foram observadas inibições significativas do crescimento planctônico, alcançando percentuais de 46,7% e 98,8%, respectivamente (**Figura 8B**). Para uma melhor clareza dos gráficos, foram omitidas as absorbâncias relativas a algumas concentrações.

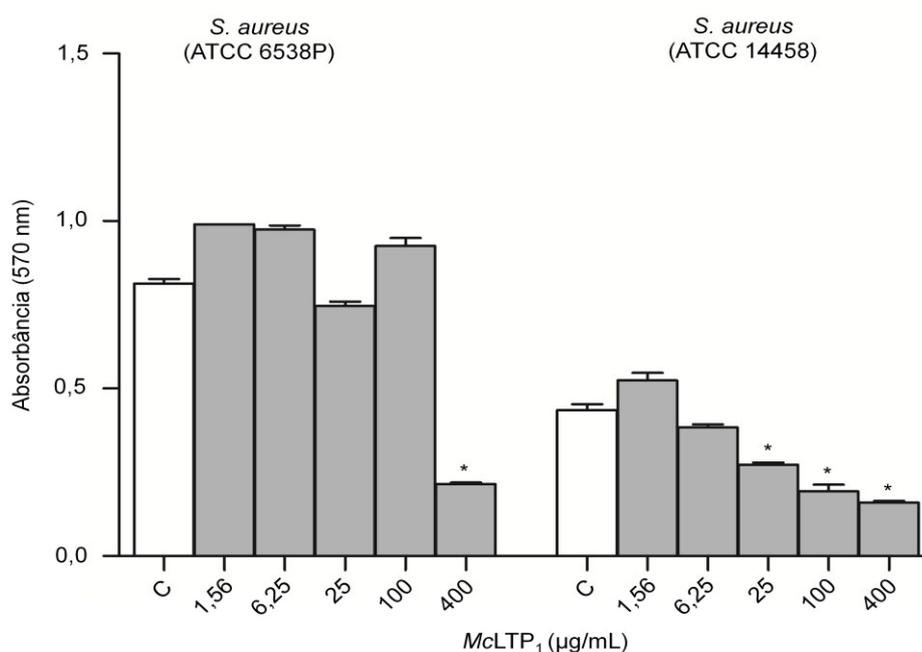
Figura 8 – Efeito de $McLTP_1$ sobre o crescimento planctônico de bactérias gram-negativas e gram-positivas. O efeito antibacteriano de $McLTP_1$ foi avaliado através de leitura de DO (620 nm) após 24 horas de contato com os microrganismos. Os valores são expressos como a média ($\pm DP$) de triplicatas. * indica diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$), através de análise de Variância (One-way ANOVA) seguido de teste de comparação múltiplo de Tukey. (A): *E. coli* (ATCC 10536); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027); e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031). (B): *S. aureus* (ATCC 6538P); *S. aureus* (ATCC 14458); e *S. epidermidis* (ATCC 12228).



4.3.2 Efeito de *McLTP*₁ sobre a formação de biofilmes de *S. aureus*

A avaliação da inibição de biofilmes bacterianos por *McLTP*₁ foi investigada frente as duas cepas de *S. aureus* (ATCC 6538P e ATCC 14458). *McLTP*₁ foi capaz de interferir na formação do biofilme de ambas as cepas testadas, sendo o efeito de inibição sobre o biofilme de *S. aureus* (ATCC 6538P) observado apenas nas concentrações mais elevadas de 200 µg/mL (39,11%; $p < 0,05$) e 400 µg/mL (73,6%; $p < 0,05$), não se estabelecendo um efeito dependente de concentração em relação a concentração de 800 µg/mL. Diante da cepa de *S. aureus* (ATCC 14458), não foi visualizada inibição em concentrações inferiores a 12,5 µg/mL, no entanto, nesta concentração, *McLTP*₁ foi capaz de inibir significativamente a formação do biofilme em 34,5%, sendo o efeito estatisticamente similar para as concentrações de 25 a 100 µg/mL. Para as demais concentrações de 200, 400 e 800 µg/mL foi observado o efeito inibitório máximo próximo de 63% de inibição (**Figura 9**).

Figura 9 – Efeito de *McLTP*₁ sobre a formação de biofilmes de *S. aureus*. A inibição da formação de biofilmes de *S. aureus* por *McLTP*₁ foi avaliada mediante teste colorimétrico com CV através de leitura de DO em 570 nm. Os valores são expressos como a média (\pm DP) de triplicatas. * indica diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$; ANOVA pós teste de Tukey).



4.3.3 Efeito modulador de *McLTP₁* na atividade antibacteriana da gentamicina e oxacilina

McLTP₁ não apresentou efeito modulador sobre as ações de gentamicina frente às cepas de *S. aureus* (ATCC 6538P e ATCC14458) e *S. epidermidis* (ATCC 12228) nas concentrações testadas (dados não mostrados). No entanto, interações sinérgicas foram observadas entre *McLTP₁* e oxacilina para as três cepas bacterianas como observado através dos Índices de Concentração Inibitória Fracionada calculados que variaram de 0,18 e 0,38, conforme mostra a **Tabela 6**.

Tabela 6 - Efeito sinérgico do cotratamento com *McLTP₁* e oxacilina frente ao crescimento planctônico de *Staphylococcus* spp.

| Cepa | CIM ($\mu\text{g/mL}$) | | | | ICIF |
|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------------|-----|------|
| | Isolada | | Combinação | | |
| | Oxacilina | <i>McLTP₁</i> | Oxacilina + <i>McLTP₁</i> | | |
| <i>S. aureus</i> (ATCC 6538P) | 0,39 | > 800 | 0,024 | 100 | 0,18 |
| <i>S. aureus</i> (ATCC 14458) | 3,125 | > 800 | 0,19 | 100 | 0,18 |
| <i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228) | 0,012 | > 800 | 0,0015 | 200 | 0,38 |

CIM: Concentração Inibitória Mínima;

ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada;

ICIF = (CIM Oxa combinação / CIM Oxa isolada) + (CIM *McLTP₁* combinação / CIM *McLTP₁* isolada). ICIF \leq 0,5: Sinergismo; 0,5 < ICIF \leq 1,0: Aditivo ou Indiferente; ICIF > 1,0: Antagônico.

4.3.4 Efeito de *McLTP₁* sobre a atividade de fatores de virulência em *Staphylococcus* spp.

McLTP₁ na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ não foi capaz de interferir na atividade da enzima catalase em nenhuma das três cepas de *Staphylococcus* testadas. Contudo, ocorreu redução da atividade catalásica a partir de 200 $\mu\text{g/mL}$,

sendo verificadas intensidades fraca e moderada para as cepas de *S. aureus* ATCC 6538P e ATCC14458, respectivamente, e uma completa inibição na atividade da catalase para a cepa de *S. epidermidis*. O efeito observado foi dependente da concentração, sendo observada a inibição da atividade da catalase das três cepas quando expostas a pré-tratamentos com *McLTP*₁ a 800 µg/mL conforme a **Tabela 7** a seguir.

Em relação à atividade coagulásica, não foi observada inibição na atividade de coagulase livre através do teste em tubo de ensaio, em ambas as cepas *S. aureus* (ATCC 6538P e ATCC14458) quando expostas à pré-tratamentos com *McLTP*₁ nas concentrações testadas de 100 a 800 µg/mL, durante os tempos de ensaio avaliados de 1, 4 e 24 horas. No entanto, em relação a atividade de coagulase ligada, avaliada em lâmina, embora sem alterações no efeito mediante pré-tratamentos com *McLTP*₁ a 100 e 200 µg/mL, a cepa de *S. aureus* (ATCC 6538P) tratada com *McLTP*₁ a 400 µg/mL, teve esse fator de virulência inibido. Efeito este observado para ambas as cepas expostas a 800 µg/mL com *McLTP*₁ (**Tabela 7**).

Quanto a atividade DNásica das cepas de *S. aureus* expostas à pré-tratamentos com *McLTP*₁ (100 - 800 µg/mL), não houve alteração da atividade desse fator de virulência, como evidenciado pela presença de halo opaco ao redor do crescimento bacteriano, após adição de HCl 1% (**Tabela 7**).

Tabela 7 – Efeito de $McLTP_1$ sobre a atividade de fatores de virulência em *Staphylococcus* spp.

| | Controle | | $McLTP_1$ ($\mu\text{g/mL}$) | | | Atividade |
|---|----------|-----|--------------------------------|-----|-----|------------------|
| | C | 100 | 200 | 400 | 800 | |
| <i>S. aureus</i> (ATCC 14458) | +++ | +++ | ++ | + | - | Catalase |
| <i>S. aureus</i> (ATCC 6538P) | +++ | +++ | + | - | - | |
| <i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228) | +++ | +++ | - | - | - | |
| <i>S. aureus</i> (ATCC 14458) | + | + | + | + | - | Coagulase ligada |
| <i>S. aureus</i> (ATCC 6538P) | + | + | + | - | - | |
| <i>S. aureus</i> (ATCC 14458) | + | + | + | + | + | Coagulase livre |
| <i>S. aureus</i> (ATCC 6538P) | + | + | + | + | + | |
| <i>S. aureus</i> (ATCC 14458) | + | + | + | + | + | DNase |
| <i>S. aureus</i> (ATCC 6538P) | + | + | + | + | + | |

- (Sem atividade), + (Fraca), ++ (Moderada) e +++ (Intensa) representam os escores conferidos na avaliação da intensidade da atividade catalásica mediante a formação de bolhas de oxigênio visualizadas. Para as demais atividades avaliadas (+) e (-) indicam a detecção ou não da atividade. C compreende o controle experimental da cultura sem tratamento prévio com $McLTP_1$.

4.4 Ensaio biológico *in vivo* em modelo de sepse

4.4.1 Efeito do (pré) tratamento com $McLTP_1$ sobre mortalidade, peso corpóreo e peso fresco relativo dos órgãos de animais com sepse

A **figura 10** apresenta o percentual de sobrevivência dos animais com sepse induzida por CLP, do grupo Sham e dos animais com sepse submetidos aos tratamentos com $McLTP_1$. Os resultados mostram um percentual de 100% de sobrevivência nos animais Sham ao final das 72 horas de experimento. Por outro lado, o grupo controle com sepse teve a sobrevivência reduzida a 50%, já ao final do primeiro dia, sendo evidenciado um percentual de 17% no último dia de observação. Para todos os grupos tratados com $McLTP_1$ (8 mg/kg), tanto nos grupos pré-tratados por

via intraperitoneal ou oral quanto no grupo pós-tratado por via oral, o percentual de sobrevivida foi de 100% em todos os dias de experimento.

O peso corpóreo dos animais também foi avaliado durante 72 horas, sendo mensurada uma massa inicial aproximada de 35 g para todos os animais antes do experimento. Ao final de três dias após a indução da sepse, os grupos pré-tratados por via oral ou intraperitoneal e pós-tratados por via oral com $M\alpha LTP_1$ (8 mg/kg), apresentaram peso corpóreo de 36 g ($\pm 0,1$), 33 g ($\pm 0,1$) e 34 g ($\pm 0,1$), respectivamente, o qual foi estatisticamente semelhante ao peso observado para o grupo Sham (34 g $\pm 0,1$). Apenas para o grupo veículo houve perda de peso significativa já ao final do primeiro dia, mantendo-se assim ao longo dos demais dias. Após 72 horas da sepse induzida por CLP, o único animal sobrevivente apresentou apenas 26 g (**Figura 11**).

O efeito protetor de $M\alpha LTP_1$ (8 mg/kg) foi observado também quanto ao peso fresco relativo dos órgãos, uma vez que os grupos pré-tratados (ip. e v.o.) e pós-tratados (v.o.) tiveram reduções significativas quando comparados ao peso fresco relativo dos rins, coração, pulmões e fígado em relação ao grupo veículo (salina), excetuando-se apenas os pulmões no grupo pré-tratado por via intraperitoneal com a proteína, como observado na **Tabela 8**.

Figura 10 - Efeito de $McLTP_1$ na sobrevivência de animais com sepse induzida por CLP. Os animais foram pré-tratados (i.p ou v.o.) ou pós-tratados (v.o) com $McLTP_1$ (8 mg/kg), e a sobrevivência avaliada ao longo de 72 horas. Os dados são expressos como a média ($\pm DP$) de cada grupo (n=6). * $p < 0,05$ v. Sham; # $p < 0,05$ v. veículo.

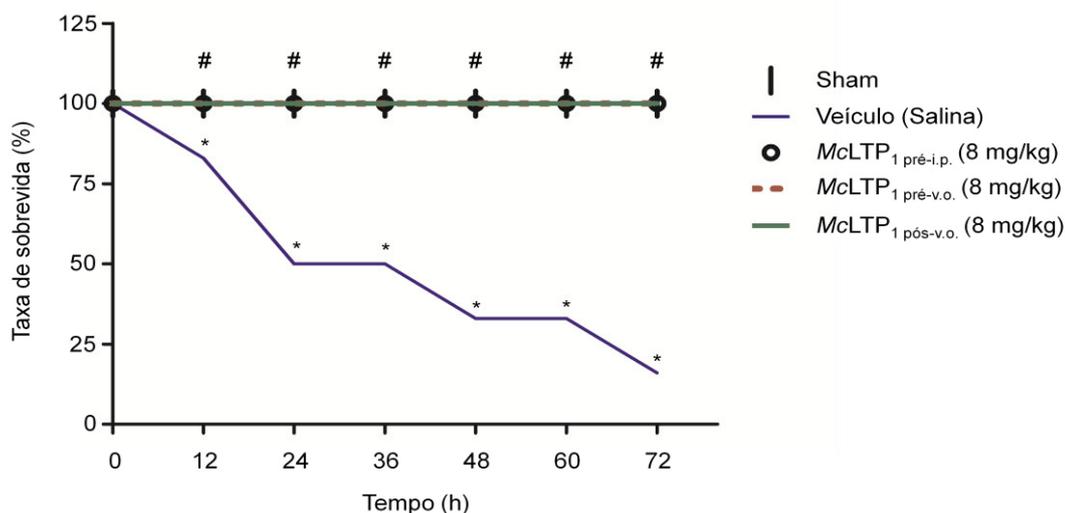


Figura 11 - Análise do peso corpóreo dos animais com sepse induzida por CLP tratados com $McLTP_1$. Os animais foram pré-tratados (i.p ou v.o, 8 mg/kg) ou pós-tratados com $McLTP_1$ (v.o, 8 mg/kg), e o peso corpóreo avaliado ao longo de 72 horas. Os dados são expressos como a média ($\pm DP$) de cada grupo (n=6). * $p < 0,05$ v. Sham; # $p < 0,05$ v. veículo.

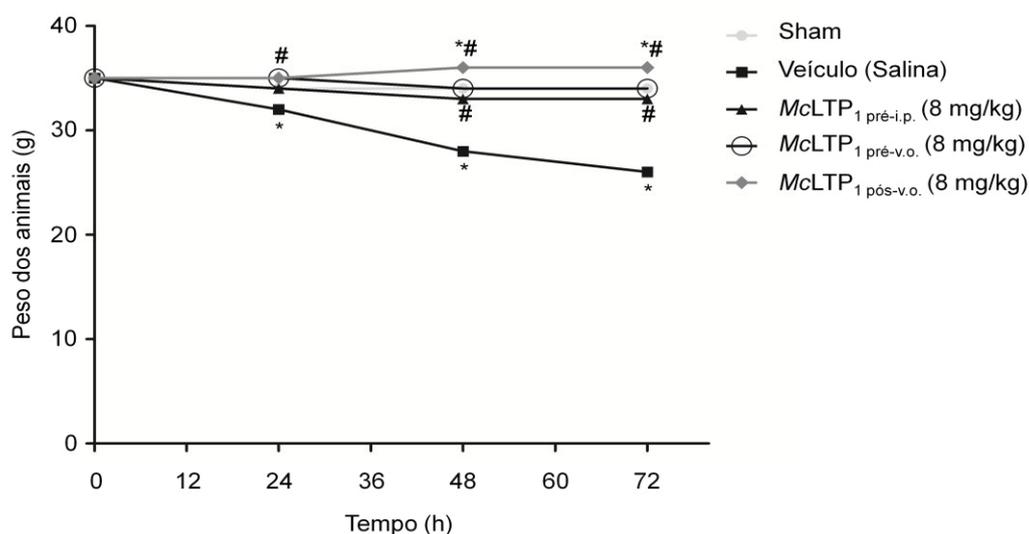


Tabela 8 – Peso fresco relativo dos órgãos de animais tratados com *McLTP*₁ após 72 horas da indução da sepse por CLP.

O peso fresco relativo dos órgãos (%) dos animais tratados ou não com *McLTP*₁ (8 mg/kg). Dados são expressos como a média ± D. P. dos órgãos coletados dos animais de cada grupo (n=6 / por grupo) ao final de 72 horas. * p < 0,05 v. Sham; # p < 0,05 v. veículo. (ANOVA, pós teste Tukey).

| Órgão | Sham | Veículo | <i>McLTP</i> ₁ | <i>McLTP</i> ₁ | <i>McLTP</i> ₁ |
|---------|-------------|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | 8 mg/kg Pré-ip. | 8 mg/kg Pré-v.o. | 8 mg/kg Pós-v.o. |
| CLP | | | | | |
| Rins | 1,33 ± 0,12 | 1,42 ± 0,10 | 1,23 ± 0,02* [#] | 1,28 ± 0,04* [#] | 1,21 ± 0,04* [#] |
| Coração | 0,51 ± 0,16 | 0,56 ± 0,06 | 0,43 ± 0,10 [#] | 0,49 ± 0,07 [#] | 0,39 ± 0,01 [#] |
| Pulmões | 0,83 ± 0,06 | 0,71 ± 0,08 | 0,66 ± 0,02* [#] | 0,69 ± 0,08* | 0,68 ± 0,06* [#] |
| Fígado | 3,86 ± 0,14 | 4,03 ± 0,13 | 3,56 ± 0,14 [#] | 3,92 ± 0,19 [#] | 3,36 ± 0,12 [#] |

4.4.2 Efeito do (pré) tratamento com $McLTP_1$ em parâmetros hematológicos de animais com sepse

Os parâmetros hematológicos de glóbulos vermelhos (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), volume médio de hemoglobina celular (MCH) e a concentração corpuscular média de hemoglobina celular (MCHC) foram analisados para os tempos de 24, 48 e 72 horas (**tabelas 9, 10 e 11**). Nas primeiras 24 horas após a indução da sepse (**tabela 9**), foi observado nos grupos pré-tratados (i.p ou v.o.) e pós-tratado (v.o.) com $McLTP_1$ (8 mg/kg) valores significativamente menores de RBC, HGB, HCT, MCV e MCH em relação àqueles observados para o grupo veículo (salina), e do mesmo modo menores comparados ao grupo Sham. No intervalo de tempo seguinte de 48 horas (**tabela 10**), foram observados nos grupos pré-tratados e pós-tratado com a proteína elevação nos parâmetros de glóbulos vermelhos, hemoglobina e hematócrito, tornando-se similar aos observados para o grupo veículo, com exceção do grupo que recebeu o pós-tratamento por via oral com a proteína que apresentou teor de hemoglobina significativamente menor. Ao término do terceiro dia após a indução da sepse, apenas os animais do grupo pós-tratado por via oral com $McLTP_1$ (8 mg/kg) apresentou parâmetros de glóbulos vermelhos, hemoglobina e hematócrito significativamente menores comparados aos valores observados nos animais do grupo veículo (salina) (**tabela 11**).

Ademais, parâmetros hematológicos de contagem de leucócitos totais e diferenciais também foram utilizados para análise do efeito protetor mediado por $McLTP_1$ em camundongos com sepse induzidos pelo modelo de CLP. Como visualizado nos dados apresentados na **figura 12 (A, B e C)**, o grupo veículo apresentou um quadro de leucocitose a partir das primeiras 24 horas após a indução da sepse, permanecendo nesse quadro ao longo das 72 horas de experimento, retornando aos níveis normais apenas os linfócitos ao final do terceiro dia. Os pré-tratamentos dos animais por ambas as vias intraperitoneal e oral com $McLTP_1$ (8 mg/kg) foi capaz de reverter o quadro de leucocitose observado para o grupo veículo, sendo um efeito mais pronunciado observado no grupo pré-i.p. No entanto, o tratamento terapêutico por via oral com $McLTP_1$ (8 mg/kg), mostrou-se mais potente, revertendo o quadro de leucocitose durante todo o período de observação do experimento, sendo capaz de reduzir significativamente tanto a contagem de

leucócitos totais, como os diferenciais de granulócitos e linfócitos. Em relação a contagem de plaquetas, houve uma elevação de suas quantidades no grupo veículo permanecendo altas ao longo das 72 horas, enquanto o grupo Sham teve aumento até as 48 horas, reduzindo posteriormente ao final do experimento. Em todos os tratamentos com *McLTP*₁ (8 mg/kg), após os três dias de indução da sepse, a quantidade de plaquetas averiguadas foi significativamente menor em relação ao grupo veículo, sendo mais uma vez observado um efeito mais pronunciado nos animais que receberam o pós-tratamento com a proteína (**Figura 12D**).

Tabela 9 - Efeito do pré-tratamento com *McLTP*₁ sobre parâmetros hematológicos dos animais com sepse induzida por CLP após 24 horas. Os animais foram pré-tratados (i.p ou v.o.) ou pós-tratado (v.o.) com *McLTP*₁ (8 mg/kg), e os parâmetros hematológicos avaliados no tempo de 24 horas. Os dados são expressos como a média (\pm DP) de cada grupo (n=6). * $p < 0,05$ v. Sham; # $p < 0,05$ v. veículo (ANOVA seguido de pós teste de Tukey).

| | Sham | Veículo | <i>McLTP</i> ₁ 8 mg/kg Pré-ip | <i>McLTP</i> ₁ 8 mg/kg Pré-v.o. | <i>McLTP</i> ₁ 8 mg/kg Pós-v.o. |
|-------------------------------------|------------------|-----------------|--|--|--|
| | CLP | | | | |
| RBC ($\times 10^6 / \mu\text{L}$) | 8,78 \pm 0,50 | 9,51 \pm 0,60 | 6,25 \pm 0,89*# | 5,93 \pm 0,04*# | 5,19 \pm 0,89*# |
| HGB (g/dL) | 17,30 \pm 0,12 | 17,3 \pm 0,60 | 12,7 \pm 0,67*# | 12,40 \pm 0,54*# | 9,60 \pm 0,67*# |
| HCT (%) | 43,30 \pm 0,81 | 45,2 \pm 0,81 | 33,0 \pm 0,23*# | 30,30 \pm 0,95*# | 21,10 \pm 0,23*# |
| MCV (μm^3) | 51,10 \pm 1,04 | 51,5 \pm 0,60 | 52,90 \pm 1,34 | 51,20 \pm 1,82 | 38,89 \pm 1,34*# |
| MCH (ρg) | 19,70 \pm 0,30 | 19,7 \pm 0,25 | 20,30 \pm 1,01 | 20,90 \pm 0,61 | 19,16 \pm 1,01 |
| MCHC (g/dL) | 38,60 \pm 0,12 | 38,2 \pm 0,90 | 38,40 \pm 1,66 | 40,90 \pm 0,59*# | 36,14 \pm 1,66*# |

Glóbulos vermelhos (RBC - red blood cells), hemoglobina (HGB - haemoglobin), hematócrito (HCT - haematocrit), volume corpuscular médio (MCV - mean corpuscular volume), hemoglobina celular média (MCH - mean cell hemoglobin), concentração de hemoglobina corpuscular média celular (MCHC - mean cell corpuscular haemoglobin concentration).

Tabela 10 - Efeito do pré-tratamento com *McLTP*₁ sobre parâmetros hematológicos dos animais com sepse induzida por CLP após 48 horas. Os animais foram pré-tratados (i.p ou v.o.) ou pós-tratado (v.o.) com *McLTP*₁ (8 mg/kg), e os parâmetros hematológicos avaliados no tempo de 48 horas. Os dados são expressos como a média (\pm DP) de cada grupo (n=6). * $p < 0,05$ v. Sham; # $p < 0,05$ v. veículo (ANOVA seguido de pós teste de Tukey).

| | Sham | Veículo | <i>McLTP</i> ₁ 8 mg/kg Pré-ip | <i>McLTP</i> ₁ 8 mg/kg Pré- v.o. | <i>McLTP</i> ₁ 8 mg/kg Pós- v.o. |
|-------------------------------------|------------------|-----------------|--|---|---|
| | CLP | | | | |
| RBC ($\times 10^6 / \mu\text{L}$) | 8,51 \pm 0,39 | 8,71 \pm 0,20 | 9,31 \pm 0,78 | 9,06 \pm 0,65 | 8,96 \pm 0,46 |
| HGB (g/dL) | 15,40 \pm 0,11 | 15,2 \pm 0,60 | 16,1 \pm 0,46 # | 16,2 \pm 0,45 *# | 14,2 \pm 0,39 *# |
| HCT (%) | 41,20 \pm 0,81 | 41,3 \pm 0,89 | 45,3 \pm 0,47 *# | 46,0 \pm 0,45 *# | 41,7 \pm 0,98 |
| MCV (μm^3) | 48,50 \pm 0,08 | 47,5 \pm 0,45 | 48,7 \pm 1,14 | 50,8 \pm 1,90 *# | 46,6 \pm 1,12 |
| MCH (μg) | 18,00 \pm 0,12 | 17,4 \pm 0,15 | 17,2 \pm 0,09 * | 17,8 \pm 0,34 | 15,8 \pm 0,91 *# |
| MCHC (g/dL) | 37,30 \pm 0,29 | 36,8 \pm 0,58 | 35,5 \pm 1,02 * | 35,2 \pm 0,89 *# | 34,0 \pm 1,01 *# |

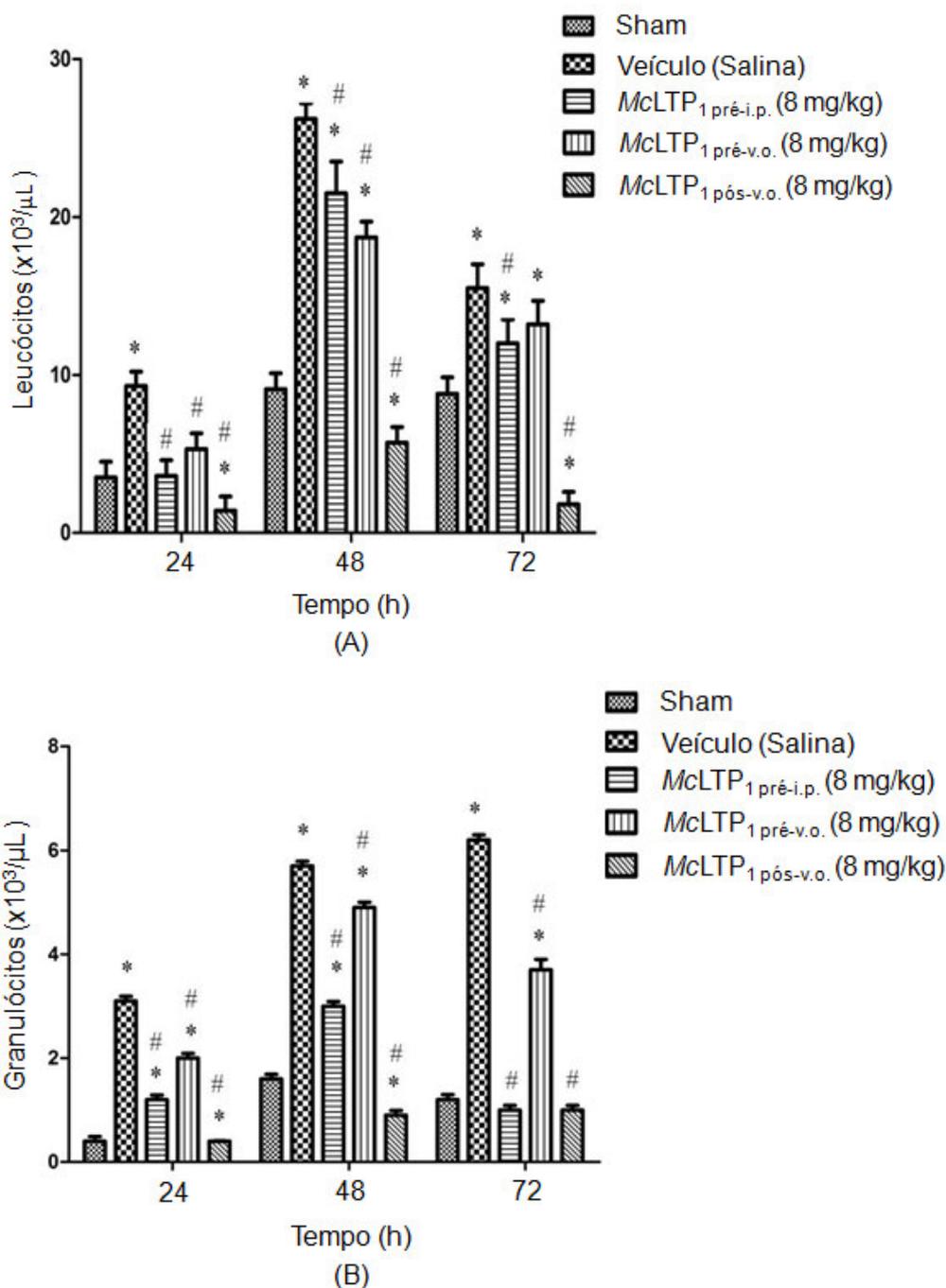
Glóbulos vermelhos (RBC - red blood cells), hemoglobina (HGB - hemoglobin), hematócrito (HCT - haematocrit), volume corpuscular médio (MCV - mean corpuscular volume), hemoglobina celular média (MCH - mean cell hemoglobin), concentração de hemoglobina corpuscular média celular (MCHC - mean cell corpuscular hemoglobin concentration).

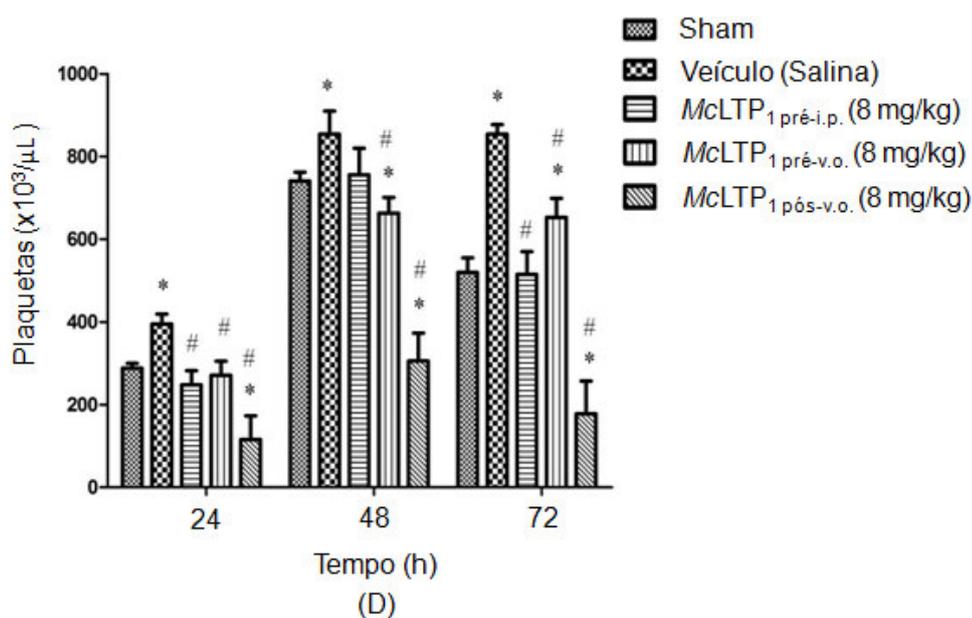
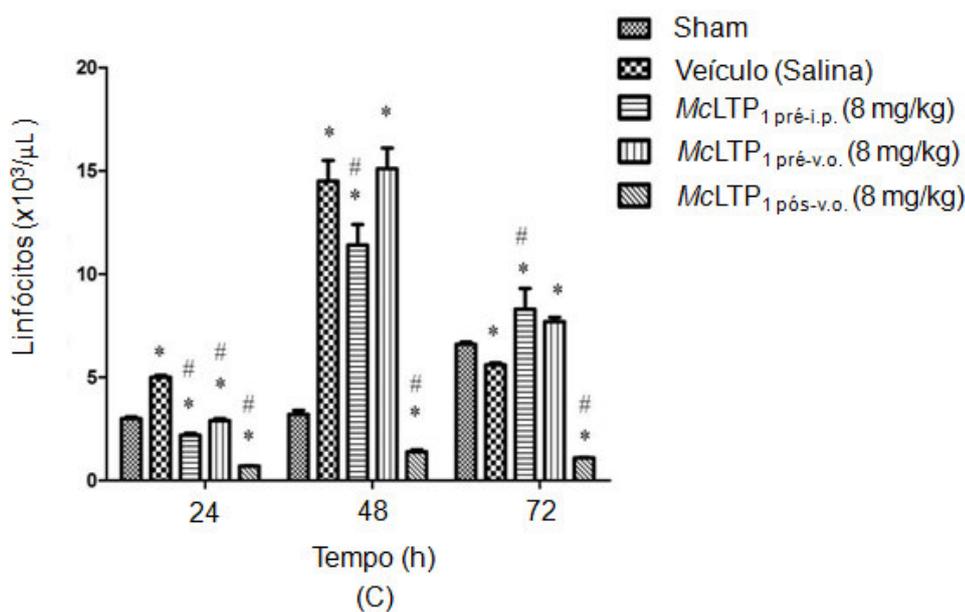
Tabela 11 - Efeito do pré-tratamento com *McLTP*₁ sobre parâmetros hematológicos dos animais com sepse induzida por CLP após 72 horas. Os animais foram pré-tratados (i.p ou v.o.) ou pós-tratado (v.o.) com *McLTP*₁ (8 mg/kg), e os parâmetros hematológicos avaliados no tempo de 72 horas. Os dados são expressos como a média (\pm DP) de cada grupo (n=6). * $p < 0,05$ v. Sham; # $p < 0,05$ v. veículo (ANOVA seguido de pós teste de Tukey).

| | Sham | Veículo | <i>McLTP</i> ₁ 8 mg/kg Pré-ip | <i>McLTP</i> ₁ 8 mg/kg Pré- v.o. | <i>McLTP</i> ₁ 8 mg/kg Pós- v.o. |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|--|---|---|
| | CLP | | | | |
| RBC ($\times 10^6 / \mu\text{L}$) | 9,10 \pm 0,93 | 7,96 \pm 0,12 | 8,14 \pm 0,93 | 9,08 \pm 0,63 | 5,66 \pm 0,58 *# |
| HGB (g/dL) | 13,9 \pm 0,34 | 13,0 \pm 0,20 | 13,6 \pm 0,92 | 15,7 \pm 0,87 *# | 11,0 \pm 0,76 *# |
| HCT (%) | 42,4 \pm 0,15 | 36,7 \pm 0,29 | 41,3 \pm 0,36 *# | 45,8 \pm 0,83 *# | 29,7 \pm 0,34 *# |
| MCV (μm^3) | 46,6 \pm 0,57 | 46,2 \pm 0,30 | 50,8 \pm 0,83 *# | 50,5 \pm 0,98 *# | 52,5 \pm 0,06 *# |
| MCH (pg) | 15,2 \pm 0,49 | 16,3 \pm 0,68 | 16,7 \pm 0,38 * | 17,2 \pm 0,63 * | 19,4 \pm 0,83 *# |
| MCHC (g/dL) | 32,7 \pm 0,35 | 35,4 \pm 0,91 | 32,9 \pm 0,83 | 34,2 \pm 0,39 *# | 37,0 \pm 0,09 *# |

Glóbulos vermelhos (RBC - red blood cells), hemoglobina (HGB - haemoglobin), hematócrito (HCT - haematocrit), volume corpuscular médio (MCV - mean corpuscular volume), hemoglobina celular média (MCH - mean cell hemoglobin), concentração de hemoglobina corpuscular média celular (MCHC - mean cell corpuscular haemoglobin concentration).

Figura 12 - Efeito de $McLTP_1$ sobre parâmetros hematológicos dos animais com sepse induzida por CLP. Os animais foram pré-tratados (i.p ou v.o.) ou pós-tratado (v.o) com $McLTP_1$ (8 mg/kg), e os parâmetros hematológicos avaliados nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os dados são expressos como a média ($\pm DP$) de cada grupo (n=6). * $p < 0,05$ v. Sham; # $p < 0,05$ v. veículo (salina). (A) quantidade de leucócitos; (B) quantidade de granulócitos; (C) quantidade de linfócitos; e (D) quantidade de plaquetas.





4.4.3 Efeito antipirético dos tratamentos profiláticos e terapêutico de McLTP_1 em animais com sepse induzida por CLP

Tratamentos profiláticos e terapêutico com McLTP_1 (8 mg/kg) apresentaram efeito antipirético em animais com sepse induzida por CLP conforme mostrado na **Tabela 12**. O grupo Sham apresentou estado de febre, após o procedimento cirúrgico, durante 36 horas com temperatura corpórea medindo $39,2 (\pm 0,2) ^\circ\text{C}$. No entanto, a temperatura, decorrido esse tempo, reduziu para $36,8 (\pm 0,1) ^\circ\text{C}$ ao final de 72 horas. Diferentemente, no grupo veículo, a manutenção do estado de febre

ocorreu em todos os dias do experimento após a cirurgia e indução da sepse, sendo aferida a temperatura de $38,2 (\pm 0,8) ^\circ\text{C}$ ao final de 72 horas. A administração de McLTP_1 (8 mg/kg) por ambas as vias intraperitoneal e oral, reduziu significativamente a temperatura corporal dos animais com sepse induzida por CLP, sendo seu efeito antipirético observado já nas primeiras 12 horas após a indução, com os animais dos grupos pré-i.p, pré-v.o. e pós-v.o. apresentando temperaturas de $35,1 (\pm 0,2) ^\circ\text{C}$, $37,8 (\pm 0,4) ^\circ\text{C}$ e $34,1 (\pm 0,1) ^\circ\text{C}$, respectivamente. A maior redução da temperatura foi observada para o grupo que recebeu doses múltiplas de McLTP_1 (8 mg/kg, v.o.) a cada 6 horas, sendo aferido ao final de 72 horas $34,0 (\pm 0,1) ^\circ\text{C}$, enquanto os animais dos grupos pré-i.p e pré-v.o. apresentaram $35,0 (\pm 0,2) ^\circ\text{C}$ e $35,5 (\pm 0,6) ^\circ\text{C}$, respectivamente.

Tabela 12 – Efeito antipirético mediado por *MclTP₁* em animais com sepse induzida por CLP. A temperatura retal dos animais foi aferida a cada 12 horas ao longo de 3 dias após a indução da sepse. Os valores são expressos como a média (\pm DP) de cada grupo (n=6). * p < 0,05 v. Sham; # p < 0,05 v. veículo (ANOVA seguido de pós teste de Tukey).

| Tratamento | Dose (mg/kg) | Temperatura retal após indução da sepse (°C) | | | | | |
|--------------------------------------|-----------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | Normal | Depois da CLP | | | | |
| | | | 12 horas | 24 horas | 36 horas | 48 horas | 72 horas |
| Sham | – | 33,2 \pm 0,3 | 39,2 \pm 0,4 | 38,2 \pm 0,1 | 39,2 \pm 0,2 | 37,8 \pm 0,1 | 36,8 \pm 0,1 |
| Veículo (salina) | – | 34,1 \pm 0,5 | 39,4 \pm 0,3 | 39,2 \pm 0,2 | 40,2 \pm 0,5 | 38,8 \pm 0,6 | 38,2 \pm 0,8 |
| <i>MclTP₁</i> pré-ip | 8 mg/kg | 33,0 \pm 0,6 | 35,1 \pm 0,2 ^{*#} | 34,1 \pm 0,6 ^{*#} | 35,1 \pm 0,7 ^{*#} | 34,0 \pm 0,4 ^{*#} | 35,0 \pm 0,2 ^{*#} |
| <i>MclTP₁</i> pré-v.o. | 8 mg/kg | 32,0 \pm 0,1 | 37,8 \pm 0,4 ^{*#} | 36,1 \pm 0,1 ^{*#} | 35,5 \pm 0,1 ^{*#} | 35,6 \pm 0,3 ^{*#} | 35,5 \pm 0,6 ^{*#} |
| <i>MclTP₁</i> pós-v.o. | 8 mg/kg | 32,0 \pm 0,5 | 34,1 \pm 0,1 ^{*#} | 33,7 \pm 0,5 ^{*#} | 34,1 \pm 0,7 ^{*#} | 34,0 \pm 0,6 ^{*#} | 34,0 \pm 0,1 ^{*#} |

5 DISCUSSÃO

As plantas têm sido exploradas pelo homem há milhares de anos, dentre os seus diversificados aspectos, por seu elevado potencial terapêutico (SILVA, R. R. *et al.*, 2013; SILVA; FERNANDES JÚNIOR, 2010). *M. citrifolia* é uma espécie vegetal, popularmente conhecida como noni, cujas propriedades farmacológicas têm sido exploradas há séculos, com potencial analgésico, anticancerígeno, anti-inflamatório, antimicrobiano, antiviral, dentre outros (SAMINATHAN *et al.*, 2013). O potencial antimicrobiano do noni tem sido identificado a partir de diversos extratos alcoólicos, de acetato de etila e aquosos de diversas partes da planta como folhas, frutos e caule, mostrando efeitos inibitórios promissores sobre o crescimento de fungos e bactérias de interesse na agricultura e na saúde humana, denotando a existência de compostos antimicrobianos da espécie vegetal em estudo (JAINKITTIVONG; BUTSARAKAMRUHA; LANGLAIS, 2009; NATHEER *et al.*, 2012; USHA; SASHIDHARAN; PALANISWAMY, 2010).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa isolou uma proteína do grupo dos Peptídeos Antimicrobianos (AMPs) das sementes do noni, pertencente à classe das proteínas transferidoras de lipídeos do tipo 1, denominada *McLTP₁*. Esta proteína tem sido bem estudada e caracterizada, sendo atribuídas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas com grande potencial para uso clínico, dado seus efeitos potentes pela via intraperitoneal e, mesmo através da administração pela via oral, evidenciando sua resistência a proteólise frente aos fluidos gástrico e intestinal, fato este comprovado *in vitro* em ensaios de digestibilidade, sendo capaz de manter-se íntegra mesmo após 5 horas em contato com pepsina, tripsina e quimiotripsina. A estabilidade frente a condições diversas de temperatura e pH também foi evidenciada para *McLTP₁*, uma vez que foi capaz de manter sua estrutura secundária quando submetida a tratamentos em condições elevadas de temperatura (95 °C) e faixas de pH em 3, 7 e 11, como observado pela manutenção de seu espectro de dicróismo circular. Estudos de estabilidade demonstraram ainda que *McLTP₁* mantém suas propriedades terapêuticas (anti-inflamatória e analgésica) inalteradas sob refrigeração, mesmo após 3 meses de armazenamento. Além disso, em ensaios de toxicidade aguda (*McLTP₁*, 80 mg/kg) e de doses repetidas (*McLTP₁*, 8 mg/kg durante 28 dias) em camundongos, a proteína não promoveu alterações em

aspectos comportamentais ou mesmo na mortalidade, bem como não alterou os parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados. Tais propriedades sinalizam favoravelmente para o uso promissor de *McLTP*₁ em investigações relacionadas a novas atividades biológicas (CAMPOS *et al.*, 2016; COSTA, 2013; LUTIF, 2015).

Diante do fato de que as proteínas transferidoras de lipídeos têm sido descritas e associadas a efeitos antimicrobianos, sem, no entanto, esta propriedade ter sido explorada *in vivo*, no presente estudo, buscou-se avaliar o potencial antibacteriano e antifúngico de *McLTP*₁ sobre espécies de interesse clínico. Além disso, buscou-se investigar, pela primeira vez nessa classe de proteínas, seu efeito protetor sobre camundongos com sepse induzida em modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP), mediante tratamentos profiláticos e terapêuticos com *McLTP*₁ (8 mg/kg) pelas vias intraperitoneal e oral.

Em um cenário de avanço da Biotecnologia, proteínas e peptídeos têm ganhado notoriedade como moléculas terapêuticas promissoras para uma variedade de doenças. Diante de sua elevada especificidade, acompanhada de baixa toxicidade às células de mamíferos *in vitro*, e promissores efeitos, tem se configurado como fortes candidatos direcionados para a prática clínica, tendo sido, inclusive descritas em um relatório na *Pharmaceutical Research e Manufacturers of America* (PhRMA - 2013) acerca de "Medicamentos Biológicos em Desenvolvimento" mais de 900 medicamentos originários de peptídeos/proteínas, dos quais 353 para o câncer e doenças relacionadas, 187 para doenças infecciosas, 69 para doenças auto-imunes e 59 para doenças cardiovasculares (CHIN *et al.*, 2012; PARK; KWAN; PARK, 2011).

As proteínas transferidoras de lipídeos, foco desse estudo, são relativamente abundantes em plantas superiores, representando cerca de 4% do total de proteínas solúveis (NG *et al.*, 2012). Elas apresentam propriedades bioquímicas bastante conservadas, como uma massa molecular de 9 kDa (tipo 1) e 7 kDa (tipo 2), bem como um ponto isoelétrico básico em torno de 9, características essas que têm sido exploradas nos processos de purificação que envolvem etapas que combinam cromatografias de exclusão molecular, troca iônica e HPLC em fase reversa (LIU *et al.*, 2015; YEATS; ROSE, 2008; KADER, 1996; FINKINA *et al.*, 2007; OOI *et al.*, 2006). No protocolo experimental proposto por Campos *et al.* (2016), a filtração em gel era a etapa cromatográfica aplicada no procedimento de purificação de *McLTP*₁, sendo na presente investigação substituída pela ultrafiltração. Tal abordagem,

embora sem envolvimento direto na redução do número de etapas experimentais, ou mesmo no rendimento proteico, conferiu maior agilidade ao seu processo de obtenção, sendo evidenciado através da capacidade de processamento da fração solúvel em TCA 2,5% por meio de vivaspín em membrana de 30 kDa em comparação à cromatografia para o armazenamento da mesma quantidade de proteína. Além disso, o processo alternativo assegurou, ao mesmo tempo, pureza similar. Costa (2013) em estudo de determinação do custo de obtenção de *McLTP₁* em escala laboratorial destaca a remoção da purificação da proteína em matriz cromatográfica e proposição de protocolos otimizados como uma estratégia de redução de custos na obtenção da proteína, sendo importante no âmbito da perspectiva de mercado do uso de *McLTP₁* para fins terapêuticos.

Após o armazenamento da proteína obtido através do protocolo modificado, foram conduzidos os ensaios da atividade antifúngica de *McLTP₁*. *McLTP₁* foi capaz de inibir particularmente o crescimento planctônico de uma única espécie de *Candida*, dentre as três testadas, apresentando um efeito inibitório de 52% sobre *Candida parapsilosis* na concentração de 25 µg/mL (2,6 µM), não sendo capaz de inibir *Candida albicans* e *Candida tropicalis* mesmo na concentração mais elevada de 400 µg/mL (42 µM). Efeitos inibitórios sobre o crescimento de espécies de fungos do gênero *Candida* foram também observados para as LTPs isoladas de sementes de *Coffea canephora* (Cc-LTP₁) e *Capsicum annuum* (Ca-LTP₁). Cc-LTP₁ inibiu o crescimento de *Candida albicans* na concentração de 400 µg/mL (aproximadamente 50% de inibição), entretanto não alterou o padrão de crescimento da espécie de *Candida tropicalis* (ZOTTICH *et al.*, 2011). Diferentemente, Ca-LTP₁ inibiu o crescimento planctônico de *Candida tropicalis* em 70% na concentração de 400 µg/mL (DIZ *et al.*, 2011)

Assim como as diversas classes de Peptídeos Antimicrobianos (AMPs), as Proteínas Transferidoras de Lipídeos têm sido investigadas por seu potencial antibacteriano e antifúngico. Essa capacidade de atuação sobre microrganismos patogênicos foi primariamente associada com seu papel biológico na defesa vegetal, sendo estudada através do padrão de expressão de genes de LTPs de plantas expostas à infecção por agentes fitopatogênicos, através da superexpressão de genes de LTPs em plantas como forma de aumentar a resistência a infecções e através da atuação *in vitro* de LTPs purificadas (DIZ *et al.*, 2011). Dentre as investigações *in vitro*, Ace-AMP₁, uma proteína transferidora de lipídeos de cebola

(*Allium cepa*), demonstrou um potente efeito antimicrobiano, sendo capaz de inibir o crescimento de 12 espécies de fungos e de 2 espécies de bactérias gram-positivas (*Bacillus megaterium* e *Sarcina lunata*) em concentrações inferiores a 10 µg/mL (Cammue *et al.*, 1995).

Tendo em vista, a notória atividade antimicrobiana exibida por Ace-AMP1, o efeito contra patógenos de plantas foi testado para LTPs purificadas de outras fontes vegetais. Uma proteína transferidora de lipídeos do tipo 2 das sementes de *Leonurus japonicus* (LjAMP2) inibiu o crescimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Botrytis maydis*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium digitatum* apresentando IC₅₀ de 5,5, 6,1, 9,3 e 40 µM, respectivamente (Yang *et al.*, 2006). Do mesmo modo, PHP, uma proteína transferidora de lipídeos de *Peganum harmala*, exibiu atividade antifúngica contra *Alternaria alternata*, *Penicillium digitatum*, *Rhizopus stolonifer* e *Magnaporthe grisea*, com IC₅₀ de 1,5, 37,5, 8,44 e 12,19 µM, respectivamente (Ma *et al.*, 2013). Lin, Xia e Ng (2007) reportaram ainda o primeiro isolamento de uma proteína transferidora de lipídeos de sementes de *Brassica campestris* com propriedades antifúngicas sobre o crescimento micelial, cujos valores de IC₅₀ de 4,5 e 8,3 µM foram encontrados para as espécies de fungos *Mycosphaerella arachidicola* e *Fusarium oxysporum*, respectivamente.

Diante das atividades antimicrobianas descritas para as LTPs contra agentes fitopatogênicos, essa classe de proteínas também vem sendo gradativamente testada contra bactérias e fungos de interesse na saúde humana (Cândido *et al.*, 2014), apesar desse potencial ainda ter sido pouco explorado. No entanto, esse interesse tem aumentado, frente aos eventos de resistência aos antimicrobianos da prática clínica, culminando com a crescente incidência de casos de doenças infecciosas em ambientes hospitalares. Em se tratando das doenças causadas por fungos, esse fenômeno, tem sido observado nos últimos 30 anos, sendo descritos principalmente acessos envolvendo o gênero *Candida* (Brown *et al.*, 2012; Cowen *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Silva, S. *et al.*, 2012). Embora *C. albicans*, predomine entre as infecções desse gênero, representando cerca de 80% dos casos, os eventos associados aos microrganismos de espécies “não-albicans”, tais como *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* têm aumentado significativamente, sendo inclusive atribuída uma resistência mais elevada entre essas espécies quando comparados com *C. albicans* (Silva, S. *et al.*, 2012). Nessas perspectivas a

prospecção de novos agentes antifúngicos, em ambos, tanto espécie de *C. albicans* como as demais do tipo não albicans, tem sido condicionada fortemente.

As propriedades antifúngicas de *McLTP*₁ foram investigadas ainda quanto a sua capacidade em inibir a formação de biofilmes. Diante de biofilmes de *Candida* spp., *McLTP*₁ não foi capaz de inibir a adesão das células na composição dos biofilmes, nem tampouco de impedir sua formação, quando testado na concentração de 50 µg/mL. Os biofilmes compreendem comunidades de microrganismos organizadas envoltas por uma matriz complexa extracelular polissacarídica que em conjunto conferem resistência à população microbiana. As etapas envolvidas na formação de biofilmes incluem a adesão das células planctônicas a uma superfície sólida, seguida do crescimento das células e expansão do biofilme (maturação), e eventual desprendimento de células para a superfície em torno do biofilme (MANAVATHU; VAZQUEZ, 2014; PENESYAN; GILLINGS; PAULSEN, 2015). Comumente associa-se a resistência aos antimicóticos conferida aos microrganismos integrantes nas comunidades em biofilmes, cerca de dez a mil vezes mais elevadas em relação às concentrações inibitórias observadas para as formas planctônicas do microrganismo, essa característica dos biofilmes, justifica a não observação do efeito antimicrobiano de *McLTP*₁, mesmo em espécies que se mostraram sensíveis a proteína em crescimento planctônico, como a cepa de *C. parapsilosis* (RAMAGE *et al.*, 2012).

No presente estudo, não foram conduzidas com profundidade investigações acerca dos mecanismos de ação dos efeitos antimicrobianos observados para *McLTP*₁. No entanto, dados reportados na literatura têm sugerido fortemente que a atividade antibacteriana e antifúngica atribuídas às LTPs está atrelada a capacidade de interação com moléculas hidrofóbicas, e, por conseguinte com membranas biológicas. Por exemplo, Shi *et al.* (2013) em abordagens *in silico* mediante estudos de “docking” e dinâmica molecular com PHL-nsLTP, uma proteína transferidora de lipídeos de *Peganum harmala* L., mostraram que essa proteína interagiu estavelmente com moléculas de ácidos graxos de 10 carbonos (ácido decanóico) a 18 carbonos (ácido oleico). Essa propriedade tem sido confirmada *in vitro* através de ensaios de permeabilização de membrana com o corante SYTOX green. Esse corante tem a habilidade de se ligar a moléculas de ácidos nucléicos e apresentar fluorescência, no entanto, ele não é capaz de atravessar membranas plasmáticas íntegras. Assim, como mostrado por Zottich *et al.* (2011) células de *Candida albicans*

expostas a tratamentos com a LTP isolada de café (*Coffea canephora* - Cc-LTP₁) apresentaram fluorescência verde, comprovando sua alteração da integridade da membrana.

Essa capacidade de interação com moléculas hidrofóbicas e que está intimamente associada à atividade de transferência de lipídeos das LTPs, tem destacado seu potencial biotecnológico para a entrega de drogas (sistemas de *drug delivery*) como estratégia alternativa na solução de problemas atrelados à permeabilidade da membrana lipídica por drogas, sendo potencialmente úteis para a indústria de medicamentos (SHI *et al.*, 2013). Além disso, outro importante aspecto a ser explorado em decorrência dessa capacidade de permeabilização de membrana é a combinação de drogas como forma de superar a resistência de microrganismos. Essa modulação do efeito de antimicrobianos também foi investigada no presente estudo, sendo observada através da potencialização do efeito de AMB na presença de McLTP₁ frente à cepa de *C. parapsilosis*, embora não tenha ocorrido o mesmo diante da combinação com ITR.

A estratégia de combinação de drogas tem se destacado como uma forma promissora de superar a resistência adquirida pelos microrganismos tornando viável o restabelecimento de sua sensibilidade às drogas antimicrobianas da prática clínica (MORA-NAVARRO *et al.*, 2015; CHOI; LEE, 2012). O fato de McLTP₁ ter sido capaz de atuar apenas em cotratamento com AMB, uma droga que atua sobre o ergosterol presente na membrana de fungos, não interagindo, contudo com ITR, droga que apresenta como alvo terapêutico uma enzima envolvida na biossíntese de ergosterol em fungos, corrobora com o efeito sobre membranas verificado para as LTPs. É possível que McLTP₁ cause uma desestabilização que poderia permitir uma maior exposição de moléculas de ergosterol para a ação da AMB, e conseqüentemente a inibição do fungo. Por outro lado, ainda que McLTP₁ assegurasse um maior influxo de ITR para o ambiente intracelular, a enzima da biossíntese de ergosterol permaneceria ainda insensível a ação de ITR, não se estabelecendo efeito de inibição mais acentuado.

O interesse no mecanismo alternativo mencionado anteriormente traduz-se também pela possibilidade de redução de efeitos colaterais já descritos para drogas usuais da clínica, como os casos de nefropatia com danos, por vezes, irreversíveis, comumente atrelados ao uso de elevadas doses de anfotericina B no cenário hospitalar (TROSKIE *et al.*, 2014). Em termos práticos, essa estratégia de interação

farmacológica de drogas antimicrobianas permite a administração de doses menores do que aquelas da rotina na prática clínica, como forma de reduzir os efeitos colaterais, mantendo-se a potencialidade das ações antimicrobianas. Dessa forma, os resultados experimentais *in vitro* sugerem em perspectiva a possibilidade de utilização de *McLTP*₁ como adjuvante no cotratamento com anfotericina B, demandando estudos em modelo animal que confirmem a natureza dessa modulação em infecção fúngica *in vivo*.

Em relação às propriedades antibacterianas de *McLTP*₁, a inibição do crescimento planctônico de bactérias de interesse clínico também foi conduzida na presente investigação. Como observado, apenas as bactérias gram-positivas foram suscetíveis à *McLTP*₁, sendo observados efeitos inibitórios de crescimento sobre *S. aureus* já a partir de 0,19 µg/mL (32% de inibição) e *S. epidermidis* em 0,78 µg/mL (18,7% de inibição), com percentuais máximos de inibição de 46,7% e de 98,8% na concentração de 800 µg/mL, respectivamente. Não foi observado efeito antibacteriano de *McLTP*₁ sobre nenhuma das espécies gram-negativas testadas (*E.coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*). Similarmente, uma LTP isolada de sementes de *Phaseolus mungo* inibiu o crescimento de *S. aureus*, não sendo capaz de atuar sobre o gram-negativo utilizado no estudo, *Salmonella typhimurium* (WANG *et al.*, 2004). Atividade antibacteriana contra bactéria gram-negativa foi descrita para uma LTP de *Pandanus amaryllifolius* que inibiu o crescimento *Pseudomonas aeruginosa*, no entanto, não foi capaz de interferir no crescimento de *S. aureus* (OOI *et al.*, 2006). Os dados observados reafirmam um aspecto bastante evidenciado na literatura de que as proteínas transferidoras de lipídeos apresentam espectro de ação sobre fungos e bactérias, em faixas de concentrações bastante variáveis (CARVALHO; GOMES, 2007).

Assim como atribuído aos fungos, sugere-se que as propriedades antibacterianas das LTPs também estejam associadas a efeitos de depleção da permeabilidade da membrana, culminando com o extravasamento de material intracelular levando a morte do microrganismo (YEATS; ROSE, 2008). Além desse mecanismo, uma vez que *McLTP*₁ demonstrou *in vitro* uma atividade inibitória de tripsina (767,10 ± 8,36 UIT/mgP) (LUTIF, 2015), é possível especular um mecanismo de ação adicional no efeito de inibição do crescimento de bactérias, uma vez que proteases como a tripsina estão envolvidas, dentre outros papéis, na captação de

nutrientes necessários no crescimento e proliferação de bactérias, constituindo-se como um potencial alvo terapêutico em bactérias (TRAVIS; POTEMPA, 2000).

O potencial antibacteriano de *McLTP₁* foi explorado ainda quanto à capacidade de inibição da formação de biofilmes bacterianos. A exposição de *McLTP₁* durante a etapa de adesão dos biofilmes de cepas de *S. aureus* acarretou uma inibição que variou de 34,5% (12,5 µg/mL) a 63,3% (800 µg/mL) para a cepa de *S. aureus* (ATCC 14458) e de 39,11% (200 µg/mL) a 73,6% (400 µg/mL) para a cepa de *S. aureus* (ATCC 6538P).

Tal como descrito para os fungos de importância na saúde humana, atualmente, a busca incessante por novos agentes terapêuticos também está atrelada, ao aumento da resistência de bactérias aos antibióticos de rotina na prática clínica (HOGBERG; HEDDINI; CARS, 2010). Esse fenômeno tem preocupado as populações mundiais em virtude das elevadas taxas de morbidade e mortalidade associada, e os elevados custos gerados nos tratamentos aos pacientes (HOEFLER *et al.*, 2006; TROSKIE, *et al.*, 2014; ARIAS; MURRAY, 2015). Essa preocupação tem se elevado, uma vez que nas últimas duas décadas estudos têm apontado com frequência cada vez maior a presença de biofilmes microbianos no cenário clínico (MANAVATHU; VAZQUEZ, 2014).

S. aureus é um patógeno versátil e virulento altamente envolvido em infecções hospitalares, sendo comumente associado a cepas produtoras de biofilmes, as quais são difíceis de combater, conduzindo à bacteremias e infecções metastáticas, associada à alta morbidade. Reduções na capacidade de formação de biofilmes pelos estafilococos representam uma diminuição da virulência por parte dessas bactérias, propiciando uma maior susceptibilidade às defesas do organismo e aos antimicrobianos (COREY, 2009; LI *et al.*, 2005; YARWOOD; SCHLIEVERT, 2003), apontando para mais uma das potencialidades antimicrobianas observadas para *McLTP₁*.

Nos ensaios de interação farmacológica sobre bactérias, *McLTP₁* foi capaz de modular os efeitos do antibiótico oxacilina contra cepas de *Staphylococcus* spp., não sendo evidenciada interação no cotratamento com a gentamicina. Tratamentos em infecções bacterianas envolvendo a utilização de um único antibiótico têm conduzido a seleção de cepas resistentes, e a aquisição de mecanismos envolvidos com a resistência, sendo comumente acompanhado de ineficiência na cura das doenças (ARIAS; MURRAY, 2015; CHOI; LEE, 2012; TROSKIE, *et al.*, 2014). Nesse contexto,

como forma de superar essa problemática, tem-se adotado a estratégia de combinação de drogas. Essa abordagem conduz ao aumento do espectro de ação contra bactérias, comparado ao tratamento com um único antibiótico, bem como a redução das dosagens de drogas e a duração do tratamento, diminuindo a pressão seletiva sobre as bactérias reduzindo as chances do surgimento de cepas resistentes (CHOI; LEE, 2012; SILVA *et al.*, 2015). O efeito modulador de *McLTP₁* sobre antimicóticos e antibióticos, é apresentado de forma pioneira neste trabalho, destacando ainda mais o potencial antimicrobiano dessa classe de proteínas, sinalizando sua aplicação como candidato terapêutico sobre doenças infecciosas.

De maneira igualmente inédita, demonstrou-se que *McLTP₁* tem a capacidade de reduzir a atividade da catalase e coagulase em *Staphylococcus* spp., sugerindo seu potencial terapêutico na intervenção em patogenias mediadas por bactérias desse gênero. A atuação de um microrganismo durante o processo infeccioso em um hospedeiro envolve diferentes estágios os quais são associados a produção de múltiplos fatores de virulência que condicionam a patofisiologia da doença (GEMMELL; FORD, 2002; UPADHYAY *et al.*, 2014). Em se tratando de *Staphylococcus* spp. o repertório de fatores de virulência é bastante diversificado, incluindo proteínas que auxiliam a adesão e invasão, como a coagulase; fatores de superfície que previnem a fagocitose por células de defesa do hospedeiro, ou que aumentam a sobrevivência no interior desses fagócitos, como a catalase e, toxinas que levam a danos em células do hospedeiro, como hemolisina e DNase (ANACARSO *et al.*, 2013; GEMMELL; FORD, 2002). A atenuação desses fatores de virulência representa uma das maneiras de intervenção terapêutica no controle de infecções no homem (UPADHYAY *et al.*, 2014).

Além das atividades antimicrobianas, nesse estudo foi avaliado o efeito protetor de *McLTP₁* em modelo experimental de sepse severa. A sepse é descrita como uma síndrome complexa associada a um quadro desregulado do sistema imune do hospedeiro em resposta a uma infecção, sendo envolvidos pelo menos um dos sinais clínicos que incluem hipertermia (> 38°C) ou hipotermia (> 36°C), elevação da frequência cardíaca (> 90 batimentos), aceleração do ritmo respiratório (taquipneia), leucocitose ou leucopenia, ou ainda quantidade normal de leucócitos com 10% na forma imatura (CAWCUTT; PETERS, 2014; COHEN, 2002). Na sepse severa, além dos sintomas descritos para a sepse, é atribuído ainda evento de disfunção de órgãos. No âmbito hospitalar, entre os casos de sepse e sepse severa

estima-se um percentual de óbitos em torno de 10 – 20% e 20 – 50%, respectivamente (MARTIN, 2012).

Como forma de estudar o efeito protetor de $McLTP_1$ na sepse severa, foi utilizado o modelo experimental de Ligadura e Perfuração do Ceco (Cecal Ligation and Puncture, “CLP”), que tem sido explorado há mais de 30 anos em estudos relacionados a patofisiologia da sepse, sendo considerado por muitos pesquisadores o “padrão de ouro” dentre os modelos de indução de sepse, e o que mais se aproxima da síndrome em humanos (YUN; LEE; LEE, 2009; WICHTERMANN; BAUE; CHAUDRY, 1980; ZANOTTI-CAVAZZONI; GOLDFARB, 2009).

Nos casos de sepse, a brevidade e adequação do tratamento contra o agente infeccioso são fundamentais na terapia anti-sepse. Estima-se que para cada hora de atraso no recebimento do antimicrobiano, o risco de morte do paciente aumenta em cerca de 10% (MARTIN 2012). Considerando esse aspecto, a etapa inicial do efeito protetor de $McLTP_1$ consistiu na determinação do protocolo experimental de administração da proteína, sendo delimitados tratamentos profiláticos, por ambas as vias intraperitoneal e oral com $McLTP_1$ na dose de 8 mg/kg com a aplicação de uma única dose antes da indução da sepse, para averiguar seu potencial preventivo. Contudo, essas estratégias não simulam a realidade do ponto de vista da prática clínica, sendo, portanto, adotado também o tratamento terapêutico com $McLTP_1$ na dose de 8 mg/kg por via oral, em intervalos de 6 horas. A proposição dos tratamentos com $McLTP_1$ na sepse, foi conduzida com base no trabalho de Campos *et al.* (2016) que relataram, de forma pioneira, as atividades anti-inflamatória e analgésica mediada por $McLTP_1$ estabelecendo a dose terapêutica de 8 mg/kg por ambas as vias oral e intraperitoneal, sendo atualmente estudados os mecanismos imunomoduladores envolvidos nessas respostas.

No modelo de sepse induzida por CLP em camundongos, os grupos pré-tratados (i.p ou v.o.) ou pós-tratados (v.o.) com $McLTP_1$ (8 mg/kg) apresentaram um percentual de sobrevivência de 100%, similar aquele observado para o grupo Sham, enquanto no grupo controle que recebeu salina esse percentual foi de apenas 17% ao final do experimento. De modo similar, o efeito protetor de $McLTP_1$ foi observado quanto aos pesos corpóreos dos animais pré-tratados e pós-tratados com a proteína, sendo capaz de manterem-se estatisticamente iguais ao grupo Sham, sendo observada perda de peso apenas no grupo controle (salina). Além disso, não foi observada redução do peso fresco relativo dos órgãos (rins, coração, pulmões e

fígado) dos animais com sepse pré-tratados ou pós-tratados com a proteína, corroborando ainda mais com o efeito protetor de *McLTP*₁.

Diante da complexidade clínica do quadro de sepse, pesquisadores têm se dedicado profundamente ao estudo da evolução patofisiológica da síndrome, sendo descrito o desequilíbrio da resposta humoral, principalmente pelo desbalanço dos mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. Dentre os mediadores pró-inflamatórios, a superexpressão de TNF- α (Fator de Necrose Tumoral), IL-1, IL-6 e IL-8 tem sido fortemente associada aos efeitos danosos observados na sepse. A liberação exacerbada desses mediadores refletem no comprometimento do combate ao agente infeccioso, em imunossupressão, e conseqüentemente maior susceptibilidade às infecções secundárias, danos teciduais, e finalmente falha no funcionamento de órgãos, culminando com o óbito do paciente (AMERSFOORT; BERKEL; KUIPER, 2003; SAGY; AL-QAQAA; KIM, 2013). No modelo de CLP, a elevada mortalidade dos animais com sepse, é acompanhada da redução do peso corpóreo dos animais em decorrência do estresse metabólico primariamente associado com o procedimento cirúrgico, e posteriormente pelo subsequente quadro de infecção sistêmica (ISKANDER et al., 2013). Campos *et al.* (2016) mostraram em modelos clássicos de inflamação, o efeito imunomodulador de *McLTP*₁, a qual foi capaz de reduzir significativamente os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6, por ambas as vias intraperitoneal e oral. É possível que a homeostase na síntese desses mediadores pró-inflamatórios possa estar envolvida na proteção dos animais por *McLTP*₁.

Quanto aos parâmetros hematológicos, os animais do grupo controle (salina) apresentaram uma elevação nas quantidades de leucócitos no sangue (leucocitose), sintoma por vezes presente durante a sepse. No entanto, esse quadro foi revertido, nos grupos de animais que receberam pré-tratamento (ip. e v.o.) e pós-tratamento (v.o) com *McLTP*₁ (8 mg/kg), sendo observado o efeito mais potente através do tratamento terapêutico com a proteína pela via oral.

As proteínas transferidoras de lipídeos são notavelmente reconhecidas por sua estrutura tridimensional compacta e estável, frente à presença de 4 pontes dissulfeto formadas pelos motivos de cisteínas ao longo da estrutura primária, conferindo resistência à proteólise a essa classe de proteínas (JAECKELS *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2013). De fato *McLTP*₁, mostrou-se estável mesmo após contato por cinco horas com pepsina, quimiotripsina e tripsina, ratificando sua resistência à

proteólise, justificando a capacidade de apresentar seu efeito através da via oral (CAMPOS *et al.*, 2016; COSTA, 2013).

Nos modelos experimentais de sepse, simultaneamente à produção das citocinas pró-inflamatórias, ocorre a síntese das citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-10, IL-4 e fator transformante de crescimento (TGF). Em se tratando da citocina IL-10, ela atua inibindo a produção de TNF- α (SCHULTE; BERNHAGEM; BUCALA, 2013). Estudos do mecanismo anti-inflamatório de *McLTP₁* têm mostrado uma associação do seu efeito, além da redução de citocinas pró-inflamatórias, com o aumento da síntese de IL-10, ratificando a contribuição desta proteína na modulação da liberação exacerbada de mediadores pró-inflamatórios, conferindo seu efeito protetor sobre os animais com sepse.

O efeito protetor mediado por *McLTP₁* foi observado ainda através do seu potencial antipirético como observado através da regulação da temperatura corporal evidenciada para todos os grupos tratados com a proteína, desde as horas iniciais após a indução da sepse, sendo, mais uma vez, atribuído um efeito mais potente através do pós-tratamento com *McLTP₁* oralmente. Assim, uma vez que as citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6 estão envolvidas, dentre outros aspectos fisiológicos, no processo de indução de febre no organismo (SCHULTE; BERNHAGEM; BUCALA, 2013), sugere-se fortemente que o efeito modulador de *McLTP₁* sobre os três mediadores pró-inflamatórios anteriormente citados, deve estar envolvido na regulação da temperatura corpórea dos animais com sepse induzida por CLP, corroborando com seu potencial antipirético.

Apesar do potencial contra sepse de *McLTP₁* não ter sido explorado com maior profundidade, as propriedades antimicrobianas juntamente com o efeito protetor evidenciado para *McLTP₁* no modelo experimental de sepse, a direciona como uma promissora candidata terapêutica nessa síndrome, haja vista bactérias gram-positivas, inclusive do gênero *Staphylococcus*, serem cada vez mais associadas nos quadros de sepse. Do mesmo modo, casos de candidemia também têm sido relatados em pacientes na fase de imunossupressão da sepse, quando estão mais suscetíveis a infecções secundárias, sinalizando uma possível intervenção com *McLTP₁*, através de seus mecanismos que envolvem a ação direta sobre o microrganismo, bem como através de sua modulação na inflamação.

Em suma, diante dos resultados promissores evidenciados para *McLTP₁* na redução da atividade de fatores de virulência bacterianos, bem como no seu

cotratamento com antimicrobianos, estudos adicionais são necessários a fim de avaliar a relevância clínica *in vivo* dessa interação farmacológica experimentada por *McLTP*₁ e anfotericina/oxacilina, e na atenuação da virulência de infecções por *Staphylococcus* spp. em abordagens mais detalhadas. Além da natureza anti-inflamatória e analgésica descrita anteriormente para *McLTP*₁, o presente estudo abre a perspectiva do uso terapêutico dessa proteína no tratamento da sepse.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados demonstrados no presente estudo, foi possível estabelecer um protocolo modificado para o isolamento de *McLTP₁*, que embora não tenha reduzido o número de etapas ou alterado seu rendimento, conferiu uma pureza similar e maior velocidade em sua purificação, mediante a substituição do passo cromatográfico de exclusão molecular por uma etapa de ultrafiltração.

Essa investigação permitiu expandir os efeitos antimicrobianos observados para as Proteínas Transferidoras de Lipídeos, uma vez que *McLTP₁* foi capaz de interferir, não somente isoladamente, como também em sinergismo com drogas antimicrobianas da prática clínica sobre o crescimento planctônico de fungos e bactérias patógenos do homem. Este fato aponta favoravelmente para a investigação em estudos *in vivo* da relevância clínica dessa interação. Além disso, particularmente para bactérias, esta proteína foi capaz de inibir fatores de virulência (formação de biofilme, atividade de catalase e coagulase) de *Staphylococcus* spp. importantes no estabelecimento de infecções.

Em modelo de infecção sistêmica *in vivo*, *McLTP₁* aumentou a sobrevivência de camundongos com sepse através de tratamentos profiláticos pelas via intraperitoneal e oral, bem como através de tratamento terapêutico pela via oral, fatos estes inéditos para essa classe de proteínas em resposta a sepse, aliando seu potencial anti-inflamatório, anteriormente identificado, e seu potencial antimicrobiano, abrindo perspectiva do uso terapêutico dessa proteína no tratamento da sepse.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica. 9ª ed. Brasília: ANVISA, 2013, 149p.
- ALSAEED, A. K. Z. Review of studies on biological activities and medical use of *Morinda citrifolia* (noni). **International Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 4, p. 99 – 108, 2013.
- AMERSFOORT, E. S. V.; BERKEL, T. J. C. V.; KUIPER, J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. **Clinical Microbiology Review**, v. 16, n. 3, p. 379 – 414, 2003.
- AMINOV, R. I.. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology** | Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy, v. 1, p. 1 – 7, 2010.
- ANACARSO, I.; CONDÒ, C.; SABIA, C.; MESSI, P.; NIEDERHAUSERN, S. de; BONDI, M.; ISEPPI, R.. Antimicrobial Resistance and Other Related Virulence Factors in *Staphylococcus* Spp isolated from Food, Environmental and Humans in Italy. **Universal Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 1, p. 1 - 9, 2013.
- ANDERSON, J. B.. Evolution of Antifungal Drug Resistance: Mechanisms And Pathogen Fitness. **NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY**, v. 3, p. 547 – 556, 2005.
- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E.. A New Antibiotic and the Evolution of Resistance. **The New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 12, p. 1168 – 1170, 2015.
- ARNOLD, T. M.; DOTSON, E.; SAROSI, G. A.; HAGE, C. A. Traditional and emerging antifungal therapies. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 7, p. 222-228, 2010.
- ASSI, R. A.; DARWIS, Y.; ABDULBAQI, I. M.; KHAN, A. A.; VUANGHAO, L.; LAGHARI, M. H.. *Morinda citrifolia* (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials, **Arabian Journal of Chemistry**, v. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.06.018> (In press), 2015.
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G.. Coagulase-Negative Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870 – 926, 2014.
- BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 159 -172, 2004.
- BOUTROT, F.; CHANTRET, N.; GAUTIER, M.-F.. Genome-wide analysis of the rice and arabidopsis *non-specific lipid transfer protein (nsLtp)* gene families and

identification of wheat *nsLtp* genes by EST data mining. **BMC Genomics**, v. 9, p. 86 - 105, 2008.

BOUTROT, F.; GUIRAO, A.; ALARY, R.; JOUDRIER, P.; GAUTIER, M.-F.. Wheat non-specific lipid transfer protein genes display a complex pattern of expression in developing seeds. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1730, p. 114 – 125, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.722, p. 248-254, 1976.

BRILHANTE, R. S. N.; FECHINE, M. A. B.; MESQUITA, J. R. L.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; MONTEIRO, A. J.; LIMA, R. A. C.; CAETANO, E. P.; PEREIRA, J. F.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. Histoplasmosis in HIV-positive patients in Ceará, Brazil: clinical-laboratory aspects and in vitro antifungal susceptibility of *Histoplasma capsulatum* isolates. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 484 - 488, 2012.

BROWN, A. C.. Anticancer Activity of *Morinda citrifolia* (Noni) Fruit: A Review. **Phytotherapy Research**, v. 26, p. 1427 – 1440, 2012.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C.. 2012. Hidden killers: Human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 1 – 10, 2012.

CAMMUE, B. P.; THEVISSSEN, K.; HENDRIKS, M.; EGGERMONT, K.; GODERIS, I. J.; PROOST, P.; VAN DAMME, J.; OSBORN, R. W.; GUERBETTE, F.; KADER, J. C. A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 445 – 455, 1995.

CAMPOS, D. C. O.; COSTA, A. S.; LIMA, A. D. R.; SILVA, F. D. A.; LOBO M. D. P.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MOREIRA, R. A.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, H. D. First isolation and antinociceptive activity of a thermostable lipid transfer protein from Noni (*Morinda citrifolia* L.) seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 71 - 79, 2016.

CÂNDIDO, E. de S.; CARDOSO, M. H. e S.; SOUSA, D. A.; VIANA, J. C.; OLIVEIRA-JÚNIOR, N. G. de; MIRANDA, V.; FRANCO, O. L.. The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. **Peptides**, v. 55, p. 65 – 78, 2014.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 19, n. 2, p. 130-139, 2006.

CARVALHO, A. O.; GOMES, V. M. Role of plant lipid transfer proteins in plant physiology – a concise review. **Peptides**, v. 28, p. 1144–1153, 2007.

CAWCUTT, K. A.; PETERS, S. G.. Severe Sepsis and Septic Shock: Clinical Overview and Update on Management. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 89, n. 11, p. 1572 – 1578, 2014.

CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; PEREZ, A. M.; REYNES, M.; BRILLOUET, J. M.; BRAT, P. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 645-654, 2006.

CHAPMAN, S. W.; SULLIVAN, D. C.; CLEARY, J. D. In search of the holy grail of antifungal therapy. **Transactions of The American Clinical and Climatological Association**, v. 119, p. 197-216, 2008.

CHEN, S. C. A.; SLAVIN, M. A.; SORRELL, T. C. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. **Drugs**, v. 71, n. 1, p. 11-41, 2011.

CHERIFI, S.; BYL, B.; DEPLANO, A.; NONHOFF, C.; DENIS, O.; HALLIN, M.. Comparative epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter-related bacteremia and from healthy volunteers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1541 – 1547, 2013.

CHIN, J.; MAHMUD, K. A. F.; KIM, S. E.; PARK, K.; BYUN, Y. Insight of current technologies for oral delivery of proteins and peptides. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 9, p. 105-112, 2012.

CHOI, H.; LEE, D. G.. Synergistic effect of antimicrobial peptide arenicin-1 in combination with antibiotics against pathogenic bacteria. **Research in microbiology**, v. 163, p. 479 – 486, 2012.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E.. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. **Antibiotics in laboratory medicine**, v. 3, p. 739 - 787, 1991.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement. CLSI M07-A8**. Wayne, Pennsylvania, USA, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved Standard, 3^a ed. M27-A3. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.

COATES, A.; HU, Y.; BAX, R.; PAGE, C.. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. **NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY**, v. 1, p. 895 – 910, 2002.

COHEN, J.. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, p. 885 – 891, 2002.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA**. Brasília:DF, 2013.

CORDEIRO, R. de A.; SERPA, R.; ALEXANDRE, C. F. U.; MARQUES, F. J. de F.; MELO, C. V. S. de; FRANCO, J. da S.; EVANGELISTA, A. J. de J.; CAMARGO, Z. P. de; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; MOREIRA, J. L. B.; BANDEIRA, T. de J. P. G.; SIDRIM, J. J. C.. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 1277-1286, 2015.

COREY, G. R.. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: definitions and treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 254 – 263, 2009.

CORREIA, A. A. S.; GONZAGA, M. L. C.; AQUINO, A. C.; SOUZA, P. H. M.; FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A. Caracterização química e físico-química da polpa do noni (*Morinda citrifolia*) cultivado no estado do Ceará. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 4, p. 609-615, 2011.

COSTA, A. S. **Testes de estabilidade e de segurança farmacológica de uma proteína isolada de sementes de *Morinda citrifolia* l.: bases para a produção de um fármaco contra a inflamação e a dor.** 2013. Monografia (Graduação em Biotecnologia), Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

COWEN, L. E.; SANGLARD, D.; HOWARD, S. J.; ROGERS, P. D.; PERLIN, D. S.. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. doi: 10.1101/cshperspect.a019752, 2014.

DENG, S.; PALU, A. K.; WEST, B. J.; SU, C. X.; ZHOU, B.-N.; JENSEN, J. C.. Lipoxygenase Inhibitory Constituents of the Fruits of Noni (*Morinda citrifolia*) Collected in Tahiti. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 5, p. 859-862, 2007.

DESAI, J. V.; MITCHELL, A. P.; ANDES, D. R.. Fungal Biofilms, Drug Resistance, and Recurrent Infection. **Cold Spring Harbor Perspectives Medicine**, v. doi: 10.1101/cshperspect.a019729, p. 1 – 18, 2014.

DEUTSCHMAN, C. S.; TRACEY, K. J.. Sepsis: Current Dogma and New Perspectives. **Immunity**, v. 40, n. 4, p. 463 - 475, 2014.

DIXON, A.R.; MCMILLEN, H.; ETKIN, N.L.; Ferment this: the transformation of Noni, a traditional Polynesian medicine (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae). **Ecological Botony**, v. 53, p. 51– 68, 1999.

DIZ, M. S., CARVALHO, A. O.; RIBEIRO, S. F. F.; CUNHA, M. da; BELTRAMINI, L.; RODRIGUES, R.; NASCIMENTO, V. V.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M.. Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel α -amylase inhibitory properties. **Physiologia Plantarum**, v. 142, p. 233 – 246, 2011.

DORA, C. L.; SOUZA, L. C.. Novas formas comerciais de Anfotericina B. **Revista de Ciências Médicas**, v. 14, n. 2, p. 187 – 197, 2005.

- DOSLER, S.; KARAASLAN, E.. Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. **Peptides**, v. 62, p. 32 – 37, 2014.
- EDSTAM, M. M.; VIITANEN, L.; SALMINEN, T. A.; EDQVIST, J.. Evolutionary History of the Non-Specific Lipid Transfer Proteins. **Molecular Plant**, v. doi: 10.1093/mp/ssr019, p. 1 – 18, 2011.
- EL-AZIZI, M.; FARAG, N.; KHARDORI, N.. Antifungal activity of amphotericin B and voriconazole against the biofilms and biofilm-dispersed cells of *Candida albicans* employing a newly developed in vitro pharmacokinetic model. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 14, n. 21, p. 1 – 9, 2015.
- EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. **Clinical Microbiology Journal**, v. 9, n. 8, p. 1 -7, 2003.
- FAUCI, A. S.; MORENS, D. M.. The Perpetual Challenge of Infectious Diseases. **The new england journal of medicine**, v. 366, p. 454 - 461, 2012.
- FINK, M. P.; WARREN, H. S.. Strategies to improve drug development for sepsis. **Nature Reviews - Drug Discovery**, v. 13, p. 741 – 758, 2014.
- FINKINA, E. I.; BALANDIN, S. V.; SEREBRYAKOVA, M. V.; POTAPENKO, N. A.; TAGAEV, A. A.; OVCHINNIKOVA, T. V.. Purification and Primary Structure of Novel Lipid Transfer Proteins from Germinated Lentil (*Lens culinaris*) Seeds. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 4, p. 430 - 438, 2007.
- FJELL, C. D.; HISS, J. A.; HANCOCK, R. E. W.; SCHNEIDER, G.. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews - Drug Discovery**, v. 11, p. 37 – 51, 2012.
- FRANÇA, H. J. **Proteínas de Sementes de *Morinda citrifolia* L.: Caracterização Bioquímica e Avaliação do seu Potencial Biotecnológico**. 2013. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- FRANCO, O. L.; MURAD, A. M.; LEITE, J. R.; MENDES, P. A.; PRATES, M. V.; BLOCH, C.. Identification of a cowpea gamma-thionin with bactericidal activity. **The FEBS Journal**, v. 273, p. 3489 – 3497, 2006.
- GAMES, P. D.; SANTOS, I. S. dos; MELLO, É. O.; DIZ, M. S. S.; CARVALHO, A. O.; SOUZA-FILHO, G. A. de; CUNHA, M. da; VASCONCELOS, I. M.; FERREIRA, B. dos S.; GOMES, V. M.. Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Peptides**, v. 29, p. 2090 – 2100, 2008.
- GEMMELL, C. G.; FORD, C. W.. Virulence factor expression by Gram-positive cocci exposed to subinhibitory concentrations of linezolid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 665 – 672, 2002.

GIRAULT, T.; FRANÇOIS, J.; ROGNIAUX, H.; PASCAL, S.; DELROT, S.; COUTOS-THÉVENOT, P.; GOMÈS, E.. Exogenous application of a lipid transfer protein-jasmonic acid complex induces protection of grapevine towards infection by *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 140 – 149, 2008.

GIZATULLINA, A. K.; FINKINA, E. I.; MINEEV, K. S.; MELNIKOVA, D. N.; BOGDANOV, I. V.; TELEZHINSKAYA, I. N.; BALANDIN, S. V.; SHENKAREV, Z. O. ; ARSENIEV, A. S.; OVCHINNIKOVA, T. V. Recombinant production and solution structure of lipid transfer protein from lentil *Lens culinaris*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 439, p. 427–432, 2013.

HAAGENSEN, J. A. J.; VEROTTA, D.; HUANG, L.; SPORMANN, A.; YANG, K.. New *In Vitro* Model To Study the Effect of Human Simulated Antibiotic Concentrations on Bacterial Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 4074 – 4081, 2015.

HAMMAMI, R.; HAMIDA, J. B.; VERGOTEN, G.; FLISS, I.. PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 963 – 968, 2009.

HOEFLER, R.; VIDOTTI, C. C. F.; MENEZES, E. S. de; PINHEIRO, S.. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. **BOLETIM FARMACOTERAPÊUTICA**, ano XI, n. 04, p. 1 – 6, 2006.

HOGBERG, L. D.; HEDDINI, A.; CARS, O.. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, n. 11, 2010.

HØIBY, N.; CIOFU, O.; JOHANSEN, H. K.; SONG, Z. J.; MOSER, C.; JENSEN, P. Ø.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T.; BJARNSHOLT, T.. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Science**, v. 3, p. 55 – 65, 2011.

ISKANDER, K. N.; OSUCHOWSKI, M. F.; STEARNS-KUROSAWA, D. J.; KUROSAWA, S.; STEPIEN, D.; VALENTINE, C.; REMICK, D. G.. Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. **Physiological Reviews**, v. 93, p. 1247 – 1288, 2013.

JAECKELS, N.; TENZER, S.; ROSFA, S.; SCHILD, H.; DECKER, H.; WIGAND, P.. Purification and structural characterisation of lipid transfer protein from red wine and grapes. **Food Chemistry**, v. 138, p. 263 – 269, 2013.

JAINKITTIVONG, A.; BUTSARAKAMRUHA, T.; LANGLAIS, R. P.. Antifungal activity of *Morinda citrifolia* fruit extract against *Candida albicans*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.108, p. 394 – 398, 2009.

JIANG, Y.; FU, X.; WEN, M.; WANG, F.; TANG, Q.; TIAN, Q.; LUO, K. Overexpression of an nsLTPs-like antimicrobial protein gene (LJAMP₂) from

motherwort (*Leonurus japonicus*) enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* oil seed rape (*Brassica napus*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 82, p. 81-87, 2013.

JIA, Z.; GOU, J.; SUN, Y.; YUAN, L.; TANG, Q.; YANG, X.; PEI, Y.; LUO, K.. Enhanced resistance to fungal pathogens in transgenic *Populus tomentosa* Carr. by overexpression of an nsLTP-like antimicrobial protein gene from motherwort (*Leonurus japonicus*). **Tree Physiology**, v. 30, p. 1599 – 1605, 2010.

JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNERO, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p.693-715, 2004.

JOO, H.-S.; OTTO, M.. Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1848, p. 3055 – 3061, 2015.

JUNG, H. W.; KIM, W.; HWANG, B. K.. Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 915 – 928, 2003.

KADER, J. C. Lipid-transfer protein in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 627-654, 1996.

KARDOS, N.; DEMAINE, A. L.. Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 92, p. 677 – 687, 2011.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE, A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R. P.; MUKTA, M. S.; GADHWE, S.. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 5678 – 5698, 2012.

KAYE, K. S.; POGUE, J. M.. Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management. **Pharmacotherapy**, v. 35, n. 10, p. 949 – 962, 2015.

KOVENDAN, K.; MURUGAN, K.; SHANTHAKUMAR, S. P.; VINCENT, S.; HWANG, JIANG-SHIU. Larvicidal activity of *Morinda citrifolia* L. (Noni) (Family: Rubiaceae) leaf extract against *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, and *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, v. 111, p. 1481–1490, 2012.

KUMAR, K. T.; PANDA, D. S.; NANDA, U. N.; KHUNTIA, S.. Evaluation of Antibacterial, Antifungal and Anthelmintic Activity of *Morinda citrifolia* L. (Noni). **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 2, p. 1030 – 1032, 2010.

KUMAR, S.; SINGH, B. R.. An Overview of Mechanisms and Emergence of Antimicrobials Drug Resistance. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 1, n. 2 especial, p. 7 – 14, 2013.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARRU, B.; ZAOUTIS, T. E. Newer antifungal agents. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 25, p. 110-115, 2013.

LEWIS, K.. Platforms for antibiotic discovery. **NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY**, v. 12, p. 371 – 387, 2013.

LI, H.; XU, L.; WANG, J.; WEN, Y.; VUONG, Y.; OTTO, M.; GAO, Q.. Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the ica locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. **Infection and immunity**, v. 73, n. 5, p. 3188-3191, 2005.

LI, J.; GAO, G.; XU, K.; CHEN, B.; YAN, G.; LI, F.; QIAO, J.; ZHANG, T.; WU, X.. Genome-wide survey and expression analysis of the putative non-specific lipid transfer proteins in *Brassica rapa* L. **PLoS One**, v. 9, n. 1, 2014.

LI, X. Z.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H.. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 337 – 418, 2015.

LIN, P.; XIA, L.; NG, T. B.. First isolation of an antifungal lipid transfer protein from seeds of a Brassica species. **Peptides**, v. 28, p. 1514 -1519, 2007.

LIU, F.; ZHANG, X.; LU, C.; ZENG, X.; LI, Y.; FU, D.; WU, G.. Non-specific lipid transfer proteins in plants: presenting new advances and an integrated functional analysis. **Journal of Experimental Botany**, v. doi:10.1093/jxb/erv313, p. 2 – 19, 2015.

LIU, S.; HOU, Y.; CHEN, X.; GAO, Y.; Li, H.; SUN, S.. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: A promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, p. 395 – 402, 2014.

LIU, W.; HUANG, D.; LIU, K.; HU, S.; YU, J.; GAO, G.; SONG, S.. Discovery, Identification and Comparative analysis of non-specific lipid transfer protein (nsltp) family in Solanaceae. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 8, p. 229 – 237, 2010.

LOS, F. C. O.; RANDIS, T. M.; AROIAN, R. V.; RATNER, A. J.. Role of Pore-Forming Toxins in Bacterial Infectious Diseases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 2, p. 173 – 207, 2013.

LUM, K. Y.; TAY, S. T.; LE, C. F.; LEE, V. S.; SABRI, N. H.; VELAYUTHAN, R. D.; HASSAN, H.; SEKARAN, S. D.. Activity of Novel Synthetic Peptides against *Candida albicans*. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1 -12, 2015.

LU, Q.; EGGIMANN, P.; LUYT, C.-E.; WOLFF, M.; TAMM, M.; FRANÇOIS, B.; MERCIER, E.; GARBINO, J.; LATERRÉ, P.-F.; KOCH, H.; GAFNER, V.; RUDOLF, M. P.; MUS, E.; PEREZ, A.; LAZAR, H.; CHASTRE, J.; ROUBY, J.-J.. *Pseudomonas*

aeruginosa serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. **Critical Care**, v. 18, p. 1 – 9, 2014.

LUMBRERAS, C.; LIZASOAIN, M.; AGUADO, J. M. Antifúngicos de uso sistémico. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 21, n. 7, p. 366-380, 2003.

LUTIF, C. C. **Caracterização bioquímica e avaliação das atividades citotóxica e alergênica de uma proteína transferidora de lipídeos isolada de sementes de *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

LV, L.; CHEN, H.; HO, C.-T.; SANG, S.. Chemical components of the roots of Noni (*Morinda citrifolia*) and their cytotoxic effects. **Fitoterapia**, v. 82, p. 704 – 708, 2011.

MA, X.; LIU, D.; TANG, H.; WANG, Y.; WU, T.; LI, Y.; YANG, J.; YANG, J.; SUN, S.; ZHANG, F.. Purification and characterization of a novel antifungal protein with antiproliferation and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities from *Peganum harmala* seeds. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 45, n. 2, p. 87 – 94, 2013.

MANAVATHU, E. K.; VAZQUEZ, J. A.. Biofilms: emerging importance in infectious diseases. **Journal of Multidisciplinary Pathology**, v. 1, n. 2, p. 1 – 13, 2014.

MARSHALL, J. C.. Why have clinical trials in sepsis failed? **Trends in molecular medicine**, v. 20, n. 4, p. 195 – 203, 2014.

MARION, D.; BAKAN, B.; ELMORJANI, K.. Plant lipid binding proteins: Properties and applications. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 195–197, 2007.

MARTIN, G. S.. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 10, n. 6, p. 701 – 706, 2012.

MARTIROSOV, D. M.; LODISE, T. P.. Emerging trends in epidemiology and management of infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.008 (in press), 2015.

McCLATCHEY, W. From Polynesian Healers to Health Food Stores: Changing Perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). **Integrative Cancer Therapies**, v. 1, n. 2, p. 110 – 120, 2002.

MORA-NAVARRO, C.; CARABALLO-LEÓN, J.; TORRES-LUGO, M.; ORTIZ-BERMÚDEZ, P.. Synthetic antimicrobial β -peptide in dual-treatment with fluconazole or ketoconazole enhances the *in vitro* inhibition of planktonic and biofilm *Candida albicans*. **Journal of Peptide Science**, v. 21, n. 12, p. 853 – 861, 2015.

NATHEER, S. E.; SEKAR, C.; AMUTHARAJ, P.; RAHMAN, M. S. A.; KHAN, K. F.. Evaluation of antibacterial activity of *Morinda citrifolia*, *Vitex trifolia* and *Chromolaena*

odorata. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 11, p. 783 – 788, 2012.

NAWROT, R.; BARYLSKI, J.; NOWICKI, G.; BRONIARCZYK, J.; BUCHWALD, W.; GOŹDZICKA-JÓZEFIAK, A.. Plant antimicrobial peptides. **Folia Microbiologica**, v. 59, n. 3, p. 181 – 196, 2014.

NAYAK, B. S.; SANDIFORD, S.; MAXWELL, A.. Evaluation of the Wound-healing Activity of Ethanolic Extract of *Morinda citrifolia* L. Leaf. **eCAM**, v. 6, n. 3, p. 351 – 356, 2009.

NAYAK, S.; MENGI, S.. Immunostimulant activity of noni (*Morinda citrifolia*) on T and B lymphocytes. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 7, p. 724 – 731, 2010.

NELSON, S. Noni seeds handling and seedling production. **Fruits and Nuts**, v. 10, p. 1-4, 2005.

NELSON, S. C.; ELEVITCH, C. R. **Noni: the complete guide for consumers and growers**. Holualoa-Hawaii: Permanent Agriculture Resources, p. 1-46, 2006.

NG, T. B.; CHEUNG, R. C. F.; WONG, J. H.; YE, X.. Lipid-Transfer Protein. **Biopolymers (Peptide Science)**, v. 98, n. 4, p. 268 – 279, 2012.

OLIVEIRA, A. R. M.; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1971-1974, 2009.

OOI, L. S. M.; WONG, E. Y. L.; SUN, S. S. M.; OOI, V. E. C.. Purification and characterization of non-specific lipid transfer proteins from the leaves of *Pandanus amaryllifolius* (Pandanaceae). **Peptides**, v. 27, p. 626 – 632, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Globalization and infectious diseases: A review of the linkages**. Geneva: Organização Mundial de Saúde, 2004.

PAGNUSSAT, L.; BURBACH, C.; BALUŠKA, F.; CANAL, L. de la. An extracellular lipid transfer protein is relocalized intracellularly during seed germination. **Journal of Experimental Botany**, doi:10.1093/jxb/ers311, p. 1 – 9, 2012.

PALU, A. K.; KIM, A. H.; WEST, B. J.; DENG, S.; JENSEN, J.; WHITE, L.. The effects of *Morinda citrifolia* L. (noni) on the immune system: Its molecular mechanisms of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 502 – 506, 2008.

PARK, K.; KWAN, I. C.; PARK, K. Oral protein delivery: current status and future prospect. **Reactive and Functional Polymers**, v. 71, p. 280-287, 2011.

PATO, C.; BORGNE, M. L.; BAUT, G. L.; PAPE, P. L.; MARION, D.; DOULIEZ, J.-P.. Potential application of plant lipid transfer proteins for drug delivery. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, p. 555 – 560, 2001.

PAWLUS, A. D.; KINGHORN, A. D.. Review of the ethnobotany, chemistry, biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, 1587–1609, 2007.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C.. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, p. 1804 – 1813, 2010.

PENESYAN, A.; GILLINGS, M.; PAULSEN, I. T.. Antibiotic Discovery: Combatting Bacterial Resistance in Cells and in Biofilm Communities. **Molecules**, v. 20, p. 5286 – 5298, 2015.

PRANTING, M.; LOOV, C.; BURMAN, R.; GORANSSON, U.; ANDERSSON, D. I.. The cyclotide cycloviolacin O2 from *Viola odorata* has potent bactericidal activity against gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1964 –1971, 2010.

RAMACHANDRAN, G.. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 213 – 218, 2014.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C.. Fungal Biofilm Resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 10, p. 521 – 528, 2012.

RATNOGLIK, S. L.; AOKI, C.; SUDARMONO, P.; KOMOTO, M.; DENG, L.; SHOJI, I.; FUCHINO, H.; KAWAHARA, N.; HOTTA, H.. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites, pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. **Microbiology Immunology**, v. 58, p. 188 – 194, 2014.

RAZAFIMANDIMBISON, SYLVAIN G.; MCDOWELL, T. D.; HALFORD D. A.; BREMER, B.. Origin of the pantropical and nutraceutical *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae): comments on its distribution range and circumscription. **Journal of Biogeography**, v. 37, p. 520 – 529, 2010.

REGENTE, M. C.; CANAL, L. de la. Purification, characterization and antifungal properties of a lipid-transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. **PHYSIOLOGIA PLANTARUM**, v. 110, p. 158 – 163, 2000.

REGENTE, M. C.; GIUDICI, A. M.; VILLALÁIN, J.; CANAL, L. de la. The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 183 – 189, 2005.

RIGBY, K. M.; DELEO, F. R.. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, p. 237 – 259, 2012.

RODRIGUES, P. R. C.; KOSACHENCO, B. G.; MAIA, J. Z.; PULZ, R. S.; MELLO, J. R. B. O uso das cefalosporinas na clínica de pequenos animais: breve revisão. **Veterinária em Foco**, v. 4, n. 2, p.143 - 158, 2007.

ROY-BARMAN, S.; SAUTTER, C.; CHATTOO, B. B. Expression of the lipid transfer protein Ace-AMP₁ in transgenic wheat enhances antifungal activity and defense responses. **Transgenic Research**, v. 15, p. 435-446, 2006.

SAFI, H.; SAIBI, W.; ALAOUI, M. M.; HMYENE, A.; MASMOUDI, K.; HANIN, M.; BRINI, F.. A wheat lipid transfer protein (TdLTP4) promotes tolerance to abiotic and biotic stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 89, p. 64 – 75, 2015.

SAGY, M.; AL-QAQAA, Y.; KIM, P.. Definitions and Pathophysiology of Sepsis. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 43, n. 10, p. 260 – 263, 2013.

SALES, G. W. P. **Avaliação da atividade antimicrobiana e do mecanismo de ação do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbail* L.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

SALUDES, J. P.; GARSON, M. J.; FRANZBLAU, S. G.; AGUINALDO, A. M. Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae). **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 7, p. 683 - 685, 2002.

SAMINATHAN, M.; RAI, R. B.; DHAMA, K.. TIWARI, R.; CHACRABORTY, S.; AMARPAL; RANGANATH, G. J.; KANNAN, K.. Systematic Review on Anticancer Potential and Other Health Beneficial Pharmacological Activities of Novel Medicinal Plant *Morinda citrifolia* (Noni). **International Journal of Pharmacology**, v. 9, n. 8, p. 462 – 492, 2013.

SCHULTE, W.; BERNHANGEN, J.; BUCALA, R.. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1 -16, 2013. Doi: 10.1155/2013/165974

SHI, Z.; WANG, Z.-J.; XU, H.-L.; TIAN, Y.; LI, X.; BAO, J.-K.; SUN, S.-R.; YUE, B.-S.. Modeling, docking and dynamics simulations of a non-specific lipid transfer protein from *Peganum harmala* L. **Computational Biology and Chemistry**, v. 47, p. 56–65, 2013.

SHIN, S.; LIM, S.. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. **Journal Applied Microbiology**, v. 97, n. 6, p. 1289 – 1296, 2004.

SHUKLA, P.; RAO, G. M.; PANDEY, G.; SHARMA, S.; MITTAPELLY, N.; SHEGOKAR, R.; MISHRA, P. R.. Therapeutic interventions in sepsis: current and anticipated pharmacological agents. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, p. 5011 – 5031, 2014.

SILVA, B. L. da; RIBEIRO, F. F.; ANDRADE, S. S. da C.; FONSÊCA, L. de C. T. da. Morbimortalidade hospitalar por sepse no Sistema Único de Saúde. **Revista de Enfermagem UFPE**, v. 7, n.1, p. 23 - 29, 2013.

- SILVA, C. R. da; NETO, J. B. de A.; SIDRIM, J. J. C.; ÂNGELO, M. R. F.; MAGALHÃES, H. I. F.; CAVALCANTI, B. C.; BRILHANTE, R. S. N.; MACEDO, D. S.; MORAES, M. O. de; LOBO, M. D. P.; GRANGEIRO, T. B.; JÚNIOR, H. V. N.. Synergistic Effects of Amiodarone and Fluconazole on *Candida tropicalis* Resistant to Fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691–1700, 2013.
- SILVA, L. R. da, MEDEIROS, P. V. Q. de, LEITE, G. A., SILVA, K. J. P., MENDONÇA, V., SILVA, G.G. da. Caracterização do fruto de *Morinda citrifolia* L. (noni). **Revista Cubana de Plantas Medicinales** [online], v.17, n.1, p. 93 – 100, 2012.
- SILVA, N. C. C.; FERNANDES JÚNIOR, A.. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 402 – 413, 2010.
- SILVA, R. R.; SILVA, D. O. e; FONTES, H. R.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D.; ALVIANO, D. S.. Anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial activities of *Cocos nucifera* var. *typica*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 107, p. 1 – 8, 2013.
- SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J.. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 288 – 305, 2012.
- SILVA, W. E. L.; FERRARI JUNIOR, W. D.; ROSA, P. R. da; PEIXOTO, R. de M.; TENÓRIO, J. A. B.; SILVA, T. M. S. da; COSTA, M. M. da. In vitro activity of propolis: synergism in combination with antibiotics against *Staphylococcus* spp. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 1, p. 1 – 5, 2015.
- SIMONE, S. G. de; SOUZA, A. L. A.. Peptídeos microbicidas - Uma alternativa viável para a terapia antimicrobiana. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 24, p. 12 – 16, 2002.
- SINGH, A. K.; SINGH, K.; PETER, P. I. Revisiting the origin of the domestication of noni (*Morinda citrifolia* L.). **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 9, n.4, p. 549 – 556, 2011.
- SINGH, D. R.. *Morinda citrifolia* L. (Noni): A review of the scientific validation for its nutritional and therapeutic properties. **Journal of Diabetes and Endocrinology**, v. 3, n. 6, p. 77 – 91, 2012.
- SRINIVASAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; RAMASUBRAMANIAN, A. K.. Overcoming antifungal resistance. **Drug Discovery Today: Technologies | Drug resistance**, v. 11, p. 65 – 71, 2014.
- STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D; DAKIĆ, I; SAVIĆ, B.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

TAPIA, G.; MORALES-QUINTANA, L.; PARRA, C.; BERBEL, A.; ALCORTA, M... Study of nsLTPs in *Lotus japonicus* genome reveal a specific epidermal cell member (LjLTP10) regulated by drought stress in aerial organs with a putative role in cutin formation. **Plant Molecular Biology**, v. 82, p. 485 – 501, 2013.

TAILOR, R. H.; ACLAND, D. P.; ATTENBOROUGH, S.; CAMMUE, B. P.; EVANS, I. J.; OSBORN, R. W.; RAY, J. A.; REES, S. B.; BROEKAERT, W. F.. A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 39, p. 24480 – 24487, 1997.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TONG, S. Y. C.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER JR., V. G.. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 604 – 661, 2015.

TOUSHEH, M.; MIROLIAEI, M.; RASTEGARI, A. A.; GHAEDI, K.; ESMAEILI, A.; MATKOWSKI, A.. Computational evaluation on the binding affinity of non-specific lipid-transfer protein-2 with fatty acids. **Computers in Biology and Medicine**, v. doi.org/10.1016/j.compbio.2013.08.012i, p. 1 – 7, 2013.

TRAVIS, J.; POTEMPA, J.. Bacterial proteinases as targets for the development of second-generation antibiotics. **Biochimica et Biophysica Acta – Protein structure and molecular enzymology**, v. 1477, p. 35 – 50, 2000.

TROSKIE, A. M.; RAUTENBACH, M.; DELATTIN, N.; VOSLOO, J. A.; DATHE, M.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K.. Synergistic Activity of the Tyrocidines, Antimicrobial Cyclodecapeptides from *Bacillus aneurinolyticus*, with Amphotericin B and Caspofungin against *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3697–3707, 2014.

UPADHYAY, A.; UPADHYAYA, I.; KOLLANOOR-JOHN, A.; VENKITANARAYANAN, K.. Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials: A Minireview of the Mechanistic Basis. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1 – 18, 2014.

USHA, R.; SASHIDHARAN, S.; PALANISWAMY, M.. Antimicrobial Activity of a Rarely Known Species, *Morinda citrifolia* L.. **Ethnobotanical Leaflets**, v. 14, p. 306 - 311, 2010.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T.. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Journal of Microbiology**, v. 10, p. 687 – 713, 2012.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J.. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135 – 162, 2006.

WALSH, C. T.; WENCEWICZ, T. A. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. **The Journal of Antibiotics**, v. 67, p. 7–22, 2014.

WANG, M. Y.; WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; NOWICKI, D. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. Review. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 23, p. 1127–1141, 2002.

WANG, N. J.; LEE, C. C.; CHENG, C. S.; LO, W. C.; YANG, Y. F.; CHEN, M. N.; LYU, P. C.. Construction and analysis of a plant non-specific lipid transfer protein database (nsLTPDB). **BMC Genomics**, v. 13, p. 1 – 9, 2012.

WANG, S. Y.; WU, J. H.; NG, T. B.; YE, X. Y.; RAO, P. F.. A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. **Peptides**, v. 25, p. 1235 – 1242, 2004.

WEI, K.; ZHONG, X.. Non-specific lipid transfer proteins in maize. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 281, p. 1 – 18, 2014.

WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; WESTENDORF, J.; WHITE, L. D. A safety review of noni fruit juice. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 8, p. 100-106, 2006.

WEST, B. J.; PALMER, S. K.; DENG, S.; PALU, A. K.. Antimicrobial Activity of an Iridoid Rich Extract from *Morinda citrifolia* Fruit. **Current Research Journal of Biological Science**, v. 4, n. 1, p. 52-54, 2012.

WICHTERMANN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H.. Sepsis and septic shock - A review of laboratory models and a proposal. **Journal of Surgical Research**, v. 29, p. 189-201, 1980.

WIDERSTRÖM, M.; WISTRÖM, J.; SJÖSTEDT, A.; MONSEN, T.. Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, p. 7 – 20, 2012.

WILLIAMS, K. J.. The introduction of ‘chemotherapy’ using arsphenamine – the first magic bullet. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v 102, p. 343 – 348, 2009.

WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. M.. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. **Journal of Infection**, v. 59 (S1), p. 4 – 16, 2009.

WU, X. X.; TIAN, H. Y.; ZHOU, S.; CHEN, L. F.; BING, X. U.. Impact of global change on transmission of human infectious diseases. **Science China: Earth Sciences**, v. 57, p. 189 – 203, 2014

YANG, X.; LI, J.; LI, X.; SHE, R.; PEI, Y. Isolation and characterization of a novel thermostable non-specific lipid transfer protein-like antimicrobial protein from motherwort (*Leonurus japonicus* Houtt) seeds. **Peptides**, v. 27, p. 3122 – 3128, 2006.

YANG, X.; XIAO, Y.; WANG, X.; PEI, Y. Expression of a novel small antimicrobial protein from the seeds of motherwort (*Leonurus japonicus*) confers disease resistance in tobacco. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 939-946, 2007.

YARWOOD, J. M.; SCHLIEVERT, P. M. Quorum sensing in Staphylococcus infections. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 11, p. 1620 - 1625, 2003.

YASHASWINI S.; VENUGOPAL C.A.; HEGDE, R.V.; MOKASHI, N.A. Noni: a new medicine plant from the tropics. **African Journal Of Plant Science**, v. 8, n. 5, p. 243 – 247, 2014.

YEATS, T. H.; ROSE, J. K. C.. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). **Protein Science**, v. 17, p. 191 – 198, 2008.

YILI, A.; MAKSIMOV, V.; MA, Q.-L.; GAO, Y.-H.; VESHKUROVA, O.; SALIKHOV, S.; AISA, H. A.. Antimicrobial Peptides from the Plants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, p. 627 – 641, 2014.

YUN, N.; LEE, C.-H.; LEE, S.-M.. Protective effect of Aloe vera on polymicrobial sepsis in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1341 – 1348, 2009.

ZAMAN, U.; ABBASI, A.. Isolation, purification and characterization of a nonspecific lipid transfer protein from *Cuminum cyminum*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 979 – 987, 2009.

ZANOTTI-CAVAZZONI, S. L.; GOLDFARB, R. D.. Animal models of sepsis. **Critical Care Clinics**, v. 25, p. 703 – 719, 2009.

ZOTTICH, U.; DA CUNHA, M.; CARVALHO, A. O.; DIAS, G. B.; SILVA, N. C.; SANTOS, I. S.; DO NACIMENTO, V. V.; MIGUEL, E. C.; MACHADO, O. L.; GOMES, V. M. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, p. 375-383, 2011.