

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de lisozimas

Gabriele Wander Ruas

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Telma Mary Kaneko

SÃO PAULO

2010

GABRIELE WANDER RUAS

Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de lisozimas

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Fármaco e Medicamentos

Área de concentração: Produção e Controle
Farmacêuticos

Orientador: Prof^a Dr^a Telma Mary Kaneko

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Ruas, Gabriele Wander

R894a Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de
lisozimas / Gabriele Wander Ruas. -- São Paulo, 2010.
80p.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.

Orientador: Kaneko, Telma Mary

1. Droga: Controle biológico e qualidade 2. Enzima:
Biotecnologia 3. Cosméticos: Microorganismo :
Contaminação I. T. II. Kaneko, Telma Mary,
orientador.

615.19015 CDD

Gabriele Wander Ruas

Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de lisozimas

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dr^a. Telma Mary Kaneko

Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, ___ de _____ de 2010.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, minha irmã e meus amigos: sempre me incentivando a alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo concedida.

Ao Professor Sandro Roberto Marana do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Química pelo auxílio indispensável na realização deste trabalho.

Ao Fábio Kendi Tamaki pelo auxílio na execução deste projeto.

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia: Nadia Michtchenko Henriques, Lúcio Mário Ferreira de Mendonça, Fabiane Chaves Cançado, Maira Artischeff Frutuoso, Larissa Martins Gonçalves.

A Dr^a Mônica Mathor do Laboratório de XXXX do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pelo auxílio na realização dos ensaios de citotoxicidade.

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos: José de Sousa, Wagner Magalhães, Delia Luna, Cibele Ferelli, Márcia Lombardo, Elissa Ostrosky, Vânia Leite, Elda Marcondes, Juliano Moraes, Irene Satiko, Rafael Takamoto, Wesley Oliveira, Miriam Matuo, Áurea Lacerda, Glaucia Santos e Túlia Botelho pelas conversas descontraídas e pelo incentivo constante.

Aos colegas do departamento: Claudinéia Pinto, Michele Issa, Marcelo Dutra, Andrea Takahashi, Patricia Granizo, Paula Prestes, Débora Nishikawa, Tatiana Balough, Carla Moraes, Robson Gama, Vanessa Tavares e Carolina Zanolini pela convivência.

A Prof^a Dr^a Terezinha de Jesus Andreoli Pinto pelas palavras de incentivo e ensinamentos passados.

As minhas amigas Natália Menves e Patrícia Lopes.

Ao Jorge e Elaine, funcionários da secretaria de pós-graduação, assim como todos os funcionários da secretaria de departamento pelo pronto apoio e esclarecimento de dúvidas.

As minhas amigas que sempre me ajudaram nos momentos difíceis e comemoraram os de alegria passados nesse período.

A minha irmã, Luiza Wander Ruas, pela amizade e companheirismo.

Aos meus pais, Amilton Camillo Ruas e Rosângela Maria Wander Ruas, pelo suporte e incentivo na realização de mais essa etapa de minha vida.

Agradeço especialmente a minha orientadora Prof^a Dr^a Telma Mary Kaneko pelos ensinamentos, pelo apoio constante e pela amizade tão querida.

A todos aqueles que colaboraram de maneira direta ou indireta para a execução deste trabalho: Muito obrigada!

EPÍGRAFE

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana.”

Louis Pasteur

RESUMO

RUAS, G.W. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de lisozimas.** 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O aumento na procura por produtos naturais pelo mercado farmacêutico, cosmético e alimentício demanda pesquisas no desenvolvimento desses produtos. Esses são direcionados à obtenção de substâncias de origem vegetal ou animal, assim como, para produtos biotecnológicos. Investigações quanto à atividade antibacteriana de proteínas e peptídeos são realizadas. Dentre essas substâncias, podemos citar as lisozimas, proteínas que hidrolisam as ligações β 1-4 glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina, presentes no peptidoglicano da parede celular bacteriana. Além disso, apresentam atividade de quitinase, ou seja, quebram a ligação glicosídica da quitina presente na parede fúngica. As lisozimas apresentam alta especificidade pela parede microbiana indicando aparente ausência de efeitos tóxicos aos humanos. Assim, tornando-a candidata a agente antimicrobiano em formulações cosméticas e farmacêuticas. A lisozima de ovo de galinha tem atividade antimicrobiana, entretanto não havia estudos relacionados com os micro-organismos contaminantes normalmente encontrados em produtos farmacêuticos e cosméticos. Além disso, a lisozima recombinante de *Musca domestica* (MdL1) não possui ainda sua atividade antimicrobiana definida. Os objetivos do trabalho foram: 1) Obtenção da lisozima recombinante de *Musca domestica* (MdL1); 2) Avaliação a atividade antimicrobiana da MdL1 e de lisozima de ovo de galinha, *Hen Egg White Lysozyme* (HEWL), frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Micrococcus luteus* (ATCC 4698), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* (ATCC 16404); 3) Avaliação da toxicidade da lisozima em cultura de células de fibroblastos (ATCC CCL-92). A MdL1 foi obtida por meio de expressão gênica em *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen), concentrada utilizando polietilenoglicol 6000 e dialisada contra água deionizada através da membrana com porosidade seletiva de 12kDa. A homogeneidade foi analisada por eletroforese em gel de poli(acrilamida) em condições desnaturantes; e a atividade catalítica foi avaliada utilizando células liofilizadas de *Micrococcus luteus* como substrato. A atividade antimicrobiana foi determinada por método específico para cada enzima. A toxicidade *in vitro* das amostras foi avaliada pela viabilidade celular de fibroblastos ATCC CCL-92. A MdL1 obtida apresentou características de homogeneidade adequadas e atividade de 108,35 U/mg. A HEWL mostrou-se ativa contra *S. aureus*, *M. luteus* e *C. albicans*. A MdL1 apresentou-se ativa contra *M. luteus*, apenas. Devido a ausência de atividade antimicrobiana a MdL1 não foi submetida a avaliação citotóxica. Em relação à HEWL não demonstrou citotoxicidade na avaliação prévia realizada.

Palavras Chaves: lisozima de ovo de galinha, lisozima recombinante de *Musca domestica* (MdL1), atividade antimicrobiana; citotoxicidade

ABSTRACT

RUAS, G.W. **Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of lysozymes**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The increase in the search for natural products by pharmaceutical, cosmetic and food markets requires researches in these products development. These are directed to obtaining substances of vegetal or animal origin, as well as biotechnological products. The research in relation to antibacterial activity of proteins and peptides is carried out. Among these substances, it is possible to mention the lysozyme, protein that catalyze the break of 1,4-beta-D glucosidic bond between N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine which are present in peptidoglycane of the bacterial cell wall. Besides, there is chitinase activity, that is, they break the glycosidic bond of chitin which is present in fungal wall. The lysozymes show high specificity by microbial wall indicating apparent absence of toxicological effects to human beings. Therefore, it becomes the candidate to antimicrobial ingredient in cosmetic and pharmaceutical dosage forms. The hen egg white lysozyme has antimicrobial activity, however there were no studies related to spoiled microorganism usually found in pharmaceutical and cosmetic products. In addition, there were not studies about microbial activity of recombinant *Musca domestica* lysozyme 1 (MdL1). The aim of this research was: 1) To obtain MdL1; 2) Evaluation of MdL1 and hen egg white lysozyme (HEWL) antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Micrococcus luteus* (ATCC 4698), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* (ATCC 16404); 3) Evaluation of lysozyme toxicity in fibroblast cells culture (ATCC CCL-92). The MdL1 was expressed as recombinant protein in *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen), concentrated using polyethylene glycol 6000 and dialyzed against deionized water through the selective porosity of 12kDa membrane. The homogeneity was analyzed by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the catalytic activity was evaluated using lyophilized cells of *Micrococcus luteus* as substrate. The antimicrobial activity was evaluated using specific methods for each enzyme. The sample toxicity was evaluated by cell viability using ATCC CCL-92 fibroblasts. The MdL1 obtained presented suitable homogeneity characteristics and activity of 108.35 U/mg. The HEWL has showed activity against *S. aureus*, *M. luteus* e *C. albicans*. MdL1 only showed activity against *M. luteus*. Due to the absence of antimicrobial activity of MdL1 in the evaluated concentration it was not submitted to the cytotoxicity test. Regarding HEWL, it has not showed cytotoxicity in the previous test.

Key words: Hen Egg White lysosome, *Musca domestica* recombinant lysozyme, antimicrobial and toxicity activity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura cristalográfica da lisozima de ovo de galinha, difração de raio-x com resolução de 1,29Å (CARPENTIER et al, 2010)	25
Figura 2 - Estrutura cristalográfica da lisozima 1 de <i>Musca domestica</i> (MdL1), difração de raio-x com resolução de 1,92Å (MARANA et al, 2006)	27
Figura 3 - Esquema da técnica de clonagem de DNA	33
Figura 4 - Imagem do crescimento da linhagem celular 3T3 (ATCC CCL-92) em baixa densidade (A) e alta densidade (B)	36
Figura 5 - Fluxograma geral da produção, purificação e análise da pureza da lisozima recombinante de <i>Musca domestica</i>	44
Figura 6 - Fluxograma do método 1 para determinação da atividade antimicrobiana da lisozima recombinante de <i>Musca domestica</i> (MdL1)	51
Figura 7 - Esquema do ensaio para determinação da atividade antimicrobiana da lisozima de ovo de galinha na microplaca de 96 poços	54
Figura 8 - Esquema do ensaio de citotoxicidade na placa de 96 poços (NIH, 2001)	57
Figura 9 - Gel de poliacrilamida da lisozima de <i>Musca domestica</i> (MdL1) após o processo de purificação. Do lado esquerdo da imagem observa-se o padrão de peso molecular. Do lado direito na parte inferior da imagem observam-se a banda correspondente à amostra de lisozima de <i>Musca domestica</i>	59
Figura 10 - Inibição do crescimento, em log de UFC/mL, de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538), pelo método de pré-incubação com diferentes tratamentos	61
Figura 11 - Comportamento da suspensão de <i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 4698) em suspensão no meio de solução salina	62

Figura 12 - Gráfico de atividade catalítica da lisozima recombinante de <i>Musca domestica</i> – MdL1 em absorbância a 650 nm, utilizando suspensão de células liofilizadas de <i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698	63
Figura 13 - Porcentagem de inibição do crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 com carga microbiana de 10^5 UFC/mL, frente à cloranfenicol 0,05mg/mL (controle de inibição de crescimento), solução salina (controle de crescimento - CC) e soluções de lisozima de ovo de galinha nas concentrações de 5; 7,5 e 10mg/mL. Meio de cultura estéril (CM) foi utilizado como branco	65
Figura 14 - Porcentagem de inibição do crescimento de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, com carga microbiana de 10^5 UFC/mL, frente à nistatina 0,05mg/mL (controle de inibição de crescimento), solução salina (controle de crescimento) e soluções de lisozima de ovo de galinha nas concentrações de 5 e 10mg/mL. Meio de cultura estéril (CM) foi utilizado como branco	66
Figura 15 - Porcentagem de inibição do crescimento de <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698, com carga microbiana de 10^4 UFC/mL, frente à cloranfenicol 0,05mg/mL (controle de inibição de crescimento), solução salina (controle de crescimento) e soluções de lisozima de ovo de galinha nas concentrações de 5 e 10mg/mL. Meio de cultura estéril (CM) foi utilizado como branco	67
Figura 16 - Porcentagem de viabilidade celular após 24 horas de contato com a lisozima de ovo de galinha	68
Figura 17 - Porcentagem de viabilidade celular após 48 horas de contato com a lisozima de ovo de galinha	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peptídeos e proteínas antimicrobianos 21

Tabela 2. Fármacos obtidos pela tecnologia do DNA recombinante, utilizando diversos sistemas de expressão 32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATCC – *American Type Culture Collection*
- BHK - *Baby Hamster Kidney* – Células derivadas de rim de hamster jovem
- BMM - *Buffered minimal metanol* - Meio mínimo contendo metanol
- CECT - *La Colección Española de Cultivos Tipo*
- CHO - *Chinese Hamster Ovary* – células derivadas do ovário de hamster chinês
- DMEN - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – Meio de cultura para células de mamíferos
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- DSM – *Deutsche Sammlung für Mikroorganismen*
- EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* - ácido etilendiamino tetraacético
- FSH - *Follicle-stimulating hormone* – Hormônio folículo estimulante
- HEWL - *Hen Egg White Lysosime* – Lisozima de ovo de galinha
- HNP – *Human neutrophil peptide* – Peptídeo de neutrófilo humano
- IFO – *Institute of Fermentation Osaka*
- LB Broth - Meio líquido Lúria Bertani
- LB Agar - Ágar Luria Bertani
- MD - *Minimal dextrose* - Meio mínimo contendo dextrose
- MIC – *Minimal Inhibitory Concentration* – Concentração mínima inibitória

- NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
- PAGE – *Polyacrylamide gel electrophoresis* – Eletroforese em gel de poliacrilamida
- PEG – Polietilenoglicol
- RNA – Ácido ribonucléico
- SDA - *Sabouraud dextrose agar* - Ágar Sabouraud contendo dextrose
- SDB - *Sabouraud dextrose broth* - Meio líquido Sabouraud contendo dextrose
- SDS – *Sodium dodecil sulfate* - Duodecil sulfato de sódio
- TSA - *Tripsin soy agar* - Ágar caseína soja
- TSB - *Tripsin soy broth* - Meio líquido caseína soja
- UFC – Unidade formadora de colônia
- YNB - *Yeast nitrogen base* - Meio mínimo de suplemento de nitrogênio para levedura
- YPD Agar - *Yeast extract peptone dextrose* - Ágar contendo extrato de levedura, peptona e dextrose
- YPD Broth - *Yeast extract peptone dextrose* - Meio líquido contendo extrato de levedura, peptona e dextrose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3 OBJETIVO	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Material	40
4.2 Métodos	43
4.2.1 Produção, purificação e análise da pureza da lisozima recombinante	43
4.2.1.1 Expressão heterogênea e purificação da lisozima recombinante	45
4.2.1.1.1 Preparo de células competentes	45
4.2.1.1.2 Eletroporação da <i>Pichia pastoris</i>	46
4.2.1.1.3 Produção e purificação da proteína heteróloga	46
4.2.1.2 Determinação da homogeneidade da proteína recombinante por análise eletroforética	47
4.2.1.3 Determinação da concentração de proteína	48
4.2.1.4 Ensaio de atividade enzimática da lisozima	48
4.2.1.5 Avaliação da esterilidade	48
4.2.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) das lisozimas	49
4.2.2.1 Desenvolvimento de metodologia para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) da MdL1	50

4.2.2.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória da HEWL.....	53
4.2.3 Avaliação da citotoxicidade da lisozima de ovo de galinha (HEWL).....	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
6 CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, é evidenciado o aumento na procura por produtos naturais pelo mercado consumidor. Para atender essa demanda, pesquisas são direcionadas à extração e/ou isolamento e identificação de substâncias químicas de origem vegetal ou animal, assim como, desenvolvimento de produtos biotecnológicos com potencial de aproveitamento pelas indústrias químicas, farmacêuticas, de cosméticos e outras de importância econômica (KABARA; ORTH, 1997; PINTO; KANEKO; PINTO, 2010; BABY et al., 2005; CHACRA; PINTO; KANEKO, 2007).

Dentre essas substâncias naturais, as proteínas e os peptídeos se destacam por serem comumente encontrados na natureza e pertencerem ao sistema imune inato de qualquer organismo. Proteínas e peptídeos de insetos, anfíbios, mamíferos, plantas e bactérias foram isolados e avaliados quanto atividade antibacteriana; dentre elas, a lisozima (KAMISZ, 2005a).

As lisozimas são conhecidas pelo seu papel na defesa do organismo contra as bactérias. Em alguns animais elas também desempenham um importante papel na digestão, como os ruminantes que possuem uma câmara de fermentação em seu tubo digestivo e dos insetos que se alimentam de bactérias presentes em material em decomposição. Em ambos, as lisozimas quebram a parede bacteriana facilitando a liberação dos seus componentes bacterianos (MARANA et al., 2006; CANÇADO et al., 2007).

As lisozimas catalisam a quebra das ligações β 1-4 glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina, presentes no peptidoglicano da parede celular bacteriana (JOLLÈS, 1964; MARANA et al., 2006). Também apresentam atividade de quitinase, ou seja, quebram a ligação glicosídica da quitina presente na parede fúngica (JOLLÈS; JOLLÈS, 1984; TERRA; FERREIRA, 2005). Essas enzimas são classificadas de acordo com a seqüência de aminoácidos e semelhança estrutural nas famílias 22, 23, 24, 25 e 73 das glicosídeo-hidrolases (COUTINHO; HENRISSAT, 1999). Membros da família 22 geralmente atuam no sistema de defesa contra bactérias, como a lisozima de ovo da galinha. No entanto,

outros componentes desta família, os quais apresentam alta atividade catalítica em pH ácido, desempenham um importante papel na digestão de bactérias em animais ruminantes e insetos detritívoros (CANÇADO et al., 2007).

As lisozimas atuam principalmente sobre bactérias gram-positivas, porém, segundo Ibrahim e colaboradores (1996), a lisozima de ovo de galinha quando desnaturada, por meio de aquecimento e mudanças de pH, tornam-se efetivas contra bactérias gram-negativas. A lisozima de ovo de galinha quando conjugada com ácido cafeico ou cinamaldeído possui atividade antimicrobiana aumentada contra *E. coli* quando comparada a lisozima livre (VALENTA; BERNKOP-SCHNÜRCH; SCHWARTZ, 1997; VALENTA; SCHWARTZ; BERNKOP-SCHNÜRCH, 1998).

Nos humanos, a lisozima está presente na pele, saliva, lágrima, urina, leite e secreções respiratórias e cervicais. Além da atividade antimicrobiana, a lisozima humana aumenta a atividade fagocítica de polimorfonuclear, leucócitos e macrófagos e estimula a proliferação de monócitos (NIYONSABA; OGAWA, 2005). É empregada como princípio ativo de medicamento para tratamento de acne induzida por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium* sp., ácaros e bactérias resistentes a antibióticos (MI AN, 2007). Existe no mercado brasileiro o medicamento Murazyme®, composto por cloridrato de lisozima utilizado para auxiliar o tratamento de lesões cutâneas e cutâneo-mucosas de etiologia herpética, piodermite, radiodermite, úlceras e fissuras do mamilo (DEF, 2007). A lisozima humana e a de ovo de galinha têm atividade antimicrobiana demonstrada frente a alguns micro-organismos, porém nenhum dos estudos apresentados avaliou os micro-organismos que são desafiados na avaliação da qualidade microbiana de produtos farmacêuticos e cosméticos, os quais são recomendados por compêndios (USP 31, 2008; CTFA, 2001). Ressalta-se que a lisozima recombinante de *Musca domestica* não possui ainda sua atividade antimicrobiana definida.

A especificidade das lisozimas de diversas origens, pela parede celular bacteriana e aparente ausência de efeitos tóxicos aos seres humanos as tornam candidatas a componentes antimicrobianos não só como fármaco, mas também como conservante de formulações farmacêuticas e cosméticas (VALENTA; SCHWARTZ; BERNKOP-SCHNÜRCH, 1998).

Os conservantes são usados em formulações cosméticas e farmacêuticas para prevenir e/ou inativar o crescimento de micro-organismos que alteram a estabilidade do produto ou causam infecções ao usuário. (KABARA; ORTH, 1997; PINTO; KANEKO; PINTO, 2010). Os conservantes sintéticos são substâncias intrinsecamente tóxicas, que podem provocar reações de hipersensibilidade ao usuário (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010). O emprego de antimicrobianos de origem natural (animal e vegetal) pode ser uma alternativa capaz de reduzir o potencial de toxicidade de formulações medicamentosas e cosméticas (KAMISZ, 2005b).

Neste contexto, esta pesquisa visou avaliar a ação antimicrobiana de lisozima de ovo de galinha e recombinante de *Musca domestica*, no intuito de encontrar agentes antimicrobianos eficazes para utilização em formulações farmacêuticas e cosméticas. Desta forma, procura-se, também, diminuir os problemas gerados por conservantes sintéticos e valorizar o emprego de conservantes naturais e biotecnológicos, que podem ainda favorecer uma melhor ação antimicrobiana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Peptídeos e Proteínas antimicrobianos

Para o tratamento de doenças infecciosas há a necessidade do uso de agentes capazes de atacar os invasores, como vírus, bactérias, protozoários, fungos e outros parasitas que geram diversas condições patológicas nos seres humanos (RANG et al., 2004).

O desenvolvimento desses agentes nos últimos 80 anos representa um dos mais importantes avanços na área terapêutica (RANG et al., 2004). Porém o uso indiscriminado de antibióticos foi um dos fatores que levou a seleção de cepas microbianas multi-resistentes a antibioticoterapia convencional. Por este motivo, a busca por novas substâncias antibióticas se faz necessária (PALUMBO et al., 2010).

Dentre essas novas substâncias, as proteínas e os peptídeos se destacam por serem comumente encontrados na natureza e pertencerem ao sistema imune inato de qualquer organismo. Proteínas e peptídeos de insetos, anfíbios, mamíferos, plantas e bactérias foram isolados e avaliados quanto atividade antibacteriana (KAMISZ, 2005a). São chamados de proteínas ou peptídeos antimicrobianos (AMP – *antimicrobial peptides or proteins*) e estas são geralmente moléculas catiônicas que interagem com o fosfolípide aniônico da membrana microbiana conferindo seletividade a mesma (PALUMBO et al., 2010). A sua seletividade frente à membrana microbiana, a rara indução à resistência microbiana e a capacidade de sinergia com antibióticos convencionais tornam os AMPs atrativos como agentes antimicrobianos (PALUMBO et al., 2010).

Puroindolinas, lactoferrina humana, lisozima humana e lisozima de aves (galinha, peru, pato e ganso) são exemplos de AMPs descritos na literatura. Na maioria das vezes a aplicação visa à conservação de alimentos (CONESA et al., 2008; WELLMAN-LABADIE; PICMAN; HINCKE, 2008; CEGIELSKA-

RADZIEJEWSKA; LESNIEROWSKI; KIJOWSKI, 2009). Entretanto, já existem relatos da utilização de AMPs na antibioticoterapia experimental (PALUMBO et al., 2010).

Por outro lado, os conservantes devem ser utilizados em formulações cosméticas e farmacêuticas para prevenir e/ou inativar o crescimento de micro-organismos que alteram a estabilidade do produto ou causam infecções ao usuário. (KABARA; ORTH, 1997; PINTO; KANEKO; PINTO, 2010). Porém, as substâncias atualmente disponíveis no mercado são intrinsecamente tóxicas que podem provocar reações de hipersensibilidade ao usuário (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010). Sendo a segunda causa mais comum de reações adversas ocasionadas por produtos cosméticos (ORTIZ, 2004).

O emprego desses antimicrobianos de origem natural (animal e vegetal) pode ser uma alternativa capaz de reduzir o potencial de toxicidade de formulações medicamentosas e cosméticas (KAMISZ, 2005b). Outro fator importante é a crescente demanda do mercado consumidor por produtos com apelo “natural” (IBARRA; JOHNSON, 2008), incentivando a pesquisa de novas substâncias antimicrobianas.

Na tabela abaixo (tabela 1) estão listados alguns exemplos de peptídeos e proteínas antimicrobianos, bem como seu espectro de ação microbiano.

Tabela 1 - Peptídeos e proteínas antimicrobianas

Peptídeo/ Proteína	Concentração	Espectro de ação	Comentários	Referência
Puroindolina A (PINA)	5 mg/animal			PALUMBO et al., 2010
Puroindolina B	5 mg/animal		Antibioterapia experimental em ratos para tratamento de infecção	
Lactoferrina bovina	1,25 mg/animal	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	causada por <i>L. monocytogenes</i>	
Lisozima de ovo de galinha	1,25 mg/animal			

Continua

Continuação

Lactoferrina humana recombinante	5 mg/mL	<i>E. coli</i> O157:H7 CECT 4267, ,	Estudo comparativo entre lactoferrina humana recombinante, lactoferrina do leite humano e seus hidrolisados.	CONESA et al., 2008
	1 mg/mL	<i>Salmonella</i> Enteritidis CECT 4155		
	1 mg/mL	<i>L. monocytogenes</i> 4b CECT 935		
Lisozima de ovo de galinha	50 µg/mL de lisozima conjugada com cinamaldeído	<i>E. coli</i> F82 (O101:K99)PR 9066 <i>S. aureus</i> DSM 1104	Avaliação da eficácia conservante de uma mistura de lisozima conjugada com cinamaldeído, na razão molar de 1:3, em géis de uso tópico.	VALENTA; BERNKOP-SCHNÜRCH; SCHWARTZ, 1997
Lisozima de ovo de galinha	0,2% de mistura de lisozima livre e lisozima conjugada com ácido cafeico (1:1)	<i>E. coli</i> ATCC 8739 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Avaliação da eficácia conservante de uma mistura de lisozima livre e lisozima conjugada com ácido cafeico em formulações de hidrogéis.	VALENTA; SCHWARTZ; BERNKOP-SCHNÜRCH, 1998
Lisozima	0,05% da mistura de lisozima livre e ácido cafeico	<i>E. coli</i>	Lisozima conjugada com ácido cafeico, na razão molar de 1:1. A fonte da enzima não foi citada.	BERNKOP-SCHNÜRCH et al., 1998
Cloridrato de lisozima	12,5 g/h.L	Bactéria ácido-láticas: <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>L. plantarum</i> e <i>L. brevis</i>	Utilização da lisozima para prevenção e tratamento de fermentação heterolática na produção de vinho.	LASANTA et al., 2010

Conclusão

			Não foi informada a fonte da lisozima, apenas que esta era de grau alimentício.	
Lisozima de ovo de galinha	80 µg/mL do complexo triclosan-lisozima para bactérias Gram-positivas e 125 µg/mL para Gram-negativas	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228); <i>Micrococcus luteus</i> ; <i>E. coli</i> K12 (IFO 3301); <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853); <i>Streptococcus zooepidemicus</i> ; <i>Bordetella bronchiseptica</i>	Lisozima complexada com triclosan, molécula com atividade antibacteriana conhecida.	HOQ; AOKI; IBRAHIM, 2009
Lisozima de ovo de galinha	Filme a base de quitosana com 60% de lisozima (p/p)	<i>P. fluorescens</i> ; <i>L. monocytogenes</i>	Filmes de quitosana incorporados com lisozima com o objetivo de servir de embalagem para queijos.	DUAN et al., 2007
Dermcidina	MIC ₉₀ > 10 µg/mL	Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	Dermcidina é uma proteína antimicrobiana natural da pele humana, secretada juntamente com o suor.	SCHRÖDER, 2004
HNP-1 e HNP-2	MIC ₉₀ = 2-100 µg/mL	Bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e vírus	São defensinas naturais do epitélio humano.	

2.2 Lisozimas

O primeiro relato sobre essa substância bactericida, denominada lisozima, foi descrito por Fleming em 1922 resultando de uma investigação de um paciente que sofria de coriza aguda no Hospital *St. Mary*. Neste relato, o autor descreve a ação da enzima sobre as bactérias, suas propriedades físico-químicas e a distribuição na natureza (FLEMING, 1922).

As lisozimas são enzimas que catalisam a quebra de ligações β 1-4 glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglicosamina (muramidase - EC 3.2.1.17), componentes do peptídeoglicano presente na parede celular bacteriana (JOLLÈS, 1964). Algumas lisozimas, também, atuam sobre a quitina, componente da parede celular fúngica, hidrolisando as ligações β 1-4 glicosídicas entre os monômeros de N-acetilglicosamina (quitinase – EC 3.2.1.14) (JOLLÈS; JOLLÈS, 1984). Devido a este mecanismo, a lisozima atua como um antimicrobiano natural dos organismos, auxiliando na defesa contra infecções bacterianas e fúngicas.

Lisozimas de diferentes origens possuem estruturas primárias diferentes, mas geralmente apresentam a mesma atividade biológica (JOLLÈS, 1964). Dessa forma, são classificadas de acordo com a sequência de aminoácidos e semelhança estrutural nas famílias 22, 23, 24, 25 e 73 das glicosídeo-hidrolases (COUTINHO; HENRISSAT, 1999). Membros da família 22 geralmente atuam no sistema de defesa contra bactérias, como a lisozima de ovo da galinha. No entanto, outros componentes desta família, os quais apresentam alta atividade catalítica em pH ácido, desempenham um importante papel na digestão de bactérias em animais ruminantes e insetos detritívoros (CANÇADO et al., 2007).

As lisozimas são amplamente distribuídas na natureza (JOLLÈS, 1964). Várias lisozimas, que diferem em peso molecular, sequência de aminoácidos e propriedades enzimáticas, foram descritas desde o primeiro relato de Fleming sobre lisozimas presentes em tecido humano, animal e vegetal (JOLLÈS; JOLLÈS, 1984).

Nos humanos, a lisozima está presente em diversos tecidos e fluídos, como: baço, placenta, leite (JOLLÈS; JOLLÈS, 1961), saliva (PETIT; JOLLÈS, 1963), lágrima, urina, pele, secreções respiratórias e cervicais (FLEMING, 1922; NIYONSABA; OGAWA, 2005). Além da atividade antimicrobiana, a lisozima humana aumenta a atividade fagocítica de polimorfonuclear, leucócitos e macrófagos e estimula a proliferação de monócitos (NIYONSABA; OGAWA, 2005).

Dentre os animais, está presente em invertebrados, como mosca doméstica (MARANA *et al.*, 2006), mariposas, abelhas e baratas (JOLLÈS *et al.*, 1979); e em vertebrados, como cachorro, coelho, porquinho da Índia, ruminantes e aves (FLEMING, 1922; DOBSON; PRAGER; WILSON, 1984). A lisozima de ovo de galinha (Figura 1) serve de modelo para vários estudos, uma vez que foi a primeira proteína a ter sua estrutura sequenciada, análise cristalográfica completa e o mecanismo de ação descrito detalhadamente (JOLLÈS; JOLLÈS, 1984).

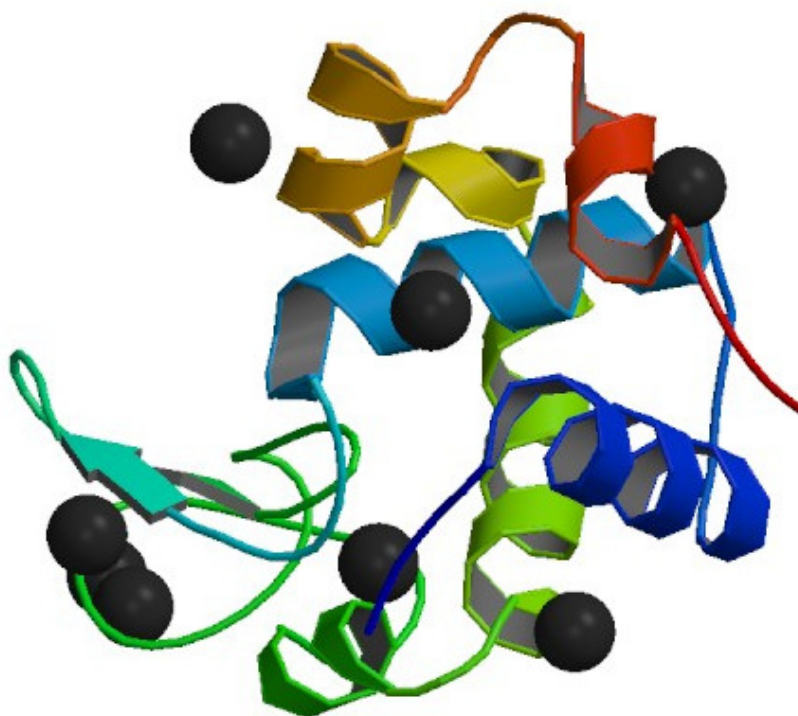


Figura 1 - Estrutura cristalográfica da lisozima de ovo de galinha, difração de raio-x com resolução de 1,29Å (CARPENTIER *et al.*, 2010)

Fonte: <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2XBR>

Nos insetos detritívoros e em ruminantes, além do papel na defesa contra micro-organismos invasores, as lisozimas desempenham um importante papel na digestão de bactérias no tubo digestivo desses animais (CANÇADO et al., 2007). Na dieta de um ruminante, aproximadamente 10% do carbono, 80% do nitrogênio e 60% do fósforo são obtidos da digestão de células microbianas. Essas lisozimas apresentam adaptações à função digestiva, como: alta expressão no tubo digestivo, resistência à ação proteolítica e a atividade antimicrobiana alcançada no pH ácido (DOBSON; PRAGER; WILSON, 1984). Em 2006, Marana e colaboradores (MARANA et al., 2006) elucidaram a estrutura de duas lisozimas digestivas de *Musca domestica*: lisozima 1 e lisozima 2. A lisozima 1, objeto de estudo deste trabalho, possui 122 aminoácidos em sua seqüência primária, tem peso molecular de 13 316Da (Figura 2). A atividade enzimática máxima apresenta-se em pH 4,0 e a afinidade pelo substrato decai conforme aumenta a força iônica do meio (CANÇADO et al., 2007).

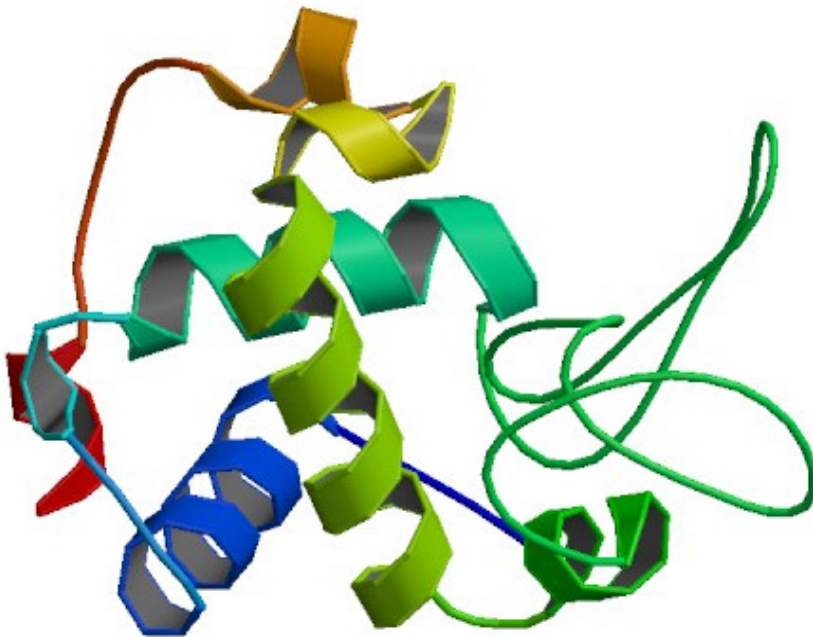


Figura 2 - Estrutura cristalográfica da lisozima 1 de *Musca domestica* (MdL1), difração de raio-x com resolução de 1,92Å (MARANA et al., 2006)

Fonte: <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2H5Z>

No reino vegetal, diversas lisozimas foram purificadas de vários tecidos vegetais, como: nabo (FLEMING, 1922), gérmen de trigo, seringueira, figo, flor-de-seda (*Calotropis procera*), *Parthenocissus quinquefolia* (AUDY; TRUDEL; ASSELIN, 1988; BERNASCONI et al., 1987), dentre outros exemplares de dicotiledôneas. A particularidade das lisozimas vegetais é que a sua maioria apresenta maior eficiência na quebra de quitina fúngica do que peptideoglicano bacteriano. Porém, assim como nos animais, sugere-se que as lisozimas atuem na defesa contra bactérias e fungos patogênicos.

As lisozimas atuam principalmente sobre bactérias Gram-positivas, porém, há relatos de atividade sobre bactérias Gram-negativas. A conjugação de lisozima de ovo de galinha com ácido cafeico ou cinamaldeído aumenta a atividade antimicrobiana da enzima frente à *Escherichia coli* quando comparada a enzima na

sua forma livre (VALENTA; BERNKOP-SCHNÜRCH; SCHWARTZ, 1997; VALENTA; SCHWARTZ; BERNKOP-SCHNÜRCH, 1998). A enzima desnaturada apresentou atividade antimicrobiana demonstrando não estar relacionada à interação enzimática com a parede bacteriana, mas não tem ainda o mecanismo elucidado (IBRAHIM et al., 1996; PELLEGRINI et al., 1997).

O domínio bactericida da lisozima de ovo de galinha é composto pelos aminoácidos nas posições 98 a 112 (I-V-S-D-G-N-G-M-N-A-W-V-A-W-R), sendo o sítio ativo de 107 a 110. Assim, substituições na seqüência resultam em aumento ou diminuição da atividade antibacteriana, indicando que a lisozima possui um mecanismo não enzimático para matar micro-organismos (PELLEGRINI et al., 1997).

2.1.1 Aplicações das lisozimas

As lisozimas são utilizadas no processamento de queijos para reduzir a deformação do alimento devido à formação de gases fermentativos, resultantes do crescimento microbiano. Essa deformação é causada pela fermentação do lactato pelo *Clostridium tyrobutyricum*, contaminante presente no leite usado na produção de queijo, resultando no acúmulo de dióxido de carbono, hidrogênio, ácido butírico e ácido acético no interior do alimento.

Frente a isso, diversos estudos foram realizados para avaliar a atividade antimicrobiana das lisozimas frente a outros micro-organismos de importância alimentícia, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Listeria monocytogenes* (WERE et al., 2004). Assim como a sua utilização na manufatura de embalagens para queijo propiciando aumento da estabilidade do produto (DUAN et al., 2007). Além da importância reconhecida na produção de queijo, também foi estudada na produção de vinho com o objetivo de prevenir a fermentação heterolática durante o envelhecimento do produto. Uma vez que a lisozima é capaz de controlar o crescimento das bactérias ácido lácticas, responsáveis por essa fermentação (LASANTA et al., 2010).

Devido a sua atividade antimicrobiana o Programa Internacional de Segurança Química (*International Program on Chemical Safety*) da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*) aprovou a utilização de lisozioma de ovo de galinha no processamento de alimentos (WHO, 1992), pois há estudos que comprovam a sua segurança frente ao seu consumo (BIANCHI, 1982).

Dentre os relatos da literatura, há poucos relacionados com as cepas microbianas correspondentes aquelas comumente encontradas como contaminantes em produtos cosméticos e farmacêuticos (VALENTA; BERNKOP-SCHNÜRCH; SCHWARZ, 1997; VALENTA; SCHWARZ; BERNKOP-SCHNÜRCH, 1998; BERNKOP-SCHNÜRCH; KRIST; VEHABOVIC; VALENTA, 1998). Esses são: *Aspergillus brasiliensis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Sendo assim, a aplicação das lisoziomas nessas áreas ainda deve ser mais explorada.

Vale ressaltar que, com o advento do sequenciamento genômico, o *Aspergillus niger* foi reclassificado como uma nova espécie denominada *A. brasiliensis* (HOUSEKNECHT et al., 2008 e VARGA et al. 2007).

2.1.1.1 Patentes

Existem diversas patentes descrevendo a aplicação de lisoziomas. Dentre elas pode-se citar a utilização da lisozioma de ovo de galinha (WO 91 17469, 2005; US 6949241, 2005) e da lisozioma recombinante humana em soluções oftálmicas para tratamento de patologias oculares, como secura ocular e inflamações. Uma vez que a lágrima é rica em lisozioma, atuando como um mecanismo de defesa natural contra infecções oculares. A solução contendo lisozioma recombinante humana pelas suas características é mais adequada para ser utilizada como colírio e solução para lentes de contato (FERRARI, 2008a).

A lisozima humana é também empregada medicamento para tratamento de acne induzida por *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Propionibacterium* sp., ácaros e bactérias resistentes a antibióticos (MI AN, 2007).

Lisozima recombinante humana ou de ovo de galinha foram adicionadas a diversas formulações para tratamento de infecções orais, melhorando a saúde bucal; infecções da pele, como a acne causada por *Propionibacterium acne*; e redução da transmissão de doenças sexualmente transmissíveis (FERRARI, 2008b)

Veronesi e Rodriguez (2006) patentearam a utilização das lisozimas de ovo de galinha, rato, vaca, coelho, cavalo ou humana modificadas, conjugadas com monoetoxipolietilenoglicol ou na sua forma de sal correspondente e incorporadas nas formas farmacêuticas orais, parenterais e de aplicação tópica para tratamento de doenças graves, como artrite reumatóide, síndrome da imunodeficiência adquirida, psoríase e choque séptico. Esses autores sugeriram que a enzima possui dois mecanismos de ação no corpo humano: direto e indireto. O primeiro seria a interação com a parede celular bactéria, degradando a ligação β 1-4 entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglicosamina, levando a morte microbiana. O mecanismo indireto se dá pela estimulação do sistema imunológico (processo ainda não elucidado) por meio dos fragmentos mucopeptídicos, elevando a concentração de TNF- α (*Tumor Necrosis Factor* – α , fator de necrose tumoral) no plasma sanguíneo

Lisozima na sua forma natural ou modificada termicamente, sozinha ou em associação com compostos amônio quaternários foram utilizadas como método para controle do crescimento microbiano em sistemas aquosos, como piscinas, sistemas de recirculação de água e meio para aquicultura.

No mercado brasileiro há o medicamento Murazyme®, composto por cloridrato de lisozima utilizado para auxiliar o tratamento de lesões cutâneas e cutâneo-mucosas de etiologia herpética, piodermite, radiodermite, úlceras e fissuras do mamilo (DEF, 2007).

2.3 Expressão heteróloga de proteínas

Com os avanços da biologia molecular surgiu a engenharia genética ou tecnologia do DNA recombinante, ramo da biologia molecular que estuda a expressão gênica celular (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2003).

A tecnologia do DNA recombinante tem sido empregada para transferir genes de interesse biotecnológico de um organismo para outro. Com o objetivo de melhorar características bioquímicas e fisiológicas de organismos que tenham importância comercial (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

Os micro-organismos são utilizados desde a antiguidade na produção de alimentos e bebidas, como: pão, vinho, cerveja, queijo e iogurte. Atualmente, além desses processos também são utilizados na produção de antibióticos, vitaminas, aminoácidos entre outras substâncias utilizadas industrialmente (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

O objetivo da engenharia genética é aumentar a produção e o rendimento da expressão dos produtos gênicos de interesse. Micro-organismos (procariotos e eucariotos), células vegetais, células de mamíferos e plantas têm sido utilizados para a produção heteróloga de proteínas e enzimas (BON; FERRARA; CORVO, 2008). O primeiro organismo empregado na clonagem do DNA foi a *Escherichia coli*. As leveduras são freqüentemente utilizadas para clonar DNA eucariótico. A clonagem em animais e plantas produz variedades de organismos geneticamente modificados com características alteradas, como plantas que são resistentes a doenças e herbicidas (NELSON; COX, 2002).

Tabela 2 - Fármacos obtidos pela tecnologia do DNA recombinante, utilizando diversos sistemas de expressão

Proteína	Sistema de expressão utilizado	Indicação	Referência
Pró-insulina humana	<i>Escherichia coli</i>	Tratamento de diabete	LIMA, 2001
Interferon β 1a	CHO	Tratamento de esclerose múltipla	
FSH (Hormônio folículo estimulante)	CHO	Tratamento de infertilidade feminina	
Fator de coagulação VIII	CHO e BHK	Tratamento de hemofilia A	CASTILHO et al., 2008
Fator de coagulação IX	CHO	Tratamento de hemofilia B	
Imunoglobulina G1	Células de mamíferos	Diagnóstico de câncer colorectal	
Imunoglobulina G (fragmento)	Células de mamíferos	Diagnóstico de isquemia cardíaca	
	Soja	Diagnóstico de isquemia cardíaca	MA; DRAKE; CHRISTOU, 2003
Hormônio do crescimento	Tabaco, girassol	Tratamento de nanismo	MA; DRAKE; CHRISTOU, 2003
Interferon- α	Arroz	Terapia de infecções virais	

Para clonar o DNA é necessário separar um gene específico do seu cromossomo, em seguida ligá-lo a uma molécula pequena de DNA (vetores) e replicar esse DNA modificado várias vezes, através do aumento do número de células hospedeiras com múltiplas cópias de DNA modificado em seu interior. O resultado final é a amplificação de um determinado gene ou segmento de DNA (figura 3) (NELSON; COX, 2002).

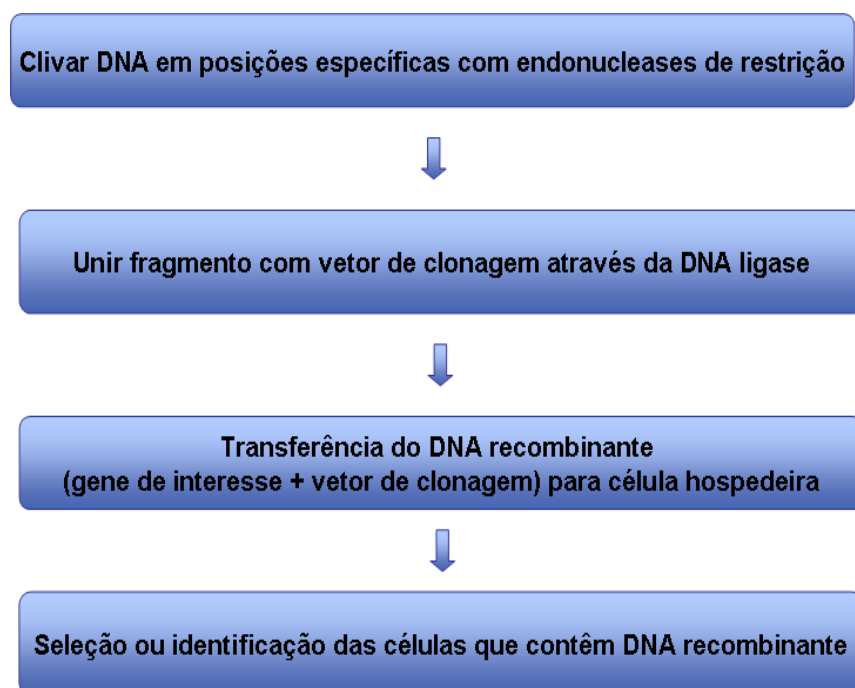


Figura 3 - Esquema da técnica de clonagem de DNA

2.3.1 Aplicações da Tecnologia do DNA recombinante

Frequentemente é o produto da expressão gênica que se tem interesse em produzir em grande quantidade, principalmente quando a proteína tem fins terapêutico, comercial ou de pesquisa (NELSON; COX, 2002).

Além dessa finalidade a clonagem do DNA pode servir para estudos sobre a estrutura e função protéica, por meio de mutações sítios dirigida onde é possível modificar a sequência primária de uma proteína e verificar as conseqüências dessa alteração (NELSON; COX, 2002).

Tendo a produção em larga escala em mente, citam-se alguns fármacos que são produtos do DNA recombinante: anticoagulante (ativador de plasminogênio tecidual); fatores de coagulação sanguínea (fator VIII); eritropoetina; fatores de crescimento; hormônio de crescimento humano; insulina humana; interferons; interleucinas; anticorpos monoclonais e vacinas (NELSON; COX, 2002; MA, DRAKE, CHRISTOU, 2003; CASTILHO et al., 2008).

2.4 Avaliação *in vitro* de citotoxicidade

O uso de animais para testes toxicológicos de novos produtos cosméticos é alvo de grandes protestos mundiais. A implantação de uma nova era pró-alternativas à experimentação animal surgiu inicialmente na Europa, por meio de organizações com apoio governamental e logo alcançou os demais continentes. Diante deste cenário, os diversos setores da indústria cosmética e farmacêutica convergem às tendências mercadológicas que visam à avaliação de produtos por meio de metodologias que diminuam o número de animais e, quando possível, ausentá-los dos testes de eficácia e segurança (ANDERSEN et al., 2004).

A validação de métodos alternativos *in vitro* para fins regulatórios permite que estes ensaios apresentem resultados robustos e confiáveis através da especificidade, sensibilidade, exatidão e precisão. Diversos centros de pesquisas executam os ensaios em consonância com o princípio dos 3R's: *refinement* (refinamento), *reduction* (redução) e *replacement* (substituição). Desta forma, tem se vantagens desde as questões éticas até a rapidez de respostas para a execução dos testes *in vivo* (ABREU, 2008).

Os 3R's foram descritos no *Principles of Human Experimental Technique* em 1959. Para a minimização da dor e do estresse nos animais é necessário o *refinement* que representa o planejamento do teste, a *reduction* que consiste na diminuição do número de animais utilizados para obter a mesma qualidade de informações dos testes clássicos *in vivo*. Finalmente, o *replacement* que representa a substituição do teste *in vivo* para o teste *in vitro* (RUSSEL; BURCH, 2009).

A toxicidade corresponde à capacidade de determinadas substâncias causarem danos aos seres vivos. Os sistemas de cultura celular assumem grande importância nos testes de toxicidade devido à sensibilidade e reprodutibilidade, que facilitam o gerenciamento dos testes, diminuindo os custos. Atualmente, sistemas de células de mamíferos são utilizados para avaliar o potencial citotóxico de componentes cosméticos, materiais médico-hospitalares, produtos farmacêuticos, químicos e poluentes ambientais (PINTO, KANEKO, PINTO, 2010). Muitas linhagens celulares são utilizadas em ensaios *in vitro*, dentre elas podemos citar a derivada de fibroblastos murinos (*Mus musculus*) 3T3- Swiss albino (figura 4). Essa linhagem celular foi estabelecida por G. Todaro and H. Green em 1962 a partir de embriões de ratos Swiss, seu crescimento é inibido quando em contato com substâncias tóxicas (ATCC, 2010).

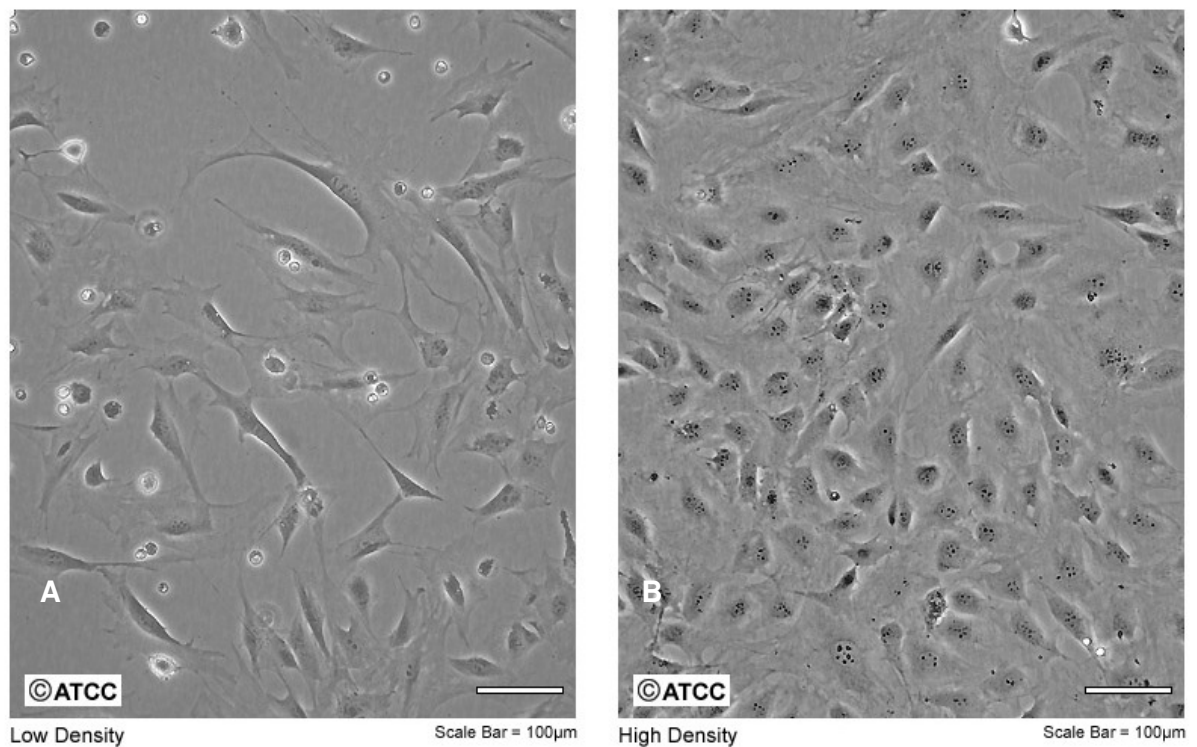


Figura 4 - Imagem do crescimento da linhagem celular 3T3 (ATCC CCL-92) em baixa densidade (**A**) e alta densidade (**B**)

Fonte: ATCC, 2010

A aplicabilidade dos métodos alternativos para a avaliação da eficácia e segurança de produtos farmacêuticos e cosméticos justifica-se somente quando os resultados são equivalentes aos obtidos nos clássicos testes toxicológicos *in vivo*. Os métodos de ensaios alternativos, cientificamente validados, permitem a confiabilidade e a comprovação de sua relevância para uma finalidade específica (COLIPA, 2010).

Em geral a relação entre dose-resposta da maioria dos *endpoints* farmacológicos e toxicológicos estudados, apresenta uma resposta não linear, geralmente no formato sigmóide, que pode ser linearizada através da conversão logarítmica do eixo x. O uso da determinação das concentrações de amostras testadas em progressão geométrica é indicado, em detrimento da progressão aritmética, já que a mesma possibilita a distribuição igualitária dos pontos testados (NIH, 2001).

Neste contexto, a utilização de séries geométricas decimais permite que experimentos independentes possam ser comparados mesmo quando utilizadas concentrações diferentes. Para tanto, segundo o *APPENDIX F - Decimal Geometric Concentration Series* (NIH, 2001), os fatores de diluição utilizados devem ser: 3,16; 2,15; 1,47; e 1,21. Desta forma, o uso das Equações 1 e 2 a seguir, resultarão, respectivamente, em valores acima (VA) e abaixo (VB) da concentração de efeito biológico da amostra em mg/mL (NIH, 2001):

**VA = concentração de efeito biológico (mg/mL) x Fator de diluição
(Equação 1)**

**VB = concentração de efeito biológico (mg/mL) : Fator de diluição
(Equação 2)**

A Equação 1 corresponde à obtenção de valores acima (VA) da concentração de efeito biológico da amostra, e a Equação 2 corresponde à obtenção de valores abaixo (VB) da concentração de efeito biológico da amostra.

Os testes de citotoxicidade medem a proporção de células viáveis após um procedimento traumático. A maioria destes testes se baseia na ruptura da integridade da membrana que é determinada pela entrada de um corante ao qual a célula é geralmente impermeável como, por exemplo, o *Trypan Blue*, ou a liberação de um corante normalmente adquirido e retido por células viáveis, por exemplo, *Neutral Red*. Estes efeitos, no entanto, são imediatos e não preveem a sobrevivência posterior das células testadas (FRESHNEY, 2005).

Conforme definido na ISO 10993-5 (2009), os inúmeros métodos utilizados para a determinação da citotoxicidade podem ser agrupados em quatro categorias: as avaliações da morfologia celular; as determinações dos danos celulares; a avaliação do crescimento celular; e a avaliação de aspectos referentes ao metabolismo celular. Os testes validados para este fim são: 3T3 NRU, teste de citotoxicidade para formação de colônias, MTT/MTS e XTT (*2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-5-*

[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) de citotoxicidade (NIH, 2001; ICCVAM, 2006).

Os sais de *tetrazolium*, componentes ativos dos corantes vitais MTT, XTT e MTS, são utilizados para distinguir as células vivas das células mortas. Eles são reduzidos à formazana pelo sistema de citocromo das células viáveis e a cor resultante é uma medida direta da viabilidade celular. As formazanas são excessivamente insolúveis em água e na tentativa de driblar este inconveniente, foram desenvolvidos os derivados do MTT, os corantes XTT e MTS que produzem formazanas mais intensamente coloridas e solúveis em água, facilitando desta forma a leitura em espectrofotômetro (BARLTROP; OWEN, 1991).

3 OBJETIVO

- 1- Obtenção da lisozima recombinante de *Musca domestica* (MdL1);
- 2- Avaliação a atividade antimicrobiana da MdL1 e de lisozima de ovo de galinha (HEWL) frente aos micro-organismos considerados como possíveis contaminantes em produtos farmacêuticos e cosméticos;
- 3- Avaliação prévia da toxicidade da lisozima em cultura de células de fibroblastos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

- Lisozima recombinante MdL1 (AAQ20048) de *Musca domestica*.

- Lisozima de ovo de galinha – Sigma-Aldrich - Missouri – Estados Unidos da América

Micro-organismos:

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) – Instituto Adolfo Lutz – São Paulo - Brasil

- *Micrococcus luteus* (ATCC 4698) depositado como *Micrococcus lysodeikticus* (KOCUR; PÁČOVÁ; MARTINEC, 1972) – Instituto Adolfo Lutz (ATCC 4698) – São Paulo - Brasil

- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) – Instituto Adolfo Lutz – São Paulo - Brasil

- *Escherichia coli* (ATCC 8739) – Instituto Adolfo Lutz – São Paulo - Brasil

- *Candida albicans* (ATCC 10231) – Instituto Adolfo Lutz – São Paulo - Brasil

- *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), depositado como *Aspergillus niger* – Instituto Adolfo Lutz – São Paulo – Brasil

- *Pichia pastoris* GS115 – Invitrogen – Califórnia – Estados Unidos da América

- *Escherichia coli* XL1 Blue – Invitrogen - Califórnia – Estados Unidos da América

Meios de cultura:

- Meio líquido Lúria Bertani (*LB Broth*) – Sigma-Aldrich – Missouri – Estados Unidos da América

- Ágar Luria Bertani (*LB Agar*) - Sigma-Aldrich – Missouri – Estados Unidos da América

- Meio líquido contendo extrato de levedura, peptona e dextrose (*Yeast extract peptone dextrose* – YPD broth) - Sigma-Aldrich – Missouri – Estados Unidos da América

- Ágar contendo extrato de levedura, peptona e dextrose (*Yeast extract peptone dextrose* – YPD-agar) - Sigma-Aldrich – Missouri – Estados Unidos da América

- Meio mínimo de suplemento de nitrogênio para levedura (*Yeast nitrogen base* - YNB) - Sigma-Aldrich – Missouri – Estados Unidos da América

- Meio mínimo contendo metanol (*Buffered minimal metanol* - BMM) – preparado a partir de YNB, tampão fosfato de potássio, biotina e metanol.

- Meio mínimo contendo dextrose (*Minimal dextrose* - MD) – preparado a partir de YNB, biotina e glicose.

- Meio líquido caseína soja (*Tripsin soy broth* – TSB) – Difco – Maryland – Estados Unidos

- Ágar caseína soja (*Tripsin soy agar* - TSA) – Difco – Maryland – Estados Unidos

- Meio líquido Sabouraud contendo dextrose (*Sabouraud dextrose broth* – SDB) – Difco – Maryland – Estados Unidos

- Ágar Sabouraud contendo dextrose (*Sabouraud dextrose agar* – SDA) – Difco – Maryland – Estados Unidos

- Meio tioglicolato líquido - Difco – Maryland – Estados Unidos

Reagentes:

- β-mercaptoetanol – Biorad – Califórnia – Estados Unidos da América

- Ácido acético – Merck – Darmstadt- Alemanha

- Ácido cítrico monidratado – Merck – Darmstadt- Alemanha

- Acetato de sódio – Merck - – Darmstadt- Alemanha

- Água MilliQ® - Millipore® - Massachusetts – Estados Unidos da América

- Amicacina – Potência: 916µg/mg

- Ampicilina - Sigma-Aldrich – Missouri – Estados Unidos da América
- Bifosfato de potássio – Merck – Darmstadt- Alemanha
- Biotina - Sigma-Aldrich – Missouri – Estados Unidos da América
- Carbonato de sódio – Merck – Darmstadt- Alemanha
- Cloranfenicol - Potência: 100.000 UI/mL,
- Cloreto de sódio – Merck – Darmstadt- Alemanha
- D-glicose - Labsynth - São Paulo – Brasil
- Duodecil sulfato de sódio (SDS) – Sigma-Aldrich – Missouri – Estados Unidos da América
- EDTA – Merck – Darmstadt- Alemanha
- Enzima de restrição SAC I – New England BioLabs – Massachusetts – Estados Unidos da América
- Fosfato de potássio – Merck – Darmstadt- Alemanha
- Fosfato de sódio bibásico dihidratado – Merck – Darmstadt- Alemanha
- Hidróxido de potássio – Merck – Darmstadt- Alemanha
- Membrana filtrante com poro de 0,22µm - Millipore® - Massachusetts – Estados Unidos da América
- Metanol – Merck – Darmstadt- Alemanha
- Microplacas com 96 poços – TPP – Trasadingen - Suíça
- Nistatina, potência: 100.000 UI/mL
- Placa de Petri 9 mm de diâmetro – Pleion – São Paulo - Brasil
- Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) Labsynth - São Paulo – Brasil
- Poliacrilamida - Sigma-Aldrich – Missouri – Estados Unidos da América
- Sistema de purificação de DNA – “Minipreps DNA purification System” – Promega® - Wisconsin – Estados Unidos da América
- Sistema de purificação de DNA – “PCR Clean” – Promega® - Wisconsin – Estados Unidos da América

- Sorbitol – Henrifarma – São Paulo - Brasil
- Sulfato de amônio - Labsynth – São Paulo – Brasil
- Vetor de expressão pPic9 – Invitrogen - Califórnia – Estados Unidos da América

4.2 Métodos

4.2.1 Produção, purificação e análise da pureza da lisozima recombinante

Esta etapa foi desenvolvida em parceria com Professor Sandro Roberto Marana – Laboratório de Enzimologia – Departamento de Bioquímica - Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

A figura 5 mostra um fluxograma geral dos processos de produção, purificação e análise de pureza da lisozima recombinante de *Musca domestica* realizados nesta etapa do trabalho (MARANA et al., 2006; CANÇADO et al., 2007).

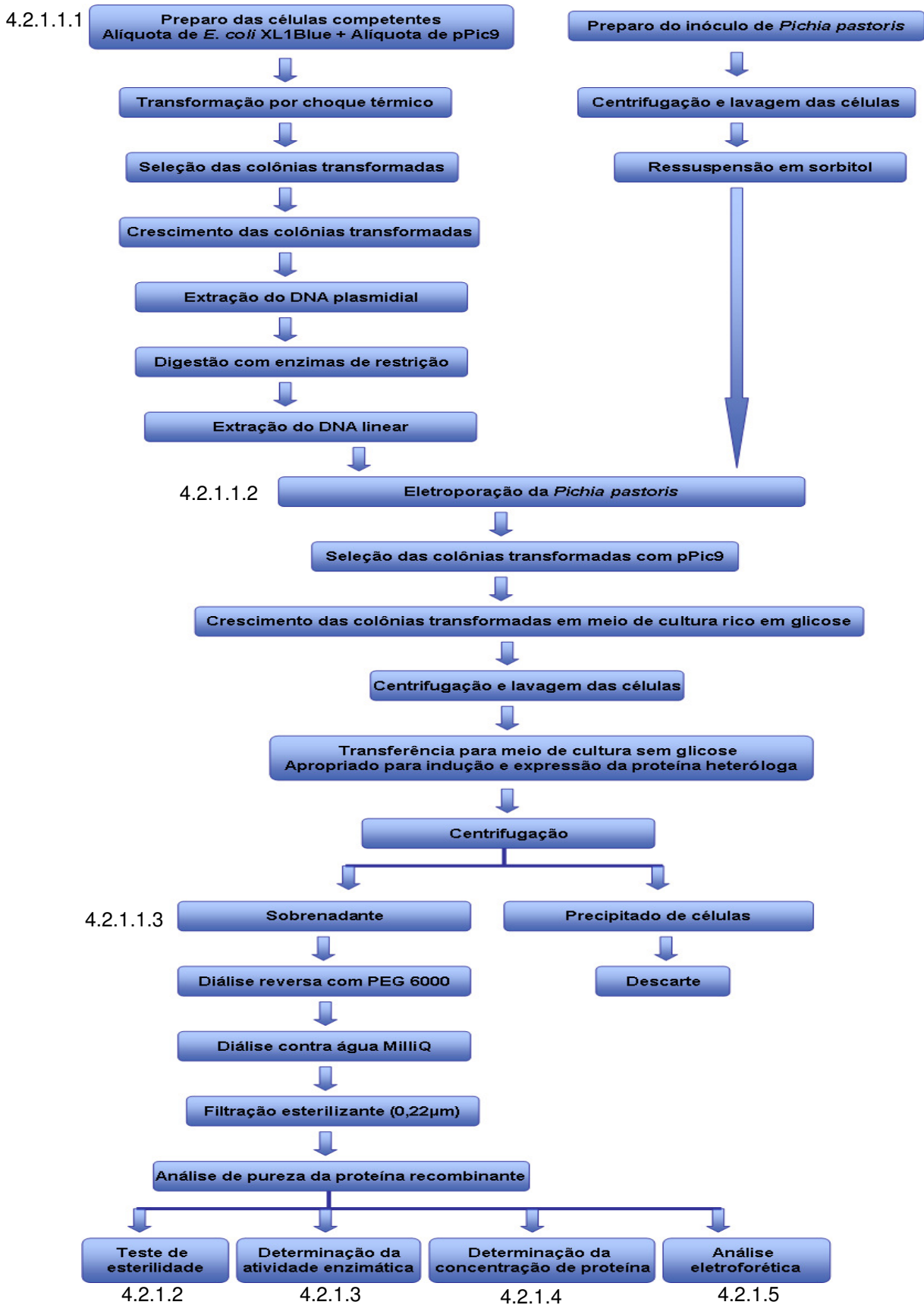


Figura 5 - Fluxograma geral da produção, purificação e análise da pureza da lisozima recombinante de *Musca domestica*

4.2.1.1 Expressão heterogênea e purificação da lisozima recombinante

4.2.1.1.1 Preparo de células competentes

Para preparar as células competentes misturou-se 1 μL de pPic9 com uma alíquota (aproximadamente 500 μL) de *Escherichia coli* XL1Blue competente, conservada em sorbitol 1M a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. A transformação das células competentes se deu por choque térmico (gelo -30 minutos, $42\text{ }^\circ\text{C}$ -30 segundos, gelo -2 minutos). Logo após a transformação, foram adicionados 0,5 mL de meio líquido e incubou-se a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora, homogeneizando-se esporadicamente.

Após a incubação de 1 hora, plaquearam-se 100 μL em LB-ágar (Luria Bertani Agar) suplementado com ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), incubou-se novamente a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por aproximadamente 16 horas.

Após o crescimento das colônias transformadas em meio de cultura semi-sólido, foi necessário multiplicá-las em meio líquido LB ($37\text{ }^\circ\text{C}$, 16h a 150 rpm) para posterior extração do DNA utilizando o sistema de purificação de DNA (Minipreps DNA purification System – Promega[®]). A quantificação do DNA foi feita pela medida de absorbância a 260 e 280 nm. Considerou-se que uma unidade de absorbância a 260 nm corresponde a 50 μg de DNA em 1,0 mL (SAMBROOK, 1989), dessa forma calculou-se a concentração de DNA extraído.

A MdL1 foi produzida em cepas competentes de *Pichia pastoris* GS115. A cultura de *P. pastoris* foi mantida em YPD contendo 20% de glicerol (v/v) a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Alíquotas desse estoque foram inoculadas em 5 mL de YPD líquido e incubadas a $28\text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm por 16 horas originando o pré-inóculo. Uma fração de 100 μL deste pré-inóculo foi transferida para um erlenmeyer contendo 500 mL de YPD líquido e incubadas nas mesmas condições até atingir a densidade óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 1,3 - 1,5. O conteúdo do erlenmeyer foi centrifugado a 1500 g, $4\text{ }^\circ\text{C}$ por 5min. As células foram lavadas duas vezes com água estéril (500 mL e 250 mL) e uma vez com sorbitol gelado (20 mL). Após a última centrifugação, as células foram suspensas

novamente em 20 mL de sorbitol gelado. Esta cultura de levedura suspensa em sorbitol foi utilizada no processo de eletroporação.

4.2.1.1.2 Eletroporação da *Pichia pastoris*

Uma vez que DNA plasmideal é circular, foi necessário linearizá-lo, utilizando enzima de restrição ScaI, para viabilizar sua inserção no genoma da levedura. Assim, em um microtubo contendo 90 µg de DNA plasmidial, adicionou-se 5 µL de ScaI e incubou-se por 8 horas a 37 °C. Após a digestão, o DNA linear foi extraído utilizando o sistema de purificação (PCR Clean – Promega®) e adicionado a 80 µL de uma suspensão de *Pichia pastoris* competente ($DO_{600nm} = 1,345$). A mistura foi homogeneizada adequadamente e transferida para uma cubeta estéril apropriada para eletroporação (Biorad®), mantida no gelo por 5 minutos e submetida à eletroporação seguindo os seguintes parâmetros: 1 500 V, 25 µF e 200 Ω (Biorad GenePulser - Biorad®). Imediatamente após o pulso elétrico foi adicionado 0,5mL de sorbitol 1M ao conteúdo da cubeta. Alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas de MD-ágar e incubadas por aproximadamente 60 horas a 28 °C até o aparecimento de colônias.

4.2.1.1.3 Produção e purificação da proteína heteróloga

A lisozima MdL1 foi produzida como proteína recombinante em leveduras *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen) previamente transformadas com o vetor pPic9 (Invitrogen) codificando para MdL1.

Além do plasmídeo codificando para MdL1, a *P. pastoris* também foi transformada com o pPic9 sem codificação para a enzima de interesse. Dessa

forma, foi possível verificar se alguma outra proteína produzida durante o processo de indução pudesse interferir na atividade antimicrobiana da MdL1.

Partindo de uma colônia isolada, a *P. pastoris* foi cultivada em meio YPD por 16h a 28 °C e 150 rpm, posteriormente as células foram lavadas com água deionizada (MilliQ) estéril . Após esta etapa as células foram transferidas para meio BMM com metanol 1,0 % (v/v), sendo assim induzidas a produzirem e secretarem MdL1 para o meio de cultura. Após 72h a 28 °C e 150 rpm, o meio foi coletado por centrifugação (7.000 g, 10 min) e a partir dele foi feita a purificação de MdL1 recombinante através de concentração com polietilenoglicol com peso molecular de 6000 (PEG 6000), seguido por diálise contra água deionizada através de membrana de diálise com porosidade seletiva de 12 kDa. Para obter a esterilidade do material, as amostras foram filtradas por membrana filtrante com poro de 0,22 µm (Millipore®).

As condições utilizadas para a expressão da MdL1 em *P. pastoris* estão descritas no manual de instruções do sistema de expressão da *Pichia pastoris* (“*Pichia* expression kit”) elaborado pela Invitrogen® (INVITROGEN CORPORATION, 2002).

4.2.1.2. Determinação da homogeneidade da proteína recombinante por análise eletroforética

O material purificado foi analisado em eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) para garantir sua homogeneidade (LAEMMLI, 1970). As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,5M – pH 6,8; glicerol; SDS 10%; 2-β-mercaptoetanol e água destilada), aquecidas a 100 °C, por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 15% contendo SDS 1% (m/v). Os parâmetros de corrente elétrica utilizados foram: 200 V e 40 mA. As proteínas contidas no gel foram coradas com nitrato de prata segundo procedimento descrito por Blum e colaboradores (1987).

4.2.1.3 Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína foi obtida de acordo com o método de Bradford (1976). Soluções de ovo albumina, com concentrações variadas, foram utilizadas como padrão de massa protéica.

4.2.1.4 Ensaio de atividade enzimática da lisozima

A atividade de lisozima foi determinada por meio do decréscimo da turbidez de suspensões de células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich – ATCC 4698) na concentração de 1 mg/mL em tampão citrato-fosfato 100 nM pH3,5. Pipetou-se 200 µL de suspensão microbiana em cubetas de caminho óptico reduzido (10 mm) e adicionou-se 50 µL da solução enzimática. Os ensaios foram feitos a 30 °C durante 15 minutos, usando 500 µL de carbonato de sódio 1M para encerrar a reação enzimática nos tempos: 0, 5, 10 e 15 minutos. Uma unidade de atividade de lisozima foi definida com a quantidade de enzima que causa um decréscimo de 0,01 unidades de absorvância/minuto (CANÇADO et al., 2007).

4.2.1.5 Avaliação da esterilidade

Para avaliar a esterilidade das amostras foi realizado o teste de esterilidade descrito na Farmacopéia Americana volume XXXIII (USP - United States Pharmacopoeia, 2010). Foram utilizados meio líquido de tioglicolato e caldo caseína

soja. A capacidade promotora de crescimento do meio de cultura (controle positivo) foi comprovada pela inoculação de micro-organismos específicos. E o controle negativo, comprovação da esterilidade dos meios de cultura, foi avaliada incubando-se os meios de cultura sem adição de inóculo microbiano e sem amostra.

4.2.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) das lisozimas

Devido a diferenças nas características das enzimas foram utilizadas técnicas diferentes para avaliar a atividade antimicrobiana. A técnica da microdiluição em caldo foi utilizada para avaliar a atividade da HEWL, pois esta enzima se encontra ativa no pH do meio de cultura. Dois métodos foram desenvolvidos e testados para avaliar a atividade antimicrobiana da MdL1, uma vez que esta enzima exibe atividade máxima no pH 3,5, sendo incompatível com o pH dos meios de cultura disponíveis.

O método 1 baseou-se no protocolo para avaliação da eficácia de desinfetantes. Neste método, a contagem dos micro-organismos viáveis foi realizada após pré-incubação com soluções de amostra antimicrobiana e controles. O método 2 baseou-se no ensaio de quantificação de atividade catalítica da enzima, substituindo as células liofilizadas por células viáveis de *Micrococcus luteus*.

4.2.2.1 Desenvolvimento de metodologia para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) da MdL1

- Método 1

Desenvolveu-se um experimento baseado no princípio de pré-incubação ou tempo de contato, descrito no método de coeficiente fenólico para avaliação da eficácia de desinfetantes da *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC, 2002). O inóculo do micro-organismo a ser testado foi pré-incubado com uma solução de agente antimicrobiano por um tempo determinado e posteriormente incubou-se obedecendo às condições ideais de crescimento microbiano.

As bactérias foram cultivadas em TSA inclinado por 24 horas para atingir a fase logarítmica de crescimento. Após a incubação, os micro-organismos eram recolhidos em solução salina 0,85% (p/v), originando uma suspensão mãe, a qual é diluída de maneira decimal e seriada para determinar a carga microbiana. Foram utilizados nos ensaios inóculos na concentração aproximada de 1×10^7 UFC/mL.

Após a padronização da carga microbiana da suspensão mãe, pipetou-se 2,0 mL em tubos de fundo cônico, centrifugou-se a 2.000 rpm por 15 minutos. O sedimento de células foi suspenso novamente, porém em diferentes diluentes que correspondem a diferentes tratamentos: solução salina (controle de crescimento), água estéril, tampão citrato-fosfato 100 mM pH 3,5 e solução de MdL1 em tampão citrato-fosfato 100mM pH 3,5.

Os tubos foram incubados a 30 °C, 100 rpm por 1 hora, logo após centrifugou-se novamente os tubos nas condições anteriormente descritas. Os sedimentos foram suspensos em TSB, diluídos até 10.000.000 de vezes e semeados em profundidade em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. As placas de Petri foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após a incubação enumerou-se as unidades formadoras de colônia (UFC) para determinar a carga microbiana. A figura 6 mostra um fluxograma do ensaio.

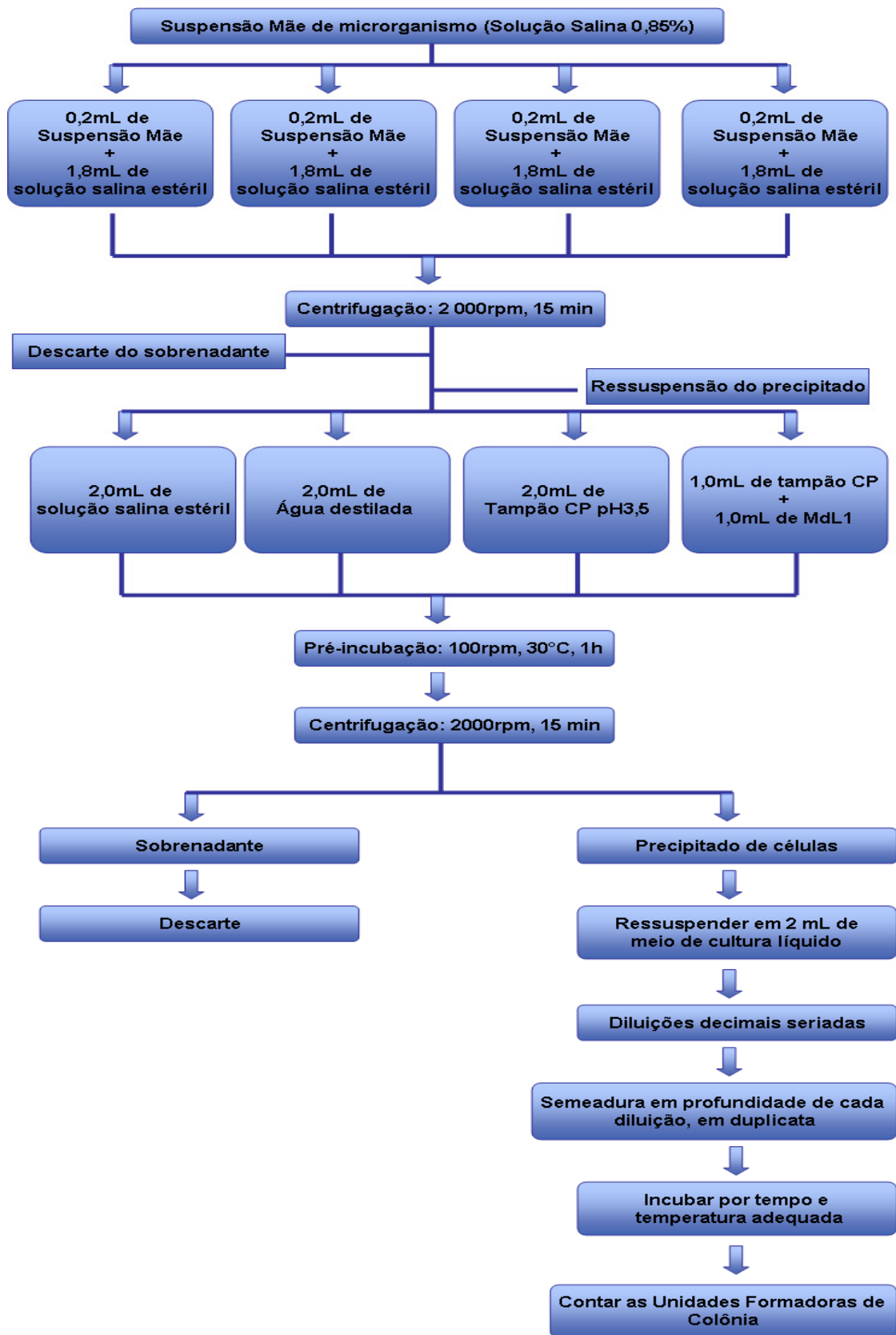


Figura 6 - Fluxograma do método 1 para determinação da atividade antimicrobiana da lisozima recombinante de *Musca domestica* (MdL1)

- Método 2

A atividade antimicrobiana da MdL1 foi avaliada utilizando um método comparativo ao ensaio de atividade catalítica da enzima, descrito por CANÇADO et al 2007. *Micrococcus luteus* ATCC 4698 (células viáveis) substituíram as células liofilizadas como substrato da reação enzimática. O ensaio foi realizado a 30 °C e a absorbância determinada em espectrofotômetro a 650nm.

As bactérias foram cultivadas em TSA inclinado por 24 horas para atingir o crescimento adequado. Após a incubação os micro-organismos eram recolhidos em solução tampão citrato-fosfato pH 3,5 100mM, originando uma suspensão mãe que foi diluída de maneira decimal e seriada para determinar a carga microbiana e obter uma suspensão com a densidade óptica desejada. Foram utilizados nos ensaios inóculos na concentração aproximada de 10^5 UFC/mL ($DO_{650nm} = 0,5$).

Os diluentes utilizados foram: solução salina 0,85% (p/v); água destilada estéril, tampão citrato-fosfato pH 3,5 100 mM e solução de MdL1.

A atividade de lisozima foi determinada através do decréscimo da turbidez de suspensões de células viáveis de *Micrococcus luteus* (ATCC 4698) com densidade óptica de 0,5 a 650 nm (densidade óptica equivalente a suspensão 1 mg/mL de células liofilizadas, utilizadas no ensaio de atividade catalítica). Essas suspensões foram preparadas em tampão citrato-fosfato 100 mM pH 3,5. Os ensaios foram realizados a 30°C durante 3 horas, utilizando-se carbonato de sódio 1M para encerrar a reação enzimática nos tempos: 0, 1, 2 e 3 horas.

Após a obtenção de suspensão microbiana com densidade óptica desejada ($DO_{650nm} = 0,5$), pipetou-se 50 μ L de cada diluente acima citado em cubetas espectrofotométricas de caminho óptico reduzido, em seguida 0,2 mL de suspensão microbiana. Considerou-se a solução salina com inóculo como controle crescimento, água destilada estéril como controle do solvente e o tampão citrato-fosfato 100 mM pH 3,5 foi avaliado assim como a solução de MdL1 para verificar a possível diminuição de turbidez da suspensão microbiana. As cubetas foram incubadas em banho-maria a 30 °C por 3 horas. A reação foi interrompida utilizando carbonato de

sódio 1M nos tempos pré-estabelecidos e a leitura realizada em espectrofotômetro a 650 nm.

Foram realizadas, no mínimo, três réplicas com três repetições consecutivas e os resultados analisados estatisticamente.

4.2.2.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória da HEWL

A avaliação da atividade antimicrobiana da HEWL foi realizada por meio de diluição de meio líquido em microplacas com 96 poços (Figura 7), baseada na técnica descrita pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* (M7-A6); Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras (M27-A2) e Método de referência para teste de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos (M38-A) (NCCLS, 2002; NCCLS, 2003; NCCLS, 2002).

Os micro-organismos testados foram: *Micrococcus luteus* (ATCC 4698), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

Os meios de cultura utilizados foram: caldo e ágar caseína soja (*trypsin soy broth* - TSB e *trypsin soy agar* - TSA), para crescimento bacteriano; e caldo e ágar Sabouraud dextrose a 4% (*Sabouraud dextrose broth* – SDB e *Sabouraud dextrose agar* – SDA), para o crescimento fúngico. Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções do fabricante (Difco®).

As colunas de 1 a 4 da microplaca foram utilizadas como controle do ensaio e as demais para testar a atividade antimicrobiana da amostra (Figura 7). Pipetou-se 100-200 µL de TSB ou SDB (controle do meio de cultura) na coluna 1; 100-200 µL de meio de cultura inoculado com o micro-organismo teste (controle de crescimento)

na coluna 2; 50-100 μL da solução de antibiótico (0,05 mg/mL) e 50-100 μL de meio de cultura inoculado com o micro-organismo em estudo (controle de atividade antimicrobiana) na coluna 3. Na coluna 4, foram pipetados 50-100 μL da solução protéica (10 mg/mL) e 50-100 μL de meio de cultura estéril, para assegurar a qualidade microbiana da solução protéica. Nas demais colunas pipetaram-se as amostras: 50-100 μL da solução de HEWL em diversas concentrações e 50-100 μL de meio TSB ou SDB inoculado com o micro-organismo a ser desafiado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C	CC	AT	CA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
B	C	CC	AT	CA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
C	C	CC	AT	CA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
D	C	CC	AT	CA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
E	C	CC	AT	CA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
F	C	CC	AT	CA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
G	C	CC	AT	CA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
H	C	CC	AT	CA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8

CM = poços referentes ao meio de cultura estéril (TSB ou SDB); CC = poços referentes ao meio de cultura inoculado com micro-organismo teste; ATB = meio de cultura inoculado com micro-organismo teste e solução de antibiótico (0,05 mg/mL); CA = poços referentes à amostra com meio de cultura estéril; A1-A8 = poços referente às diluições da amostra em ordem decrescente de concentração

Figura 7 - Esquema do ensaio para determinação da atividade antimicrobiana da lisozima de ovo de galinha na microplaca de 96 poços

O meio de cultura estéril (CM) foi considerado como 100% de inibição de crescimento microbiano e assim utilizado para calcular a porcentagem de inibição frente aos antibióticos padrões escolhidos e amostras de lisozima de ovo de galinha. As concentrações testadas foram da faixa de 0,04 a 10 mg/mL, em razão geométrica de 2. Também foi realizado o controle de crescimento microbiano (CC) indicando a viabilidade celular, ou seja, a ausência de atividade antimicrobiana.

As microplacas foram encubadas por aproximadamente 24 horas a 35 ± 2 °C para bactérias, 48 horas a 25 ± 2 °C para levedura e 7 dias a 25 ± 2 °C para bolor. Após o período total de incubação foram realizadas leituras a 630nm em espectrofotômetro de microplacas (LM-LGC Biotecnologia).

4.2.3 Avaliação da citotoxicidade da lisozima do ovo de galinha (HEWL)

Os ensaios foram realizados sob condições assépticas em ambiente controlado de fluxo laminar biológico, utilizando-se materiais e reagentes esterilizados por filtração esterilizante, calor seco ou úmido, radiação esterilizante ou óxido de etileno, de acordo com a natureza de cada um. Foram empregadas técnicas assépticas para a garantia da viabilidade celular (FRESHNEY, 2000; OECD, 1998).

Os fibroblastos (ATCC CCL-92) utilizados nos testes de citotoxicidade não necessitam da submissão ao Comitê de Ética para Experimentação Animal. O meio de cultura utilizado para o crescimento celular foi o DMEM suplementado com antibióticos e antimicótico (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 mg/mL e anfotericina 0,025 mg/mL), 4 mM de glutamina e 10% (v/v) de soro fetal bovino, de acordo com as recomendações de normas internacionais (ISO 10993-5, 2009).

Segundo o *APPENDIX F - Decimal Geometric Concentration Series* (NIH, 2001), os fatores de diluição utilizados foram: 3,16; 2,15; 1,47; e 1,21. Além disso, após o uso desses fatores utilizou-se as Equações 1 e 2 para determinar valores acima (VA) e abaixo (VB) da concentração de efeito antimicrobiano da amostra (NIH, 2001):

VA = concentração de efeito biológico (mg/mL) x Fator de diluição

(Equação 1)

VB = concentração de efeito biológico (mg/mL) : Fator de diluição

(Equação 2)

A equação 1 corresponde à obtenção de valores acima (VA) da concentração de efeito biológico da amostra. E a equação 2, aos valores acima a concentração de efeito biológico da amostra.

A aplicação dessas equações resultou em amostras com concentrações de 1 a 46mg/mL (1 mg/mL; 2 mg/mL; 3 mg/mL; 4 mg/mL; 7 mg/mL; 8 mg/mL; 10 mg/mL; 15 mg/mL; 18 mg/mL; 21,5 mg/mL; 32 mg/mL e 46 mg/mL).

Em microplacas de 96 poços (0,28 cm² de área de cada poço) foram semeadas 1×10^4 células por poço (Figura 8) e incubadas por 24 horas, a 37 °C em atmosfera de 97% de umidade relativa e 5% de CO₂, até atingirem a subconfluência de aproximadamente 80% na placa de cultura. O processo de descolamento celular se deu pela ação da solução de tripsina 0,05% (p/v) - EDTA 0,02% (p/v) em tampão fosfato de pH 7,4 (ICCVAM, 2006). Em seguida, foram adicionadas as amostras com variadas concentrações de proteína. Após 24 e 48 horas da adição das amostras, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com a solução de tampão fosfato (pH 7,4). Após a lavagem das células, adicionou-se a solução do corante vital MTS 0,2% solubilizado em meio de cultura. Após 2 horas de incubação, foram realizadas as leituras de absorbância, a 490 nm em espectrofotômetro de microplacas (NIH, 2001; ICCVAM, 2006).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	B	CC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CC	B
C	B	CC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CC	B
D	B	CC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CC	B
E	B	CC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CC	B
F	B	CC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CC	B
G	B	CC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CC	B
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

B = Branco, poços referentes ao controle do corante MTS, CC = controle de células; C1-C8 = poços referente às diluições da amostra em ordem crescente de concentração.

Figura 8 - Esquema da disposição das células na placa de 96 poços durante o ensaio de citotoxicidade (NIH, 2001)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha da obtenção da lisozima recombinante de *Musca domestica* (MdL1) utilizando o sistema de expressão *Pichia pastoris* foi baseada na característica desta levedura de secretar a proteína para o meio de cultura, o que possibilitou o processo de purificação mais simples e rápido (BON; FERRARA; CORVO, 2008). Com o processo de purificação descrito no item 3.2.1 foi suficiente para obter a MdL1 pura e homogênea. A Figura 9 mostra apenas uma banda gel de poliacrilamida, na faixa de padrão de peso molecular de 14.400 Da, na raia correspondente à amostra. Segundo Cançado e colaboradores (2007) o peso molecular da MdL1 é de 13.316 Da, os resultados da análise eletroforética da lisozima obtida estavam em conformidade.

O processo de purificação utilizado, item 4.2.1, propiciou que a partir de 500 mL de meio de cultura se obtivesse aproximadamente 25 mg de proteína pura, com atividade específica de 108,35 U/mg. O resultado alcançado foi melhor que Cançado (2008) utilizando a purificação pelo método de precipitação com sal ("salting out"), diálise e cromatografia de troca iônica, que obteve o rendimento, de aproximadamente 4 mg de proteína pura a partir de 1 L de meio de cultura.

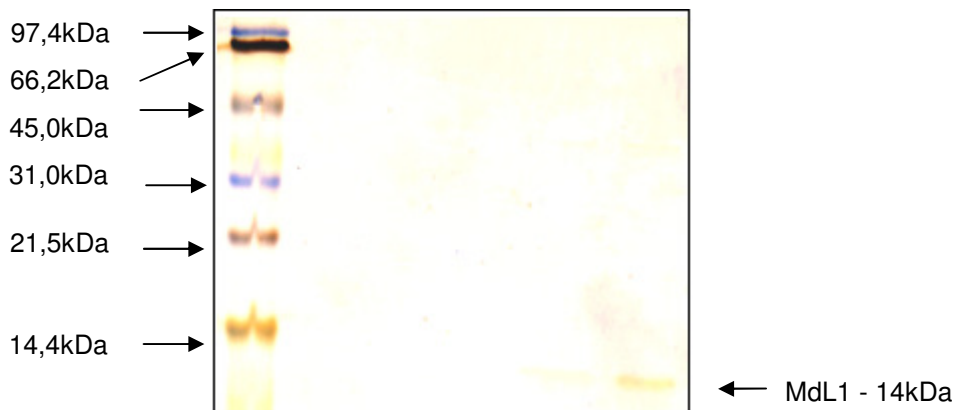


Figura 9 - Gel de poliacrilamida da lisozima de *Musca domestica* (MdL1) após o processo de purificação. Do lado esquerdo da imagem observa-se o padrão de peso molecular. Do lado direito na parte inferior da imagem observam-se a banda correspondente à amostra de lisozima de *Musca domestica*

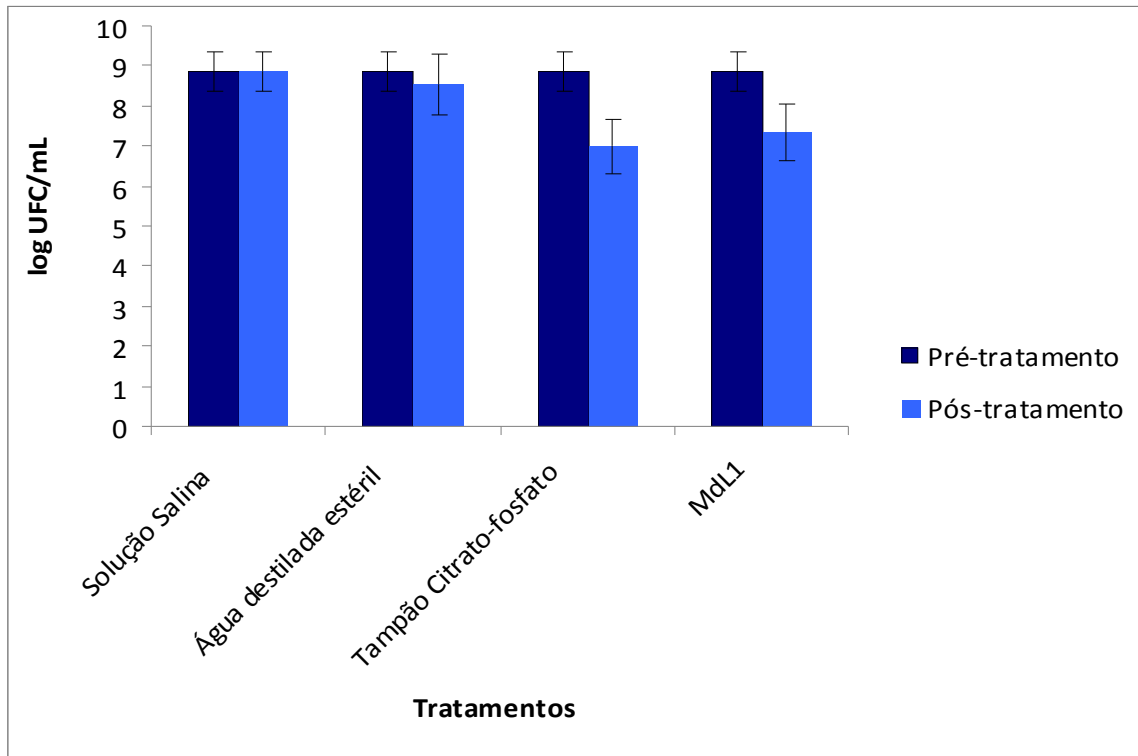
Em termos de controle do ensaio, foi necessário esterilizar a amostra para garantir que a carga microbiana presente fosse apenas do inóculo do micro-organismo teste. Dessa maneira, foi realizado o teste de esterilidade descrito na USP XXI, o qual comprovou a esterilidade das amostras de MdL1, evidenciado pela não turvação dos meios de cultura inoculados com MdL1 e observados diariamente durante o período de incubação de 14 dias. A capacidade promotora de crescimento do meio de cultura (controle positivo) foi comprovada pelo crescimento microbiano nos tubos inoculados com os micro-organismos específicos. E a esterilidade do mesmo (controle negativo) foi constatada pela ausência de turvação dos tubos de ensaio sem inóculo e sem amostra. A HEWL não foi submetida ao teste de esterilidade, pois a solução era preparada assepticamente e era usada imediatamente, entretanto foi realizada concomitantemente a avaliação da atividade antimicrobiana o controle da amostra (solução mãe de HEWL com meio de cultura estéril).

Com o intuito de avaliar a atividade antimicrobiana da MdL1, dois métodos foram desenvolvidos e testados. Uma vez que esta enzima exibe atividade máxima no pH 3,5, sendo incompatível com o pH dos meios de cultura convencionais e

disponíveis. Portanto, impossibilitando o ensaio de microdiluição em caldo como realizado com a lisozima de ovo de galinha.

O método 1 baseou-se no princípio de pré-incubação ou tempo de contato, descrito no método de coeficiente fenólico para avaliação da eficácia de desinfetantes da *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC, 2002). O inóculo do micro-organismo a ser testado foi pré-incubado com uma solução de agente antimicrobiano por um tempo determinado e posteriormente incubou-se obedecendo a suas condições ideais de crescimento microbiano como descrito no item 4.2.2.1.

A figura 10 mostra os resultados obtidos com o ensaio de pré-incubação da MdL1 com *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. A redução da carga microbiana ocorrida na amostra tratada com MdL1 foi também observada na amostra tratada com tampão citrato-fosfato pH3, 5; comprovando ser ação do baixo pH conferido pelo tampão e não da enzima.



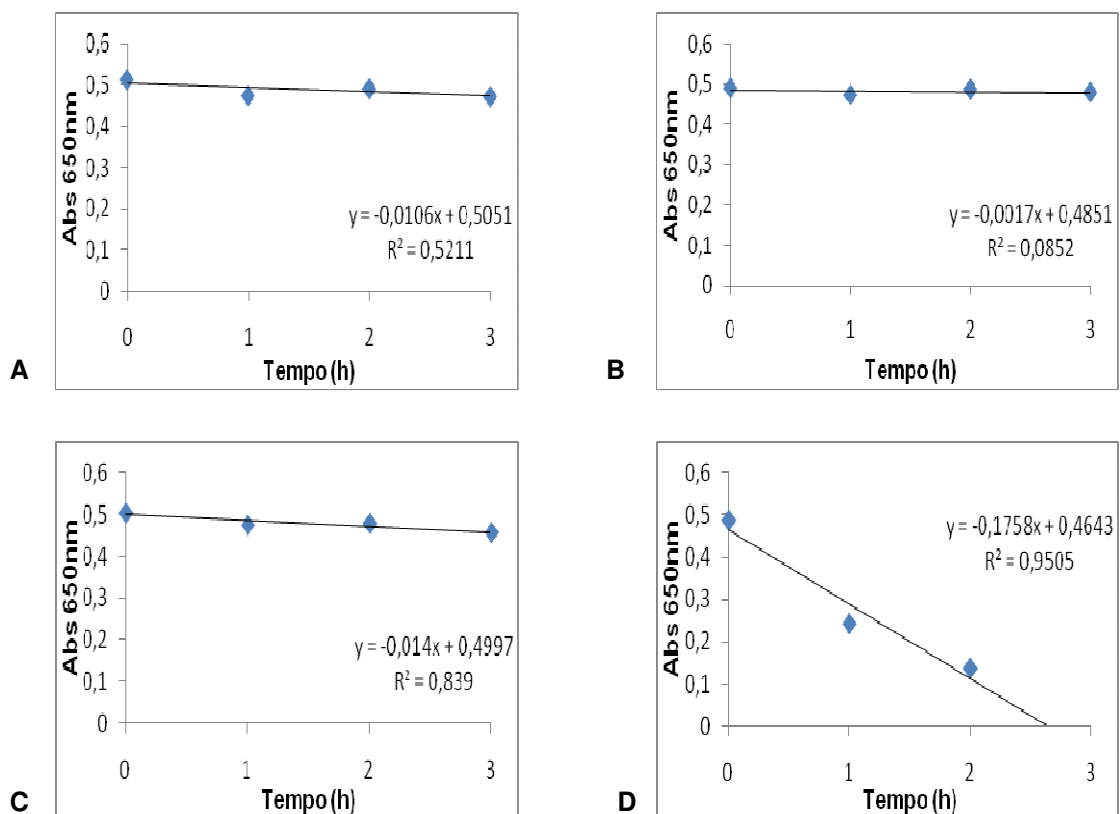
Solução salina 0,85% = controle de crescimento; água destilada estéril = controle de solvente; tampão citrato-fosfato 100mM pH3,5 e solução de lisozima de *Musca domestica* (MdL1) a concentração de 0,12mg/mL foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana

Figura 10 - Inibição do crescimento, em log de UFC/mL, de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), pelo método de pré-incubação com diferentes tratamentos

Como os resultados obtidos com o método 1 não foram satisfatórios, foi desenvolvido outro método. Esse nomeado método 2 baseou-se na metodologia do ensaio de atividade catalítica da enzima, descrito por Cançado et al. (2007), porém as células liofilizadas do *Micrococcus luteus* ATCC 4698 (depositado como *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698) foram substituídas por células viáveis deste micro-organismo para avaliar a morte microbiana. Optou-se por desenvolver esse método com o mesmo micro-organismo utilizado no ensaio de atividade catalítica (CANÇADO, 2007), pois segundo Nakimbugne et al. (2006), lisozimas de diferentes origens nem sempre atuam sobre os mesmos micro-organismos.

A inibição do crescimento microbiano foi observada pela redução de turbidez, como mostra a figura 11. Constatou-se que esse fenômeno foi causado pela ação

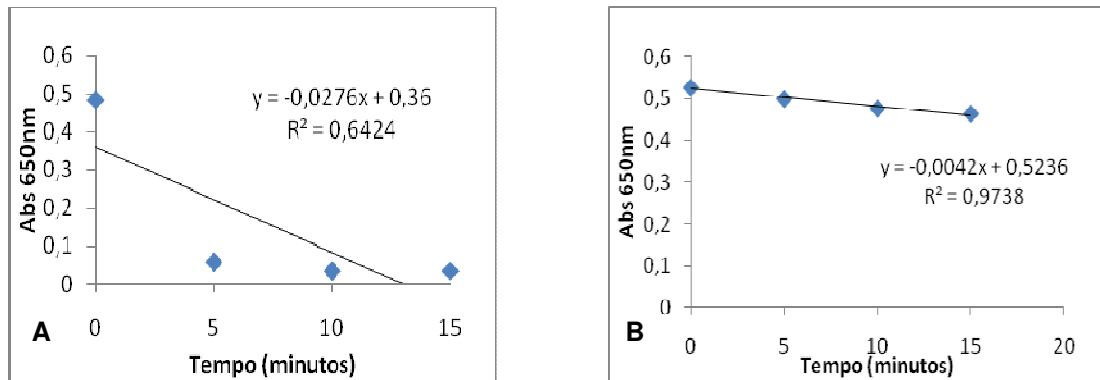
enzimática, pois ao se substituir pela solução de MdL1 por solução salina (A) ou água estéril (B) ou tampão citrato-fosfato (C) a redução de turbidez não ocorreu (Figura 10). Observando-se o coeficiente de determinação (R^2) dos quatro gráficos da figura anteriormente citada, constata-se que o decaimento de turbidez causado pelas preparações (A), (B) e (C) apresentam baixa correlação com o tempo do ensaio, ou seja, não evidenciam atividade catalítica. Porém, o coeficiente de determinação apresentado no gráfico onde a solução de lisozima foi utilizada apresenta alta correlação ($R^2 \geq 0,95$) com o tempo de ensaio, indicando atividade catalítica da enzima sobre o substrato de células viáveis. Estes resultados demonstram que a qualidade do modelo experimental utilizado pode estimar corretamente os valores da variável resposta (absorbância).



A = Solução salina; B = água estéril; C = tampão citrato-fosfato e D = solução a 0,052mg/ mL de lisozima 1 de *Musca domestica*

Figura 11 - Comportamento da suspensão de *Micrococcus luteus* (ATCC 4698) em suspensão no meio de solução salina

A solução de MdL1 a 0,052 mg/mL mostrou em rápido decaimento da turbidez da suspensão de células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, indicando a atividade catalítica da enzima. Entretanto, os resultados apresentaram baixa correlação linear com o tempo de ensaio, evidenciados pelo coeficiente de determinação (R^2) menor ou igual a 0,95, indicando que esta concentração não pertencia à faixa linear de resposta da curva de decaimento de turbidez. Frente a essa ocorrência, a amostra foi diluída 100x e ensaiada novamente, obteve-se alta correlação linear com o tempo de ensaio, comprovando que esta concentração estava dentro da faixa linear de resposta da curva de decaimento da turbidez nestas condições de ensaio (Figura 12).



A – solução de MdL1 a 0,052mg/mL. B – solução de MdL1 a 0,0052mg/mL

Figura 12 - Atividade catalítica da lisozima recombinante de *Musca domestica* frente às células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698

Observando os gráficos das figuras 11 e 12 foi possível estabelecer que o método 2 de avaliação de atividade antimicrobiana da lisozima recombinante de *Musca domestica* foi adequado, pois apresentou especificidade pelo substrato e alta correlação para determinar a atividade catalítica da enzima frente ao mesmo.

Com o método desenvolvido, a MdL1 foi avaliada frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). Para que os resultados da atividade antimicrobiana fossem confiáveis, é importante ressaltar que houve o cuidado de verificar a não

interferência do produto resultante da indução do plasmídeo sem codificação para MdL1.

Os resultados da análise da atividade antimicrobiana da MdL1 na concentração utilizada de 0,052 mg/mL (concentração máxima obtida) não apresentou atividade antimicrobiana frente a todos os micro-organismos desafiados (dados não mostrados). Testar amostras com concentrações mais elevadas seria desejado, entretanto a obtenção dessa enzima em maior concentração implicaria na utilização de equipamentos não disponíveis no laboratório, portanto fator limitante para o prosseguimento dos ensaios da atividade antimicrobiana e da avaliação prévia da atividade citotóxica.

Cabe ressaltar que a MdL1 atua em faixa ácida de pH, sendo uma interessante alternativa para aplicação, como conservante, em formulações ácidas como máscaras e alisantes capilares. Outra alternativa vislumbrada é em relação ao tratamento de infecções estomacais, causadas pelo *Helicobacter pylori*, embora seja necessário avaliar a atividade antimicrobiana dessa enzima frente a este micro-organismo. Assim, a utilização da MdL1 apresenta perspectiva de estudo no futuro.

Na avaliação da atividade antimicrobiana da lisozina de ovo da galinha (HEWL), as concentrações de 0,04 a 10 mg/mL foram testadas frente aos micro-organismos estabelecidos. Com os micro-organismos: Gram-negativos, *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; e o exemplar de fungo filamentoso *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 não ocorreu inibição do crescimento, em todas as concentrações testadas (dados não mostrados). Entretanto, houve inibição de 90% do crescimento microbiano de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 na concentração de 7,5 mg/mL (Figura 13) e 100% de *Candida albicans* ATCC 10231 e *Micrococcus luteus* ATCC 4698 nas concentrações de 10 mg/mL e 5 mg/mL, respectivamente (concentrações em realce nas figuras 14 e 15).

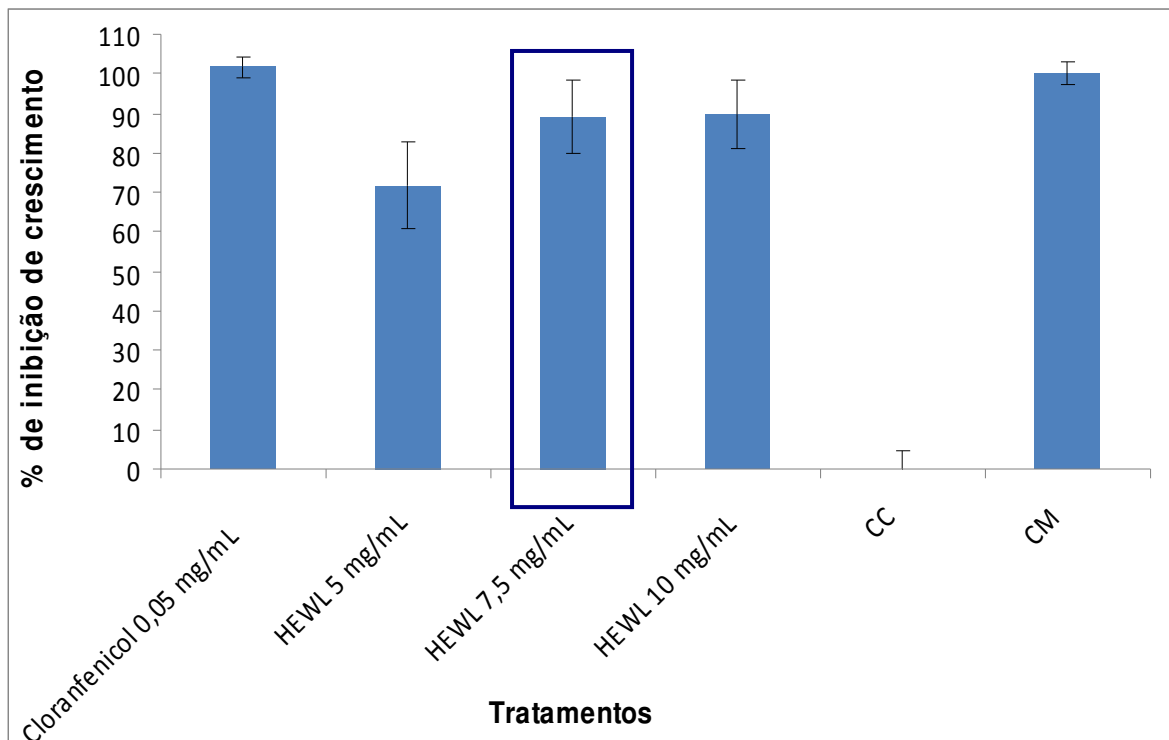


Figura 13 - Porcentagem de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 com carga microbiana de 10^5 UFC/mL, frente à cloranfenicol 0,05 mg/mL (controle de inibição de crescimento), meio de cultura inoculado (controle de crescimento - CC) e soluções de lisozima de ovo de galinha nas concentrações de 5; 7,5 e 10 mg/mL. Meio de cultura estéril (CM) foi utilizado como branco

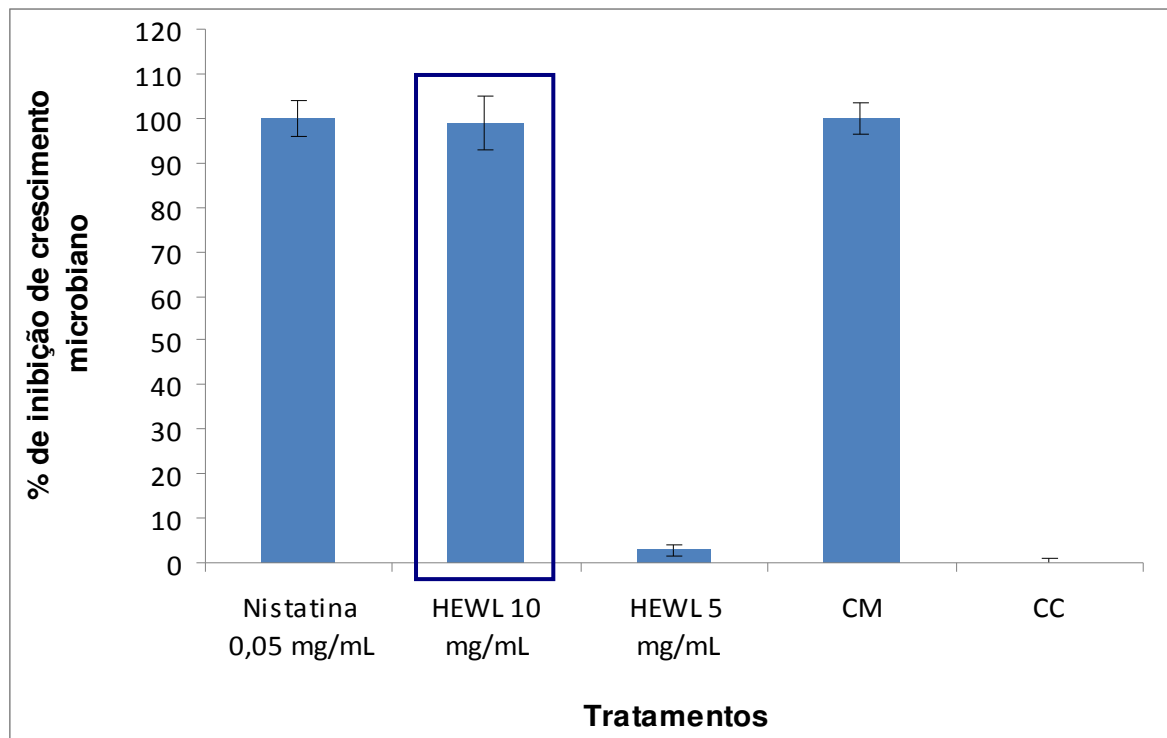
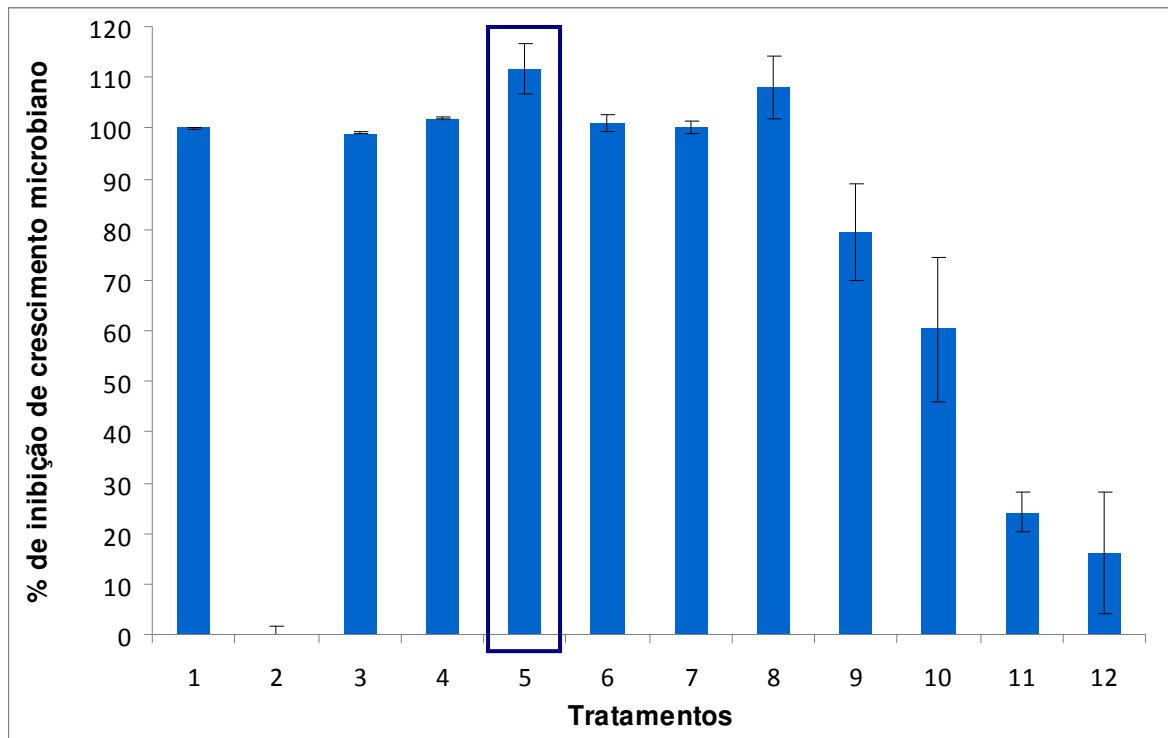


Figura 14 - Porcentagem de inibição do crescimento de *Candida albicans* ATCC 10231, com carga microbiana de 10^5 UFC/mL, frente à nistatina 0,05 mg/mL (controle de inibição de crescimento), meio de cultura inoculado (controle de crescimento) e soluções de lisozima de ovo de galinha nas concentrações de 5 e 10 mg/mL. Meio de cultura estéril (CM) foi utilizado como branco



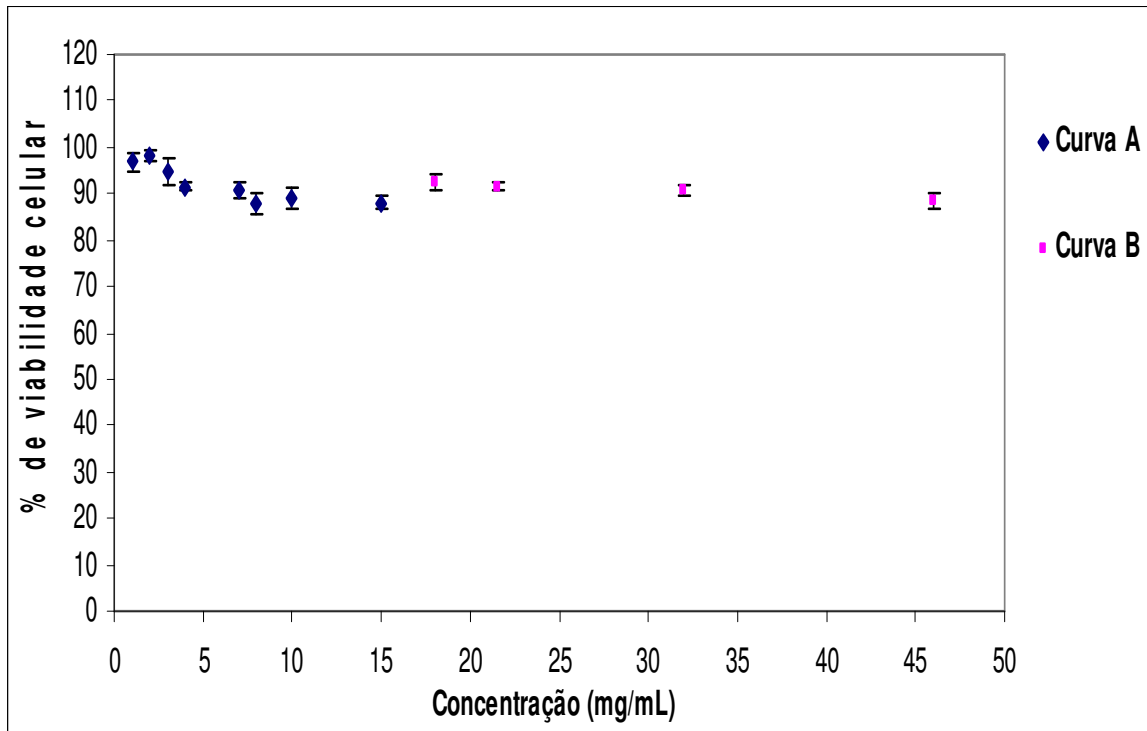
1.CC – Controle de crescimento; 2.CM – Controle do meio de cultura (meio de cultura estéril); 3.Cloranfenicol 0,05 mg/mL; 4.HEWL 10 mg/mL; 5.HEWL 5 mg/mL; 6.HEWL 2,5 mg/mL; 7.HEWL 1,25 mg/mL; 8.HEWL 0,625 mg/mL; 9.HEWL 0,313 mg/mL; 10.HEWL 0,157 mg/mL; 11.HEWL 0,08 mg/mL; 12.HEWL 0,04 mg/mL

Figura 15 - Porcentagem de inibição do crescimento de *Micrococcus luteus* ATCC 4698, com carga microbiana de 10^4 UFC/mL, frente à cloranfenicol 0,05 mg/mL (controle de inibição de crescimento), meio de cultura inoculado (controle de crescimento) e soluções de lisozima de ovo de galinha nas concentrações de 5 e 10 mg/mL. Meio de cultura estéril (CM) foi utilizado como branco

Na avaliação *in vitro* de citotoxicidade, item 2.4, comentou-se que a relação entre dose e resposta da maioria dos *endpoints* farmacológicos e toxicológicos apresenta uma resposta não linear, geralmente no formato sigmóide, que pode ser linearizada através da conversão logarítmica do eixo x. É indicada a determinação das concentrações de amostras testadas por meio da progressão geométrica, em detrimento da progressão aritmética, pois possibilita a distribuição igualitária dos pontos testados (NIH, 2001). A utilização de séries geométricas decimais permite que experimentos independentes possam ser comparados mesmo quando utilizadas concentrações diferentes. Para tanto, foram utilizados os fatores de diluição e

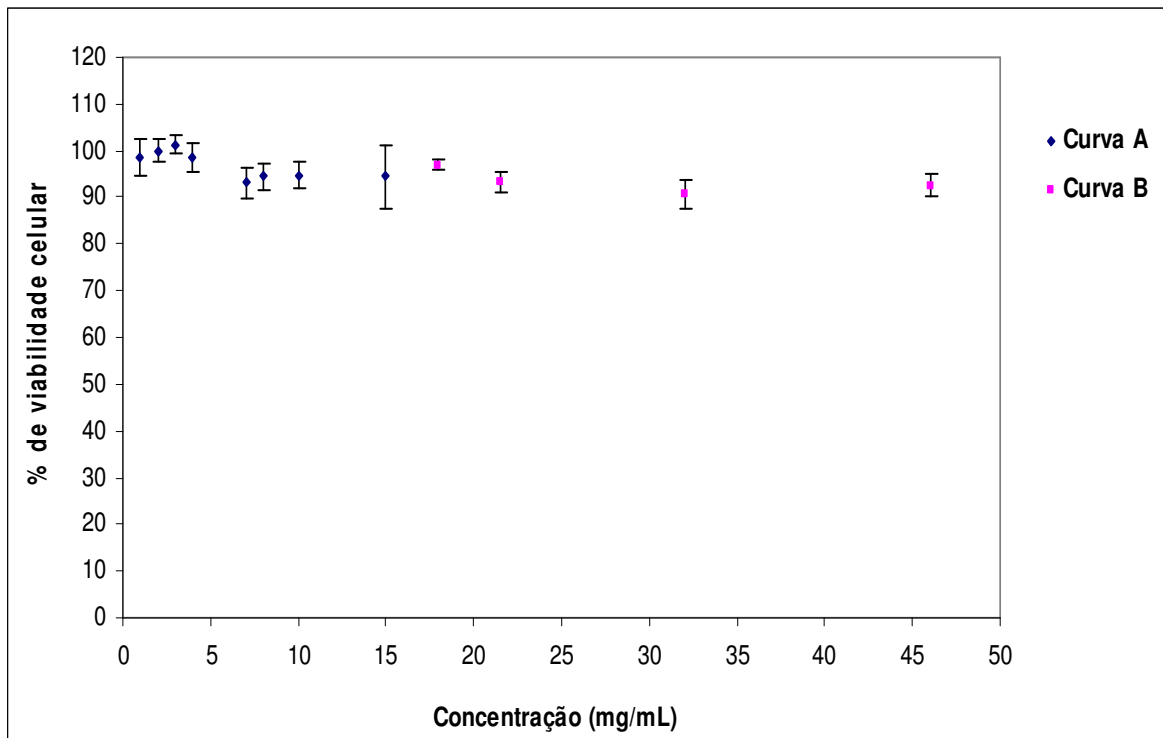
equações, citadas no item 4.2.3, para calcular as concentrações avaliadas no ensaio de citotoxicidade.

Os resultados da interação entre as diversas concentrações de lisozima de ovo de galinha e os fibroblastos, após 24 e 48 horas, estão expressos na forma de porcentagem de viabilidade celular nas figuras 16 e 17.



Curva A – valores obtidos pela aplicação da equação 1; Curva B - valores obtidos pela aplicação da equação 2

Figura 16 - Porcentagem de viabilidade celular após 24 horas de contato com a lisozima de ovo de galinha



Curva A – valores obtidos pela aplicação da equação 1; Curva B - valores obtidos pela aplicação da equação 2

Figura 17 - Porcentagem de viabilidade celular após 48 horas de contato com a lisozima de ovo de galinha

Esses resultados corroboram com dados obtidos de ensaios de toxicidade aguda em cobaias, ratos e coelhos. No qual relata que a lisozima de ovo de galinha é tolerada até 4000 mg/kg, quando administrada via oral em ratos e cobaias. Na administração intravenosa é tolerada até 1000 mg/kg em cobaias e 2000 mg/kg em ratos e coelhos (BIANCHI, 1982). Não há relatos de ensaios *in vitro* com lisozimas, assim ressaltando a importância da realização de uma avaliação mais elaborada da citotoxicidade dessas proteínas antimicrobianas.

6 CONCLUSÃO

Obteve-se a lisozima recombinante de *Musca domestica* (MdL1), pela tecnologia do DNA recombinante, com as características pureza e homogeneidade adequadas.

A lisozima recombinante de *Musca domestica* (MdL1) não demonstrou atividade antimicrobiana, nas concentrações testadas, frente aos micro-organismos desafiados, pelo métodos especificamente desenvolvidos.

A lisozima de ovo de galinha (HEWL) apresentou atividade antimicrobiana frente aos Gram-positivos *Micrococcus luteus* ATCC 4698 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e frente à levedura *Candida albicans* ATCC 10231.

A avaliação prévia da toxicidade da lisozima de ovo de galinha (HEWL) indicou inocuidade desta enzima.

A lisozima de ovo de galinha (HEWL) pode ser considerada candidata a conservante para uso em formulações cosméticas e medicamentosas, porém utilizado em associação com substâncias que atuem sobre micro-organismos Gram-negativos e bolores, requerendo estudos futuros para investigar estas associações.

REFERÊNCIAS

ABREU, C.L.C. **Avaliação da citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3T3**. 104 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional em Saúde, Rio de Janeiro, 2008.

ANDERSEN, M.L., D'ALMEIDA, V., KO, G.M., KAWAKAMI, R., MARTINS, P.J.F. Ética na experimentação animal. In: **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: Cromosete Gráfica e Editora, 2004. p. 2-9.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. Official methods of analysis. 14th ed. Arlington, 2002. p. 1-3.

ATCC - American Type Culture Collection. Disponível em: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-92&Template=cellBiology>. Acesso em: 10.dez.2010.

AUDY, P.; TRUDEL, J.; ASSELIN, A. Purification and characterization of lysozyme from wheat germ. **Plant Science**, v. 58, p. 43-50, 1988.

BABY, A.R.; MACIEL, C.P.M.; KANEKO, T. M.; CONSIGLIERI, V.O.; VELASCO, M.V.R. Validation assay for total flavonoids (as rutin equivalents) from *Treichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) (and) *Phytopetalium olacoids* Bentham (Olacaceae) commercial Extract. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 4, p. 1015-1019, 2005.

BARLTROP, J.A., OWEN, T.C. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.1, n.1, p. 611-614, 1991.

BERNASCONI, R.L.; PILET, P.E.; JOLLÈS, J.; JOLLÈS, P. Purification and N-terminal amino-acid sequence of a basic lysozyme from *Parthenocissus quinquefolia* cultured *in vitro*. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 915, p. 254-2600, 1987

BLUM, H.; BEIR, H.; GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93 – 99, 1987.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia – Produção, aplicações e mercado**. Ed. Interciência, Rio de Janeiro, 2008, 506p.

CANÇADO, F. C. **Bases moleculares do efeito do pH na atividade catalítica de duas lisozimas digestivas de *Musca domestica* (Diptera)**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008, 92p.

CANÇADO, F.C; VALÉRIO, A.A.; MARANA, S.R.; BARBOSA, J.A.R.G. The crystal structure of a lysozyme c from housefly *Musca domestica*, the first structure of a digestive lysozyme. **J. Structural Biology**, v.160, p. 83–92, 2007.

CASTILHO, L.R.; MORAES, A.M.; AUGUSTO, E.F.P.; BUTLER, M. **Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**. 1^a ed, Nova Iorque: Taylor & Francis, 2008. 518p.

CHACRA, N. A. B.; PINTO, T.J.A.; KANEKO, T. M. Evaluation of Preservative Systems in Ophthalmic Suspension of Dexametasone and Polymyxin B. **Die Pharmazie**, v. 62, n. 3, p. 199-204, 2007.

CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA, R.; LESNIEROWSKI, G.; KIJOWSKI, J. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by thermochemical technique. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 228, p. 841-845, 2009.

COLIPA: Serious about Cosmetics - Serious about Alternative Methods.
Disponível em: <www.colipa.eu/downloads/50.html>. Acesso em: 10. dez. 2010.

CONESA, C.; ROTA, M.C.; PÉREZ, M.D.; CALVO, M.; SÁNCHEZ, L. Antimicrobial activity of recombinant human lactoferrin from *Aspergillus awamori*, human milk lactoferrin and their hydrolysates. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 228, p. 205-211, 2008.

COSMETIC, TOILETRY AND FRAGRANCE ASSOCIATION. **Microbiological Guideline**. Washington, 2001.

COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B. (1999) Carbohydrate active enzymes. Disponível em: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>.

Dicionário de Especialidades Farmacêuticas – DEF. Editora de Publicações Científicas, 2007.

DOBSON, D.E.; PRAGER, E.M.; WILSON, A.C. Stomach lysozymes of ruminants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, f. 18, p. 11607-11616, 1984.

DUAN, J.; PARK, S.I.; DAESCHEL, M.A.; ZHAO, Y. Antimicrobial chitosan-lysozyme (CL) films and coatings for enhancing microbial safety of mozzarella cheese. **Journal of Food Science**, v. 72, f. 9, p. M355-362, 2007.

FERRARI, S. **Novel ophthalmic compositions containing human recombinant lysozyme and use thereof for treating eye conditions and as contact lens solutions**. WO 2008/109397 A2, 12 de setembro de 2008a.

FERRARI, S. **Novel compositions containing lysozyme and c-1/c-4 polysaccharides and use thereof in oral care, cosmetology and dermatology, contraception, urology and gynecology.** WO 2008/124764 A1, 16 de outubro de 2008b.

FLEMING, A. On remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 93, p. 306-317, 1922.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique.** 5.ed. New York: Wiley, 2005. 732p.

HOUSEKNECHT, J.; STAMENOVA, E.; SUH, S-O; BECK, B.; MCKEE, M.; ZHOU, J. Reclassification of ATCC[®] 16404[™] and ATCC[®] 9462[™] as *Aspergillus brasiliensis*. **Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter**, v. 14, f. 10, p. 2-8, 2008.

IBARRA, F.; JOHNSON, C.H. Natural preservatives from concepts in nature. **Cosmetics & Toiletries**, v. 123, f. 3, 2008.

IBRAHIM, H.R.; HIGASHIGUCHI, S.; KOKETSU, M.; JUNEJA, L.R.; KIM, M.; YAMAMOTO, T.; SUGIMOTO, Y.; AOKI, T. Partially Unfolded Lysozyme at Neutral pH Agglutinates and Kills Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria through Membrane Damage Mechanism. **J. Agric. Food Chem**, v. 44, p. 3799-3806, 1996.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS - ICCVAM. Peer review panel report: The use of in vitro basal cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing. Research Triangle Park: National Toxicology Program, n. 07-4519, nov. 2006

INVITROGEN CORPORATION. *Pichia* expression kit – A manual of methods for expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. Catálogo nº K1710-01, Carlsbad, CA, Estados Unidos, 2000-2002.

ICCVAM. Peer review panel report: The use of in vitro basal cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing. Research Triangle Park: National Toxicology Program, n. 07-4519, nov. 2006.

ISO 10993-5 (International Organization for Standardization) Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods. Switzerland, 2009.

JOLLÈS, J; SCHOENTGEN, F.; CROIZIER, G.; CROIZIER, L.; JOLLÈS, P. Insect lysozymes from three species of Lepidoptera: their structural relatedness to the c (chicken) type lysozyme. **Journal of Molecular Evolution**, v. 14, p. 267-271, 1979.

JOLLÈS, P. Recent developments in the study of lysozymes. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 3, f. 1, p. 28-36, 1964.

JOLLÈS, P.; JOLLÈS, J. Lysozyme from human milk. **Nature**, v. 192, p. 1187-1188, 1961.

JOLLÈS, P; JOLLÈS, J. What's new in lysozyme research? **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 63, p. 165-189, 1984.

KABARA, J.J.; ORTH, D.S. **Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs: principles and practices**, 1^a ed, Marcel Dekker, 1997, 274 p.

KAMYSZ, W.; TURECKA, K. Antimicrobial preservative effectiveness of natural peptide antibiotics. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 62, f. 5, p. 341-344, 2005a.

KAMYSZ, W.; NADOLSKI, P. Antibacterial activity of peptides from amphibians skin. **Annales Academiae Medicae Gedanensis**, v. 35, p. 29-34, 2005b.

KOCUR, M.; PÁČOVÁ, Z.; MARTINEC, T. Taxonomic status of *Micrococcus luteus* (Schroeter 1872) Cohn 1872, and designation of the neotype strain. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 22, f. 4, p. 218-223, 1972.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, v. 227, p. 680 – 685, 1970.

LASANTA, C.; ROLDÁN, A.; CARO, I.; PÉREZ, L.; PALACIOS, V. Use of lysozyme for the prevention and treatment of heterolactic fermentation in the biological aging of Sherry wines. **Food Control**, v. 21, p. 1442-1447, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3ª ed., Ed. Sarcier, São Paulo, 2002, 975p.

LIMA, B. D. **A produção de insulina humana por engenharia genética**. *Biotechnology Ciência e Desenvolvimento*, 23: 28-31, 2001.

MA, J.K-C.; DRAKE, P.M.W.; CHRISTOU, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Nature Reviews/Genetics**, v. 4, p. 794-805, 2003.

MARANA, S. R.; CANÇADO, F. C.; VALÉRIO, A. A.; FERREIRA, C.; TERRA, W. R.; BARBOSA, J. A. R. G. Crystallization, data collection and phasing of two digestive lysozymes from *Musca domestica*. **Acta Cryst.**, f. 62, p.750–752, 2006.

MI AN. **Use of Human Lysozyme in preparation of medicine for treating of acne**. US 2007/0264247A1, 15 novembro 2007.

NAKIMBUGNE, D.; MASSCHALCK, B.; ATANASSOVA, M.; ZEWDIE-BOSÜNER, A.; MICHIELS, C.W. Comparison of bactericidal activity of six lysozymes

at atmospheric pressure and under high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 355-363, 2006.

NCCLS/CLSI NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition (M7-A6). Wayne, PA, USA, 2003.

NCCLS/CLSI - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovado-Segunda Edição (M27-A2). Wayne, PA, Estados Unidos, 2002.

NCCLS/CLSI - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Método de referência para teste de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos; Norma aprovada (M38-A). Wayne, PA, Estados Unidos, 2002.

NIH PUBLICATION - NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Guidance document on using in vitro data to estimate in vivo starting doses for acute toxicity, n. 01-4500, ago. 2001.

NIYONSABA, F.; OGAWA, H. Protective roles of the skin against infection: Implication of naturally occurring human antimicrobial agents b-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. **J. Dermatological Science**, v. 40, p. 157-168, 2005.

ORTIZ, K.J.; YIANNIAS, J.A. Contact dermatitis to cosmetics, fragrances and botanicals. **Dermatologic Therapy**, v. 17, p. 264-271, 2004.

PALUMBO, D.; IANNACCONE, M.; PORTA, A.; CAPPARELLI, R. Experimental antibacterial therapy with puriindolines, lactoferrin and lysozyme in *Listeria monocytogenes*-infected mice. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 538-545, 2010.

PELLEGRINI, A.; THOMAS, U.; BRAMAZ, S.K.; HUNZIKER, P.; VON FELLEBERG, R. Identification and isolation of bacterial domain in chicken egg white lysozyme. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, p. 372-378, 1997.

PETIT, J.F.; JOLLÈS, P. Purification and analysis of human saliva Lysozyme. **Nature**, v. 200, p. 168-169, 1963.

PINTO, A.C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. LOPES. N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, f. 1, 45-61, 2002.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F.. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 3ª ed., Ed. Atheneu, São Paulo, 2010, 780 p.

TERRA, W. R; FERREIRA, C. Biochemistry of Digestion. In: Gilbert, L. I.; Iatov, K.; Gill, S. **Comprehensive Molecular Insect Science**. Oxford: Elsevier, 2005. V. 4, p. 171-224.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5ª ed., Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2004, 904p.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E.F. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2ªed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque, 1989.

SCHRÖDER, J-M. Molécules de défenses constitutionnelles locales. **Ann. Dermatol. Venereol**. v. 131, p. 411-416, 2004.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, v. 33. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2010.

VALENTA, C.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; SCHWARTZ, M. Modification of lysozyme with cinnamaldehyde: a strategy for constructing novel preservatives for dermatics. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 148, p. 131-137, 1997.

VALENTA, C.; SCHWARTZ, E; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Lysozyme-caffeic acid conjugates: possible novel preservatives for dermal formulations. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 174, p. 125- 132, 1998.

VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; TÓTH, B.; FRISVAD, J.C.; PERONE, G.; SUSCA, A.; MEIJER, M.; SAMSON, R.A. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1925-1932, 2007.

VERONESI, P.A.; RODRIGUEZ, P.E.A. **Use of lysozyme C to prepare medicinal compositons for the treatment of some serious diseases**. US 7012062, 14 de março de 2006.

VUNK, G.H.; MARAIS, D.A. **Lysozyme-based method and composition to control the growth of microorganisms in aqueous systems**. US 7348301, 26 de fevereiro de 2006.

WELLMAN-LABADIE, O.; PICMAN, J.; HINCKE, M.T. Comparative antibacterial activity of avian egg white protein extracts. **British Poultry Science**, v. 49, f. 2, p. 125-132, 2008.

WERE, L.M.; BRUCE, B.; DAVIDSON, P.M.; WEISS, J. Encapsulation of nisin and lysozyme in liposomes enhances efficacy against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 67, f. 5, p. 922-927, 2004.

WHO, *World Health Organization*. WHO Food Additives Series: Lysozyme, v. 30, f. 749, 1992.

ZAHA, A; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia molecular básica.**
3ª Ed., Ed. Mercado Aberto, Porto Alegre, 2003, 424p.