

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: Profª Drª 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
Profª Drª 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
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª 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
Profª Drª 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
Profª Drª 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	
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

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS TOXINAS PRESENTE EM LAGARTA *Lonomia obliqua* (LEPIDÓPTERA, SATURNIIDAE) COM ATIVIDADE ANTIBIOFILME

Patrícia Souza e Silva

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

Luiz Filipe Ramalho Nunes de Moraes

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

Elizangela de Barros

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Ana Paula de Araújo Boleti

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: As infecções relacionadas ao biofilme são notoriamente difíceis de erradicar e têm sido objeto de intensas pesquisas científicas nos últimos 30 anos. Por outro lado, animais apresentam sistema circulatório com hemolinfa, rica em moléculas bioativas. Dentre as moléculas bioativas os peptídeos antimicrobianos são interessantes candidatos para o desenvolvimento de ferramentas

biotecnológicas devido a eficácia e ausência de efeito colateral frente a bactérias Gram-negativa e positiva. Objetivo foi avaliar atividade antibiofilme da hemolinfa de lagarta da espécie *Lonomia obliqua* frente ao crescimento de *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Os animais foram anestesiados em gelo, a hemolinfa foi retirada com o auxílio de seringa de insulina U-100. Após a retirada da mesma, a amostra foi centrifugada e posteriormente liofilizada. A concentração de proteínas foi analisada pelo método de Bradford. A amostra foi aplicada em gel de eletroforese SDS-PAGE 12%. O perfil proteico demonstrou massas moleculares de 116 a 14 kDa, sugerindo a presença de moléculas do tipo LOPAP, LOSAC, Hyaluronidases, Lonofribrase, prostaglandina D2 e fosfolipases A2 com 69, 43, 49, 35, 25, 27 e 15 kDa, já bem caracterizadas na literatura e que apresentam potencial farmacológico. Em adição, a atividade antibiofilme da hemolinfa demonstrou crescimento bacteriano mínimo de 128 e 32 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ no crescimento de *K. pneumoniae* e *S. aureus*, respectivamente. Como conclusão fica clara a atividade antibiofilme da hemolinfa contra as bactérias Gram-negativa e -positiva o que permite para os próximos passos a seleção de candidatos proteicos com potencial farmacológico.

PALAVRAS-CHAVE: Moléculas, Infecção, Inibição.

ABSTRACT: Biofilm-related infections are notoriously difficult to eradicate and have been the subject of intense scientific research over the past 30 years. On the other hand, animals have circulatory system with hemolymph, rich in bioactive molecules. Among the bioactive molecules the antimicrobial peptides are interesting candidates for the development of biotechnological tools due to the efficacy and absence of collateral effect against Gram-negative and -positive bacteria. Among the bioactive molecules the antimicrobial peptides are interesting candidates for the development of biotechnological tools due to the efficacy and absence of collateral effect against Gram negative and positive bacteria. The objective of this study was to evaluate the antibiofilm activity of the caterpillar hemolymph of the species *Lonomiaobliqua* in the presence of *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. The animals were anesthetized on ice, the hemolymph was withdrawn with the aid of U-100 insulin syringe. After the removal, it was centrifuged. The supernatant was lyophilized. Protein concentration was analyzed by the Bradford method. The sample was applied on a 12% SDS-PAGE electrophoresis gel. The protein profile showed molecular masses of 116 to 14 kDa, suggesting the presence of LOPAP, LOSAC, Hyaluronidases, Lonofribrase, prostaglandin D2 and phospholipases A2 at 69, 43, 49, 35, 25, 27 and 15 kDa, as well characterized in the literature and that present pharmacological potential. In addition, the antibiotic activity of hemolymph demonstrated MBIC 128 and 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in the growth of *K. pneumoniae* and *S. aureus*, respectively. As a conclusion, the antibiotic activity of hemolymph against Gram-negative and -posts bacteria is clear, which allows the selection of protein candidates with pharmacological potential for the next steps.

KEYWORDS: Molecules, Infection, Inhibition.

1 | INTRODUÇÃO

A maioria dos membros do reino animal formam associações com microrganismos simbióticos, que são frequentemente de fundamental importância para a biologia. Essas simbioses variam em termos de efeitos no hospedeiro e nos processos evolutivos e ecológicos (MORAN, 2006). Nos últimos 50 anos, o uso irrestrito de antibacterianos tem exercido uma pressão seletiva sobre as bactérias que você atribuiu à resistência aos medicamentos (TACCONELLI, 2009). Atualmente, o tratamento dessas infecções tem se tornado cada vez mais difícil, pois esses microrganismos estão se tornando resistentes às opções antimicrobianas disponíveis (LABRO e BRYSKIER, 2014; NORDMANN et. al, 2012; PITOUT e LAUPLAND, 2008).

Um dos fatores que agrega mais a resistência a antibióticos é a capacidade dessas bactérias formarem comunidades de biofilme que são altamente benéficas para muitos aspectos da vida humana, incluindo a provisão de resistência à colonização do intestino grosso, degradação de compostos orgânicos e poluentes ambientais (REID et al, 2001; WHITE et al., 1998). No entanto, essas comunidades multicelulares metabolicamente

integradas são amplamente consideradas problemáticas em ambientes industriais e clínicos. Isso ocorre porque os biofilmes são extremamente recalcitrantes à eliminação por agentes antimicrobianos e pela resposta imune do hospedeiro. Os biofilmes são geralmente relatados como sendo muito menos suscetíveis a tratamentos antimicrobianos do que suas formas livres chamada de células planctônicas, com reduções na suscetibilidade de 100-1000 x, ou mais, frequentemente demonstradas (ABBASSI et al, 2008; WHITE et al, 1998)

As infecções relacionadas ao biofilme são notoriamente difíceis de erradicar e têm sido objeto de intensas pesquisas científicas nos últimos 30 anos. Exemplos de infecções associadas ao biofilme incluem a colonização de dispositivos médicos implantados (HABASH et al,1999) como cateteres venosos centrais, articulações próteses, cateteres urinários, marca-passos e válvulas cardíacas mecânicas; cáries dentárias; infecções pulmonares em pacientes com fibrose cística (GOVAN et al, DERETIC, 1996); e feridas crônicas (WOLCOTT et al, 2010). A maioria das infecções humanas (60% -80%) são associadas a biofilmes(COSTERTON et al,1995).

A bioprospecção de novas moléculas com potencial antimicrobiano vem recebendo nas últimas décadas especial atenção. Dentre estas moléculas bioativas as toxinas de serpente, anuro, escorpiões, vespas, aranhas, lagartas entre outros são fontes inesgotáveis de protótipos biofármacos. Lagartas da espécie *Lonomia obliqua*, classificadas na ordem Lepidoptera, subfamília Ditrysia, superfamília Bombycoidea e família Saturniidae apresentam poucos relatos na literatura e toxinas. Esta espécie possui um ciclo biológico de 185 dias em média, sendo altamente dependente do clima. Os insetos adultos (mariposas) vivem de 7 a 10 dias, os quais não se alimentam e são desprovidos de qualquer toxicidade. Estudos sobre a morfologia e histologia da *Lonomia obliqua* feita por VEIGA e colaboradores (2001) mostraram um complexo tegumentar constituído por um grande número de cerdas altamente organizadas, além de outras especializações.

A toxina da *Lonomia obliqua* tem sido estudado a fim de identificar seus constituintes e o mecanismo de atuação. No entanto, atividades como **a)** fibrinogênica, por ação de uma protease denominada lonofibrase (PINTO et al, 2004); **b)** pro coagulante, por ação de duas enzimas, uma ativadora de Fator X, a LOSAC (*Lonomia obliqua* Stuart-factoractivator), e outra ativadora de protrombina, conhecida como LOPAP (*Lonomia obliqua* Prothrombin Activator Protease) (REIS, et al, 2006) e **c)** fosfolipásica, por ação de uma fosfolipase A2 símile, a lonomiatoxina (AROCHA-PIÑANGO e GUERRERO, 2001). Devido a este arsenal de moléculas estes gêneros são de grande interesse pois apresentam potencial farmacológico. Com isso o objetivo desse trabalho é extrair e caracterização de moléculas bioativas presentes na hemolinfa de lagarta da espécie *Lonomia obliqua* com efeito inibitório frente ao crescimento de *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* formadoras de biofilmes.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Extração e Precipitação

A hemolinfa de *Lonomia obliqua* foi coletada a partir de larvas de sexto estágio, após o corte das cerdas. A hemolinfa recolhida com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 foi clarificada por centrifugação a 11 000 rpm durante 30 min. O sobrenadante foi então filtrado através de membrana de 0,22 µm (Millipore), e depois congelado em -80 ° C e liofilizado.

Quantificação Protéica

Após a liofilização as amostras foram ressuspensas no volume mínimo (solução estoque) e quantificadas pelo método de BRADFORD (1976). Nesta técnica, a absorvância da proteína, 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 expressão com o desvio padrão.

Perfil Eletroforético Por SDS-PAGE

A separação das proteínas da toxina extraída 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, utilizando o padrão da PROMEGA® (*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: 100v, durante aproximadamente 2h. Após o término das corridas, os géis foram corados com a solução corante de *Comassie Brilliant Blue*. Após descorar os géis, os mesmos foram revelados com nitrato prata e escaneados para análises.

Microrganismos

Foram utilizados nos experimentos as bactérias *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Avaliação da Atividade Antibiofilme *in vitro*

A formação de biofilmes foi obtida utilizando o meio líquido BM2 [fosfato de

potássio 62 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7 mM, MgSO_4 2 mM, FeSO_4 10 μM e glicose 0,4%]. Culturas bacterianas crescidas durante 18 h em meio *Mueller Hinton* foi diluída (1:100, v:v). O crescimento de células planctônicas foi avaliado utilizando a absorbância a 600 nm. O meio foi removido, e os poços da microplaca foram lavados duas vezes com água deionizada. Células aderentes foram coradas com cristal violeta a 0,01% por 20 min. Os poços da microplaca foram lavados duas vezes com água deionizada, secadas ao ar e o cristal violeta aderido a células, foi solubilizado com 110 μL de etanol a 60%. A formação de biofilmes foi obtida utilizando absorbância a 595 nm. Todas as leituras de absorbância foram realizadas com o leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, Inc., United States). Para cada experimento foram realizadas repetições técnicas e biológicas.

Ensaio Hemolítico *in vitro*

O ensaio hemolítico foi desenvolvido conforme (KIM et al, 2005), com algumas modificações. Sangue fresco foi coletado de voluntários saudáveis em tubos BD Vacuntainer com EDTA e centrifugadas a 1600 rpm por 2 minutos três vezes com tampão fosfato (0,01 M, pH 7,4). Alíquotas de 50 μL da suspensão de células a 1% foi incubada com 50 μL de uma série de diluições em 512, 256, 128, 64 e 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ amostras testes. Os experimentos foram realizados em microplaca de 96 poços. A placa foi incubada a temperatura ambiente por uma hora. A hemoglobina liberada foi monitorada a 415 nm no leitor de microplacas BioRad. Triton X-100 (1%) foi utilizado como controle positivo, representando 100% de lise celular e tampão fosfato (0,01 M, pH 7,4) foi utilizado, como controle negativo, representando 0% de hemólise. Todos os experimentos foram desenvolvidos em triplicata e expressos com desvio padrão. A porcentagem de hemólise foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ de hemólise} = \frac{(A_{415 \text{ nm}} \text{ com a solução do peptídeo} - A_{415 \text{ nm}} \text{ em tampão fosfato}) \times 100}{(A_{415 \text{ nm}} \text{ com Triton X-100} - A_{415 \text{ nm}} \text{ em tampão fosfato})}$$

Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como a média e os resultados analisados no programa *Graph Pad Prism* estatisticamente utilizando a análise de variância para as curvas doses-resposta (ANOVA TWO-WAY) e a um critério (ANOVA ONE-WAY) para os pontos únicos, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os níveis de significância serão estabelecidos em $P < 0.05$.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando o perfil eletroforético foi possível identificar 21 bandas presente que estão entre 14-116 kDa. Moléculas com massas moleculares similares foram observadas, sugerindo a presença de proteínas como LOPAP, LOSAC, hyaluronidases, lonofibrase, prostaglandina D2 e fosfolipases A2 com 69, 43, 35, 25, 27 e 15 kDa (Figura 1). Segundo (REIS e colaboradores (2001) mostraram em sua purificação da LOPAP que a banda que se encontra é de aproximadamente 69 kDa em SDS-PAGE, essa proteína é estudada do veneno de *Lonomia obliqua* pois tem o potencial de ser ativadora de protrombina, independente dos constituintes do complexo protrombinase, íons de cálcio aumenta sua atividade. Losac é o primeiro ativador do fator X purificado de uma excreção de lepidópteros. É uma proteína de cadeia polipeptídica de aproximadamente 43 kDa, é capaz de ativar o fator X em uma concentração dependente (SEIBERT, 2003)

A lonofibrase possui uma massa molecular estimada em 35 kDa, considerada uma típica enzima α -fibrinogenase, similar à encontrada no veneno de *Lonomia achelous* ou em alguns venenos ofídicos (MARKLAND, 1997). Fosfolipases A2 promove a hidrólise de fosfolipídios com a geração de ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos, resultando, indiretamente na hemólise. O representante de *L. obliqua* caracterizada é a lonomiatoxina, uma fosfolipase A2 símile de 15 KDa. Esta molécula parece estar envolvida na hemólise de eritrócitos humanos e murinos, assim como na hemólise intravascular em ratos, fatos observados por estudos *in vitro* com o extrato bruto de cerdas (SEIBERT, 2004)

Lipocalinas que apresentam atividade enzimática, o representante melhor estudado deste grupo é a prostaglandina D2 Sintase. Esta enzima é responsável pela síntese de prostaglandina D2 no cérebro de mamíferos e é distinta físico e imunologicamente de outras moléculas sintetizadoras de prostaglandinas encontradas nos demais tecidos. A enzima purificada encontra-se na forma de monômero e possui uma massa molecular estimada em aproximadamente 27 kDa (IRIKURA, 2003)

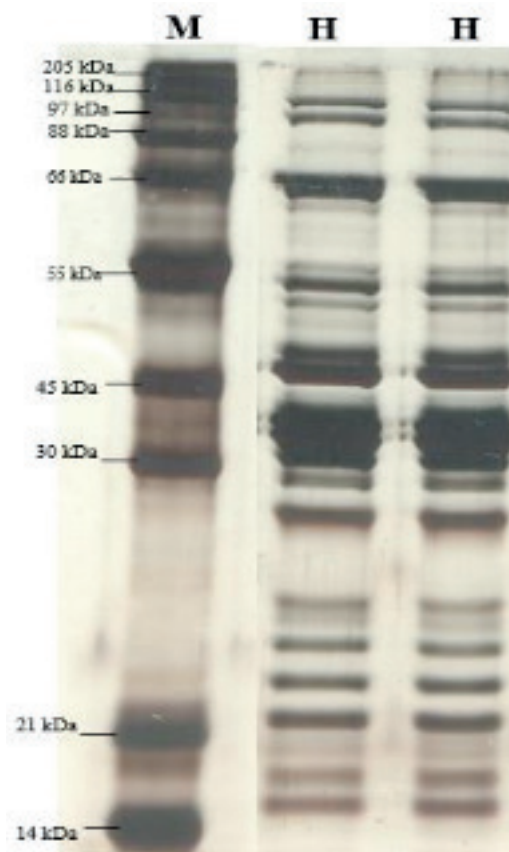


Figura 1: Gel eletroforese (SDS-PAGE) revelado com prata, (M) marcador molecular com banda de proteínas já descritas e marcação do peso em kDa. (H) Hemolinfa de *Lonomia obliqua* na concentração de 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (H) Hemolinfa de *Lonomia obliqua* na concentração de 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Na análise dos testes de biofilme com a hemolinfa o resultados demonstrou que teve atividades com a bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* na concentração de 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e com Gram-positiva *S. aureus* nas concentração de 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstrado assim uma melhor atividade frente a bactéria Gram-positiva (Tabela 1).

Bactérias	<i>L. obliqua</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Ciprofloxacina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>Klebsiellapneumoniae</i> (ATCC 13883)	128	16
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	32	16

Tabela 1: Concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB) da hemolinfa de *Lonomia obliqua* e da Ciprofloxacina na inibição de duas cepas de bactérias.

No ensaio hemolítico para avaliar a citotoxicidade a hemolinfa testada *in vitro* demonstrou atividade na concentração de 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Seibert et al, (2003) demonstrou em seu trabalho com extrato de cerdas de *L. obliqua* foi consideravelmente hemolítico em eritrócitos de camundongos *in vitro*.

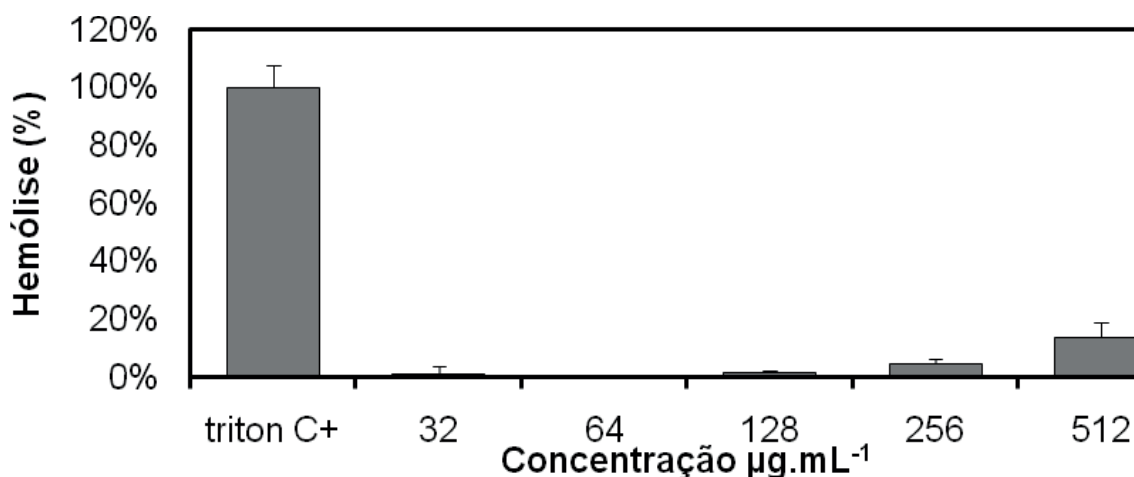


Figura 2: Ensaio hemolítico *in vitro* da hemolinfa de *Lonomia obliqua* em diluição, Triton representa a 100% da hemólise C+.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hemolinfa de *Lonomia obliqua* nos resultados apresentados teve uma resposta eficaz no combate de células bacterianas Gram-positivas devido a afinidade das moléculas apresentada no extrato, em biofilme a resposta para Gram-negativa foi promissora ao combate de biofilmes. Na resposta a citotoxicidade de eritrócitos o resultado foi satisfatório, assim podemos considerar a hemolinfa de *L. obliqua* como uma promissora na síntese de moléculas bioativas e futuramente na produção de novos fármacos contra bactérias formadoras de biofilme.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos ao CNPQ, ao laboratório S-inova Biotech da Universidade Católica Dom Bosco e a todos os colaboradores.

REFERÊNCIAS

- ABBASSI. **Isolation, characterization and molecular cloning of new temporins from the skin of the North African ranid Pelophylax saharica**. Peptides, v. 29, n. 9, p. 1526–1533, Set 2008.
- AROCHA-PIÑANGO, C. L. e GUERRERO, B. **Lonomia; Genus Caterpillar Envenomation: Clinical and Biological Aspects**. Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis, v. 31, n. 3–6, p. 288–293, 2001.
- BRADFORD, M. M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248–254, 1976.
- COSTERTON, J W et al. **Microbial Biofilms**. Annual Review of Microbiology, v. 49, n. 1, p. 711–745, 1995.
- GOVAN, J R, DERETIC, V. **Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia**. Microbiological reviews, v. 60, n. 3, p. 539–74, 1996.

HABASH, M B et al. **The effect of water, ascorbic acid, and cranberry derived supplementation on human urine and uropathogen adhesion to silicone rubber.** Canadian journal of microbiology, v. 45, n. 8, p. 691–4, 1999.

IRIKURA, Daisuke et al. **Cloning, expression, crystallization, and preliminary X-ray analysis of recombinant mouse lipocalin-type prostaglandin D synthase, a somnogen-producing enzyme.** Journal of biochemistry, v. 133, n. 1, p. 29–32, 2003.

KIM, Jin-Young e colab. **Antimicrobial activity studies on a trypsin–chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 330, n. 3, p. 921–927, 13 2005.

LABRO, M. T. e BRYSKIER, J. M. **Antibacterial resistance: an emerging ‘zoonosis’?** Expert Review of Anti-infective Therapy, v. 12, n. 12, p. 1441–1461, 2014.

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.

MARKLAND, F. S. **Snake Venoms.** Drugs, v. 54, n. Supplement 3, p. 1–10, 1997.

MORAN, N. A. **Symbiosis.** Current biology : CB, v. 16, n. 20, p. R866-71, 2006.

NORDMANN, POIREL, DORTET. **Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.** Emerging infectious diseases, v. 18, n. 9, p. 1503–7, 2012.

PINTO, A. F. M.; et al. **Lonofibrase, a novel α -fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars.** Thrombosis Research, v. 113, n. 2, p. 147–154, 2004.

PITOUT, J. D. D.; e LAUPLAND, B. **Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern.** The Lancet Infectious Diseases, v. 8, n. 3, p. 159–166, 2008.

REIS, Cleyson Valença e colab. **Lopap, a prothrombin activator from *Lonomia obliqua* belonging to the lipocalin family: recombinant production, biochemical characterization and structure-function insights.** The Biochemical journal, v. 398, n. 2, p. 295–302, 2006.

REIS, C. V.; et al. **In Vivo Characterization of Lopap, a Prothrombin Activator Serine Protease from the *Lonomia obliqua* Caterpillar Venom.** Thrombosis Research, v. 102, n. 5, p. 437–443, 2001.

SEIBERT, C. S. et al. **Intravascular hemolysis induced by *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract: an experimental model of envenomation in rats.** Toxicon, v. 44, n. 7, p. 793–799, 1 Dez 2004.

SEIBERT, C. S. e SHINOHARA, E. M. G. e SANO-MARTINS, I. S. **In vitro hemolytic activity of *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract on human and Wistar rat erythrocytes.** Toxicon, v. 41, n. 7, p. 831–839, 2003.

TACCONELLI. **Antimicrobial use: risk driver of multidrug resistant microorganisms in healthcare settings.** Current Opinion in Infectious Diseases, v. 22, n. 4, p. 352–358, 2009.

VEIGA, A.B.G, BLOCHTEIN, B. GUIMARÃES, J.A. **Structures involved in production, secretion and injection of the venom produced by the caterpillar *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae).** Toxicon, v. 39, n. 9, p. 1343–1351, 2001.

WHITE, C. e SHAMAN, A. K. e GADD, G. M. **An integrated microbial process for the**

bioremediation of soil contaminated with toxic metals. Nature Biotechnology, v. 16, n. 6, p. 572–575, 1998.

WOLCOTT, R.D. et al. **Chronic wounds and the medical biofilm paradigm.** Journal of Wound Care, v. 19, n. 2, p. 45–53, 2010.

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

