

# 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

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
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
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

Atena Editora  
Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://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

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
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	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902091</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>17</b>
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	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902092</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>30</b>
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	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902093</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>41</b>
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	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902094</b>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>51</b>
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	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902095</b>	

<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>71</b>
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	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902096</b>	
<b>CAPÍTULO 7</b> .....	<b>81</b>
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	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902097</b>	
<b>CAPÍTULO 8</b> .....	<b>96</b>
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	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902098</b>	
<b>CAPÍTULO 9</b> .....	<b>110</b>
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	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902099</b>	
<b>SOBRE OS ORGANIZADORES</b> .....	<b>118</b>

## CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME E ANTITUMORAL DA PEÇONHA DE *Tityus confluens*

### **Regina Meneses Gonçalves**

Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande - MS

### **Danieli Fernanda Buccini**

Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande - MS.

### **Luiz Filipe Ramalho Nunes de Moraes**

Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande - MS

### **Ludovico Migliolo**

Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande - MS

**RESUMO:** Se tratando de saúde pública e privada, as infecções bacterianas e as neoplasias figuram entre as principais causas de mortalidade no mundo. Em virtude à gravidade desses problemas e a escassez de terapias específicas, moléculas provenientes de fontes naturais têm despertado o interesse de pesquisadores. Estas moléculas são de interesse especial devido suas múltiplas funções biológicas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o potencial bioativo da peçonha de *Tityus confluens* frente ao biofilme de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase positiva e tumor ascítico de *Ehrlich*. Os indivíduos de *T. confluens* foram anestesiados e eutanasiados com gelo para remover o télson, a partir do qual a peçonha foi obtida, e posteriormente, o

extrato bruto. A quantificação proteica do EB foi realizada pelo método de Bradford. Monitorou-se o perfil proteico por SDS-PAGE a 12%. A avaliação da atividade antibiofilme foi realizada utilizando o método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços. Também foi realizado ensaio frente a células tumorais em cultura pelo método do MTT. Como resultados, visualizou-se bandas proteicas entre 6,5 e 205 kDa. Para os ensaios biológicos *in vitro*, a peçonha não apresentou inibição contra células planctônicas e biofilme nas concentrações testadas. Observou-se a viabilidade das células do tumor ascítico de *Ehrlich* após 24h de incubação, com atividade da peçonha na concentração máxima testada. Porém, após 48h, não foi observada nenhuma atividade. Contudo, mais estudos são necessários para elucidar a atividade antimicrobiana da peçonha de *T. confluens*, uma vez que, frente à células tumorais, a peçonha apresentou potencial biotecnológico.

**PALAVRAS-CHAVE:** escorpião, resistência microbiana, biofilme, células cancerígenas.

**ABSTRACT:** In the case of public health, bacterial infections and neoplasias are among the main causes of mortality in the world. The severity of these problems and the lack of specific therapies, molecules derived from natural sources have aroused the attention of researchers. These molecules are of special



interest because of their multiple biological functions. Therefore, the objective of this work was to characterize the bioactive potential of *Tityus confluens* venom against strains of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase positive biofilms and Ehrlich ascites tumor. The individuals of *T. confluens* were anesthetized and euthanized with ice to remove the telson, from which the venom was obtained and then the crude extract. Protein quantification of EB was performed by the Bradford method. The protein profile was monitored by 12% SDS-PAGE. The evaluation of antibiofilm activity was carried out using the broth microdilution method in 96 well-plates. In addition, tumor cell culture assay was also performed by the MTT method. As results, protein bands between 6.5 and 205 kDa were observed. For the in vitro biological assays, the venom did not exhibit inhibition against planktonic cells and biofilm at the concentrations tested. The viability of the Ehrlich ascitic tumor cells was monitored after 24h incubation, with venom activity evaluated at the maximum concentration tested. However, after 48 hours no activity was detected. However, further studies are needed to elucidate the antimicrobial activity of the *T. confluens* venom, since the venom presented a biotechnological potential against the tumor cells.

**KEYWORDS:** scorpion, microbial resistance, biofilm, cancer cells.

## 1 | INTRODUÇÃO

Infecções causadas por bactérias, principalmente quando se trata das superbactérias, estão sendo um dado preocupante segundo informações da Organização Mundial da Saúde (OMS), onde em 35 anos esse problema poderá matar mais que o câncer (BBC, 2014). Dentre esses problemas destacamos aqueles promovidos pela superbactéria *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase positiva (KpC). Essa bactéria tem proporcionado um aumento em infecções nosocomiais, como por exemplo, pneumonia, meningite e infecções do trato urinário, o que contribui com mais de 50% nas taxas de mortalidade. A *K. pneumoniae* KpC pode ser oportunista, atacando, principalmente, pacientes imunodeprimidos (RIBEIRO et al., 2015).

As bactérias estão em constante processo de mutação, o que favorece a disseminação e aumento da resistência. *K. pneumoniae* KpC tem como um dos seus mecanismos de resistência, a produção de enzimas, como por exemplo as  $\beta$ -lactamases, que hidrolisam antibióticos que possuem o anel  $\beta$ -lactâmico (BRADFORD et al., 2004; SANTAJIT e INDRAWATTANA, 2016).

Outro mecanismo conhecido de evolução dos microrganismos para impedir a ação dos fármacos é a formação de biofilme, um problema alarmante, pois são infecções graves e de difícil tratamento (VERMA et al., 2010). Biofilmes são comunidades bacterianas que se agregam a uma superfície formando uma matriz extracelular com polissacarídeos, ácidos graxos e DNA. Essa matriz confere a esses organismos maior capacidade de resistência aos antibióticos (CHIN et al., 2015).

Outro dado preocupante no âmbito da saúde é o câncer, onde, dados estatísticos

da OMS mostram que os casos aumentarão em 50% até 2030 (ABIIS, 2016). A palavra câncer designa, especificamente, tumores malignos, que podem ou não serem provenientes de neoplasias benignas. Tumores malignos tem alta capacidade de realizar metástase, piorando a saúde do paciente, já que neste caso, outros órgãos e tecidos são atingidos. Os tumores ou neoplasias se desenvolvem devido a hiperproliferação das células, havendo um desregulamento na diferenciação celular deixando as células atípicas e, conseqüentemente, ocorre a interrupção da organização normal do tecido. As neoplasias podem ser causadas por diversos fatores como exposição à radiação, patógenos, mutações e/ou hereditariedade (AKTIPIS et al., 2015).

O tumor de *Ehrlich*, um adenocarcinoma mamário com capacidade de crescimento em forma ascítica, é um modelo bem estabelecido e muito utilizado na linha de investigação de neoplasias. Estudar neoplasias em cultivo celular torna possível a elucidação de mecanismos biológicos envolvidos na patogênese da doença, bem como possibilita o desenvolvimento de agentes citotóxicos não nocivos às células normais (CALIXTO-CAMPOS et al., 2013; SAAD- HOSSNE et al, 2004).

Tendo em vista que os problemas relatados são de difícil tratamento, e em alguns casos, não há terapia medicamentosa específica disponível para combatê-los, a busca por moléculas bioativas de origem animal está sendo uma nova alternativa no desenvolvimento de novas drogas mais eficazes. Com isso, peçonhas de escorpião são alvo de estudo devido sua complexidade, onde peptídeos, enzimas, proteínas, lipídeos e nucleotídeos, fazem parte de sua composição (DE MELO et al., 2015).

Notoriamente, a atividade biológica que peçonhas em geral apresentam, pode ser devido à fração peptídica ali presente (SANTOS, 2016). Dessa forma, estudos com peçonha bruta de escorpiões já demonstraram ações contra bactérias, por exemplo contra o bacilo Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa* (AHMED et al., 2012). Assim como peptídeos antimicrobianos (PAMs) isolados da peçonha escorpiônica foram ativos contra bactérias Gram-negativas resistentes a múltiplos fármacos, como por exemplo *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e *Acinetobacter baumannii* (HERNANDEZ-APONTE et al., 2011).

Outros estudos também mostram que peptídeos provenientes da peçonha de escorpiões possuem ação antitumoral, um exemplo são os neopládin 1 e 2 isolados de *Tityus discrepans* que demonstraram atividade contra uma linhagem celular de carcinoma mamário humano (D'SUZE et al., 2010). O modo de ação dos peptídeos ainda é pouco conhecido, mas pode-se inferir que varia muito, o que depende da superfície das células em que ele vai entrar em contato, e da composição de aminoácidos do próprio peptídeo. Em um dos mais diversos casos, eles podem atuar eletrostaticamente na membrana da célula alvo, causando lise (CHEROBIM, 2014). Dessa forma, possivelmente, muitas doenças como infecções bacterianas e câncer poderão ser tratadas usando moléculas bioinspiradas nas moléculas da peçonha escorpiônica. Diante disso, este estudo teve como objetivo caracterizar o potencial bioativo da peçonha de *T. confluens* frente a biofilme de *K. pneumoniae* KpC e tumor

ascítico de *Ehrlich*.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos animais

Os escorpiões da espécie *T. confluens* foram obtidos por meio de busca ativa realizadas pela equipe do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, coordenada pela bióloga Silvia Barbosa do Carmo. Os animais foram identificados pela ausência ou presença de serrilha no quarto seguimento da cauda.

### 2.2 Extração do Veneno e Preparo do Extrato Bruto

Para a extração do veneno foram utilizados 40 exemplares, com uma média de 4,5 a 5,5 cm. Os animais foram anestesiados e eutanasiados em gelo, após isso o telson foi retirado e macerado em tampão  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM pH 7,8. O extrato bruto (EB) foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 min à 4°C, o sobrenadante foi armazenado em refrigerador -20°C e o EB foi então liofilizado. Após a liofilização, o mesmo foi ressuspenso em 300 µL de água ultra pura e armazenado em refrigerador -20°C para posteriores análises.

### 2.3 Quantificação Proteica

A quantificação proteica foi realizada em microplaca de 96 poços por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Uma alíquota de 6 µL de EB foi diluída em água ultra pura (1:10, v:v) e 20 µL foram utilizados para um volume de 180 µL do reagente de Bradford, realizando a quantificação com três réplicas. Nesta técnica, a absorvância das proteínas é revelada pelo corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* em meio ácido, resultando em modificação na cor da solução, sendo detectável em 595 nm. Para a calibração da curva foi utilizada albumina sérica bovina, em concentrações de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 e 1.57 µg.mL<sup>-1</sup>.

### 2.4 Perfil Eletroforético Por SDS-PAGE

A separação do conteúdo proteico presente na peçonha foi realizada por meio da técnica de eletroforese unidimensional em SDS-PAGE conforme o método de Laemmli (LAEMMLI, 1970). O gel desnaturante foi preparado na concentração de 12%. Para a comparação de massa molecular, foi utilizado o padrão da *Molecular Probes*<sup>®</sup> (*Protein*

*Molecular Weight Standards P-6649*, o qual possui massas moleculares com 205, 116, 97, 80, 66, 55, 45, 30, 21, 14 e 6.5 kDa). Uma alíquota de 8 µL de EB, na concentração de 2,7 µg, foi misturada a 8 µL de tampão de amostra 2x [Tris/HCl pH 6,8 100 mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20%] para então ser aplicada no gel. O tampão de corrida utilizado foi o 1x [Tris 250mM, glicina pH 8.3 2,5M, SDS1%]. A eletroforese foi realizada em 90 v, 40 mA, durante aproximadamente 3 horas. Após o término da corrida, o gel foi corado com a solução de *Coomassie Brilliant Blue G-250* durante 24h, sem agitação. O gel foi descorado com água deionizada, perfazendo 5 trocas de água até remover a solução. Após isso, o mesmo foi fotodocumentado em digitalizador *HP Scanjet G2410* para posteriores análises das massas moleculares.

## 2.5 Ensaio de Concentração Inibitória Mínima de Biofilme (Cimb)

A formação do biofilme bacteriano de *K. pneumoniae* KpC (+ 002210477) foi obtida utilizando meio de cultura *Basal Medium 2* (BM2) [fosfato de potássio 62 mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7 mM,  $\text{MgSO}_4$  2 mM,  $\text{FeSO}_4$  10 µM e glicose 0,5%]. Culturas bacterianas crescidas durante 18 horas em meio comercial *Mueller-Hinton* (MHB) foram diluídas (1:100, v:v) e 50 µL foram pipetados em microplaca de 96 poços, nos poços da peçonha do escorpião, do controle de crescimento bacteriano e do controle de inibição do antibiótico ciprofloxacino. Nos poços onde foi pipetado apenas MHB não adicionou-se bactéria, pois este foi o controle negativo. Em seguida, a microplaca foi incubada a 37°C por 24 horas para indução da formação do biofilme. O método de microdiluição proposto por Wiegand et al. (2008) foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima (de 16 a 256 µg.mL<sup>-1</sup>) que previne 100% da formação de biofilme. Posteriormente, as células planctônicas foram mensuradas em um comprimento de onda de 600 nm e depois removidas. Os poços da microplaca foram lavados duas vezes com água deionizada. As bactérias aderidas aos poços da microplaca foram coradas com 110 µL de cristal de violeta a 0,1% durante 20 min. Em seguida, a microplaca foi lavada duas vezes com água deionizada, deixada secar a temperatura ambiente e o cristal violeta aderido a células foi solubilizado com 120 µL de etanol a 60%. A formação de biofilmes foi mensurada por meio da leitura da absorbância a um comprimento de onda de 595 nm. Todas as leituras de absorbância foram realizadas por meio do leitor de microplacas (*Bio-Tek Instruments, Inc., UnitedStates*).

## 2.6 Preparação e Avaliação Celular do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

As células do TAE foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Patologia da UNESP de Botucatu e estocadas em refrigerador à -80°C na concentração de 2 x 10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup>. Para os ensaios, as células foram descongeladas, centrifugadas por 10 min a 2500 rpm, e o sobrenadante desprezado. As células foram ressuspensas

em meio de cultivo RPMI. A partir dessa suspensão celular, foram injetados 200  $\mu\text{L}$  de células TAE intraperitonealmente em dois camundongos *Swiss*, fazendo o repasse celular a cada sete dias para os estudos de atividade citotóxica. Após cinco dias da injeção das células do TAE, o crescimento tumoral tornou-se evidente devido à expansão abdominal do animal. Para condução dos ensaios, os animais foram eutanasiados com dose letal de anestésico (quetamina e xilazina) seguido de deslocamento cervical. As células foram obtidas a partir do lavado peritoneal, onde a pele abdominal do animal foi retirada e, por meio de uma seringa, o líquido intraperitoneal foi aspirado. Seguidamente, as células foram lavadas por duas vezes em meio de cultivo RPMI (suplementado com soro bovino fetal 10%) e centrifugadas por 10 min a 2500 rpm. Posteriormente foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer (diluição de 1:20 em líquido de Turk) e a viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão do Azul de Tripán, sendo considerada adequada quando superior a 95% de viabilidade. Todos os procedimentos descritos no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UCDB (protocolo nº 015/2015) e de acordo com as diretrizes do Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

## 2.7 Ensaio Colorimétrico Com Sal de Tetrazolium (MTT)

A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio colorimétrico do MTT, conforme proposto por Takeuchi et al. (1991). Esta é avaliada pela análise baseada na redução do sal 3-[(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT, *Sigma*) solúvel em água para um formazan insolúvel de cor roxa, produto das desidrogenases mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente ativas (vivas). Para isso, uma suspensão de células, contendo  $2 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>, foi colocada em placa de 96 poços e incubadas com meio RPMI contendo 256, 128, 64, 32 e 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de peçonha escorpiônica, perfazendo um volume final de 200  $\mu\text{l}$  e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> 5%, a 37°C. A viabilidade celular foi avaliada 24 e 48 horas após a incubação. Depois desse período, foi aspirado todo o meio e adicionados 10  $\mu\text{L}$  da solução de MTT, em todos os poços da placa, e incubada por 2 horas. Após o período de incubação, foram adicionados 60  $\mu\text{L}$  da solução solubilizadora (HCl + álcool isopropílico) para dissolver os cristais de formazan. Em seguida, foram realizadas leituras a 570 nm em leitor de microplacas (*Bio-Tek Instruments, Inc., United States*). As porcentagens de viabilidade celular foram calculadas em relação aos controles celulares não tratados.

## 2.8 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando *Graph Pad Prism* (v. 5.0, Graph Pad Software, Inc.). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio

padrão. A comparação entre grupos foi realizada utilizando o teste ANOVA (*One-Way*) seguido por pós- teste de Bonferroni. A diferença entre os meios foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição da peçonha escorpiônica é muito variada e tem atraído interesse da indústria farmacêutica desde há muito tempo. Moléculas presentes na peçonha demonstram grande potencial terapêutico quando se diz respeito ao tratamento de doenças, por isso a identificação e caracterização desses compostos naturais são tão importantes (CORDEIRO et al., 2015).

Para tanto, foi realizada uma caracterização preliminar do perfil proteico da peçonha de *T. confluens* a partir da análise eletroforética (Figura 01), onde foi possível observar a presença de moléculas que podem estar relacionadas à atividades farmacológicas. Entre 45 e 55 kDa, foram observadas bandas que podem indicar a presença de hialuronidase (HORTA et al., 2014). Esta enzima hidrolisa o ácido hialurônico presente ao redor das células de tecido conjuntivo, o que o torna permeável à difusão de líquidos. Nos casos de envenenamento, isso favorece a entrada da peçonha nos tecidos.

Conforme descrito no trabalho de Cordeiro et al. (2015), moléculas abaixo de 7 kDa são mais propensas a terem ação nos canais iônicos, estas são consideradas neurotoxinas. Geralmente, as neurotoxinas mais encontradas na peçonha escorpiônica são aquelas que modulam canais de sódio, potássio, cloreto ou cálcio. Porém, para o gênero *Tityus*, as famílias de neurotoxinas mais estudadas são as que atuam em canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Exemplos de neurotoxinas do canal de sódio são Ts1, Ts3 e Ts5, e do canal de sódio podemos citar as  $\alpha$ - neurotoxinas do tipo Ts6 e Ts7, todas essas descritas para *T. serrulatus*.

Com base no exposto, pode-se inferir que, possivelmente, bandas entre 6,5 e 14 kDa indicam a presença de NaTxs: toxinas do canal de sódio, e bandas abaixo de 6,5 kDa sejam KTxs: toxinas do canal de potássio, conforme descrito na literatura para *T. serrulatus* (DE OLIVEIRA et al., 2016). Sugere-se também que bandas abaixo de 6 kDa possam indicar a presença peptídeos antimicrobianos (DU et al., 2015).

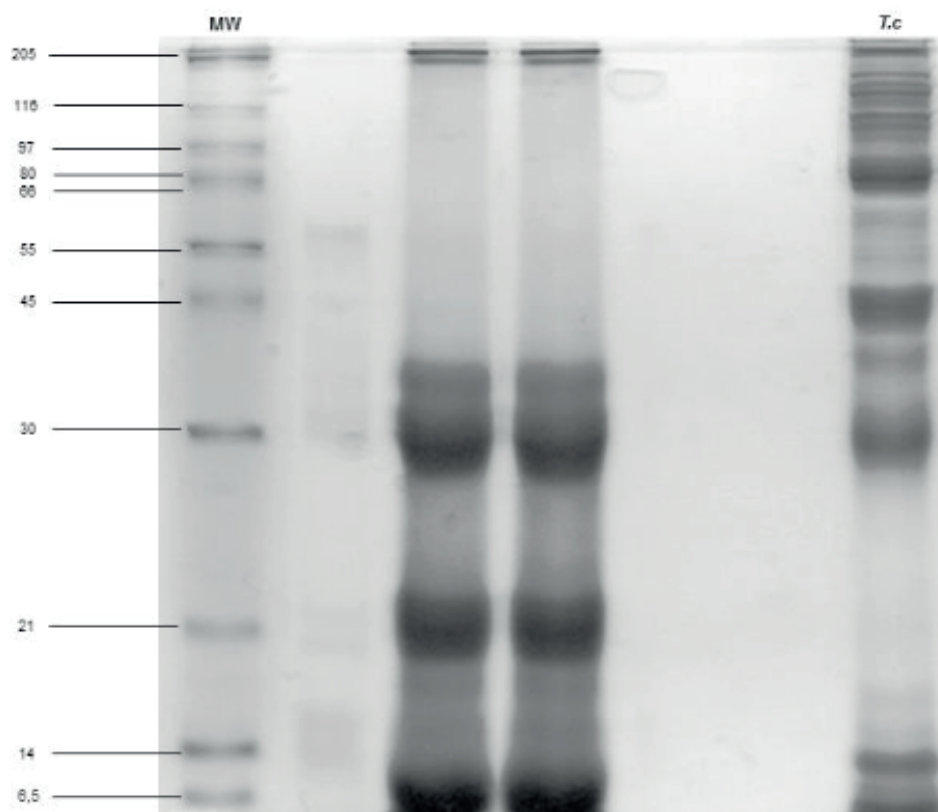


Figura 01. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% de EB da peçonha de *T. confluens*. **MW:** marcador molecular *Molecular Probes*®; **T.c:** EB da peçonha de *T. confluens*.

Na peçonha escorpiônica também estão presentes moléculas que não agem nos canais iônicos, mas que possuem ação biológica, sendo estas chamadas de peptídeos antimicrobianos (HARRISON et al., 2014). Já foram isolados PAMs da peçonha escorpiônica, como por exemplo, hadrurina de 4,43 kDa isolado de *Hadrurus aztecus*, vejovina de 4,9 kDa isolado de *Vaejovis mexicanus*, dentre outros. Por esse motivo, enfatizamos as moléculas de baixo peso molecular, já que os PAMs provenientes da peçonha escorpiônica são geralmente de 2 a 5 kDa, além de serem catiônicos e anfipáticos (DU et al., 2015).

Em relação às atividades biológicas deste estudo, foi observado que nas concentrações de 16 a 256  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  não houve inibição das células planctônicas, como tampouco inibição da formação de biofilme (Figura 02) para *K. pneumoniae* KpC, quando comparados ao controle de crescimento e ao controle de inibição do antibiótico ciprofloxacina.

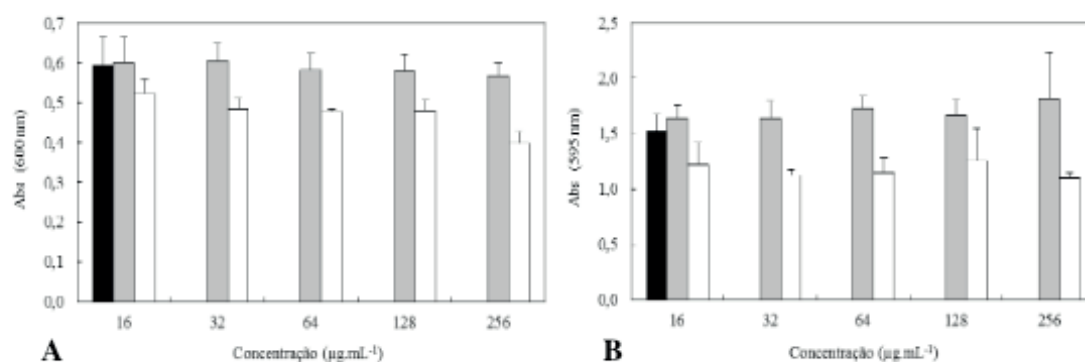


Figura 02. Concentração inibitória mínima de células planctônicas (A) e de biofilme de *K. pneumoniae* KpC (B). Barra preta: controle de crescimento das células bacterianas; Barras cinzas: diferentes concentrações da peçonha; Barras brancas: diferentes concentrações do antibiótico ciprofloxacino. A análise estatística foi realizada por Graph Pad Prism (v. 5.0, Graph Pad Software, Inc.), utilizando teste ANOVA (One- Way) e pós-teste de Bonferroni. A diferença entre os meios foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

Quando se utiliza peçonha bruta, muitas são as interferências e reações que podem acontecer, dificultando a atividade microbiana das moléculas. Parte dessas interferências pode estar relacionada com enzimas, sendo observada atividade proteolítica significativa na peçonha de escorpiões do gênero *Tityus*, como *T. serrulatus*, *T. stigmurus*, *T. bahiensis* (VENANCIO et al., 2013). Uma vez que há alta atividade enzimática, visa-se a importância de utilizar inibidores de proteases para minimizar a degradação da amostra bruta.

Estudos relatam que há efeitos antimicrobianos induzidos por escorpine (proveniente da peçonha de *Pandinus imperator*), uma vez que esteja isolado (DIEGO-GARCIA et al., 2007), o que nos leva a ressaltar a importância da purificação e posterior caracterização das moléculas presentes na peçonha bruta de *T. confluens*.

Outra hipótese que se co-relaciona com os resultados obtidos é que muitas espécies de bactérias, assim como a utilizada, *K. pneumoniae* KpC, são capazes de produzir enzimas que inativam os peptídeos. Estudos como o de Ebbensgaard et al. (2015), Haney e Hancock (2013) demonstram que, em casos de não ocorrer inibição, pode ter acontecido degradação proteolítica.

Além da atividade que os agentes antimicrobianos, possivelmente PAMs, apresentam contra bactérias, estudos já demonstraram atividade antiproliferativa em linhagens de células cancerígenas humanas (HOSKIN e RAMAMOORTHY, 2008).

As células tumorais em cultura do tumor ascítico Ehrlich estavam viáveis para o ensaio de citotoxicidade, pois através do método de exclusão do azul de Tripán, visualizou-se uma quantidade ínfima de células não viáveis, aquelas em que o corante reagiu com o citoplasma, tornando-as de coloração azul. No ensaio do MTT, a peçonha



escorpiônica demonstrou atividade citotóxica significativa de 55% em  $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para 24 horas de incubação (Figura 03-A). Para 48 horas de incubação (Figura 03-B) não houve diferença estatística em nenhuma das concentrações empregadas (16 a  $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), quando comparada ao crescimento das células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).

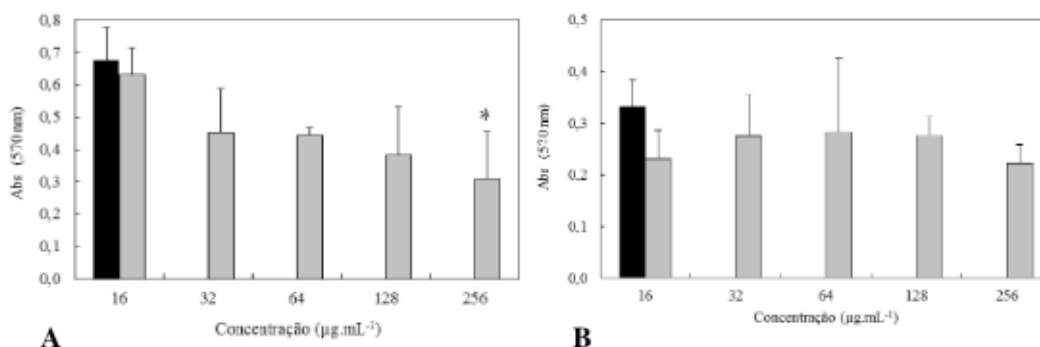


Figura 03. Avaliação da viabilidade celular por meio do ensaio do MTT, após 24 (A) e 48 horas (B) de incubação. Barra preta: controle de crescimento das células TAE; Barras cinzas: células TAE juntamente com diferentes concentrações da peçonha. A análise estatística foi realizada por Graph Pad Prism (v. 5.0, Graph Pad Software, Inc.), utilizando teste ANOVA (One-Way) e pós-teste de Bonferroni. A diferença entre os meios foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . \*Diferença significativa.

Dados de um estudo mostram que a peçonha bruta do escorpião *Rhopalurus junceus* foi capaz de reduzir a viabilidade celular de uma linhagem de células cancerígenas epiteliais, onde a concentração da peçonha variava de 0,6 a  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  (de 600 a  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) com efeitos de dose dependente (DIAZ-GARCIA et al., 2013). Outro estudo mostra a redução da viabilidade celular, de maneira dependente de dose, em células de câncer de pulmão quando expostas a peçonha de *Androctonus australis hector*, variando nas concentrações de 50 a  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (BECHOHRA et al., 2016). Apesar de as linhagens celulares que foram comparadas não serem parecidas, podemos evidenciar que a concentração utilizada no presente estudo foi bem menor que a concentração utilizada pelos estudos citados. Assim, a peçonha escorpiônica deve ser explorada para novas descobertas de moléculas com potencial antiproliferativo frente à células tumorais.

O tumor ascítico de *Ehrlich*, assim como outras neoplasias, é regulado por vias moleculares onde o bloqueio de tais vias afeta a proliferação celular. Então, a investigação dessas vias é uma alternativa promissora quando se trata dos alvos que os compostos naturais podem atingir (FEITELSON et al., 2015). Um exemplo são os canais iônicos hERG associados à proliferação e ao ciclo celular de vários tipos de câncer. Inibindo esses canais com bloqueadores específicos seria uma forma de não deixar células tumorais se proliferarem (QUINTERO-HERNANDEZ et al., 2013).

## 4 | CONCLUSÕES

A amostra bruta foi satisfatória no ensaio frente a células tumorais em cultura, apesar de apenas a maior concentração demonstrar atividade, é de grande importância biotecnológica estudar os compostos da peçonha, uma vez que os PAMs são os mais prováveis de serem os responsáveis pelas atividades biológicas.

Apesar de a atividade que a peçonha demonstrou contra o biofilme ter sido ineficiente, e para a linhagem tumoral foi significativa, identificar e caracterizar as moléculas presentes na peçonha torna possível a aplicação farmacológica das mesmas em diversos tipos de doenças.

Uma vez que em apenas uma concentração houve inibição, vale ressaltar que os experimentos precisam ser repetidos, bem como a quantificação, pois esta pode estar subestimando ou superestimando a concentração.

Em casos de atividade em maiores concentrações, o nível de citotoxicidade às células normais do paciente também pode ser aumentado. Então, novas estratégias devem ser utilizadas, como o isolamento e purificação de moléculas bioativas, diminuindo as variáveis que atrapalham quando se trabalha com a peçonha bruta. Uma das variáveis que podem ter sido mais significantes são as enzimas que degradam proteínas e peptídeos, por isso, ressaltamos a importância de se realizar experimentos com amostras brutas usando inibidores de proteases.

Outra estratégia plausível a ser testada é a terapia combinada ou sinergismo, isso pode potencializar o efeito de inibição. Novos testes devem ser feitos para finalização deste estudo, visto que ainda há muito o que ser desvendado nas mais variadas ações que a peçonha escorpiônica possui.

## REFERÊNCIAS

AHMED, U. et al. **Antibacterial activity of the venom of *Heterometrus xanthopus***. Indian journal of pharmacology, v. 44, n. 4, p. 509-511, 2012.

AKTIPIIS, C. A. et al. **Cancer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity**. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, v. 370, n. 1673, 2015.

ALIANÇA BRASILEIRA DA INDÚSTRIA INOVADORA EM SAÚDE (ABIIS). **Casos de câncer aumentarão 50% até 2030**. Disponível em: <http://www.abiis.org.br/casos-de-cancer-aumentarao-50-por-cento-ate-2030.html>. Acesso em: 02 nov. 2017

BBC BRASIL. **Em 35 anos, superbactérias poderão matar mais que câncer**. Disponível em: [http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2014/12/141211\\_superbug\\_fd](http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2014/12/141211_superbug_fd). Acesso em: 29 out. 2017.

BECHOHRA, L.; LARABA-DJEBARI, F.; HAMMOUDI-TRIKI, D. **Cytotoxic activity of *Androctonus australis hector* venom and its toxic fractions on human lung cancer cell line**. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis, v. 22, p. 29, 2016.

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, n. 1, p. 248–254, 1976.

BRADFORD, P. A. et al. **Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City.** Clin Infect Dis, v. 39, n. 1, p. 55-60, 2004.

CALIXTO-CAMPOS, C. et al. **The Ehrlich tumor induces pain-like behavior in mice: a novel model of cancer pain for pathophysiological studies and pharmacological screening.** Biomed Res Int, v. 2013, p. 624815, 2013.

CHEROBIM, M. D. **Atividade in vitro e in vivo dos peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 derivados de *Pleuroctes americanus* contra *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.** Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Distrito Federal. 2014.

CHIN, C.-Y. et al. **Global transcriptional analysis of *Burkholderia pseudomallei* high and low biofilm producers reveals insights into biofilm production and virulence.** BMC Genomics, London, v. 16, n. 1, p. 471, 2015.

CORDEIRO, F. A. et al. **Arachnids of medical importance in Brazil: main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva.** J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis, v. 21, p. 24, 2015.

D'SUZE, G. et al. **Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line.** Toxicon, v. 56, n. 8, p. 1497-505, 2010.

DE MELO, E. T. et al. **Structural characterization of a novel peptide with antimicrobial activity from the venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus*: Stigmurin.** Peptides, v. 68, p. 3-10, 2015.

DE OLIVEIRA, G. H. et al. ***Tityus serrulatus* envenoming in non-obese diabetic mice: a risk factor for severity.** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, v. 22, n. 1, p. 26, 2016.

DIAZ-GARCIA, A. et al. **In vitro anticancer effect of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines.** J Venom Res, v. 4, p. 5-12, 2013.

DIEGO-GARCIA, E. et al. **Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of “orphan” components.** Peptides, v. 28, n. 1, p. 31-7, 2007.

DU, Q. et al. **AaeAP1 and AaeAP2: novel antimicrobial peptides from the venom of the scorpion, *Androctonus aeneas*: structural characterisation, molecular cloning of biosynthetic precursor-encoding cDNAs and engineering of analogues with enhanced antimicrobial and anticancer activities.** Toxins (Basel), v. 7, n. 2, p. 219-37, 2015.

EBBENSGAARD, A. et al. **Comparative Evaluation of the Antimicrobial Activity of Different Antimicrobial Peptides against a Range of Pathogenic Bacteria.** PLoS One, v. 10, n. 12, p. e0144611, 2015.

FEITELSON, M. A. et al. **Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets.** Semin Cancer Biol, v. 35 Suppl, p. S25-s54, 2015.

HANEY, E. F.; HANCOCK, R. E. **Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications.** Biopolymers, v. 100, n. 6, p. 572-83, 2013.

HARRISON, P. L. et al. **Antimicrobial peptides from scorpion venoms.** Toxicon, v. 88, p. 115-37, 2014.

- HERNANDEZ-APONTE, C. A. et al. **Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus***. *Toxicon*, v. 57, n. 1, p. 84-92, 2011.
- HORTA, C. C. R. et al. **Molecular, immunological, and biological characterization of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase: new insights into its role in envenomation**. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 8, n. 2, p. e2693-e2693, 2014.
- HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. **Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides**. *Biochim Biophys Acta*, v. 1778, n. 2, p. 357-75, 2008.
- LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature* 227(5259): 680-685, 1970.
- QUINTERO-HERNANDEZ, V. et al. **Scorpion venom components that affect ion-channels function**. *Toxicon*, v. 76, p. 328-42, 2013.
- RIBEIRO, S. M. et al. **Antibiofilm peptides increase the susceptibility of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to beta-lactam antibiotics**. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 59, n. 7, p. 3906-12, 2015.
- SAAD-HOSSNE, R.; SAAD-HOSSNE, W.; PRADO, R. G. **Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich: estudo experimental *in vitro***. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 19, n. 1, p. 54-58, 2004.
- SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. **Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens**. *Biomed Res Int*, v. 2016, p. 2475067, 2016.
- SANTOS, M. L. G. **Potencialidades terapêuticas do veneno**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Minas Gerais. 2016.
- TAKEUCHI, H.; BABA, M.; SHIGETA, S. **An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds**. *J Virol Methods*, v. 33, n. 1-2, p. 61-71, 1991.
- VENANCIO, E. J. et al. **Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms**. *Toxicon*, v. 69, p. 180-90, 2013.
- VERMA, V.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S. **Structural changes induced by a lytic bacteriophage make ciprofloxacin effective against older biofilm of *Klebsiella pneumoniae***. *Biofouling*, v. 26, n. 6, p. 729-37, 2010.
- WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. **Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances**. *Nat Protoc*, v. 3, n. 2, p. 163-75, 2008.

## **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

