

# 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>

## ANÁLISE DE PERFIL PROTEICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DA HEMOLINFA DA ARANHA *Nhandu carapoensis*

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

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

### **Patrícia Souza e Silva**

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

### **Alexya Sandim Guindo**

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

### **Ludovico Migliolo**

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

**RESUMO:** A resistência bacteriana é um dos maiores problemas de saúde pública. Dentre os diversos micro-organismos patogênicos, podemos citar as bactérias como os principais agentes responsáveis por enfermidades e infecções que acometem a população mundial. Segundo a organização mundial da saúde (OMS), até o ano de 2050 mais de 10 milhões de pessoas morrerão devido à decorrência de infecções causadas por superbactérias, sendo na América Latina mais de 390 mil mortes atribuídas a estas bactérias. Infecções bacterianas podem gerar perdas financeiras globais de até 100 trilhões de dólares caso o quadro atual se mantenha. Diante disto torna-se necessário buscar por novas ferramentas biotecnológicas, que permitam o combate

eficaz às bactérias resistentes. As aranhas são fortes candidatos para a bioprospecção, pois são artrópodes peçonhentos com um sistema imunológico altamente especializado em combater infecções do tipo bacteriana, viral e até mesmo parasitária. Possuindo mecanismos de imunidade inata como cascata de coagulação, cascata de pró-fenoloxidase e síntese de peptídeos antimicrobianos. Poucos estudos ainda são realizados a respeito dos mecanismos do sistema imune de aracnídeos, muito menos sobre aranhas. Entender o sistema de defesa destes organismos pode revelar diversas moléculas ativas que contribuirão para o desenvolvimento de novas ferramentas biotecnológicas, visando o combate às infecções bacterianas. Este trabalho teve como finalidade avaliar o perfil por SDS-PAGE unidimensional e testar a sua atividade antibacteriana. A hemolinfa extraída da aranha *Nhandu carapoensis* demonstrou atividade contra bactérias gram-negativas da espécie *Klebsiella pneumoniae* obtendo atividade de IC<sub>50</sub> nas concentrações (512, 256, 128 e 54 µg.mL<sup>-1</sup>).

**PALAVRAS-CHAVE:** Bioprospecção, Aranha, Bactérias patogênicas, *Nhandu carapoensis*.

**ABSTRACT:** Bacterial resistance is one of the major public health problems. Among the various pathogenic microorganisms, we can cite bacteria as the main agents responsible for

diseases and infections that affect the world population. According to the World Health Organization (WHO), by the year 2050 more than 10 million people will die due to the result of infections caused by superbugs, being in Latin America more than 390 thousand deaths are attributed to these bacteria. These bacterial infections can generate global financial losses of up to U\$ 100 trillion dollars if the current situation persists. In view of this it is necessary to search for new biotechnological tools that enable effective combat against superbugs. Spiders are strong candidates for bioprospection, because they are venomous arthropods with a highly specialized immune system to fight bacterial, viral and even parasitic infections. Possessing innate immunity mechanisms such as coagulation cascade, pro-fenoloxidase cascade and antimicrobial peptide synthesis. Few studies have yet been done on the mechanisms of the immune system of arachnids, much less on spiders. Understanding the defense system of these organisms can reveal several active molecules that will contribute to the development of new biotechnological tools, aiming to combat bacterial infections. This work aimed to evaluate the protein profile by one-dimensional SDS-PAGE and to test its antibacterial activity. The hemolymph extracted from the spider *Nhandu carapoensis* demonstrated activity against gram-negative bacteria of the species *Klebsiella pneumoniae* obtaining IC50 activity at the concentrations (512, 256, 128 and 54  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ )

**KEYWORDS:** Bioprospection, Spider, Pathogenic bacteria, *Nhandu carapoensis*.

## INTRODUÇÃO

Microrganismos patogênicos são responsáveis por milhares de mortes que acometem o ser humano nos dias atuais. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), caso nada seja feito para reverter este caso, até 2050 mais de 10 milhões de pessoas morrerão no mundo em decorrência à infecções bacterianas, devido à resistência aos antibióticos atribuídas às bactérias.

Bactérias resistentes estão listadas como uma das maiores preocupações da atualidade no eixo de saúde pública e privada no mundo. Estes organismos geram grande colapso em todo o mundo, gerando infecções e enfermidades às pessoas infectadas. Isso se deve ao fato de ao longo do tempo estes organismos adquirirem um gene de resistência (plasmidial ou cromossomal) permitindo-as promover mecanismos que atuam diretamente nos antibióticos. Um mecanismo de resistência muito frequente entre as bactérias e que já é bem elucidado é a síntese da enzima  $\beta$ -lactamase, contém o potencial de degradar por meio de hidrólise do o anel  $\beta$ -lactâmico presente em diversos antibióticos comumente utilizados em ambientes hospitalar como é o caso da penicilina e as cefalosporinas (SANTOS, 2004; KUMAR; VALERA, 2013).

Dentre os grupos de bactérias relacionadas à resistência de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos podemos citar gram-negativas e gram-positivas, sendo descritos e identificados mais de 200 tipos de enzimas  $\beta$ -lactamases classificadas em diferentes grupos funcionais (KUMAR; VALERA, 2013). Várias espécies de bactérias produzem  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs), sendo elas codificadas por genes

presentes em plasmídeos, como é o caso de CTX-M, pode apresentar diversas variações que resultam em diversos produtos de sua ação enzimática sobre os antibióticos, possibilitando resistência a todas as penicilinas e cefalosporinas de terceira geração (BLAIR et al., 2015).

Entre as espécies relacionadas à resistência de antibióticos podemos citar *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (SANTOS, 2004). São descritos na literatura mais de 180 ESBLs, encontradas em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* entre outras pertencentes à família das Enterobacteriaceae. Também sendo descrito em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (BAPTISTA, 2013).

Antibióticos podem ser classificados de duas formas distintas de acordo com sua função: bacteriostáticos, promovendo a inibição do crescimento bacteriano mantendo as colônias bacterianas em sua fase estacionária e, bactericidas, exterminando a população bacteriana, atuando em processos vitais para a integridade da célula, acarretando a morte celular. Cada antibiótico depende de uma concentração específica para que sua atividade seja mantida (BAPTISTA, 2013; PANKEY; SABATH, 2013).

Antibióticos podem ser classificados de duas formas distintas de acordo com sua função, bacteriostáticos promovem a inibição do crescimento bacteriano mantendo as colônia bacteriana em sua fase estacionária. Bactericidas exterminam a população bacteriana, utilizando de mecanismos bactericidas, atuando em processos vitais para a integridade da célula, acarretando à morte celular. Sendo que cada antibiótico depende de uma concentração específica para que sua atividade seja mantida (BAPTISTA, 2013; PANKEY; SABATH, 2013).

Segundo a literatura, o antibiótico ideal deve ser um fármaco de alvo seletivo, espectro de ação estreito, de baixo nível de citotoxicidade, que não afete a microbiota saprófita, boa distribuição no local de infecção, ação bactericida rápida, possua poucas reações adversas, várias de vias de administração, não interfira no sistema imunológico do hospedeiro e nem induza resistência, além de possuir um baixo custo/benefício (BAPTISTA, 2013; KATZUNG, 2007, COSTA, 2017). Todavia, ainda não foi descoberto ou desenvolvido um antibiótico que detenha todas estas características, pois a relação entre antibióticos e bactérias não é linear (BAPTISTA, 2013; KATZUNG, 2007; COSTA, 2016).

Os antibióticos também podem ser classificados em famílias, baseando-se no seu mecanismo de ação. Sendo descritos cinco tipos de mecanismos de ação, sendo eles: Inibição da síntese da parede celular; Inibição da síntese ou dano da membrana citoplasmática; Inibição da síntese proteica nos ribossomas; Alteração na síntese dos ácidos nucleicos; alteração de metabolismos celulares (GOODMAN; GILMAN'S, 2008; KATZUNG, 2007).

Dentre os mecanismos de ação citados acima, podemos exemplificar alguns antibióticos como os  $\beta$ -lactâmicos (Penicilinas e Cefalosporinas), que atuam

interferindo a síntese da parede celular, inibindo enzimas necessárias para a formação do peptidoglicano, além da Bacitracina e Vancomicina (BAPTISTA, 2013; COSTA, 2017). Agentes antimicrobianos como os Aminoglicosídeos, Tetraciclina, Cloranfenicol, Macrólitos, Licosamida e Oxazolidinonas são responsáveis por inibir ou modificar a síntese das proteínas, de maneira a se ligar em uma das duas subunidades dos ribossomos bacterianos, impedindo o crescimento bacteriano, sendo estes classificados como compostos bacteriostáticos (COSTA, 2016; COSTA, 2017).

A inibição da síntese de ácidos nucleicos se dá aos antibióticos que possuem ação de inibir enzimas que atuam no processo de replicação do DNA, como a girase e topoisomerase IV. Os antibióticos mais comuns são as quinolonas como a Ciprofloxacina, Norfloxacina e Ofloxacina (COSTA, 2016). Outros agentes como a Rifampicina atuam inibindo a RNA polimerase durante o processo de transcrição, impossibilitando a síntese de mRNA e consecutivamente a de proteínas (BAPTISTA, 2013; COSTA, 2017).

Dentre os antimicrobianos que agem promovendo a desorganização da membrana plasmática estão as Polimixinas. São compostos anfipáticos tensoativos que interagem com polissacarídeos inseridos na membrana externa. Atuam como carreadores de cátions de cálcio e magnésio, íons necessários para manter a integridade da membrana, alterando a sua permeabilidade e causando extravazamento do líquido intracelular (DZIDIC, 2008; COSTA, 2017). O metabolismo celular pode ser interferido por meio de agentes como Sulfonamidas e o Trimetopim, que bloqueiam diversas etapas do processo de síntese de ácido fólico, um elemento determinante para que ocorra a síntese de DNA e RNA, atuando como um cofator (DZIDIC, 2008).

A resistência bacteriana é um fenômeno recente e seus mecanismos podem surgir do próprio micro-organismo que podem resistir à ação de um determinado antibiótico devido a uma característica estrutural/funcional da própria espécie (BLAIR, 2015) ou adquiridos por meio de transmissão do material genético proveniente de outros microrganismos que contenham genes de resistência através de conjugação, transformação e transdução (COSTA, 2016) ou através de mutações que podem ocorrer durante a replicação celular ou indução por agentes mutagênicos como a radiação ionizante e não-ionizante, agentes alquilantes ou espécies reativas de oxigênio (RICE, 2005; BAPTISTA, 2013; COSTA, 2017).

Desde a descoberta da Penicilina, por Alexander Fleming, em 1928, o mercado passou a produzir e descobrir diversos outros tipos de antibióticos. De início isto causou um grande impacto no combate às infecções, trazendo um marco na evolução da medicina, pois até então não havia forma eficiente para o combate às infecções bacterianas, promovendo a redução das taxas de morbidade e mortalidade (COSTA, et al., 2012). Em decorrência ao uso indevido destes fármacos utilizados no tratamento contra às infecções, o surgimento de micro-organismos resistentes aumentou, principalmente nos últimos anos. Isso ocorre, pois estas bactérias se acumulam e se disseminam, trazendo um grande risco para a população, pois o espectro de fármacos utilizados para o tratamento de infecções diminuiu devido à resistência. Diante deste

contexto, os pacientes estão mais suscetíveis à complicações e o tempo de estadia hospitalar aumenta (COSTA, 2017, SIQUEIRA, 2004).

Microrganismos portadores de resistência intrínseca ou de genes de resistência, possuem maior vantagem competitiva. Os antibióticos geram uma pressão seletiva, eliminando os organismos não resistentes e permitindo a perpetuação dos resistentes (KUMAR, 2013). A capacidade bioquímica expressa por estes micro-organismos favorece seu desenvolvimento, mesmo em um ambiente de alta competição e pressão seletiva, selecionando organismos resistentes à agentes antimicrobianos presentes em uma comunidade microbiana (GUSTAVO, 2008; COSTA, 2017).

Os mecanismos bioquímicos retratados na literatura são: inativação enzimática do antibiótico, modificação do alvo do antibiótico, bombas de efluxo, alteração da permeabilidade da membrana e formação de biofilme (baptista, 2013; costa, 2017).

A Inativação enzimática do antibiótico se baseia num mecanismo enzimático de resistência, promovendo a inativação do antibiótico por meio de enzimas que degradas ou inativam o fármaco. Este mecanismo de resistência pode envolver três tipos de processos, sendo eles hidrólise, transferência de um grupamento químico ou oxiredução (COSTA, 2017). Um exemplo mais conhecido deste tipo de resistência é a produção da enzima  $\beta$ -lactamase, capaz de hidrosilar o anel  $\beta$ -lactâmico, presente em diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, capaz de atuar degradando antibióticos como as penicilinas e cefalosporinas. Existem também as ESBLs, um tipo de  $\beta$ -lactamase que possui diversas variantes e produtos de tradução que conferem resistência a todas as penicilinas e cefalosporinas (KUMAR, 2013).

Há também a inativação de antibióticos pela ação de enzimas catalizadoras denominadas transferases, que promovem reações do tipo O-acetilação, N-acetilação, O-fosforilação, O-nucleodilação, O-ribosilação, O-glicosilação ou transferência de ácidos graxos. Estas enzimas são dependentes de co-substratos como ATP, acetil-Coenzima A,  $\text{NAD}^+$ , UDP-glicose ou glutatona (BAPTISTA, 2013; COSTA, 2017). Este tipo de mecanismo de resistência pode afetar diferentes classes de antibióticos com é o caso dos mecrolídeos, aminoglicosídeos, anfenicóis, fosfomicina e estreptograminas (BLAIR, 2015; COSTA, 2017).

Dentre as enzimas transferases que atuam inativando os antibióticos, podemos citar a Cloranfenicol Acil-transferases, Aminoglicosídeo Acetil-transferases, Virginamicina Acetil-transferases e Macrolídeo Quinases, conferindo resistência aos fármacos Cloranfenicol, Aminoglicosídeos, Estreptograminas e Macrólídeos, presentes em espécies como *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (KUMAR, 2013; COSTA, 2017). Enzimas como a TeTX, promovem a oxidação ou redução de antibióticos a Tetraciclina (BAPTISTA, 2013).

Modificação do alvo do antibiótico consiste na alteração estrutural do alvo de ligação do antibiótico, ainda mantendo a mesma função. Este mecanismo de resistência é comumente relatado em *Staphylococcus aureus*, que são portadoras de um elemento genético móvel denominado SCCmec, que possui em sua integridade o

gene *mecA*, conferindo resistência à Meticilina (DZIDIC et al., 2008; COSTA, 2017).

Bombas de efluxo também é outro processo fisiológico no qual um complexo proteico transmembranar, que atua exportando agentes antimicrobianos que adentraram à célula bacteriana de volta para o meio extracelular, acarretando baixos níveis de antibióticos no interior da bactéria. Bombas de efluxo é um mecanismo de resistência com potencial para combater todos as classes de antibióticos, atuando essencialmente para Tetraciclinas, Macrólidos e Fluoroquinolonas (DZIDIC et al., 2008; COSTA, 2017).

Este mecanismo de resistência está relacionado à diversos genes que codificam diferentes transportadores de antibióticos. Dentre os genes relacionados podemos citar *mef*, *msr* e *vga*, presentes em cocos Gram-positivos resistentes a Macrólitos, Lincosamina e Estreptogramina B. Há também descrito o gene TET, associado à resistência para Tetraciclinas. Além do gene *acrR* que codifica um sistema de efluxo denominado AcrAB-TolC, presente em *Escherichia coli*, além de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Existem diversos tipos de bombas de efluxo, sendo este um mecanismo que atua como transportadores ativos dependentes da hidrólise de ATP e pelo gradiente iônico intracelular (BAPTISTA; KUMAR, 2013; COSTA, 2017).

A alteração da permeabilidade da membrana é outro mecanismo de resistência aos antibióticos que é caracterizado pela diminuição do potencial de permeabilidade da membrana das bactérias. Existem três formas de um fármaco penetrar a membrana celular, por meio de difusão pelas porinas, difusão da bicamada fosfolipídica ou um mecanismo denominado *self promoted uptake* dependendo das características físico-químicas e estruturais de cada antibiótico, por exemplo, compostos hidrofílicos penetram através das porinas (DZIDIC, 2008; DECLOUR, 2009; COSTA, 2017).

Este tipo de resistência baseia-se na mudança da permeabilidade fármaco devido à alterações estruturais, ou de quantidade, seletividade ou do tamanho das porinas, além de variações na estrutura e tamanho de lipopolissacarídeos (LPS) (BAPTISTA, 2013; COSTA, 2017). Uma alteração na permeabilidade da membrana pode contribuir para a diminuição da concentração do antibiótico no meio intracelular das bactérias, sendo este um mecanismo de resistência eficiente para o combate à farmacos como  $\beta$ -lactâmicos, Aminoglicosídeos, Cloranfenicol e Fluoroquinolonas, descrito em bactérias Gram-negativas (DECLOR, 2009, BAPTISTA, 2013; COSTA, 2017).

A formação de biofilme é considerado o mais recente mecanismo de resistência bacteriana. O biofilme permite o desenvolvimento bacteriano em diversos tipos de ambientes, dentre alguns deles podemos citar placas dentárias, ambientes aquáticos, catéteres médicos e feridas traumáticas, agrupados de tal maneira que são protegidos contra entrada de múltiplos fármacos (KUMA et al., 2013).

A formação de biofilme ocorre em duas fases diferenciadas, sendo a primeira a adesão de células planctônicas em um superfície, a segunda fase é caracterizada pelo surgimento de micro colônias que se agrupam em multicamadas celulares, dando início à síntese e secreção de uma matriz extracelular composta por proteínas e

polissacarídeos. No interior da matriz as colônias de uma ou mais espécie de bactérias podem se comunicar através de um mecanismo químico denominado *quorum sesin*, promovendo a ativação de genes responsáveis pela formação de exopolissacarídeos e até a troca de informações genéticas como genes de resistência (SOUZA et al., 2011; COSTA, 2017).

A biotecnologia é uma ciência que evolui rapidamente ao longo dos últimos anos e exerce um papel importante, aplicando recursos e sistemas biológicos, vinculados à tecnologia para contribuir com alguma finalidade em processos específicos. Atualmente pesquisas são realizadas com extratos de fluídos de diversos animais, com intuito de identificar moléculas bioativas com a finalidade do combate a micro-organismos patogênicos. A toxina de aracnídeos é composta por diversos tipos de proteínas e peptídeos, cada qual com sua atividade e função específica (FERNANDES, 2010; PINTO, 2014).

Além da toxina há também a hemolinfa, que ainda não é bem elucidada pois são poucos os estudos realizados com este tipo de fluído, mas que apresenta potencial farmacológico e pode se tornar um forte candidato na busca por compostos ativos. Isto permite a realização de pesquisas com bactérias e biofilmes, estudando a reação a resposta dos mesmos, em busca de uma maneira mais viável de combatê-los, além de utilizar recursos biológicos e não tóxicos para o organismo humano (SILVA Jr, 2000).

As aranhas pertencem a ordem Araneae e representam um grande exemplo de adaptação, podendo ser encontradas desde desertos quentes até os picos mais remotos de montanhas, presentes em todas as regiões do mundo com exceção dos polos árticos. São indivíduos solitários e ótimos caçadores, as aranhas constituem a maior ordem de aracnídeos. Foram descritas aproximadamente 32 mil espécies no mundo, podendo este ser apenas uma pequena parcela do verdadeiro valor. Aranhas são animais peçonhentos (exceto Uloboridae), capazes de inocular o seu veneno por meio das quelíceras. A toxina produzida auxilia principalmente em sua alimentação, como forma de captura e paralização da presa, realizando a pré-digestão e quebra dos tecidos (RUPPERT & BARNES, 1996).

Por maior que seja a riqueza de espécies de aranhas, poucos estudos são realizados com estes animais, o mesmo ocorre com escorpiões, serpentes e anuros, sendo poucas as espécies que têm sua toxina ou hemolinfa totalmente caracterizadas. A toxina das aranhas é composta basicamente por nucleotídeos, íons inorgânicos, aminoácidos livres, neurotransmissores, poliaminas, peptídeos, proteínas e enzimas (ESCOUBAS, 2004). No entanto há uma necessidade maior ênfase de estudos das moléculas neurotóxicas presentes no troxina de aranhas, composta principalmente de acilpoliaminas e toxinas polipeptídicas, atingindo receptores de glutamato (neurotransmissor excitatório em músculos esqueléticos de invertebrados e no sistema nervoso de central em mamíferos) e canais iônicos da membrana de células excitáveis (BORGES, 2008).

O número de espécies realmente causadoras de acidentes graves não ultrapassa

o de 30 em todo o mundo. No Brasil, os gêneros que oferecem grande risco à saúde humana são *Phoneutria*, *Loxosceles* e *Latrodectus*. Outras espécies, não pertencentes a estes gêneros, podem picar, porém geralmente a consequência é apenas uma dor local (SOERENSEN, 2000). De forma geral a maioria destas aranhas podem ser encontradas no Cerrado brasileiro, algumas como a *Loxosceles laeta* e *Phoneutria nigriventer* são frequentemente encontradas em regiões urbanas.

Em contrapartida, aranhas também apresentam além do veneno outros mecanismos de interesse biotecnológico. A hemolinfa dos artrópodes exerce função fisiológica semelhante ao sangue dos vertebrados. Apresentando em sua composição hemócitos e plasma, sendo a hemocianina a principal proteína desta substância, exercendo papel semelhante à hemoglobina nos vertebrados (BEDNASKII, 2013).

O sistema imunológico dos invertebrados pode ser amplamente explorado, levando em consideração sua complexidade, uma vez que os artrópodes se diferenciam dos vertebrados por não apresentarem memória imunológica ou imunoglobulinas, sustentando sua linha de defesa em complexas reações celulares. Nessas reações os hemócitos atuam reconhecendo invasores microbianos (geralmente bactérias e fungos), fagocitando e promovendo a morte por meio de substâncias tóxicas que são liberadas em nódulos ou enzimas como a fenoloxidase, enzima que faz parte de um complexo de proteases, formando o complexo das pró-fenoloxidases que se tornam ativas ao reagirem com mínimas concentrações de lipopolissacarídeos ou peptídeos que normalmente compõem membranas de bactérias (SODERHALL & CERENIUS, 1998).

Ao serem infectados com parasitas ou micro-organismos patogênicos, os artrópodes e conseqüentemente as aranhas iniciam um processo de produção de uma série de peptídeos e enzimas antimicrobianas que antes permaneciam em baixas concentrações no organismo, tendo como finalidade reconhecer e interagir com os patógenos, promovendo a catálise celular dos mesmos (SILVA Jr, 2000).

O número de pesquisas realizadas com a hemolinfa destes animais é ainda menor em relação ao das toxinas. Como exemplo alguns os peptídeos presentes na hemolinfa de aranhas da espécie *Acanthoscurria gomesiana* foram sintetizados: theraphosinina (sequência parcial), 4.052,5 Da, atividade contra bactéria Gram-positiva: *M. luteus* A270; mygalomorphina (sequência parcial), 415,9 Da, atividade contra bactéria Gram-negativa: *E. coli* SBS363; gomesina (sequência total), 2.270 Da, atividade contra bactérias Gram-positivas *Aerococcus viridans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus magisterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Pediococcus acidilacrici*, *Staphylococcus aureus*, Gram-negativas *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, fungos *Alternaria brassicicola*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium culmorum*, *Trichoderma viride*, *Candida albicans*, protozoários *Leishmania* (L.) *amazonensis* e células cancerígenas. *Acanthoscurrina* (sequência parcial), 10.249 Da, atividade contra bactéria Gram-negativa *E. coli* SBS363 e fungo

*C. albicans* (SILVA Jr, 2000).

## METODOLOGIA

### Coleta de Animais

Aranhas de diferentes espécies foram coletadas por meio de busca ativa em áreas antropizadas do bioma Cerrado e Pantanal. As espécies de aranhas foram mantidas em cativeiro visando aperfeiçoar a produção e coleta de hemolinfa.

### Extração da Hemolinfa e Preparo do Extrato Bruto

A hemolinfa de aranhas macho e fêmea da espécie *Nhandu carapoensis* em diferentes estágios de crescimento foram coletadas por meio de punção de vaso dorsal (Figura 1) por intermédio de uma agulha de insulina e seringa de 1 mL, na presença de tampão citrato de sódio (NaCl 0,45m; glicose 0,1m; citrato trissódico 30mm; ácido cítrico 26mM; EDTA 10mM), pH 4,6 (2 volumes de hemolinfa:1 volume de tampão). Os hemócitos foram separados do plasma por centrifugação a 14000 rpm, durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado, liofilizado e armazenado à -20 °C para posteriores análises.

### Quantificação Proteica

Após a liofilização as amostras foram ressuspendidas no volume mínimo (solução estoque) e quantificadas pelo método de Bradford (1976). Nesta técnica, a absorbância das proteínas foi avaliada pelo corante *Comassie Brilliant Blue G-250* em meio ácido resultando na modificação da cor da solução sendo detectável em um comprimento de onda de 595 nm (QUEIROZ, 2012). Para a calibração da curva foi utilizado albumina sérica bovina (BSA), 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 da hemolinfa extraída foi realizada por meio da técnica de eletroforese em SDS-PAGE unidimensional, conforme o método de Laemmli (1970). O gel desnaturante foi preparado nas concentrações de 12% no gel de corrida e 5% no gel empilhador. Para a comparação de massa molecular, foi utilizado o padrão da POMECA® (*The Broad Range Protein Molecular Weight Markers* o qual possui massas moleculares com 225, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 15 e 10 kDa). A corrida foi realizada nas seguintes condições: 80v, durante aproximadamente 3h. Após o término das corridas, os géis foram corados em solução corante de *Comassie Brilliant Blue*. Após descorar

os géis, os mesmos foram escaneados para posteriores análises. Todos os géis foram realizados em réplicas técnicas e biológicas.

### **Avaliação da Atividade Antibacteriana**

Cepas de *Klebsiella pneumoniae* foram utilizadas para os ensaios antibacterianos com hemolinfa de *Nhandu carapoensis*. As bactérias foram plaqueadas em placas com ágar *Mueller-Hinton* e incubadas em agitador sob-rotação de 200 rpm a 37°C, *overnight*. As leituras para análise de crescimento bacteriano foram medidas em espectrofotômetro a 600 nm utilizando 100 µL de cada réplica. Os testes de CIM foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido pelo *CLSI* (Wayne, 2012) por meio do método de diluição em microplacas de 96 poços. Três réplicas técnicas foram organizadas nas microplacas a uma concentração bacteriana final de  $2-5 \times 10^5$  ufc. mL<sup>-1</sup>. A hemolinfa foi testada em concentrações que variam de 4 a 512 µg.mL<sup>-1</sup>. Como controle positivo foi utilizado Cloranfenicol nas mesmas concentrações da hemolinfa, enquanto que a suspensão bacteriana em MHB foi utilizada como controle negativo. As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 18 h e as leituras foram realizadas em leitor de microplacas a 600 nm após o tempo de incubação.

### **Avaliação Antibiofilme**

A formação de biofilmes foi obtida utilizando o meio líquido BM2 [fosfato de potássio 62 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, FeSO<sub>4</sub> 10 µM e glicose 0,4%]. Culturas bacterianas de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) crescidas durante 18 h em caldo *Mueller-Hinton* (MHB) foi diluída (1:100, v:v) em BM2. Em placas de fundo redondo de 96 poços a cultura foi adicionada com hemolinfa em diluição em séries de 4 a 1024 µg.mL<sup>-1</sup>, finalizando o experimento em 100 µL e foi incubado por 24 horas a 37 °C. O controle de crescimento negativo continha apenas bactérias, como controle positivo foi utilizado ciprofloxacina nas concentrações da hemolinfa. 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 às 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 realizados repetições técnicas e biológicas.

## Ensaio Hemolítico *in vitro*

O ensaio hemolítico foi desenvolvido conforme Kim e colaboradores (2005), com algumas modificações. Sangue fresco foi coletado de camundongos saudáveis em tubos BD Vacuntainer com EDTA e centrifugadas a 1600 rpm por 2 min três vezes com tampão fosfato (0,01 M, pH 7,4). Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de células a 1% foi incubada com 50  $\mu\text{L}$  de uma série de diluições em 512 a 4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  amostras testes. Os experimentos foram realizados em microplaca de 96 poços. A placa foi incubada à 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 a expressos com desvio padrão. A porcentagem de hemólise foi calculada utilizando a seguinte equação:

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

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Coleta de Animais e Extração de Hemolinfa

Exemplares da espécie *Nhandu carapoensis* (espécie frequentemente encontrada na região) foram coletados na região de Campo Grande-MS, Latitude: -20.4435, Longitude: -54.6478 20° 26' 37" Sul, 54° 38' 52" Oeste e levados ao laboratório. Em laboratório as aranhas foram devidamente imobilizadas expondo a região dorsal do opstossoma (abdome). Após a raspagem das cerdas foi possível localizar o vaso dorsal (coração) que armazena e distribui hemolinfa para o restante do corpo em todas as espécies de aranhas, podendo variar seu tamanho de acordo com o animal.

Por intermédio de uma seringa de insulina de 1 mL (Figura 3 B), a hemolinfa foi coletada do interior do vaso cardiovascular das aranhas na presença de tampão citrato de sódio. Os hemócitos foram separados do plasma por centrifugação à 14000 rpm, durante 10 min sob temperatura constante de 4°C. Aproximadamente 7 mL de hemolinfa foram coletado num total de seis extrações de um indivíduo adulto, fêmea da espécie *Nhandu carapoensis*.

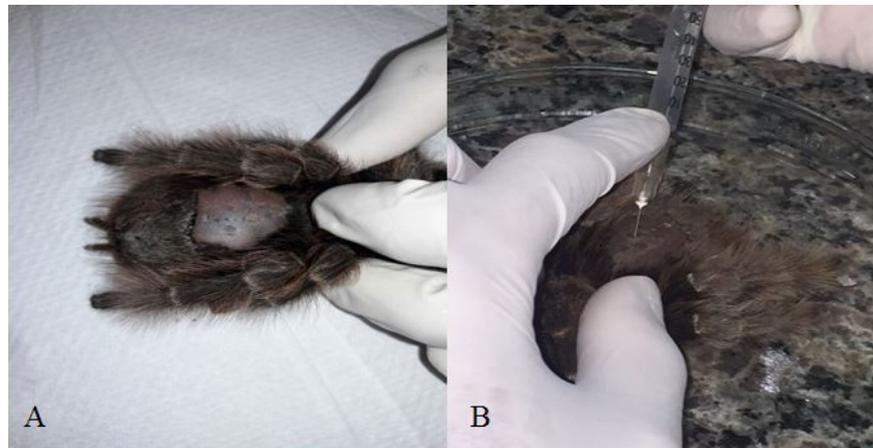


Figura 01. (A) Opstossoma de *Nhandu carapoensis* após raspagem de cerdas. É possível observar uma região mais escura na parte raspada, onde logo abaixo da cutícula encontra-se o vaso cardiovascular dorsal presente em todas as espécies de aranhas. (B) Extração de hemolinfa a partir do vaso cardiovascular dorsal da aranha *Nhandu carapoensis*, com auxílio de seringa contendo 200  $\mu\text{L}$  de Tampão Citrato de Sódio, para evitar possível coagulação do material coletado.

### Quantificação Proteica

As amostras coletadas foram imediatamente quantificadas por meio do método Bradford e analisadas num equipamento espectrofotométrico. A partir da curva da albumina foi possível constatar a concentração de proteínas em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A reação com o corante *Comassie Brilliant Blue G-250* indica a presença de proteínas. Por meio do monitoramento da absorvância de luz pelo aparelho espectrofotométrico foi obtido a concentração protéica.

### Análise em SDS-PAGE

O gel de eletroforese unidimensional realizado com extrato bruto de hemolinfa da aranha *Nhandu carapoensis* apresenta proteínas com massa molecular entre 150 e 15 kDa, em contrapartida, estudos realizados por Sanggaard (2015) revelaram uma série de proteínas presentes no plasma da aranha *Acanthoscurria geniculata*, dentre estas podemos citar *Hemolactin-likeprotein 1*, de 549.3 kDa, *Hemocianin G, F, A, E, E, D, C e Bchain*, de massa molecular respectivamente 72.3, 72.5, 60.6, 26.2, 53.2, 73.4, 73.2 e 62.3kDa. *Hemolactin-like protein 2*, 380 kDa, *Histones*, 14.4, 13.8 e 14.2 kDa e *Complement componente 3* de 67.8 e 127.4 kDa e *Hydroxy butyrate dehydrogenase* de 38.7 kDa.

Muitas destas proteínas estão associadas ao sistema imune das aranhas, além da circulação de oxigênio e mecanismos de coagulação (SANGGAARD, 2015). A resposta imune das aranhas e dos artrópodes em geral é baseada na imunidade inata. Sua circulação aberta torna-os mais suscetíveis a perda de hemolinfa por lesão, sendo mais propensos à infecções. Para solucionar este tipo de problema, os artrópodes desenvolveram um eficiente mecanismo de coagulação, de rápida

atividade, sendo também de importante papel no sistema imunológico, uma vez que imobilizadas no coágulo as bactérias aprisionadas acabam morrendo. Em humanos vemos mecanismos semelhantes, onde armadilhas extracelulares de neutrófilos e o coágulo humano também são capazes de imobilizar e matar bactérias (BRINKMANN, 2004; LOOF, 2011).

O plasma de hemolinfa dos artrópodes em geral é composto por proteínas livres, células e peptídeos antimicrobianos. A proteína mais comum presente na hemolinfa de diversos artrópodes é a hemocianina. Esta é um complexo proteico constituído por cadeias menores, que é responsável pela captação e transporte de oxigênio (O<sub>2</sub>). As hemocianinas descritas na literatura assumem um formato de hexâmero, incluindo ao longo de sua cadeia anéis porfirínicos ligados à íons de cobre. Estudos realizados por Liu e colaboradores (2018), desenvolveram um peptídeo antimicrobiano denominado B11, derivado da hemocianina de *Litopenaeus vannamei*. SILVA-JUNIOR (2000) isolou o peptídeo gomesina, theraphosina, mygalomorphina e acanthoscurrina, presentes na hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*.

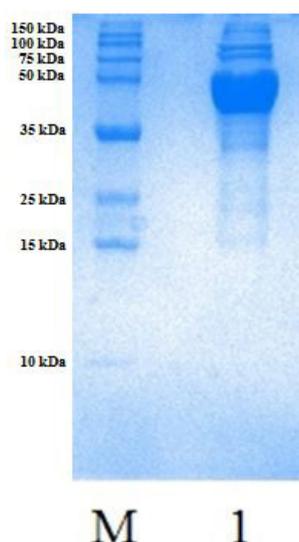


Figura 02. Gel de eletroforese (SDS-PAGE), com bandas proteicas coradas por *Coomassie Brilliant Blue G-250*, sendo M: Marcador molecular, apresentando bandas de 150, 100, 75, 50, 35, 25, 15 e 10 kDa. E 1: Extrato bruto de hemolinfa de aranhas da espécie *Nhandu carapoensis*.

## Ensaio Antibacteriano

Os ensaios realizados utilizando amostras do extrato bruto de hemolinfa da aranha *Nhandu carapoensis* frente à cepas bacterianas de *Klebsiella pneumoniae*, demonstraram inibição de crescimento em células planctônicas, obtendo maior inibição na concentração de 512  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .

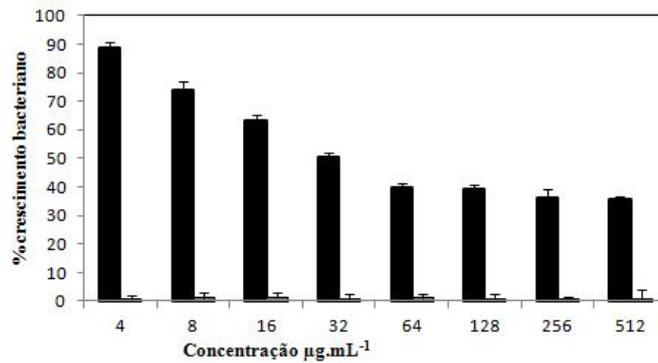


Figura 03. Gráfico representativo da atividade antibacteriana do extrato bruto de hemolinfa da aranha *Nhandu carapoensis*. Em **preto** o crescimento de células plantônicas na presença da amostra de hemolinfa em diferentes concentrações, em **cinza** na presença do antibiótico cloranfenicol.

### Ensaio Antibiofilme

As amostras também demonstraram atividade inibindo a formação de biofilme em cepas bacterianas de *Klebsiella pneumoniae*, obtendo maior inibição na concentração de 1024 µg.mL<sup>-1</sup>.

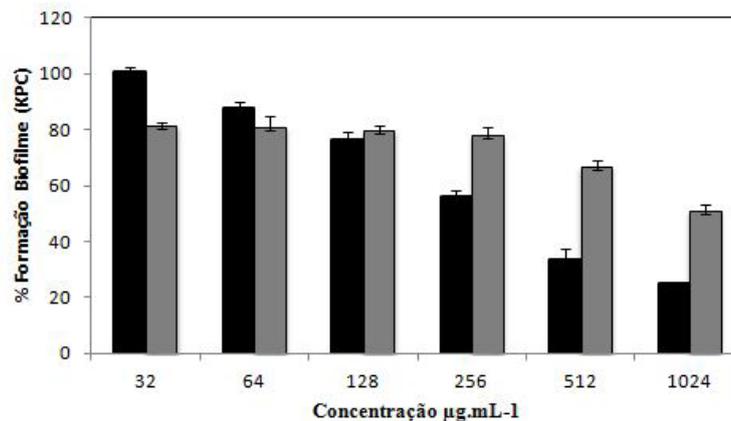


Figura 04. Gráfico representativo da atividade antibiofilme do extrato bruto de hemolinfa da aranha *Nhandu carapoensis*. Em **preto** a porcentagem de formação de biofilme na presença de hemolinfa em diferentes concentrações. Em **cinza** na presença do antibiótico ciprofloxacina.

### Ensaio Hemolítico

O extrato bruto de hemolinfa da aranha *Nhandu carapoensis* não apresentou atividade hemolítica.

### CONCLUSÃO

O extrato bruto de hemolinfa da aranha *Nhandu carapoensis* possui diversos componentes proteicos, que podem estar relacionados com seu sistema imune. E possui atividade frente à bactérias Gram-negativas da espécie *Klebsiella pneumoniae*,

inibindo 50% da população bacteriana, além de atividade antibiofilme.

## REFERÊNCIAS

- BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismo de Resistência aos Antibióticos**. 2013. 42f. Monografia (Dissertação de Mestrado) – Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa.
- BLAIR, J. M. et al. **Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance**. *Nature*, v. 13, p. 42-51, 2015.
- BRINKMANN, V.; **Neutrophil extracellular traps kill bacteria**, *Science*, v. 303, p. 1535-1535, 2004.
- COSTA, A. L. P. et al. **Análise qualitativa fitoquímica e do potencial antimicrobiano do extrato bruto de casca de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bomple (Lecytidaceae) frente a microrganismos gram-positivos**. *Ciência Equatorial*, v. 22, p. 26-34, 2012.
- COSTA, A. L. P. **Resistência Bacteriana aos Antibióticos: uma perspectiva do fenômeno biológico, suas conseqüências e estratégias de contenção**. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIFAP, Macapá, 2016.
- COSTA, A. L. P., SILVA-JUNIOR, A. C. S. **Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura**. *Estação Científica (UNIFAP)*. Macapá, v. 7, n. 2, p. 45-57, maio/agosto. 2017.
- DECLOUR, A., **Outer membrane permeability and antibiotic resistance**. *National Institutes of Health*. 1749 (5), 808-816. 2009.
- DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. **Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects**. *Food Technology and Biotechnology*. v. 46, n. 11, p. 11-21, 2008.
- FERNANDES, S. C. R. **Caracterização química e biológica de compostos bioativos da peçonha da aranha caranguejeira *Nhandu coloratovillosus* (Schmidt, 1998)**. 103 f. Mestrado em Biologia Animal – Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, 2010.
- GUSTAVO, B. L. **Análise de portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* no hospital universitário de Brasília**. 102 f. Monografia (Dissertação de Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. 2008.
- KATZUNG, B. (2007). **Farmacologia Básica e Clínica** (10ª ed.). Brasil: McGraw Hill.
- KUMAR, S., VALERA, M. F. **Molecular Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents**. *Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education*, Formatex, p. 522-534. 2013.
- LOOF, T. G.; MORGELIN, M.; JOHANSSON, L.; OEHMCKE, S.; OLIN, A. I.; DICKNEITE, G.; NORRBY-TEGLUND, A.; THEOPOLD, U.; HERWALD, H. **Coagulation, an ancestral serine protease cascade, exerts a novel function in early immune defense**. *Blood*, v. 118, p. 2589-2598. 2011.
- PANKEY, G., SABATH, L. **Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram positives bacterial infections**. *Oxford Journals*, 38, 864-865. 2013.
- PINTO, J. R. A. S. **Análise estrutural das proteínas da seda da teia da aranha *Naaphila clavipes*, uma abordagem proteômica**. 288f. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular – Instituto de Biociências de Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2014.

RICE, L., BONOMO, R. **Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial.** ViclorLorian, M. D. (Eds), Antibiotics in Laboratory Medicine, (5<sup>a</sup> ed., p. 441-476, 2005).

SANGGAARD, K. W. **The spider hemolymph clot proteome reveals high concentrations of hemocyanin and von willebrand factor-like proteins.** BBA – Proteins and Proteomics

SILVA Jr, P. I. **Sistema imune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurriagomesiana*.** 2000. 162 f. Doutorado em Ciências Biomédicas. – Universidade de São Paulo – Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo/SP, 2000.

SILVA Jr, P. I.; DAFFRES, S.; BULET, P. **Isolation and characterization of Gomesin, an 18 residues cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthos curriagomesiana* hemocytes with sequence similarities to Horseshoe Crab antimicrobial peptides of the Tachyplesin family.**The Journal of Biological Chemistry. v. 275, n. 43, p. 33464-33470, 2000.

SANTOS, N. Q. A. **Resistência Bacteriana no contexto da infecção hospitalar.** Texto Contexto Enfermagem, v. 13, n. Especial, p. 64-70, 2004.

SIQUEIRA, C. M. M. **Resistência aos Antibióticos: O uso inadequado dos antibióticos na prática clínica.** Resista de La Organización de Farmacéuticos Iberoamericanos, v. 14, n. 1, p. 45-68, 2004.

## 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 tálson, 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; SANTAJOIT 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).

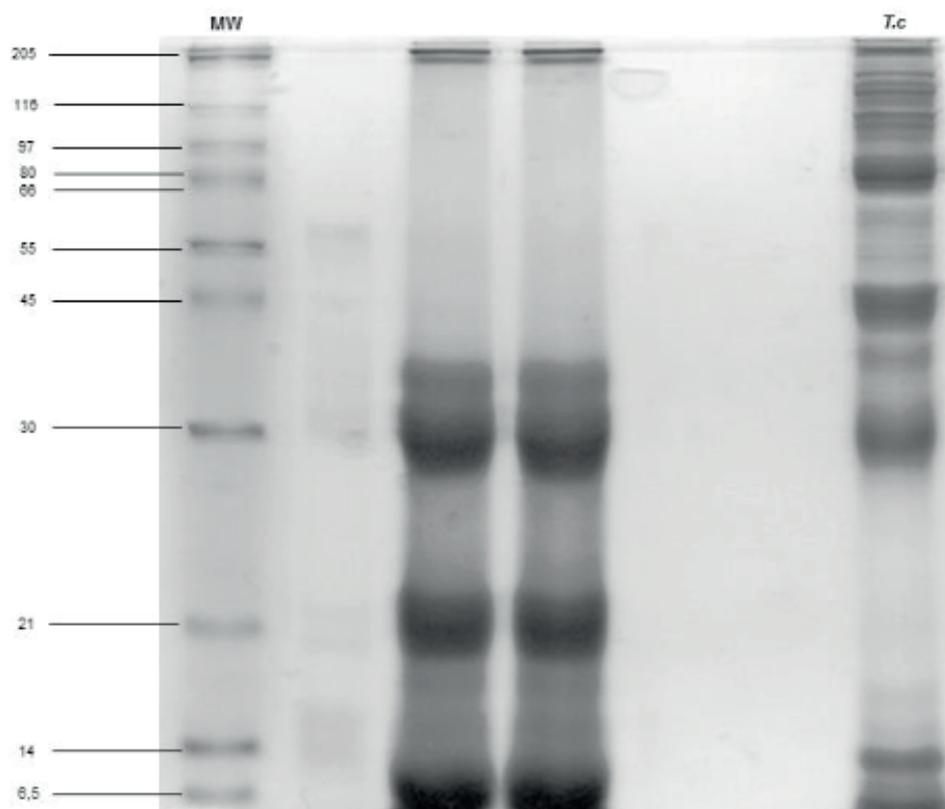


Figura 01. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% de EB da peçonha de *T. confluens*. **MW**: marcador molecular *Molecular Probes*®; **T.c**: EB da peçonha de *T. confluens*.

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.

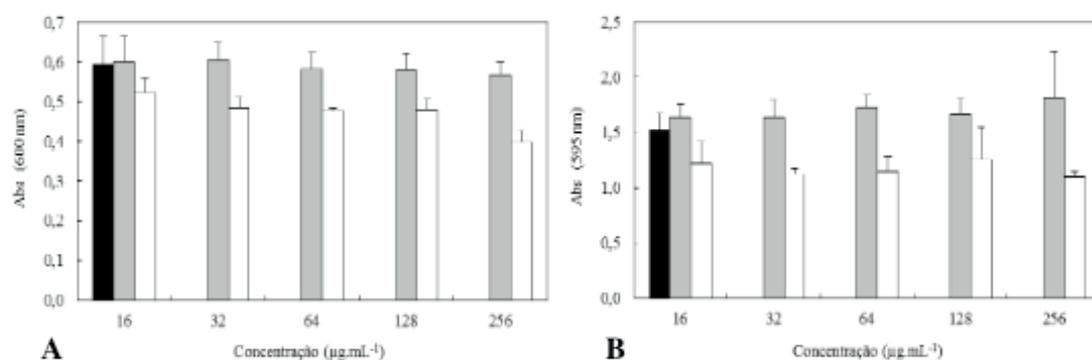


Figura 02. Concentração inibitória mínima de células planctônicas (A) e de biofilme de *K. pneumoniae* KpC (B). Barra preta: controle de crescimento das células bacterianas; Barras cinzas: diferentes concentrações da peçonha; Barras brancas: diferentes concentrações do antibiótico ciprofloxacino. A análise 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).

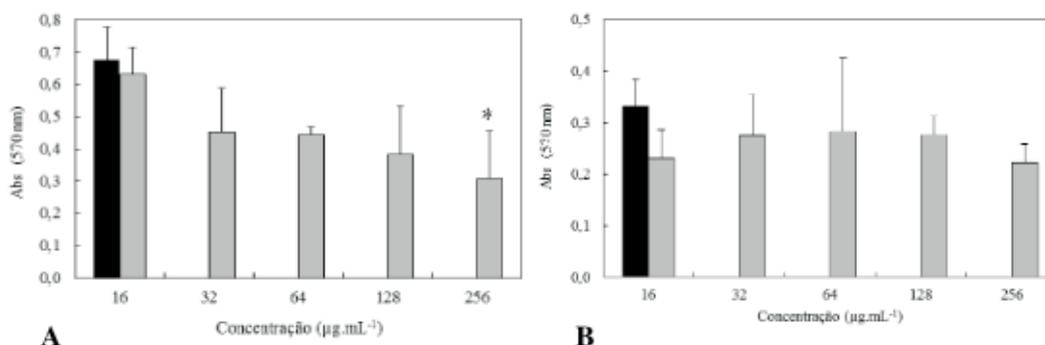


Figura 03. Avaliação da viabilidade celular por meio do ensaio do MTT, após 24 (A) e 48 horas (B) de incubação. Barra preta: controle de crescimento das células TAE; Barras cinzas: células TAE juntamente com diferentes concentrações da peçonha. A análise estatística foi realizada por Graph Pad Prism (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 *Pleuronectes 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.

## 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  $\mu$ 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{L}$  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<sup>-1</sup>, 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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM

de  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM de  $\text{FeSO}_4$  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.

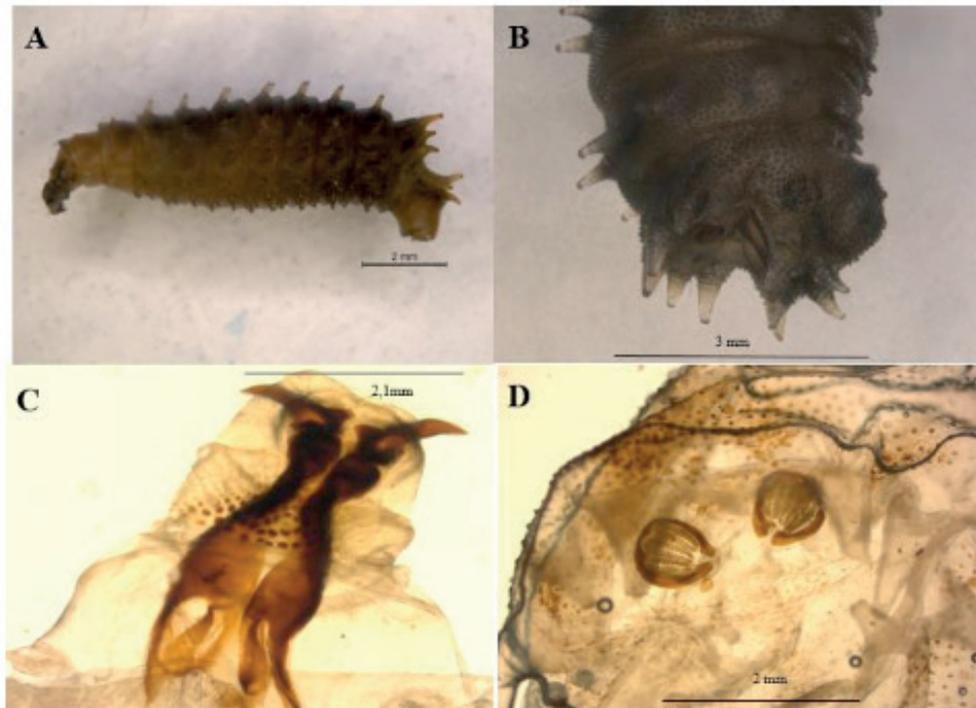


Figura 2: (A) *Chrysomya albiceps* em fase larval três, (B) Tubérculos que rodeiam o bordo do segmento posterior dalarva, (C) Extremidade anterior estrutura pretas relacionadas asclerites e terminando emganchos (o esqueleto cefalo faríngeo), (D) Espiráculos posteriores de terceiro instar, estão presente 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.

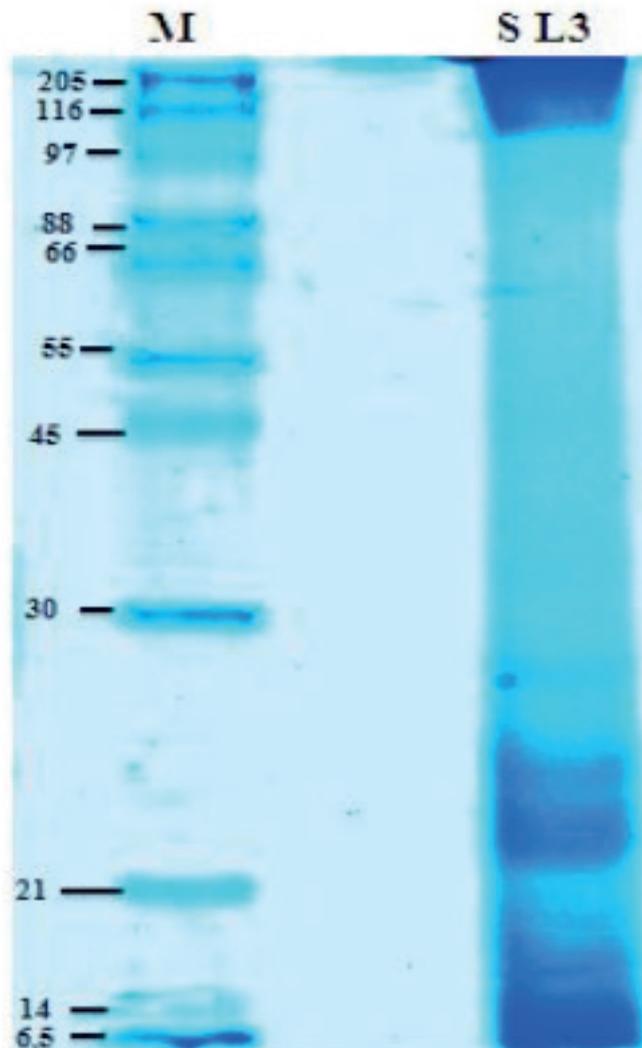


Figura 3: Gel de eletroforese SDS-PAGE com a coloração de azul *Comassie*, **M** representa o marcador molecular com algumas bandas já descritas de 205 á 6,5 kDa. **SL3** representa a secreção *C. albiceps* dá em terceiro estágio. **Fonte:** Scaneado por Patrícia Souza e Silva no

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).

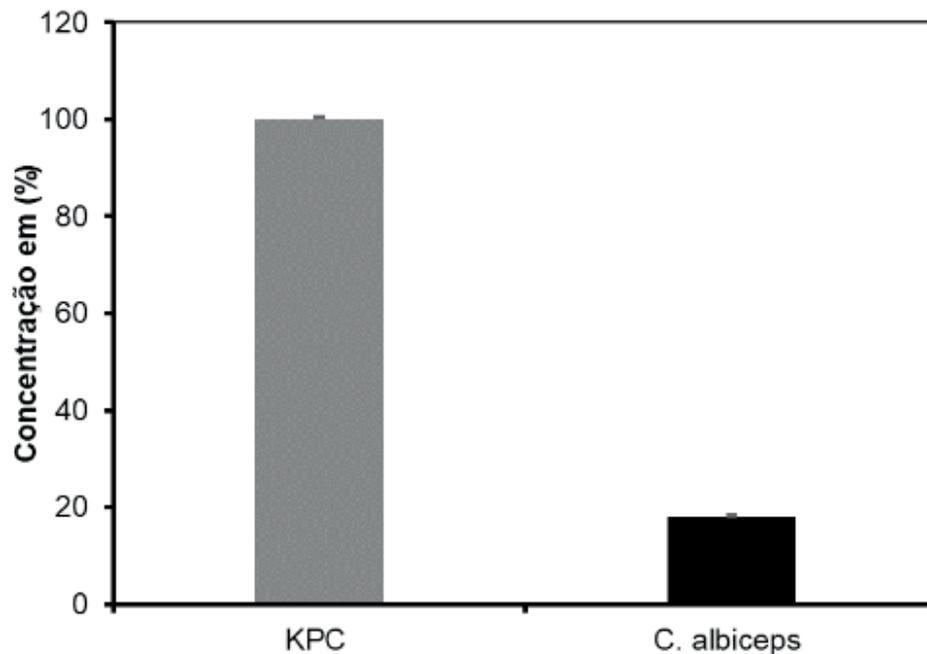


Figura 4: Porcentagem de inibição do biofilme de *K. Pneumoniae KpC*; barra preta crescimento de bacteriano e a barra cinza crescimento bacteriano com solução aquosa da secreção cutânea de *C. albiceps*.

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.

## 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,  $\text{MgSO}_4$  2 mM,  $\text{FeSO}_4$  10  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  da suspensão de células a 1% foi incubada com 50  $\mu\text{L}$  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  $\alpha$ -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)

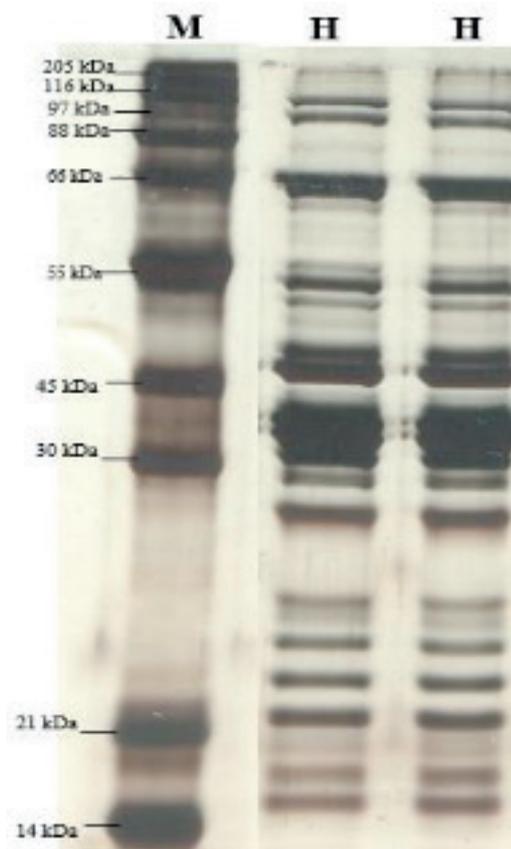


Figura 1: Gel eletroforese (SDS-PAGE) revelado com prata, (M) marcador molecular com banda de proteínas já descritas e marcação do peso em kDa. (H) Hemolinfa de *Lonomia obliqua* na concentração de 3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (H) Hemolinfa de *Lonomia obliqua* na concentração de 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$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

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*.

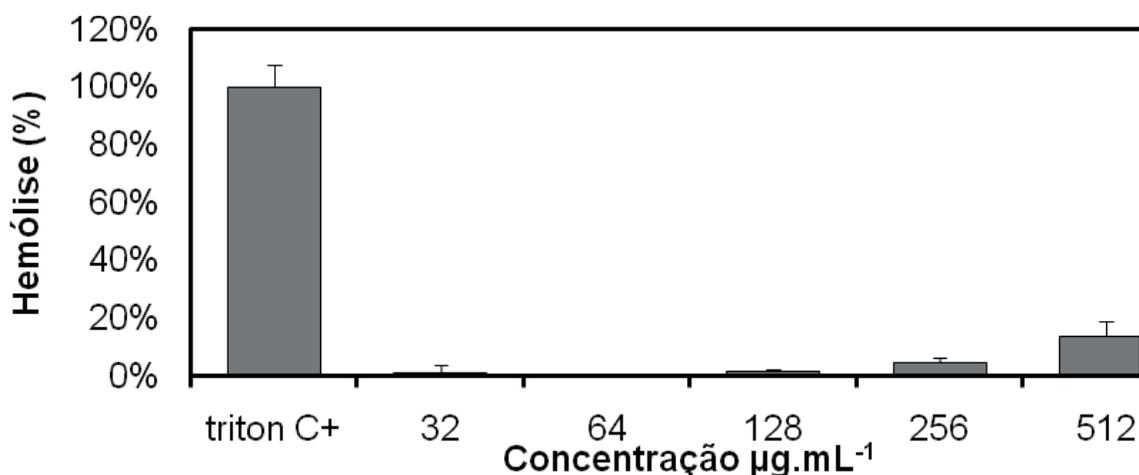


Figura 2: Ensaio hemolítico *in vitro* da hemolinfa de *Lonomia obliqua* em diluição, Triton representa a 100% da hemólise C+.

## 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  $\alpha$ -fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars.** Thrombosis Research, v. 113, n. 2, p. 147–154, 2004.

PITOUT, J. D. D.; e LAUPLAND, B. **Extended-spectrum  $\beta$ -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.

## DESENHO RACIONAL DE PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS ANÁLOGOS A TOXINA DO ESCORPIÃO *Tityus sp.*

### Lucas Bianchi Nunes

Universidade Católica Dom Bosco  
Campo Grande, MS

### Taylla Michelle de Oliveira Flores

(Pós-graduação em Biologia Molecular e Celular  
Universidade Federal da Paraíba João  
Pessoa-PB)

### Patricia Souza e Silva

Universidade Católica Dom Bosco  
Campo Grande, MS

### Elizangela de Barros

Universidade Católica Dom Bosco  
Campo Grande, MS

### Marlon Henrique Cardoso

Universidade Católica Dom Bosco  
Campo Grande, MS

### Octávio Luiz Franco

Universidade Católica Dom Bosco  
Campo Grande, MS

### Ludovico Migliolo

Universidade Católica Dom Bosco  
Campo Grande, MS

**RESUMO:** Atualmente, as infecções bacterianas têm sido preocupação de governos e alvo de estudos, pois este é um problema em todo o mundo. As pessoas que mais sofrem são aquelas imunossuprimidas, sendo afetadas por super bactérias como *Enterococcus*

*faecalis* e *Escherichia coli* que provocam graves danos à saúde. Com o avanço da tecnologia e a prospecção de novas drogas, os peptídeos antimicrobianos (PAM) são candidatos a combater esses microrganismos e curar pessoas. Em relação aos resultados *in silico*, os peptídeos Butylatus apresentaram características de peptídeos antimicrobianos, baixa energia de interação nas membranas miméticas, boa estabilidade estrutural na membrana. Além disso, a atividade *in vitro* observada foi que o peptídeo apresenta atividade antimicrobiana e baixa atividade hemolítica. A partir desses resultados, é possível considerar o peptídeo TsAp-1 como candidato a produtos biotecnológicos de interesse para a indústria farmacêutica e hospitalar.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bactérias patogênicas; Peptídeos antimicrobianos; Estudo *in silico*.

**ABSTRACT:** Currently, bacterial infections have been targeted by governments and study targets, as this is a problem around the world. People who are most immunosuppressed are affected by supercommissions such as *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* that cause serious damage to health. The antimicrobial peptides (PAM) are candidates to combat these microorganisms and heal people. Regarding the *in silico* results, the peptides butylatus the characteristics of antimicrobial peptides,

low interaction energy in the mimetic membranes, good structural reassembly in the membrane. In addition, the *in vitro* activity showed that the peptide showed antimicrobial activity and low hemolytic activity. In order to obtain results, it is possible to consider the peptide TsAp-1 as a biotechnological product of interest for a pharmaceutical and hospital industry.

**KEYWORDS:** Pathogenic bacteria; Antimicrobial peptides; *In silico* study.

## 1 | INTRODUÇÃO

### 1.1 O Combate À Infecções e o Surgimento Das Resistências aos Antibióticos

Infecções bacterianas tem sido alvo da atenção dos estudos da comunidade médica, organizações de saúde e governos. Este problema global é tratado a partir de pesquisas de produtos no intuito de eliminar esses patógenos. Busca-se atingir esse objetivo por meio de fármacos que sejam eficazes e que causem menos efeitos adversos aos pacientes. Se por um lado a resistência bacteriana aos fármacos atualmente recomendados contribui para significativo aumento dos óbitos, por outro há gastos exorbitantes em tratamentos (GURGEL; CARVALHO, 2008; PEREIRA et al., 2005; WANNMACHER, 2004). Estima-se que, em breve, estaremos sem condições de tratar infecções bacterianas devido ao fato de não termos mais opções para deter sua resistência e multiplicação (VIANNA et al., 2016). A Figura 1 apresenta uma expectativa de mortes por microrganismos em 2050.



Figura 1 - Expectativa de mortes por micro-organismos em 2050.

Legenda: Mortalidade por 10.000 habitante de 5.000 (em cinza) até mais de 10.000 mortes (em vermelho). Fonte: (DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE, 2016) (ADAPTADO).

Visando obter novas ferramentas para tratamento de infecções bacterianas, Peptídeos Antimicrobianos (PAM) aparecem como uma alternativa proveitosa. Os

PAMs são peptídeos que exercem atividade bacteriostática, bactericida, lise celular, prevenção do biofilme, entre outras, nas quais podem ser usadas contra a infecção bacteriana (HARRISON et al., 2014).

A interação dos PAM se dá nas membranas destes organismos, interagindo com a membrana externa das bactérias. Após o PAM se fixar na membrana inicia-se a desestabilização da parede microbiana por meio da formação de poros ou a atividade de enfraquecimento da membrana. As formas de atuação dos peptídeos na membrana bacteriana foi estudada ao longo do tempo e elucidadas várias maneiras de interação, como demonstra a Figura 2 (CALISKAN et al., 2013a; TARAZI, 2015). Contudo, Powers e Hancock (2003), apresentam que a capacidade antimicrobiana dos peptídeos se dá pela combinação de cationicidade, hidrofobicidade, formação de estrutura secundária, anfipaticidade, conformação, hidrofobicidade e ângulo polar. Para promover a ação antimicrobiana descrita, o PAM interage com a membrana da célula alvo por meio de interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Para tanto, características estruturais e eletrostáticas precisam ser consideradas pois a mudança em alguma característica do peptídeo acarreta mudanças no corpo e atividade do peptídeo (POWERS; HANCOCK, 2003).

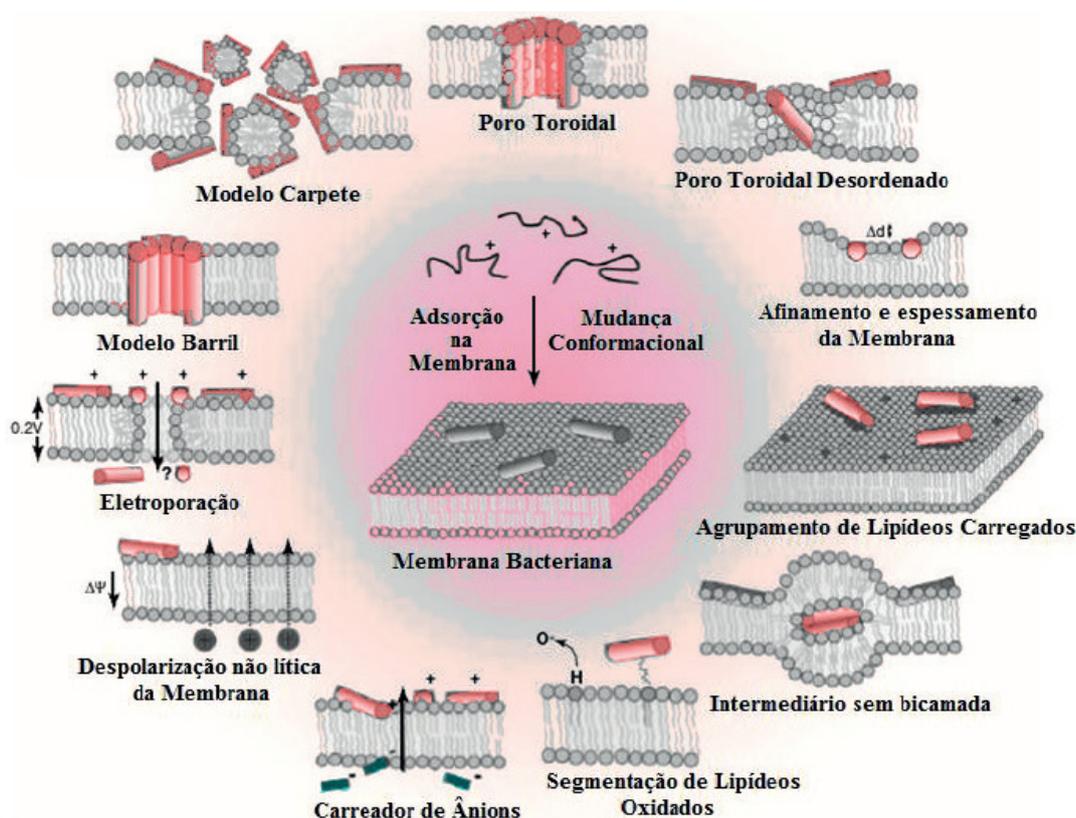


Figura 2 - Mecanismos de ação de PAMs na membrana bacteriana. Padrões clássicos de ruptura de membrana, os peptídeos se encontram com a membrana interagindo de maneira a formar um limiar de concentração e penetrar-se em toda membrana formando poros no modelo Barril, solubilizar a membrana em estruturas de micelas no modelo tapete ou formar poros peptídeo-lipídeo como é o padrão poro toroidal. No modelo de poro toroidal desordenado, a formação de poros é, de certa forma, aleatória e envolve um número menor de peptídeos. A espessura da bicamada de fosfolipídios pode ser perturbada pela existência de peptídeos, ou a própria membrana pode ser reconstruída de modo a formar domínios ricos em lipídios aniônicos. Em poucos casos, a bicamada sem intermediários poder induzida; peptídeos

podem ser adsorvidos pela membrana bacteriana direcionando fosfolipídios oxidados; peptídeos podem induzir pequenos ânions por meio da bicamada, resultando no efluxo, o potencial de membrana pode ser dissipado sem outro dano aparente, ou, também podemos observar inversamente, no modelo molecular de eletroporação, a acumulação de peptídeo na monocamada externa que aumenta o potencial da membrana a um limiar que torna a membrana porosa a transitoriedade de várias moléculas, incluindo o peptídeo que causou este efeito (NGUYEN, et al., 2011) (ADAPTADO).

## 1.2 Disposição de Pam Na Natureza e Em Escorpiões

PAM são sintetizados em vários organismos, tais como serpentes, lagartas, anuros e escorpiões (HARRISON et al., 2014, 2016; HEINEN et al., 2014; LADRAM, 2016; VAN HOEK, 2014). Estudos recentes apresentam que as toxinas de escorpiões possuem propriedades biológicas eficientes contra bactérias, fungos, células tumorais, inibição de canais iônicos e mediadores da dor (CALISKAN et al., 2013b; KING; HARDY, 2013; QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013). Uma breve representação da atividade das toxinas em estado bruto é apresentada na Tabela 1.

Escorpião	Peptídeo	Carga	Atividade biológica	Referencial teórico
<i>Tityus serrulatus</i>	TsAP-1	+1	Anti-Gram+, antifúngico, antitumoral	(GUO et al., 2013)
<i>Tityus serrulatus</i>	TsAP-2	+1	Anti-Gram+, antifúngico, antitumoral	(GUO et al., 2013)
<i>Scorpiops tibetanus</i>	SiCT1	+1	Anti-Gram+	(YUAN et al., 2010)
<i>Pandinus imperator</i>	Pantinin-2	+1	Anti-Gram+, Gram-, antifúngico	(ZENG et al., 2013)
<i>Mesobuthus martensii</i>	BmKbpp	+7	Anti-Gram+, Gram-, antifúngico, cél. Mamíferos	(XU et al., 2014)
<i>Androctonus aeneas</i>	AaeAP1	+2	Anti-Gram+, antifúngico, antitumoral	(DU et al., 2015)
<i>Androctonus aeneas</i>	AaeAP2	+2	Anti-Gram+, antifúngico, antitumoral	(DU et al., 2015)
<i>Tityus discrepans</i>	Bactridine 1	+2	Anti-Gram+ e Gram-	(DÍAZ et al., 2009)
<i>Tityus stigmurus</i>	Stigmurin	+1	Anti-Gram+, antifúngico, cél. de mamíferos, antitumoral	(DE MELO et al., 2015)
<i>Vaejovis mexicanus smithi</i>	VmCT1	+2	Anti-Gram+ & Gram-	(RAMÍREZ-CARRETO et al., 2012)
<i>Vaejovis mexicanus smithi</i>	VmCT2	+2	Anti-Gram+ & Gram-, cél. Mamíferos	(RAMÍREZ-CARRETO et al., 2012)
<i>Chaerilus tricostatus</i>	Ctriporin	+3	Anti-Gram+, antifúngico	(FAN et al., 2011)
<i>Heterometrus petersii</i>	Hp 1036	+1	Antiviral	(HONG et al., 2014)
<i>Heterometrus petersii</i>	Hp 1239	+1	Antiviral	(HONG et al., 2014)

Tabela 1 - Peptídeos de escorpiões, sua carga líquida e ação biológica.

Fonte: Banco de dados on-line Antimicrobial Protein Data Bank e Med-Line.

Nota: Dados trabalhados pelo autor.

A toxina dos escorpiões apresenta aspecto opalescente e leitoso, sendo constituída por muco, proteínas básicas neurotóxicas, nucleotídeos, aminoácidos e enzimas. Sua composição pode variar de acordo com a presa do escorpião, região geográfica e variações genéticas (DIEGO-GARCÍA et al., 2013; RATES et al., 2008).

Contudo, a toxina do *T. serrulatus*, possui as seguintes famílias de proteínas (classificadas por atividade): toxinas de canal de sódio (NaTx), toxinas de canal de potássio (KTx), toxinas diuréticas, peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs), PAM, enzimas e outras toxinas, como mostra a Figura 7.

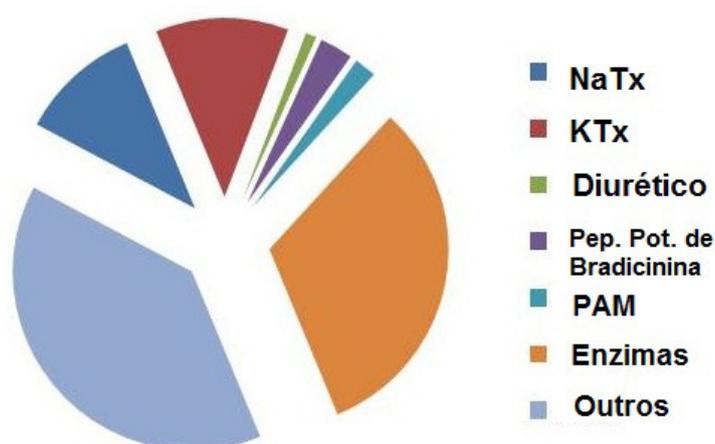


Figura 7 - Composição da peçonha de escorpiões *Tityus*.

Fonte: Venom Zone (ADAPTADO).

A toxina do escorpião-amarelo é composta por proteínas neurotóxicas que interagem com alta especificidade em canais iônicos. Este fato desperta o interesse de pesquisadores em isolar e caracterizar tais proteínas e peptídeos, visando tratamentos mais eficazes nos casos de envenenamento e a compreensão de mecanismos fisiológicos, patológicos e biológicos (DE MELO et al., 2015; DIEGO-GARCÍA et al., 2013; PEDRON et al., 2017). Testes com peptídeos extraídos da toxina de escorpiões apresentaram efeito bactericida, bacteriostático e antibiofilme, sendo pouco nocivo a células humanas e com baixo efeito hemolítico (HWANG et al., 2013; LEE et al., 2013; RAMÍREZ-CARRETO et al., 2012).

Isolando determinadas frações da toxina do escorpião *T. serrulatus*, observou-se que existem pelo menos dezenove peptídeos tóxicos, podendo ser classificados em  $\alpha$  e  $\beta$ -toxinas, de acordo com a sua conformação estrutural. As mais notáveis, no entanto, são a *Tityus*Toxina1 (Ts1) caracterizada como  $\beta$ -neurotoxina com atividade tóxica para mamíferos e insetos ao interagir fortemente com o sítio quatro de canais de sódio; Ts2 com ação de retardo na inativação de canais de sódio, sendo uma  $\alpha$ -neurotoxina; a Ts3 é composta por 62 resíduos de aminoácidos, massa de 7,240 kDa e ação sobre o terceiro canal de sódio induzindo a liberação de mediadores

químicos como a acetilcolina e a catecolaminas, além disso, esta toxina exerce atividade sobre a despolarização de fibras nitrégicas e liberação de óxido nítrico, levando ao relaxamento do músculo liso cavernoso (HWANG et al., 2013; LEE et al., 2013; RAMÍREZ-CARRETO et al., 2012).

A Ts15 bloqueia canais de potássio Kv1.2 e Kv1.3 e observou-se que tal bloqueio é físico; já a Ts18 apresenta-se como uma proteína curta e com ação em canais de íons sódio (LIMA, 2014; QUINTERO et al., 2013); outros componentes menos estudados como peptidases e hialuronidases estão presentes neste veneno. Hialuronidases são enzimas capazes de degradar hialurona, componente presente na matriz extracelular, facilitando a rápida difusão das toxinas no organismo da presa (ALMAAYTAH et al., 2014; DE MELO et al., 2015).

Sobre a atividade antimicrobiana dos peptídeos da peçonha, observa-se que existem fatores interdependentes nos componentes estruturais que determinam essa atividade (TARAZI, 2015; VALDEZ-VELÁZQUEZ et al., 2013). Foi observado que os peptídeos antimicrobianos oriundos da toxina de escorpião desempenham papel eletrostático na parede das membranas de bactérias, uma vez que a membrana apresenta amino-componentes carregados negativamente como fosfolipídios ácidos e lipopolissacarídeos (LPS) (TARAZI, 2015).

Na peçonha do escorpião *T. serrulatus*, o peptídeo TsAP-1 (FLSLIPSLVGGISAFK) apresenta 17 resíduos de aminoácidos, carga +1, 78% de hidrofobicidade, 52% de resíduos hidrofóbicos e massa de 1161.94 Da. O TsAP-1 este possui concentração inibitória mínima (CIM) de crescimento de *Staphylococcus aureus* (120  $\mu$ M), *Escherichia coli* (160  $\mu$ M) e *Candida albicans* (160  $\mu$ M) e concentrações bactericidas mínimas de *S. aureus* (>160  $\mu$ M), *E. coli* (>160  $\mu$ M) e *C. albicans* (>160  $\mu$ M), além de ser bioativo contra células tumorais *in vitro* H157 e H838 (Carcinoma epidermóide oral humano e adenocarcinoma de câncer de pulmão, respectivamente) com valores de inibição de 55,9  $\mu$ M e 52,5  $\mu$ M, respectivamente, atividade hemolítica de 6,48% na concentração máxima (160  $\mu$ M). Por estas características este peptídeo foi utilizado para desenho racional de peptídeos análogos sintéticos (GUO et al., 2013).

### 1.3 Modelagem Molecular (MM)

A modelagem molecular, de acordo com a IUPAC, busca investigar as estruturas e propriedades moleculares por meio da química computacional e de técnicas de visualização tridimensional (BARREIRO et al., 1997). Desta forma, a MM tem por objetivo gerar, manipular e/ou representar com precisão estruturas moleculares e calcular as propriedades físico-químicas delas (VERLI, 2014). Para continuação da atuação e desenvolvimento desta nova metodologia, os empenhos em tecnologia computacional precisaram avançar também tanto em capacidade de armazenamento de dados como em sua análise, o que, somado ao aprimoramento na química funcional (técnicas como ressonância magnética nuclear (RMN), cristalografia de raio-X, bioquímica e biologia

molecular) trouxe desenvolvimento em áreas até então completamente desconhecidas (COHEN, 1996; VERLI, 2014).

## 2 | MATERIAL DE MÉTODOS

### 2.1 Desenho Racional e Predição dos Análogos do Peptídeo TsAP-1

O peptídeo TsAP-1 (FLSLIPSLVGGSSISAFK), oriundo do escorpião *Tytilus serrulatus*, (GUO et al., 2013) escorpião brasileiro conhecido escorpião-amarelo, foi utilizado como *template* para que os peptídeos fossem desenhados racionalmente por meio da observação da estrutura primária de aminoácidos e pela predição de sua conformação em  $\alpha$ -hélice, então, os resíduos de aminoácidos foram reorganizados utilizando o diagrama em hélice do servidor **HeliQuest** (GAUTIER et al., 2008) para realizar o desenho racional com a intenção de melhorar características físico-químicas (hidrofobicidade, carga líquida e massa teórica) do peptídeo TsAP-1, que é o controle para comparação dos análogos.

Utilizou-se o servidor *Antimicrobial Peptide Database (APD)* para conhecer a porcentagem de resíduos hidrofóbicos e massa teórica do peptídeo TsAP-1 e os desenhados racionalmente. Para conhecer a similaridade entre o peptídeo molde e seus análogos foi utilizado o programa **Clustal Omega** versão 1.2.4 (SIEVERS et al., 2011) no formato com números. Para prever a atividade antimicrobiana, foi utilizado o servidor **CAMP<sub>R3</sub>** (WAGHU et al., 2016) o qual utiliza banco de dados *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, *UniProtKB* e *PDB* (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) selecionando peptídeos com as palavras-chave: antimicrobianos, antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários considerando informações sobre a sequência, estrutura, definição proteica, atividade, taxonomia do organismo de origem e organismos alvos (WAGHU et al., 2016).

### 2.2 Síntese, e Quantificação do Produto

Os peptídeos TsAP-1 e os análogos foram sintetizados pela empresa Aminotech, com uma pureza de 95% (após remoção de TFA), pelo método da fase sólida utilizando o químico N-9-fluorenilmetiloxicarbonilo (*F-moc*) em resina de amida Rink. O peptídeo sintético foi solubilizado em ácido trifluoroacético aquoso a 0,1% (TFA) e filtrado com um filtro Millex de 0,22  $\mu$ m 25 mm (Millipore-Merck, Billerica, MA). As concentrações de peptídeos sintéticos para todas as experiências *in vitro* e foram determinadas utilizando a medição por absorvância a 205, 215 e 225 nm (FALCAO et al., 2016).

## 2.3 Análises Estruturais *In Silico*

### A) Alinhamento e modelagem molecular

A construção dos modelos tridimensionais do peptídeo controle e dos peptídeos análogos foi realizada por similaridade por meio do servidor **I-TASSER** utilizando o banco de dados PDB (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Para realizar a validação dos modelos desenvolvidos utilizou-se o programa **PROCHECK14**, o qual apresenta a geometria peptídica, a estereoquímica e a distribuição energética pontuando ângulos diedros considerando forças covalentes e análise do **gráfico de Ramachandran**. Além deste, por meio do programa **ProSA-web** calculou-se o nível de qualidade dos peptídeos gerados baseado em resultados previamente dados dentro de intervalos de proteínas nativas por meio do Z-score (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

### B) Estudo em *Docking* (Docagem Molecular)

O programa **AutoDock 4.2** foi utilizado para elucidar modos possíveis de interação entre os peptídeos desenhados racionalmente e o peptídeo controle em uma membrana mimética bacteriana Gram-negativa e Gram-positiva. As membranas foram construídas utilizando o servidor **CHARMM-GUI**, na proporção de 9:1 de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DPPE) e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (DPPG). A bicamada foi construída em uma caixa retangular, onde moléculas de água foram adicionadas, bem como neutralizando íons por métodos de substituição. A caixa da grade foi calculada com 40 × 40 × 25 pontos e espaçamento de 1,0 Å centrado na superfície da membrana. Depois disso, cinquenta quadros de encaixe foram feitos e as estruturas geradas foram classificadas de acordo com seus valores de afinidade. O programa **PyMOL** foi utilizado para visualizar as estruturas tridimensionais dos peptídeos modelados bem como as interações peptídeo-membrana respeitando a distância de 2,8 a 3,6 Å para todos os átomos ancorados com a membrana (CARDOSO et al., 2016)

## 2.4 Quantificação dos Peptídeos

Os peptídeos sintetizados foram quantificados de acordo com a metodologia de Murphy e Kies (MURPHY, J. B.; KIES, 1960) pela absorção de luz UV, utilizando a média entre as seguintes fórmulas:

$$a. (ABS_{215} - ABS_{225}) \times 0,144 = k$$

$$b. ABS_{205} \times 0,031 = T$$

$$c. \frac{(k + T)}{2} = C$$

Onde, ABS é a absorbância e C é igual à concentração do peptídeo em mg/mL

nos comprimentos de onda 205, 215 e 225 nm. As constantes são representadas por 0,144 e 0,031.

## 2.5 Análise funcional *in vitro*

### A) Ensaio hemolítico

A atividade hemolítica do peptídeo TsAP-1 e os análogos foi avaliada utilizando eritrócitos de camundongo. Os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão fosfato 50 mM, pH 7,4. A solução peptídica foi adicionada à suspensão de eritrócitos (1%, em volume), em uma concentração final variando de 256 a 8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em um volume final de 100  $\mu\text{L}$ . As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 60 min. A liberação de hemoglobina foi monitorizada medindo a absorbância do sobrenadante a 540 nm. O controle de hemólise zero (branco) foi determinado com eritrócitos suspensos na presença de tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 e para controle positivo (100% de lise de eritrócitos); utilizou-se uma solução de 1% (em volume) de Triton X-100 dissolvido em água milli-Q em vez da solução peptídica. Os ensaios hemolíticos foram realizados em triplicata (CARDOSO et al., 2016).

### B) Ensaios antibacterianos

*Escherichia coli* (ATCC 8739), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), sensíveis à metilina foram utilizados para ensaios antimicrobianos. As espécies bacterianas foram cultivadas em 1,0 mL de *Mueller-Hinton* (MH) por 24 horas a 37°C sob agitação em tubos de ensaio. Após isto, cada peptídeo sintético foi incubado com 5 x 10<sup>5</sup> UFC. mL<sup>-1</sup> de bactéria. Os controles negativos e positivos do ensaio foram bactérias em meio MH e várias diluições de ciprofloxacina, respectivamente, com volume final de 100  $\mu\text{L}$ . Foi considerado atividade inibitória quando o peptídeo apresentou >90% de inibição do crescimento bacteriano quando comparado ao controle. O crescimento bacteriano foi medido em 595  $\mu\text{m}$  após 24 horas de incubação na placa, realizado de acordo com os protocolos descritos pelo Comitê Nacional de Padrões de Laboratório Clínico (NCLS).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Desenho racional e síntese de análogos do TsAP1

Neste trabalho, o peptídeo TsAP-1 (FLSLIPSLVGGSSISAFK) foi sintetizado quimicamente e testado contra bactérias.

Como forma de prever se o peptídeo TsAP1 apresentaria atividade antimicrobiana e prospectar sua massa foi utilizado o servidor CAMP<sub>R3</sub>. Por meio de um banco de dados é possível conhecer, com grande precisão, a probabilidade da molécula apresentar

atividade antimicrobiana. Conforme análise, por meio da ferramenta “Resultados com classificador de análise discriminante”, o controle obteve 98,5% de chance de ser antimicrobiano, o que é considerado uma margem de segurança para prosseguir com os estudos, tanto para os padrões de atividade antimicrobiana como de massa, visto que é de comum acordo na comunidade científica atividade antimicrobiana prevista de no mínimo 85% (THOMAS et al., 2009; WAGHU et al., 2016).

## Alinhamento e Modelagem Molecular

A predição estrutural foi realizado por meio do programa *I-TASSER*, o qual utiliza o banco de dados PDB. Para isso, esse programa busca na biblioteca do *PDB* proteínas molde (*templates*) para projetar a estrutura tridimensional do peptídeo desenhado racionalmente. Em seguida, o *I-TASSER* utiliza simulações de Monte Carlo para encadear regiões alinhadas construídas por *ab initio*. O terceiro passo é a simulação da montagem do peptídeo pelo *SPICKER* onde restrições espaciais serão agrupadas dos modelos do *LOMETS* e *PDB* pelo servidor *TM-align* com posterior orientação das simulações. Desta forma, é possível reduzir choques estéricos na cadeia de aminoácidos. Os modelos finalizados com a estrutura atômica são realizadas por meio do programa *REMO*, o qual traduz particularidades mediante otimização da rede de ligações de hidrogênio (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010; SHEN et al., 2009;).

O peptídeo analisado por meio do *I-TASSER* foi alinhados com dez (10) *templates* de maior significância nos alinhamentos *LOMETS*.

Os parâmetros utilizados são o *C-score*, *TM-score* e o *RMSD*. O *C-score* dizem respeito ao padrão que estima a qualidade dos modelos construídos pelo servidor *I-TASSER*, considerando a importância dos alinhamentos e parâmetros de convergência da estrutura. É considerado significativo quando o valor do *C-score* se encaixa entre -5 e 2, onde quanto maior valor maior a confiança e vice-versa. Quando avalia-se o *TM-Score* propõe-se a mensurar a similaridade estrutural de duas estruturas. Contudo, o *TM-Score* atua em conjunto com o *RMSD*, que é a distância média dos pares de aminoácidos das duas estruturas que é sensível a erros locais, colabora para diminuir erros nos modelos gerados. Valores de *TM-score* >0,5 indicam um modelo topológico preciso, enquanto valores de *TM* <0,17 constituem uma similaridade aleatória (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010; SHEN et al., 2009; ZHANG, 2008). O *RMSD* (*Root Mean Square Deviation*, ou Desvio Médio do Quadrado da Raiz, em português) prevê o desvio médio dos átomos das estruturas alinhadas, do controle e os análogos. De forma que, quanto maior este valor, também será maior a diferença de estrutura entre os peptídeos que estão sendo comparadas (KUFAREVA; ABAGYAN, 2012).

A partir dos dados de referência é possível observar que os modelos gerados respeitam os parâmetros de qualidade do *C-score* quando todos os valores se alojam no espaço de -5 a 2 e o *TM-score* permanece maior que 0,5.

## Validação dos Modelos Tridimensionais

Uma importante etapa no processo de desenho racional é a avaliação das estruturas preditas, e se torna ainda mais relevante quando os modelos desenhados apresentam diferenças quanto à ação (SCHAFFERHANS; KLEBE, 2001). Atualmente, existem programas *on-line* que possibilitam a avaliação dos modelos, tais como: *PROCHECK* e *Aggrescan3D* (DAVY et al., 1993; ZAMBRANO et al., 2018). O objetivo destes programas é avaliar níveis de qualidade e confiabilidade dessas estruturas geradas. Para tanto, buscam avaliar as propriedades da organização estrutural (como regularidade estereoquímica), qualidade do empacotamento de resíduos e a fidelidade do enovelamento em conformidade com o ambiente químico dos resíduos dos peptídeos (HOLTJE, H. D., SIPPL, W., ROGNAN D., & FOLKERS, 2003). Segundo Höltje e colaboradores, é necessário verificar a qualidade estereoquímica das estruturas dos modelos formados e avaliar a formatação de parâmetros como comprimentos de ligações, ângulos no meio de ligações, ângulos torsionais e a quiralidade dos resíduos (HOLTJE, H. D., SIPPL, W., ROGNAN D., & FOLKERS, 2003).

O programa *PROCHECK* foi utilizado para avaliação dos parâmetros estereoquímicos (ângulos torsionais da cadeia principal  $\Phi$  e  $\Psi$ , ângulos torsionais das cadeias laterais, contatos ou impedimentos estéricos), energias das ligações de hidrogênio, planaridade das ligações peptídicas, desvios em relação à geometria tetraédrica dos carbonos- $\alpha$ , dentre outros). Para validar os dados estéricos com qualidade, o programa emite o valor “*G-factor*”, o qual representa qualidade acima de -0,5, abaixo deste valor é considerado “não-usual” e abaixo de -1,0 é considerado “altamente não-usual” (DAVY et al., 1993).

## Estudo em *Docking* (Docagem Molecular)

O peptídeo TsAP-1 foi analisado quanto à sua interação com membranas bacterianas e estabilidade em  $\alpha$ -hélice. Para tanto foi construída uma membrana composta de DPPE e DPPG, para simular a membrana bacteriana. O peptídeo então foi atracado contra a membrana para permitir o contato do ligante ao alvo.

O *Docking Molecular* é um procedimento capaz de prever a melhor forma de interação entre uma molécula e um ligante. O *Docking* foi operacionalizado em duas etapas sendo a primeira a predição da estrutura e posicionamento e orientação do peptídeo com a membrana de acordo com a afinidade da molécula e o segundo com verificação de distâncias de ligação.

Neste trabalho propõe-se uma nova forma de análise da avaliação estatística por meio de média e desvio padrão, ponderando que esses dados, do ponto de vista da energia de maior frequência, tem maior probabilidade de levar a um melhor entendimento da interação receptor/membrana. Para isto foram observados as

cinquenta simulações dos peptídeos com a membrana e observadas as energias de interação mais frequentes em cada simulação.

O *Docking* entre o peptídeo controle TsAP-1 e membrana aniônica (Figura 10) demonstrou média de  $-5,1 \pm 0,7$  kcal/mol e energia mais frequente foi a de  $-5,2$  kcal/mol. Já o *Docking* entre o peptídeo controle e membrana catiônica (Figura 11) demonstrou média de energia livre de  $-3,6 \pm 0,6$  kcal/mol de energia, sendo a energia mais frequente de  $-3,8$  kcal/mol.

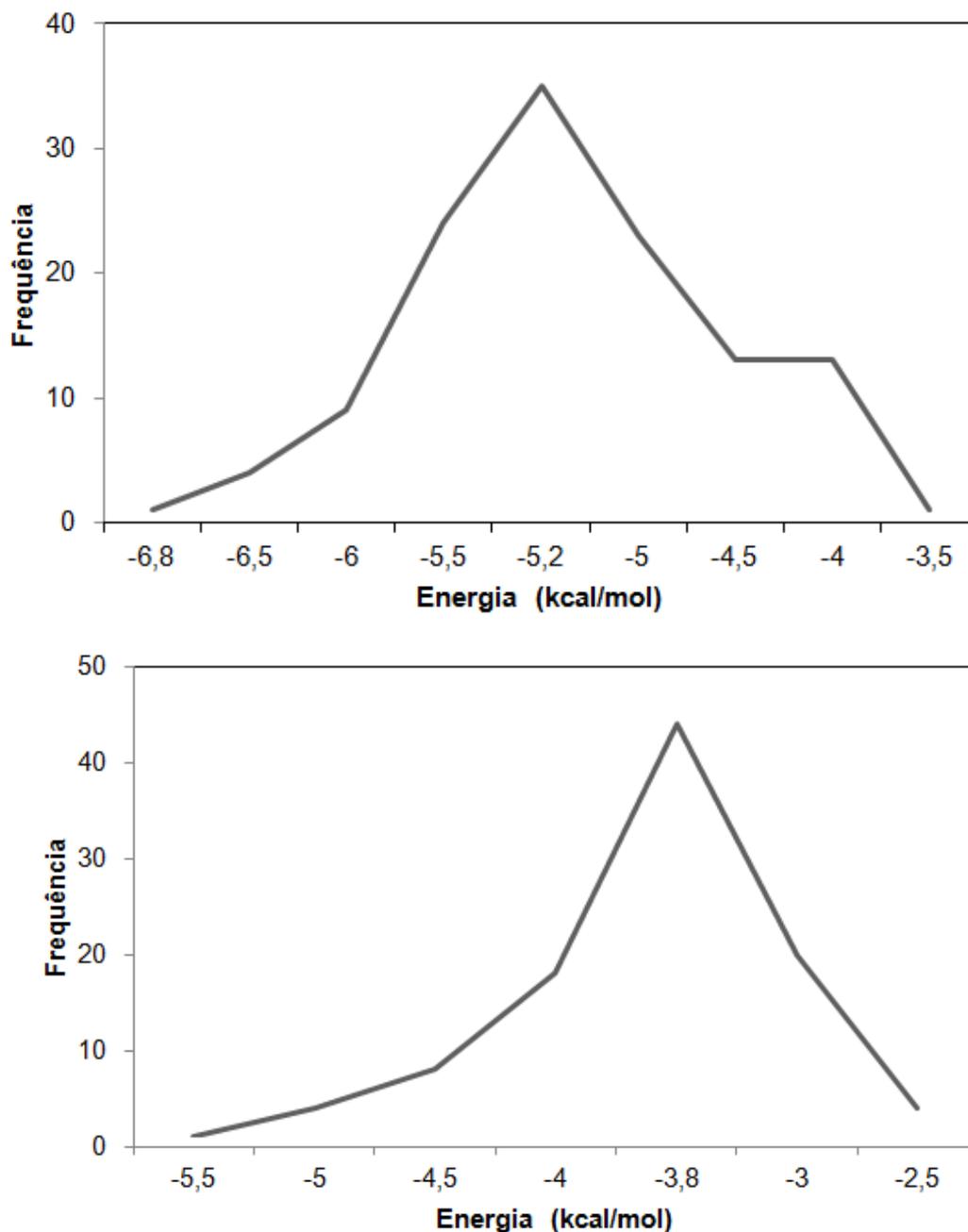


Figura 10- Interação entre o TsAP-1 e a membrana aniônica e catiônica.

A partir destes gráficos que representam os resultados das interações no *Docking*, é demonstrado que o peptídeo TsAP-1 possui afinidade por membranas Gram-positiva

e negativa, como já era esperado. Este peptídeo apresenta alta hidrofobicidade, mesmo possuindo carga líquida baixa para atividade antimicrobiana.

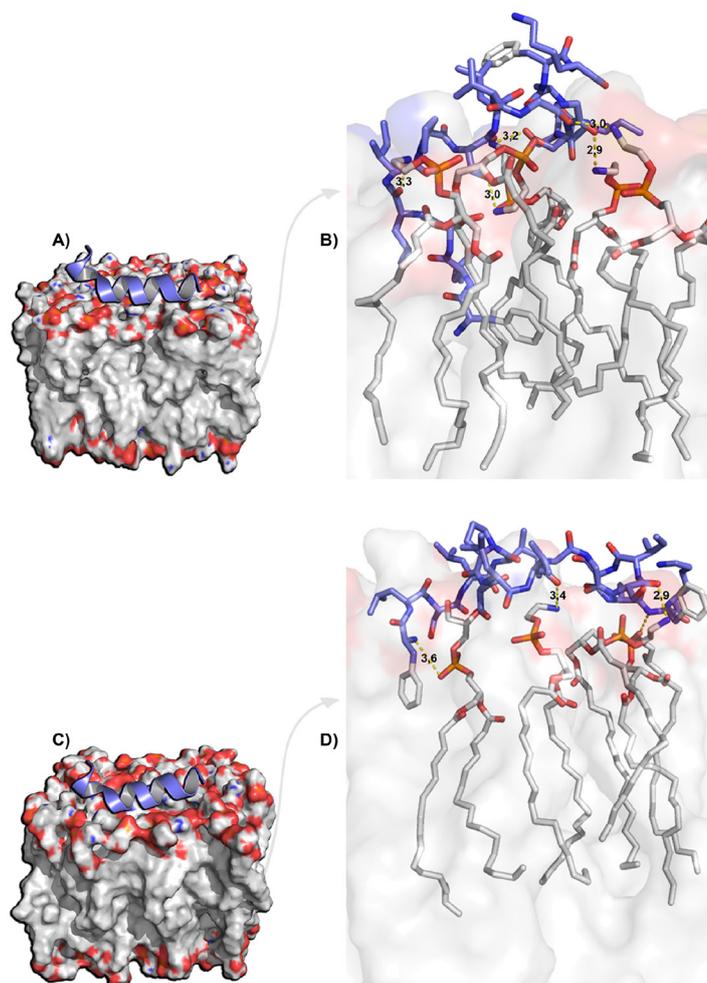


Figura 12 - Interação *in silico* entre TsAP-1 e membranas miméticas aniônicas e catiônicas.

Representação tridimensional teórica das interações do peptídeo com membrana aniônica (A) e das imagens revelando os resíduos de aminoácidos com interações com a membrana por meio da energia de maior frequência (-5,2 kcal/mol) (B). Representação tridimensional teórica das interações do peptídeo com membrana catiônica (C) imagens revelando os resíduos de aminoácidos com interações com a membrana por meio da energia de maior frequência (-3,8 kcal/mol) (D).

Os testes *in silico* apresentados pelo *Docking* apresentam que seu primeiro contato com membranas aniônicas é de ordem eletrostática. Os resíduos hidrofílicos Ser<sup>7</sup> e Ser<sup>14</sup> interagiram com átomos de nitrogênio da cabeça polar dos fosfolipídios (DPPE<sup>2</sup> e DPPE<sup>1</sup>), formando ligações de hidrogênio de distâncias 2,7 e 3,1 Å, respectivamente. Os resíduos apolares Gly<sup>10</sup>, Gly<sup>11</sup> e Leu<sup>4</sup>, realizaram interações de ligações de hidrogênio por meio de seus respectivos oxigênios com os fosfolipídios (DPPE<sup>8</sup>, DPPG<sup>4</sup> e DPPE<sup>7</sup>) com distâncias de 3,0, 3,0 e 3,5 Å, respectivamente, à princípio, a Lys<sup>17</sup> não formou interações neste estudo de *Docking*.

Quando analisa-se a interação entre o TsAP-1 e a membrana mimética catiônica, observa-se que seu primeiro contato foi por meio de uma Phe<sup>1</sup> utilizando nitrogênios (O14) em fosfolipídios (DPPG<sup>5</sup>) com distância de 3,6 Å, respectivamente. Além disso, a

Val<sup>6</sup> e a Ser<sup>12</sup> ligaram-se aos fosfolipídios DPPE<sup>7</sup> e DPPE<sup>6</sup>, por ligações de hidrogênio, em distancias de 3,4 e 2,9 Å, respectivamente. As interações e distancias do *Docking* podem ser visualizadas na Tabela 5.

	Resíduo	Átomo	Distancia (Å)	Fosfolipídio*	Átomo**	Interação
TsAP-1 (G-)	Gly-10	O	3,0	DPPE-8	N	LH
	Gly-11	O	3,0	DPPG-4	N	LH
	Ser-14	O <sub>γ</sub>	3,2	DPPG-1	N	LH
	Ser-7	O <sub>γ</sub>	2,7	DPPE-2	N	LH
	Leu-4	O	3,3	DPPE-7	N	LH

Tabela 5- Avaliação *in silico* das interações entre os peptídeos TsAP-1 e Butylatus-1, 2, 3 e 4 com membrana bacteriana mimética catiônica e aniônica.

Legenda: **LH**: ligações de hidrogênio, **LI**: ligação iônica; N: nitrogênio; O: oxigênio; Arg: arginina; Ala: alanina; Lys: lisina; Val: valina; Ser: serina; Leu: leucina; Phe: fenilalanina; Gly: glicina; Z: átomo da cadeia principal,  $\gamma$ : nome da posição do átomo, H1: átomo da cadeia lateral.

\*Posição do fosfolipídio.

\*\*Átomo do fosfolipídio que fez a interação.

## Síntese dos Peptídeos

O TsAP-1 foi sintetizado pela empresa Aminotech. O peptídeo foi sintetizado para realização dos testes antimicrobianos e hemolítico. A confirmação das purezas e massas moleculares observadas para os peptídeos controle determinada por MALDI-ToF, que apresentara valor experimental de 1736,1. Valor este que corresponde à predição dos programas de bioinformática.

## Bioensaios Com Bactérias

Foram realizados com o objetivo de determinar a ação dos peptídeos desenhados racionalmente e o controle em reduzir o crescimento bacteriano. Os resultados obtidos podem ser observados como apresenta a Tabela 6.

	TsAP-1*	TsAP-1**
<i>E. coli</i>	160	147,5
<i>E. faecalis</i>	160	147,5
Hematócrito	160	147,5

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM) obtida com os peptídeos Butylatus e o controle sintéticos e atividade hemolítica.

Valores em  $\mu$ M

## 4 | CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apartir das análises dos resultados obtidos por meio de métodos de bioinformática, considerando o comportamento físico-químico do peptídeo sintetizado e sua relação com as atividades *in vitro* é possível afirmar que este peptídeo estudado é candidato a futuros produtos antibacterianos, considerando a técnica de bioinformática para prospecção de moléculas antibacterianas.

## REFERÊNCIAS

- ALMAAYTAH, A. et al. **Mauriporin, a novel cationic  $\alpha$ -helical peptide with selective cytotoxic activity against prostate cancer cell lines from the venom of the scorpion androctonus mauritanicus.** *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, v. 19, n. 4, p. 281–293, 2013.
- ALMAAYTAH, A. et al. **Enhanced Antimicrobial Activity of AamAP1-Lysine, a Novel Synthetic Peptide Analog Derived from the Scorpion Venom Peptide AamAP1.** *Pharmaceuticals*, v. 7, n. May 2016, p. 502–516, 2014.
- BARREIRO, E. J. et al. **Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal.** *Química Nova*, v. 20, n. 3, p. 300–310, 1997.
- CALISKAN, F. et al. **Biological assays on the effects of Acra3 peptide from Turkish scorpion *Androctonus crassicauda* venom on a mouse brain tumor cell line (BC3H1) and production of specific monoclonal antibodies.** *Toxicon*, v. 76, p. 350–361, 2013a.
- CALISKAN, F. et al. **Molecular cloning and biochemical characterization of the first Na<sup>+</sup>-channel  $\alpha$ -type toxin peptide (Acra4) from *Androctonus crassicauda* scorpion venom.** *Biochimie*, v. 95, n. 6, p. 1216–1222, 2013b.
- CARDOSO, M. H. et al. **A polyalanine peptide derived from polar fish with anti-infectious activities.** *Scientific Reports*, v. 6, p. 1–15, 2016.
- CARLSSON, J.; BOUKHARTA, L.; AQVIST, J. **Combining docking, molecular dynamics and the linear interaction energy method to predict binding modes and affinities for non-nucleoside inhibitors to HIV-1 reverse transcriptase.** *J Med Chem*, v. 51, n. 9, p. 2648–56, 2008.
- COHEN, N. C. **Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design.** 1st Editio ed. [s.l.] Academic Press, 1996.
- DATHE, M.; WIEPRECHT, T. **Structural features of helical antimicrobial peptides: Their potential to modulate activity on model membranes and biological cells.** *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1462, n. 1–2, p. 71–87, 1999.
- DAVY, P. et al. **AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR.** v. 86, p. 77–89, 1993.
- 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.

DÍAZ, P. et al. **Antibacterial activity of six novel peptides from Tityus discrepans scorpion venom.** A fluorescent probe study of microbial membrane Na<sup>+</sup> permeability changes. *Toxicon*, v. 54, n. 6, p. 802–817, 2009.

DIEGO-GARCÍA, E. et al. **Novel potassium channel blocker venom peptides from Mesobuthus gibbosus (Scorpiones: Buthidae).** *Toxicon*, v. 61, n. 1, p. 72–82, 2013.

DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE. **Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos em números - 2015:** Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos. p. 43, 2016.

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 antica.** *Toxins*, v. 7, n. 2, p. 219–237, 2015.

FALCAO, L. L. et al. **Peptides Antimicrobial properties of two novel peptides derived from Theobroma cacao osmotin.** *Peptides*, v. 79, p. 75–82, 2016.

FAN, Z. et al. **Ctriporin, a new anti-methicillin-resistant Staphylococcus aureus peptide from the venom of the scorpion Chaerilus tricostatus.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, n. 11, p. 5220–5229, 2011.

GAUTIER, R. et al. **HELIQUEST: A web server to screen sequences with specific  $\alpha$ -helical properties.** *Bioinformatics*, v. 24, n. 18, p. 2101–2102, 2008.

GE, Y. et al. **In Vitro Antibacterial Properties of Pexiganan , an Analog of Magainin In Vitro Antibacterial Properties of Pexiganan , an Analog of Magainin.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, n. 4, p. 782–788, 1999.

GESELL, J.; ZASLOFF, M.; OPELLA, S. J. **Two-dimensional <sup>1</sup>H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an alpha-helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution.** *Journal of biomolecular NMR*, v. 9, n. 2, p. 127–35, 1997.

GUO, X. et al. **Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, Tityus serrulatus: Evaluation of their antimicrobial and anticancer activities.** *Biochimie*, v. 95, n. 9, p. 1784–1794, 2013.

GURGEL, T. C.; CARVALHO, W. S. **A Assistência Farmacêutica e o Aumento da Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos.** *Am. J. Pharm*, v. 27, n. 1, p. 118–23, 2008.

HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H.-G. **Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies.** *Nature Biotechnology*, v. 24, n. 12, p. 1551–1557, dez. 2006.

HARRISON, P. L. et al. **Antimicrobial peptides from scorpion venoms.** *Toxicon*, v. 88, n. June, p. 115–137, 2014.

HARRISON, P. L. et al. **Characterisation of three alpha-helical antimicrobial peptides from the venom of Scorpio maurus palmatus.** *Toxicon*, v. 117, p. 30–36, 2016.

HAYES, J. M. et al. **Kinetics, in silico docking, molecular dynamics, and MM-GBSA binding studies on prototype indirubins, KT5720, and staurosporine as phosphorylase kinase ATP-binding site inhibitors: The role of water molecules examined.** *J Med Chem*, v. 51, n. January, p. 703–719, 2018.

HEINEN, T. E. et al. **Effects of Lonomia obliqua caterpillar venom upon the proliferation and**

**viability of cell lines. Cytotechnology**, v. 66, n. 1, p. 63–74, 2014.

HOLTJE, H. D., SIPPL, W., ROGNAN D., & FOLKERS, G. **Introduction to comparative protein modeling. 2003.**

HONG, W. et al. **Inhibitory activity and mechanism of two scorpion venom peptides against herpes simplex virus type 1. Antiviral Research**, v. 102, n. 1, p. 1–10, 2014.

HWANG, I. et al. **Synergistic Effect and Antibiofilm Activity Between the Antimicrobial Peptide Coprisin and Conventional Antibiotics Against Opportunistic Bacteria. Current Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 56–60, 30 jan. 2013.

KING, G. F.; HARDY, M. C. **Spider-Venom Peptides: Structure, Pharmacology, and Potential for Control of Insect Pests. Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 475–496, 2013.

KUFAREVA, Irina; ABAGYAN, Ruben. Methods of protein structure comparison. In: Homology Modeling. Humana Press, 2011. p. 231-257.

LADRAM, A.; NICOLAS, P. Antimicrobial peptides from frog skin: biodiversity and therapeutic promises. *Front. Biosci*, v. 21, p. 1341-1371, 2016.

LEE, J.-K. et al. **Antibacterial Efficacy of a Human  $\beta$ -Defensin-3 Peptide on Multispecies Biofilms. Journal of Endodontics**, v. 39, n. 12, p. 1625–1629, dez. 2013.

MADIGAN, M. T. et al. *Microbiologia de Brock-14<sup>a</sup> Edição*. Artmed Editora, 2016.

MIGLIOLO, L. et al. **Structural and functional evaluation of the palindromic alanine-rich antimicrobial peptide Pa-MAP2. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 7, p. 1488–1498, 2016.

MURPHY, J. B.; KIES, M. W. **Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 45, p. 382–384, 1960.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. **The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, 2011.

OLIVEIRA, D. M. DE; LACERDA, A. F. **Peptídeos antimicrobianos: biotecnologia aplicada a saúde. Revista de Saúde da Fiaciplac**, v. 1, n. 1, p. 31–45, 2014.

PEDRON, C. N. et al. **Novel designed VmCT1 analogs with increased antimicrobial activity. European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 126, p. 456–463, 2017.

PEREIRA, M. S. et al. **A infecção hospitalar e suas implicações para o cuidar da enfermagem. Texto contexto enferm**, v. 14, n. 2, p. 250–257, 2005.

PERUMAL SAMY, R. et al. **Animal venoms as antimicrobial agents.**

POWERS, J. P. S.; HANCOCK, R. E. W. **The relationship between peptide structure and antibacterial activity. Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1681–1691, 2003.

QUINTERO-HERNÁNDEZ, V. et al. **Scorpion venom components that affect ion-channels function. Toxicon**, v. 76, n. July 2013, p. 328–342, 2013.

RAMÍREZ-CARRETO, S. et al. **Gene cloning and functional characterization of four novel antimicrobial-like peptides from scorpions of the family Vaejovidae. Peptides**, v. 34, n. 2, p. 290–295, 2012.

- RATES, B. et al. **Tityus serrulatus venom peptidomics: Assessing venom peptide diversity.** *Toxicon*, v. 52, n. 5, p. 611–618, 2008.
- ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: **A unified platform for automated protein structure and function prediction.** *Nature Protocols*, v. 5, n. 4, p. 725–738, 2010.
- ROZEK, A. et al. **Structure-Based Design of an Indolicidin Peptide Analogue with Increased Protease Stability.** *Biochemistry*, v. 42, n. 48, p. 14130–14138, 2003.
- SADREDINAMIN, M. et al. **Antimicrobial Peptides (AMPs).** *Novelty in Biomedicine*, v. 4, p. 70–76, 2016.
- SAROJINI, V. **Peptides: From Emil Fischer to Psa.** *Chemistry in New Zealand*, v. 1142, n. July, p. 79–86, 2013.
- SCHAFFERHANS, A.; KLEBE, G. **Docking ligands onto binding site representations derived from proteins built by homology modelling.** *Journal of Molecular Biology*, v. 307, n. 1, p. 407–427, 2001.
- SEO, M.-D. et al. **Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review.** *Molecules*, v. 17, n. 12, p. 12276–12286, 2012.
- SHEN, Y. et al. **TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts.** *Journal of biomolecular NMR*, v. 44, n. 4, p. 213–23, 23 ago. 2009.
- SIEVERS, F. et al. **Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega.** *Molecular Systems Biology*, v. 7, n. 539, 2011.
- TARAZI, S. **Scorpion venom as antimicrobial peptides (AMPs): A review article.** *The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents*, p. 1–9, 2015.
- THOMAS, S. et al. **CAMP: A useful resource for research on antimicrobial peptides.** *Nucleic Acids Research*, v. 38, n. SUPPL.1, p. 774–780, 2009.
- USACHEV, K. S. et al. **High-resolution NMR structure of the antimicrobial peptide protegrin-2 in the presence of DPC micelles.** *Journal of Biomolecular NMR*, v. 61, n. 3–4, p. 227–234, 2015.
- VALDEZ-VELÁZQUEZ, L. L. et al. **Mass Fingerprinting of the Venom and Transcriptome of Venom Gland of Scorpion *Centruroides tecomanus*.** *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, 2013.
- VAN HOEK, M. L. **Antimicrobial peptides in reptiles.** *Pharmaceuticals*, v. 7, n. 6, p. 723–753, 2014.
- VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular.**
- VIANNA, J. S. et al. **Drug Resistance in *Helicobacter Pylori*.** *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 53, n. 4, p. 215–223, 2016.
- VRIENS, K. et al. **Synergistic Activity of the Plant Defensin HsAFP1 and Caspofungin against *Candida albicans* Biofilms and Planktonic Cultures.** *PLOS ONE*, v. 10, n. 8, p. e0132701, 6 ago. 2015.
- WAGHU, F. H. et al. **CAMPR3: A database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides.** *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. D1, p. D1094–D1097, 2016.
- WANG, G. **Database-guided discovery of potent peptides to combat HIV-1 or superbugs.**

**Pharmaceuticals**, v. 6, n. 6, p. 728–758, 2013.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. **ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins**. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. SUPPL.2, p. 407–410, 2007.

XU, X. et al. **Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Mesobuthus martensii***. *Journal of Proteomics*, v. 106, p. 162–180, 2014.

YEAMAN, M. R. **Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance**. *Pharmacological Reviews*, v. 55, n. 1, p. 27–55, 2003.

YUAN, W. et al. **Cloning and functional characterization of a new antimicrobial peptide gene StCT1 from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus***. *Peptides*, v. 31, n. 1, p. 22–26, 2010.

ZAMBRANO, R. et al. **AGGRESCAN3D ( A3D ): server for prediction of aggregation properties of protein structures**. v. 43, n. April 2015, p. 306–313, 2018.

ZENG, X. C. et al. **Three new antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus imperator***. *Peptides*, v. 45, p. 28–34, 2013.

ZHANG, Y. **I-TASSER server for protein 3D structure prediction**. *BMC Bioinformatics*, v. 9, p. 1–8, 2008.

## AVALIAÇÃO E SELEÇÃO *IN SILICO* DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS BIOINSPIRADOS NA L-AMINOÁCIDO OXIDASE DA SERPENTE

*Bothrops jararacussu*

### **Odaias Pereira de Almeida Filho**

Universidade Católica Dom Bosco (UCDB)  
Laboratório S-Inova Biotec

### **Breno Emanuel Farias Frihling**

Universidade Católica Dom Bosco (UCDB)  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia -  
Mato Grosso do Sul

### **Michel Ângelo Constantino de Oliveira**

Universidade Católica Dom Bosco (UCDB),  
Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento  
Local- Mato Grosso do Sul

### **Gilberto Astolfi**

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
(UFMS), Instituto Federal de educação ciência e  
tecnologia de Mato Grosso do Sul (IFMS). Pós-  
Graduação em Ciências da Computação- UFMS/  
UFG-PPGCC-UFG- Mato Grosso do Sul

### **Hemerson Pistori**

Inovisão Universidade Católica Dom Bosco  
(UCDB) e Universidade Federal de Mato Grosso  
do Sul (UFMS)- Mato Grosso do Sul

### **Ludovico Migliolo**

Universidade Católica Dom Bosco (UCDB)  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia -  
Mato Grosso do Sul

**RESUMO:** As infecções bacterianas são um problema em escala global, causando grande alarde. Devido a diversos fatores como o uso indiscriminado de antibióticos bactérias cada vez mais se tornam resistentes. Graças

ao avanço tecnocientífico, hoje por meio da bioinformática estrutural é possível estudar os peptídeos antibacterianos (PAM) que podem ser a chave para combater microrganismos. Desenho racional vem para melhorar o potencial antibacteriano de moléculas diminuindo os efeitos adversos. Visando a resolução da problemática o trabalho tem como objetivo principal desenhar racionalmente novos peptídeos análogos à L-aminooxidase (LAO) da serpente *Bothrops jararacussu*, ligando atributos físico-químicos à atividade antimicrobiana. Com base nos peptídeos antimicrobianos depositados no *Protein Data Bank*, um padrão físico-químico foi identificado pelo programa *Antimicrobial Pattern Prediction* desenvolvido pelos autores. As sequências primárias analisadas levando em consideração as características de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade. A sequência primária foi avaliada pelo programa CAMPr3 para predição da atividade antibacteriana, o padrão encontrado teve sua conformação em hélice predita pelo *Helical Wheels Projections*. A LAO escolhida possui código 4E0V (PDB). O padrão encontrado foi “HHHKHHK” sendo “H” hidrofóbico e “K” hidrofílico. Esse se repetiu nove vezes na molécula alvo de estudo e todas foram analisadas de acordo com a carga e hidrofobicidade onde somente duas sequências foram identificadas e nomeadas 4E0V\_E e 4E0V\_G. Portanto as sequências encontradas

no estudo *in silico* podem ser candidatos antimicrobianos alternativos, entretanto é preciso a realização de mais experimentos *in vitro* para a confirmação dos resultados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Desenho racional, antibacteriano, *Bothrops*

**ABSTRACT:** Bacterial infections are a problem on a global scale, causing great fanfare. Due to various factors like the indiscriminate use of antibiotics bacteria increasingly become resistant. Thanks to the techno-scientific advance, today through structural bioinformatics it is possible to study the antibacterial peptides (PAM) that can be the key to fight microorganisms. Rational design comes to improve the antibacterial potential of molecules by decreasing adverse effects. Aiming at solving the problem, the main objective of this work is the rational design of new peptides analogous to the L-aminooxidase (LAO) of the snake *Bothrops jararacussu*, linking physicochemical attributes to antimicrobial activity. Based on the antimicrobial peptides deposited in the Protein Data Bank, a physicochemical pattern was identified by the Antimicrobial Pattern Prediction program developed by the authors. The primary sequences analyzed taking into account the characteristics of hydrophobicity and hydrophilicity. The primary sequence was evaluated by the CAMPr3 program for prediction of antibacterial activity, the pattern found had its helix conformation predicted by Helical Wheels Projections. The chosen LAO has code 4E0V (PDB). The standard found was “HHKHKK” with hydrophobic “H” and hydrophilic “K”. This was repeated nine times in the target molecule of study and all were analyzed according to the charge and hydrophobicity where only two sequences were identified and named 4E0V\_E and 4E0V\_G. Therefore the sequences found in the *in silico* study may be alternative antimicrobial candidates, but more *in vitro* experiments are necessary to confirm the results.

**KEYWORDS:** Rational design, antibacterial, *Bothrops*

## 1 | INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de gerações de microrganismos resistentes aos antibióticos e sua distribuição em populações microbianas em toda a biosfera são os resultados de muitos anos de seleção ininterrupta pressão das aplicações humanas de antibióticos, via subutilização, uso excessivo e uso indevido. Este não é um processo natural, mas uma situação sobreposta à natureza (Davies; Davies, 2010).

A capacidade dos microrganismos a se adaptar e a resistência aos antibióticos torna cada vez mais difícil o tratamento por infecções bacterianas (Vianna 2016). A própria manipulação de amostras no laboratório clínico e a rotina laboratorial pode favorecer aos mecanismos de resistência bacteriana (Vásquez-Giraldo; Libreros-Zúñiga; Crespo- Ortiz, 2017).

A maioria das agências internacionais, nacionais e locais reconhece a gravidade do problema. Muitas resoluções e recomendações foram propostos, e numerosos relatórios foram escritos, mas sem sucesso: o desenvolvimento de resistência a antibióticos é implacável (Davies; Davies, 2010). O aumento das taxas de resistência

significa que, perante uma infeção provocada por um determinado microrganismo, é maior a probabilidade desse microrganismo ser resistente aos antibióticos habitualmente utilizados, sendo a infeção apenas tratável por fármacos de mais largo espetro, por sua vez com maior potencial gerador de resistências (Direção Geral da Saúde, 2017).

Tratando-se de um processo de ocorrência expectável e natural, a seleção de cepas resistentes tem sido potenciada pela utilização frequentemente inapropriada dos antimicrobianos (Direção Geral da Saúde, 2017). O problema das resistências aos antibióticos não é sequer exclusivo da saúde humana, estendendo-se a todas as áreas onde se utilizam antibióticos, como a pecuária e a saúde animal. Esse fator levou a OMS a definir o conceito de *one health* (Direção Geral da Saúde, 2017). Sem antibióticos eficazes, diversos campos da medicina serão severamente prejudicados, incluindo a cirurgia, o cuidado de bebês prematuros, a quimioterapia para o câncer, o cuidado do paciente crítico e a medicina do transplante (Robert, J Guidos, 2011).

Nos últimos anos, o surgimento de patógenos resistentes a medicamentos tem provocado a necessidade de desenvolver novos antibióticos (Aoki; Ueda, 2013). A perda de antibióticos eficazes resultará em um grande aumento na morbidade e mortalidade por infeções. A resistência antimicrobiana é uma tremenda preocupação Organização Mundial de Saúde. (Robert; J Guidos, 2011).

Segundo previsão internacional no que se refere a mortes atribuíveis às RAM quando comparadas com outras causas de morte, estima-se que se estas não forem controladas até 2050, mais 10 milhões de pessoas poderão morrer todos os anos (Direção Geral da Saúde, 2017). É necessário fazer um uso racional antibióticos, reduzir a prevalência de infeções bacterianas (Direção Geral da Saúde, 2017).

O mecanismo de resistência bacteriana levou a uma grande emergência médica fazendo com que as ciências da saúde explorassem meios alternativos para combater esses patógenos (Mookherjee; Hancock., 2007). O desenvolvimento de novas ferramentas bioativas como drogas peptídicas podem ser a chave para retardar a tendência à resistência antimicrobiana (Migliolo et al., 2016). Essas drogas peptídicas podem possuem propriedades farmacocinéticas ideais (Aoki; Ueda, 2010).

Para o uso dessas drogas é preciso aprofundar o conhecimento na estrutura-função e a interação peptídeo-alvo levando a construção de drogas peptídicas que sejam mais eficazes e seguras e que possam atuar com maior afinidade contra suas células- alvo (Migliolo., 2016). Observando também os parâmetros físicos químicos que parecem ser a chave para deixá-los mais eficazes (Ferreita et al., 2017).

## 2 | JUSTIFICATIVA

Devido a inúmeros fatores a resistência microbiana está alcançando níveis inimagináveis levando a uma grande emergência médica. Muito é discutido e

abordado tentando melhorar o panorama, mas a situação é delicada, por exemplo os fármacos presentes no mercado não são capazes de resolver esse problema. Além disso, o processo para lançar um novo fármaco é demorado e extremamente caro, o planejamento racional de fármacos levando em conta a sua estrutura e o seu mecanismo de ação é uma estratégia promissora e com um custo menor que pode ser uma maneira de ajudar a resolver o problema da resistência antimicrobiana.

### 3 | OBJETIVO

#### 3.1 Geral

O trabalho em questão tem como objetivo principal desenhar racionalmente novos peptídeos análogos bioinspirados na enzima L-aminoácido oxidase de uma serpente pertencente ao gênero *Bothrops*, correlacionando os atributos físico-químicos com padrões de repetição antimicrobiana.

#### 3.2 Específico

Realizar a modelagem computacional de peptídeos derivados de uma L-aminoácido oxidase de serpente pertencente ao gênero *Bothrops*;

Compreender características físico-químicas conformacionais dos peptídeos desenhados racionalmente;

Predizer a conformação molecular por meio de programas computacionais;

### 4 | METODOLOGIA

#### 4.1 Triagem de Sequência Modelo

Foi realizada uma pesquisa de sequências primárias de peptídeos naturais e sintéticos derivados de serpentes utilizando as palavras chaves L-amino acidoxidase (LAO), *Bothrops*, protein no banco de dados Protein Database (PDB, <https://www.rcsb.org/>). Após o processo foi procurado na sequência alvo de estudo um padrão predito pelo software hydrophobia prediction (APP).

#### 4.2 Avaliação In Silico das Atividades Antimicrobianas

Uma vez encontradas as sequências alvo do estudo foram analisadas as suas propriedades físico-químicas tais como hidrofobicidade, carga líquida, média de hidrofobicidade (GRAVY) determinadas por meio da predição do *Antimicrobial Peptide Database* (APD, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Para prever a atividade

antimicrobiana, foi utilizado o servidor CAMPR3 (Waghu et al., 2016) o qual utiliza banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *UniProtKB* e PDB. Para a predição da conformação em  $\alpha$ -hélice foi usado o servidor online Helical wheels projections (<http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>).

### 4.3 Modelagem Molecular

Os modelos tridimensionais teóricos foram construídos por meio do software I-tasser e visualizados por meio da ferramenta pymol.

## 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Triagem de Sequência Modelo

Após a pesquisa de sequências no Protein Database (PDB) com as palavras chaves “LAO e *Bothrops*” foi encontrada uma sequência que possui 497 resíduos aminoácidos pdb: (4E0V), essa molécula foi purificada e caracteriza estruturalmente com intuito de correlacionar sua estrutura com suas propriedades toxicológicas, a molécula apresentou atividade catalítica para aminoácidos alifáticos com cadeia lateral grande como L-Metionina, L-Leucina.

Após a caracterização de hidrofobicidade e hidrofiliidade foi encontrado o padrão (HHHKHHK) pelo *Antimicrobial Pattern Prediction* em que “H” se refere a um resíduo hidrofóbico e “K” se refere a um resíduo hidrofílico, o padrão se repetiu nove vezes na sequência escolhida (Figura 2).

### 5.2 Desenho Racional

O padrão escolhido repetiu-se nove vezes na sequência escolhida, cada um desses sete peptídeos possuía sete resíduos de aminoácido. Para criação de um AMP é importante determinar as suas características como carga e hidrofobicidade (Migliolo et al, 2016) (tabela 1), esses parâmetros são importantes para predizer aspectos relacionados à performance dos peptídeos.

Análise computacional	>4EOV_A	>4EOV_B	>4EOV_C	>4EOV_D	>4EOV_E	>4EOV_F	>4EOV_G	>4EOV_H	>4EOV_I
Sequência	MFSKPGK	TVLEASE	GQVKTYR	GPMRLPE	YFIKNIR	SLQKAVE	LNARVIK	TTSRAAR	SGPEGLD
Resíduos	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Carga	+2	-2	+2	0	+2	0	+2	+2	-2
Hidrofobicidade	28%	42%	14%	28%	42%	42%	57%	28%	14%
Gravy	-0.842	0.185	-1.442	-0.842	-0.2	-0.271	0.342	-1.085	-0.914
SVM	0.985	0.263	0.483	0.174	0.551	0.000	0.128	0.000	0.040
RF	0.4155	0.513	0.4385	0.543	0.385	0.355	0.453	0.413	0.46
AD	0.687	0.000	0.010	0.001	0.429	0.000	0.276	0.011	0.000
AMN	AMP	NAMP	AMP	NAMP	AMP	NAMP	AMP	NAMP	NAMP
Massa Teórica	793.978	747.802	850.97	798.964	953.15	773.882	813.009	761.837	673.679

Tabela 1 - Comparação entre as sequências dos peptídeos estudados. Peptídeo 4EOV\_A, 4EOV\_B, 4EOV\_C, 4EOV\_D, 4EOV\_E, 4EOV\_F, 4EOV\_G, 4EOV\_H e 4EOV\_I destacando propriedades físico-químicas e predição das probabilidades para antimicrobianos por meio de análises: Máquina de vetores de suporte (SVM), *Random Forest* (RF), análise discriminante (DA) e rede neural artificial (ANN).

Estudos demonstram que peptídeos para se apresentarem de maneira estáveis devem apresentar carga entre +2 à +5 e um grau de hidrofobicidade por volta de 40% a alta hidrofobicidade faz com que os peptídeos possam perder sua conformação helicoidal uma vez que resíduos hidrofóbicos tendem a se proteger a água (Bersch-Ferreira et al, 2017).

Análise computacional	>4EOV_E	>4EOV_G
Sequência	YFIKNIR	LNARVIK
Resíduos	7	7
Carga	+2	+2
Hidrofobicidade	42%	57%
Gravy	-0.2	0.342
SVM	0.551	0.128
RF	0.385	0.453
AD	0.429	0.276
AMN	AMP	AMP
Massa Teórica	953.15	813.009

Tabela 2 - Comparação entre as sequências dos peptídeos estudados. Peptídeo 4EOV\_E, 4EOV\_G destacando propriedades físico-químicas e predição das probabilidades para antimicrobianos por meio de análises: Máquina de vetores de suporte (SVM), *Random Forest* (RF), análise discriminante (DA) e rede neural artificial (ANN).

Observando a carga, hidrofobicidade, Gravy (grau de apatia) e massa molecular elegeu-se dois peptídeos que possam vir a ter potencial antimicrobianos são eles o 4EOV\_E e o 4EOV\_G (Tabela 2). Uma vez escolhidas as sequências alvo do estudo é preciso visualiza-las no modelo tridimensional da proteína (Figura 1) para predizer qual será a conformação das sequencias escolhidas.

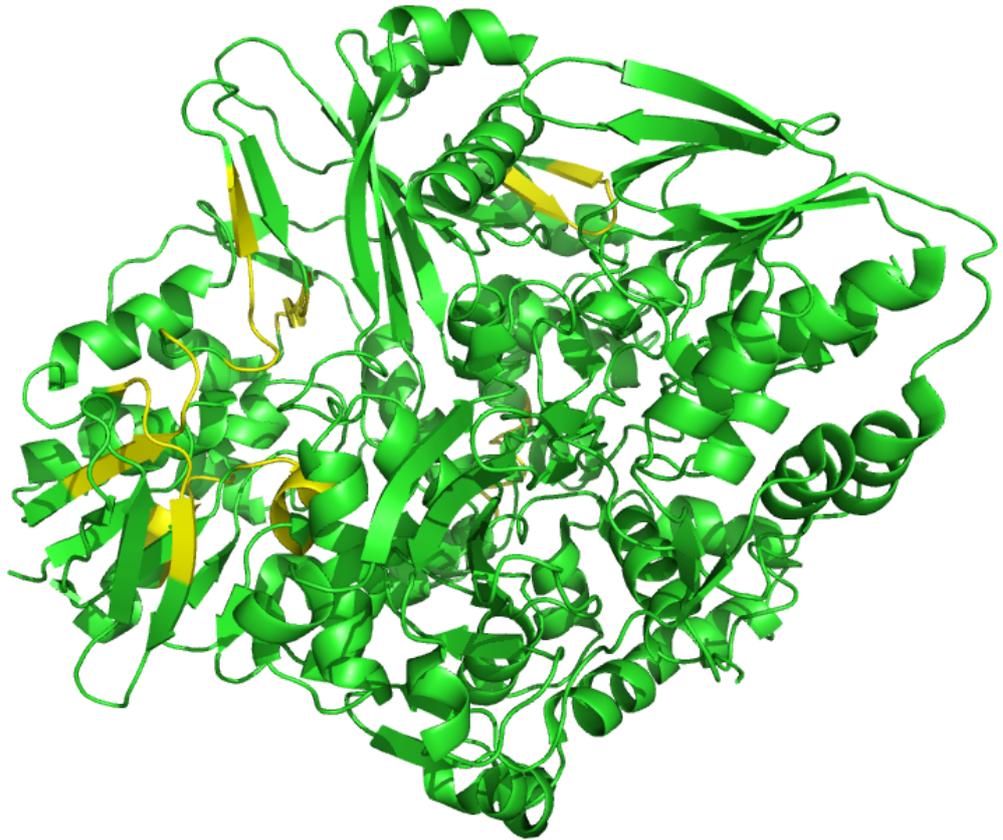


Figura 1. Estrutura tridimensional da enzima LAO(4E0V) em destaques amarelo regiões detectadas pelo programa APP de acordo com os padrões visualizados para antimicrobianos.

Um dado de demasiada importância para o processo é a visualização do diagrama em hélice que fornece como seria a estrutura em hélice da molécula, devido a esse motivo os peptídeos que foram elegidos tiveram sua estrutura em hélice predita (figura 2).

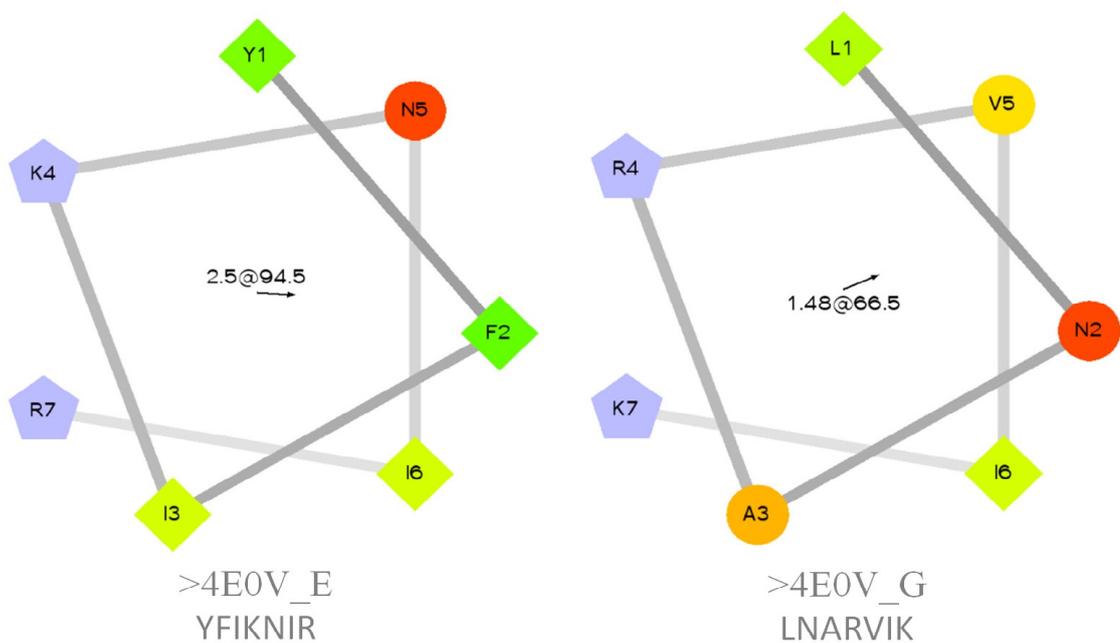


Figura 2. Diagrama em hélice dos peptídeos candidatos selecionados, em verde aminoácidos

aromáticos, em vermelho polares não carregados, em laranja apolares os aminoácidos e em azul os aminoácidos hidrofílicos.

### 5.3 Modelagem Molecular

A visualização dos modelos tridimensionais foi realizada pelo programa Pymol. Primeiramente foi selecionada a região da proteína em que se tinha a sequência escolhida e marcada pela coloração amarela, após isso essa sequência de resíduos de aminoácidos foi isolada da proteína (figuras 3).

Em um primeiro momento o peptídeo estudado apresenta uma estrutura estendida, quando o peptídeo estiver interagindo com a bicamada fosfolipídica de microrganismos esse pode ter sua conformação alterada (Yan et al., 2017). As sequências escolhidas para o projeto possuem dois aminoácidos hidrofílicos em sua composição, que podem ser capazes de alterar a conformação do peptídeo pois irão interagir com a parte interna da membrana fosfolipídica. Ademais, as distribuições desses aminoácidos influenciam diretamente na citotoxicidade das sequências, peptídeos que possuem alta hidrofobicidade tendem a ser mais citotóxico (Kumagai et al, 2019).

O mecanismo de ação dos peptídeos funciona dividido em três passos, o primeiro é o de aproximação com a membrana devido a suas características eletroestáticas a molécula se sente atraída pela polaridade da membrana, o segundo é a passagem do peptídeo pelos polissacarídeos e o acesso a membrana citoplasmática, o terceiro e último é de inserção e permeabilização em que de fato é possível visualizar o mecanismo de ação do peptídeo alvo do estudo (Irazazabal; Franco; Ladram, 2016) um peptídeo que possui a estrutura tridimensional apresentada pode alterar sua conformação ao interagir com a membrana citoplasmática do microrganismo podendo provocar sua lise, pode também interagir com proteínas transmembranas e poros da membrana.



Figura 3. Em verde estrutura tridimensional da enzima LAO (4E0V) com ênfase nas regiões em folha- $\beta$  (amarelo) as quais foram usadas para o desenho racional dos peptídeos 4E0V\_E e

Um aspecto que é de demasiada importância na sequência peptídica é a análise isolada dos aminoácidos, aminoácidos polares não carregados como asparagina podem alterar a entalpia da membrana fosfolipídica, mais especificamente dos lipídios do grupo inicial o que leva a uma desestabilização da membrana. A interação de aminoácidos carregados positivamente e lipídeos carregados negativamente pode favorecer a formação de domínios lipídicos e poros na membrana, dessa maneira a estrutura pode se desestabilizar levando ao seu colapso (Olivia et al, 2019).

## 6 | CONCLUSÃO

Os padrões encontrados *in silico* demonstraram que os peptídeos desenhados racionalmente apresentaram as características físico-químicas necessárias sugerindo potenciais candidatos antibacterianos. Entretanto é necessário a realização de experimentos *in vitro* para comprovar o melhoramento das moléculas desenvolvidas.

## REFERÊNCIAS

AOKI, W.; UEDA, M. **Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics**. *Pharmaceuticals*, v. 6, n. 8, p. 1055–1081, 21 ago. 2013.

BERSCH-FERREIRA, Â. C. et al. **Association between polyunsaturated fatty acids and inflammatory markers in patients in secondary prevention of cardiovascular disease**. *Nutrition*. São- Paulo, v. 37, n. 1 p. 30- 36, maio/2017.

DO REGO, F. O. R. **Análise in silico de proteínas: modelo baseado na apolipoproteína-e relacionada à doença de Alzheimer**. 2012. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso- Universidade Federal da Bahia, Brasil, 2012.

GAUTIER, R. et al. **HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific ahelical properties**. *Bioinformatics*, v. 24, n. 18, p. 2101–2102, 2008.

IRAZAZABAL, I. L. **Avaliação estrutural e funcional de novos peptídeos antimicrobianos obtidos a partir de desenho racional**. 2016. 101f. Dissertação de Doutorado- Universidade de Brasília, Brasil, 2016.

KUMAGAI, A. et al. **Elastic behavior of model membranes with antimicrobial peptides depends on lipid specificity and d-enantiomers**. *Soft matter*, Reino Unido, v. 1, n. 1, p.1–16, 2019.

MIGLIOLO, L. et al. **Structural and functional evaluation of the palindromic alanine-rich antimicrobial peptide Pa-MAP2**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1858, n. 7, p. 1488–1498, 2016.

Ministério da Saúde. **Programa de Prevenção e Controle de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos**, v. 1, n. 1, p. 24, dezembro/2017.

MOL, A. R.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. **NETWHEELS: A Web Application To Create High Quality Peptide Helical Wheel And Net Projections**. *Biorxiv*, P. 416347, 2018.

MOOKHERJEE, N.; HANCOCK, R. E. W. **Cationic host defence peptides: Innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections.** Cellular and Molecular Life Sciences, v. 64, n. 7–8, p. 922–933, 19 abr. 2007.

MORRIS, A. L. et al. **Stereochemical quality of protein structure coordinates.** Proteins: Structure, function, bioinformatics. British, v. 12, n. 4, p. 345-364, abril/1992.

OLIVIA, R. et al. **Membrane disintegration by the antimicrobial peptide (P)GKY20: lipid segregation and domain formation.** Physical chemistry chemical physics,

ROBERT, J GUIDOS. **Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives.** Oxford Journals. British, v. 52, n. 5, p. 397- 428, maio/2011

RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. **Stereochemistry of polypeptide chain configurations.** Journal of molecular biology, v. 7, n. 1, p. 95–99, 1963.

SOUZA, C.S. **Uma guerra quase perdida.** Rev. Ciên. Hoje, v.23, p.27-35, 1998.

ULLAH, A. et al. Structural insights into selectivity and cofactor binding in snake venom L-amino acid oxidases. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** Brazil,v. 421 ,n. 1 ,p. 124-128, abril/2012

Wang, Z. and Wang, G. **APD: the antimicrobial peptide database.** Nucleic Acids Research 32, p D590-D592. 2004.

YAN, A. et al. **Molecular Dynamics Simulations of a Conformationally Mobile Peptide-Based Catalyst for Atroposelective Bromination.** ACS Catalysis. Estados Unidos,v. 8 ,n. 11 ,p. 1-24.

YANG, J. et al. **The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction.** Nature methods, v. 12, n. 1, p. 7–8, 2015.

Zambrano, R., et al, Jamroz, M., **AGGRESCAN3D ( A3D ): server for prediction of aggregation properties of protein structures** 43, 306–313, 2018.

## ESTUDO DA NEUTRALIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO VENENO DA SERPENTE

*Bothrops erythromelas*

### **Ellynes Amancio Correia Nunes**

Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biologia Molecular João Pessoa, Paraíba

### **Renner de Souza Leite**

Universidade Federal de Campina Grande, Unidade Acadêmica de Saúde do Centro de Educação e Saúde Cuité, Paraíba

### **Álison Emmanuel Franco Alves**

Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biologia Molecular João Pessoa, Paraíba

### **Ludovico Migliolo**

Universidade Católica Dom Bosco Campo Grande, Mato Grosso do Sul

### **Karla Patrícia de Oliveira Luna**

Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde Campina Grande, Paraíba

**RESUMO:** Ofidismo é um problema de saúde pública negligenciada mundialmente, que vitima aproximadamente 2,5 milhões de pessoas por ano, envolvendo 125 mil mortes. O gênero *Bothrops* é responsável por 87% dos envenenamentos registrados no Brasil. Sendo a espécie endêmica do Nordeste brasileiro a *Bothrops erythromelas*, responsável pelo maior número de acidentes registrados na Paraíba. O veneno botrópico induz hemorragias, coagulopatia, edema, necrose podendo levar à morte e/ou incapacidade permanente. Uma

vez que pouco se sabe a respeito de isotipos e especificidade de anticorpos produzidos por pacientes envenenados por serpentes da espécie *B. erythromelas*, objetivou-se avaliar o veneno desta serpente, frente ao reconhecimento entre moléculas e anticorpos presentes no soro de indivíduos envenenados, e frente aos soros comerciais brasileiros. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 12,5%, para avaliação da neutralização do veneno em vítimas tratadas com soro antiofídico, posteriormente utilizou-se o método de *Western blotting* para observar se haveria reatividade cruzada entre venenos de diferentes gêneros, e por fim, se analisou a neutralização *in vitro* do veneno frente ao soro antiofídico comercial brasileiro gênero específico. Observou-se que bandas de 29 a 31 KDa não são bem neutralizadas mesmo após a soroterapia em pacientes envenenados por *B. erythromelas*. Não ocorreu reação cruzada entre o veneno da referida serpente e o veneno de espécies pertencentes aos gêneros *Crotalus* e *Philodryas*. Ademais, o soro comercial não foi capaz de neutralizar algumas bandas presentes no veneno, entre elas as de 29 a 31 KDa, como foi confirmado no ensaio de neutralização *in vitro*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Envenenamento; Ofidismo; Soro comercial.

**ABSTRACT:** Snakebites is a neglected public health problem worldwide, it victims approximately 2.5 millions of people by year which gives 125 thousands death. Bothrops genus is responsible for 87% of the envenoming in Brazil. The endemic specie in the Northeast Brazil is the *Bothrops erythromelas*. The venom induces local hemorrhage, coagulopathy, edema, necrosis and can lead to permanent disability or death. There are limited studies about isotypes and specificity of antibodies produced by envenomed patients by *B. erythromelas*. The aim of this study is to evaluate this snake venom against the recognition between molecules and antibodies presents in the serum of envenomed individuals by other snake genus compared to Brazilian commercial serum. The proteins were separated in polyacrylamide gel for rating the neutralization of the venom in treated patients with the antivenom serum. Following was used the Western Blotting method to observe if there was cross reactivity between venoms of different genus. Lastly, the “*in vitro*” neutralization of the venom against the Brazilian commercial serum was analyzed. It has been observed that the fragments of 29 and 31 KDa are not well neutralized even after the treatment in patients envenomed by *B. erythromelas*. There was no cross-reaction between the venom of this snake and the venom of species belonging to the genus *Crotalus* and *Philodryas*. In addition, the commercial serum was not able to neutralize some of the fragments present in the venom, among them those fragments of 29 and 31 KDa, as confirmed at the *in vitro* neutralization test.

**KEYWORDS:** Envenom; Snakebites; Commercial Serum.

## 1 | INTRODUÇÃO

Acidentes com serpentes são um problema de saúde pública negligenciado que vitimam cerca de 2.500.000 pessoas com 125 mil mortes anualmente, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (ALBUQUERQUE, 2013). No Brasil ocorrem aproximadamente 26.112 casos notificados por ano com uma letalidade de cerca de 6,95% (BRASIL, 2017).

Os venenos ofídicos contêm uma grande variedade de componente, cujo papel preliminar é agir para imobilizar a presa. Cerca de 90% do peso seco das peçonhas das serpentes são compostas por proteínas, principalmente as enzimáticas (serino proteinases, metaloproteases, L-aminoácido oxidase, fosfolipases) e proteínas sem atividade enzimática (desintegrinas, lectinas de tipo C, peptídeos natriuréticos). A parte não proteica compreende ânions e cátions inorgânicos, lipídeos, carboidratos, pequenos peptídeos e aminoácidos (CARDOSO, 2003; JENNINGS et al, 2005; GUTIÉRREZ, 2009a).

O gênero *Bothrops* e *Bothriopsis* são responsáveis por 87% dos envenenamentos notificados no Brasil (BRASIL, 2016). No domínio caatinga, a espécie endêmica é *Bothrops erythromelas* (AMARAL, 1923), conhecida localmente como jararaca-da-seca, jararaca malha de cascavel ou jararaca vermelha. Seu veneno apresenta

ação proteolítica, caracterizando o envenenamento pela presença de bolhas, edema e necrose, que provavelmente decorre da ação de enzimas como proteases, hialuronidasas e fosfolipases, da liberação de mediadores da resposta inflamatória; ação coagulante, ativando isoladamente ou simultaneamente o fator X e a protrombina, podendo agir como a trombina, convertendo o fibrinogênio em fibrina. Este tipo de ação causa distúrbios na coagulação sanguínea, uma vez que ao atingir a cascata de coagulação de forma direta, promove a destruição do fibrinogênio e da fibrina, podendo, por conseguinte, causar incoagulabilidade sanguínea; e ação hemorrágica, que são decorrentes da ação das hemorraginas provocando lesões na membrana basal dos capilares, associadas à trombocitopenia e alterações da coagulação (GUTIÉRREZ, 2009).

O tratamento indicado pelo Ministério da Saúde para envenenamentos com serpentes é a utilização de soros antiofídicos, que no Brasil são produzidos pelo Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos (CPPI), Instituto Butantan – IB (SP), Instituto Vital Brasil – IVB (RJ) e Fundação Ezequiel Dias – FUNED (MG), por meio da imunização de equinos, onde o soro antiofídico, é produzido com venenos provenientes de cinco espécies do gênero *Bothrops* mais prevalentes no Brasil: *B. jararaca* – 50%, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. matogrossensis* – 12,5% cada, e são distribuídos pelo Ministério da Saúde, por meio da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), (BRASIL, 2010).

Poucos estudos imunológicos são realizados com humanos, sobretudo, no que diz respeito a resposta imune humoral de pacientes envenenados por serpentes. Esse dado é preocupante porque a resposta imune humoral é a primeira frente de defesa do organismo, importante para delinear a evolução da doença (LICHTMANN; PILLAI, 2008). Para a serpente *B. erythromelas* (Figura 1), a importância de se realizar estudos imunológicos referente à espécie, se dá porque a mesma é endêmica da região Nordeste do Brasil (ROMANO-HOGE, 1990; GUTIÉRREZ, 2009), e é responsável pelo maior número de atendimentos na Paraíba (SINAN, 2012), porém, seu veneno não consta no pool de venenos utilizados na formulação do antiveneno comercial no Brasil.



Figura 1. *Bothrops erythromelas* (Jararaca da seca)

Fonte: Répteis da caatinga

Diante disto, objetivou-se avaliar a neutralização do veneno da serpente *B. erythromelas*, diante do reconhecimento entre anticorpos presentes no soro de indivíduos envenenados por outros gêneros de serpente, e frente aos soros comerciais brasileiros.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Pacientes

Fizeram parte da pesquisa pacientes de ambos os sexos e diferentes idades, envenenados por serpentes dos gêneros *Crotalus*, *Philodryas* e *Bothrops* e atendidos no Centro de Assistência Toxicológica do Hospital de Trauma de Campina Grande, no ano de 2012.

Os indivíduos foram entrevistados e, em seguida, foram submetidos aos exames clínico-laboratoriais, além da coleta de informações a partir das fichas de atendimento. Os critérios de inclusão na seleção dos pacientes contemplaram aqueles que receberam tratamento soroterápico e sinais/sintomas clínicos mais frequentes de envenenamento, como o edema local e alterações no tempo de coagulação sanguínea

do paciente.

Foram coletados um total de 30 mililitros (mL) de sangue de cinco (n= 5) pacientes que foram submetidos à pesquisa. Esta coleta foi feita em três intervalos de tempo: 0 horas antes da soroterapia, 12 horas após a soroterapia e 24 horas após a soroterapia, para cada coleta foi obtido 10 mL de sangue por paciente. Os pacientes que fizeram parte da pesquisa foram catalogados como Indivíduos: A, B, C, D e E. Onde o indivíduo A, foi vítima de um acidente causado pela serpente *Bothrops erythromelas*; os indivíduos B e D, foram vítimas de acidentes causados por serpentes do gênero *Crotalus*; e os indivíduos C e E, foram vítimas de acidentes causados por serpentes do gênero *Philodryas*.

## 2.2 Considerações Éticas

Esta pesquisa foi avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Estadual da Paraíba (CEP-UEPB), protocolo número 0007.0.133.000-12 de acordo com a Resolução nº 196 do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisas realizadas com seres humanos.

## 2.3 Obtenção do Veneno

O veneno da serpente *B. erythromelas* foi obtido por meio da ordenha de espécimes em cativeiro. Os espécimes foram provenientes do Zoológico Museu Vivo Répteis da Caatinga, localizado no município de Puxinanã, Paraíba. Foram selecionados apenas animais adultos. O veneno, após liofilização, foi mantido à temperatura de -20°C até o momento de sua utilização.

## 2.4 Perfil Eletroforético de Proteínas do Veneno de *B. erythromelas* Diante do Soro de Indivíduos Envenenados

Géis de poliacrilamida 12,5% em presença de SDS (Dodecil sulfato de sódio) foram feitos e acoplados a um sistema de eletroforese da Hoeffer. Ao sistema foi adicionado Solução Tampão (TRIS 0,125 M; GLICINA 0,95 M; SDS 5g). As amostras correram a 60 mA e 90 V por cerca de 1 a 2 horas. Os géis de empilhamento (*stacking gel*) e de separação (*running gel*) foram preparados a uma concentração de acrilamida de 4,5% (p:v) e 10% (p:v), respectivamente. Aos géis foram aplicados padrão de peso molecular (PM) (Sigma-Aldrich) com um espectro de 8 a 220 KDa); venenos de serpentes da espécie *B. erythromelas*, com soro de indivíduos previamente envenenados pela mesma serpente. Todas as amostras foram eluídas em tampão da amostra de Laemmli (1970) (Tris-HCl 1M pH 6,8; SDS 10%; β-mercaptoetanol 14,7 M; Glicerina; Azul de Bromofenol), e incubadas por 5 min em banho-maria antes de

sua aplicação no gel. Posteriormente foi feita a coloração dos géis com o corante *Coomassie brilliant blue* R-250; Metanol; Ácido Acético; H<sub>2</sub>O), durante 30 minutos, seguido do tratamento com descorante (metanol 30%, ácido acético 10% e H<sub>2</sub>O 60%) com intervalos de 10 min.

## **2.5 Avaliação do Cruzamento Entre Soro de Indivíduos Envenenados Por Serpentes dos Gêneros *Crotalus* e *Philodryas* Com Veneno da Serpente *B. erythromelas* Por Meio de *Western Blotting***

Para a realização da técnica de Western blotting (Towbin et. al., 1979) é necessário que as proteínas sejam anteriormente separadas pelo processo de Eletroforese em gel. Uma vez separadas as proteínas são transferidas para uma membrana absorvente, onde serão analisadas (KURIEN; SCOLFIELD, 2006).

Após o processo de eletroforese, onde se utilizou um padrão de massa molecular (Sigma-Color Burst; com espectro entre 8 a 220KDa); os géis foram submetidos a um processo de transferência das bandas de proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Whatman). Ao sistema foi adicionado 3 papéis de filtro umedecidos com Tampão Anodo I (Tris Base 36,3 g; Metanol; H<sub>2</sub>O), seguido de mais três papéis de filtro umedecidos com Tampão Anodo II (Tris 3g; Metanol; H<sub>2</sub>O), posteriormente foi colocada a membrana de nitrocelulose, seguida do Gel, e posteriormente se umidificou mais seis papéis de filtro com Tampão Catodo (Tris 3 g; Ácido capróico 5,2 g; Metanol; H<sub>2</sub>O) acrescentando-se ao sistema que foi submetido a transferência por cerca de uma hora no bloqueador em sistema Semi Dry (Semi-Dry Blotting Systems, C.B.S. Scientific, modelo EBU-4000) com a voltagem de 45 V e amperagem máxima em 300 mA.

Após a transferência a membrana de nitrocelulose (NTC), foi corada com o corante Ponceau a 0,2% e 1% de TCA por 5 min. Em seguida procederam-se incubações de bloqueio com leite desnatado (Molico) 5% e lavagem em PBS com pH entre 7.2 e 7.4. Após a última lavagem com PBS-Tween 20 0,05%, procedeu-se incubação da folha de NTC com os primeiros anticorpos (soro dos pacientes envenenados por *Crotalus* e *Philodryas*), overnight, sob refrigeração.

No dia seguinte, lavagens com PBS-Tween20 0,05% foram realizadas e o segundo anticorpo (IgM-conjugada a peroxidase), foi adicionado à membrana de NTC, sendo a mesma incubada por duas horas a temperatura ambiente. A revelação da membrana foi realizada com 4-Cloronaftol (Sigma-Aldrich), feito na hora, e a reação parada com água destilada.

Os imunocomplexos formados (componentes antigênicos do veneno mais anticorpos presentes no soro do paciente) foram detectados através de uma sonda enzimática. No presente trabalho, a sonda enzimática utilizada foi a anti-IgM humana (Sigma-Aldrich) conjugada a peroxidase (Sigma-Aldrich).

## 2.6 Ensaio de Neutralização do Veneno da Serpente *B. erythromelas* Diante dos Antivenenos Comerciais

Para se analisar a neutralização do veneno da serpente *Bothrops erythromelas* frente aos antivenenos comerciais utilizou-se a metodologia descrita por Gené et al. (1989).

Foram incubadas doses fixas de veneno de serpente com diferentes concentrações de antivenenos comerciais em banho-maria por 30 min a uma temperatura de 37°C.

Incubou-se 5 µL (microlitros) do veneno da serpente com 10; 50; 100 e 200 µL, respectivamente do soro antitoxico comercial. Foi adicionado aos pools tampão de amostra q.s.p. 1X (loading buffer- 2X).

Depois de incubadas a 37°C, as amostras foram aplicadas ao gel de poliacrilamida 12,5%, onde foram submetidas ao processo de eletroforese.

No processo de SDS-PAGE foram utilizados três padrões de peso molecular, a saber, PM (Sigma-Color Burst) com espectro entre 8 a 220 KDa.

Posteriormente este gel foi corado com o corante *Coomassie Brilliant Blue* por 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de tratamento com o descorante (metanol 30%, ácido acético 10% e H<sub>2</sub>O 60%) com intervalos de 10 min.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1 Perfil Eletroforético de Proteínas do Veneno de *B. erythromelas* Diante do Soro de Indivíduos Envenenados

Ao se realizar a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS observou-se bandas proteicas que reafirmaram o que foi observado nos experimentos realizados por Luna et al. (2010), com os quais observou-se um padrão de bandas com peso molecular entre 29 e 31 KDa que não sofrem neutralização mesmo após o tratamento soroterápico dos pacientes envenenados.

No gel 1 (Figura 2) é possível verificar a interação entre o veneno da serpente *B. erythromelas* e o soro de indivíduos envenenados pela mesma serpente. Como pode-se observar nas Colunas 3, 4, 5, 6, 7 e 8 mostram a formação de um complexo imune que sugere uma grande interação entre o veneno da serpente e os anticorpos presentes nos soros dos pacientes, o que pode ser visualizado pela forte coloração da formação no início do gel. É importante observar, também, que algumas bandas presentes no gel como a banda de cerca de 29 KDa não é neutralizada mesmo após a soroterapia dos pacientes envenenados. É importante verificar que nos poços 3, 4 e 5 foi utilizado o pool de soro acrescido de veneno da espécie *B. erythromelas*, este pool refere-se a primeira coleta que caracteriza o tempo zero do tratamento,

sendo respectivamente, leve, moderado e grave. Os poços seguintes, a saber, 6, 7 e 8 receberam pools de terceira coleta, o que indica o tempo de 24 horas após o tratamento, este também foi acrescido com o veneno da serpente e assim como os poços anteriores constituem envenenamentos do tipo, leve, moderado e grave, nesta ordem. No gel 2, foi utilizada a mesma sequência do gel 1. Pode-se visualizar que não há formação de imunocomplexos como foi observado no primeiro gel.

A formação de complexo imune observada no primeiro gel, está relacionada a presença do veneno no sistema, uma vez que os anticorpos do soro dos pacientes reagiram e interagiram com as proteínas do veneno. E o mesmo não se observa no segundo gel, onde não houve a adição do veneno da *B. erythromelas*.

As bandas que se encontram destacadas no esquema (Figura 2), a saber, aproximadamente 29 e 31 KDa, bem como a de cerca de 100 KDa, podem constituir um grupo de proteínas que não são neutralizadas pelo tratamento soroterápico, corroborando com os resultados de Luna et. al (2010), uma vez que o veneno da espécie causadora do envenenamento não está contido no *pool* de venenos selecionados para a produção do soro antiofídico poliespecífico, produzido no Brasil.

Jorge et al. (2014), observaram que serpentes da espécie *B. erythromelas* possuíam variações na composição química do seu veneno de acordo com a sua localização geográfica. O que sugere que dentro da mesma espécie podem ocorrer tipos de envenenamentos diferentes, quanto a sua gravidade, mostrando que o soro poliespecífico não configura a melhor opção no tratamento para reverter o quadro de envenenamento de vítimas de acidentes ofídicos, mas que um soro produzido em nível de espécie seria mais eficiente na neutralização de todos os componentes do veneno.

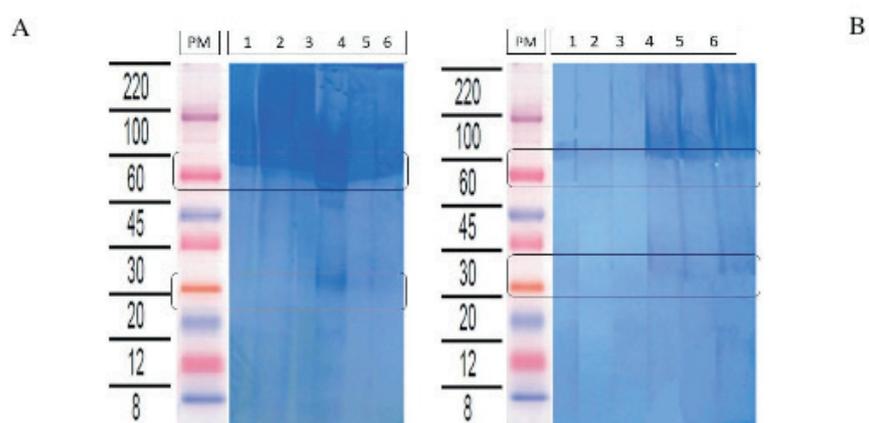


Figura 2: A- Coluna 1,2 e 3 coletas I de soro de pacientes em zero hora (antes do tratamento soroterápico) + veneno, Colunas 4,5 e 6: coletas III de soro de pacientes (24 horas após tratamento soroterápico) + veneno. B- Coluna 1,2 e 3 coletas I de soro de pacientes em zero hora (antes do tratamento soroterápico), Colunas 4,5 e 6: coletas III de soro de pacientes (24 horas após tratamento soroterápico) sem veneno.

### 3.2 Avaliação do Cruzamento Entre Soro de Indivíduos Envenenados Por

## Serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Philodryas* com veneno da serpente *B. erythromelas* por meio de *Western blotting*

Os resultados indicam que os antígenos do veneno da serpente *B. erythromelas* não apresentaram reação cruzada com o soro de indivíduos envenenados por outros gêneros de serpente (Figura 3), uma vez que não se observou bandas presentes na membrana de nitrocelulose, principalmente na nossa banda de interesse, localizada na região de 29-31 KDa, como destacado na Figura 3. Este resultado é promissor, uma vez que o marcador que estudamos, banda de 29-31 KDa, pode vir a ser um diferenciador importante para o diagnóstico de envenenamento pela serpente *B. erythromelas* no Nordeste.

A necessidade de se observar a ocorrência de uma reação cruzada entre os venenos de *Bothrops erythromelas* e *Philodryas. sp.* dá-se devido às semelhanças dos quadros fisiopatológicos, entre estes envenenamentos (FAN; CARDOSO 1995, FRANÇA; MÁLAQUE 2003). De acordo com estudos realizados por Tanjoni et al. (2003) onde foi utilizando o anticorpo monoclonal anti-jararagina que reconhece um epítipo presente na região Cterminal do domínio desintegrina-like, uma metaloproteínase do veneno de *Bothrops jararaca*, demonstraram pela técnica de *Dot Blot* que estes anticorpos reagiram com os venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis*, sugerindo que as metaloproteínases destes venenos apresentam epítipos comuns aos de *B. jararaca*. Corroborando tais achados, Rocha et al. (2006) demonstraram que o soro antibotrópico comercial apresentou reatividade cruzada com o veneno das serpentes *P. olfersii* e *P. patagoniensis* sendo capaz de neutralizar a ação hemorrágica, e eficientemente a atividade tóxica destes venenos (*P. olfersii* e *P. patagoniensis*), com eficiências similares aos obtidos com o veneno de *B. jararaca*.

No que concerne aos venenos das serpentes pertencentes aos gêneros *Crotalus* e *Bothrops*, possuem bioquímica diferenciada. De acordo com Breithaupt (1976) os principais componentes do veneno crotálico são: fosfolipases A<sub>2</sub>, Crotapotina, Crotoxina, Crotamina e Girotoxina. O veneno botrópico por sua vez possui em sua composição química, Botropsina I e II, Trombocitina, Jararacina, metaloproteínases, Jararacafribase, e outras enzimas pro-coagulantes. (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988). Contudo Spencer (1998) indica que umas das principais frações da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*, a Bothropstoxin-1 é uma fosfolipase A<sub>2</sub>. Assim, as fosfolipases são constituintes tanto do veneno botrópico como do crotálico. Daí se dá a necessidade de se observar uma possível reação cruzada entre estas duas peçonhas.



Figura 3: Resultado do Western Blo realizado com (1) Padrão de Massa molecular (Sigma-ColorBurst) com espectro de 6.5 a 200 KDa. (2): veneno da serpente *B. erythromelas*; (3): soro de indivíduo envenenado por *C. durissus*; (4): soro de indivíduo envenenado por *Philodryas* sp.; (5) soro de indivíduo envenenado por *C. durissus*; (6) soro de indivíduo envenenado por *Philodryas* sp.

### 3.3 Ensaio de Neutralização do Veneno Da Serpente *B. Erythromelas* Diante dos Antivenenos Comerciais

A Figura 4 mostra o perfil de neutralização apresentado quando 5 $\mu$ L de veneno é incubado com 10, 50, 100 e 200  $\mu$ L de soro antiveneno comercial.

Como é possível observar, na coluna 4, a concentração de SAB (10  $\mu$ L) não foi suficiente para neutralizar o veneno, uma vez que as bandas referentes aos componentes do mesmo ainda são bem visíveis. Nas colunas 5 (50 $\mu$ L SAB), 6 (100 $\mu$ L SAB), 7 (200 $\mu$ L SAB) é possível observar que várias bandas do veneno aparecem não neutralizadas, assim como a banda observada apenas no veneno (Coluna 3), entre elas a banda de cerca de 29 a 31 KDa, como indicado pela seta.

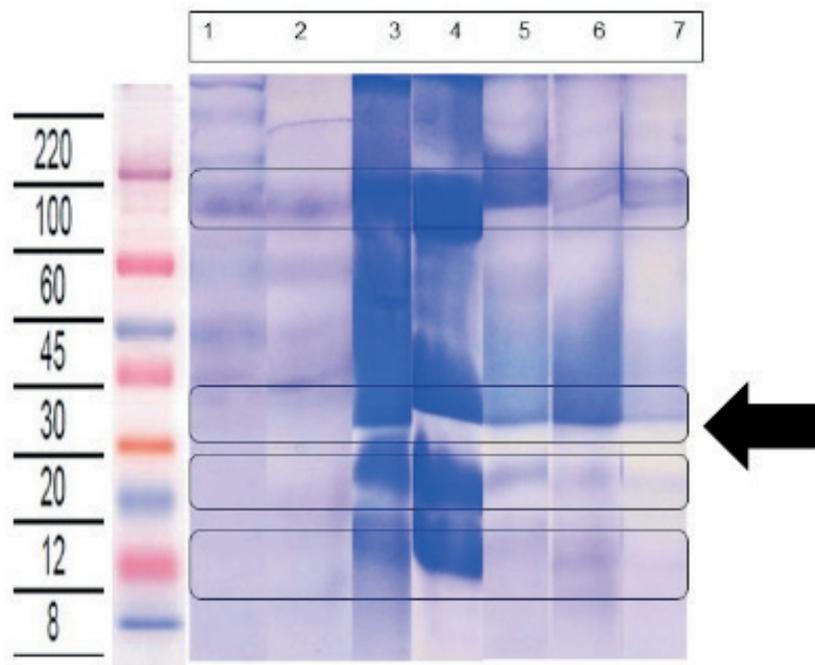


Figura 4: Eletroforese unidimensional destacando (1) e (2) Padrão de Massa Molecular; (3) veneno mais Tampão de Amostra; Coluna (4) Veneno + SAB 10  $\mu\text{L}$ ; (5) veneno + SAB 50  $\mu\text{L}$ ; (6): veneno + SAB 100  $\mu\text{L}$ ; (7) veneno + SAB 200  $\mu\text{L}$ .

À medida que se aumenta a concentração do soro, observa-se que mais bandas vão sendo neutralizadas e que algumas, especialmente aquela localizada na região de 31 kDa permanece inalterada.

Em estudos realizados por Boechat et al. (2001), foi observado que o soro antibotrópico possuía uma eficácia de apenas 58% na letalidade da ação do veneno da *Bothrops erythromelas* quando comparado ao de *Bothrops jararaca*, que possui uma eficiência de 100%. Essa diferença na ação de neutralização dos venenos botrópicos colocam em questão a qualidade do soro comercial antibotrópico fornecido pelo Ministério da Saúde, uma vez que a *B. erythromelas* é a principal responsável pelos acidentes ofídicos registrados na região nordeste do Brasil.

Deve-se considerar que a técnica de incubação do veneno com o SAB (soro antibotrópico) mimetiza o que ocorre no organismo vivo. Porém, também devemos salientar que em um envenenamento não é possível saber a quantidade de veneno inoculada e, certamente, o tempo decorrido entre a ligação dos antígenos presentes no veneno com os anticorpos do soro, é bem maior, ou seja, de acordo com os resultados descritos na Figura 4, uma quantidade maior de soro pode sim ajudar na neutralização de toxinas em período de tempo menor.

De acordo com Jorge e Ribeiro (1997), a tendência atual deve ser a utilização de doses menores de soro, pelo menos quando se trata de envenenamentos leves e moderados, principalmente em locais de alta prevalência de *B. jararaca*. Nossos resultados não corroboram essa afirmação, pois o raciocínio não se aplica a áreas onde ocorre a espécie *B. erythromelas*, já que a mesma não está presente no pool de venenos que compõem o SAB. Eles afirmam ainda que em envenenamentos graves

permanecem as recomendações de doses altas (12 ou mais ampolas), conforme orientações oficiais (Ministério da Saúde, 2003; Manual de vigilância epidemiológica, São Paulo, 2015). Esses casos, entretanto, são menos frequentes. Dada a diversidade de espécies encontradas nas várias regiões do país, é importante que estudos semelhantes sejam realizados também em outros locais, para se avaliar a eficácia dessas doses de antiveneno em relação a outras espécies peçonhentas.

O tempo decorrido entre o envenenamento e o tratamento deve ser levado em consideração, pois, de acordo com nossa experiência clínica no Estado da Paraíba, observamos que pacientes que levam mais de 6 horas para chegar ao socorro hospitalar e realizar o tratamento apresentam, com frequência, hemorragias disseminadas. Essas hemorragias, entretanto, podem ser revertidas após correto tratamento soroterápico (SANO-MARTINS; SANTORO, 2004). Porém, deve-se considerar que, se a banda mais importante encontrada neste estudo, 29 - 31 kDa, pode ser a responsável por causar hemorragias, estamos diante de potentes toxinas específica desse veneno, e que não são neutralizadas com o tratamento soroterápico em uso.

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dessa forma, pode-se concluir, que ao se analisar o perfil de neutralização das toxinas presentes no veneno da serpente *B. erythromelas* frente ao soro de indivíduos envenenados antes e após a soroterapia, observou-se que as bandas de 29 a 31 kDa apresentaram padrão de neutralização diferenciado, uma vez que mesmo 24 horas após a submissão do paciente ao soro antivenenoso, estas bandas permaneceram não neutralizadas.

O mesmo se observou quando se analisou o perfil de neutralização do veneno da serpente *B. erythromelas*, frente ao soro antivenenoso comercial, mesmo sendo submetido a diferentes concentrações de soro antivenenoso. As mesmas proteínas encontradas nas bandas de 29 a 31 kDa permaneceram inalteradas, ou seja, não houve neutralização.

Esta implicação indica que o soro antivenenoso gênero específico produzido no Brasil não age com total eficiência no processo de reverter completamente os danos causados pela ação do veneno da *Bothrops erythromelas*.

Além disso, identificamos outras bandas proteicas com aproximadamente 24, 36 e 55 kDa no veneno da serpente *B. erythromelas*, representando toxinas que não foram neutralizadas pelo soro antivenenoso comercial, o que aumenta em muito a preocupação de que mais de uma classe de toxinas possa estar agravando os envenenamentos deflagrados por essa espécie. Estudos de venômica são necessários para que essas bandas sejam identificadas quanto a sua estrutura, composição química, sequência de aminoácidos e atividade biológica.

Avaliando-se o possível cruzamento entre o soro de pacientes envenenados por serpentes pertencentes aos gêneros *Crotalus* e *Philodryas* frente ao veneno de *B.*

*erythromelas*, a metodologia de *Western blotting* mostrou que os antígenos do veneno de *B. erythromelas* não apresentaram reação cruzada com os soros dos indivíduos envenenados pelas serpentes dos outros dois referidos gêneros. Dado importante uma vez que pretendemos no futuro identificar marcadores específicos do envenenamento pela serpente *B. erythromelas*.

Estes resultados ajudam a direcionar novas pesquisas para o melhoramento de futuros tratamentos através da inclusão de soros mais específicos no tratamento de indivíduos envenenados por serpentes, um problema de saúde pública negligenciado. Essa estratégia pode levar a diminuição da letalidade, morbidade e de danos irreversíveis que possam ser causados pelos envenenamentos causados por esta espécie de serpente.

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, P.L.M.M.; JACINTO, C.N.; JUNIOR, G.B.S.; LIMA, J.B.; VERAS, M.S.B.; DAHER, E.F. 2013. **Epidemiological profile of snakebite accidents in a metropolitan area of northeast Brazil**. Rev. Inst. Med.Trop. São Paulo. V.55, 295-301.

AMARAL, A. **New genera and species of snakes**. Proc. N. Engl. Zool. Club 8. 1923. p. 85 e 105.

BOECHAT, A.L.; PAIVA, C.S.; FRANCA, F.O.; DOS SANTOS, M. C.2001. **Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in *Bothropsatrox* and *Bothropserythromelas* envenoming**. Revista do Instituto de Medicina Tropical. V. 43, 10, 2001.

BRASIL. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**, eighth ed. Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília. 2010.

BRASIL. **Acidente por animais peçonhentos** - notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN) - SINAN NET, DATASUS (Tecnologia da Informação a Serviço do SUS. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária). 2016.

BRASIL. **Acidente por animais peçonhentos** - notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN) - SINAN NET, DATASUS (Tecnologia da Informação a Serviço do SUS. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária). 2017.

BREITHAUPT H. "**Neurotoxic and myotoxic effects of *Crotalu sphospholipase A* and its complex with crotapotin**. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol." Vol.292 (3): 271-278.

CARDOSO JLC, WEN FH. **Introdução ao ofidismo**. In: ARAÚJO FAA, SANTALÚCIA M.; CABRAL R.F. editores. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes**. Editora Sarvier, São Paulo, 2003.

FAN, H.W. & J.L. CARDOSO. **Clinical toxicology of snake bites in South America**, 1995. In: J. MEIER & J. WHITE (Eds). **Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons**. Boca Raton, CRC Press, 667-688.

FRANÇA FOS & MÁLAQUE CMS. **Acidente Botrópico**. In: CARDOSO JLC,FRANÇA FOS, FAN HW, MÁLAQUE CMS, HADDAD JR.2003.**Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1 ed. Sarvier, São Paulo; v.1, 468.

GENÉ, J.A.;ROY,A.; ROJAS, G.;GUTIÉRREZ, J.M.; E CERDAS,L. **Comparative study on coagulant**,

**defibrinating, fibrinolytic, and fibrinolytic activities of Costa Rica crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom.** *Toxicon*, 27, 841-848.

GUTIÉRREZ, J.M., RUCAVADO, A. **Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage.** *Biochimie* Vol. 82. 2009. p. 841-850.

GUTIÉRREZ, J.M., ESCALANTE, T., RUCAVADO, A. **Experimental pathophysiology of systemic, alterations induced by *Bothrops asper* snake venom.** *Toxicon* Vol. 54. 2009a. p. 976-987.

HOMSI-BRANDEBURGO M.I.; QUEIROZ L.S.; SANTO-NETO H; RODRIGUES-SIMIONI L; GIGLIO J.R. 1988. **Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin.** *Toxicon*, Vol.26, 615-627.

JENNINGS, B.; SPEARMAN, W.; SHERPHARD. E. 2005. **A novel 25KDa protein form the venom of *Bitis arietans* with similarity to C-type lectins causes fibrinogen- dependent platelet agglutination.** *Toxicon*, Vol. 46, 687-98.

JORGE, M. T. & RIBEIRO, L. A. 1997. **Dose de soro (antiveneno) no tratamento do envenenamento por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*.** *Rev. Ass. Med. Brasil*. Vol.43, 74-76.

JORGE, R.J.B.; MONTEIRO, H.S.A.; GONÇALVES-MACHADO, L.; GUARNIERI, M.C.; XIMENES, R.M.; BORGES-NOJOSA, D.M.; LUNA, K.P.de O.; ZIGALI, R.B.; CORRÊA-NETTO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; SANZ, L.; CALVETE, J.J.; PLA, D.2014. **Venomomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from Five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil.** *Rev. Journal of Proteomics* XX. Published by: Elsevier B.V.93-114.  
DOI: 10.1016/j.jprot.2014.11.011

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. 2006. **Western blotting. Methods.** San Diego. Vol. 38, 283-293.  
DOI: 10.1016/j.ymeth.2005.11.007

LAEMMLI, U.K. 1970. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*. Vol.227, 680-685. DOI: 10.1038/227680a0

LICHTMANN, A.; PILLAI, S. 2008. **Imunologia Celular e Molecular.** Editora: Elsevier. Ed. 6.

LUNA, K.P.; XAVIER, E.M.; PASCOAL, V.P.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; PEREIRA, V.R.A. 2010. **Humoral immune response of patients bitten by the snake *Bothrops erythromelas*.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Vol. 43 (6),731-732.

Ministério da Saúde. 2003. **Manual de diagnóstico e tratamento dos acidentes por animais peçonhentos.** Brasília: Fundação Nacional de Saúde (FUNASA).

Ministério da Saúde.2015. **Manual de Vigilância Epidemiológica.** São Paulo.

ROCHA, M.M.T.; D. PAIXÃO-CAVALCANTE; D.V. TAMBOURGI & M.F.D. FURTADO.2006. **Duvernoy's gland secretion of *Philodryasolfersii* and *Philodryaspatagoniensis*(Colubridae): Neutralization of local and systemic effects by commercial bothropic antivenom (*Bothrops* genus).** *Toxicon* 47, 95-103.

ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. 1990. **Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento. Distribuição geográfica no continente americano.** In: SOERENSEN, B., **Animais Peçonhentos.** Livraria Atheneu, Rio de Janeiro. Vol.1, 1-41.

SANO-MARTINS I.S. & SANTORO M.L. 2004. **Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos do Brasil.** 289-303.

SINAN-Sistema Nacional de Agravos de Notificação. Estatística 2012. Ministério da Saúde. <http://sinan.saude.gov.br/>. (Accessed: 10.08.2015).

SPENCER PJ, AIRD SD, BONI-MITAKE M, NASCIMENTO N, ROGERO JR. 1998. **A single-step purification of bothropstoxin-1**. Braz J Med Biol Res. Vol. 31(9), 1125-1127. PMID: 9876278

TANJONI, I.; D. BUTERA; P.J. SPENCER; A.H. TAKEHARA; I. FERNANDES & A.M. MOURA-DA-SILVA. 2003. **Phylogenetic conservation of a snake venom metalloproteinase epitope recognized by monoclonal antibody that neutralizes hemorrhagic activity**. Toxicon 42 (7), 809-816. PMID: 14757213

TOWBIN H, STAEGELIN T, GORDON J. 1979. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications**. Proc Natl Acad Sci U S A. Vol. 76(9), 4350-4354.

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

### Alexya Sandim Guindo

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

### Luiz Humberto Guimarães Riquelme Junior

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

### Luiz Felipe Ramalho Nunes de Moraes

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

### Ludovico Migliolo

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

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

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

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

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

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

**KEYWORDS:** bioprospecting, anurans, toxin, protein.

## 1 | INTRODUÇÃO

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

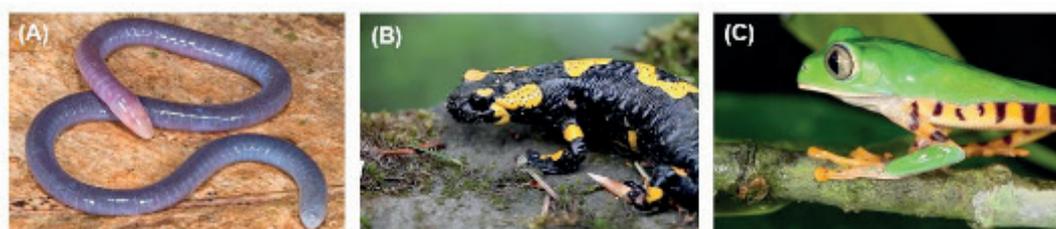


Figura 1. Exemplares da classe Amphibia, sendo, (A) representante da ordem Gymnophiona; (B) representante da ordem Caudata; (C) representante da ordem Anura.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

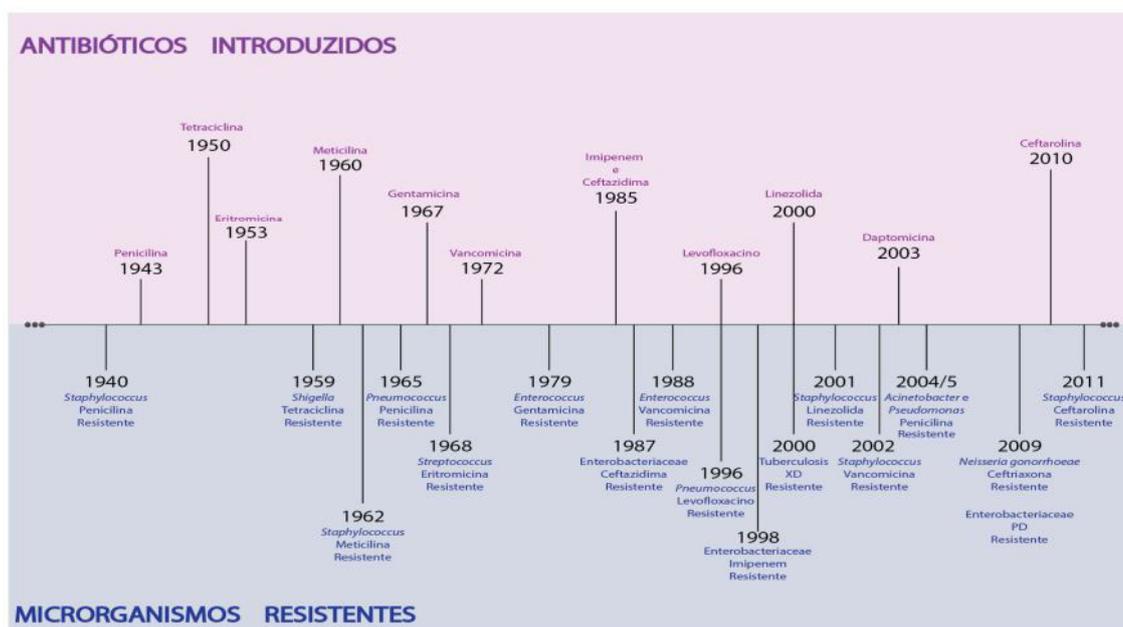


Figura 2. Linha do tempo dos importantes eventos-chave do desenvolvimento da resistência microbiana entre os anos de 1940 e 2011. XD: *extensively drug*; PD: *pan drug*. Imagem adaptada do CDC (2014) *apud* ANJOLLETTE, 2015.

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

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

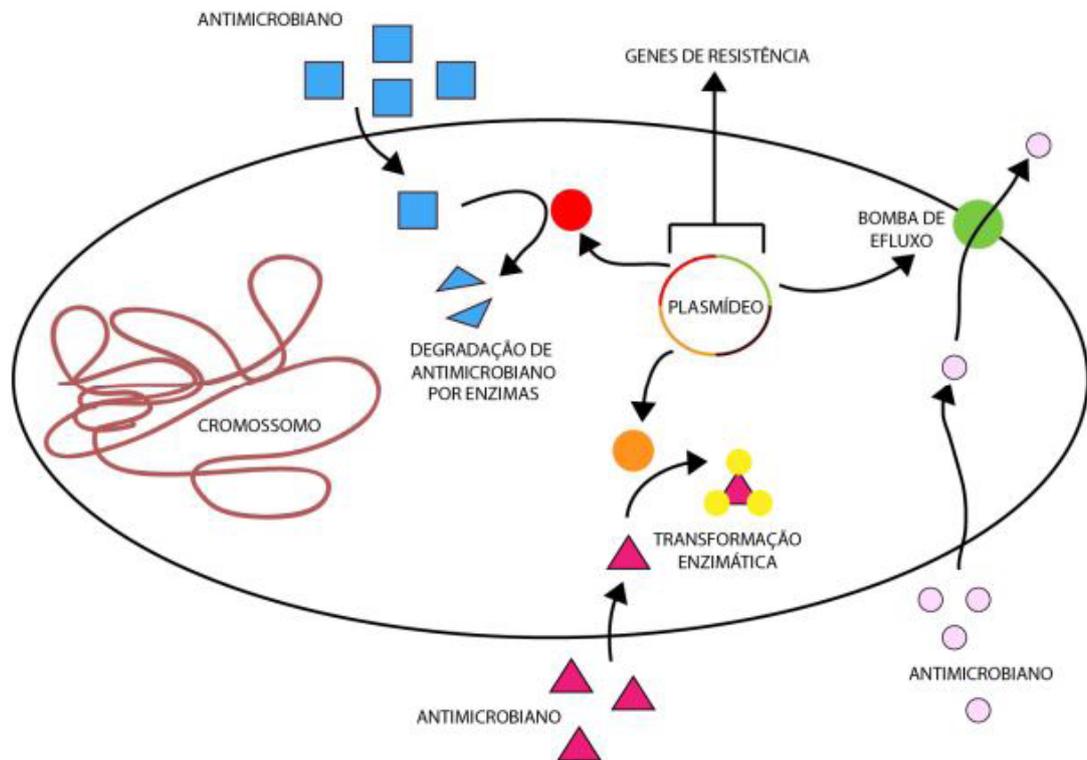


Figura 3. Diversos mecanismos biológicos de resistência microbiana. **Fonte:** Adaptado de LEVY; MARSHALL (2004) *apud* ANJOLETTE, 2015.

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

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

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### Extração das Toxinas

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

### Quantificação Proteica

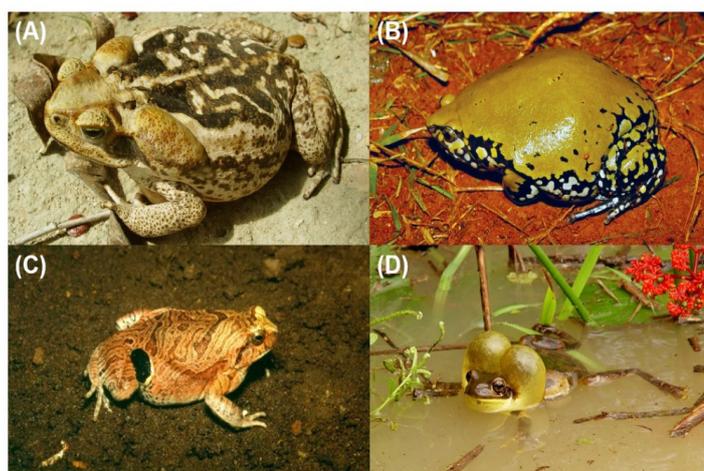
Após a liofilização as amostras foram ressuspendidas no volume mínimo com água Milli-Q e centrifugadas a 11000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi retirado e armazenado em tubo de polipropileno de 2 mL, sendo posteriormente quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

### Perfil Eletroforético Por SDS-PAGE

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

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

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



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

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



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

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

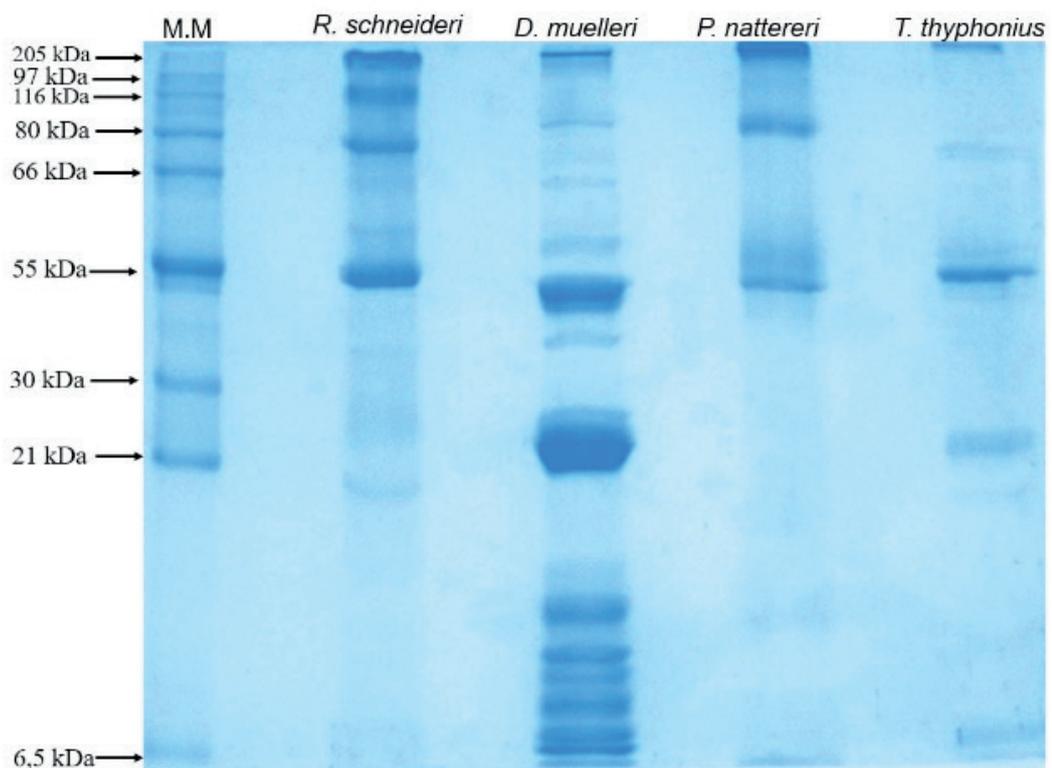


Figura 6. Gel de Eletroforese SDS-PAGE 12% corado com Comassie Brillant Blue, onde M.M

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

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

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

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

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

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

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

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

## 4 | CONCLUSÃO

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

## REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## POTENCIAL DE INIBIDORES SERINICOS EM FOLHAS DE *Croton urucurana* (MALPIGHIALES, EUPHORBIACEAE) PARA O CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)

### **Taylla Michelle de Oliveira Flores**

Pós-graduação em Biologia Molecular e Celular  
Universidade Federal da Paraíba  
João Pessoa-PB

### **Liliam Silvia Cândido**

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais,  
Universidade Federal da Grande Dourados,  
Dourados-MS

### **Ludovico Migliolo**

*S-Inova Biotech*, Pós-graduação em  
Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco,  
Campo Grande-MS

### **Jannaina Velasques da Costa Pinto**

Centro de Formação em Ciências Agroflorestais,  
Universidade Federal do Sul da Bahia Itabuna-BA.

**RESUMO:** Um dos principais fatores que impedem números mais expressivos de produtividade na cultura do milho é a alta incidência de pragas na lavoura, sobretudo da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera, Noctuidae). Os mecanismos adaptativos dessa praga garantem aquisição de resistência aos compostos químicos após poucas gerações, tornando-a de difícil controle. Nos últimos anos, a prospecção de inibidores de peptidases vem ganhando destaque graças ao seu potencial inseticida, capaz de reduzir a disponibilidade de aminoácidos essenciais ao desenvolvimento das larvas, levando à

morte. Neste trabalho, foi utilizado o extrato proteico de folhas de *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) com o objetivo de identificar a presença de inibidores de peptidases e avaliar o seu potencial de uso no controle da *S. frugiperda*. O extrato foi preparado em tampão Tris-HCl 50mM pH 8 e submetido à precipitação proteica com sulfato de amônio na saturação de 30-60%. Ensaio enzimáticos preliminares foram realizados utilizando como substrato Azocaseína (1%) e Tripsina Bovina. Ao constatar atividade antitripticas amostras entre as concentrações de 1,35 a 5,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , estas foram submetidas ao ensaio com substrato específico BApNA (1,25mM) em Tripsina Bovina que resultou em atividade inibitória de até 80% para a concentração de 26,95  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Deu-se então prosseguimento ao ensaio com substrato BApNA em homogenato intestinal da lagarta *S. frugiperda*, que apresentou atividade inibitória de 80% quando utilizados 2,7  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do extrato. Os resultados obtidos determinaram significativo potencial inseticida do extrato proteico das folhas de *C. urucuranae* para a possibilidade de desenvolvimento de um produto biotecnológico destinado ao controle desta lepidoptera. Nesse sentido, novos estudos de bioprospecção desta planta são encorajados.

Palavras chaves: Sangra d'água, proteases, inibidores de proteases, mecanismos de defesa vegetal.

**ABSTRACT:** One of the main factors that prevent more expressive numbers of productivity in the maize crop is the high incidence of pests in the crop, especially of the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera, Noctuidae). The adaptive mechanisms of this pest guarantee the acquisition of resistance to chemical compounds after a few generations, making it difficult to control. In recent years, the prospection of inhibitors of peptidases has been gaining prominence in relation to the insecticidal potential, capable of reducing the availability of essential amino acids to the development of the larvae, leading to death. In this work, the leaf protein extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) were used in order to detect the presence of inhibitors of peptidases and to evaluate their potential use in the control of *S. frugiperda*. The extracts were prepared in Tris-HCl buffer (50 mM) and submitted to protein precipitation with ammonium sulfate at saturation of 30-60%. Preliminary enzymatic assays were performed using the substrate Azocasein (1%) in Trypsin Bovine. When the antitriptic activity in the sample between the concentrations of 1.35 and 5.4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  was verified, they were submitted to the BApNA (1.25mM) substrate assay in Trypsin Bovina which resulted in inhibitory activity up to 80% for the concentration of 26.95  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The assay was then carried out with BApNA substrate in intestinal homogenate of the *S. frugiperda* caterpillar, which showed 80% inhibitory activity when 2.7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of the extract was used. The results obtained determined a significant insecticidal potential of *C. urucurana* leaf extract and the possibility of developing a biotechnological product destined to the control of this lepidoptera. In this sense, new bioprospecting studies of this plant are encouraged.

**KEYWORDS:** Sangrad'água, proteases, protease inhibitors, plant defense mechanisms.

## 1 | INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zeamays*, *Poales*, *Poaceae*) é segunda mais importante no Brasil, perdendo apenas para a soja. A colheita anual de grãos chegou a 91,2 toneladas, na safra 2018, ocupando aproximadamente 16 milhões de hectares. Ainda assim, esses números são considerados baixos quando comparados aos de países que priorizam a agricultura de precisão para produção de grãos, a exemplo dos Estados Unidos (CONAB, 2019).

Um dos principais fatores que comprometem a produtividade do milho no Brasil é a grande incidência de insetos pragas na lavoura. Levando-se em conta que o Brasil está inserido numa zona tropical, os fatores climáticos favorecem a colonização, reprodução e adaptação de insetos pragas, que ocorrem de forma mais acelerada comparado a outras zonas do globo (RUBIN, 2009; SANTOS et al., 2004). Dentre as pragas mais incidentes, a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) (SMITH, 1797), também conhecida como lagarta-do-cartucho, é de difícil controle, podendo levar a uma perda drástica na produção do milho e de outras culturas de grãos (RUBIN, 2009).

O controle de pragas através de defensivos químicos é a técnica mais comumente usada no manejo, no entanto a resistência a diferentes compostos adquirida rapidamente pela *S. frugiperda* tornou-se um grande problema para a produtividade da lavoura. Esta resistência está muitas vezes associada ao manejo inadequado das pulverizações, seja pela dosagem ou pela repetição indiscriminada da prática ao longo do ciclo da lavoura (COSTA et al., 2005; LIMA et al., 2012; WAQUIL, 2007).

A tendência em se prospectar compostos originados do metabolismo primário das plantas, de natureza proteínica, utilizados constitutivamente como mecanismo de defesa natural a campo, vem ganhando espaço no controle à incidência de insetos pragas na lavoura. Um exemplo típico é o uso de inibidores de peptidases serínicas (ADDOR, 1995; MACEDO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013).

Os Inibidores de peptidases (IPs) são compostos proteicos que inibem a atividade de peptidases no intestino das lagartas por meio de bloqueios ao sítio ativo destas enzimas, resultando na redução da disponibilidade de aminoácidos necessários para o crescimento e desenvolvimento da praga, levando-as à morte. Os IPs estão presentes, em sua maioria, nos órgãos de reserva, mas podem também ser encontrados em outros tecidos vegetais e desempenham importante papel na defesa aos ataques de insetos e microrganismos patogênicos em lavouras, podendo ser utilizados como potencial bioinseticida (BAYÉ et al., 2005; DUNSE et al., 2010; TREMACOLDI, 2009; VELASQUES et al., 2017).

A *Croton urucurana* (Malpighiales, Euphorbiaceae), popularmente conhecida como sangra d'água graças ao látex vermelho liberado pelo seu caule, é uma planta comumente encontrada no Cerrado e na Mata Atlântica, e é comumente utilizada entre as populações indígenas tanto para fins medicinais como para propriedades inseticidas (SIMIONATTO et al., 2007).

A literatura especializada também apresenta estudos relacionando o potencial de uso da *C. urucurana* no controle de pragas agrícolas, como as larva de *Anagasta kuehniella* que atacam lavouras de algodão (SILVA et al., 2009). No entanto, não são encontrados dados relacionados aos compostos de origem proteica em extratos da sangra d'água. Diante disso, neste trabalho foram aplicados métodos de prospecção de moléculas proteicas em *C. urucurana* com intuito de identificar a presença de inibidores de peptidase e sua aplicabilidade no controle de lepidóptera, principalmente em modelos agrícolas.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta de Material

Folhas de *Croton urucurana* foram coletadas no Parque das Nações Indígenas, localizado na cidade de Campo Grande – Mato Grosso do Sul (20.4555° S, 54.5797°

W). As folhas foram transportadas até o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular S-Inova Biotech da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB. As folhas foram lavadas, secas e colocadas em estufa de circulação fechada, a 36,5° C por quatro dias. Após a secagem das folhas, foi realizada a remoção da nervura central, e o limbo foliar foi moído em moinho de facas para obtenção do material totalmente pulverizado.

## 2.2 Obtenção da Fração 30-60% do Extrato Foliar

Foram homogeneizados 100g de folhas de *Croton urucuran* pulverizadas com adição de 2000 mL de solução tampão de extração Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (proporção de 1:20 p:v) sob agitação magnética *overnight*. As amostras foram filtradas e, em seguida, centrifugadas a 10000 rpm por 30 min à 4°C. O pellet foi descartado e o sobrenadante foi posteriormente liofilizado.

O extrato obtido do tampão Tris-HCl foi submetido à precipitação por Sulfato de Amônio segundo metodologia descrita por BURGESS(2009) empregando a faixa de saturação inicial-final de 30-60% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, utilizada nos bioensaios.

## 2.3 Determinação de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais dos extratos foi estimada pelo método descrito por BRADFORD(1976), utilizando a curva de BSA (albumina sérica bovina) como padrão. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (BioDrop) a 595 nm.

## 2.4 Homogenato do Trato Digestivo do Inseto

Larvas de *S. frugiperda* de 5° instar, obtidas no Laboratório de Controle de Pragas da Universidade Católica Dom Bosco, foram dissecadas com auxílio de lupa e pinça, os tratos intestinais selecionados foram transferidos para microtubos contendo 200µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e mantidos a ± 0,2°C. O homogenato intestinal foi preparado de acordo com a metodologia estabelecida por TERRA e colaboradores (1977), seguindo algumas modificações feitas por AMORIM(2007). O sobrenadante foi coletado e quantificado pelo método de BRADFORD(1976) em espectrofotômetro (BioDrop) à 595 nm, diluído a 1 µg.µL<sup>-1</sup> e a leitura padronizada para cerca de 0,100 de absorbância.

## 2.5 Ensaio Enzimático

As atividades inibitórias proteolíticas foram conduzidas por meio de ensaio enzimático com tripsina bovina utilizando solução de Azocaseína a 1% e BA<sub>p</sub>NA

1,25mM como substratos.

**Atividade inibitória realizada com substrato não específico Azocaseína a 1%:** Os testes foram realizados de acordo com a metodologia descrita por IVERSEN & JORGENSEN(1995), utilizando diferentes concentrações da amostra (0,084; 0,337; 0,674; 1,350; 2,700; 5,400; 13,500 e 26,950  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A absorbância foi medida a 440 nm.

**Atividade inibitória realizada com substrato BApNA ( $\beta$ -N-benzoil-arginina-p-nitroanilida):** Para a detecção da atividade inibitória, diferentes concentrações da amostra (0,084; 0,168; 0,337; 0,674; 1,350; 2,700; 5,400; 13,500; 26,950  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foram incubadas com a tripsina e o tampão TrisHCl 50 mM pH 7,5, completando o volume de 500  $\mu\text{L}$ , durante 10 min a 37 °C. Decorrido o tempo, adicionou-se o substrato BAPNA 1,25 mM (benzoil-arginina-paranitroanilida, Sigma), prosseguindo-se a incubação durante 15 min a 37 °C. A reação foi paralisada pela adição de ácido acético 30% (v:v) e a hidrólise do substrato pela enzima foi monitorada fotometricamente à 410 nm (Multiskan Go – Thermo Scientific).

Outros testes de atividades inibitórias proteolíticas foram conduzidos por meio de ensaio enzimático com a amostra nas concentrações de 0,084; 0,168; 0,337; 0,674; 1,350; 2,700  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , utilizando o homogenato intestinal de *S. frugiperda* como enzima de clivagem e substrato específico BApNA (1,25 mM). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e, nos ensaios em branco, o substrato foi adicionado após a reação ter sido parada com adição de ácido acético na concentração final. O cálculo da atividade inibitória foi gerado a partir da determinação da atividade residual da tripsina no ensaio (ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961).

## 2.6 Análise Estatística

A ANOVA foi realizada pelo software SPSS ,com os dados dos ensaios de inibição, utilizando delineamento inteiramente casualizado, seguido dos testes de media Waller-Duncan<sup>a,b</sup> a 5%.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

A extração de proteínas das áreas foliares tem alguns fatores complicadores, devido aos aspectos quantitativos destas biomoléculas nesse tecido vegetal. A fitomassa verde chega a 5% nas folhas, enquanto que nos tecidos de reserva (tubérculos, sementes,etc,) esse valor pode representar até 40% da massa (FERRI, 2006; PIRIE, 1978).

Métodos alternativos, como o isolamento de proteínas por precipitações com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , têm se mostrado mais eficazes, proporcionando resultados mais significativos em relação à concentração de proteínas totais, e principalmente para

os inibidores de peptidases (BHATTACHARYYA; BABU, 2009; GOMES et al., 2005; PANDO et al., 2001). De acordo com a quantificação do extrato de *C. urucurana* precipitado em  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na fração de 30-60%, realizada por Bradford, observou-se uma concentração proteica de  $540 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

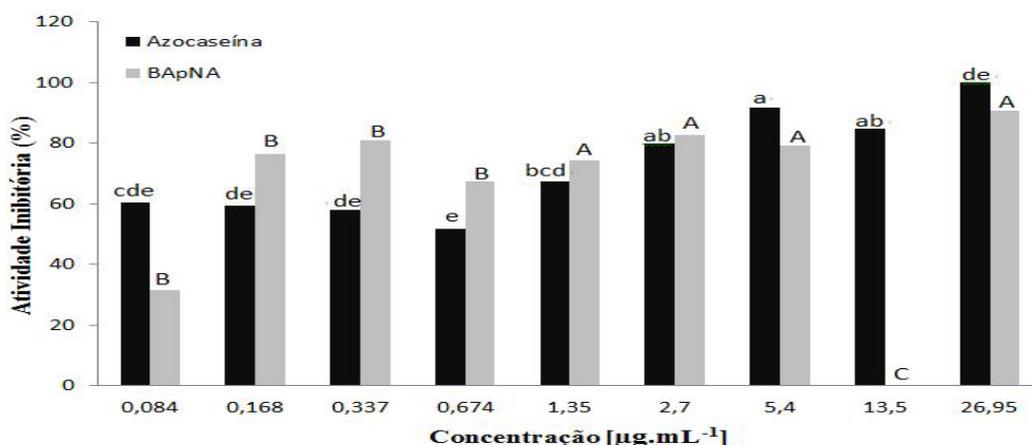


Figura 1: Porcentagem da atividade inibitória contra enzima tripsina ( $0,15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) utilizando os substratos azocaseína (1%) e BApNA (1,25 mM) em nove concentrações diferentes da fração 30-60 em  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  do extrato bruto das folhas de *C. urucurana* em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8. Letras maiúsculas distintas diferem as concentrações entre si, dentro de seus substratos, em substrato BApNA (1,25mM), pelo teste Waller-Ducana 5%. Letras minúsculas distintas diferem as concentrações entre si, em substrato azocaseína (1%), pelo teste Waller-Duncan a 5%.

Para confirmar a presença de inibidores de peptidases no extrato de *C. urucurana* precipitado em  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na fração de 30-60% foram realizados os ensaios preliminares da atividade antitriptica utilizando o substrato Azocaseína (1%). De acordo com BURGESS (2009), no precipitado 30-60% são esperadas as maiores concentrações de inibidores de peptidases, sobretudo da família Kunitz. A azocaseína é um substrato não específico e muito usado preliminarmente nos experimentos para avaliar a atividade enzimática dos inibidores mesmo quando não se tem a proteína purificada (IVERSEN; JORGENSEN, 1995).

No ensaio de inibição foram testadas as concentrações de  $0,084$ ;  $0,337$ ;  $0,674$ ;  $1,35$ ;  $2,7$ ;  $5,4$ ;  $13,5$ ;  $26,95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 1). As maiores médias de inibição em contato com o precipitado ocorreram entre as concentrações de  $1,35$  a  $5,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , estatisticamente não sendo observada diferença significativa entre elas. ARAÚJO e colaboradores (2014) apresentaram resultados para a mesma fração (30-60%), utilizando extratos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) a qual inibiu 100% da atividade da enzima quando utilizado uma concentração aproximada de  $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Essa atividade superior à encontrada para a *C. urucurana* pode estar relacionada ao fato de o amendoim pertencer à família Fabaceae, reconhecida pela presença de inibidores de natureza tanto constitutiva como induzida por mecanismos de defesa.

Em função dos resultados obtidos com azocaseína (1%), foram realizados os

testes de atividade inibitória utilizando substrato específico BApNA (1,25 mM) com a amostra nas mesmas concentrações, e os dados obtidos foram comparados.

Para o substrato BApNA (Figura 1) pode-se observar que entre as concentrações de 1,35, 2,7, 5,4 e 26,95  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  não ocorreu diferença estatística significativa, obtendo um média de atividade antitriptica de praticamente 80%. Podendo-se notar estabilização da atividade, independente das concentrações adicionadas. As concentrações 0,084, 0,168, 0,337, 0,674  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  demonstraram atividade inibitória mediana, variando de 50 a 70%.

Os IPs são onipresentes em tubérculos e sementes leguminosas, mas também podem ser encontrados em diferentes tecidos de vários grupos sistemáticos de plantas. VANDERJAGT et al. (2000) apresentaram resultados com as folhas de *Entada africana*, *Senna obtusifolia* e *Sesbania pachycarpa*, nos quais foram detectados uma grande concentração de inibidores de tripsina.

Embora seu papel fisiológico não tenha sido completamente elucidado, há evidência de que as plantas acumulam IPs como proteínas de armazenamentos, em função da sinalização exógena, em situação de estresse nutricional ou lesão mecânica. Por outro lado, os IPs também podem contribuir para a defesa da planta contra a herbivoria, inibindo a atividade da protease no organismo. (SOUZA et al., 2017; VELASQUES et al., 2017).

Dentre os compostos mais bioprospectados, os inibidores de peptidase têm sido amplamente reportados como possíveis agentes inseticidas. Esses fatores vêm ocasionando a morte dos insetos em todos os estágios fenológicos da planta, assim como alteração na morfologia da praga e efeito repelente. Alguns extratos de plantas são capazes de interferir no desenvolvimento larval até a fase adulta (KAMIABI; JAAL; KENG, 2013).

A *S. frugiperda* é uma das maiores pragas da ordem Lepidoptera. Essa espécie se alimenta de uma vasta gama de culturas, sendo considerado um inseto polífono, resultando em perdas severas de rendimentos. De acordo com TERRA & FERREIRA (1994) em quase todas as espécies identificadas da ordem Lepidoptera, foi constatada a presença em grandes quantidades de serino endopeptidases no intestino médio desses insetos.

Nos testes realizados com o homogenato intestinal da *S. frugiperda* utilizando substrato BApNA (1,25 mM) (Figura 2), foi verificado diferença estatística significativa de atividade para as diferentes concentrações do precipitado. Com 2,7  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  obteve-se a melhor média de inibição das peptidases presentes no homogenato intestinal, aproximadamente 80%, e conforme a concentração de extrato diminuía, menor era a média de inibição observada, chegando a aproximadamente 45% de atividade inibitória em 0,084  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .

A partir disso observa-se que mesmo em baixíssimas concentrações da amostra, ocorria atividade inibitória eficiente, tendo em vista que a média de atividade inibitória considerada ideal para o controle de Lepidópteras é entre 50 a 80%, pois quando

as lagartas são expostas aos inibidores com taxa alta de atividade, seu organismo sofre grande pressão, podendo induzir a polimorfismos ou mutações genéticas, desencadeando resistência pela praga ao inibidor e um curto período de tempo (SOUZA et al., 2016).

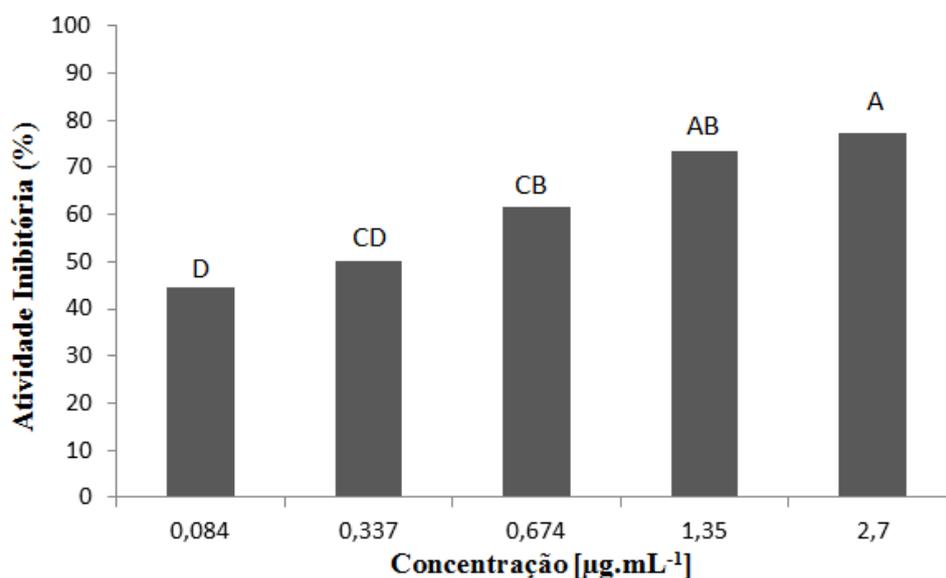


Figura 2: Porcentagem da atividade inibitória contra o homogenato intestinal de *S. frugiperda* utilizando o substrato BApNA (1,25 mM) em cinco concentrações diferentes da amostra fracionada em  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  do extrato bruto das folhas de *C. urucurana* em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8. Letras maiúsculas distintas diferem as concentrações entre si pelo teste Waller-Ducana 5%.

A eficiência no controle de insetos pragas ocorre à capacidade de alguns inibidores de peptidases de interferir na ação das peptidases presentes no sistema digestivo dos insetos, através de ligações competitivas com a peptidase digestiva impedindo que ocorra a ligação substrato-peptidase, resultando na deficiência de aminoácidos e, conseqüentemente, prejudicando o crescimento, desenvolvimento, fecundidade e sobrevivência dos insetos (AZZOUZ et al., 2005; OPPERT et al., 2003; VELASQUES et al., 2017).

Diante disso há uma busca incessante por alternativas ao uso de compostos sintéticos e da crescente bioprospecção de extratos vegetais ricos em proteínas em busca de novas moléculas bioativas e eficazes no combate às pragas (KIM et al., 2010). Devido à sua natureza constitutiva, o papel dos inibidores pode ser ativado por um único gene, diante disso vários estudos sobre a expressão de IPs em plantas transgênicas vem sendo realizados em um esforço para aumentar a resistência das culturas contra esses insetos-pragas que desolam as plantações (MAHESWARAN et al., 2007; MEDEIROS et al., 2016; VELASQUES et al., 2017).

## 4 | CONCLUSÃO

Dessa forma podemos observar que os estudos realizados com o extrato foliar obtido da *C. urucurana* demonstrou ser uma fonte rica de inibidores de peptidases serínicas, por meio dos ensaios enzimáticos específicos realizados. Os resultados mostraram efeito inibitório significativo sobre a peptidase Tripsina Bovina, em torno de 80% de inibição de sua atividade. Quando testado com o homogenato intestinal da *S. frugiperda*, a atividade inibitória se manteve dentro da faixa de inibição considerada para a prospecção a campo (50% - 80%). Contudo são necessários mais estudos com o intuito de comprovar a atividade inseticida tanto *in vivo* como *in situ*.

## REFERÊNCIAS

- ADDOR, R. W. **Insecticides**. New York: Agrochemicals from natural products, 1995.
- AMORIM, T. M. L. DE. **Avaliação da ação bioinseticida de SBTI e vicilina de Erythrina velutina em enzimas digestivas e membrana peritrofica de larvas de Plodia interpunctella** (Lepidoptera: Pyralidae). 2007. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- ARAÚJO, J. M. DE et al. **Determination Of Antitryptic Activity In Proteins From Peanut Products Isolated By Affinity Chromatography**. Química Nova, v. 37, n. 10, p. 1618–1623, 2014.
- AZZOUZ, H. et al. **Effects of plant protease inhibitors, oryzacystatin I and soybean Bowman-Birk inhibitor, on the aphid Macrosiphum euphorbiae (Homoptera, Aphididae) and its parasitoid Aphelinus abdominalis** (Hymenoptera, Aphelinidae). Journal of Insect Physiology, v. 51, n. 1, p. 75–86, 1 jan. 2005.
- BAYÉ, A. et al. **Structural basis of the resistance of an insect carboxypeptidase to plant protease inhibitors**. PNAS, v. 102, n. 46, 2005.
- BHATTACHARYYA, A.; BABU, C. R. **Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from Derris trifoliata Lour. seeds: Insight into structural and antimalarial features**. Phytochemistry, v. 70, n. 6, p. 703–712, 1 abr. 2009.
- 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. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BURGESS, R. R. **Protein Precipitation Techniques**. Methods in Enzymology, v. 463, p. 331–342, 1 jan. 2009.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Sagra Brasileira - Grãos**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>.
- COSTA, M. A. G. et al. **Eficácia de diferentes inseticidas e de volumes de calda no controle de Spodoptera frugiperda nas culturas do milho e sorgo cultivados em várzea**. Ciência Rural, v. 35, n. 6, p. 1234–1242, dez. 2005.
- DUNSE, K. M. et al. **Molecular basis for the resistance of an insect chymotrypsin to a potato type II proteinase inhibitor**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 107, n. 34, p. 15016–21, 2010.

**ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 95, n. 2, p. 271–278, 1961.

**FERRI, P. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FOLHA DE MANDIOCA (Manihot esculenta Crantz) PARA OBTENÇÃO DE CONCENTRADO PROTÉICO.** [s.l.] Universidade Estadual do Oeste do Parana, 2006.

**GOMES, C. E. M. et al. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly).** Plant Physiology and Biochemistry, v. 43, n. 12, p. 1095–1102, 2005.

**IVERSEN, S. L.; JORGENSEN, M. H. Azocasein assay for alkaline protease in complex fermentation broth.** Biotechnology Techniques, v. 9, n. 8, p. 573–576, 1995.

**KAMIABI, F.; JAAL, Z.; KENG, C. L. Bioefficacy of crude extract of *Cyperus aromaticus* (Family: Cyperaceae) cultured cells, against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes.** Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 3, n. 10, p. 767–775, 2013.

**KIM, S.I. et al. Toxicity and repellency of origanum essential oil and its components against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) adults.** Journal of Asia-Pacific Entomology, v. 13, n. 4, p. 369–373, 2010.

**LIMA, I. DOS S. et al. Infestação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e seus inimigos naturais em milho nas condições de sequeiro e irrigado.** Dourados-MS: Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), 2012. v. 5

**MACEDO, M. L. R. et al. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*.** Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 158, n. 2, p. 164–172, 2011.

**MAHESWARAN, G. et al. A proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* inhibits the normal development of light-brown apple moth, *Epiphyas postvittana* in transgenic apple plants.** Plant Cell Reports, v. 26, n. 6, p. 773–782, 14 maio 2007.

**MEDEIROS, A. et al. Sugarcane Serine Peptidase Inhibitors, Serine Peptidases, and Clp Protease System Subunits Associated with Sugarcane Borer (*Diatraea saccharalis*) Herbivory and Wounding.** International Journal of Molecular Sciences, v. 17, n. 9, p. 1444, 2016.

**OLIVEIRA, C. F. R. DE et al. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors.** Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 165, n. 1, p. 19–25, 2013.

**OPPERT, B. et al. Effects of proteinase inhibitors on digestive proteinases and growth of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae).** Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 134, n. 4, p. 481–490, 2003.

**PANDO, S. C. et al. Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds.** Phytochemistry, v. 57, n. 5, p. 625–631, 1 jul. 2001.

**PIRIE, N. W. Leaf protein and other aspects of fodder fractionation.** Cambridge-UK: Cambridge University Press., 1978.

**RUBIN, L. A. Manejo Da Lagarta-Do-Cartucho, *Spodoptera Frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae), Na Cultura Do Milho.** Santa Maria - RS: Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

**SANTOS, L. M. DOS et al. Fertilidade e longevidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**

**(Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho.** Ciência Rural, v. 34, n. 2, p. 345–350, abr. 2004.

SILVA, L. B. et al. **Effects of croton urucurana extracts and crude resin on Anagasta kuehniella (Lepidoptera: Pyralidae).** Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 52, n. 3, p. 653–664, jun. 2009.

SIMIONATTO, E. et al. **Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of Croton urucurana Baillon (Euphorbiaceae) stem bark.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 18, n. 5, p. 879–885, 2007.

SMITH, J. E. **The natural history of the rarer lepidopterous insects of Georgia.** London : Printed by T. Bensley, for J. Edwards [etc.], 1797.

SOUZA, T. P. et al. **Comparative analysis of expression profiling of the trypsin and chymotrypsin genes from Lepidoptera species with different levels of sensitivity to soybean peptidase inhibitors.** Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 196–197, p. 67–73, 2016.

SOUZA, T. P. et al. **Defense-related proteins involved in sugarcane responses to biotic stress.** Genetics and Molecular Biology, v. 40, n. 1 suppl 1, p. 360–372, 2017.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 109, n. 1, p. 1–62, 1994.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; DE BIANCHI, A. G. **Action pattern, kinetical properties and electrophoretical studies of an alpha-amylase present in midgut homogenates from rhynchosciara americana (diptera) larvae.** Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, v. 56, n. 2, p. 201–209, 1 1977.

TREMACOLDI, C. R. **Proteases e Inibidores de Proteases na Defesa de Plantas Contra Pragas.** Embrapa Amazonia Oriental, P. 44, 2009.

VANDERJAGT, D. J. et al. **The trypsin inhibitor content of 61 wild edible plant foods of Niger.** Plant Foods for Human Nutrition, v. 55, n. 4, p. 335–346, 2000.

VELASQUES, J. et al. **The rescue of botanical insecticides: A bioinspiration for new niches and needs.** Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 143, p. 14–25, 2017.

WAQUIL, J. C. **MANEJO FITOSSANITÁRIO E AMBIENTAL: MILHO TRANSGÊNICO Bt E RESISTÊNCIA DAS PLANTAS AO ATAQUE DA LAGARTA-DO-CARTUCHO.** Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2007\\_1/ManFito/Index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/ManFito/Index.htm)>, p. 117–131, 2007.

## **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

