

Prospecção de Moléculas Bioativas em Animais e Plantas: Uma Visão Biotecnológica

Regina Meneses Gonçalves
Breno Emanuel Farias Frihling
Ludovico Migliolo
(Organizadores)



Atena
Editora
Ano 2019

Regina Meneses Gonçalves
Breno Emanuel Farias Frihling
Ludovico Migliolo
(Organizadores)

Prospecção de Moléculas Bioativas em Animais e Plantas: Uma Visão Biotecnológica

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Executiva: Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Lorena Prestes
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^a Dr^a Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof^a Dr^a Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof^a Dr^a Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof.^a Dr.^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof.ª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof.ª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof.ª Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
P966	Prospecção de moléculas bioativas em animais e plantas [recurso eletrônico] : uma visão biotecnológica / Organizadores Regina Meneses Gonçalves, Breno Emanuel Farias Frihling, Ludovico Migliolo. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-575-4 DOI 10.22533/at.ed.754190209 1. Bioquímica. 2. Biotecnologia. 3. Microbiologia. I. Gonçalves, Regina Menesas. II. Frihling, Emanuel Farias. III. Migliolo, Ludovico. CDD 660.6
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A obra intitulada “*Prospecção de moléculas bioativas em animais e plantas: uma visão biotecnológica*” consiste em uma coletânea de artigos científicos apresentados em 9 capítulos, com enfoque em biotecnologia. Na mesma, foram expostos conhecimentos sobre bioquímica, microbiologia e bioinformática, com estudos em diferentes espécies, abrangendo a biodiversidade brasileira.

Na biotecnologia, os campos de estudos são muito amplos e englobam pesquisas complexas envolvendo microrganismos, plantas e animais. Desta forma, a obra apresenta pesquisas sobre moléculas bioativas derivadas de aracnídeos, insetos, répteis, anfíbios e plantas. Essas moléculas bioativas apresentam uma gama de atividades biológicas, e algumas dessas, com potencial antimicrobiano, inibidores de peptidases, entre outras, foram apresentadas no decorrer da obra.

Ademais, moléculas protéicas bioativas provenientes de fontes naturais, podem ter sua sequências primárias caracterizadas e modificada por meio da bioinformática (metodologia de desenho racional), que busca melhorar seu potencial terapêutico *in vitro* partindo de estudos *in silico*.

As informações geradas nesta obra são de extrema relevância em nível acadêmico, pois mostra pesquisas básicas avançando para pesquisas aplicadas, o que proporciona o enriquecimento da comunidade científica e formação profissional de alunos de graduação e pós graduação.

Regina Meneses Gonçalves
Breno Emanuel Farias Frihling
Ludovico Migliolo

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
ANÁLISE DE PERFIL PROTEICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DA HEMOLINFA DA ARANHA <i>Nhandu carapoensis</i>	
Luiz Filipe Ramalho Nunes de Moraes Patrícia Souza e Silva Alexya Sandim Guindo Ludovico Migliolo	
DOI 10.22533/at.ed.7541902091	
CAPÍTULO 2	17
CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME E ANTITUMORAL DA PEÇONHA DE <i>Tityus confluens</i>	
Regina Meneses Gonçalves Danieli Fernanda Buccini Luiz Filipe Ramalho Nunes de Moraes Ludovico Migliolo	
DOI 10.22533/at.ed.7541902092	
CAPÍTULO 3	30
AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE LARVAS NECRÓFAGAS <i>Chrysomya albiceps</i> (DIPTERA, CALLIPHORIDAE) INIBIDORAS DE BIOFILME DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC	
Patrícia Souza e Silva Regina Meneses Gonçalves Daniela Lopes Da Cunha Lucas Rodrigues de Lima Carina Elisei De Oliveira Ludovico Migliolo	
DOI 10.22533/at.ed.7541902093	
CAPÍTULO 4	41
EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS TOXINAS PRESENTE EM LAGARTA <i>Lonomia obliqua</i> (LEPIDOPTERA, SATURNIIDAE) COM ATIVIDADE ANTIBIOFILME	
Patrícia Souza e Silva Luiz Filipe Ramalho Nunes de Moraes Elizangela de Barros Ana Paula de Araújo Boleti Ludovico Migliolo	
DOI 10.22533/at.ed.7541902094	
CAPÍTULO 5	51
DESENHO RACIONAL DE PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS ANÁLOGOS A TOXINA DO ESCORPIÃO <i>Tityus sp.</i>	
Lucas Bianchi Nunes Taylla Michelle de Oliveira Flores Patricia Souza e Silva Elizangela de Barros Marlon Henrique Cardoso Octávio Luiz Franco Ludovico Migliolo	
DOI 10.22533/at.ed.7541902095	

CAPÍTULO 6	71
AVALIAÇÃO E SELEÇÃO <i>IN SILICO</i> DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS BIOINSPIRADOS NA L-AMINOÁCIDO OXIDASE DA SERPENTE <i>Bothrops jararacussu</i>	
Odaias Pereira de Almeida Filho	
Breno Emanuel Farias Frihling	
Michel Ângelo Constantino de Oliveira	
Gilberto Astolfi	
Hemerson Pistori	
Ludovico Migliolo	
DOI 10.22533/at.ed.7541902096	
CAPÍTULO 7	81
ESTUDO DA NEUTRALIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO VENENO DA SERPENTE <i>Bothrops erythromelas</i>	
Ellynes Amancio Correia Nunes	
Renner de Souza Leite	
Álison Emannuel Franco Alves	
Ludovico Migliolo	
Karla Patrícia de Oliveira Luna	
DOI 10.22533/at.ed.7541902097	
CAPÍTULO 8	96
ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO POR SDS-PAGE DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE <i>Rhinella schneideri</i> , <i>Dermatonotus muelleri</i> , <i>Physalaemus nattereri</i> e <i>Trachycephalus typhonius</i>	
Alexya Sandim Guindo	
Luiz Humberto Guimarães Riquelme Junior	
Luiz Felipe Ramalho Nunes de Moraes	
Ludovico Migliolo	
DOI 10.22533/at.ed.7541902098	
CAPÍTULO 9	110
POTENCIAL DE INIBIDORES SERINICOS EM FOLHAS DE <i>Croton urucurana</i> (MALPIGHIALES, EUPHORBIACEAE) PARA O CONTROLE DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)	
Taylla Michelle de Oliveira Flores	
Liliam Silvia Cândido	
Ludovico Migliolo	
Jannaina Velasques da Costa Pinto	
DOI 10.22533/at.ed.7541902099	
SOBRE OS ORGANIZADORES.....	118

ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO POR SDS-PAGE DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE *Rhinella schneideri*, *Dermatonotus muelleri*, *Physalaemus nattereri* e *Trachycephalus typhonius*

Alexya Sandim Guindo

Universidade Católica Dom Bosco – UCDB
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Luiz Humberto Guimarães Riquelme Junior

Universidade Católica Dom Bosco – UCDB
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Luiz Felipe Ramalho Nunes de Moraes

Universidade Católica Dom Bosco – UCDB
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Ludovico Migliolo

Universidade Católica Dom Bosco – UCDB
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

RESUMO: O Brasil compreende 1.080 espécies de anfíbios. A ordem anura possui a maior diversidade, com 1.039 espécies. A secreção cutânea desses animais apresentam dois tipos de glândulas: as mucosas que atuam na manutenção da pele, e as serosas que são responsáveis pela síntese e armazenamento dos compostos tóxicos. A composição das secreções cutâneas de glândulas mucosas e serosas apresentam diversos compostos bioativos que já foram isolados e caracterizados como aminas biogênicas, esteróides, alcalóides e peptídeos antimicrobianos. Portanto, o presente estudo teve como objetivo analisar o perfil proteico presente na secreção cutânea de anuros por meio do método de Eletroforese (SDS-PAGE)

visando a identificação de peptídeos com baixa massa molecular. As espécies utilizadas foram *Rhinella schneideri*, *Dermatonotus muelleri*, *Physalaemus nattereri* e *Trachycephalus typhonius*, obtidos do Biotério da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). A secreção foi extraída por meio de eletroestimulação branda com uma bateria alcalina de 9V, o lavado foi imediatamente recuperado com água ultrapura e congelados a -80°C para liofilização. Para análise do perfil proteico foi utilizado o método de Eletroforese SDS-PAGE 12% e posteriormente corado com *Comassie Brilliant Blue*. Os resultados com SDS-PAGE demonstraram que *D. muelleri*, *R. schneideri*, *P. nattereri* e *T. typhonius* apresentaram 17, 5, 4 e 3 bandas proteicas respectivamente. *D. muelleri* foi a única espécie que apresentou massas moleculares abaixo de 21 kDa. Para as demais espécies houve variação entre 30 a 205 kDa. Este método foi eficaz na identificação de proteínas e *D. muelleri* apresentou maior número de moléculas proteicas de baixa massa molecular.

PALAVRAS-CHAVE: Bioprospecção, anuros, toxina, proteína.

ABSTRACT: Brazil comprises 1,080 species of amphibians. The anura order has the highest diversity, with 1,039 species. The cutaneous secretions of these animals present two types of

glands: the mucous membranes that act in the maintenance of the skin, and the serous ones that are responsible for the synthesis and storage of the toxic compounds. The composition of cutaneous secretions of the mucous and serous glands present several bioactive compounds that have already been isolated and characterized as biogenic amines, steroids, alkaloids and antimicrobial peptides. Therefore, the present study aimed to analyze the protein profile present in the cutaneous secretion of anurans by means of the Electrophoresis method (SDS-PAGE) aiming at the identification of peptides with low molecular mass. The species used were *Rhinella schneideri*, *Dermatonotus muelleri*, *Physalaemus nattereri* and *Trachycephalus typhonius*, obtained from the Zootério of the Catholic University Don Bosco (UCDB). The secretion was extracted by gentle electrostimulation with a 9V alkaline battery, the wash was immediately recovered with ultrapure water and frozen at -80°C for lyophilization. Protein profile analysis was performed using the 12% SDS-PAGE electrophoresis method and then stained with Comassie Brilliant Blue. The results with SDS-PAGE demonstrated that *D. muelleri*, *R. schneideri*, *P. nattereri* and *T. typhonius* presented 17, 5, 4 and 3 protein bands respectively. *D. muelleri* was the only species that had molecular masses below 21 kDa. For the other species there was variation between 30 and 205 kDa. This method was effective in the identification of proteins and *D. muelleri* presented higher number of low molecular weight protein molecules.

KEYWORDS: bioprospecting, anurans, toxin, protein.

1 | INTRODUÇÃO

Os anfíbios, do grego *anfi*: dupla; *bio*: vida, são animais que, têm parte do ciclo de sua vida na água, na forma larval representada pelos girinos, e a outra parte do ciclo de vida dos indivíduos adultos é terrestre, são considerados os primeiros vertebrados a conquistarem este ambiente, porém nem todos os anfíbios têm essa vida dupla, em algumas espécies, do ovo já eclodem juvenis, inexistindo a fase aquática dos girinos (STORER, 2003). Filogeneticamente, a classe Amphibia divide-se em três ordens: Gymnophiona: Animais ápodos e subterrâneos, conhecidos como cobras-cegas ou mais corretamente, cecílias. Caudata: Animais aquáticos e terrestres que apresentam caudas, representados pelas salamandras e tritões e Anura: Abrange a maioria dos anfíbios conhecidos pelos sapos, rãs e pererecas. O Brasil possui 1080 espécies de anfíbios, distribuindo-se em 36 Gymnophionas, cinco Caudata e 1039 Anuras (SEGALLA et al., 2016).

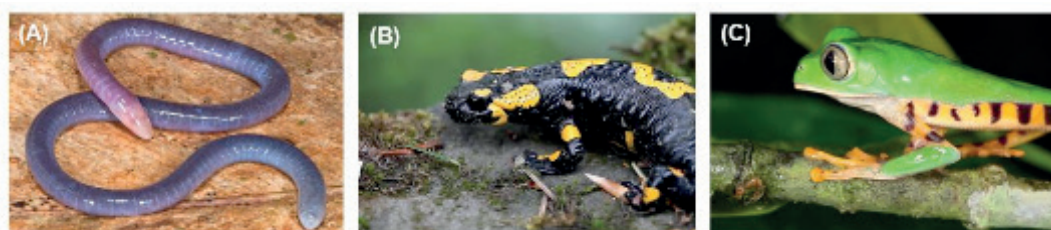


Figura 1. Exemplares da classe Amphibia, sendo, (A) representante da ordem Gymnophiona; (B) representante da ordem Caudata; (C) representante da ordem Anura.

Anfíbios apresentam uma forma de defesa passiva, ainda que não possuam grande eficiência para prevenir a morte. A maior parte das funções vitais dos anfíbios é desempenhada pela pele, como, respiração, proteção contra dessecação, contra diversos microrganismos, dentre outros. A produção e secreção de pequenas quantidades de veneno são realizadas pelas inúmeras glândulas distribuídas por toda a superfície corpórea do animal (JARED; ANTONIAZZI et al., 2009).

Na atualidade, as secreções de anfíbios anuros tem sido foco de diversas pesquisas, acabando em contribuições importantes relacionadas, principalmente, à identificação de toxinas com significativas ações farmacológicas. A descoberta de várias novas toxinas tem tido decorrência devido a técnicas sofisticadas para o isolamento de compostos presentes nos venenos de anfíbios (DORNELLES; MARQUES; RENNER, 2010).

Existem dois tipos de glândulas encontradas na pele de anfíbios, as glândulas granulares, também conhecidas como serosas ou de veneno, as quais são responsáveis pela defesa passiva do animal e produzem secreções tóxicas a um grande número de vertebrados, e as glândulas mucosas que estão presentes em maior quantidade e são responsáveis por atuar na manutenção da pele e produzem secreções de natureza química diferenciada (DORNELLES; MARQUES; RENNER, 2010).

Desde o final da década de 80, os compostos presentes nas secreções glandulares de anfíbios são alvo de inúmeros estudos (HABERMEHL, 1981). Existe uma variedade de substâncias presentes na secreção bruta das glândulas dos anfíbios, como por exemplo, aminas biogênicas (adrenalina, noradrenalina e dopamina), peptídeos antimicrobianos (PAMs), esteroides e alcaloides (DALY; MYERS; WHITTAKER, 1987; ERSPAMER, 1971; HABERMEHL, 1981; JARED; ANTONIAZZI, 2009; LAI et al., 2003; MONTI; CARDELLO, 1994). Esses compostos podem ser, farmacologicamente, miotóxicos, neurotóxicos, hemotóxicos, cardiotoxícos, colinomiméticos ou simpatomiméticos, vasoconstritores, dentre outros (HABERMEHL, 1981; JARED; ANTONIAZZI, 2009). As substâncias encontradas nas secreções de pele de anuros podem ser utilizadas como analgésicos, na terapêutica ao combate de neoplasias, como medicamentos em problemas cardíacos e contra bactérias resistentes à diversos antimicrobianos (GARG; HIPPARGI; GANDHARE, 2008).

Já foram isolados e bem caracterizados vários PAMs bioativos presentes na pele de anfíbios anuros (Tabela 1) (PRATES; BLOCH JR, 2000; WEI et al., 2015), estes são caracterizados principalmente por sua natureza catiônica e capacidade de lisar membranas de microrganismos, dentre esses, a bombinina, foi isolada das secreções glandulares de *Bombina variegata*, descrita em 1970 como peptídeo antibacteriano e hemolítico (PRATES; BLOCH JR., 2000; SIMMACO; KREIL; BARRA, 2009). Esses peptídeos se dispõem de algumas características químicas como, por exemplo,

pequenos resíduos de aminoácidos (de 20 a 46 resíduos), carga líquida positiva (ricos em lisina ou arginina) e são geralmente moléculas anfipáticas (NICOLAS; MOR, 1995; VRIES et al., 2015). Estas moléculas servem como modelos para a produção de novos fármacos (NEGRI et al., 1992; LAZARUS et al., 1999; GEBHARD et al., 2004; PRATES et al., 2004; BRAND et al., 2006b).

A descoberta por novos fármacos vem se tornando muito importante devido ao aumento da resistência de fungos e bactérias aos antimicrobianos disponíveis no mercado. O processo de disseminação de doenças torna-se mais acelerado decorrente da adaptação e rápida multiplicação dos microrganismos (DORNELLES; MARQUES; RENNER, 2010).

Peptídeos	Anuros
Bombininas	<i>Bombina sp.</i>
Brevininas	<i>Rana brevipedata</i>
Buforina	<i>Bufo bufo</i>
Caerinas	<i>Litoria sp.</i>
Ceruleína	<i>Litoria cerulea</i>
Demaseptina	<i>Phyllomedusa sp.</i>
Esculentinas	<i>Rana esculenta</i>
Frenalina	<i>Litoria infrafronata</i>
Gaegurinas	<i>Rana rugosa</i>
Levitideo	<i>Xenopus laevis</i>
Maculalinas	<i>Litoria genimaculata</i>
Magalininas	<i>Xenopus sp.</i>
PGLa	<i>Xenopus laevis</i>
Pipininas	<i>Rana pipiens</i>
Ranalexinas	<i>Rana catesbeiana</i>
Rugosinas	<i>Rana rugosa</i>
Temporinas	<i>Rana temporaria</i>
Xenoxinas	<i>Xenopus sp.</i>
Xenopsina	<i>Xenopus laevis</i>

Tabela 1. Principais peptídeos antimicrobianos encontrados nas secreções cutâneas de anfíbios anuros. Fonte: Adaptado de PRATES; BLOCH JR (2000) apud ANJOLETTE, 2015.

Com o descobrimento de novos PAMs de diversos organismos, houve a transformação destas moléculas em compostos básicos para o design de novas e eficientes gerações de medicamentos contra inúmeras doenças (FJELL et al., 2012; LEE et al., 2015).

Nos últimos anos diversos estudos apontam para o crescimento da resistência antimicrobiana aos atuais medicamentos disponíveis na clínica médica. A resistência aos antimicrobianos vem tornando-se um problema mundial de saúde pública e vem aumentando nas últimas décadas (CDC, 2014; MOELLERING-JR, 2011; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

Estudos do Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) estimam 23.000 mortes provocadas por doenças vinculadas à resistência antimicrobiana para, aproximadamente, 2.000.000 de pessoas com doenças que possuem microrganismos resistentes (CDC, 2014). É apresentado na figura 2 o desenvolvimento da resistência antimicrobiana entre os anos de 1940 e 2011.



Figura 2. Linha do tempo dos importantes eventos-chave do desenvolvimento da resistência microbiana entre os anos de 1940 e 2011. XD: *extensively drug*; PD: *pan drug*. Imagem adaptada do CDC (2014) *apud* ANJOLLETTE, 2015.

No Brasil, cerca de 70% das bactérias hospitalares são resistentes a pelo menos um antimicrobiano mais comumente utilizado no tratamento de pacientes. A resistência aos antimicrobianos é uma consequência natural de adaptação das bactérias quando expostas aos mesmos (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2007).

Mesmo que haja uma vasta diversidade de ação dos antimicrobianos, a resistência microbiana pode ocorrer de várias formas (WRIGHT, 2005). Dentre elas, os principais mecanismos incluem modificação molecular do alvo por meio de transformação enzimática, expressão de genes de resistência, ativação da bomba de efluxo, além da alteração da permeabilidade da membrana (Figura 3). A resistência pode surgir de forma passiva, onde é resultado de mecanismos inatos pré-existentes) ou de forma ativa, por meio da aquisição de um novo material genético, por exemplo, plasmídeos ou transposões (LEVY; MARSHALL, 2004; ODDS; BROWN; GOW, 2003; WRIGHT; SUTHERLAND, 2007).

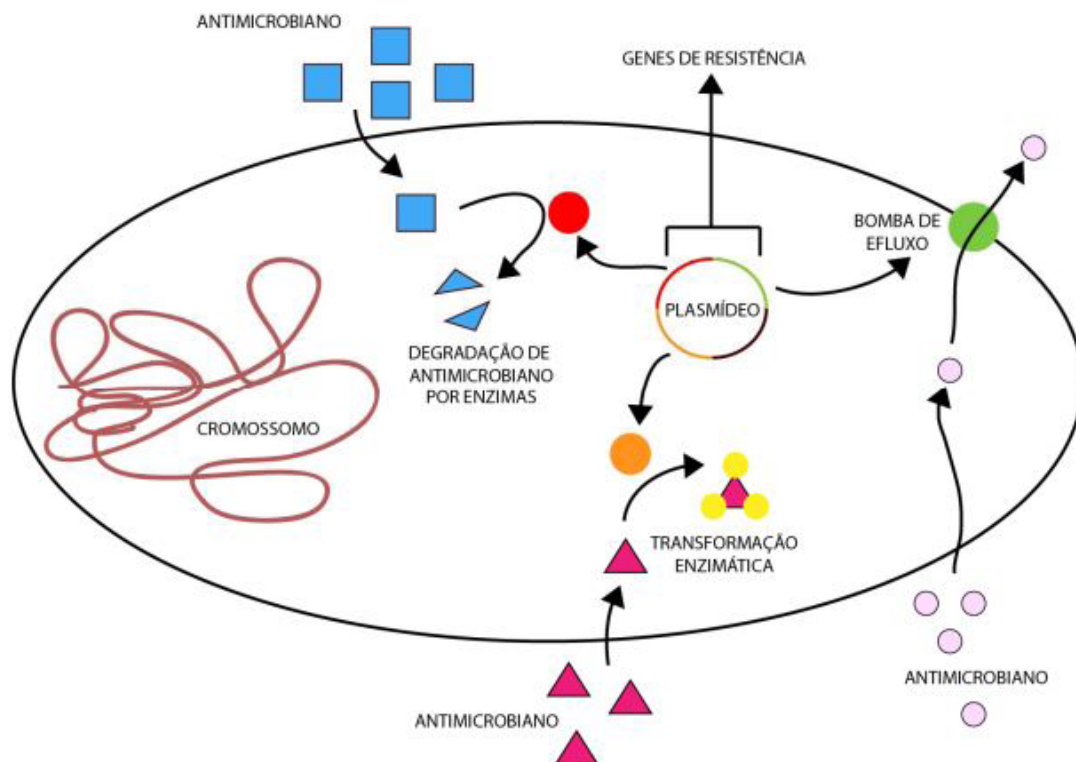


Figura 3. Diversos mecanismos biológicos de resistência microbiana. **Fonte:** Adaptado de LEVY; MARSHALL (2004) *apud* ANJOLETTE, 2015.

Como resultado do aumento das estratégias terapêuticas atualmente utilizadas, estão os avanços empregados na identificação de novas fontes de compostos antimicrobianos (WRIGHT; SUTHERLAND, 2007). Nos últimos anos, o número de antimicrobianos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) tem diminuído drasticamente. Em 2012, menos de quatro agentes antimicrobianos foram aprovados pelo FDA, o que mostra a necessidade do desenvolvimentos de novas classes de antimicrobianos para os quais a resistência ainda não foi adquirida, além da indispensabilidade em destinar maiores investimentos para estudos das atuais classes existentes, já que estas exibem um perfil de segurança conhecido (SHLAES et al., 2013; SPELLBERG et al., 2004).

Diante disso, torna-se indispensável o estudo de toxinas e peçonhas animais para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e, tendo em vista à necessidade de novas alternativas aos antibióticos atuais utilizados. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar o perfil proteico presente na secreção cutânea de anuros por meio do método de Eletroforese (SDS-PAGE) visando a identificação de peptídeos com baixa massa molecular.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Extração das Toxinas

As espécies utilizadas foram obtidas do Biotério da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB. A obtenção da secreção cutânea dos animais foi por meio da eletroestimulação dorsal com uma bateria alcalina de 9V, ligada a dois fios de cobre onde foram tocados no dorso do animal por três vezes sendo cinco segundos cada, fazendo com que por meio da compressão corpórea, estimula-se as glândulas de veneno, liberando a toxina juntamente com o muco fabricado pelas glândulas mucosas. Toda substância secretada pelo animal foi rapidamente lavada com água Milli-Q até que toda a secreção liberada desprendesse da pele e armazenada em um Becker de 500 mL. Após a extração, a secreção foi transferida para tubos de polietileno de 50 mL e congelados a -80°C (Ultra Freezer) para liofilização.

Quantificação Proteica

Após a liofilização as amostras foram ressuspensas no volume mínimo com água Milli-Q e centrifugadas a 11000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi retirado e armazenado em tubo de polipropileno de 2 mL, sendo posteriormente quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Perfil Eletroforético Por SDS-PAGE

A separação das proteínas das toxinas extraídas foram realizadas por meio da técnica de eletroforese em SDS-PAGE conforme o método de Laemmli (1970). O gel desnaturante foi preparado nas concentrações de 12%. Para a comparação de massa molecular, foi utilizado o padrão da POMECA® (The Broad Range Protein Molecular Weight Markers) o qual possui massas moleculares com 225, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 15 e 10 kDa. A corrida foi realizada nas seguintes condições: 80v, durante aproximadamente 3h. Após o término das corridas, os géis foram corados com a solução corante de Comassie Brilliant Blue. Após descorar os géis, os mesmos foram escaneados para posteriores análises. Todos os géis foram realizados em réplicas técnicas e biológicas.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies utilizadas neste trabalho foram *Rhinella schneideri*, *Dermatonotus muelleri*, *Physalaemus nattereri* e *Trachycephalus typhonius* (Figura 4).

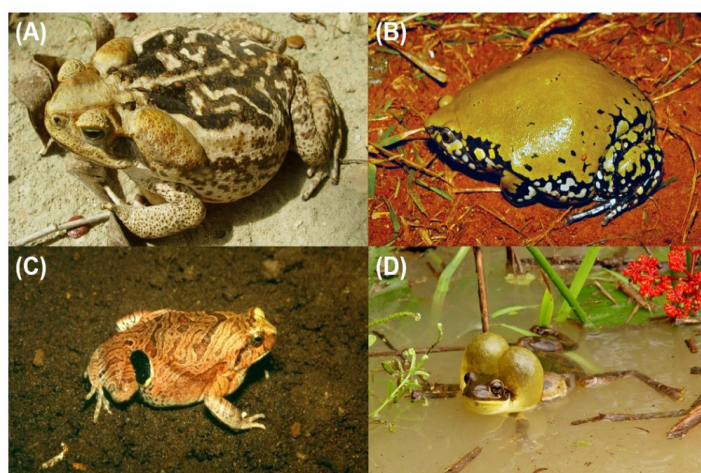


Figura 4. Espécies utilizadas neste trabalho, sendo, (A) *R. schneideri*, (B) *D. muelleri*, (C) *P. nattereri* e (D) *T. typhonius*.

A obtenção das toxinas por meio da eletroestimulação mostrou-se eficiente, esse método de extração possibilita que todas as glândulas do animal, mucosas e granulosas, sejam contraídas e estimuladas sem causar lesões (Figura 5), além de que auxilia na conservação desses animais, pois antigamente era necessário que houvesse a retirada da pele dos animais para a obtenção da amostra (KONIG et al., 2015). Esse método de extração foi eficiente para que ocorresse o pouco manejo do animal pela mão do manejador o que possibilita perder menos amostra, já que o método convencional, o mecânico, o qual são massagens feitas no animal com o intuito de perturbá-lo para que este excrete a secreção, possibilita a maior aderência da amostra nas luvas do manejador fazendo com que se tenha grande quantidade de amostra perdida. Após a extração os animais foram devolvidos imediatamente para o local de onde foram retirados.



Figura 5. Demonstração do processo de extração pelo método de eletroestimulação.

As amostras obtidas foram armazenadas em tubos de polipropileno de 50mL e congeladas a -80°C (Ultra Freezer) para liofilização. Após serem liofilizadas, estas foram quantificadas pelo método de Bradford e foi realizada a análise do perfil proteico por meio do método de Eletroforese (SDS-PAGE). Os resultados com SDS-PAGE (Figura 6) mostraram que as espécies *R. schneideri*, *D. muelleri*, *P. nattereri* e *T. typhoni* apresentaram 5, 17, 4 e 3 bandas proteicas respectivamente. A espécie *D. muelleri* foi a única que obteve massas moleculares abaixo de 21 kDa. As massas moleculares para *R. schneideri*, *P. nattereri* e *T. typhoni* variou entre 30 a 205 kDa.

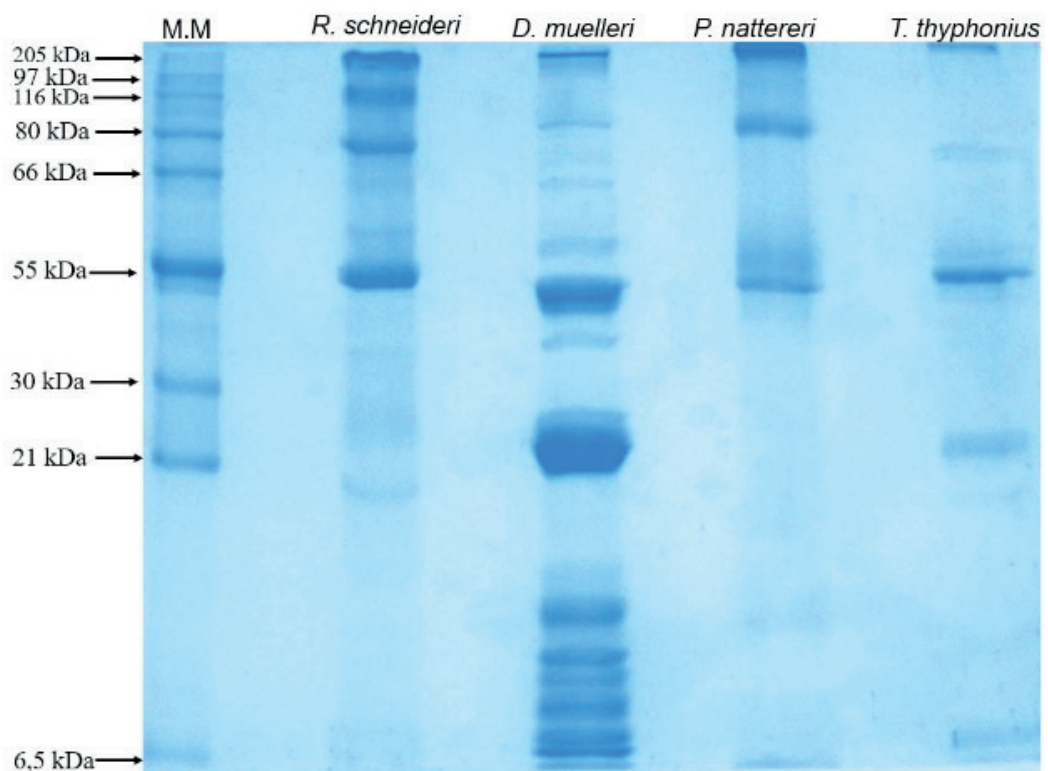


Figura 6. Gel de Eletroforese SDS-PAGE 12% corado com Comassie Brillant Blue, onde M.M

indica o marcador molecular e as demais colunas mostrando as bandas proteicas respectivas a cada espécie.

Em um trabalho feito por CAVALCANTE (2015) devido a ausência de banco de dados para a espécie *D. muelleri* foi montado uma tabela por meio da via BLAST comparando as proteínas da ordem Squamata (Tabela 2).

Massa Molecular (kDa)	Correspondência
110-160	Octapeptide Repeat protein T2 – " <i>Ophiophagus hannah</i> " Fusaric acid – " <i>Capsella rubella</i> " RHO guanine nucleotide Exchange fator 7 – " <i>Harpegnathos saltador</i> "
70	Queratina de diversas espécies
65	Selenium-binding protein – " <i>Xenopus sp.</i> "
60	Thrombin-like enzyme – " <i>Cerastes cerastes</i> " Calmodulin-binding motif – " <i>Xenopus tropicalis</i> "
30	Queratina tipo II citoesqueleto – "Gorila"
17	Cyclophilin A – " <i>Ambystoma tigrinum</i> "
16	Queratina tipo I citoesqueleto – " <i>Crotalus adamantus</i> " e " <i>Anolis carolinensis</i> "
15	AP2M1 – " <i>Xenopus tropicalis</i> "

Tabela 2. Comparação das proteínas de massas moleculares encontradas na espécie *D. muelleri* com proteínas de massas moleculares aproximadas encontradas via BLAST correspondente a ordem Squamata. **Fonte:** Adaptado de CAVALCANTE (2015).

STUART e colaboradores (2012), por meio de um banco de dados demonstrou que bandas proteicas correspondente entre 205kDa à 116kDa foi apontada a Octapeptide repeat protein T2 da espécie *Ophiophagus hannah*, considerada uma das maiores serpentes peçonhenta do mundo, encontrada no sul e sudeste da Ásia. Esta proteína é um polipeptídeo semelhante a mutações de genes que são responsáveis por causar demência progressiva (GOLDMAN; SCHAFER, 2014 apud CAVALCANTE, 2015).

Uma provável enzima responsável pela codificação do nucleotídeo RHO guanine também foi relatado neste mesmo trabalho, está enzima oriunda de uma espécie de formiga, a *Harpegnathos saltador*, onde pode-se estar relacionado a alimentação da maioria dos anuros que é composta por insetos, e destes são retirados alguns compostos utilizados na fabricação das toxinas (BONASIO et al., 2010).

Se compararmos o perfil proteico de *D. muelleri* com espécies da família Hylidae, grande parte dos trabalhos nessa vertente, possuem massas moleculares de proteínas

a partir de 21 kDa semelhantes, as que apresentam proximidade a 6,5 kDa podem representar hylaserpina, a qual é um inibidor de tripsina e quimiotripsina e apresenta atividade bacteriostática frente a bactérias Gram-positivas, onde foi descoberta pela secreção de *Hyla simplex* (WU et al., 2011). Proteínas encontradas na secreção da espécie *Phyllomedusa sauvagei*, possuem massas moleculares com cerca de 6,6 e 6,7 kDa e são inibidoras de proteases, são bactericidas e induz a acumulação de eritrócitos (GEBHARD et al., 2004).

4 | CONCLUSÃO

O método de SDS-PAGE permite estimar rapidamente a quantidade de grupo de proteínas de acordo com a massa molecular, com a amostra estando equalizada negativamente devido a ação do detergente SDS, permitindo assim a fácil separação e visualização das bandas proteicas, além do mais possui um custo mais econômico quando comparado a outras técnicas.

REFERÊNCIAS

- ANJOLETTE, F.A.P. **Análise proteômica comparativa das secreções das glândulas parotoides e mucosas do sapo *Rhinella schneideri* e avaliação, in vitro, da atividade antimicrobiana.** 140 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.
- BONASIO, R.; ZHANG, G.; YE, C.; MUTTI, N. S.; FANG, X.; QIN, N.; DONAHUE, G.; YANG, P.; LI, Q.; LI, C.; ZHANG, P.; HUANG, Z.; BERGER, S. L.; REINBERG, D.; WANG, J.; LIEBIG, J. **Genomic Comparison of the Ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*.** Science, v. 329, n. 5995, p. 1068-1071, 2010.
- BRAND, G. D.; KRAUSE, F. C.; SILVA, L. P.; LEITE, J. R. S. A.; MELO, J. A. T.; PRATES, M. V.; PESQUERO, J. B.; SANTOS, E. L.; NAKAIE, C. R.; COSTA-NETO, C. M.; BLOCH JR, C. **Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*.** Peptides. v. 27, p. 2137- 46. 2006b.
- CAVALCANTE, I. D. **Análise Bioquímica e Biológica da Secreção Cutânea do Anuro *Dermatonotus muelleri*.** 2015. 72 f. Dissertação (Ciências). Instituto Butantan, São Paulo, 2015.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance threats in the United States.** 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>>. Acesso em: 20 Jan. 2019.
- DALY, J. W.; MYERS, C. W.; WHITTAKER, N. **Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (*Dendrobatidae*), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibia.** Toxicon, Oxford, v. 25, n. 10, p. 1023-1095, 1987.
- DORNELLES, M. F.; MARQUES, M. G. B.; RENNER, M. F. **Revisão sobre toxinas de Anura (Tetrapoda, Lissamphibia) e suas aplicações biotecnológicas.** Revista Ciência em Movimento - Biociências e Saúde, Porto Alegre, v. 12, n. 24, p. 103-117, 2010.
- DORNELLES, M. F.; MARQUES, M. G. B.; RENNER, M. F. **Revisão sobre toxinas de Anura (Tetrapoda, Lissamphibia) e suas aplicações biotecnológicas.** Revista Ciência em Movimento - Biociências e Saúde, Porto Alegre, v. 12, n. 24, p. 103-117, 2010.

ERSPAMER, V. **Biogenic amines and active polypeptides of amphibian skin.** Annual Review of Pharmacology, Palo Alto, v. 11, p. 327-350, 1971.

FJELL, C. D. et al. **Designing antimicrobial peptides: form follows function.** Nature Reviews. Drug Discovery, London, v. 11, n. 1, p. 37-51, 2012.

GARG, A. D.; HIPPARGI, R.; GANDHARE, A. N. **Toad skin-secretions: Potent source of pharmacologically and therapeutically significant compounds.** The Internet Journal of Pharmacology, Sugar Land, v. 5, n. 2, 2008.

GEBHARD, L. G.; CARRIZO, F. U.; STERN, A. L.; BURGARDT, N. I.; FAIVOVICH, J.; LAVILLA, E.; ERMÁCORA, M. R. **A Kazal prolyl endopeptidase inhibitor isolated from the skin of *Phyllomedusa sauvagii*.** Eur. J. Biochem., v. 271, p. 2117–2126, 2004.

GEBHARD, L. G.; CARRIZO, F. U.; STERN, A. L.; BURGARDT, N. L.; FAIVOVICH, J.; LAVILLA, E.; ERMÁCORA, M. R. **A Kazal prolyl endopeptidase inhibitor isolated from the skin of *Phyllomedusa sauvagii*.** Eur. J. Biochem. v. 271, p. 2117-26. 2004

GOLDMAN, L.; SCHAFER, A. I. **Cecil Medicina.** 24 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

HABERMEHL, G. G. **Amphibia (Amphibians).** In: _____. **Venomous Animals and Their Toxins.** New York: Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 1981. cap. 6, p. 112-116.

JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M. **Anfíbios: biologia e venenos.** In: CARDOSO et al. (Ed.). **Animais Peçonhetos no Brasil.** 2. ed. São Paulo: SARVIER, 2009. cap. 31, p. 317-328.

KONIG, E.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; SHAW, C. **The diversity and evolution of anuran skin peptides.** In: Peptides, v. 63 p. 96 – 117, Elsevier, Alemanha, 2015.

LAI, R. et al. **Identification and cloning of a trypsin inhibitor from skin secretions of Chinese red-belly toad *Bombina maxima*.** **Comparative Biochemistry and Physiology.** Part B, Biochemistry & Molecular Biology, Oxford, v. 131, n.1, p. 47-43, 2003

LAZARUS, L. H.; BRYANT, S. D; COOPER, P. S.; SALVADORI, S. **What peptides these deltorphins be.** Prog. in Neur. v. 57, p. 377-420. 1999.

LEE, H. T. et al. **A Large-Scale Structural Classification of Antimicrobial Peptides.** **BioMed Research International,** New York, v. 2015, p. 6, 2015.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. **Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses.** Nature Medicine, New York, v. 10, n. 12 Suppl, p. S122-9, 2004.

MOELLERING-JR, R. C. **Discovering new antimicrobial agents.** International Journal of Antimicrobial Agents, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 2-9, 2011.

MONTI, R.; CARDELLO, L. **Bioquímica do veneno de anfíbios.** In: BARRAVIERA, B. **Venenos Animais: uma Visão Integrada.** Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas, 1994. cap. 15, p. 225-231.

NEGRI, L.; ERSPAMER, G. F.; SEVERINI, C.; POTENZA, R. L.; MELCHIORRI, P.; ERSPAMER, V. **Dermorphin-related peptides from the skin of *Phyllomedusa bicolor* and their amidated analogs activate two μ opioid receptor subtypes that modulate antinociception and catalepsy in the rat.** Proc. Nael. Acad. Sci. USA. v. 89, p. 7203-07. 1992.

NICOLAS, P.; MOR, A. **Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense of**

vertebrates. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 49, p. 277-304, 1995

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. **Antifungal agents: mechanisms of action.** TRENDS in Microbiology, Cambridge, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.

PRATES, M. V.; BLOCH-JR, C. Peptídeos antimicrobianos: uma alternativa no combate a microorganismos resistentes. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, Brasília, v.17, p. 30-36, 2000

PRATES, M. V.; SFORÇA, M. L.; REGIS, W. C. B.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; PERTINHEZ, T. A.; ARAÚJO, A. L. T.; AZEVEDO, R. B.; SPISNI, A.; BLOCH JR, C. **The NMR-derived Solution Structure of a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of the Anuran *Hyla punctata*.** J. Biol. Chem. v. 279, p. 13018–26, 2004.

SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; LANGONE, J. A.; GARCIA, P. C. de A.; **Brazilian Amphibians: List of Species.** 2016.

SHLAES, D. M. et al. **The FDA Reboot of Antibiotic Development.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, v. 57, n. 10, 4605-4607, 2013.

SIMMACO, M.; KREIL, G.; BARRA, D. Bombinins, antimicrobial peptides from Bombina species. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, v. 1788, n. 8, p. 1551-5, 2009

SPELLBERG, B. et al. **Trends in antimicrobial drug development: implications for the future.** Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, Chicago, v. 38, n. 9, p. 1279-1286, 2004.

STORER, T.; **Zoologia.** São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2003.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S; COSTE, A.T. **Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections.** International Journal of Microbiology, New York, v. 2012, p. 1-26, 2012.

VRIES, R. et al. **Next-generation nanoantibacterial tools developed from peptides.** Nanomedicine, London, v. 10, n. 10, p. 1643-61, 2015.

WRIGHT, G. D. **Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification.** Adv Drug Deliv Rev. 2005; 57(10):1451-70.

WRIGHT, G. D.; SUTHERLAND, A. D. **New strategies for combating multidrug-resistant bacteria.** TRENDS in Microbiology, Cambridge, v. 13, n. 6, p. 260-267, 2007.

WU, J.; LIU, H.; YANG, H.; YU, H.; YOU, D.; MA, Y.; YE, H.; LAI, R. **Proteomic analysis of skin defensive factors of tree frog *Hyla simplex*.** In: Journal of proteome research, v. 10, n. 9, p. 4230-4240, 2011.

SOBRE OS ORGANIZADORES

REGINA MENESES GONÇALVES é graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Católica Dom Bosco (2017) e mestranda em Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco. Atualmente, seu foco de pesquisa é avaliação de peptídeos antimicrobianos frente a bactérias patogênicas humanas e animais, com intuito do desenvolvimento de novas terapias.

BRENO EMANUEL FARIAS FRIHLING - Graduado em Ciências Biológicas, Mestre em Biotecnologia e Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Católica Dom Bosco, tem experiência na área de manejo de animais de laboratório convencionais (ratos e camundongos) e não-convencionais (serpentes), manejo de animais silvestres, captura e manejo de pequenos mamíferos, educação ambiental e técnicas clássicas de purificação. Atualmente trabalha com caracterização bioquímica e bioprospecção de moléculas bioativas presentes nas toxinas de serpentes da região do estado de Mato Grosso do Sul. Além disso, participa de projetos com ênfase na análise de águas com a identificação de fármacos presentes em amostras naturais, rurais e urbanas.

LUDOVICO MIGLIOLO é graduado em Ciências Biológicas (Bacharelado E Licenciatura) pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2005 e 2006). Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2008) e Doutor em Ciências Genômicas e Biotecnologia pela Universidade Católica de Brasília (2012), com período sanduíche em *The University of Queensland* (Austrália). Atuou como pós doutor bolsista PNPD CAPES na área de Biotecnologia durante 2 anos na Universidade Católica de Brasília, na bioprospecção e síntese de peptídeos bioativos para o desenvolvimento de novas terapias. Atualmente é professor de graduação e pós graduação além de ser pesquisador nível 2 na área de Biotecnologia pela Universidade Católica Dom Bosco, Mato Grosso do Sul. Tem experiência na área de Bioquímica, Biofísica e Bioinformática com ênfase em Purificação de Proteínas e Peptídeos Naturais e Sintéticos, Modelagem Molecular de Estruturas Proteicas e Peptídeos, Estudos de Interação Proteína-Proteína, Peptídeo-Proteína, Peptídeo-DNA, Peptídeo-Membranas Biológicas, Estudos com Dicroísmo Circular e Espectrometria de Massa. Além disso, atua na área de desenho racional de peptídeos bioativos análogos de toxinas de serpente, escorpião, anuros, aranhas e insetos. Aplicação destas metodologias nos seguintes temas: defesa de plantas, peptídeos antimicrobianos, imunomoduladores, anticongelantes e análises proteômicas animais, vegetais e de microrganismos.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-575-4

