



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CLAUDIA AGUIAR DOS SANTOS

**NOVAS ALTERNATIVAS PARA O TRATAMENTO DE  
*PROPIONIBACTERIUM ACNES* BIOINSPIRADOS EM  
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

Campo Grande – MS 2019

CLAUDIA AGUIAR DOS SANTOS

**NOVAS ALTERNATIVAS PARA O TRATAMENTO DE  
*PROPIONIBACTERIUM ACNES* BIOINSPIRADOS EM  
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

Autora: Claudia Aguiar dos Santos  
Orientador: Prof. Dr. Ludovico Migliolo

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia

**CAMPO GRANDE-MS  
2019**

S237n Santos, Claudia Aguiar dos

Novas alternativas para o tratamento de Propionibacterium  
Acnes bioinspirado em Peptídeos Antimicrobianos/ Claudia  
Aguiar dos Santos; orientação Prof Dr Ludovico Migliolo.--  
Campo Grande, MS : 2019.

45 f.: il.; 30 cm;

Dissertação (mestrado em Biotecnologia) - Universidade  
Católica Dom Bosco, Campo Grande MS, 2019

1. Antibióticos. 2. Bactericidas. 3. Medicamentos  
- Biotecnologia. I. Migliolo, Ludovico. II. Título.

CDD: 660.6



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
*Inspira o futuro*

**NOVAS ALTERNATIVAS PARA O TRATAMENTO DE PROPIONIBACTERIUM  
ACNES BIOINSPIRADOS EM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

Autora: Claudia Aguiar dos Santos

Orientadora: Prof. Dr. Ludovico Migliolo

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia  
Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADA em 13 de dezembro de 2019.

*Ludovico Migliolo*

Prof. Dr. Ludovico Migliolo - UCDB

*Susana Elisa Moreno*

Profa. Dra. Susana Elisa Moreno - UCDB

*Karla R. A. Porto*

Profa. Dra. Karla Rejane Andrade Porto – FCG/FACSUL

## RESUMO

A acne vulgar manifesta-se frente a inúmeros fatores patogênicos como a formação do comedão ou comedogênese, produção de sebo e reprodução bacteriana ou colonização pelo *Propionibacterium acnes*. Os tratamentos mais efetivos, sejam tópicos ou sistêmicos, causam variados efeitos colaterais aos pacientes além de induzir a resistência bacteriana, um desafio para a saúde pública global. Assim, existe a necessidade de desenvolver novas moléculas para o tratamento de doenças causadas por bactérias, e os Peptídeos Antimicrobianos sintéticos tornam-se uma opção no controle da patogenese. Este estudo propõe avaliar a ação dos peptídeos sintéticos isolados de invertebrados a Temporina Tpa, Latarcina- 3A e Macropina -2, e os análogos Temphylarata-1, -2, Latarasina-2, -3 e - 4 frente a *P.acne*. Após o estudo teórico da estrutura tridimensional, os peptídeos citados foram submetidos aos ensaios *in vitro* para avaliar seu perfil ,capaz de causar Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e hemólise. Observou-se que nem todos peptideos selecionados foram efetivos como antimicrobianos, a exemplo da temporina-PTa que não foi ativa no controle de crescimento da *P. acnes*. No entanto, os peptídeos temphylarata -1 e -2 mostraram resultados positivos bactericida nas concentrações de 91,87 e 87,4 $\mu$ M, respectivamente. Embora o peptídeo latarcina-3a não tenha apresentado atividade bactericida causou diminuição de crescimento, e seus análogos sintetizados causaram inibição de crescimento e ainda tiveram atividade antimicrobiana atribuída à concentração de 19,6 $\mu$ M para a latarasina-2, 10,8 $\mu$ M para a latarasina-3 e 2,7 $\mu$ M para a latarasina-4. Igualmente ativo o peptídeo macropina-2 apresentou uma inibição em 39,2 $\mu$ M e ação bactericida em 79,4 $\mu$ M, relato inédito para essa finalidade. Ao comparar a ação entre os peptídeos ativos, a latarasina-4 demonstrou ser o melhor candidato para o desenvolvimento de biofármacos no combate e tratamento de *P. acnes*.

**Palavras-chave:** antibióticos; acnes vulgar; bactericida; biofármacos.

## ABSTRACT

Acne vulgaris manifests itself against numerous pathogenic factors such as comedo formation or comedogenesis, sebum production and bacterial reproduction or colonization by the *Propionibacterium acnes*. Topical or systemic treatments cause various side effects and bacterial resistance, a challenge to global public health. There is a need to develop new molecules for the treatment of bacterial diseases, and synthetic Antimicrobial Peptides (AMPs) become a safe and effective option. There is a need to develop new molecules for the treatment of bacterial diseases, and synthetic Antimicrobial Peptides (PAMs) become a safe and effective option. Temporin Tpa, Latarcine 3A e Macropin 2, e os análogos Temphylarate-1, -2, Latarasine-2, -3 e -4 compared to *P.acnes*. After the theoretical study of the three-dimensional structure, the cited peptides were submitted to in vitro tests to evaluate their profile capable of causing minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and hemolysis. It was observed that not all selected peptides were effective as antimicrobials, as in the case of temporina-Pta not active in growth and reproduction control *P.acnes*. Temphylarate -1 and -2 peptides showed positive bactericidal results at 91,87µM and 87,4µM, respectively. The peptide latarcin-3a did not show bactericidal activity caused growth decrease, and its synthesized analogs caused growth inhibition and still had antimicrobial activity attributed to 19,6µM to the latarasine-2, 10,8µM to the latarasine-3 and 2,7µM to the latarasine-4. Equally active, the macropine-2 peptide showed an inhibition of 39.2µM and bactericidal action of 79.4µM, an unprecedented report for this purpose. By comparing the action between the active peptides, latarasine-4 proved to be the best candidate for the development of biopharmaceuticals in the combat and treatment of *P. acnes*.

**Keywords:** antibiotics; common acne; bactericidal; biopharmaceuticals.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

Ao meu orientador professor Dr.Ludovico Migliolo, por acreditar na minha proposta de trabalho e me guiar pelo melhor caminho.

A professora Dr. Karla Rejane Andrade Porto, exemplo de motivação, inspiração, por disponibilizar seu tempo todas as vezes que necessitei e principalmente por todos os conhecimentos que me compartilhou.

A professora Dr. Cláudia Ramalheira, pela preocupação com meu emocional e psicológico durante toda essa jornada, e principalmente por todos os conhecimentos que me compartilhou.

À Patrícia Sousa pela coorientação, por ser uma pessoa disposta a dividir seus conhecimentos e esteve sempre ao meu lado em todo período de análises do meu experimento.

À Taylla Flores, pelo apoio, pelo carinho, pela paciência e pela parceria, por me conduzir durante vários dias de experimento.

À Regina Meneses, pelo carinho, pela paciência e pela parceria. Por me apoiar e me incentivar na parte laboratorial do meu experimento.

A toda equipe no laboratório s-nova pelos conhecimentos partilhados.

Aos meus pais, Aurivan Dutra De Lima, Marilene De Oliveira Aguiar e Carlos Sebastião Dos Santos, Jânio Pereira Gomes que me criaram, sem eles eu não estaria aqui. Principalmente à minha mãe Aurivan que me ensinou a ser uma mulher forte,e valorizar o estudo.

Ao meu companheiro, Israel Avelar Baptista, que neste dois anos manteve nossa casa e principalmente a empresa em ordem pois sem sua administração essa conquista não seria possível.

À Evanilde Palinsky Lourenço, pelos anos de amizade, e pelo companheirismo, por todos os dias que me levou para passear para me distrair e arejar a cabeça, mais principalmente por me estender a mão na hora de dificuldade financeira, nunca irei esquecer tudo que fez por mim.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Claudia Aguiar Dos Santos filha de Carlos Sebastião Dos Santos e Marilena de Oliveira Aguiar, nasceu em Presidente Médici –RO, no dia 12 de julho de 1983.

Concluiu a graduação em Tecnologia em Estética e cosmética em 2014, pela Faculdade Unigran Capital, passando a atuar profissionalmente na área. Concluiu em 2016, o curso de Pós- Graduação (Lato Sensu) Especialização em Dermoestética Facial, realizado na faculdade Unigran Capital. Cursando na sequencia diversos aperfeiçoamento na área.

Proprietária do salão de beleza harmonia desde 2013 possui experiência na área de tricologia, colorimetria, Terapias capilares, cabeleireira, manicura desde 1997.

Atual em 2010 como instrutor de curso técnico

Senac MS no curso de cabeleireiro, em 2014 atuou como instrutor de estágio na faculdade Unigran Capital.

Desde 2017, docente do curso de graduação de tecnólogo em estética e cosmetologia da (FCG) Faculdade Campo Grande, tendo ministrado diversas disciplinas em Estética e imagem pessoal, Eletroestética facial e corporal, entre outras matérias com temáticas afins.

Recente passou por um processo seletivo para corpo docente da universidade Unigran Capital, obtendo aprovação em todas as etapas, integrando-se ao grupo ,como professora no curso Tecnólogo em Estética e cosmetologia no ano de 2020.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura da pele com suas camadas e anexos ..... 10
- Figura 2.- Imagem Eletroscópica de Varredura da Propionibacterium acnes.....13
- Figura 3 - Mecanismo de proliferação da bactéria e formação da acne com formação de comedões, pápula e pústula..... 12
- Figura 4 - Os diagramas de hélices dos peptídeos usados (A) temporina-PTa, (B) temphylarata-1, (C) temphylarata-2, (D) laticarcina-3a, (E) laticarcina-2, (F) laticarcina-3, (G) laticarcina-4 e (H) macropina-2. Resíduos de aminoácidos carregados positivamente estão em azul, carregados negativamente e negativamente em vermelho, alifáticos estão em amarelo e cinza ..... 22
- Figura 5 - Curva de crescimento. O quadrado em vermelho mostra a fase log do crescimento das P. acnes, e as linhas apresentam o ponto da D.O e o tempo ..... 25

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Comparação entre as sequências dos peptídeos estudados: temporina-PTa, temphylarata-1, -2 e latarsina-3a, laticarcina -2, -3 e -4. **Z**-Carga líquida total, **H**- Hidrofobicidade,  **$\mu$ H**-Momento hidrofóbico (valores dados em %) e **MM**-massa molecular, respectivamente. . 24
- Tabela 2 - Atividade antimicrobiana de peptídeos sintéticos frente a *P. acnes*, com as concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) e os resultados hemolíticos apresentados em  $\mu$ M. O valor nd corresponde a não determinado.....26

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPs	Peptídeos antimicrobianos
CAPs	Peptídeos antimicrobianos catiônicos
CBM	Concentração bactericida mínima
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIM	Concentração inibitória mínima
GBD	Global Burden of Disease
LPS	Lipossacarídeos
MBC	Concentração bactericida mínima
MHA	Ágar Mueller Hinton
ml	Mililitro
mm	Milímetro
NK	(Natural Killer)
Nm	Nanômetro
°C	Celsius
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
TPa	Peptídeo Temporina TPa
TSA	<i>Trypticase soy àgar</i>
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>
UV	Ultravioleta
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta

# SUMÁRIO

<b>2. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
2.1. Estrutura e imunologia da pele .....	8
2.2. A Fisiopatologia da acne vulgar e o <i>P. acnes</i> .....	11
1.2 Tratamento da acne vulgar.....	13
1.4 Peptídeos antimicrobianos.....	15
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>17</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
4.1. Objetivo geral.....	18
4.2. Objetivos específicos .....	18
<b>5. METODOLOGIA</b> .....	<b>19</b>
5.1. Triagem das Sequências modelo.....	19
5.2. Padronização do crescimento bacteriano .....	19
5.3. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).....	20
5.4. Ensaio hemolítico.....	20
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
6.1. Características dos peptídeos.....	21
6.2. Curva de crescimento da <i>P. acnes</i> .....	25
6.3. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).....	25
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>30</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A acne é um problema que atinge grande parte das pessoas no mundo. Embora aparente ser um problema de caráter estético, devido às suas implicações e gravidade, é classificada como uma patologia. Dados disponibilizados pelo *Global Burden of Disease* (GBD) já colocava a acne vulgar como a oitava patologia de maior incidência para população mundial entre 1990 a 2010. Ao considerar o impacto das doenças de pele e suas complicações, é visto que estas contribuíram com 1,79% para a carga global de doenças capazes de causar incapacitações por anos de vida, e nesta escala a acne vulgar aparece em segundo lugar no *ranking* (KARIMKHANI, 2017).

Clinicamente, a acne é classificada como vulgar, hiperandrogênica, iatrogênica, cosmética, neonatal e conglobata da mulher adulta. Pode apresentar complicações clínicas variadas conforme o grau de acometimento tecidual, que varia entre leve, moderado e grave (GIACHETTI, 2008; MANFRINATO, 2009; DELGADO, 2017). Apresenta como etiopatologia a hiperprodução de sebo glandular, hiperqueratinização folicular, colonização bacteriana do folículo sebáceo e liberação de mediadores do processo inflamatório (LIMA, 2006; ÁBILA; MARTINS, 2009).

A acne vulgar é uma disfunção inflamatória de caráter crônico, que atinge a unidade pilosebácea desencadeando lesões específicas que geram dor, risco de infecção, além de grande desconforto estético. Apesar de ser relativamente comum nas populações em geral, a sua patogênese não está claramente descrita. Embora a associação entre a incidência de acne vulgar com os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-12) e outros elementos oxidantes seja comum (ASKARI *et al.*, 2017).

Entre os sinais e sintomas relacionados à acne vulgar tem-se presença de: comedões (designados popularmente como cravos); pápulas ou lesões eritematosas e endurecidas, sólidas e arredondadas; pústulas, quando as lesões apresentam pus; nódulos, quando as lesões são caracterizadas por inflamação, e que podem ocasionar destruição dos tecidos deixando cicatrizes e; cistos que são lesões maiores que as pústulas, caracterizadas pela inflamação que avançam às camadas mais profundas da pele, podem ocasionar dores intensas e deixar marcas como cicatrizes (TUCHAYI *et al.*, 2015).

A região do corpo mais afetada é a face, e também é a mais visível, contribuindo como um dos motivos que causam o constrangimento e desencadeia a reclusão do indivíduo, chegando em casos extremos ao diagnóstico clínico de depressão, sobretudo entre os adolescentes (ITOH *et al.*, 2014). As lesões também podem atingir o tórax e o dorso pela maior distribuição de unidades pilosebáceas nessas regiões (DELGADO, 2017; SILVA; COSTA; MOREIRA; 2014).

O surgimento da acne vulgar pode ser resultado da interação de múltiplos fatores patogênicos. Entretanto, Pretsch *et al.*, (2014) apontam como principal agente causal a presença do *Propionibacterium acnes* para a formação do comedão ou comedogênese, favorecida pela produção de sebo nos sítios sebáceos. Já o ambiente e a fonte de substrato presente, propicia a reprodução bacteriana e a colonização local, iniciando o processo inflamatório.

Anteriormente Zucheto *et al.*, (2011) associaram o aumento e a hiperproliferação de material gorduroso no infundíbulo da glândula sebácea com a elevação da produção de hormônio androgênio, condição contributiva para

início da comedogênese e do processo inflamatório, podendo evoluir para lesões de grandes proporções.

Os autores referem, ainda, que a presença de pústulas, pápulas ou máculas são decorrentes do agravamento do processo inflamatório, progredindo para o rompimento ou dano da parede folicular, com extravasamento do conteúdo para a derme. O resíduo formado pelo sebo com a queratina presente no canal folicular forma um comedão aberto que recebe incrementos do acúmulo de melanina, tornando-se escurecido. Citam também que a presença de esterases produzidas pela *P. acne* na glândula transforma os glicerídeos sebáceos em glicerol e ácidos graxos livres, ocasionando irritação da parede do folículo e atração e ativação de glóbulos brancos mononucleares.

Apesar do desenvolvimento da acne vulgar ser relacionado ao excesso de sebo, indivíduos podem ser acometidos pela doença sem apresentar hiperseborreia. É importante destacar que a severidade da doença dermatológica apresenta dependência de fatores como idade, sexo e etnia, expressando-se em maior evidência em jovens, mulheres e negros (TUCHAYI *et al.*, 2015).

Outros fatores contributivos para o surgimento da acne podem estar associados ao uso de cosmético cuja matéria prima apresente tendência comedogênica, ao consumo medicamentoso de esteróides anabolizantes, corticosteróides e anticoncepcionais, ou mesmo a condições relacionadas à tensão emocional, ao ciclo menstrual, entre outros que promovam uma condição fisiológica propícia para a patologia ora discutida (FIGUEIREDO, 2011; LYNN, 2016).

Atualmente, as opções terapêuticas mais efetivas para acne vulgar, sejam tópicas ou sistêmicas, causam variados efeitos colaterais aos pacientes, além de induzirem à resistência bacteriana (DELGADO, 2017). Assim, torna-se imprescindível a busca por tratamentos mais efetivos e que ofereçam melhor qualidade de vida ao paciente, exigindo constante pesquisa e atualização terapêutica por parte da comunidade científica acadêmica e de indústrias cosméticas e farmacêuticas.

É nesse contexto que se ressalta a necessidade do desenvolvimento de novas moléculas para o controle e tratamento da acne vulgar. E para tanto, este estudo objetiva testar a atividade antibacteriana dos peptídeos antimicrobianos e seus análogos frente à bactéria *P. acnes*, como uma opção segura e eficaz.

## **1.1. Estrutura e imunologia da pele**

### **1.1.1 Pele e anexos cutâneos**

A pele é composta por camadas, que histologicamente se diferem em epiderme, derme e a camada subcutânea. Enquanto órgão tem funções múltiplas, citando como mais comum ser isolante contra componentes orgânicos do meio exterior impedindo a ação de certos agentes externos, com importante extensão imunológica. Sendo a responsável por manter a homeostasia corpórea, evitar a perda de água e eletrólitos, bem como realizar a regulação termogênica (EDMONDS-WILSON, 2015; DELGADO, 2017).

A pele, em nível estrutural, é formada por uma camada mais externa em contato com o ambiente, a epiderme, uma intermediária denominada derme e, uma outra mais profunda, denominada hipoderme. (LIU *et. al.*, 2013; KAO, 2015). Constituída por um tecido epitelial estratificado, formada por quatro tipos de

---

células diferentes e cinco camadas distintas de diferentes espessuras, principalmente, por células queratinócitos (DELGADO, 2017).

É na camada basal que ocorre a multiplicação celular esta próxima ao fornecimento de sangue, e dão origem aos melanócitos e queratinócitos. Os melanócitos são os responsáveis pela produção de melanina, sendo esta, atuante na pigmentação e proteção da pele contra os raios ultravioletas, enquanto os queratinócitos são os responsáveis pela síntese da queratina uma proteína estrutural formadora de microfilamentos responsáveis pela resistência, elasticidade e impermeabilidade à água (ELDER, 2011; OLIVEIRA, 2015).

Outra estrutura importante são os desmossomos, responsáveis pela adesão intercelular dos queratinócitos em toda a epiderme, sendo mais concentrados na camada espinhosa, composto por seis polipeptídios que formam a placa desmossomal que interagem com as glicoproteínas transmembranas do desmossomo da célula adjacente, garantindo a adesão intercelular (ELDER, 2011).

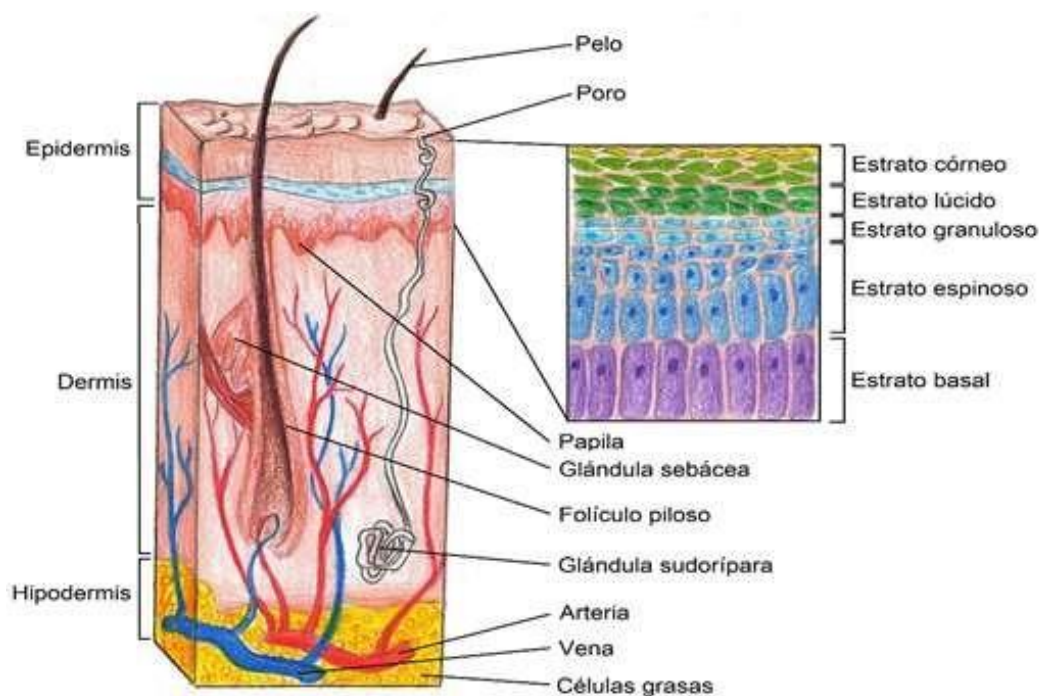
Além dessas estruturas de união, há entre as células epidérmicas, o glicocálice, uma espécie de cimento intercelular constituído de glicoproteínas que auxiliam na coesão intercelular e permite a circulação de substâncias hidrossolúveis. Na sequência da camada espinhosa e em direção à superfície, as células formam fileiras repletas de grânulos basófilos, constituindo assim, a camada granulosa (WILLIAMS, 2013).

A camada córnea surge simultaneamente organizada por filamentos em feixes paralelos e compactos, contendo na sua constituição colesterol, ceramida e ácido graxo livre, favorecendo a formação da barreira lipídica extracelular hidrofóbica (OLIVEIRA, 2015).

A derme apresenta espessura de 5 a 7 vezes maior que a epiderme, contém colágeno e elastina, forma a matriz extra fibrilar de suporte, elasticidade além de propriedades de extensibilidade. Sua morfogênese é fundamental para a determinação da arquitetura, tipo de diferenciação e padrão dos anexos (LIU *et al.*, 2013).

A interface entre a epiderme e a derme é conhecida como junção dermo-epidérmica ou zona da membrana basal (HALAL, 2011). A representação da pele e seus anexos estão representados na figura 1.

---



**Figura 1** - Estrutura da pele com suas camadas e anexos Fonte: Adaptada de (COSTA, 2015).

Abaixo da derme, encontra-se uma camada de tecido subcutâneo denominado de hipoderme, composta de tecido conjuntivo frouxo, que faz a junção da derme aos tecidos e órgãos subjacentes, embora não seja considerada uma parte constituinte da pele (DELGADO, 2017).

### 1.1.2 Sistema Imunológico cutâneo

Fazem parte do sistema imunológico, tecidos, células e moléculas que protegem o organismo da ação de agentes patológicos. As barreiras físico-químicas constituem um dos principais mecanismos de ativação da imunidade inata, são formadas visando o bloqueio ou o impedimento da entrada de agentes que causam infecção no organismo hospedeiro, como exemplo a pele. A imunidade inata é mediada por células efetoras da imunidade, dendríticas, Natural Killer (NK), as citocinas, sistema complemento, entre outros. Além de ser inicialmente meios de defesa contra antígenos estranhos, a imunidade inata proporciona a indução da resposta imune adaptativa (MURPHY, 2012; PILLAI, 2015).

Devido as suas diferentes especificidades associadas a resposta imune, a imunidade adaptativa pode ser denominada também como imunidade específica. Seus componentes são os linfócitos e seus anticorpos produzidos frente às substâncias estranhas (antígenos) e promovem a indução de respostas de defesa específicas (RIBEIRO, 2017).

Os linfócitos expressam receptores para diversificados antígenos, se diferenciam em linfócitos B e T com respostas diferenciadas aos tipos de receptores antigênicos, como a produção de receptores específicos para a identificação de possíveis infecções ou alterações nas células do organismo, de neutralizar determinados patógenos, sintetizar e secretar anticorpos na corrente sanguínea, respectivamente (PILLAI *et al.*, 2015; COICO e SUNSHINE, 2015).



A resposta direta observada no processo de defesa da pele mediante a comedogênese é desencadeada tanto pela produção de interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) como pela indução de fosfolipase A2, que exarceba o processo inflamatório (TUCHAYI *et al.*, 2015). Sendo a IL-6 uma citocina pleiotrópica, ela desempenha uma gama de funções nos efeitos imunes celulares e humorais relacionados à inflamação, defesa do hospedeiro e injúria tecidual, produzida e secretada por células endoteliais. Por causa dessa atividade biológica pleiotrópica, a citocina desempenha um papel principal na cascata das citocinas e estimula a síntese de outras citocinas. Enquanto a fosfolipase A2, é uma família de enzimas que hidrolizam fosfolípidios oxidados, gerando produtos bioativos, os quais potencializam o processo inflamatório (VOLP *et al.*, 2008).

### 1.2.A Fisiopatologia da acne vulgar e o *P. acnes*

A acne vulgar é uma das doenças de pele mais comum, com prevalência em até 85% dos adolescentes e 11% dos adultos, no qual o envolvimento microbiano da *P. acnes* é considerado uma das principais causas para o desenvolvimento da acne (Gibbons *et al.*, 2013). Contudo, devido ao seu caráter multifatorial, a patogênese deve-se levar em conta também a hiperqueratinização que estimula a produção de sebo nas glândulas sebáceas (SCIPIONI; MONTEIRO; SOLDATELI, 2015).

Embora a bactéria comensal *P. acnes* presente predominantemente nos sítios sebáceos seja fundamental na regulação da homeostase da pele e impeça a colonização de outros patógenos nocivos, ela também pode atuar como um patógeno oportunista na acne vulgar (ROSENTHAL *et al.*, 2011, KITOWSKA *et al.*, 2005).

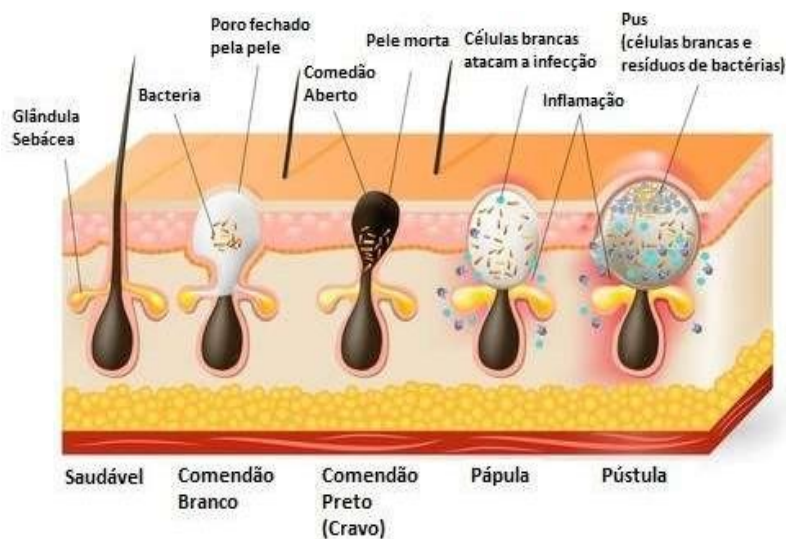
Anteriormente denominada *Corynebacterium*, a *P. acnes*, é a principal bactéria que coloniza as glândulas sebáceas. Classificada como Gram-positiva, anaeróbica facultativa, e nominada difteróide, pois não forma esporos e possui forma de bastonete, está presente tanto no estrato córneo como nas unidades pilossebáceas (figura 2) (JAHNS, 2013; NEVES *et al.*, 2015). No entanto, apesar de décadas de estudo, ainda não está claro como *P. acnes* contribui para a patogênese da acne, é um importante comensal da flora cutânea normal e compete diretamente com outros exemplares do gênero presente na pele, tais como o *P. avidum*, *P. granulosum* e o *S. epidermidis* (GIBBON *et al.*, 2013; COSTA, 2015)



**Figura 2.-** Imagem Eletroscópica de Varredura da *Propionibacterium acne*  
Fonte: Adaptada de Costa (2015).

A *P. acnes* sobrevive por meio da macrofagia no interior da unidade pilossebácea, contribui além da inflamação, para a produção de biofilme nos folículos, ou seja, adesão dos queratinócitos, bem como, para o aparecimento de comedões. Este, possui uma matriz capaz de produzir uma barreira de proteção que impede a ação dos antibióticos. Sabe-se que a *P.acnes* tem potencial migratório do microbioma cutâneo para regiões mais profundas do tecido, possui a habilidade de sobrevivência e pode apresentar potencial patogênico. Considerada como tipo comensal, pode abrigar cerca de dez milhões de organismos viáveis. A bactéria metaboliza triglicerídeos, ácidos graxos livres, escateno e colesterol livre ou esterificado, estes constituintes servem de substrato para o crescimento e desenvolvimento da *P. acnes* e quando oxidados contribuem para a exacerbação do processo inflamatório (ELDER, 2011; LEVIN, 2016). Na Figura 2, é apresentado o mecanismo da proliferação bacteriana.

Neves (2015) descreve que a liberação de ácidos graxos livres pelo processo de hidrólise dos triglicerídeos contribui para a manutenção do pH ácido na superfície da pele, sendo este considerado um fator de proteção da pele e possivelmente um controlador da flora local.



**Figura 3** - Mecanismo de proliferação da bactéria e formação da acne com formação de comedões, pápula e pústula Fonte: Adaptado de ELDER (2011).

Além da secreção das lipases, sabe-se que a *P. acnes* pode secretar fatores quimiotáticos além de metaloproteases e porfirinas, podem ainda interferir na produção de espécies de oxigênio e radicais livres que causam danos aos queratinócitos, com destaque nas regiões da face e couro cabeludo devido à alta concentração de unidades pilossebáceas nesses locais (BEYLOT *et al.*, 2014).

É uma doença crônica na qual é comum a presença de lesões e cicatrizes, condição que desencadeia outros fatores com consequências no âmbito psicológico, conforme relatado nos estudos de Halvorsen *et al.*, (2011). Indivíduos acometidos também podem apresentar tendências suicidas, além de problemas de saúde mental e isolamento afetivo (MISERY, 2011).

### 1.2.1. Graus de classificação da acne vulgar

A classificação ou diagnóstico da acne vulgar é realizada por meio de inspeção visual, registro por fotografia e, conforme a gravidade ou tipo de lesão. Em geral, o diagnóstico é dado por um especialista, como por exemplo, um dermatologista, por esteticista e/ou demais profissionais que trabalham com estética a exemplo dos fisioterapeutas (COSTA, 2015).

De acordo com Vaz (2004), do ponto de vista clínico, a acne pode ser classificada como não-inflamatória e inflamatória, variando de acordo com o tipo de lesão predominante. Nas lesões não-inflamatórias, o comedão aberto ou ponto negro é uma lesão plana ou ligeiramente elevada, e pode atingir 5mm de diâmetro, e o comedão fechado ou branco é uma lesão palpável, esbranquiçada ou da cor da pele, com 1 a 3 mm de diâmetro. As lesões inflamatórias são descritas como pápulas ou lesão palpável, rosada ou avermelhada, com menos de 5 mm de diâmetro, quando evolui com surgimento de pus no seu conteúdo é identificada como pústula. Ao tornar-se sólida é denominada nódulo, com a presença de lesão sólida e elevada, com diâmetro superior a 5 mm, geralmente presente na derme, e o cisto é um nódulo elástico, não aderente às estruturas subjacentes, que inflama e supura, quase sempre resulta numa cicatriz.

É possível estabelecer o grau de severidade conforme a quantidade de lesões: leve quando houver menos de 10 pápulas/pústulas e ausência de nódulos; moderada entre 10-20 pápulas/ pústulas presentes e/ou alguns nódulos; severa com a presença acima de 20 pápulas/pústulas e/ou muitos nódulos. E de modo mais simplista em: (a) acne não inflamatória ou comedoniana, (b) de grau leve ou grau I, sendo considerada a forma mais leve da doença, (c) moderado ou grau II, (d) grave de grau III e (e) grau IV (VAZ 2004; GOMES, 2017). Pode haver ainda, uma complementação segundo Zucheto *et al.*, (2011) que propõe um outro nível, denominado de grau V, para a forma mais grave e rara da doença, geralmente com complicações sistêmicas.

## 1.2 Tratamento da acne vulgar

Os tratamentos de acne podem ser divididos em profilático, medicamentoso e estético, os quais abrangem várias opções desde as mais brandas aos tratamentos tópicos eletroterápicos (PEREIRA, 2013; ALBA, 2015). Outra opção é o uso de plantas medicinais de forma direta ou por meio de preparações a base de ativos botânicos, compondo a linha de tratamento designada como fitoterápica e fitocosmética (LUCHESE e CARLI, 2014).

Apesar de décadas de estudo, ainda não está claro como *P. acnes* contribui para a patogênese da acne, sendo um importante comensal da flora cutânea normal, e também o fator patogênico no desenvolvimento da acne. A terapêutica empregada há mais de 30 anos é a antibioticoterapia direcionada ao patógeno, que pode ser tópica ou sistêmica, conforme a gravidade e o tipo de lesão (GIBBON *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2017).

Atualmente, há uma gama de fármacos utilizados no tratamento da acne vulgar, que atuam nos diferentes estágios da evolução das lesões, e podem ser usados isoladamente ou em combinação. Incluem os fármacos tópicos nas situações de acne controlada, com combinações terapêuticas de retinóides, peróxido de benzoilo, isotretinoína, tretinoína, adapaleno, nicotinamida, ácido azelaico e antibióticos de uso tópico, e os fármacos sistêmicos que são usados em combinação com fármacos tópicos para o controle da acne nas suas formas

---

mais severas, a exemplo da tetraciclina, minociclina, eritromicina, clindamicina, cefalexina, doxiciclina, ampicilina, entre outros (VAZ, 2004; DELGADO, 2017).

Ainda na abordagem de controle do agente causador é citado também o uso das cefalosporinas, seu uso se deve a excelente absorção oral, e por ser estável no trato gastrointestinal (VAZ, 2004; DEZANI, 2010).

A terapêutica mais utilizada para o tratamento da acne de grau leve a moderada é o uso do peróxido de benzoíla, de natureza lipofílica, que o torna capaz de penetrar o estrato córneo e o ducto polissebáceo reduzindo de maneira significativa o número de *P. acnes* e do *S. epidermidis*, ambas bactérias Gram-positivas presente na pele. Porém, deve ser utilizado com cuidado pois pode propiciar a oxidação das proteínas, causando um certo grau de atividade queratolítica e desestruturação do tampão folicular e, conseqüentemente, provocando a esfoliação das células do epitélio (WILLIAMS *et al.*, 2012; OKAMOTO *et al.*, 2016; KOSMADAKI e KATSAMBAS, 2017)

Nos casos mais severos da infecção, é comum o uso oral e tópico da isotretinoína, embora reduza o processo inflamatório em cerca de 70 a 89%, promove diminuição total de microorganismos bacterianos e reduz diretamente a quimiotaxia dos neutrófilos (BRITO *et al.*, 2010).

Na acne grave o tratamento sistêmico é recomendado, geralmente são utilizados grupos de três antibióticos de amplo espectro: tetraciclina, eritromicina e clindamicina por um período de seis a oito semanas. Quando é observado junto com a acne inflamatória a formação de nódulos, é comumente utilizado os antibióticos: minociclina, doxiciclina, cefalexina, tetraciclina, sulfametoxazol e trimetopim (CAPDVILLA, 2014; LYNN *et al.*, 2016).

Contudo, a ação dos antimicrobianos é limitada devido a estratificação, tornando o mecanismo de inativação independente de processos biológicos ativos (STREMPER; STREHMEL; OVERHAGE, 2015). O uso recorrente e prolongado desencadeia a tolerância aos antimicrobianos, que consiste na formação de biofilmes, impedindo a difusão dos ativos por meio da matriz extracelular das bactérias, que se desenvolve em camadas através da matriz polimérica e gera nutrientes e oxigênio, de forma a facilitar sua sobrevivência (FINNEGAN *et al.*, 2015).

### 1.3.1 Efeito adverso dos antimicrobianos

O tratamento tópico medicamentoso contínuo pode ocasionar efeitos adversos, como por exemplo, pele seca e escamosa, eritema, alergia de contato, além de provocar manchas em tecidos devido a componentes químicos presentes na fórmula (LYNN *et al.*, 2016).

Para indivíduos que não possuem tolerância ao primeiro fármaco de escolha geral, o peróxido de benzoíla, indica-se o tratamento com ácido azelaico. Entretanto, reações adversas, como por exemplo, rápida sensação de irritabilidade na camada superior da pele, leve e transitória; bem como, dores agudas; entre outros, já foram relatadas (BOTROS, 2015).

O uso de retinóides pode ser outra opção, mas é comum a ocorrência de irritabilidade, dor e descamação, principalmente a isotretinoína seguida pelo ácido retinóico e pelo adapaleno, mesmo em baixas concentrações, isto é, na posologia de 0.025% (CAPDVILLA, 2014).

Capdevilla (2014) menciona ainda, que o ácido salicílico é um agente queratolítico com ação antibacteriana leve e pode ser associado à retinóides tópicos no combate da acne comedônica. Porém o uso por períodos prolongados ou em concentrações elevadas, pode promover o salicilismo com inflamação e

escamação da pele. Em gestantes, seu uso é proibido e pode trazer riscos ao feto e/ou ao recém-nascido.

Tem-se verificado um aumento da frequência de *P. acnes* resistentes aos antibióticos, o que se associa à falências terapêuticas, sugerindo que este problema está relacionado com o uso do mesmo antibiótico em ciclos terapêuticos repetidos. E ainda, contribuem para efeitos adversos como distúrbios gástricos, diarreia e infecções do trato urinário (VAZ, 2004; BRITO *et al.*, 2010).

Como alternativa de antibióticos sistêmicos tem-se: o  $\beta$ -lactâmico clássico que apresenta a mesma característica estrutural da penicilina; e a cefalexina, uma cefalosporina de primeira geração que tem a propriedade de efeito inibitório sobre a biossíntese de componentes estruturais da parede celular de microorganismos suscetíveis (AOKI & OKUHARA, 1980; TAMAI *et al.*, 1988; PUTAROV, 2010). Sua ação antibiótica se deve a excelente absorção oral, estável no trato gastrointestinal, mas apresenta como efeitos adversos urticária e colite pseudo-membranosa (DEZANI, 2010).

Observando o panorama de tratamento, a busca de terapias que permitam aumento do bem estar e menos efeito adverso são fatores de importância no tratamento de doenças epiteliais. Atualmente diversos laboratórios estão empenhados no descobrimento e desenvolvimento de moléculas bioativas de plantas ou animais, e numa abordagem mais direcionadas os peptídeos antimicrobianos (PAMs) obtidos por via sintética.

## 1.4 Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos apresentam uma quantidade variável entre 15 a 50 aminoácidos, e massa molecular abaixo de 10 kDa, apresentam amplo espectro de ação contra diversos microrganismos, como por exemplo vírus, bactérias, fungos, protozoários e células tumorais (BAHAR; REN, 2013).

Em relação à atividade biológica, os Peptídeos Antimicrobianos atuam como componentes principais da imunidade inata contra infecções, mesmo sendo um oportunista que pode ter seu crescimento acelerado e causar danos. Quase 90% possuem características comuns à carga elétrica global, variando entre +2 e +11, possuindo ainda hidrofobicidade e anfipaticidade, que são determinadas devido à presença de aminoácidos específicos, que afetam a atividade antimicrobiana e são os responsáveis por sua especificidade. Os 10% restantes são peptídeos aniônicos ricos em glutamato e aspartato (NARAYANA e CHEN, 2015).

Entre os aminoácidos com caráter hidrofóbico, apresentam na sua constituição, em geral, a alanina, leucina, fenilalanina, triptofano, isoleucina, tirosina e valina (KANG *et al.*, 2014). Por possuírem, em sua maioria, carga positiva, os são referenciados como CAPs, (do inglês peptídeos antimicrobianos catiônicos), condição que permite interagir com a membrana plasmática do patógeno (NGUYEN *et al.*, 2011). Essa interação constitui um dos principais mecanismos de ação dos peptídeos, contrária à ação dos antibióticos que estão direcionados para as proteínas indistintamente (KANG *et al.*, 2014).

A forma como os peptídeos interferem na conformação da membrana dos microrganismos é determinada por sua estrutura secundária, que o torna permeável na camada lipoprotéica. A maioria dos peptídeos catalogados nas bibliotecas demonstra adotar uma forma helicoidal e, nesse caso, dentre os peptídeos elencados, os PAMs de  $\alpha$ -hélice são os que se aproximam da descrição das literaturas a seu respeito (SANTOS, 2018; KANG *et al.*, 2014).

A interação entre CAPs e membranas bacterianas ocorre, inicialmente, por meio da atração eletrostática entre os peptídeos com carga elétrica positiva, e entre as superfícies polianiónicas nas células constituídas pelos ácidos teicoicos e lipoteicoicos, e pelos lipopolissacarídeos (LPS). Os CAPs conseguem atravessar a membrana devido a uma instabilidade provocada por meio da bicamada da parede celular, permitindo a translocação do peptídeo (BATONI, *et al.*, 2011). Essa passagem ocasiona a formação de poros na membrana, e, conforme a produção e aplicação de novos PAMs aumentam, ocorre a lise e a destruição da membrana, com posterior interrupção do processo infeccioso. Essa perspectiva favorece o estudo e o desenvolvimento de novas moléculas que sejam funcionais no tratamento de diversas doenças infecciosas, dentre elas a acne vulgar (NGUYEN *et al.*, 2011).

#### 1.4.1 Produção de peptídeos de invertebrados

As propriedades biológicas dos peptídeos antimicrobianos isolados de invertebrados são descritas desde a década de 80. No decorrer dos anos, foram descritas mais de 1000 moléculas com ação contra patógenos, as quais têm como características: baixa massa molecular; serem positivamente carregadas em pH fisiológico; serem anfipáticas; os aminoácidos que a compõem apresentam fitas beta, folhas alfa e pontes dissulfetoproporcionando; menor capacidade de induzir resistência e; causam a morte rápida dos microrganismos patógenos (LIMA *et al.*, 2012).

Kozlov *et al.*, (2006) exploraram pela primeira vez as latarcinas (Ltcs), uma família de peptídeos citolíticos encontrados no veneno da aranha *Lachesana tarabaei* (Zodariidae), onde está presente laticin-3a, ativo contra bactérias. A Ltc-3a possui 20 aminoácidos, uma estrutura helicoidal com momento hidrofóbico de 0,575, carga +6 e hidrofobicidade de 35%. Latarasin-2, -3 e -4 foram projetados para terem efeito antimicrobiano melhor que Ltc-3a, sendo que as modificações foram feitas nos resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos.

São capazes de produzir substâncias nocivas ou tóxicas, com distintos efeitos farmacológicos, como no caso dos Anuros, que possuem na composição de seus venenos: peptídeos; amins biogênicas; esteroides e; alcalóides, produzindo efeitos cardiotoxicos, neurotóxicos, miotóxicos e anestésicos. Alguns anfíbios também possuem substâncias antimicrobianas em seu tegumento, além de elementos com efeito citotóxico, podendo causar danos em nível celular, os quais podem servir de modelo para o desenho de novas drogas terapêuticas, como exemplo a produção de Temporina pela *Rana catesbiana* (DORNELLES, MARQUES, RENNERT, 2010).

Dentro da ordem Hymenoptera, o maior é formado pelas abelhas (superfamília Apoidea), com aproximadamente 17.500 espécies. Além da sua importância como polinizador, alguns estudos mostram a atividade dos peptídeos produzidos pelos espécimes com potencial de ação contra cepas bacterianas Gram-negativa e Gram-positiva, como exemplo a macropina obtida da *Macropis fulvipes* (BARROS e MACEDO, 2017).

## 2. JUSTIFICATIVA

O lançamento de um fármaco desenvolvido de forma tradicional leva cerca de 12 anos. Calcula-se que os custos estejam em torno de 0,5 bilhão a 2 bilhões de dólares, e são poucas as classes de antibacterianos trazidos ao mercado, ao passo que os fármacos velhos perdem sua eficácia, maximizando o potencial de doenças infecciosas, como a acne vulgar. Embora existam inúmeras técnicas e métodos de tratamento que apresentam bons resultados quanto à melhora significativa do aspecto estético da pele, a contenção do agravo dessa doença dermatológica requer escolhas que precisam considerar o grau de acometimento e sua tipologia.

Essas condições impulsionaram a busca de novas moléculas e medicamentos capazes de combater os microrganismos patogênicos, com destaque aos peptídeos antimicrobianos (PAMs) e suas aplicações em medicinais e biotecnologias (CRAIK *et al.*, 2013; HANEY, MANSOUR, HANCOCK, 2017). Em valores monetários, é possível observar um aumento crescente nos últimos anos decorrente da produção de peptídeos antimicrobianos, alcançando montante de US\$ 25,4 bilhões em 2018 (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015).

A presente pesquisa é parte integrante dos trabalhos desenvolvidos no laboratório S-Inova, grupo de trabalho do Prof. Dr. Ludovico Miglioli com objetivos de testar peptídeos comerciais e seus análogos sintetizados, denominados como temporina-Tpa, temphylarata-1, temphylarata-2, latarcina3a, latarasina-2, latarasina-3, latarasina-4 e macropina-2. As padronizações para purificação e quantificação seguiram definições de Murphy e Kies (1960), e foram identificados por absorção de UV nos comprimentos de onda 205, 215 e 225 nm, respectivamente.

Considerando as inúmeras inferências terapêuticas para o tratamento da P. acne e as várias reações adversas apresentadas pelos fármacos comerciais de uso tópico e sistêmico, que corroboram para a interrupção do tratamento e a descontinuidade do surgimento de biofilme e quadros de resistência, este projeto propõe utilizar os peptídeos disponibilizados nas bibliotecas de bancos de dados utilizados pelo grupo de pesquisa, e os seus análogos sintetizados, como antibacterianos no controle da *P. acnes*.

---

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Testar a atividade antibacteriana dos peptídeos antimicrobianos e seus análogos frente à bactéria *Propionibacterium acnes*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Identificar as sequências modelo dos peptídeos antimicrobianos sintéticos;
  - Identificar a concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos temphylarata-1, temphylarata -2, laticarcina-3a, laticarcina-2, laticarcina-3, laticarcina-4 e macropina-2 contra *P. acnes*;
  - Avaliar a concentração bactericida mínima (CBM);
  - Avaliar a hemólise;
-



## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Triagem das Sequências modelo

Foram utilizados dados moleculares gerados por modelos racionais depositados em biblioteca de peptídeos sintéticos antimicrobianos, utilizada pelo grupo de pesquisa do laboratório S-Inova a partir dos métodos de desenho *in silico* para produzir moléculas com alta especificidade para patógenos.

O critério utilizado para a obtenção das novas sequências análogas foi a substituição pontual de resíduos de aminoácidos no peptídeo de origem com a finalidade de reduzir a carga líquida total, de ajustar a hidrofobicidade e de reorganizar o momento hidrofóbico. Foi usado o diagrama de hélice dos peptídeos de origem como suporte para separar os resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos dispostos uma  $\alpha$ -hélice para gerar aos novos peptídeos (YEAMAN; YOUNT, 2003).

Segundo os dados obtidos a partir da biblioteca de peptídeos sintéticos, foram sintetizados os análogos identificados segundo o peptídeo original, descritos como *temphylarata-1* e *temphylarata-2* (obtidas a partir da *temporina-Tpa* da *Hylarana picturata*), *latarasina-2*, *latarasina-3*, *latarasina-4* (obtidas a partir da *latarcina3a* *Lachesana tarabaevi*) e a *macropina-2* da *Macropis fulvipes*.

As moléculas obtidas foram avaliadas conforme os parâmetros de hidrofobicidade, momento hidrofóbico, diagrama de hélice, comprimento, peso molecular e carga líquida, para verificar a molécula mais efetiva como atividade bactericida.

### 4.2. Padronização do crescimento bacteriano

A fase de crescimento exponencial é o período de maior atividade metabólica da célula do microrganismo teste, e, portanto, o estágio ideal para utilização das células nos bioensaios. A curva de crescimento da *P. acnes* foi monitorada para ser definido o tempo correto para a incubação, sendo este diretamente proporcional à maior concentração celular esperada para a fase exponencial de crescimento. As quantificações foram realizadas por meio da leitura da densidade ótica (DO) e pela presença de Unidade Formadora de Colônia (UfC).

O perfil de crescimento foi determinado utilizando três colônias de *P. acnes* (ATCC 51277), cultivadas em meio TSA (*trypticase soy agar*, do inglês) a 37 °C por aproximadamente 18 h overnight, num volume final de 5mL de cultivo em tubo Falcon. Após esse período, alíquotas de 100  $\mu$ L de cada réplica foram diluídas em 3mL de TAS e medidas em espectrofotômetro a 600 nm, em períodos de 30 minutos até o tempo final de 390 minutos. Todo o ensaio foi realizado em três réplicas.

A determinação da UFC, expressa como UFC.mL<sup>-1</sup>, foi realizada após sucessivas diluições seriadas da concentração inicial de inóculo, partindo de alíquotas de 100 $\mu$ L em solução salina tamponada de fosfato, em placas de Petri contendo meio sólido TSA. Para efeito do cálculo das UFC, foram contabilizadas tomadas somente placas que continham entre 30 e 300 colônias formadas. Em seguida foi realizada a definição da concentração final referente ao número de bactérias presente no cultivo inicial, conforme equação a seguir:

$$\text{UFC.mL}^{-1} = \frac{\text{Número de colônias contadas na placa} \times \text{Diluição da amostra}}{\text{Volume inicial total (mL)}}$$

### 4.3. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Após estabelecidas as condições de cultivo, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM), segundo adaptações da metodologia descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2009).

Uma concentração de células bacterianas na concentração final de  $2-5 \times 10^5$  ufc.mL<sup>-1</sup> foi dispersa em microplacas de 96 poços, em três réplicas técnicas para cada peptídeo avaliado. Os peptídeos anteriormente descritos e eleitos para o estudo foram preparados nas concentrações entre 4 e 128 µg.mL<sup>-1</sup> e distribuídos nas microplacas incubadas a 37°C durante 18h overnight. As leituras para definição da CIM foram realizadas em leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, Inc., Estados Unidos) a 600 nm. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração de peptídeo em que não houve crescimento bacteriano.

Como controle positivo, foi utilizado cefalexina nas mesmas concentrações dos peptídeos, de 4 a 128 µg.mL<sup>-1</sup>, enquanto a suspensão bacteriana na concentração  $2-5 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> foi adicionada em meio TSA e definida como controle negativo. Ambos ensaios, positivo e negativo, foram submetidos às mesmas condições para os testes com os peptídeos.

A avaliação da concentração bactericida mínima (CBM) seguiu a metodologia adaptada de Wiederstein e Sippl (2007) e foi conduzida após os resultados da CIM. Três repetições no volume de 10 µL foram retiradas dos poços das microplaca, plaqueadas em Agar Mueller Hinton (MHA) e incubadas a 37°C por 24h. O CBM foi determinado como a menor concentração de peptídeo em que nenhum crescimento bacteriano foi detectado, o que caracteriza a concentração mínima para induzir ao efeito bactericida.

### 4.4. Ensaio hemolítico

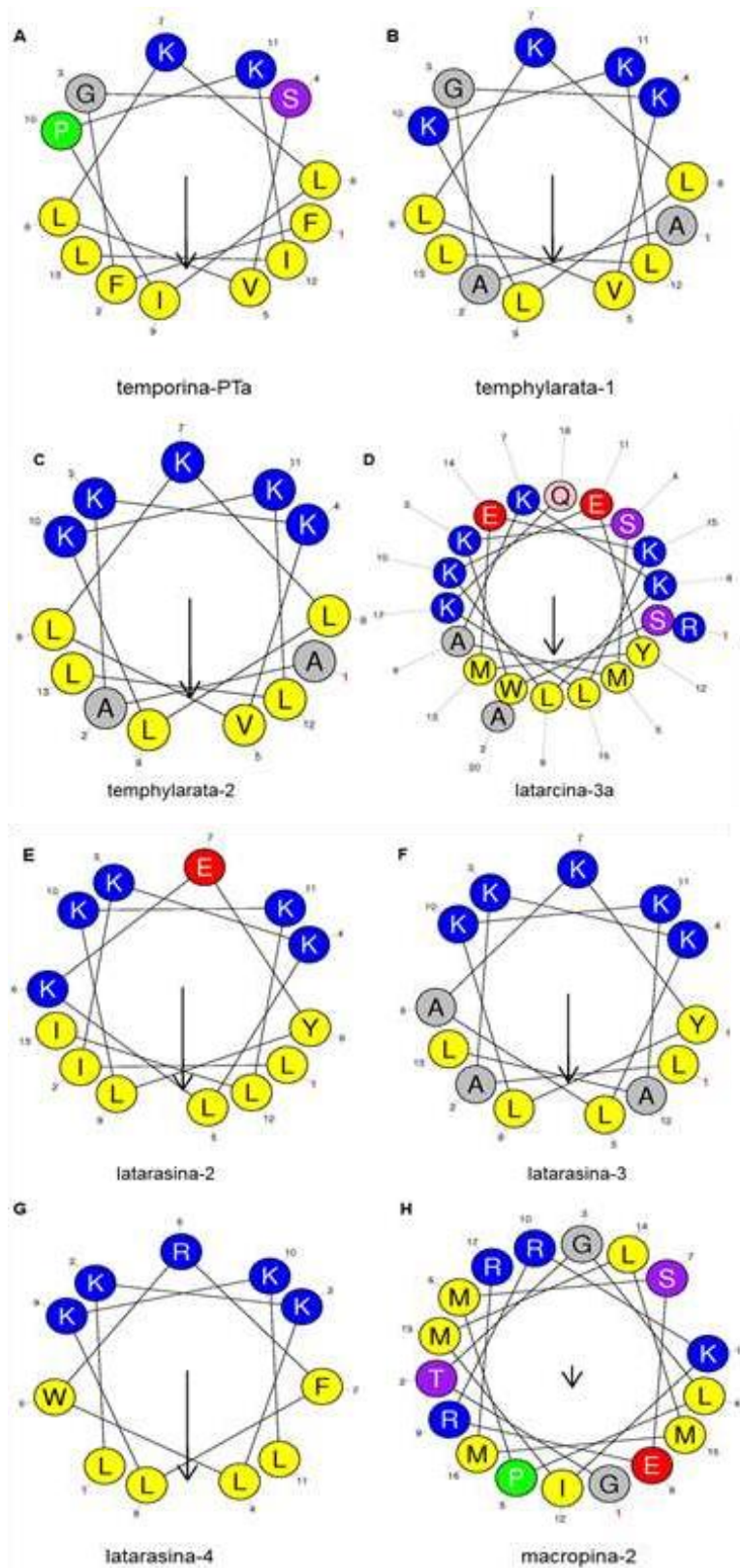
O ensaio hemolítico foi desenvolvido conforme Kim e colaboradores (2005), com algumas modificações. Sangue fresco foi coletado de camundongos albinos da linhagem *Swiss (Mus musculus)*, centrifugado a 1600 rpm por 2 minutos, três vezes com tampão fosfato (50mm, pH 7,4). Alíquotas de 50 µL da suspensão de células a 1% foram incubadas com 50 µL de uma série de diluições das soluções peptídicas, variando de 4 a 128 µg.mL<sup>-1</sup>, em microplaca de 96 poços. A placa foi incubada à temperatura ambiente por uma hora. A hemoglobina liberada foi monitorada a 415 nm no leitor de microplacas BioRad. Triton X-100 (1%) foi utilizado como controle positivo, representando 100% de lise celular e tampão fosfato (0,01 M, pH 7,4) foi utilizado como controle negativo, representando 0% de hemólise. Esse experimento foi aprovado pelo CEUA com o número 014/2018, da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande, MS.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Características dos peptídeos

Os peptídeos temporina-PTa, temphylarata-1, temphylarata-2, latarcina-3a, latarasina-2, latarasina-3 ,latarasina-4 e macropina-2 foram utilizados nos ensaios frente a *P. acnes*. O diagrama de hélice dos peptídeos foi usado para segregar os resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos conforme Figura 3. Esses peptídeos apresentam em sua sequência cargas líquidas positivas, anfipacidade e hirofopacidade.

---



**Figura 4** - Os diagramas de hélices dos peptídeos usados (A) temporina-PTa, (B) temphylarata-1, (C) temphylarata-2, (D) latarcina-3a, (E) latarasina-2, (F) latarasina-3, (G) latarasina-4 e (H) macropina-2. Resíduos de aminoácidos carregados positivamente estão em azul, carregados negativamente em vermelho, alifáticos estão em amarelo e cinza.

A sequência controle de temporina-PTa (**FFGSVLKLIPKIL**) apresenta carga líquida +3 e hidrofobicidade 61%. A sequência temphylarata-1 (**AAGKVLKLLKLL**) apresentam alanina, apolar alifático, lisina, aminoácido carregado positivamente que confere sua carga de +4 a hidrofobicidade de 61%, e o momento hidrofóbico 0,66%. O segundoanálogo temphylarata-2 (**AAKKVLKLLKLL**) apresenta em sua sequência a mesma conformação do peptídeo temphylarata-1, sendo modificada, apenas, a glicina por uma lisina, assim sua carga líquida é de +5 a hidrofobicidade 61% e o momento hidrofóbico de 0,72%. O peptídeo antimicrobiano latarcina-3a (**SWKSMAKKLKEYMEKLRQRA**) possuiu sua estrutura helicoidal com momento hidrofóbico de 0,575, carga +6 e hidrofobicidade de 35%.

A latarasina-2 (**LIKKLKEYLKKLI**) apresenta +4, sua hidrofobicidade é de 43% e o momento hidrofóbico em 0,84 tem lisinas em uma face e em outra com leucinas e isoleucinas.

A latarasina-3 (**LAKKLAKYLKKAL**) apresenta +5, sua hidrofobicidade é de 53% e o momento hidrofóbico em 0,70 os aminoácidos então distribuídos em uma face de lisinas e outra face com alaninas e leucinas.

A latarasina-4 (**LKKLWRFLKKL**) apresenta carga de +4, sua hidrofobicidade é de 54% e o momento hidrofóbico em 0,91 tem em sua conformação uma face de peptídeos carregados positivamente com lisinas e uma arginina e outra face com aminoácidos .

A macropina-2 (**GTGLPMSERRKIMLMMR**) apresenta uma carga líquida de +4 a sua hidrofobisidade de 41% e o momento hidrofóbico em 0,17, os aminoácidos estão espacialmente fora da anfipacidade. (Tabela 1).

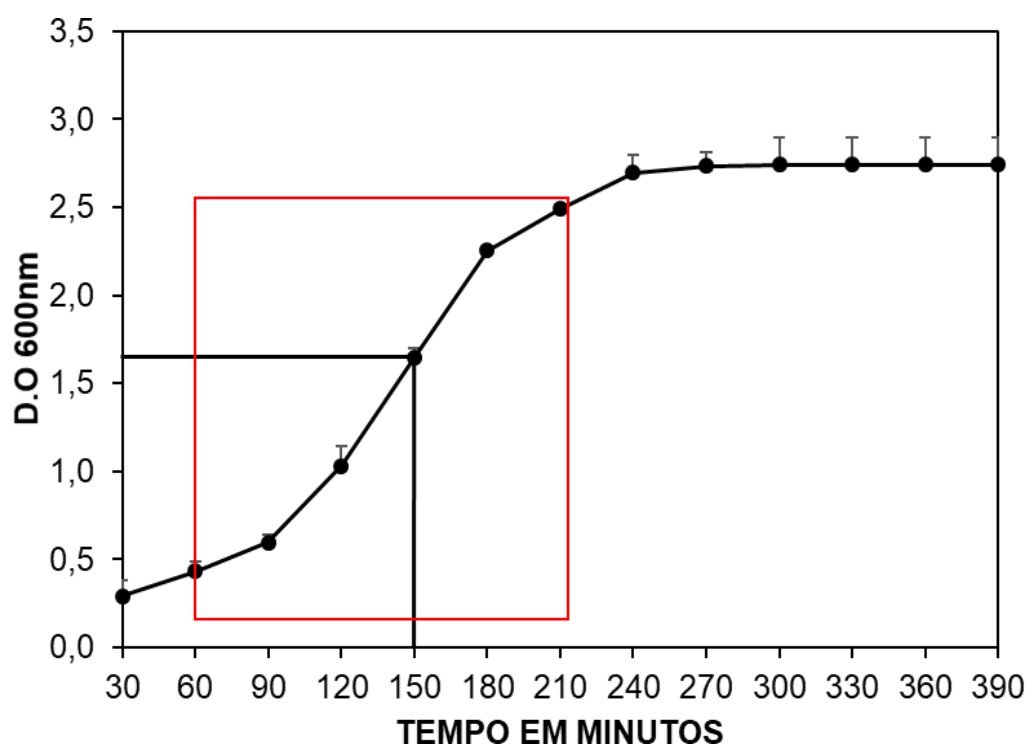
---

**Tabela 1** - Comparação entre as sequências dos peptídeos estudados: temporina-PTa, temphylarata-1, -2 e latarsina-3a, latarcina -2, -3 e -4. **Z**-Carga líquida total, **H**- Hidrofobicidade,  **$\mu$ H**-Momento hidrofóbico (valores dados em %) e **MM**-massa molecular, respectivamente.

Peptídeos	Sequência	<Z>	<H%>	$\mu$ H>	MM (Da)
temporina-	FFGSVLKLIPKIL	+3	61	0,72	1473.0
temphylarata-1	AAGKVLKLLKKLL	+4	61	0,66	1394.8
temphylarata-	AAKKVLKLLKKLL	+5	61	0,72	1465.9
latarcina-3a	SWKSMAKKLKEYMEKLLKQRA	+6	35	0,57	2484,0
latarasina-2	LIKLLKEYLKKLI	+4	43	0,84	1630,1
latarasina-3	LAKKLAKYLKKAL	+5	53	0,70	1487,9
latarasina-4	LKKLWRFLKKL	+5	54	0,91	1472,9
macropina-2	GTGLPMSERRKIMLMR	+4	41	0,17	1416.0

## 5.2. Curva de crescimento da *P. acnes*

A padronização da curva de crescimento da bactéria *P. acnes* demonstrou uma curva favorável para o crescimento no meio de cultura utilizado o TSB. De acordo com a curva, observa-se que de 30 a 120 min o microrganismo estudado se encontra na fase log, na qual a bactéria está em adaptação metabólica ao novo ambiente. De 120 a 330 min, a fase lag, em que há a divisão máxima, onde o número de células dobra a cada geração, foi possível achar a densidade óptica do crescimento da bactéria, que foi de 1,6 (Figura 4). Após 336 min, a bactéria entra na fase estacionária, na qual há escassez de nutriente, e o número de células vivas é igual ao número de células mortas



**Figura 5** - Curva de crescimento. O quadrado em vermelho mostra a fase log do crescimento das *P. acnes*, e as linhas apresentam o ponto da D.O e o tempo.

## 5.3. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Os resultados provenientes dos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) demonstra que o peptídeo temporina-PTa não apresentou atividade para a bactéria *P. acnes* e não foi bactericida. Os peptídeos temphylarata-1 e temphylarata-2 tiveram os mesmos resultados de CIM em 43  $\mu$ M, e demonstraram atividade bactericida na mesma concentração de 87  $\mu$ M. O peptídeo latarcina-3a não demonstrou atividade frente

ao microrganismo testado mesmo na maior concentração. Em contrapartida, os peptídeos latarasinas análogos inibiram o crescimento da bactéria em menores concentrações, a latarasina-2 inibiu em 19,6  $\mu\text{M}$ , a latarasina-3 inibiu em 10,8  $\mu\text{M}$  e a latarasina-4 inibiu em 2,7  $\mu\text{M}$  (tabela 2). A macropina-2 apresentou uma inibição do crescimento bacteriano em 39,2  $\mu\text{M}$  e bactericida em 79,4  $\mu\text{M}$ , os peptídeos não foram hemolíticos em hemácias de mamífero.

**Tabela 2** - Atividade antimicrobiana de peptídeos sintéticos frente a *P. acnes*, com as concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) e os resultados hemolíticos apresentados em  $\mu\text{M}$ . O valor nd corresponde a não determinado.

	<b>Peptídeos</b>	<b>CIM</b>	<b>CBM</b>	<b>Hemolítico</b>
<b>Pta</b>	<b>temporina-</b>	(86,9 $\mu\text{M}$ )	nd	(87 $\mu\text{M}$ )
	<b>temphylarata-</b>	(45,9 $\mu\text{M}$ )	(91,8 $\mu\text{M}$ )	(87 $\mu\text{M}$ )
<b>1</b>	<b>temphylarata-</b>	(43,7 $\mu\text{M}$ )	(87,4 $\mu\text{M}$ )	(87 $\mu\text{M}$ )
<b>2</b>	<b>latarcina-3a</b>	(51,5 $\mu\text{M}$ )	(51,5 $\mu\text{M}$ )	(51,5 $\mu\text{M}$ )
	<b>latarasina-2</b>	(19,6 $\mu\text{M}$ )	(19,6 $\mu\text{M}$ )	(78,4 $\mu\text{M}$ )
	<b>latarasina-3</b>	(10,8 $\mu\text{M}$ )	(10,8 $\mu\text{M}$ )	(86,4 $\mu\text{M}$ )
	<b>latarasina-4</b>	(2,7 $\mu\text{M}$ )	(2,7 $\mu\text{M}$ )	(86,4 $\mu\text{M}$ )
	<b>macropina-2</b>	(39,2 $\mu\text{M}$ )	(79,4 $\mu\text{M}$ )	(79,4 $\mu\text{M}$ )



## 6. DISCUSSÃO

Os peptídios antimicrobianos (AMPs) são moléculas constituintes do sistema imunológico de indivíduos multicelulares. Tais moléculas são consideradas excelentes candidatas para o desenvolvimento de novos antimicrobianos devido à sua estrutura secundária e às suas características químicas como hidrofobicidade, catiogenicidade e anfipaticidade ( ZASLOFF, 2002; WANG, 2010; DA SILVA; MACHADO; HANEY; MANSOUR; HANCOCK, 2017).

Estudos mostram que o momento hidrofóbico, juntamente com hidrofobicidade e carga líquida apropriadas, aumenta a probabilidade do peptídeo adotar uma conformação  $\alpha$ -helicoidal, melhorando a interação com membranas e, conseqüentemente, a atividade antimicrobiana (MIGLIOLO *et al.*, 2016). No presente estudo, todos os (AMPs) caracterizados demonstraram ótimas hidrofobicidades, sendo os peptídios laterasina-2 e laterasina-4 as moléculas que apresentaram os maiores momentos hidrofóbicos e também as que demonstraram maior atividade antimicrobiana frente à *P. acnes*.

Poucos estudos realizados até o momento relatam que peptídeos anfipáticos, com uma quantidade razoável de resíduos hidrofóbicos, podem se interagir na membrana da bactéria de maneira aleatória, potencializando a atividade frente a bactérias (PRÉVOST *et al.*, 2018).

A laterasina-4 foi o peptídeo que apresentou uma inibição de 100% em uma concentração de 2,7  $\mu$ M, cujo desempenho pode estar relacionado à distribuição dos seus aminoácidos. Peptídeos da família das laterasinas são caracterizados por uma forte carga catiônica e por uma distribuição dos resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos que favorece uma anfipaticidade secundária e formação de uma  $\alpha$ -hélice no microambiente de membrana. Essa relação entre sequência primária e estrutura tridimensional confere ao peptídeo laterasina-3a um mecanismo de ação do tipo modelo carpete (KOZLOV *et al.*, 2006).

Syed *et al.* (2018) demonstram que as propriedades antimicrobianas dos peptídeos obtidos de veneno de animais peçonhentos estão ligadas à inibição da ATP sintase bacteriana. Além disso, a inibição seletiva da ATP sintase pelos peptídeos de veneno sugere uma alternativa viável para combater infecções microbianas resistentes a antibióticos, o que corrobora com os resultados apresentados neste estudo.

A temporina-PTa é um peptídeo antimicrobiano natural da rã *Hylarana picturata*, com 13 resíduos de aminoácidos, estrutura alfa-hélice, com +3 de carga, 61% de hidrofobicidade, sendo que sua atividade é mais focada em bactérias gram-positivas como *S. aureus* (Conlon *et al.*, 2008). Os peptídeos temporina-PTa, temphylarata-1 e temphylarata-2 apresentaram CIM apenas em altas concentrações diferentemente dos resultados apresentados por Popovic *et al.*, (2012) e Urbán *et al.*, (2007), o quais testaram o potencial antimicrobiano de peptídeos derivados de pele de sapo, apresentando baixa CIM frente à bactéria *P. acnes*.

Na presente pesquisa, a macropina-2 exibe uma carga líquida de +4 e hidrofobicidade em 41%, e o seu momento hidrofóbico está em 0,17. Seus aminoácidos estão espacialmente fora da anfipaticidade, e apresentou CIM em altas concentrações 39,2  $\mu$ M e CBM em 79,4  $\mu$ M. Barros e Macedo (2017) relatam que a macropina obtida da *Macropis fulvipes* apresenta grande potencial frente a cepas bacterianas Gram-negativa, bem como em Gram-positiva. Foi possível observar que, mesmo em grandes concentrações, houve inibição e

efeito bactericida, o que pode estar correlacionado ao seu momento hidrofóbico e à sua anfipacidade.

---

## 7. CONCLUSÃO

Entre os peptídeos selecionados, o resultado bactericida é atribuído para temphylarata -1 e -2, latarasina-2, -3, e -4. Igualmente ativo, o peptídeo macropina-2 apresentou uma inibição e ação bactericida, com relato inédito para essa finalidade. Ao comparar a ação entre os peptídeos ativos, a latarasina-4 demonstra ser o melhor candidato para desenvolver biofármacos no combate e tratamento de *P. acnes*.

A latarasina-4 é o peptídeo que apresenta grande potencial para a produção de uma linha de cosmético, para prevenir, tratar e controlar o grau leve *P.acnes*, bem como, desenvolver cosmecêuticos, para tratar o grau moderado e até mesmo medicamento de alta qualidade e biotecnologia, sem os efeitos colaterais dos fármacos usuais. Sua característica de ação tem efeito direto sobre as glândulas sebáceas, e assim ação direta na bactéria. Entretanto, são necessários outros estudos para que se concretize essa realidade.

---

## 8. BIBLIOGRAFIA

ÁBILA, C. M. S.; MARTINS, R. M. K. Tratamento da acne com ativos da Amazônia.. **Revista Personalité**, São Paulo, p. 10-20, jan 2009.

ALBA, M. N. **AVALIAÇÃO CLÍNICA DAS TÉCNICAS DE PEELING COM ÁCIDO SALICÍLICO E DE FOTOTERAPIA PARA TRATAMENTO DE ACNE VULGAR GRAUS I E II EM ADOLESCENTES**.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Sorocaba.. Sorocaba - SP, p. 85. 2015.

AOKI, H.; OKUHARA, M. Natural beta-lactam antibiotics.. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 34, n.1, p. 159-181, 1980.

ASKARI et al. Association between Acne and Serum Pro-inflammatory Cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-12 and RANTES) in Mustard Gas-Exposed Patients: Sardasht-Iran Cohort Study. **Arch Iran Med.** , v. 20, n.2, p. 86-91, Feb 2018.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides.. **Pharmaceuticals** , Basel, Switzerland, n. 6, n.12, p. 1543–1575, 2013.

BARROS, M. P. D. **Venenos como fonte de moléculas ativas contra biofilmes bacterianos patogênicos**. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (Tese de Doutorado) - Faculdade de Farmácia Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Porto Alegre, p. 128. 2017.

BEYLOT, C. et al. Propionibacterium acnes: an update on its role in the pathogenesis of acne. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 28, p. 271-278, 2014.

BOTROS, P. T. G. P. G. Evaluation and Management of Acne. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 42, p. 465-471, 2015.

BRITO, M. D. F. D. M. et al. Avaliação dos efeitos adversos clínicos e alterações laboratoriais em pacientes com acne vulgar tratados com isotretinoína oral. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n.3, p. 331-337, 2010.

BRITO, M. F. M. et al. Avaliação dos efeitos adversos clínicos e alterações laboratoriais em pacientes com acne vulgar tratados com isotretinoína oral.. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n.3, p. 331-337, 2010.

---

CAPDEVILA, E. F. Tratamiento de la acné juvenil. **Formación continuada endermatologia (PIEL)**, v. 29, n.6 , p. 375- 381, 2014.

CLSI, C. A. L. S. I. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standand-Tenth Edition. **Wayne, CLSI document M02-A10**, 2009.

COICO, R.; SUNSHINE, G. Immunology: a short course.. **John Wiley & Sons**, v. 1, 2015.

COSTA, M. M. D. **Estudo de viabilidade de um protótipo integrado para o diagnóstico e tratamento da acne por técnicas ópticas**. Tese de Doutorado Universidade de São Paulo. São Carlos, SP, p. 158. 2015.

DA SILVA, A. M. F.; DA COSTA, F. P.; MOREIRA, M. Acne vulgar: diagnóstico e manejo pelo médico de família e comunidade. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 9, n.30, p. 54-63, 2014.

DA SILVA, F. P.; MACHADO, M. C. C. Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications.. **Peptides**, v. 36, n.2, p. 308-313, 2012.

DELGADO, I. L. L. **Avaliação do efeito antimicrobiano e anti-inflamatório de derivados furoxânicos e benzofuroxânicos como alternativa para o tratamento da acne vulgar. Dissertação (Mestrado)**. Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, p. 96. 2017.

DEZANI, A. B. Avaliação in vitro da solubilidade e da permeabilidade da lamivudina e da zidovudina. Aplicações na classificação biofarmacêutica. **PhD Thesis - Universidade de São Paulo**, 2010.

DJ, C. et al. The future of peptide-based drugs. *Chemical biology & drug design*, v. 81, n.1, p. 136-147, 2013.

DORNELLES, M. F.; MARQUES, M. D. G. B.; RENNEN, M. F. Revisão sobre toxinas de Anura (Tetrapoda, Lissamphibia) e suas aplicações biotecnológicas. **Ciência em Movimento**, v. 12, n. 24, p. 103-113, 2010.

ELDER, D. E. L. *Histopatologia da Pele*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

FIGUEIREDO, A. Avaliação e tratamento do doente com acne – Parte I: Epidemiologia, etiopatogenia, clínica, classificação, impacto psicossocial, mitos e realidades, diagnóstico diferencial e estudos complementares.. **Rev. Port. Clin. Geral**, v. 27, p. 59-65, 2011.

---

FINNEGAN, S.; PERCIVAL, S. L. EDTA: An Antimicrobial and Antibiofilm Agent for Use in Wound Care. **Advances in Wound Care**, v. 4, n7, p. 415–421, 2015.

FITZ-GIBBON, S. et al. Propionibacterium acnes strain populations in the human skin microbiome associated with acne. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n.9, p. 2152-2160, 2013.

G, B. et al. Antimicrobial Peptides Against Microbial Biofilms: Advantages and Limits. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 256-279, 2011.

GIACHETTI, A. Acné Conceptos actuales. **Conexion pediátrica**, v. 1, n.2, p. 1-6, 2008.

GOMES, K. W. Acne. **Telecondutas Acne.**, Porto Alegre - RS, p. 13, 2017.

HALAL, J. **Tricologia e a Química Cosmética Capilar**. 1. ed. [S.l.]: Cengage CTP, 2011. ISBN 8522110891.

HALVORSEN, J. et al. Suicidal Ideation, Mental Health Problems, and Social Impairment Are Increased in Adolescents with Acne: A Population-Based Study.. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 2, p. 63-370, 2011. ISSN 0022-202X.

HANEY, E. F.; MANSOUR, S. C.; HANCOCK, R. E. Antimicrobial peptides: An introduction. In: Antimicrobial Peptides.. **Humana Press**, New York, NY, p. 3-22, 2017.

HANEY, E. F.; MANSOUR, S. C.; HANCOCK, R. E. Antimicrobial peptides: An introduction. In: Antimicrobial Peptides.. **Human Press, New York, NY**, p. 3-22, 2017.

ISMAIL, S. et al. Methodological issues in studying PAHSA biology: masking PAHSA effects. **Cell metabolism**, v. 28, n.4, p. 543-546, 2018.

ITOH, T. et al. Antimicrobial and anti-inflammatory properties of nostocionone isolated from Nostoc commune Vauch and its derivatives against Propionibacterium acnes. **Anaerobe.**, v. 27, p. 56-63, 2014.

JAHNS, A. C. . Simultaneous visualization of Propionibacterium acnes and Propionibacterium granulosum with immunofluorescence and fluorescence in situ hybridization. **Anaerobe**, v. 23, p. 48-54, 2013.

KANG, S. et al. Antimicrobial peptides: therapeutic potentials. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 12, n.12, p. 1477-1486, 2014.

---

KAO, A. P.; CONNELLY, J. T.; BARBER, A. H. 3D nanomechanical evaluations of dermal structures in skin. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 57, p. 14-23, 2015.

KARIMKHANI, C. et al. Global Skin Disease Morbidity and Mortality An Update From the Global Burden of Disease Study 2013. **JAMA Dermatol.** , 2017.

KIM, J. K. et al. Púrpura trombocitopênica e anemia hemolítica auto-imune em pacientes internados com lúpus eritematoso sistêmico juvenil. **rev bras reumatol**, v. 47, n.1, p. 10-15, 2007.

KISTOWSKA, M. et al. Propionibacterium acnes promotes Th17 and Th17/Th1 responses in acne patients. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n.1, p. 110-118, 2015.

KOSMADAKI, M.; KATSAMBAS, A. Topical treatments for acne. **Clinics in Dermatology**, v. 35, p. 173-178, 2017.

KOZLOV, S. et al. Latarcins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaevi* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n.30, p. 20983-20992, 2006.

LEVIN, J. The relationship of proper skin cleansing to pathophysiology, clinical benefits, and the concomitant use of prescription topical therapies in patients with AcneVulgaris. **Dermatology Clinics**, v. 34, p. 133-145, 2016.

LIMA, L. A. F. Acne na mulher adulta e tratamento.. **Revista Médica da Santa Casa de Maceió**, Maceió, v. 1, n.1, p. 26-29, jan 2006.

LIU, X. et al. Feasibility of using optical coherence tomography to study the influence of skin structure on finger friction.. **Tribology International**, v. 63, p. 34-44, 2013.

LUCHESI, L. A.; CARLI, R. B. G. Sabonete de óleo de copaíba e própolis para o controle da acne. **Comestics & Toiletries**, São Paulo, v. 26, n.6, p. 60-68, dez 2014.

LYNN, D. D. et al. he epidemiology of acne vulgaris in late adolescence.. **Adolescent Health, Medicine and Therapeutics**, v. 7, p. 13-25, 2016.

MANDEL, D. E.; MALEMUD, C. J.; ASKARI, A. D. Idiopathic inflammatory myopathies: a review of the classification and impact of pathogenesis.. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n.5, 1084 2017.

---

MANFRINATO, G. L. **Acupuntura estética no tratamento da acne (estudo de caso). Monografia (Especialização em Acupuntura) – Instituto Brasileiro de Therapias e Ensino.** Maringá, p. 58. 2009.

MIGLIOLO, L. et al. Structural and functional evaluation of the palindromic alanine-rich antimicrobial peptide Pa-MAP2.. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1858, 7, p. 1488-1498, 2016.

MISERY, L. Consequences of Psychological Distress in Adolescents with Acne.. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n.12, p. 90-292, 2011. ISSN 0022-202x.

MURPHY, J. B.; KIES. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 45, p. 382-384, 1960.

MURPHY, K. Janeway's immunobiology.. **Garland Science**, New York, 2012.

NARAYANA, J. L.; CHEN, J. Y. Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents.. **Peptides**, v. 72, p. 88-94, 2015.

NEVES, J. R. et al. C.Propionibacterium acnes e a resistência bacteriana. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 3, n.7, Supl. 1, p. 27-38, 2015.

NEVES, J. R. et al. Propionibacterium acnes e a resistência bacteriana. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 3, n.7, Supl. 1, p. 27-38, 2015.

NGUYEN, F. et al. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. **Biological Chemistry**, v. 395, n5, p. 559-575, 2014.

OKAMOTO, K. et al. In vitro antimicrobial activity of benzoyl peroxide against Propionibacterium acnes assessed by a novel susceptibility testing method. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 22, n.6, p. 426-429, 2016.

OLIVEIRA, B. R. M. D. **LE'ACNE Inovação Cosmética para Tratamento da Acne.** Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do grau de Especialização em Tecnologia Cosmética ao IPUPO Educacional, através do MBA em Tecnologia Cosmética.. [S.I.], p. 54. 2015.

OLIVEIRA, D. E. L. A. Peptídeos antimicrobianos: biotecnologia aplicada a saúde.. **Revista de Saúde da Fiaciplac**, v. 1, n.1, ago-dez 2014.

PEREIRA, M. D. F. L. **Cosmetologia.** São Paulo: Difusão Editora, v. 1, 2013.

---



PILLAI, S.; ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. [S.l.]: Elsevier Brasil, v. 1, 2015.

POPOVIC, E. et al. Peptides with antimicrobial and anti-inflammatory activities that have therapeutic potential for treatment of acne vulgaris. **Peptides**, v. 34, n.2, p. 275–282, abr 2012.

PRETSCH, A. et al. Antimicrobial and Anti-Inflammatory activities of endophytic fungi *talaromyces wortmannii* extracts against Acne-inducing bacteria. **PLoS ONE**, v. 9, n.6, p. 1-12, 2014.

PUTAROV, T. V. **Avaliação de fontes de selênio e seus efeitos no perfil metabólico e condição reprodutiva de cães**.. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual Paulista. Botucatu - SP, p. 72. 2010.

RIBEIRO, F. M. **IRRADIAÇÃO DE SANGUE USANDO FONTE DE<sup>137</sup>Cs: DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA DE VIAS E GENES RELACIONADOS À SUPERFAMÍLIA B7-CD28/CTLA4**. Dissertação - Instituto de Matemática, Estatística e Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, p. 100. 2017.

ROSENTHAL, M. et al. Skin micro-biota: microbial community structure and its potential association with health and disease. **Infect Genet Evol**, v. 11, p. 839–848, 2011.

SANTOS, E. M. D. **Avaliação da atividade microbiana in vitro do peptídeo Lrot3.6 nanoencapsulado frente às bactérias E. coli, S. aureus e S. epidermidis**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Juiz de Fora. Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia. Juiz de Fora. Juiz de Fora, p. 113. 2018.

SCIPIONI G., M. G. S. B. Acne e dieta: uma revisão.. **Nutrire.**, v. 40, n.1, p. 104-109, apr 2015.

TAMAI, I. et al. Stereospecific absorption and degradation of cephalexin. **J. harm Pharmacol**, London, v. 40, p. 320-324, 1988.

TUCHAYI, S. M. et al. Acne Vulgaris. **Disease primers**, v. 1, p. 1-20, 2015.

URBÁN et al. Activities of four frog skin-derived antimicrobial peptides (temporin-1DRa, temporin-1Va and the melittin-related peptides AR-23 and RV-23) against anaerobic bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, n.3, p. 317–321, mar 2007.

---

VAZ, A. L. Acne vulgar: bases para o seu tratamento. **Rev Port Clin Geral** , v. 19, p. 561-70, 2004.

VOLP, A. C. P. et al. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica.. **Arq Bras Endocrinol Metab** , São Paulo, v. 52, n. 3, abr 2008.

WANG, T. et al. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 44, p. 18979-18984, 2010.

WILLIAMS HC, D. R. G. S. Acne vulgaris. **Lancet.**, jan, v. 379, n. 9813, p. 361-372, 2013.

WILLIAMS, K. B. A. H. C. Epidemiology of acne vulgaris.. **British Association of Dermatologists**, Nottingham, v. 168, p. 474–485, 2013.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance.. **Pharmacological reviews**, v. 55, n.1, p. 27-55, 2003.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n.6870, p. 389, 2002.

---