

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 sequencias 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 | |
| Álisson 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 |

AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE LARVAS NECRÓFAGAS *Chrysomya albiceps* (DIPTERA, CALLIPHORIDAE) INIBIDORAS DE BIOFILME DE *Klebsiella pneumoniae* KPC

Patrícia Souza e Silva

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia
Campo grande - Mato Grosso do Sul

Regina Meneses Gonçalves

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia
Campo grande - Mato Grosso do Sul

Daniela Lopes Da Cunha

Universidade Católica Dom Bosco, Graduada de
Ciências Biológicas Licenciatura
Campo grande - Mato Grosso do Sul

Lucas Rodrigues de Lima

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia
Campo grande - Mato Grosso do Sul

Carina Elisei De Oliveira

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia
Campo grande - Mato Grosso do Sul

Ludovico Migliolo

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia
Campo grande - Mato Grosso do Sul

RESUMO: A entomologia forense consiste no método de utilizar dípteras como a mosca *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae), uma vez que são as primeiras a chegar ao local e colonizar o corpo. Em ambientes hospitalares

as bactérias como *Klebsiella pneumoniae* vem adquirindo resistência formando biofilmes, deixando antibióticos carbapênicos sem ação sobre elas. Com isso o objetivo desse trabalho é a caracterização de moléculas bioativas encontrada na secreção de larvas, com efeito inibitório no desenvolvimento de biofilme de *K. pneumoniae* (KPC 1825971). As amostras coletadas foram lavadas duas vezes com água ultrapura, pesadas e centrifugadas. Após o sobrenadante foi filtrado em membrana poliestersulfônica e liofilizados. A concentração de proteínas presentes na amostra foi quantificada pelo método de Bradford. A amostra foi aplicada em gel de eletroforese SDS-PAGE 12%. O teste bacteriano foi realizado pelo método de microdiluição em placas de 12 poços, com meio de cultura *Mueller Hinton*, ressuspensando 4 mg de cada amostra no meio líquido bacteriano, e o teste de biofilme foi feito com diluição seriada das amostras. Os resultados do perfil proteico mostram a presença de peptídeos como massas moleculares similares as descritas na literatura para compostos encontrados na secreção da família Calliphoridae. Por exemplo, dipterinas de 8 e 9 kDa, cecropinas e defensinas com 4 e 5 kDa, respectivamente. Contra *Klebsiella pneumoniae* KPC houve inibição do biofilme de 82%. O estudo é de grande importância pois pode ser possível produção de novos fármacos através dessas proteínas.

PALAVRAS CHAVE: Entomologia Forense, resistência, moléculas.

ABSTRACT: Forensic entomology consists of the method of using diptera such as the fly *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae), since they are the first to arrive at the site and colonize the body. In hospital environments, bacteria such as *Klebsiella pneumoniae* have acquired resistance-forming biofilms, leaving carbapenic antibiotics with no action on them. Thus, the objective of this work is the characterization of bioactive molecules found in larval secretion, with an inhibitory effect on the development of *K. pneumoniae* biofilm (KPC 1825971). The collected samples were washed twice with ultrapure water, weighed and centrifuged. After the supernatant was filtered on polyether sulfonic membrane and lyophilized. The concentration of proteins present in the sample was quantified by the Bradford method. The sample was applied on a 12% SDS-PAGE electrophoresis gel. The bacterial test was performed by the microdilution method in 12-well plates with Mueller Hinton culture medium, resuspending 4 mg of each sample in the bacterial liquid medium, and the biofilm test was done with serial dilution of the samples. The protein profile results showed the presence of peptides with similar molecular mass observed in the literature for the Calliphoridae family secretion compound. For example, 8 and 9 kDa dipterocins, 4 and 5 kDa cecropins and defensins, respectively. The study is of great importance because it may be possible to produce new drugs through these proteins.

KEYWORDS: Forensic Entomology, resistance, molecules.

1 | INTRODUÇÃO

A *Chrysomya albiceps* (Wiedemann 1819) (Diptera: Calliphoridae), é conhecida popularmente como mosca varejeira, no contexto atual o estudo do ciclo de vida está sendo relacionadas em casos criminais de investigação forense para determinação do tempo de morte, já que são as primeiras a fazer a ovoposição. Nas moscas há três estágios larvais ou instars que podem ser referidos como LI, LII e LIII. O estágio de vida específico dessas larvas pode ser identificado pelo número de fendas presentes em cada espiráculo posterior. No primeiro instar, só uma fenda está presente, no segundo instar, duas fendas que estão presentes, no terceiro instar, três fendas estão presentes. Em varejeiras há normalmente uma diferença de tamanho de larvas nos terceiro estágios. O primeiro instar tende a ser inferior a 2 mm de comprimento, enquanto que o segundo instar é entre 2 - 9 mm de comprimento. O terceiro instar pode ser entre 9 e 22 mm de comprimento (GENNARD, 2012)

Os insetos na sua fase larval se alimentam de matéria em decomposição onde outros microrganismos também estão presentes como bactérias, fungos, vírus e protozoário. Portanto, devido a este fato o estudo do sistema imunológico desses insetos é de grande importância para a biotecnologia. Uma das principais formas de proteção utilizadas por dipteras é a produção de peptídeos antimicrobianos, os quais

são produzidos pelo corpo gorduroso, ou por hemócitos, em resposta à infecções microbiana, sendo então secretadas rapidamente na hemolinfa, dessa forma, são capazes de chegar a qualquer parte do corpo do inseto. Normalmente, decorrem algumas horas ou dias para a completa expressão das proteínas solúveis de defesa, sabe-se que muitas dessas proteínas têm ação inibitória sobre bactérias e fungo (DE SILVA, 2002; SOUZA et al. 2010). Nos insetos o sistema imune é adaptativo, os peptídeos antimicrobianos desempenham um papel importante na defesa contra invasores (CYTRYŃSKA et al. 2007). Os peptídeos antimicrobianos apresentam regiões hidrofóbicas e catiônicas com baixa massa molecular (BULET et al. 1999). O seu mecanismo de ação é variado em alguns deles atuam nas bicamadas lipídicas da membrana celular bacteriana Gram-positivas e -negativas (DA SILVA, 2002).

Antibióticos de última geração como os carbapenêmicos não são mais eficazes frente a bactéria *Klebsiella pneumoniae* produtora da enzima carbapenemase. A *K. pneumoniae* KpC sintetiza esta enzima que quebra o anel beta-lactâmico do antibiótico bloqueando a atividade do antibiótico (MARCHAIM et al., 2008). Além de produzirem enzimas, essas bactérias são formadoras de biofilmes o que favorece ainda mais o desenvolvimento de resistência principalmente devido a transferência horizontal de compostos entre bactérias denominado de *quorum sensing*. Segundo KARATAN e WATNICK (2009) biofilme é a transição entre células bacterianas planctônicas para colônias sésseis, o processo de desenvolvimento de biofilme são orientados por estímulos ambientais em conjunto com várias vias moleculares envolvendo o secundário mensageiro cíclico di-GMP. O desenvolvimento do biofilme progride em três fases: 1) fixação de bactérias a uma superfície e formação de um biofilme monocamada, 2) a maturação do biofilme e surgimento de uma estrutura tridimensional e 3) a dispersão do biofilme maduro. Deste modo as bactérias denominadas KpC apresentam resistência a 95% dos antibióticos existentes no mercado farmacêutico sendo um grave problema na saúde pública e privada. Com isso o objetivo trabalho foi analisar o ciclo de vida das moscas *C. albiceps* e caracterizar moléculas bioativas encontrada na secreção de larvas, com efeito inibitório no desenvolvimento de biofilme de *K. pneumoniae* 1825971 KpC.

2 | METODOLOGIA

Coleta dos Insetos

Para a coleta das larvas foi preciso acompanhar processo de decomposição de um suíno e a colonização por dípteras, o suíno tinha aproximadamente 20 Kg, foi colocado com uma proteção para que não houvesse a predação por outros animais, a proteção feita com tela de aço e ferros de construção com medidas de 36 x 21 x 23 cm. O local em questão está a 2 Km da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), chamado de Instituto São Vicente na região de Campo Grande/ MS.



Figura 1: (A) em mapa o instituto São Vicente, o círculo em vermelho local onde foi colocado o suíno, (B) Caixa de ferro com tela 36 x 21 x 23 cm e (C) suíno com 20 kg, primeiro dia.

Fonte: Google Maps e Patricia Souza e Silva.

Foi feito o acompanhamento diariamente e após o sétimo dia foi possível coletar as larvas mais ativas e expostas sobre a carcaça do animal. Foram coletadas e levadas para o laboratório S-Inova Biotech da Universidade Católica Dom Bosco para as identificações em microscópio e as extrações.

Identificação Morfológica Por Microscopia Ótica (Mo)

Para o estudo morfológico em microscopia ótica (Zeiss Axio Scope A1), foi utilizado 5 exemplares de larvas por amostra coletada. A metodologia utilizada foi baseada em (CARVALHO, 2006).

Extração das Secreções das Larvas

As larvas foram lavadas duas vezes com água ultrapura para retirar o excesso celular do suíno, pesadas vivas, para cada 1g de larvas foram adicionados 500 μ L de água ultrapura distribuídas em béquers. Por meio de aquecimento em estufa a 37°C por 1 h, foi retirada o extrato aquoso e acondicionados em tubos de propileno 50 mL para serem centrifugados a 4 °C, 11.000 rpm por 30 min. Após centrifugação

o sobrenadante do extrato da *Chrysomya albiceps*, o extrato foi filtrado duas vezes em membrana poliestersulfônica com tamanho de poro 0,22 μm para a retirada de células bacteriana e restos celulares proveniente do suíno, após foi feita a liofilização do extrato.

Quantificação Protéica

Após a liofilização as amostras foram ressuspendidas no volume mínimo (solução estoque) e quantificadas pelo método de BRADFORD (1976). Nesta técnica, a absorvância das proteínas é avaliada pelo corante *Comassie Brilliant Blue G-250* em meio ácido resultando em modificação na cor da solução sendo detectável em um comprimento de onda 595 nm. Para a calibração da curva foi utilizado albumina sérica bovina, em diferentes concentrações. Todas as quantificações foram realizadas em triplicata e expressas com o desvio padrão.

Perfil Eletroforético Por Sds-Page

A separação das proteínas extraídas foi realizada pela 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, utilizado o padrão da PROMEGA® (*The Broad Range Protein Molecular Weight Markers*) o qual possui massas moleculares com 205, 116, 97, 88, 66, 55, 30, 21, 14, 6,5 kDa). A corrida foi realizada nas seguintes condições: o tampão da amostra foi aplicado em um volume de 5 e 15 μL da amostra, a corrida foi realizada 90 v, durante aproximadamente 2:30 h e, após o término das corridas, o gel foi corado com a solução corante de *Comassie Brilliant Blue*. Após descorar o gel, os mesmos foram escaneados para análises do perfil proteico.

Avaliação da Atividade Antibacteriana e Biofilme

Para avaliar a atividade antibacteriana da amostra obtida a partir da bioprospecção, o método de microdiluição em caldo de acordo M7-A6 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (WAYNE, 2012). A bactéria obtida por meio de isolado clínico *K. pneumoniae* 1825971 KpC foi utilizada para todos os experimentos. Para isolamento da bactéria utilizou-se, caldo Mueller Hinton até atingir uma densidade 10^8 UFC.mL⁻¹, foram semeadas sobre a superfície de placas de Petri de 150 mm de diâmetro contendo Agar *Mueller Hinton*. As colônias foram diluídas em solvente Mueller Hinton 3 mL deixadas para agitar a 37° C *overnight*.

A diluições 1:100 da cultura bacteriana crescida durante 24h foi incubadas em meio BM2 [62 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7), 7 mM de (NH₄)₂SO₄, 2 mM

de MgSO_4 , 10 mM de FeSO_4 e 0,4% de glicose (m:v)] e em meio BHI em microplacas de 96 poços a amostra na concentração na $1024 \mu\text{g}$ liofilizada foi ressuspendidas em $320 \mu\text{L}$ e pipetadas com bactéria e meio nas seguintes diluições: $50 \mu\text{L}$ de amostra mais $50 \mu\text{L}$ de bactéria, em outro poço $100 \mu\text{L}$ de bactéria para o controle positivo de crescimento bacteriano, outro poço $50 \mu\text{L}$ de amostra e $50 \mu\text{L}$ do meio BM2 para análise de contaminação da amostra e por último $100 \mu\text{L}$ do meio BM2 para o controle negativo, todos aplicados em triplicata, após a microplacas foi colocada para a incubação por 24 h a 37°C . O extrato contra as células planctônicas foram acessadas por densidade óptica a 600 nm no leitor de microplaca. Em seguida, as células planctônicas foram removidas dos poços da microplaca, foi lavada duas vezes com água deionizada. As bactérias aderidas aos poços da microplaca foram coradas com 100 mL de violeta cristal a 0,1% durante 20 minutos. A microplaca foi lavada duas vezes com água deionizada, secas ao ar e solubilizadas novamente com $120 \mu\text{L}$ de etanol a 70%. O conteúdo da microplaca foi teve novamente a leitura em 595 nm no espectrofotômetro.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a identificação da espécie *Chrysomya albiceps* foi analisado a presença dos tubérculos os quais são característicos Do estágio larval (Figura 2 A e B). Na Figura 2 C, esta representado o aparelho bucal composto pela extremidade anterior chamada esclerite e terminando em estruturas na forma de ganchos denominadas de esqueleto cefalofaríngeo o que também é característico da espécie em estudo. Por fim, a Figura 2 D reforça o estágio larval de terceiro instar da espécie *C. albiceps* com a presença de 3 espiráculos.

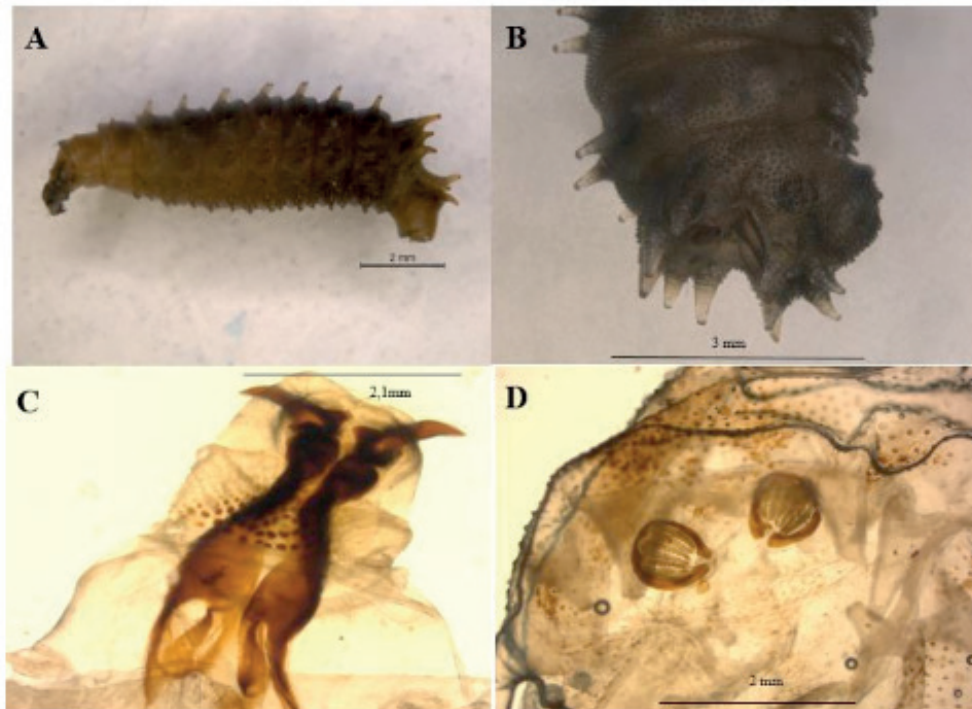


Figura 2: (A) *Chrysomya albiceps* em fase larval três, (B) Tubérculos que rodeiam o bordo do segmento posterior dalarva, (C) Extremidade anterior estrutura pretas relacionadas asclerites e terminando emganchos (o esqueleto cefalo faríngeo), (D) Espiráculos posteriores de terceiro instar, estão presente três fendas completas. **Fonte:** Tiradas em laboratório S-Inova Biotech por Lucas Rodrigues de Lima no microscópio Zeiss Axio Scope A1 objetivas de 5 x.

Para quantificação proteica da secreção cutânea de *C. albiceps* foi monitorado a absorvância utilizando o comprimento de onda 595 nm comparado com valores de concentração padrão (albumina bovina). A concentração obtida da solução aquosa foi de 48 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O perfil proteico da amostra no gel de SDS-PAGE, mostrou banda de 116 e muitas bandas abaixo de 30 kDa como mostra na Figura 3. Bandas abaixo de 10 kDa mostram a presença de peptídeos que na literatura estão caracterizados como dipterocinas 8 e 9 kDa, assim como as cecropinas e defensinas as quais apresentam 4 e 5 kDa, respectivamente.

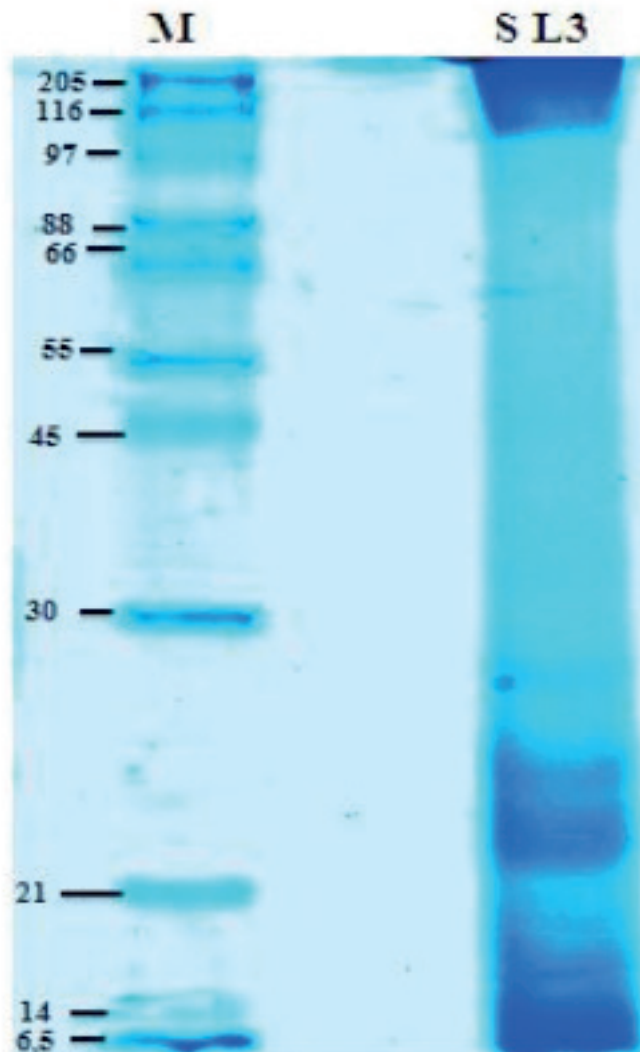


Figura 3: Gel de eletroforese SDS-PAGE com a coloração de azul *Comassie*, **M** representa o marcador molecular com algumas bandas já descritas de 205 á 6,5 kDa. **SL3** representa a secreção *C. albiceps* dá em terceiro estágio. **Fonte:** Scaneado por Patrícia Souza e Silva no

Massas conhecidas de dipterocinas são encontradas em hemolinfa e secreção de larvas da *Lucilia sericata* 8 e 9 kDa (KRUGLIKOVA, 2011). Em algumas obras está descrito defensinas em hemolinfa, glândulas salivares, gordura corporal, intestino e secreção das larvas de moscas varejeiras como *Chrysomya megacephala* (ČEŘOVSKÝ et al., 2010). As cecropinas, são de aproximadamente 5 kDa e constituem uma família de peptídeos antimicrobianos que possuem ação bacteriana e tais proteínas foram encontradas pela primeira vez, em hemolinfa da pupa *Hylophara cecropia* (BREY et al., 1993).

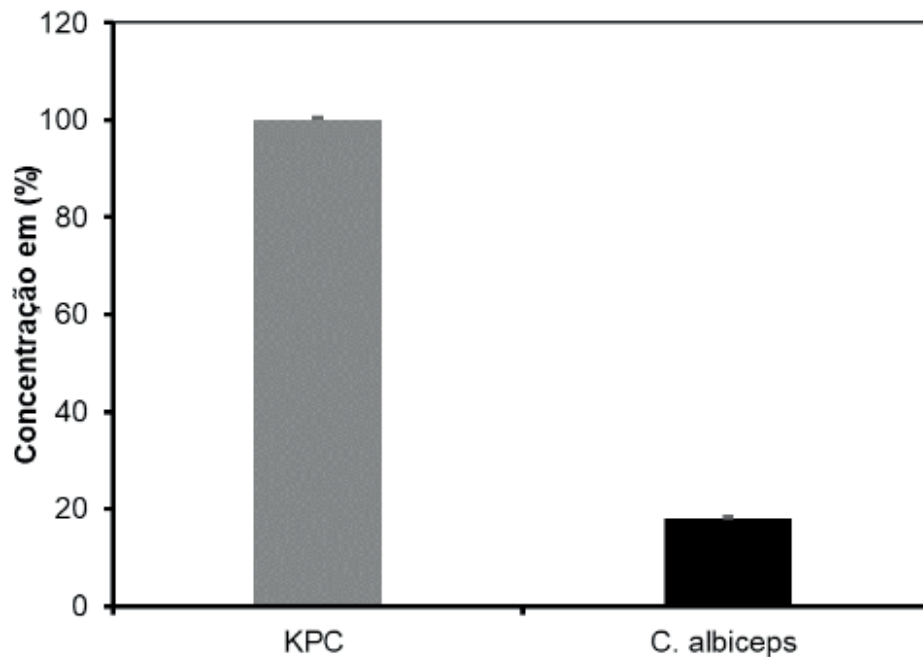


Figura 4: Porcentagem de inibição do biofilme de *K. Pneumoniae KpC*; barra preta crescimento de bacteriano e a barra cinza crescimento bacteriano com solução aquosa da secreção cutânea de *C. albiceps*.

Para a comprovação de que a amostra estaria contaminada foi riscada uma placa de 150 mm de diâmetro contendo Agar *Mueller Hinton*, incubada a 37°C por 24 h, foi observada que a amostra estava sem contaminação, não houve crescimento de nem uma colônia bacteriana.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo revela a presença de proteína e peptídeos na secreção cutânea de larvas no terceiro instar de *C. albiceps*, e uma atividade significativa contra *K. pneumoniae* resistente a carbapenemase. O estudo é de extrema importância para a biotecnologia na busca por alternativas ao controle e combate a microrganismos patogênicos.

5 | AGRADECIMENTOS

A CNPQ, laboratório S-Inova Biotech, Universidade Católica Dom Bosco e todos os colaboradores.

REFERÊNCIAS

BRADFORD, Marion M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976.

BREY, P T et al. **Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 90, n. 13, p. 6275–9, 1 Jul 1993.

BULET, P. et al. **Antimicrobial peptides in insects; structure and function.** Developmental & Comparative Immunology, v. 23, n. 4–5, p. 329–344, 1 Jun 1999.

ČEŘOVSKÝ, Václav et al. **Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*.** Cellular and Molecular Life Sciences, v. 67, n. 3, p. 455–466, 18 Feb 2010.

CYTRYŃSKA, Małgorzata et al. **Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph.** Peptides, v. 28, n. 3, p. 533–546, 2007.

GENNARD, E. **Forensic entomology : an introduction.** [S.l.]: Wiley Blackwell, 2012.

KARATAN, E. WATNICK, P. **Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 73, n. 2, p. 310–347, 2009.

KRUGLIKOVA, A. A. **Antimicrobial components of haemolymph and exosecretion of larvae *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera, Calliphoridae).** Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, v. 47, n. 6, p. 534–542, 2011.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** Nature, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

MARCHAIM, Dror . **Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes.** Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 52, n. 4, p. 1413–8, 2008.

RATCLIFFE, N. A. **Insect natural products and processes: New treatments for human disease.** Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 41, n. 10, p. 747–769, 2011.

RATCLIFFE, N. A. **Detection and preliminary physico-chemical properties of antimicrobial components in the native excretions/secretions of three species of *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) in Brazil.** Acta Tropica, v. 147, p. 6–11, 2015.

WAYNE. **M11-A8 Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard—Eighth Edition.** 2012.

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

