ELISA CHAPARRO AGUIRRE

Moléculas Bioativas em Quilópodes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

ELISA CHAPARRO AGUIRRE

Moléculas Bioativas em Quilópodes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Júnior

Versão original.

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Chaparro Aguirre, Elisa.

Moléculas bioativas em quilópodes / Elisa Chaparro Aguirre. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Pedro Ismael da Silva Júnior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Sistema imune quilópodes.

Versão do título para o inglês: Bioactive molecules in chilopods.

Descritores: 1. Miriapodes 2. Quilópodes 3. Moléculas bioativas 4. Sistema imune 5. Seqüenciamento "de novo" 6. Espectrometria de massa I. Silva Júnior, Pedro Ismael da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0156/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Elisa Chaparro Aguirre.

Título da Dissertação: Moléculas bioativas em quilópodes.

Orientador(a): Pedro Ismael da Silva Júnior.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Presidente: Nome completo:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 310, referente ao projeto intitulado: "*Peptídeos antimicrobianos em quilópodes: purificação e caracterização de peptídeos presentes em otostigmus sp.(Scolopendromorpha)*" sob a responsabilidade de **Elisa Chaparro Aguirre**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPsh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 15 de maio de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

*Para minha família e para aqueles que se dão o
luxo de perguntar o POR QUÊ?*

AGRADECIMENTOS

Como o grande cantor de salsa Héctor Lavoe escreveu uma vez: “Tudo tem o seu final, nada dura para sempre, a gente tem que lembrar que não existe eternidade”. Lembro desta frase, sempre que chega ao fim uma etapa da minha vida. Este documento representa o final de um período que foi fundamental para mim. Porém, tenho que discordar do Héctor naquilo que diz sobre não existir a eternidade, pois neste tempo conheci pessoas que fizeram com que eu sentisse a eternidade durante um dia, que me ensinaram que 'sempre' é agora e é a essas pessoas que eu quero agradecer neste momento:

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Dr. Pedro Ismael, cujos ensinamentos sempre foram além do acadêmico. Vi nele mais do que um professor, um amigo, alguém a quem admirar e confiar. Pedro, as palavras ficam curtas para expressar tudo o que você representou para mim nestes anos.

A meus pais, obrigada por terem me ensinado a coragem para ir atrás dos sonhos e por me dar a força para me manter firme quando as coisas ficaram difíceis.

Aos meus irmãos, obrigada por serem minha inspiração e por fazer de mim uma melhor pessoa.

Aos meus avós agradeço pelo apoio e carinho! Espero algum dia ter um coração tão grande quanto o de vocês

Tio Hugo... Minha imaginação agradece o seu plano de leitura!

A minha família, obrigada por ser meu lar sem importar a onde eu dormisse nem quantas geografias ficaram no meio.

Aos amigos do laboratório de Química de proteínas: Katie (Euuu), Luana, Gabriela, Raphael, Ivan, Leonardo, Denise, Nicole, Carol e aos associados da “Republica Independiente de Bertani”: Rogerio, Carol e Roberto. Obrigada por fazerem parte do meu dia a dia, das risadas, da força e da ajuda durante o meu mestrado.

Aos colaboradores diretos, que enriqueceram o projeto, sem vocês não seria possível chegar até aqui:

- Ao Dr. Robson Melo, obrigada por sempre estar disposto a discutir os resultados e responder minhas dúvidas os seus ensinamentos foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Dr. Frank Quina, pela sua ajuda e disposição para a análise de NMR e das frações hidrofílicas. Professor, obrigada por manter as portas sempre abertas e me receber para discutir os meus resultados.
- A Central Analítica do IQ da USP e as meninas Cristiane Mattiaci Xavier e Janaina Dantas Vicachagua, pela ajuda com a análise de RNM e estar prestes a responder as minhas dúvidas sobre a interpretação deste.
- Ao Dr. Ernani Pinto, por me permitir fazer a análise de massa e purificação das amostras hidrofílicas no seu laboratório.
- Ao Dr. Felipe Dörr e a Fabiana Dörr, pela sua ajuda com a análise das frações hidrofílicas por HIC e responder os 500 mails que vieram depois.
- A Rosana Martins pela ajuda com a classificação das lacraias e por ter passado meu mail ao Pedro faz já algum tempo.
- Ao Prof. Ariel Mariano Silber e a Inga obrigada pela ajuda com as análises de atividade antiparasítica.
- A Dra. Claudia Blanes por me ajudar com as análises em espectrometria de massa.
- A Dra. Sirlei Daffre, por sempre estar prestes a me ajudar e ter sempre abertas as portas do seu laboratório.
- Ao Dr. Hugo Armelin e a Dra. Solange Serrano, agradeço o apoio durante o desenvolvimento do meu projeto.
- A Dra. Julia Cunha e ao Ismael, pela ajuda com a análise no Q-ToF e sempre estarem dispostos a me ajudar com as dúvidas na análise dos espectros.

- Ao Dr. Thomaz Rocha e Silva, obrigada pela ajuda com o documento da minha tese e fazer mais divertido os dias no HPLC.
- Ao Dr. Daniel Pimenta, por ter discutido os resultados sempre que precisei.
- As agências financiadoras, FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro durante o desenvolvimento deste projeto e a CAPES pela bolsa de mestrado.

Também quero agradecer a os amigos que me ajudaram na produção deste documento: Daissy (punto coma coma punto....) Simon (y la maldita primavera???), Nat (PANDEMONIUM), Fê (Green Power as minhas costas também te agradecem) e Andres (Leoncio). Já falei umas 500 vezes, mais agora é oficial: OBRIGADA.

Aos amigos que a vida me colocou pela frente nestes anos: Ana Paula (Honey), Vivian (Fundamental), Andrea (Minha bailarina), Davi (Senhor Pandero), Sara, Gui, Cintia, Camilla, Carolina (Toliimaaa) Andre e Rafael. Também à comunidade 6^a de Santa Margarida Maria, Fernando e Monica. Vocês viraram minha família aqui no Brasil por isso acho que um simples obrigado nunca vai ser suficiente.

Aos amigos butantanescos: Louisse, Podê, Bianca, Luciano, Karl (Você é membro emérito) e as meninas da casa 82 (Andria, Lu, Bia), obrigada pelo dia a dia e as risadas, a sua amizade é um dos maiores presentes do Butantan na minha vida.

A Leticia e ao Gustavo PETRONI (A.K.A Tulipas), o meu sentimento de gratidão é infinito, obrigada por me segurar nos momentos mais difíceis deste tempo no Brasil, como já falei, considero vocês meus anjos da guarda.

Aos os irmãos que eu escolhi: Monga, Mara, Padrino, To, Salin, Noemi, Quitterie... Devo a vocês minha saúde mental, obrigada por sempre estarem me animando e me fazendo rir quando mais o estava precisava.

Agradeço finalmente a todos os funcionários, técnicos, alunos e pesquisadores do Centro de Toxinologia Aplicado do Instituto Butantan. Cada um a sua maneira fez do meu dia a dia sempre algo melhor.

É difícil mencionar todas as pessoas que contribuíram neste trabalho e que me acompanharam durante este tempo. A todos só tenho palavras de agradecimento e de carinho.

¡MUCHAS GRACIAS!

Simple Lover

Amo las vastas achicorias de la noche, sus músicas de cuero mojado y el caminar fragoso de antílopes azules transportando los árboles del bosque un poco más lejos, mudando los árboles cada noche con ternura murmurante de institutrices o colmenas.

Amo la forma en que tocas el piano, como con cuentagotas de jade tirando aquí y allá los pequeños campanarios que tienes en la concavidad de las uñas.

Amo los enternecidos escarabajos de Australia, los discursos cadenciosos del mariscal Smuts y esos espectáculos del tiempo vernal, cuando muchachos encendidos buscan entre los juncos una nunca encontrada escolopendra.

Cortazar

RESUMO

CHAPARRO, E. **Moléculas bioativas em quilópodes**. 2011. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Os artrópodes constituem o grupo mais diverso do Reino Animal, apresentando uma distribuição muito ampla nos ecossistemas e habitats. O fato de esses animais terem mudado muito pouco durante sua evolução e estarem bem adaptados aos ambientes inóspitos e com uma alta presença de microorganismos patogênicos, torna interessante a realização de estudos sobre o seu sistema imunológico. Parte importante deste sistema são os peptídeos antimicrobianos, que controlam a invasão dos diferentes patógenos. Estas moléculas não só podem fornecer informação sobre o sistema imune e o funcionamento deste, como também pode ajudar a buscar alternativas nas lutas contra as doenças infecciosas. Sendo assim, se torna interessante a purificação e a caracterização dos peptídeos antimicrobianos presentes nesses animais como também o conhecimento do funcionamento de seu sistema imune. Neste trabalho foram utilizadas duas espécies da ordem quilópoda: *Scolopendra viridicornis* e *Otostigmus cavalcanti* como modelo experimental. Foi avaliada a presença de moléculas bioativas na hemolinfa (plasma e hemócitos) e no extrato total do corpo, bem como a produção destas moléculas após o animal receber um estímulo ou injúria. Foi observada a presença de diferentes frações com atividade antimicrobiana na hemolinfa (plasma e hemócitos) e no extrato total de animais desafiados e não desafiados em *Otostigmus cavalcanti*, apresentando um aumento na atividade antimicrobiana nos animais do grupo estimulado. O que pode significar que algumas das moléculas antimicrobianas estão presentes constitutivamente no animal enquanto outras precisam de um estímulo para ser expressas. No plasma de *S. viridicornis* foram observadas diferentes frações com atividade antimicrobiana, observando-se atividade contra a bactéria Gram-negativa *E coli* e contra a levedura *C. albicans*. No entanto, nos hemócitos, diferentes frações apresentaram atividade somente contra a bactéria Gram-positiva *M. luteus*. Na porção hidrofóbica do extrato

total do corpo de *S. viridicornis* também foram observadas diferentes frações com atividade antimicrobiana. No material eluído em 5% de ACN, por análise de ESI-MS de uma fração com atividade contra *M. luteus* foram observadas duas moléculas com massa molecular baixa (848,49 e 861,94 Da). Ainda no extrato total da fração hidrofóbica foram observadas duas moléculas que se apresentaram puras. A primeira destas mostrou uma massa molecular de 1,7 kDa mas ainda não foi caracterizada. Enquanto a segunda evidenciou um peptídeo de 925,4658 Da e cuja estrutura primaria apresentou um composto de 8 resíduos de aminoácidos (RYPAVGYT). Esta molécula foi nomeada *Lacraia*. Entretanto na porção hidrofílica do extrato total de *S. viridicornis* e de *Otostigmus cavalcanti* foram observadas frações de baixa massa molecular com atividade antiparasítica contra *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma brucei* e antibacteriana contra *E. coli* e *M. luteus*. Também nesta fração foi observada uma molécula semelhante à Gomesina um peptídeo antimicrobiano da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*. A análise e caracterização desta molécula ainda esta em progresso.

Palavras-chave: Lacraia. Moléculas bioativas. Sistema imune em miriápodes. Seqüenciamento “de novo”. Espectrometria de massa.

ABSTRACT

CHAPARRO, E. **Bioactive molecules in chilopods**. 2011. 120 p. Masters thesis (Biology of Pathogen-Host Relation) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Arthropods constitute the most diverse group in the Animal Kingdom, representing a very wide distribution in different ecosystems and habitats. The fact that these animals have changed very little during their evolution and that they're well adapted to harsh environments with a high presence of pathogenic microorganisms, makes it interesting to conduct studies on their immune system. An important part of these systems are antimicrobial peptides that control the invasion of various pathogens. These molecules not only provide us with information on their immune system and its functioning, but can also help us find alternatives in the struggle against infectious diseases. Therefore, the purification and characterization of antimicrobial peptides present in these animals becomes important, as well as gaining knowledge on how their immune systems work. In this work two specimens of the Chilopoda order, *Scolopendra viridicornis* and *Otostigmus cavalcanti*, were used as an experimental model for the characterization of bioactive molecules present in the hemolymph and total body extract as well as the production of these molecules after stimulating or injuring the animal. The presence of different fractions with antimicrobial activity in the hemolymph (plasma and hemocytes) and the total body extract of defied and not defied animals in *Otostigmus cavalcanti* was observed. Presenting an increase in the antimicrobial activity in the stimulated group of animals, this could mean that some of the antimicrobial molecules are constitutively present in the animal, while others need to be induced to be expressed. In the plasma of *S. viridicornis* different fractions with antimicrobial activity and with activity against the Gram-negative bacteria *E coli* and against the *C. albicans* yeast were observed. Notwithstanding, in the hemocytes, there are different fractions that presented activity only against the Gram-positive *M. luteus* bacteria. In the hydrophobic portion of the total extract of the *S.*

viridicornis's body, different fractions with anti-microbial activity were also observed. In the 5% ACN eluted material, by an ESI-MS analysis of a fraction with activity against *M. luteus* two molecules with low molecular mass (848.49 and 861.94 Da) were present and two pure molecules were observed in the total extract of the hydrophobic fraction. The first one presented a molecular mass of 1.7 kDa that remains to be characterized. The second one was a 925.4658 Da peptide, whose primary structure presented a compound of 8 amino acid residues (RYPAVGYT). This molecule was named *Lacrain*. However, in the hydrophilic portion of the total extract of *S. viridicornis* and *O. cavalcanti* low molecular mass fractions with antiparasitic activity against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma brucei* as well as antibacterial activity against *E. coli* and *M. luteus* were observed. Also in this fraction a molecule similar to Gomesin, an antimicrobial peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana*, was present. The analysis and characterization of this molecule is still in progress.

Key words: Centipede. Bioactive molecules. Immune system in miryapods. “de novo” sequencing. Mass spectrometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Mecanismos de ação dos peptídeos ao interagir com a bicamada fosfolipídica da membrana plasmática.....	36
Figura 2- Centopéias secas a venda no mercado medicinal de Seoul na Coreia do Sul	38
Figura 3- Espécies utilizadas como modelo experimental.	41
Figura 4- Extração de hemolinfa..	42
Figura 5- Análise comparativa do perfil cromatográfico (FR-CLAE) do extrato ácido de hemócitos e da atividade antimicrobiana de animais induzidos e não induzidos de <i>O. Cavalcanti</i> da eluição 40% de ACN.	52
Figura 6- Análise comparativa do perfil cromatográfico (FR-CLAE) do extrato ácido de plasma e da atividade antimicrobiana de animais induzidos e não induzidos de <i>O. cavalcanti</i> da eluição 40% de ACN.	53
Figura 7- Análise comparativa do perfil cromatográfico da primeira purificação por FR-CLAE e da atividade antimicrobiana entre o extrato total induzido e não induzido de <i>O. Cavalcanti</i> da eluição 5% de ACN.....	58
Figura 8- Análise comparativa do perfil cromatográfico da primeira purificação por FR-CLAE e da atividade antimicrobiana entre o extrato total induzido e não induzido de <i>O. Cavalcanti</i> da eluição 40% de ACN... 	59
Figura 9- Cromatograma obtido na primeira etapa de purificação da fração hidrofílica (0%) do extrato total de <i>O. cavalcanti</i> por CLAE.....	62
Figura 10- Atividade antiparasítica contra <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> da fração 1A da porção hidrofílica (0%) do extrato total de <i>O. cavalcanti</i> (induzido) após a primeira purificação por CLAE..	64

Figura 11- Atividade antiparasítica contra <i>Trypanosoma brucei</i> da fração 3A da porção hidrofílica (0%) de extrato total de <i>O. cavalcanti</i> (induzido) após a primeira purificação por CLAE.....	65
Figura 12- Cromatograma obtido na segunda etapa de purificação da fração 1A da porção hidrofílica (0%) do extrato total de <i>O. cavalcanti</i> por CLAE..	66
Figura 13- Espectro de massa obtido por MALDI-ToF da fração ativa 1A_1 da porção hidrofílica do extrato total de <i>O. Cavalcanti</i> após segundo passo purificação por CLAE..	67
Figura 14- Perfil cromatográfico após a terceira etapa de purificação por HIC da fração 1A_2..	68
Figura 15- Cromatograma da terceira etapa de purificação por HIC da fração ativa contra <i>E. coli</i> 1A_2A (A) e espectro de massas (B, C e D) da fração 2A*1a.	70
Figura 16- Cromatograma da terceira etapa de purificação por HIC da fração ativa contra <i>E. coli</i> 1A_2A (A) e espectro de massas (B) da fração 2A*1b.....	71
Figura 17- Perfil cromatográfico da primeira etapa de purificação da extração ácida dos hemócitos <i>S. viridicornis</i>.	73
Figura 18- Perfil cromatográfico da primeira etapa de purificação do plasma de <i>S. viridicornis</i>.	76
Figura 19- Perfil cromatográfico e atividade antimicrobiana das frações obtidas na primeira etapa de purificação do plasma de <i>S. viridicornis</i>.....	77
Figura 20- Perfil cromatográfico da primeira etapa de purificação do plasma de <i>S. viridicornis</i>.	78

Figura 21- Perfil cromatográfico e sinalização das frações com atividade antimicrobiana obtidas da eluição de 5% de ACN após primeira etapa de purificação da extração branda do extrato total de <i>S. viridicornis</i>.....	81
Figura 22- Cromatograma da segunda purificação por CLAE da amostra C5_1.	82
Figura 23- Análise de massas por LC-ESI/MS (A) da fração ativa C5_2A..	84
Figura 24- Perfil cromatográfico da primeira etapa de purificação da eluição de 80% de ACN da extração branda do extrato total de <i>S. viridicornis</i>.....	85
Figura 25- Perfil cromatográfico da eluição de 40% de ACN após primeira etapa de purificação da extração branda do extrato total de <i>S. viridicornis</i>.	87
Figura 26- Cromatogramas da segunda etapa de purificação por FR-CLAE das frações C40_4 (A) e C40_5 (C) e espectros de massas (B a D) das frações ativas obtidas.	89
Figura 27- Cromatograma da segunda etapa de purificação por FR-CLAE da fração C40_6 (A) e espectro de massas (B) da fração ativa obtida..	91
Figura 28- Sequenciamento “de novo” do peptídeo de 925,439 Da presente na fração com atividade antimicrobiana C40_6..	94
Figura 29- Cromatograma e atividade da primeira etapa de purificação da fração hidrofílica (0%) do extrato total de <i>S. viridicornis</i> por CLAE.....	96
Figura 30- Atividade antiparasítica de frações da porção hidrofílica (0%) de extrato total de <i>S. viridicornis</i> após a primeira purificação por CLAE.....	98
Figura 31- Cromatograma da segunda etapa de purificação por CLAE da amostra C0_2.....	99

Figura 32- Cromatograma da segunda etapa de purificação por CLAE da amostra C0_1.....	101
Figura 33- Análise de massas por LC-ESI/MS da fração ativa C0_1A.	102
Figura 34- Espectro de RMN ¹H da fração C0_1A..	103
Figura 35- Espectro de RMN ¹H da fração C0_1A..	104
Figura 36- Perfil cromatográfico e atividade antimicrobiana das frações obtidas após a terceira etapa de purificação por HIC da fração C0_1A....	105
Figura 37- Cromatograma da terceira etapa de purificação por HIC da fração ativa contra <i>E. coli</i> C01A_1A (A) e espectro de massas (B e C) da fração C0*1a..	106
Figura 38- Cromatograma da terceira etapa de purificação por HIC da fração ativa contra <i>E. coli</i> C01A_1A (A) e espectro de massas (B e C) da fração C0*1b..	107
Figura 39- Cromatograma da terceira etapa de purificação por HIC da fração ativa contra <i>E. coli</i> C01A_1A (A) e espectro de massas (B e C) da fração C0*1c..	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Hemócitos presentes no sistema imune dos artrópodes.....	30
Tabela 2 - Características estruturais das principais classes de peptídeos catiônicos.....	35
Tabela 3 - Atividade antimicrobiana apresentada pelas diferentes frações obtidas por FR-CLAE do extrato ácido de plasma e hemócitos (induzido e controle) do material eluído a 40% de ACN da hemolinfa de <i>O. cavalcanti</i>.	56
Tabela 4 - Atividade antimicrobiana apresentada pelas diferentes frações obtidas por FR-CLAE da extração ácida do extrato total (Induzido e Controle) de <i>O. cavalcanti</i>.	61
Tabela 5- Atividade antimicrobiana apresentada pelas diferentes frações obtidas da porção hidrofílica do extrato total do corpo de <i>O. cavalcanti</i> (OC0%).....	63
Tabela 6- Atividade antimicrobiana apresentada pelas diferentes frações obtidas da eluição 40% de ACN após a primeira etapa de purificação por FR-CLAE do extrato ácido de hemócitos de <i>S. viridicornis</i>.	74
Tabela 7- Atividade antimicrobiana apresentada pelas diferentes frações obtidas das eluições 5%, 40% e 80% de ACN após a primeira etapa de purificação por FR-CLAE do plasma de <i>S. viridicornis</i>.	79
Tabela 8- Estrutura Primária e outros parâmetros moleculares da Lacraina.	95

Tabela 9- Atividade antimicrobiana apresentada pelas diferentes frações obtidas da porção hidrofílica do extrato total do corpo de <i>S. viridicornis</i> (SVC0%).	97
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs: absorbância

ACN: acetonitrila

Ala: alanina

Arg: arginina

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CTI: cromatograma total de íons.

Da: daltons

DIC: dissociação induzida por colisão

D₂O: água deuterada

E_{col}: energia de colisão

ESI: electrospray ionization (ionização por eletrospray)

FO: fenoloxidase

Gly: glicina

hr: hora

IMD: immune deficiency (deficiência imune)

LC: liquid chromatography (cromatografia líquida)

MALDI: matrix assisted laser desorption ionization (ionização e desorção a laser assistida por matriz)

min: minutos

MS: mass spectrometry (espectrometria de massas)

MTO: medicina tradicional oriental

m/z: razão entre massa e carga

PAMs: peptídeos antimicrobianos

PI: ponto isoeletrico

Pro: prolina

RMN: ressonância magnética nuclear

TFA: ácido trifluoracético

Thr: treonina

ToF: time of flight (tempo de voo)

Tyr: tirosina

Val: valina

LISTA DE SÍMBOLOS

AMINOÁCIDOS

Alanina		A
Arginina		R
Glicina		G
Prolina		P
Tirosina		Y
Treonina		T
Valina		V

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	Sistema Imune dos Invertebrados	29
1.1.1	<i>Peptídeos Antimicrobianos</i>	32
1.2	Medicina Tradicional Oriental	37
2	OBJETIVOS	40
2.1	Objetivos Específicos	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	Animais	41
3.2	Hemolinfa	41
3.2.1	<i>Extração de hemolinfa</i>	41
3.2.2	<i>Extração e Purificação das Moléculas Bioativas</i>	43
3.2.2.1	Plasma	43
3.2.2.2	Hemócitos	44
3.3	Extrato Total	45
3.3.3	<i>Purificação das Moléculas Bioativas</i>	45
3.4	Bioensaios	46
3.4.1	<i>Bactérias e Fungos</i>	46
3.4.2	<i>Parasitas</i>	47
3.5	Espectrometria de Massas	47
3.5.1	<i>Grau de pureza e Massas Moleculares das frações bioativas</i>	48
3.5.2	<i>Seqüenciamento dos Peptídeos Antimicrobianos</i>	49
3.6	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	50
3.7	Busca e análise em Bancos de Dados	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	<i>Otostigmus cavalcanti</i>	51
4.1.1	<i>Comparação da atividade antimicrobiana na hemolinfa entre animais desafiados e controle</i>	51
4.1.2	<i>Extrato Total</i>	57
4.1.2.1	<i>Frações Ativas da Porção Hidrofóbica</i>	57

4.1.2.2 Frações Ativas da Porção Hidrofílica do Extrato total	61
4.2 <i>Scolopendra viridicornis</i>	72
4.2.1 <i>Hemolinfa</i>	72
4.2.1.1 Frações Ativas: Hemócitos.....	72
4.2.1.2 Plasma.....	75
4.2.2 <i>Extrato Total</i>	80
4.2.2.1 Frações Ativas Extrato Total Porção Hidrofóbicas	80
4.2.2.2 Fração hidrofílica do extrato total.....	96
5 CONCLUSÕES	110
REFERÊNCIAS	112
ANEXO- Sequenciamento “de novo” do peptídeo de 925,439. Da Lacraina, peptídeo antimicrobiano com atividade contra <i>E.coli</i>.	120

1 INTRODUÇÃO

Os artrópodes constituem o grupo mais diverso do Reino Animal, estimando-se que cheguem a alcançar mais de um milhão de espécies. A sua distribuição geográfica é muito ampla devido à grande capacidade adaptativa, reprodutiva e de defesa contra os predadores, estando presente em todos os ecossistemas e habitats (RUPPERT e BARNES, 2005). Estes animais surgiram no início do Cambriano, e sofreram poucas alterações durante a evolução. No entanto, estão bem adaptados a ambientes inóspitos, com alta presença de microorganismos e parasitas patogênicos. Tais características podem demonstrar que uma das razões do sucesso deste filo seja a capacidade de se defender contra esses patógenos, possuindo um eficiente sistema imunológico. (RUPPERT e BARNES, 2005; BARRAVIERA, 1994).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são elementos importantes do sistema imunológico que ajudam a combater diferentes patógenos. O estudo dessas moléculas não só pode fornecer informações sobre o sistema imune e o funcionamento do mesmo, como também pode auxiliar na busca de novas alternativas na luta contra doenças infecciosas.

O estudo, isolamento e caracterização de peptídeos antimicrobianos em diferentes organismos como plantas e animais têm aumentado nos últimos anos; atualmente já se conhece a estrutura primária de mais de 1216 PAMs (<http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial>). Em artrópodes, foi possível conseguir grandes avanços neste campo, principalmente no estudo de insetos (BOMAN, 1986; BOMAN e HULTMARK, 1987; BULET et al., 1999; HAINE et al., 2008) e de aracnídeos como escorpiões (EHRET-SABATIER et al., 1996), aranhas (SILVA JR, 2000), carrapatos (FOGAÇA et al., 2006) e opiliões (SAYEGH et al., 2010). Entretanto, dentre os artrópodes, um grupo em especial chama atenção uma vez que existem poucos estudos sobre seus mecanismos de defesa: os miriápodes.

Os miriápodes são artrópodes terrestres que apareceram há 420 milhões de anos, no começo do Siluriano, e estão divididos em quatro classes:

Chilopoda (Centopéias), Diplopoda (Piolhos-de-cobra), Pauropoda e Symphyla (RUPPERT e BARNES, 2005). Apresentam o corpo articulado em vários segmentos, não sendo possível observar uma diferenciação clara entre tórax e abdome. Atualmente estão descritas aproximadamente 11.460 espécies. Este grupo está subdividido em cinco ordens: Geophilomorpha, Scolopendromorpha, Lithobiomorpha, Scutigeromorpha e Craterostigmomorpha. Até o momento foram descritas aproximadamente 1500 espécies de quilópodes, mas calcula-se que este número possa chegar a 2800 espécies (BRUSCA e BRUSCA, 2003). No Brasil foram descritas aproximadamente 150 espécies (CHAGAS JR, 2003). Normalmente, são de atividade noturna e se encontram em lugares escuros e úmidos tais como: cavernas, embaixo de pedras, troncos caídos, folhiço etc. Os quilópodes se caracterizam por ter um par de pernas por segmento, variando o número segundo a espécie. Sua dieta consiste de vários pequenos artropódes, nos quais, quando predados, sofrem injeção de veneno produzido nas glândulas localizadas no primeiro segmento de patas modificadas.

As espécies da ordem Scolopendromorpha encontram-se frequentemente em regiões tropicais e subtropicais. Desta ordem foram descritas 350 espécies para a região Neotropical, das quais 19 espécies são brasileiras e 8 são encontradas no estado de São Paulo (CHAGAS JR, 2003).

Nesta ordem encontramos as escolopendras, que vivem em ambientes onde a presença de bactérias, fungos e agentes patogênicos é muito alta. Xylander (2009) trabalhou com este grupo e detectou na hemolinfa a presença de substâncias com atividade antibacteriana, mas não as purificaram nem realizaram a caracterização destas moléculas. Do veneno da *Scolopendra subspinipes mutilans* já foram caracterizados três peptídeos com propriedades antimicrobianas: a Escolopendrina I (WENHUA et al., 2006) e a Escolopina I e II (KANFU et al., 2010).

Na medicina tradicional oriental, o extrato do corpo das escolopendras é conhecido por sua propriedade de diminuir os sintomas da deterioração do sistema nervoso central. Existem estudos sobre como usar o pó do corpo de

Scolopendra subspinipes mutilans para tratar os sintomas do mal de Alzheimer's (REN et al., 2006) e como terapia para os AVC (XIAO et al., 2005).

O estudo de moléculas provenientes da fauna e da flora é valioso, uma vez que a própria evolução tratou de selecionar um amplo espectro de substâncias eficientes que atuam contra diferentes microorganismos e patógenos. Estas se tornam assim candidatas promissoras para o desenvolvimento de drogas importantes no combate a patógenos resistentes aos antibióticos convencionais (FINLAY e HANCOCK, 2004).

Assim, se torna interessante a purificação e a caracterização das substâncias antimicrobianas presentes nesses animais, bem como o conhecimento do funcionamento de seu sistema imune.

1.1 Sistema Imune dos Invertebrados

Nos invertebrados a primeira linha de defesa contra os patógenos é a cutícula. Após esta ser rompida, a capacidade de reconhecer os tecidos próprios e não próprios por parte do sistema imune é coordenada pela ação combinada de vários tipos de hemócitos, que fagocitarão ou encapsularão o invasor, e de diversos fatores humorais, que disparam cascatas proteolíticas resultando na coagulação ou melanização do microorganismo (LAMBERTY et al., 2001). Este mecanismo de defesa é denominado imunidade inata e é o mais primitivo dos mecanismos, pois se conservou durante toda a evolução até a atualidade, estando presente em todos os animais (HANCOCK; BROWN; MOOKHERJEE, 2006).

O sistema imune dos invertebrados se diferencia dos vertebrados pela ausência de imunidade adaptativa. A qual apresenta uma resposta específica contra patógenos (atribuída às imunoglobulinas) e memória imunológica (HOFFMANN, 2003). Este mecanismo é considerado evolutivamente como o mais derivado ao surgir aproximadamente há 450 milhões de anos em peixes mandibulados (HOFFMAN, 2004).

Na imunidade inata dos invertebrados as funções imunológicas mais importantes, são a fagocitose e o encapsulamento, controladas principalmente por dois tipos de células: os granulócitos e os plasmatócitos, que por sua vez são apoiados por outros hemócitos diferentes (**Tabela 1**). Os invertebrados apresentam então, uma grande variedade de moléculas capazes de lizar os microorganismos, unir suas paredes celulares aglutinando-os e, assim, favorecer a fagocitose por meio de moléculas líticas e antimicrobianas (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Tabela 1- Hemócitos presentes no sistema imune dos artrópodes.

IMUNOÓCITO	ABREVIATURA	CARACTERÍSTICAS
Prohemócitos	PRs	Células germinais, acredita-se que são a fonte para a multiplicação de hemócitos pós-embrionais
Plasmatócitos	PLs	Grande presença na hemolinfa dos artrópodes
Granulócitos	GRs	Mais primitivos, presentes em todos os artrópodes
Esferulócitos	SPs	Podem ser considerados granulócitos mais desenvolvidos.
Coagulócitos	CÓS	
Adipohemócitos	Ads	
Oenocitóides	Oes	Acredita-se que são originados dos plasmatócitos

Fonte: Gupta, 1986.

Os granulócitos (GRs) são encontrados principalmente no citoplasma e constituem mais de 30% dos hemócitos achados na hemolinfa dos artrópodes. Possuem os fatores que induzem a coagulação e sua função nos invertebrados seria equivalente aos linfócitos B e T nos vertebrados (GUPTA, 1986).

O outro tipo celular de grande importância no sistema imune dos artrópodes são os plasmócitos (PLs), que nos vertebrados se comparam com os linfócitos Natural killer. Estas células encontram-se em grandes quantidades na hemolinfa dos artrópodes (GUPTA, 1986).

Quando o sistema imune dos artrópodes é ativado, os hemócitos se organizam formando cápsulas ou nódulos ao redor do microorganismo invasor e a cascata da profenoloxidase e da coagulação são ativadas para que os nódulos sejam melanizados/coagulados eliminando por hipoxia ou por ação de substâncias tóxicas liberadas (CERENIUS e SODERHALL, 1998, 2004).

A cascata da coagulação e da pro-Fenoloxidase (**proFO**) são ativadas pelo contato de proteínas de membrana liberadas no plasma, como lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias Gram-negativas ou β -1,3-glucana das leveduras. O resultado final destas reações é a produção da coagulina a partir de coagulogênio, na cascata da coagulação (ULRICH et al., 2004), e de melanina originada de quinonas, na cascata da proFO (CERENIUS e SODERHALL, 2004). Ambas tem papel fundamental no aprisionamento dos microorganismos nos nódulos e evitam a perda de hemolinfa após rompimento da cutícula.

Os hemócitos também produzem e armazenam moléculas com atividade antimicrobianas como os PAMs, fatores de coagulação, lectinas e inibidores de proteases (IWANAGA et al., 1994). Os hemócitos são atraídos quimiotaticamente ao local da injúria liberando as moléculas já mencionadas (HOFFMAN, 2004).

Em miriápodes, um estudo realizado por Xilander em 1990 com os diplópodes *Rhapidostreptus virgator* e *Chicobolus* sp. e com os quilópodes *Lithobius forficatus* e *Scolopendra* sp. mostraram que quando comparadas as duas classes, os quilópodes apresentam maior dependência da resposta imune celular enquanto os diplópodes apresentaram uma menor presença de hemócitos na hemolinfa (XILANDER e NEVERMANN, 1990). Ao comparar a resposta imune dos miriápodes com a dos insetos, utilizando *Manduca sexta* (Lepidoptera) como modelo animal, observaram uma menor capacidade de coagulação, substâncias antimicrobianas menos eficientes e processo de encapsulação lento por parte dos miriápodes (XILANDER, 1990).

Na aranha *Acanthoscurria gomesiana* (Theraphosidae) foi demonstrado em experimentos *in vivo* e *in vitro* que os hemócitos são atraídos quimicamente

por LPS ou leveduras, provocando a degranulação das células (FUKUZAWA et al., 2008).

1.1.1 Peptídeos Antimicrobianos

As moléculas com atividade antimicrobiana nos artrópodes podem ser produzidas constitutivamente ou após a indução por infecção, rompimento da cutícula ou estímulo inflamatório (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

Em escorpiões da espécie *Androctonus australis* foram encontrados dois PAMs na hemolinfa de animais não desafiados: a butinina e a androctinina. O primeiro apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas enquanto o segundo possui atividade contra bactérias e fungos (EHRET-SABATIER et al., 1996).

A gomesina é um peptídeo antimicrobiano constitutivamente expresso nos hemócitos da aranha *Acanthoscurria gomesiana* (SILVA; DAFFRE; BULET, 2000), sendo liberado no lugar da infecção após o animal ser desafiado (FUKUZAWA et al., 2008). Nesta mesma espécie foi separada outra molécula com atividade contra a bactéria Gram- negativa *Escherichia coli*: a Migalina, uma acilpoliamina que também está presente nos hemócitos desta aranha, mesmo sem um estímulo prévio (PEREIRA et al., 2007).

Da hemolinfa do carrapato *Rhipicephalus microplus* não estimulado, foram isolados e caracterizados dois PAMs: a microplusina (no plasma) e uma defensina presente na hemolinfa (FOGAÇA et al., 2004).

Nesse contexto, acredita-se que os PAMs e as moléculas bioativas nos quelicerados são constitutivamente expressos na hemolinfa, sendo liberados no plasma após o animal ser desafiado por microorganismos. Charlet e colaboradores em 1996 sugeriram que a presença de moléculas antimicrobianas expresas constitutivamente nos invertebrados é um mecanismo imune primitivo quando comparado com o sistema de indução de produção de PAMs presentes nos invertebrados superiores. Considerando que a origem dos insetos há 390 milhões de anos foi posterior a dos quelicerados há

445 milhões de anos (RUPPERT e BARNES, 2005), a hipótese de que o sistema imune dos insetos é mais derivado do que dos quelicerados torna-se plausível, uma vez que neles encontramos vários organismos que necessitam de um estímulo para produzir as substâncias antimicrobianas. Estas desaparecem aproximadamente três semanas depois do desafio e são produzidas novamente ao receber um novo estímulo (BULET et al., 1999).

O principal órgão produtor de PAMs nos insetos holometábolos é o corpo gorduroso (equivalente ao fígado nos mamíferos), e sua síntese é induzida poucas horas após a infecção, sendo liberadas posteriormente na hemolinfa (LAMBERTY et al., 2001).

No entanto, nos hemimetábolos, a produção destas moléculas é realizada nos hemócitos (BULET e STOCKLIN, 2005). Em estudos com térmitas, *Pseudacanthotermes spiniger* (Isoptera), foram encontrados PAMs constitutivamente expressos (LAMBERTY et al., 2001), sugerindo uma resposta imune similar a observada em quelicerados, sendo esta menos derivada do que a presente em insetos holometábolos.

A informação acerca do sistema imune em insetos é baseada principalmente nos estudos realizados na mosca *Drosophila melanogaster*. Após a injúria, a produção de PAMs e moléculas bioativas pode ser induzida por dois mecanismos. O primeiro é mediado pelo receptor transmembranaral *Toll* que ativa fatores de transcrição para a síntese de peptídeos ativos contra microorganismos após o reconhecimento de componentes da parede bacteriana de Gram-positivas ou da membrana plasmática de leveduras (FERRANDON et al., 2007). O segundo é a via de deficiência imune (IMD) desencadeada pelas proteínas presentes na membrana das bactérias Gram-negativas. Os produtos deste mecanismo são homólogos ou altamente similares aos precursores da cascata da sinalização do receptor do fator necrótico tumoral (TNF) em mamíferos (HOFFMAN, 2004).

Trabalhos recentes, usando o besouro *Tenebrio molitor*, mostram que os PAMs induzidos após estímulo são importantes na inibição do crescimento de bactérias resistentes à primeira linha de defesa do sistema imune (i.e

encapsulação), devido ao fato de que o ápice da atividade destes peptídeos só é atingido após a eliminação de grande parte dos microorganismos (HAINE et al., 2008). Nesse contexto fica evidenciado a importância da primeira resposta do animal sobre a ação dos PAMs na eliminação de microorganismos invasores.

Em miriápodes já foi descrita a presença de substâncias antimicrobianas que estão constitutivamente expressas na hemolinfa como também moléculas específicas que são induzidas após infecção ou injúria (XILANDER, 1990, 2009). Estas últimas chegam a sua máxima atividade de 3 a 5 dias após a injúria, o que é considerado lento quando comparado com insetos, que alcançam o seu máximo entre 6 a 24 horas depois do estímulo.

Os peptídeos antimicrobianos de origem animal possuem características estruturais diversas. Na sua maioria são peptídeos catiônicos (com elevado pI), compostos por 9 a 100 resíduos de aminoácidos, não tendo tamanho superior a 10 kDa. São de natureza anfipática, podendo ser lineares ou cíclicos (DE SIMONE et al., 2002; BROGDEN, 2005). São classificados em cinco grupos principais dependendo da sua estrutura primária e secundária (**Tabela 2**). Apesar do fato da maioria dos PAMs serem catiônicos, alguns são aniônicos, como a microplusina, um peptídeo com atividade contra a bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* (FOGAÇA et al., 2004).

Até o momento, já foram descritos peptídeos com atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos (leveduras e filamentosos), vírus e parasitas. Um outro elemento importante com relação a atividade dos PAMs é que os mesmos podem ser divididos em hemolíticos (atividade contra hemáceas de mamíferos) e não hemolíticos (SHAI, 2002).

Tabela 2 - Características estruturais das principais classes de peptídeos catiônicos.

Classe	Estrutura	Fonte
Lineares com estrutura β	2-3 β o 2-3 enlaces Cys (defensinas, thioninas, protegrinas, polifemusinas).	Plantas, insetos, crustáceos, serpentes, células de mamíferos (Neutrófilos, plaquetas, macrófagos, células de Paneth), laringe, traquéia e intestino.
Lineares com hélice α	Hélices anfipáticas frequentemente com torção no meio.	Insetos, anfíbios, crustáceos, mamíferos e bactérias.
Lineares com ombros	Hélice de Poli-Pro Tipo II	Neutrófilos bovinos e insetos.
Cíclicos com Loops	Estrutura cíclica covalente que pode apresentar uma ou mais pontes de SH.	Neutrófilos bovinos, bactérias e serpentes.
Derivados de grandes peptídeos com função desconhecida	Complexa e apresenta ponte de SH.	Plantas

Fonte: De Simone et al., 2002.

O mecanismo de ação dos peptídeos se dá através do aumento da permeabilidade da membrana plasmática, o que provocaria o extravasamento do conteúdo celular ao interferir no empacotamento dos fosfolipídios, inviabilizando a sobrevivência do animal (ANDREU e RIVAS, 1998). Os peptídeos são primeiramente atraídos para a superfície da membrana do microorganismo por meio das interações eletrostáticas entre as cargas negativas da superfície da membrana do patógeno e as positivas dos peptídeos (HUANG, 2000). Após a ligação do peptídeo na membrana, o aumento na permeabilidade da membrana plasmática é explicado por três modos de ação diferentes (**Figura 1**) pelos quais os peptídeos interferem no arranjo fosfolipídico da membrana (BROGDEN, 2005):

- Modelo *Carpet*. A desestruturação da membrana plasmática ocorre quando os peptídeos ficam orientados horizontalmente cobrindo a bicamada lipídica formando sobre esta um “tapete” que pode levar à formação de micelas (Figura 1A).
- Modelo *Barrel stave*. O poro é formado somente pelos peptídeos, os quais alinham sua fração hidrofóbica com as caudas dos fosfolipídios da membrana, deixando no interior da membrana a porção hidrofílica (Figura 1B).
- Modelo do *Poro Toroidal*. O lúmen do poro é formado pela cabeça polar dos fosfolipídios (os quais foram induzidos para adotar uma curvatura mais positiva) e pela porção hidrofílica do peptídeo. A porção hidrofóbica forma o “interior” do poro (Figura 1C).

Figura 1- Mecanismos de ação dos peptídeos ao interagir com a bicamada fosfolipídica da membrana plasmática. Modelo *Carpet* (A). Modelo *Barrel Stave* (B). Modelo do *Poro toroidal* (C). As regiões hidrofóbicas estão representadas em azul e as hidrofílicas em vermelho.
 Fonte: Brogden, 2005.

Os PAMs também podem agir sobre alvos intracelulares ao inibir a síntese de proteínas, atividades enzimáticas e a síntese da parede celular (HALE e HANCOCK, 2007; JENSEN et al., 2006).

A ação dos peptídeos pode se apresentar em diferentes compartimentos celulares e, por isso, esses compostos são considerados fundamentais nos estudos para o desenvolvimento de drogas importantes contra patógenos resistentes aos antibióticos que existem atualmente.

1.2 Medicina Tradicional Oriental

Na China e Coreia é comum encontrar pessoas que praticam a “medicina científica” e a Medicina Tradicional Oriental (MTO). Existem clínicas com doutores especializados em medicina tradicional, prescrevendo medicamentos baseados em diferentes plantas, artrópodes e vertebrados (PEMBERTON, 1999). Esta medicina tem sido utilizada cada vez mais no ocidente. Estudos mostram que nos Estados Unidos mais de 40% da população utiliza ou esteve em contato em algum momento da sua vida com a MTO (KESLER et al., 2001) e acredita-se que este dado tende a aumentar nos próximos anos. Esta tradição apresenta dois benefícios: o primeiro é que possui milhares de anos de experimentação, pois se conhecem registros de 1610 a.C. (PEMBERTON, 1999); o segundo é que estas práticas ainda estão vigentes, bem como sua utilização está crescendo por mostrarem bons resultados.

Dentre os medicamentos baseados em artrópodes da MTO, os prescritos com maior frequência provêm de quilópodes (centopéias) (**Figura 2**), como por exemplo, de *Scolopendra subspinipes*, da qual se utiliza o pó obtido do corpo seco para o tratamento de dores reumáticas, gripes, convulsões e prevenção do câncer. A sua capacidade de absorção de água pode prevenir e tratar a tuberculose fungo-bacteriana e a micoses de pele (PEMBERTON, 1999; YOON 2006).

Na prática popular, a escolopendra viva é fervida em água, colocada para secar ao sol e depois moída sem a cabeça e o último segmento. O pó obtido é utilizado para fazer chá ou óleos para tratar as diferentes doenças supracitadas.

Devido à grande importância destes animais na MTO, a análise das moléculas do corpo das lacraias tem levado ao isolamento de várias moléculas com propriedades bioativas como a *centipedina* (KIM et al., 1998), uma molécula com atividade antibiótica; a *escolonase*, uma serino protease de 25 kDa com atividade fibrinolítica (YOU et al., 2004), e finalmente o jineol, uma quinolina alcalóide com atividade antioxidante e altamente citotóxica contra células tumorais (MOON et al., 1996; YOON et al., 2006).

Figura 2- Centopéias secas a venda no mercado medicinal de Seoul na Coréia do Sul.

Fonte: <http://www.flickr.com/photos/96245092@N00/395080720> (HWAYOUNGJUNG, 2011).

Na medicina tradicional oriental, acredita-se que vários quilópodes têm a propriedade de reduzir os sintomas da degeneração do sistema nervoso central, como por exemplo, a perda da memória. Ren et al. (2006) trabalharam com o efeito da *Scolopendra subspinipes mutilans* na doença de Alzheimer, obtendo uma melhora dos pacientes com um aumento na função cognitiva. Eles atribuíram este resultado aos ácidos graxos achados no corpo da lacraia, os

quais apresentaram atividade quelante que resulta numa inibição da acetilcolinesterase, enzima encarregada da degradação da acetilcolina.

Um dos maiores problemas da utilização dos medicamentos da MTO foi descrito por Yuen e Tam et al. (2006). Eles concluíram que um dos principais efeitos colaterais destes medicamentos (incluindo o pó de escolopendra) é a alta taxa de hepatotoxicidade e a perda da função do fígado. Isto foi observado em pacientes submetidos a este tratamento por cerca de seis meses a um ano, resultando em alguns casos que necessitaram de transplante de fígado e/ou outros que vieram ao óbito. Por esta razão a análise dos princípios ativos e o mecanismo de ação destes medicamentos tornam-se fundamental.

Dentro desse contexto, com o objetivo de entender melhor o sistema de defesa dos miriápodes contra os patógenos, o presente trabalho se propôs a isolar e caracterizar moléculas com atividade antibiótica presentes na hemolinfa e no extrato total dos quilópodes *Scolopendra viridicornis* (NEWPORT, 1844) e *Otostigmus Cavalcante* (COSCARÓN, 1955), bem como avaliar se o sistema imune destes animais é indutível ou constitutivo.

2 OBJETIVOS

Neste trabalho nosso objetivo foi iniciar o estudo do sistema imunológico de quilópodes, utilizando como modelo experimental lacraias da ordem Scolopendromorpha. Para um entendimento mais amplo dos processos envolvidos no sistema imune dos quilópodes em particular e dos artrópodes em geral foi nosso objetivo verificar a capacidade imunológica dos quilópodes através da produção de substâncias antimicrobianas além de avaliar se essas substâncias são produzidas constitutivamente ou quando ocorre uma infecção, como observado em outros artrópodes.

2.1 Objetivos Específicos

- Estudar a resposta imune dos quilópodes, avaliando se a produção de moléculas bioativas é constitutiva ou se são produzidas após o desafio microbiano, utilizando como modelo de experimentação as lacraias do gênero *Otostigmus cavalcanti*.
- Isolar moléculas com atividade antimicrobiana presentes na hemolinfa (hemócitos e plasma) e no extrato total de duas espécies de quilópodes: *Scolopendra viridicornis* e *Otostigmus cavalcanti*.
- Caracterizar as moléculas que apresentam atividade antimicrobiana. Avaliar o espectro de atividade das moléculas antimicrobianas isoladas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados exemplares de lacraias do gênero *Otostigmus cavalcanti* e *Scolopendra viridicornis* (Scolopendromorphae) (**Figura 3**), de ambos os gêneros e em diferentes estágios de desenvolvimento, coletados no Instituto Butantan (São Paulo/SP, Brasil) e no município de Peixe (Tocantins/TO, Brasil), respectivamente, sob licença do IBAMA número 11024-3/2008.

Figura 3- Espécies utilizadas como modelo experimental. (A) *Otostigmus cavalcanti* (B) *Scolopendra viridicornis*.

As lacraias foram mantidas em cativeiro sob condições de extrema higiene durante pelo menos 7 dias antes da realização de qualquer experimento. Os exemplares de *O. cavalcanti* foram alimentadas com larvas de *Tenebrio molitor* e os de *S. viridicornis* com camundongos neonatos.

3.2 Hemolinfa

3.2.1 Extração de hemolinfa

Para a coleta do material, os animais foram previamente anestesiados com CO₂. A hemolinfa foi obtida através de punção do vaso dorsal, na

membrana localizada entre o sétimo e o oitavo segmento do corpo (**Figura 4**) com a utilização de seringas apirogênicas. Para evitar a degranulação dos hemócitos e conseqüentemente a coagulação da hemolinfa, a coleta foi realizada na presença de tampão de citrato de sódio (NaCl 0,45 M; glicose 0,1 M; citrato trissódico 30 mM; ácido cítrico 26 mM; EDTA 10 mM) como anticoagulante em pH 4,6 (2 volumes de hemolinfa: 1 volume de tampão) (SÖDERHALL e SMITH, 1983).

Figura 4- Extração de hemolinfa. A hemolinfa foi coletada por punção do vaso dorsal, na membrana entre o sétimo e o oitavo segmento do corpo.

Para a imunização experimental, os animais foram inoculados na região dorso-lateral do tronco, na membrana entre o sétimo e o oitavo segmento do corpo, com 20 μ L de uma solução de bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* SBS 363 e bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* A270 (4×10^4 células). Após 72 horas, a hemolinfa foi extraída e os animais (n=7), passaram por um processo de maceração (modificado de SILVA et al., 2000). A imunização foi realizada somente em exemplares de *Otostigmus cavalcanti*, e destes, um grupo (n=7) foi mantido sem imunização (grupo controle).

Foram utilizados dois espécimes de *S. viridicornis* para a coleta de hemolinfa cujo volume final total foi de aproximadamente 2 mL. Da coleta realizada com os espécimes de *O. Cavalcanti* (n = 14) foi obtido um volume final de 500 µL de cada grupo (induzido e controle).

A hemolinfa foi centrifugada a 800 x g durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante (plasma) foi separado do *pellet* (hemócitos) para que estes pudessem ser analisados separadamente.

O plasma foi concentrado em uma centrífuga a vácuo (Savant Instruments, EUA). Os hemócitos foram submetidos à lavagem em tampão citrato de sódio e centrifugados a 800 x g durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado.

3.2.2 Extração e Purificação das Moléculas Bioativas

3.2.2.1 Plasma

Após concentração em uma centrífuga a vácuo (Speed Vac, Savant Instruments, Inc), o plasma das lacraias imunizadas e não imunizadas foi ressuspenso em água Milli-Q acidificada (ácido trifluoroacético [TFA] 0,05%). A solução foi mantida em banho de gelo durante 30 minutos, sob agitação constante. O sobrenadante, obtido por centrifugação a 16.000 x g por 30 minutos a 4° C (Centrifuge 5804R Eppendorf Instruments, Inc), foi aplicado em três cartuchos Sep-Pak C18 (Water Associates) ligados em série e equilibrados com água acidificada. Três eluições foram realizadas utilizando-se diferentes concentrações de acetonitrila (5, 40 e 80%) em água acidificada.

Após a eluição, as frações obtidas foram concentradas em centrífuga a vácuo, ressuspenso em água Milli-Q acidificada (TFA 0,05%), e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (**CLAE**). A purificação foi realizada utilizando sistema UFLC Shimadzu modelo Prominence com coluna de fase reversa semipreparativa do tipo JUPITER C18 (250 mm x 10 mm, Phenomenex™) em um gradiente de concentração de 0 a 20% para fração de

5%, de 2 a 60% fração de para 40% e de 20 a 80% para a fração de 80% de acetonitrila acidificada (ACN/TFA) durante 60 minutos com um fluxo de 1,5 mL/min. As frações coletadas manualmente, foram concentrados em centrífuga a vácuo (Savant Instruments, Inc) e reconstituídas em água Milli-Q.

A presença de atividade antimicrobiana nestas frações foi determinada por ensaio de inibição de crescimento em meio líquido **(Materiais e Métodos 1.5)**.

As frações nas quais foram observadas atividade antimicrobiana, mas não apresentavam total pureza ao serem analisadas por espectrometria de massa do tipo Maldi-TOF, passaram por um processo repurificação. Esta nova etapa consistiu em uma purificação por CLAE utilizando-se uma coluna de fase reversa analítica do tipo JUPITER C18 (250 mm x 4.60 mm, Phenomenex™) em diferentes gradientes de concentração e um fluxo de 1 mL/min.

3.2.2.2 Hemócitos

Os hemócitos das lacraias foram concentrados em uma centrífuga a vácuo e, após este processo, macerados em presença de ácido acético 2 M. A solução foi mantida em banho de gelo durante 30 minutos, com agitação constante. O sobrenadante, obtido por centrifugação a 16.000 x g por 30 minutos a 4 °C, foi aplicado em cartuchos Sep-Pak C18 (Water Associates) ligados em série (três) e equilibrados com água acidificada com o objetivo de pré-purificar as moléculas bioativas. Três eluições foram realizadas utilizando-se diferentes concentrações de acetonitrila em água acidificada (5, 40 e 80%).

Após esta eluição, o processo de purificação foi o mesmo já realizado anteriormente para o plasma.

3.3 Extrato Total

Após a extração de hemolinfa, foi retirada a cabeça dos exemplares já anestesiados e o ultimo segmento e seus corpos foram fracionados e macerados num almofariz de cerâmica em presença de acetonitrila 50% e banho de gelo e depois filtrado (2 vezes). O material obtido foi centrifugado a 16.000 x g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi concentrado em centrifuga a vácuo.

3.3.3 Purificação das Moléculas Bioativas

O material obtido nas diferentes extrações foi centrifugado a 16.000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi concentrado em centrífuga a vácuo, ressuspenso em água acidificada (TFA 0,05%) e aplicado em colunas Sep-Pak C18 (Water Associates), ligadas em série (três), equilibradas com água acidificada com o objetivo de pré-purificar as frações com atividade antimicrobiana. Três eluições foram realizadas utilizando-se diferentes concentrações de acetonitrila (5, 40 e 80%) em água acidificada. As frações 5, 40 e 80% passaram pelo mesmo processo de purificação previamente descrito **(Materiais e Métodos 3.2.2)**.

Também foi avaliada a presença de atividade antimicrobiana no material hidrofílico (0%) que não foi retido pela resina da Sep-Pak C18. Esta foi concentrada em centrífuga a vácuo, ressuspensa em acetato de amônio 50 mM, e submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A purificação foi realizada em modo isocrático utilizando o cromatógrafo da Shimadzu modelo SCL- 8^a com uma coluna de troca iônica (Asahipack GS-320 HQ) tendo como fase móvel acetato de amônio 50 mM durante 50 minutos com um fluxo de 1 mL/min. As frações e os picos coletados manualmente foram concentrados em centrífuga a vácuo (Savant Instruments, Inc) e posteriormente reconstituídas em água Milli-Q.

A presença de atividade antimicrobiana nestas frações e nos picos determinou-se por ensaio de inibição de crescimento em meio líquido **(Materiais e Métodos 3.4)**.

Os picos que apresentaram atividade antimicrobiana passaram por uma nova etapa de purificação por cromatografia líquida utilizando um cromatógrafo AKTA P-900 e coluna de filtração Superdex-Peptide HR 1030 (Amersham Biosciences) tendo como fase móvel acetonitrila 30% e com um fluxo de 0,5 mL/min. As frações coletadas manualmente passaram por um novo teste para determinar a atividade antimicrobiana.

Após análise por espectrometria de massas **(Materiais e Métodos 3.5)** observou-se que as frações ainda não estavam puras e por isso passaram por um terceiro passo de purificação por cromatografia de interação hidrofóbica **(HIC)**. Nessa etapa, foi utilizado um equipo LC-MicroTOF-QII acoplado a um sistema de cromatografia líquida, com uma coluna Zic-HILIC (Sequant- Merck), com um gradiente de ACN 90% (carregada com formiato de amônio 5 mM com 0,05% de ácido fórmico) de 100 a 30%, com um fluxo de 1,5 mL/min.

O efluente da coluna foi dividido na razão 1:20, sendo uma parte enviada ao MS e o resto coletado manualmente para novos testes antimicrobianos.

3.4 Bioensaios

3.4.1 Bactérias e Fungos

A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando-se ensaios contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos.

Os organismos utilizados nos ensaios foram: *Micrococcus luteus* A270 (bactéria Gram-positiva), *Escherichia coli* SBS 363 (bactéria Gram-negativa) e as leveduras *Candida tropicalis* IOC 4560 e *Candida albicans* MDM8.

Para a atividade antimicrobiana, foi utilizado o ensaio de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido (BULET et al., 1993). O ensaio foi realizado em placas de 96 poços com uma alíquota de 10 ou 20 µL das frações

ativas e 90 ou 80 μL do microrganismo no meio de cultivo e em fase logarítmica de crescimento, na concentração final de 10^5 céls/mL para bactérias e 10^4 céls/mL para leveduras em cada poço.

O meio de crescimento utilizado para as leveduras continha dextrose de batata na concentração 12 g/L (Potato Dextrose Broth – PDB- Difco™, Houston, EUA; *half strength*) e para as bactérias foi usado um meio de cultura pobre em nutrientes (PB: peptona 10 g/L; NaCl 5 gr/L; Ph 7,4).

O crescimento bacteriano é analisado por medida da densidade óptica da cultura, num leitor de microplaca Victor 3 – 1420 (PerkinElmer) a 595 nm, após 18 horas de incubação a 30° C sob agitação constante.

3.4.2 Parasitas

As formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* da linhagem LV79, procíclicas de *Trypanosoma brucei* da linhagem 427 e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* da linhagem CL-14, foram cultivadas em seus respectivos meios (199, SDM-79 e LIT) suplementados com 10% de soro fetal bovino e mantidos a 28 °C em pH: 7,5. Para os ensaios, foram utilizados os tripanossomatídeos na fase exponencial de crescimento em placas de 96 poços.

O controle de inibição foi realizado com 200 μM de rotenona e 0,5 μM de antimicina.

A cada 24 h de crescimento foram realizadas leituras por fluorimetria (ELX800/BIOTEK®) com uma absorbância de 620 nm, durante 7 dias. A densidade celular foi calculada, analisada e comparada utilizando test Wilcoxon não paramétrico.

3.5 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas foi utilizada para avaliar a pureza das moléculas durante as etapas de purificação, para verificar a massa das

moléculas que apresentaram atividade antimicrobiana e para determinar a estrutura primária dos peptídeos antimicrobianos.

3.5.1 Grau de pureza e Massas Moleculares das frações bioativas

Para verificar o grau de pureza e as massas moléculas com atividade antimicrobiana foram utilizadas as técnicas de MALDI-ToF/MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/ mass spectrometry), ou ESI-MS (Electrospray Ionization – Mass Spectrometry).

O equipamento utilizado para a espectrometria de massa por MALDI-ToF foi um espectrômetro Ettan MALDI-TOF/Pro (Amershan Biosciences, Suécia), operando em modo reflectron (para valores de massa/carga $[m/z]$ de 200 até 800 para moléculas pequenas e de 500 à 10.000 para peptídeos em geral) e positivo, isto é, detectando íons carregados positivamente. Usou-se como matriz a solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em ACN/H₂O 1:1.

Os espectros foram obtidos após cinco minutos do início da leitura ou pelo acúmulo de 200 espectros simples. A energia do laser no começo da análise era de 34% e posteriormente foi calibrado com um padrão de peso molecular contendo os peptídeos angiotensina II e P14R (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) com massas moleculares monoisotópicas de 1.045,53 e 1.532,86 Da., respectivamente.

Nas análises feitas por ESI-MS utilizou-se um espectrômetro LCQ Duo® (Thermo Finnigan, EUA), operando em modo positivo e previamente calibrado com cafeína (m/z 192,5), acetato de L-MRFA (m/z 524,3) e Ultramark 1621 (m/z 1022, 1122, 1222, 1322, 1422, 1522, 1622, 1722, 1822 e 1922).

O software utilizado na análise dos espectros foi o Xcalibur 2.0 (Thermo Electron, EUA). A deconvolução dos m/z obtidos para a obtenção das massas moleculares das frações analisadas foi realizada no software MagTran 1.02 (ZHANG e MARSHALL, 1998) ou MassAnalyzer 1.03 (Amgen, Thousand Oaks, CA, EUA).

As frações da porção hidrofílica também foram analisados por ESI-MS com um MicroTOF-QII, operada no modo positivo a 4.500V, *drying gás* a 4 L/min a 250 °C, operando para identificar valores de m/z 50 a 3000.

3.5.2 Seqüenciamento dos Peptídeos Antimicrobianos

A estrutura primária dos peptídeos presentes nas frações com atividade antimicrobiana foi determinada através da técnica de seqüenciamento “de novo” (CANTU et al., 2008; SEIDLER et al., 2010) dos seus espectros de fragmentação obtidos por ESI-Q-ToF/MS (“Eletrospray Ionization-Quadrupole-Time of Flight/Mass Spectrometry”) em um equipamento Q-Tof Ultima™ API (Micromass, UK) acoplado a uma fonte de cromatografia líquida em nano-escala nanoACQUITY UltraPerformance LC® (Waters).

As frações foram ressuspensas em 20 µL de ACN/H₂O 1:1 com ácido fórmico 0,1% e submetidos a análise por infusão direta sob o fluxo de 0,5 µL/min em uma seringa de 50 µL (Hamilton, Reno, NV, EUA). A fragmentação dos íons mono ou duplamente carregados foi realizada sob diferentes energias de colisão (Ecol) contra gás inerte (argônio). Os espectros foram obtidos cada 0,5 segundo e a composição final de espectros foi obtida após três minutos de aquisição.

Para a obtenção da estrutura primária dos peptídeos presentes nas frações com atividade antimicrobiana foi usada a técnica de seqüenciamento “de novo”, onde os espectros obtidos foram deconvoluídos e avaliados utilizando o software MaxLynx 4.1 com a ferramenta MaxEnt3, para que os íons com mais de uma carga fossem convertidos em monocarregados. A sinalização dos valores de m/z correspondentes as seqüências y e b foi feita com o auxílio do aplicativo “Peptide Sequencing” (MassLynx 4.1-Waters).

3.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear (NMR) foi utilizada para elucidar a estrutura das frações com atividade antimicrobiana do material hidrofílico do extrato total do corpo de *S. viridicornis*.

Esta análise foi feita em espectrômetro de 500 MHz (modelo Avance DRX500) da marca Bruker, e o processamento do espectro foi realizado no TOPSPIN 1.3

Os espectros de RMN de ^1H foram realizados utilizando-se a sequência de pulsos zg30 após a amostra ser ressuspensa em 200 μL de água deuterada D_2O . Estes foram adquiridos, com um número de aquisição (NS: 512), tempo de aquisição (AQ:5,033 s), número de pontos utilizados na aquisição do espectro (TD:65536), janela espectral (SWH: 6510,417 Hz), tempo de espera entre as aquisições (D1: 1 s), duração do pulso de 90° (P1: 8,7 s), e o valor do ganho do receptor (RG: 7,1). No processamento foi utilizado o preenchimento por zeros, *zero-filling*, isto é, utilização do mesmo número de pontos que na aquisição do espectro (SI:65536) e a multiplicação exponencial *Line Broadening* (LB: 0,3 Hz). Foi feita a correção automática da linha de base.

3.7 Busca e análise em Bancos de Dados

Os parâmetros físico-químicos das seqüências (i.e pI) com o aplicativo disponível no ExPASy: *ProtParam* (GATTIKER et al., 2003) do *Swiss Institute of Bioinformatics* (<http://web.expasy.org/protparam/>).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho realizou-se uma avaliação da atividade e da produção de moléculas com atividade antimicrobiana por parte de duas espécies de quilópodes: *Otostigmus cavalcanti* e *Scolopendra viridicornis*. As análises foram realizadas utilizando-se as frações obtidas da hemolinfa (plasma e hemócitos) e do extrato total do corpo após purificação por FR-CLAE, através de ensaios de inibição de crescimento microbiano em meio líquido (Ver 3.4).

4.1 *Otostigmus cavalcanti*

4.1.1 *Comparação da atividade antimicrobiana na hemolinfa entre animais desafiados e controle*

Visando verificar se nos quilópodes é necessário um estímulo prévio no sistema imune para a produção de peptídeos e moléculas com atividade antimicrobiana, foram inoculados 20 μ L de uma solução de *E. coli* e *M. luteus* (4×10^4 células) na região dorso-lateral do tronco das lacraias (n=7), na membrana entre o sétimo e o oitavo segmento do corpo. 300 μ L de hemolinfa foram coletados após 72 horas do estímulo, tendo outro grupo (n=7) como controle, onde também foram coletados 300 μ L de hemolinfa total (ver 3.1).

Nos perfis observados após a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (FR-CLAE) das diferentes frações obtidas dos grupos desafiado e não desafiado de *O. cavalcanti*, observaram-se diferenças importantes na atividade antimicrobiana (**Figuras 5 e 6**).

Figura 5- Análise comparativa do perfil cromatográfico (FR-CLAE) do extrato ácido de hemócitos e da atividade antimicrobiana de animais induzidos e não induzidos de *O. Cavalcanti* da eluição 40% de ACN. As amostras foram obtidas utilizando Coluna Júpiter C18 Semipreparativa com gradiente linear de 2 a 60% de ACN durante 60 min. e fluxo de 1,5 mL/min. A linha vermelha refere-se à resposta obtida quando utilizamos os hemócitos de animais desafiados, as frações que apresentaram atividade antimicrobiana foram representadas pela letra **A** e acompanhadas por número; * Moléculas presentes somente no perfil do grupo induzido. A linha preta é o perfil resultante da purificação do extrato ácido de hemócitos de animais não estimulados (controle), representadas pela letra **B** e acompanhadas por número as frações com atividade antimicrobiana.

Figura 6- Análise comparativa do perfil cromatográfico (FR-CLAE) do extrato ácido de plasma e da atividade antimicrobiana de animais induzidos e não induzidos de *O. cavalcanti* da eluição 40% de ACN. As amostras foram obtidas utilizando Coluna Júpiter C18 Semipreparativa com gradiente linear de 2 a 60% de ACN durante 60 min, e fluxo de 1,5 mL/min. A linha vermelha refere-se à resposta obtida utilizando o plasma de animais desafiados, representadas pela letra **A** e acompanhadas por número são as frações que apresentaram atividade antimicrobiana. A linha preta é o perfil resultante da purificação dos hemócitos não induzidos (controle), representadas pela letra **B** e acompanhadas por número as frações com atividade antimicrobiana.

Como mencionado anteriormente (Ver 1.1.1), nos invertebrados, os peptídeos e moléculas antimicrobianas podem ser produzidos constitutivamente ou após indução. Nos hexápodes de maneira geral e insetos holometábolos mais especificamente, estes peptídeos são produzidos principalmente no corpo gorduroso e sua síntese é induzida logo após de uma infecção ou injúria para posteriormente, ser liberados na hemolinfa (LAMBERTY et al., 2001). Estudos realizados a esse respeito, em *Drosophila*

melanogaster, mostram uma rápida resposta do sistema imune, chegando a alcançar sua máxima atividade de produção de moléculas antimicrobianas entre 6 a 24 horas depois de recebido um estímulo (BULET et al., 1999).

Em contraste, nos insetos hemimetábolos, os peptídeos antimicrobianos estão presentes constitutivamente nos hemócitos granulares (LAMBERTY et al., 2001). Isto também é observado em outros invertebrados como nos moluscos e nos quelicerados, onde peptídeos antimicrobianos estão armazenados nos hemócitos granulares e são liberados na hemolinfa (DESTOUMIEUX et al., 2000).

Neste contexto, e pelos perfis observados de cromatografia líquida de alta eficiência (FR-CLAE) foi observada uma diferença importante entre o grupo controle e o grupo desafiado previamente. Esta diferença confirmou-se com os resultados das atividades onde se observou uma maior atividade antimicrobiana nas frações obtidas de animais que receberam um estímulo prévio em comparação com animais não estimulados.

Pelo anterior, pode observar-se um alto índice de que o sistema imunológico destes animais não é totalmente constitutivo, sendo necessário um estímulo prévio para a produção das moléculas antimicrobianas. Esta hipótese se vê suportada pelo estudo apresentado pelo Xilander em 2009, onde ele relatava que as substancias antimicrobianas podiam ser encontradas permanentemente ou serem produzidas após uma injúria ou infecção. Ele observou uma maior atividade antimicrobiana após 72 horas da injúria, o que é bastante lento quando comparado com insetos (estes apresentam ou seu ápice de atividade entre 6 a 24 horas após receber o estímulo).

É importante salientar que, ao analisar as atividades específicas de cada fração, foi possível observar que as frações obtidas dos hemócitos (dos dois grupos), apresentaram atividade específica contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* (**Tabela 3**). Estes resultados apresentam uma nova atividade na hemolinfa de miriápodes, uma vez que em estudos anteriores só tinha sido detectada atividade contra bactérias Gram-positivas no extrato total da hemolinfa de miriápodes (XILANDER e NEVERMANN, 1999).

Por outro lado, a atividade antimicrobiana do plasma dos grupos induzido e controle, (**Tabela 3**), evidenciaram um espectro mais amplo de atividade contra microrganismos quando comparados com o material obtido dos hemócitos. Isto pode ser explicado dado que o conteúdo de moléculas bioativas dos hemócitos é liberado no plasma após infecção pela degranulação dos mesmos (HOFFMAN, 2004).

A atividade encontrada contra a levedura *C. tropicalis* até o momento é sob nosso conhecimento o primeiro registro de atividade antifúngica no plasma de quilópodes e de miriápodes. Porém deve ser lembrado que na medicina tradicional oriental (MTO) uma das aplicações do “pó de lacraia” é para tratar a tuberculose fungo-bacteriano e a micose de pele (PEMBERTON, 1999; YOON 2006). Neste contexto a análise e caracterização destas frações pode ser um alvo interessante para futuros estudos em quilópodes.

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana apresentada pelas diferentes frações obtidas por FR-CLAE do extrato ácido de plasma e hemócitos (induzido e controle) do material eluído a 40% de ACN da hemolinfa de *O. cavalcanti*.

HEMÓCITOS				
CARACTERISTICA		MICROORGANISMO		
AMOSTRA	FRAÇÃO	<i>M. luteus</i> A270	<i>E. coli</i> SBS363	<i>C. tropicalis</i> IOC 4560
HONI 40%	1B	--	X	--
HOI 40%	1A	--	X	--
	2A	--	X	--
	3A	--	X	--
PLASMA				
AMOSTRA	FRAÇÃO	<i>M. luteus</i> A270	<i>E. coli</i> SBS363	<i>C. tropicalis</i> IOC 4560
PONI40%	1B	--	--	X
	2B	--	X	X
	3B	X	--	--
POI40%	1A	--	--	X
	2A	--	--	X
	3A	--	X	X
	4A	X	--	--

A atividade antimicrobiana foi avaliada contra três microrganismos: *M. luteus*, *E. coli* e *C. tropicalis*, e foi sinalizada como: X- atividade; -- sem atividade. (HONI- hemócitos *Otostigmus* não induzido; HOI- hemócitos *Otostigmus* induzido; PONI- Plasma *Otostigmus* não induzido; POI- Plasma *Otostigmus* induzido).

Já a análise dos perfis cromatográficos, obtidos por FR-CLAE do extrato ácido de plasma e hemócitos (induzido e controle) do material eluído a 5 e 80% de ACN da hemolinfa de *O. cavalcanti*, não apresentaram diferenças significativas.

4.1.2 Extrato Total

Os corpos dos dois grupos de lacraias (estimulado e controle) foram macerados (sem a cabeça e o último segmento), após de ter extraído a hemolinfa, e submetidos à extração em fase sólida com cartuchos Sep-Pak® C18. Foram realizadas três eluições utilizando-se diferentes concentrações de acetonitrila (5, 40 e 80%) em água acidificada. O material eluído a 5, 40 e 80% de ACN (porção hidrofóbica), sendo também coletado e avaliado o material que não foi retido pela resina da Sep-Pak® C18 identificado como 0% (Fração hidrofílica). O material foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência. As frações obtidas nas cromatografias foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana por meio do ensaio de inibição de crescimento em meio líquido e posteriormente as que apresentaram atividade tiveram sua pureza avaliada.

4.1.2.1 Frações Ativas da Porção Hidrofóbica

Depois da extração em fase sólida por Sep-Pak C18 do extrato total dos grupos controle e estimulados de *O. cavalcanti*, foram obtidas três frações eluídas a 5, 40 e 80% de ACN, que foram submetidas à FR-CLAE utilizando-se uma coluna semipreparativa (**Ver 3.3.1**). As frações obtidas nas cromatografias após a coleta manual tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada por ensaio de inibição de crescimento em meio líquido (**Materiais e métodos 3.4**).

Com o intuito de verificar se nos quilópodes é necessário um estímulo prévio para a produção de peptídeos e moléculas com atividade antimicrobiana no extrato total, um grupo de 7 lacraias foi inoculado com 20 µL de uma solução de *E. coli* e *M. luteus* (4×10^4 células) na região dorsoventral do tronco dos animais. O processo de extração (**ver 3.3**) foi realizado 72 horas após do estímulo. Tendo outro grupo como controle.

Nos perfis observados após a análise por cromatografia líquida de alta eficiência das diferentes frações obtidas dos grupos: desafiado e não desafiado de *O. cavalcanti*, observaram-se diferenças na atividade antimicrobiana, na

estimulação de frações presentes constitutivamente e na produção de possíveis novas moléculas (**Figuras 7 e 8**).

Figura 7- Análise comparativa do perfil cromatográfico da primeira purificação por FR-CLAE e da atividade antimicrobiana entre o extrato total induzido e não induzido de *O. Cavalcanti* da eluição 5% de ACN. As amostras foram obtidas da extração branda do extrato total, utilizando Coluna Júpiter C18 semi-preparativa com gradiente linear de 0 a 20% de ACN durante 60 min. e fluxo de 1,5 mL/min. A linha vermelha refere-se à resposta obtida no extrato total dos animais induzidos, representadas por a letra A e acompanhadas por numero estão às frações que apresentaram atividade antimicrobiana; * Moléculas presentes somente no perfil do grupo induzido. A linha preta é o perfil resultante da purificação do extrato total dos animais não induzidos (controle), representadas por a letra B e acompanhadas por numero estão às frações com atividade antimicrobiana.

Figura 8- Análise comparativa do perfil cromatográfico da primeira purificação por FR-CLAE e da atividade antimicrobiana entre o extrato total induzido e não induzido de *O. Cavalcanti* da eluição 40% de ACN. As amostras foram obtidas da extração branda do extrato total, utilizando Coluna semipreparativa Júpiter C18 com gradiente linear de 2 a 60% de ACN durante 60 min. e fluxo de 1,5 mL/min. A linha vermelha refere-se à resposta obtida no extrato total dos animais induzidos, representadas por a letra **A** e acompanhadas por numero estão às frações que apresentaram atividade antimicrobiana; * Moléculas presentes somente no perfil do grupo induzido. A linha preta é o perfil resultante da purificação do extrato total dos animais não induzidos (controle), representadas por a letra **B** e acompanhadas por numero estão às frações com atividade antimicrobiana.

Como mencionado na análise realizada na hemolinfa no presente estudo nos invertebrados, a produção das moléculas com atividade antimicrobiana pode ser constitutiva ou depender de um estímulo prévio. Neste contexto, e pelos perfis obtidos por FR-CLAE onde foram observadas diferenças importantes entre o grupo controle e o grupo induzido, sendo esta diferença confirmada com os resultados das atividades onde se observou uma maior atividade antimicrobiana nas frações obtidas dos animais que receberam um estímulo prévio em comparação com os animais controle, pode se especular que

o sistema imune dos quilópodes não é totalmente constitutivo, sendo necessário um estímulo prévio para a produção das moléculas antimicrobianas.

Esta hipótese se vê suportada pelos dados obtidos nas análises da hemolinfa do presente estudo (ver 4.1.1) e as análises realizadas pelo Xilander no 2009, onde é relatada a presença constitutiva e a produção após de injúria das substâncias antimicrobianas na hemolinfa.

Por outro lado ao analisar as atividades específicas das frações foram observadas frações ativas contra os três microorganismos testados, observando-se uma maior atividade no extrato total dos animais que receberam um estímulo prévio (**Tabela 4**) sendo que as frações obtidas após FR-CLAE da eluição de 5% de ACN do grupo controle não apresento atividade contra nenhuma dos microorganismos.

Devido à importância destes animais na MTO, a análise das moléculas do corpo de lacraia tem levado ao isolamento de várias moléculas com bioatividade já foram descritas do extrato total do quilópode *Scolopendra subspinipes mutilans* como a escolonase, uma serina protease com atividade fibrinolítica (YOU et al., 2010) e a centipedina uma coumarina com atividade contra a bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* (KIM, 1998). Neste contexto a análise e caracterização destas frações pode ser um alvo interessante para futuros estudos em quilópodes.

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana apresentada pelas diferentes frações obtidas por FR-CLAE da extração ácida do extrato total (Induzido e Controle) de *O. cavalcanti*.

CARACTERISTICA		MICROORGANISMO		
AMOSTRA	FRAÇÃO	<i>M. luteus</i> A270	<i>E. coli</i> SBS363	<i>C. albicans</i> MDM8
COI 5%	1A	X	--	X
	1B	--	--	X
CONI40%	2B	--	X	--
	1A	X	--	--
COI40%	2A	X	--	X
	3A	--	X	X
	4A	--	X	--

A atividade antimicrobiana foi avaliada contra três microrganismos: *M. luteus*, *E. coli* e *C. albicans*, e foi sinalizada como: **X**– atividade; -- sem atividade. (**CONI**– corpo *Otostigmus* não induzido; **COI**– corpo *Otostigmus* induzido).

Já a análise dos perfis cromatográficos, obtidos por FR-CLAE da extração ácida do extrato total (Induzido e controle) do material eluído a 80% de *Otostigmus cavalcanti*, não apresentaram diferenças significativas

4.1.2.2 Frações Ativas da Porção Hidrofílica do Extrato total

Para avaliar a presença de atividade antimicrobiana no material hidrofílico (0%) que não foi retido pela resina da Sep-Pak C18, a fração “0%” foi concentrada em centrífuga a vácuo, ressuspensa em Acetato de Amônio 50 mM e submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (**Materiais e Métodos 3.3.1**) utilizando-se uma coluna Asahipack GS-320 com um gradiente isocrático de Acetato de Amônio 50 mM (**Figura 9**). As frações obtidas foram avaliadas por meio do ensaio de inibição de crescimento em meio líquido.

Três das frações coletadas após fracionamento por CLAE apresentaram atividade antimicrobiana. Estas foram identificadas de 1A a 3A. Na **Tabela 5** podemos observar as atividades antimicrobianas. Só foi detectada atividade antimicrobiana no material proveniente do extrato total do grupo que recebeu um estímulo prévio. Nenhuma das frações apresentou atividade antifúngica.

Figura 9- Cromatograma obtido na primeira etapa de purificação da fração hidrofílica (0%) do extrato total de *O. cavalcanti* por CLAE. As amostras obtidas da porção hidrofílica do extrato total de *O. cavalcanti* foram purificadas utilizando uma Coluna Asahipack GS-320 com gradiente isocrático de Acetato de amônio durante 60 mins e fluxo contante de 1,0 mL/min. Três frações apresentaram atividade antimicrobiana e foram identificadas de 1A a 3A.

Tabela 5- Atividade antimicrobiana apresentada pelas diferentes frações obtidas da porção hidrofílica do extrato total do corpo de *O. cavalcanti* (OC0%).

CARACTERISTICA		MICROORGANISMO			
AMOSTRA	FRAÇÃO	<i>M. luteus</i> A270	<i>E. coli</i> SBS363	<i>L. (L.)</i> <i>Amazonensis</i> LV79	<i>T. brucei</i> 427
OC0%	1A	X	X	X	--
	2A	X	X	--	--
	3A	--	X	--	X

A atividade anti- bacteriana foi testada em dois microorganismos *M. luteus* e *E. coli* e a anti-parasítica contra dois parasitas *L. (L.) amazonensis* e *T. brucei* e foi sinalizada como: **X** atividade; -- sem atividade.

Na análise das frações 1A e 3A, também foi detectada atividade antiparasítica. A fração 1A apresentou atividade contra *L. (L.) amazonensis* e a fração 3A apresentou atividade contra *T. brucei*. Após aplicar o teste de Wilcoxon não paramétrico, para a análise dos resultados, observou-se uma diferença significativa na densidade celular entre estas duas amostras e os controles principalmente após passadas 120 horas para *L. (L.) amazonensis* e 96 horas para *T. brucei* (**Figuras 10 e 11 respectivamente**).

Figura 10- Atividade antiparasítica contra *Leishmania (L.) amazonensis* da fração 1A da porção hidrofílica (0%) do extrato total de *O. cavalcanti* (induzido) após a primeira purificação por CLAE. A atividade foi confirmada após o teste não paramétrico de Wilcoxon onde foi observada uma diferença significativa nas densidades celulares entre o controle positivo e a amostra em presença do parasita. A maior diferença foi observada após 120 horas.

Figura 11- Atividade antiparasítica contra *Trypanosoma brucei* da fração 3A da porção hidrofílica (0%) de extrato total de *O. cavalcanti* (induzido) após a primeira purificação por CLAE. A atividade foi confirmada após o teste não paramétrico de Wilcoxon onde foi observada uma diferença significativa nas densidades celulares entre o controle positivo e a amostra em presença do parasita. A maior diferença foi observada após 96 horas.

Visando purificar as moléculas com atividade antimicrobiana, a fração 1A passou por uma segunda etapa de purificação por CLAE utilizando-se uma coluna de filtração em gel (Superdex Peptide), com um gradiente isocrático de ACN 30%. As frações foram coletadas manualmente para serem utilizadas no ensaio de inibição em meio líquido para confirmar sua atividade.

O perfil cromatográfico da fração **1A (Figura 12)** evidenciou a presença de diferentes moléculas na amostra, duas destas frações confirmaram sua atividade antibacteriana (**1A_1 e 1A_2**). A atividade antiparasítica destas frações ainda não foi confirmada.

Figura 12- Cromatograma obtido na segunda etapa de purificação da fração 1A da porção hidrofílica (0%) do extrato total de *O. cavalcanti* por CLAE. As amostras obtidas da porção hidrofílica do extrato total de *O. cavalcanti* foram purificadas utilizando uma Coluna Superdex Peptide com gradiente isocrático de ACN 30% por 50 mins e fluxo contante de 0,5 mL/min. Duas frações apresentaram atividade antimicrobiana e foram identificadas como 1A_1 e 1A_2.

A análise por espectrometria de massa da fração ativa 1A_1 revelou uma molécula pura, cujo valor de m/z (378,833) foi obtido por MALDI-ToF/MS. De acordo com os padrões isotópicos, com picos espaçados em 1 Da, pode-se perceber que os íons são monocarregados, confirmando a massa molecular (Figura 13).

Figura 13- Espectro de massa obtido por MALDI-ToF da fração ativa 1A_1 da porção hidrofílica do extrato total de *O. Cavalcanti* após segundo passo purificação por CLAE. Espectro de massa da fração com atividade antibacteriana obtido por MALDI-ToF apresentou uma única molécula com uma massa de 377,836 Da.

A análise por espectrometria de massa da fração 1A_2 revelou a presença diferentes moléculas pelo que com a finalidade de purificar as moléculas com atividade antimicrobiana, a fração 1A_2 foi submetida a uma terceira etapa de purificação por cromatografia de interação hidrofóbica (**HIC**), utilizando-se uma coluna Zic-HILIC (Sequant- Merck), com um gradiente de ACN 90% (carregada com formiato de amônio 5 mM com 0,05% de ácido fórmico) de 100 a 30% e com um fluxo constante de 1,5 mL/min. O efluente da coluna foi dividido na razão 1:20, sendo uma parte enviada ao MS e o resto coletado manualmente para novos testes antimicrobianos.

O cromatograma evidenciou a presença de diferentes moléculas na amostra. Duas das frações resultantes após esta etapa de purificação, identificadas como **1A_2A** e **1A_2B**, confirmaram atividade contra *E. coli* (**Figura 14**).

Figura 14- Perfil cromatográfico após a terceira etapa de purificação por HIC da fração 1A_2. A fração ativa 1A_2 foi submetida a um terceiro passo de purificação por cromatografia de interações hidrofílicas, utilizando uma coluna Zic-HILIC sob um gradiente de 100 a 30% de ACN 90% (carregada com Formiato de amônio 5 mM com 0,05% de Acido Formico) com Formiato de amônio 5 mM com 0,05% de Acido Formico e um fluxo constante de 1,5 mL/min. As frações coletadas que apresentaram atividade contra *E. coli* foram sinalizadas com um traço vermelho e identificadas como 1A_2A e 1A_2B.

Foi determinada por LC-ESI/MS a pureza e os valores de massa das moléculas presentes nas duas frações que apresentaram atividade antimicrobiana. A análise da fração 1A_2A mostrou a presença de duas moléculas, identificadas como **2A*1a** e **2A*1b**.

A análise por espectrometria de massa da fração 2A*1a apresentou 4 valores de m/z referentes aos íons com duas ($[M+2H]^{2+}$, $m/z=1136,0264$), três ($[M+3H]^{3+}$, $m/z=757,6945$), quatro ($[M+4H]^{4+}$, $m/z=568,5236$) e cinco ($[M+5H]^{5+}$, $m/z=455,0206$) cargas de uma única molécula com uma massa de 2270,0896 Da (**Figura 15**).

Quando comparados estes resultados com o espectro de massas do peptídeo antimicrobiano Gomesina, extraído dos hemócitos da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*, com uma massa molecular de 2270,4

Da (SILVA et al., 2000) foram observadas semelhanças importantes na composição dos seu espectro de íons.

A gomesina é um peptídeo com atividade antimicrobiana muito intensa, com similaridades na sua seqüência com outros peptídeos antimicrobianos encontrados em artrópodes como a tachyplesina do limulideo *Tachypleus tridentatu* (NAKAMURA et al., 1988) ou a androctonina isolada do escorpião *Androctonus australis* (EHRET-SABATIER et al., 1996).

De modo controverso com a gomesina, a fração 2A*1a apareceu na análise da porção hidrofílica do extrato total, e sendo que uma das características da gomesina é que é um peptídeo hidrofóbico, seria interessante confirmar a hidrofobicidade da fração isolada da lacraia, já que uma explicação dela estar presente neste material é que na primeira separação do material bruto com os cartuchos Sep-Pak, o cartucho poderia estar saturado permitindo que moléculas hidrofóbicas não ligassem na resina.

Neste contexto, e pela semelhança observada entre as duas moléculas, poderíamos sugerir que a fração 2A*1a, corresponderia a um peptídeo antimicrobiano Gomesina *Like*, com uma massa molecular de 2270,08 Da. Seria interessante realizar mais análises desta fração para confirmar esta hipótese.

Figura 15- Cromatograma da terceira etapa de purificação por HIC da fração ativa contra *E. coli* 1A_2A (A) e espectro de massas (B, C e D) da fração 2A*1a. A fração ativa 1A_2A foi submetida a um terceiro passo de purificação por cromatografia de interações hidrofílicas. A fração 1A_2A (A) apresentou-se composta por 2 moléculas principalmente. O CL-ESI/MS da fração 2A*1a evidenciou a presença de 4 valores de m/z referentes aos íons com duas, três, quatro e cinco cargas de uma molécula com uma massa de 2270,08 Da (B) esta apresentou padrões isotópicos, na figura (C) o íon carregado com quatro cargas e na (D) o íon carregado com 3 cargas.

A análise por espectrometria de massa da fração 2A*1b evidenciou a presença de um íon majoritário com $m/z=126,0215$, sendo também observados outros íons menos intensos pelo que conviria realizar outras análises para determinar a massa da molécula (**Figura 16**).

Figura 16- Cromatograma da terceira etapa de purificação por HIC da fração ativa contra *E. coli* 1A_2A (A) e espectro de massas (B) da fração 2A*1b. A fração ativa 1A_2A foi submetida a um terceiro passo de purificação por cromatografia de interações hidrofílicas. A fração 1A_2A (A) apresentou-se composta por 2 moléculas principalmente. O CL-ESI/MS da fração 2A*1b evidenciou a presença de um íon majoritário com um $m/z = 126,0215$ (B).

A análise da fração 1A_2B por LC-ESI/MS não foi conclusiva devido a baixa capacidade de ionização desta fração. Neste contexto sugere-se em futuros estudos realizar a análise das massas das moléculas presentes nesta fração por APCI-MS.

Conviria também em futuros análises das frações 1A_2A e 1A_2b outra etapa de purificação por HIC com um gradiente otimizado de ACN 90% (com Formiato de amônio 5 mM, 0,05% de ácido fórmico).

4.2 *Scolopendra viridicornis*

4.2.1 Hemolinfa

As moléculas com propriedades antimicrobianas presentes nos hemócitos e no plasma de *Scolopendra viridicornis* foram analisadas separadamente. O material passou por duas etapas de purificação e a atividade das frações coletadas foi confirmada por meio de ensaios de inibição de crescimento microbiano em meio líquido utilizando-se três diferentes microrganismos: *E. coli* (SBS363), *M. luteus* (A270) e *C. albicans* (MDM8). As frações que apresentaram atividade contra algum destes, foram analisadas por espectrometria de massas.

4.2.1.1 Frações Ativas: Hemócitos

O material derivado de extração ácida dos hemócitos de *S. viridicornis* passou por uma etapa de extração em fase sólida utilizando-se cartuchos Sep-Pak® C18. As frações obtidas, eluídas a 5, 40, e 80% de acetonitrila, foram submetidas à cromatografia líquida de fase reversa e após serem coletadas manualmente tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada por ensaio de inibição de crescimento em meio líquido (**Materiais e Métodos 3.4.1**).

Na análise das frações coletadas das eluições de 5 e 80%, não foi observada atividade contra nenhum dos microrganismos utilizados no ensaio.

O material eluído a 40% de ACN dos hemócitos de *S. viridicornis* (SVH 40%), após fracionamento por FR-CLAE sob um gradiente de 2 a 60% de ACN/TFA (0,05%) em H₂O/TFA (0,05%) durante 60 min, apresentou cinco frações com atividade antimicrobiana, identificadas como **H40** (hemócitos eluídos a 40% de ACN). (**Figura 17**).

Figura 17- Perfil cromatográfico da primeira etapa de purificação da extração ácida dos hemócitos *S. viridicornis*. As amostras obtidas da eluição de 40% de ACN foram purificadas utilizando Coluna Júpiter C18 Semi-preparativa com gradiente linear de 2 a 60% de ACN durante 60 min. e fluxo constante de 1,5 mL/min. A cromatografia resultou em cinco frações com atividade antimicrobiana, identificadas de H40_1 à H40_5.

A obtenção de frações com atividade antimicrobiana nos hemócitos de lacraias não desafiadas da espécie *S. viridicornis* aponta ao fato de que algumas moléculas ativas, armazenadas nos hemócitos destes animais são constitutivamente expressas da mesma maneira como já foi descrito no camarão *Panaeus vannamei* (DESTOUMIEUX et al., 1997), no caranguejo-ferradura *Tachypleus tridentatus* (SHIGENAGA et al., 1990) e na térmita *Pseudacanthotermes spiniger* (LAMBERTY et al., 2001).

De acordo com Xilander e Neverman (2009) e com o presente estudo, em quilópodes se observa a presença de frações com atividade antimicrobiana sem a necessidade de um estímulo prévio. Não obstante é observado também um aumento importante desta atividade após o animal ser estimulado.

Como mostrado na tabela 6 a fração H40_1 apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, enquanto as outras, apenas contra *M. luteus*. Nenhuma fração apresentou atividade contra a levedura *C. albicans*.

É interessante notar que estes resultados apresentam uma atividade diferente em relação aos obtidos nos hemócitos de *Otostigmus cavalcanti* (ver 4.1), , já que neste se observa uma atividade principal contra bactérias Gram-negativas, enquanto as frações de *S. viridicornis* são ativas principalmente contra bactérias Gram-positivas. Uma explicação para isto poderia ser que os espécimes de *O. cavalcanti* sofreram um estímulo prévio à extração (Ver 3.2.1) sendo injetados 72 horas antes a extração com *E. coli* e com *M. luteus* o que poderia ter induzido a produção de moléculas com atividade específica contra *E. coli*. A produção de moléculas com atividade antimicrobiana após injúria tem sido amplamente descrito em *Drosophila melanogaster* (BULET et al., 1999) e em insetos holometábolos (LAMBERTY et al., 2001).

Tabela 6- Atividade antimicrobiana apresentada pelas diferentes frações obtidas da eluição 40% de ACN após a primeira etapa de purificação por FR-CLAE do extrato ácido de hemócitos de *S. viridicornis*.

CARACTERISTICA		MICRORGANISMO	
AMOSTRA	FRAÇÃO	<i>M. luteus</i> A270	<i>E. coli</i> SBS363
SVH 40%	H40_1	X	X
	H40_2	X	--
	H40_3	X	--
	H40_4	X	--
	H40_5	X	--

A atividade antimicrobiana foi testada em dois microrganismos *M. luteus* e *E. coli* e foi sinalizada como: **X** – atividade; -- sem atividade (**SVH**- *Scolopendra viridicornis* hemócitos).

A análise por espectrometria de massas destas frações não foi conclusiva e, as frações ativas após terem sido submetidas a uma segunda etapa de purificação (dado não apresentado), não apresentaram atividade antimicrobiana em nenhuma das subfrações.

Após busca na literatura, não foi encontrado nenhum trabalho com dados de análise de espectrometria de massa da hemolinfa de miriápodes. No entanto, uma das características que poderia influenciar na ionização das moléculas é que hemolinfa destes animais é alcalina (XILANDER, 2009).

4.2.1.2 Plasma

Primeiramente, o plasma foi fracionado em uma coluna Sep-Pak® C18 em três diferentes concentrações de ACN (5, 40 e 80%). Posteriormente, o material obtido passou por cromatografia líquida de fase reversa, cujo material obtido teve sua atividade antimicrobiana avaliada por ensaio de inibição de crescimento microbiano em meio líquido (**Materiais e Métodos 3.4.1**).

Após serem submetidas ao fracionamento por FR-CLAE, com um gradiente linear de 0 á 20% de ACN de ACN/TFA (0,05%) em H₂O/TFA (0,05%) durante 60 min., duas das frações obtidas da eluição de 5% de ACN do plasma de *S. viridicornis* (SVP5%), apresentaram atividade antimicrobiana. Estas foram identificadas como P5_1 e P5_2 (Plasma eluído a 5% de ACN). (**Figura 18**).

Figura 18- Perfil cromatográfico da primeira etapa de purificação do plasma de *S. viridicornis*. As amostras obtidas na eluição de 5% de ACN foram purificadas utilizando Coluna Júpiter C18 semipreparativa com gradiente linear de 0 a 20% de ACN durante 60 min. e fluxo de 1,5 mL/min. A cromatografia resultou em duas frações que apresentaram atividade antimicrobiana identificadas como P5_1 e P5_2.

O material eluído a 40% de ACN do plasma de *S. viridicornis* (SVP 40%), após ser submetido a fracionamento por FR-CLAE utilizando-se um gradiente de 2 a 60% de ACN/TFA (0,05%) em H₂O/TFA (0,05%) durante 60 min., apresentou três frações com atividade antimicrobiana, que foram identificadas como P40 (plasma eluído a 40% de ACN) e numerados em ordem ascendente (**Figura 19**).

Figura 19- Perfil cromatográfico e atividade antimicrobiana das frações obtidas na primeira etapa de purificação do plasma de *S. viridicornis*. As amostras obtidas da eluição de 40% de ACN foram purificadas utilizando Coluna Júpiter C18 semipreparativa com gradiente linear de 2 a 60% de ACN durante 60 min. e fluxo constante de 1,5 mL/min. A cromatografia resultou em três frações identificadas de P40_1 à P40_3, que apresentaram atividade antimicrobiana.

É importante mencionar, de maneira geral, que a diferença deste perfil cromatográfico (**Figura 19**) com o da eluição de 40% de ACN do extrato ácido dos hemócitos (**Figura 17**) onde a absorbância, o número de picos e o espectro de atividade antimicrobiana é evidentemente inferior. Em *Tachypleus tridentatus*, Iwanaga e Lee (2005) descreveram que as moléculas ativas do sistema imune (como por exemplo, os PAMs) são armazenadas em grânulos pequenos no interior dos hemócitos, sendo estes liberados na hemolinfa após uma infecção ou injúria, enquanto no plasma há pouca variedade de proteínas. Desta forma, poderíamos especular que as frações ativas obtidas no plasma podem ser moléculas que originalmente estavam no interior dos hemócitos e foram liberadas após a extração.

Nas frações obtidas da eluição de 80% de ACN do plasma de *S. viridicornis* (SVP80%), após serem submetidas a fracionamento por FR-CLAE, com um gradiente linear de 20 á 80% de ACN de ACN/TFA (0,05%) em H₂O/TFA (0,05%) durante 60 min, foram encontradas três que apresentaram atividade antimicrobiana, que foram identificadas como P80_1, P80_2 e P80_3 (Plasma eluído a 80% de ACN) **(Figura 20)**.

Figura 20- Perfil cromatográfico da primeira etapa de purificação do plasma de *S. viridicornis*. As amostras obtidas da eluição de 80% de ACN foram purificadas utilizando Coluna Júpiter C18 Semipreparativa com gradiente linear de 20 a 80% de ACN durante 60 min. e fluxo constante de 1,5 mL/min. A cromatografia resultou em três frações identificadas de P80_1 à P80_3, que apresentaram atividade antimicrobiana.

Os resultados dos ensaios de inibição de crescimento microbiano em meio líquido, das frações de SVP5% apresentaram atividade contra a *E. coli* e contra a levedura *C. albicans*. Nas amostras obtidas das eluições de 40 e 80% de ACN do plasma (SVP40% e SVP80% respectivamente) foi detectada atividade

antimicrobiana contra os três microrganismos nos quais os testes foram realizados. (**Tabela 7**).

Tabela 7- Atividade antimicrobiana apresentada pelas diferentes frações obtidas das eluições 5%, 40% e 80% de ACN após a primeira etapa de purificação por FR-CLAE do plasma de *S. viridicornis*.

CARACTERISTICA		MICROORGANISMO		
AMOSTRA	FRAÇÃO	<i>M. luteus</i> A270	<i>E. coli</i> SBS363	<i>C. albicans</i> MDM8
SVP 5%	P5_1	--	X	--
	P5_2	--	--	X
SVP 40%	P40_1	--	X	X
	P40_2	--	X	--
	P40_3	X	--	--
SVP 80%	P80_1	--	X	--
	P80_2	--	--	X
	P80_3	X	--	X

A atividade antimicrobiana foi testada contra três microrganismos *M. luteus*, *E. coli* e *C. albicans*, e foi sinalizada como: x – atividade; -- sem atividade (**SVP-** Scolopendra viridicornis plasma).

Esta atividade antimicrobiana é semelhante a observada com as frações ativas do plasma de *Otostigmus cavalcanti* que apresentaram atividade contra os três microrganismos. Este dado corrobora com nossos resultados a respeito da presença de moléculas com atividade antimicrobiana constitutivamente presentes na hemolinfa dos quilópodes com um espectro de ação contra bactérias e leveduras.

A análise por espectrometria de massas desse material não foi conclusiva. Um fator que poderia estar dificultando a análise de massas é que as amostras não ionizem facilmente o que dificulta a leitura nos equipamentos utilizados.

Um outro motivo poderia ser uma baixa concentração da molécula no material a ser analisado.

4.2.2 Extrato Total

Os corpos de exemplares *S. viridicornis* (n=7) após os animais ter tido retirada a sua hemolinfa, foram macerados (sem a cabeça e o último segmento) em presença de acetonitrila 50% e submetidos à extração em fase sólida com cartuchos Sep-Pak® C18. Foram realizadas três eluições utilizando-se três diferentes concentrações de acetonitrila: 5, 40 e 80% em água acidificada (porção hidrofóbica), sendo também avaliado o material que não foi retido pela resina da Sep-Pak® C18 identificado como 0% (fração hidrofílica). Este material foi submetido à análise por cromatografia líquida. As frações obtidas nas cromatografias foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana por meio do ensaio de inibição de crescimento em meio líquido.

4.2.2.1 Frações Ativas Extrato Total Porção Hidrofóbicas

Após a extração em fase sólida por Sep-Pak C18 do extrato total de *S. viridicornis*, foram obtidas três frações eluídas a 5, 40 e 80% de ACN, que foram submetidas à FR-CLAE utilizando-se uma coluna semipreparativa (**Ver 3.3.1**). As frações obtidas nas cromatografias tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada por ensaio de inibição de crescimento em meio líquido (**Materiais e Métodos 3.4**).

Quatro das frações resultantes da eluição do extrato total de *S. viridicornis* de 5% de ACN (SVC5%), após fracionamento por FR-CLAE, com um gradiente linear de 0 a 20% de ACN de ACN/TFA (0,05%) em H₂O/TFA (0,05%) durante 60 min., apresentaram atividade antimicrobiana contra *M. luteus*. Estas foram identificadas como **C5** (corpo eluído a 5% de ACN) e numeradas em ordem ascendente. (**Figura 21**).

Figura 21- Perfil cromatográfico e sinalização das frações com atividade antimicrobiana obtidas da eluição de 5% de ACN após primeira etapa de purificação da extração branda do extrato total de *S. viridicornis*. As amostras obtidas da eluição de 5% de ACN foram purificadas utilizando Coluna Júpiter C18 Semipreparativa com gradiente linear de 0 a 20% de ACN durante 60 min. e fluxo constante de 1,5 mL/min.. A cromatografia resultou em 4 frações identificadas de C5_1 à C5_4, que apresentaram atividade antimicrobiana.

Com a finalidade de purificar as moléculas com atividade antimicrobiana, as frações foram submetidas a uma segunda etapa de FR-CLAE utilizando-se uma coluna analítica Júpiter C18. As frações foram coletadas manualmente para serem utilizadas no ensaio de atividade antimicrobiana contra o microrganismo para o qual tinham apresentado atividade após a primeira purificação por FR-CLAE.

A purificação da fração **C5_2** por FR-CLAE foi realizada sob um gradiente linear otimizado de 12 a 25% de ACN/TFA 0,05% em H₂O/TFA 0,05% durante 60 minutos. O cromatograma mostrou a presença de um pico principal **C5_2A** que foi utilizado para confirmar sua atividade anti-*M. luteus*. (**Figura 22**).

Figura 22- Cromatograma da segunda purificação por CLAE da amostra C5_1. A amostra obtida após a segunda purificação por CLAE utilizando Coluna Júpiter C18 Analítica com gradiente linear de 13 a 25% de ACN durante 60 min. e fluxo constante de 1,0 mL/min.. A cromatografia resultou em uma fração identificada como C5_2A, que apresentou atividade anti- *M. luteus*.

Posteriormente, a fração foi avaliada quanto à pureza e valores de massa das moléculas presentes por LC-ESI/MS. A análise indicou a presença de duas moléculas com massas moleculares de 848,94 e 861,96 Da, a partir da combinação de espectros individuais do cromatograma total de íons (CTI) do intervalo entre 3,10 à 4,02 min (**Figura 23**).

Visto que o aparelho detecta a relação entre massa e carga (m/z), pode-se relacionar o número de cargas presentes numa molécula aos valores de m/z dos diferentes estados de ionização, que por electrospray, confere às moléculas múltiplas cargas, podendo desta forma, ser deconvoluídas no valor da sua massa molecular.

Os espectros individuais combinados do intervalo de tempo marcado com um traço vermelho no CTI (3,13-3,61 min) mostram dois valores de m/z referentes aos íons com duas ($[M+2H]^{2+}$, $m/z= 425,632$) e três ($[M+3H]^{3+}$, $m/z= 284,349$) cargas de uma molécula com 848,94 Da de massa molecular

(Figura 23B). Os valores de m/z no espectro do intervalo marcado com um traço azul (3,7- 4,02 min) foram deconvoluidos para uma molécula com massa de 861,96 Da, pois estão relacionados ao seu íon com duas $[M+2H]^{2+}$, $m/z=431,518$ **(Figura 23C).**

É interessante observar que as duas moléculas observadas na análise por espectrometria apresentam uma baixa massa molecular (menos a 1 kDa). Isto pode indicar a presença de dois peptídeos antimicrobianos pequenos (7 a 8 resíduos de aminoácidos), mais também pode ser que estas moléculas não sejam de natureza protéica. Contudo, estudos para verificar esta hipótese não foram realizados.

Os estudos realizados até a atualidade no corpo de quilópodes só tem apresentado moléculas de baixo peso molecular e de natureza não protéica. Este é o caso do Jineol, um alcalóide com atividade citotóxica com massa molecular de 161,0477 Da. (MOON et al., 1996), e da Centipedina que apresenta uma massa de 162,1 Da. com atividade contra a bactéria *Klebsiella pneumoniae* (KIM et al., 1998).

Os resultados obtidos por LC-ESI/MS da fração C5_2A após a segunda etapa por FR-CLAE, indicaram a impureza da amostra devido à presença de duas moléculas, com massas de 848,94 e 861,94 Da, respectivamente.

Figura 23- Análise de massas por LC-ESI/MS (A) da fração ativa C5_2A. Espectros combinados dos intervalos, vermelho (B) e azul(C), do cromatograma total de íons da fração C5_2A (A), obtido por LC-ESI/MS, mostraram a presença dos íons com duas e três cargas da molécula de 848,94 Da (B) e dos íons com duas cargas da molécula de 861,96 Da (C).

Após as frações ativas **C5_1**, **C5_3** e **C5_4** terem sido submetidas a uma segunda etapa de purificação (dado não apresentado), não foi possível detectar a atividade antimicrobiana em nenhuma das frações coletadas. Especulamos que estas moléculas exerciam conjuntamente sua atividade antimicrobiana e que por este motivo, ao serem separadas no segundo passo de purificação a atividade não foi detectada. Outro motivo poderia ser que as moléculas degradaram-se.

Do material obtido da eluição de 80% de ACN do extrato total de *S. viridicornis* (SVC80%), após fracionamento por FR-CLAE, com um gradiente linear de 20 à 80% de ACN de ACN/TFA (0,05%) em H₂O/TFA (0,05%) durante 60 min. três frações mostraram-se ativas contra a bactéria Gram-positiva *M. luteus*. Nenhuma das frações apresentou atividade contra *C. albicans* ou *E. coli* (**Figura 24**).

As frações ativas foram identificadas como **C80** (corpo eluído a 80% de ACN) e numeradas em ordem ascendente.

Figura 24- Perfil cromatográfico da primeira etapa de purificação da eluição de 80% de ACN da extração branda do extrato total de *S. viridicornis*. As amostras obtidas da eluição de 80% de ACN foram purificadas utilizando Coluna Júpiter C18 semipreparativa com gradiente linear de 20 a 80% de ACN durante 60 min. e fluxo constante de 1,5 mL/min.. A cromatografia resultou em três frações identificadas de C80_1 à C80_3, que apresentaram atividade antimicrobiana.

Sobre as atividades descritas no corpo da *S. viridicornis* se observa uma maior presença de atividade contra a bactéria Gram-positiva (*M. luteus*) quando comparadas com a atividade contra leveduras e a bactéria Gram-negativa *E.*

coli. A ausência de atividade contra bactérias Gram-negativas em animais não estimulados foi observada na hemolinfa de *Scolopendra cingulata* e no diplópode *Rhapidostreptus virgator*, estes animais só apresentaram atividade contra *E. coli* quando foram desafiadas com o mesmo microorganismo 72 horas antes da extração (XILANDER, 2009). Por este motivo seria interessante, realizar estudos comparando a atividade do extrato total do corpo, contra bactérias gram-negativas após os animais receberem um estímulo com o intuito de observar se a produção de moléculas com atividade contra *E. coli* se vê aumentada no extrato do corpo tanto quanto na hemolinfa.

Uma vez que as frações ativas **C80_1**, **C80_2** e **C80_3** foram submetidas a uma segunda etapa de purificação (dado não apresentado), não foi possível detectar atividade antimicrobiana em nenhuma das frações coletadas de cada cromatografia. O que nos leva a especular que estas moléculas exerciam conjuntamente sua atividade antimicrobiana e que por este motivo ao serem separadas no segundo passo de purificação a atividade não foi detectada ou que no processo as moléculas ativas foram degradadas.

Das frações obtidas da eluição de 40% de ACN do extrato total de *S. viridicornis* (SVC40%), depois de fracionadas por FR-CLAE, com um gradiente linear de 2 a 60% de ACN de ACN/TFA (0,05%) em H₂O/TFA (0,05%) durante 60 min., oito apresentaram atividade antimicrobiana. Estas foram identificadas como C40 (corpo eluído a 40% de ACN) e numerados em ordem ascendente (**Figura 25**).

De modo controverso com as atividades descritas nas frações eluídas a 5 e 80% de ACN do corpo de *Scolopendra viridicornis*, a atividade observada nas frações obtidas da eluição do 40% de ACN foi principalmente contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*, com exceção da fração **C40_2**, que apresentou atividade contra a bactéria Gram-positiva *M. luteus*. Este tipo de atividade só havia sido descrita na hemolinfa total de animais imunizados previamente com uma alíquota da mesma bactéria (XILANDER, 2009).

Após a primeira etapa de purificação, as frações foram submetidas a outro passo de purificação por FR-CLAE, utilizando-se uma coluna Júpiter C18

analítica sob gradientes otimizados de ACN/TFA (0,05%) em H₂O/TFA (0,05%) durante 60 minutos a um fluxo constante de 1 mL/min.

Figura 25- Perfil cromatográfico da eluição de 40% de ACN após primeira etapa de purificação da extração branda do extrato total de *S. viridicornis*. As amostras obtidas da eluição de 40% de ACN foram purificadas utilizando Coluna Júpiter C18 semipreparativa com gradiente linear de 2 a 60% de ACN durante 60 min. e fluxo constante de 1,5 mL/min. A cromatografia resultou em 8 frações identificadas de C40_1 à C40_8, que apresentaram atividade antimicrobiana.

Os perfis cromatográficos das frações **C40_4** e **C40_5** obtidos após uma segunda etapa de purificação por FR-FR-CLAE apresentaram a presença de diferentes moléculas nas amostras. Estas foram coletadas manualmente com o objetivo de confirmar a atividade anti- *E. coli* detectada anteriormente, que foi apresentada pelas frações **4A** e **4B** do material **C40_4** (**Figura 26 A**) e **5A** do **C40_5** (**Figura 26 C**).

A análise por espectrometria de massa da fração **C40_4A** indicou uma única molécula com massa de 1,767,513 Da, com padrões isotópicos, de picos espaçados em 1 Da, indicando que os íons são monocarregados, confirmando

assim a massa obtida (**Figura 26 B**). Se espera em futuros estudos realizar a caracterização desta molécula a qual aparenta ser de natureza protéica.

O espectro de massas obtido por MALDI-ToF/MS da fração **C40_5A** evidenciou a presença de diferentes moléculas com massas entre 732,505 e 2.113,106 Da (**Figura 26 D**), sendo necessária uma outra etapa de purificação para o isolamento das moléculas ativas.

Figura 26- Cromatogramas da segunda etapa de purificação por FR-CLAE das frações C40_4 (A) e C40_5 (C) e espectros de massas (B e D) das frações ativas obtidas. As frações com atividade antimicrobiana obtidas após a primeira etapa de purificação por FR-CLAE do extrato total da lacraia eluído a 40% de ACN foram submetidas a uma segunda etapa de purificação com uma coluna Jupiter C18 analítica sob um gradiente linear de 18 a 28% (A) e 20 a 32% (C) de ACN/TFA 0,05% em H₂O/TFA 0,05% durante 60 min e fluxo constante de 1,0 mL/min. As frações coletadas que apresentaram atividade contra *E. coli* foram identificadas como C40_4A, C40_4B (A) e C40_5A (C). Os espectros de massas das frações ativas C40_4A (B) e C40_5A (D) obtidos por MALDI-ToF, apresentaram valores de m/z referentes às moléculas presentes nas frações.

A amostra **C40-6** do material obtido do extrato total do corpo de *S. viridicornis*, da eluição de 40% de ACN, foi submetida a fracionamento numa segunda etapa de purificação por FR-CLAE, onde foi utilizada uma coluna analítica sob um gradiente linear de 22% a 34% de ACN/TFA 0,05% em H₂O/TFA 0,05% durante 60 minutos. No ensaio de inibição de crescimento

microbiano dos picos coletados, destacou - se a presença de atividade anti *E. Coli* somente na fração **C40-6A (Figura 27 A)**, apresentando-se pura quando submetida à espectrometria de massas, cujo valor de m/z (926,439) foi obtido por MALDI-ToF/MS. De acordo com os padrões isotópicos, com picos espaçados em 1 Da, pôde-se perceber que os íons são monocarregados, confirmando a massa molecular do peptídeo **(Figura 27 B)**.

Figura 27- Cromatograma da segunda etapa de purificação por FR-CLAE da fração C40_6 (A) e espectro de massas (B) da fração ativa obtida. A fração com atividade antimicrobiana obtida após a primeira etapa de purificação por FR-CLAE do extrato total da lacraia eluído a 40% de ACN foi submetida a uma segunda etapa de purificação com uma coluna Jupiter C18 analítica sob um gradiente linear de 22 a 44% de ACN/TFA 0,05% em H₂O/TFA 0,05% durante 60 min e fluxo constante de 1,0 mL/min (A). A fração coletada que confirmou atividade contra *E. coli* foi identificada como C40_6A. O espectro de massa desta fração obtido por MALDI-ToF, apresentou uma única molécula com uma massa de 925,438 Da (B).

Os ensaios subsequentes foram realizados com o objetivo de obter a caracterização da estrutura primária através das técnicas de seqüenciamento

“de novo” por espectrometria de massas utilizando um equipamento do tipo Q-ToF (Micromass™ Q-ToF Ultima API).

A interpretação dos fragmentos de um peptídeo, gerados pela quebra de uma de suas ligações peptídicas após dissociação induzida por colisão (DIC) contra moléculas de um gás inerte (He ou Ar) é conhecida como a técnica de seqüenciamento “de novo”. São da série “b” os fragmentos que contêm a parte N-terminal da molécula e aqueles que possuem a parte C-terminal do peptídeo são da série “y” (ROEPSTORFF e FOHLMAN, 1984). A diferença de massa entre os fragmentos adjacentes de uma mesma série corresponde à massa do resíduo de aminoácido presente naquela posição da molécula. E assim que é possível seqüenciar um peptídeo de massa molecular conhecida através deste processo. Quanto maior for a variedade e quantidade de fragmentos -y e -b gerados por um peptídeo, mais simples e confiável será a determinação de sua estrutura primária.

O espectro de fragmentação permite também conhecer a composição de aminoácidos do peptídeo, obtida pela presença dos imônios e seus íons relacionados na região de baixos valores de m/z do espectro (FALICK et al., 1993).

O seqüenciamento “*de Novo*” da cadeia polipeptídica completa foi realizado pela interpretação do espectro de DIC da molécula com massa de 926,439 Da, obtido pela dissociação induzida por colisão com energias (E_{col}) em diferenças de potenciais de 15 e 20 V do seu íon duplamente carregado ($[M+2H]^{2+}$, m/z 463,69) (**ANEXO**). É importante mencionar, que dada a baixa massa molecular do peptídeo não foi necessário submeter à amostra a digestão enzimática, sendo suficiente o fracionamento da molécula inteira por MS-MS.

O assinalamento de todos os íons da série -b (**Figura 28 A**) permitiu a determinação parcial da estrutura primária, constituída por oito resíduos: Arg1-Tyr2-Pro3-Ala4-Val5-Gly6-Tyr7-Thr8. Além dos valores de m/z referentes aos íons da série -b (em azul), que apresentaram abundâncias relativas

superiores a 10%, foi encontrado o íon *-y1* (120,06) (em vermelho). Na região de baixos valores de *m/z* do espectro foi observado o íon amônio do resíduo de Tirosina (136,07) (**Figura 28 B**). Além disto, nessa mesma região os valores de *m/z* relativos a alguns fragmentos internos (quando ocorre quebra de duas ligações peptídicas) do peptídeo: Pro- Ala (169,09), Ala- Val (171,11), Gly- Tyr (221,07), Tyr – Pro (261,10), Tyr- Thr (265,10), Arg- Tyr (320,15) (**Figura 28 B**) (CANTÚ et al., 2008).

O peptídeo seqüenciado foi nomeado *lacraina* em alusão ao nome popular das escolopendras no Brasil (LACRAIA). Sua estrutura primaria e linear é conformada por oito resíduos de aminoácidos (RYPAVGYT), cuja massa molecular teórica é de 925,4658 Da diferindo da massa aferida (925,439 Da) em 0,02 Da.

Figura 28- Sequenciamento “de novo” do peptídeo de 925,439 Da presente na fração com atividade antimicrobiana C40_6. O espectro de DIC (A) do peptídeo foi adquirido com diferenças de potenciais de 20 V na célula de colisão do seu íon com quatro cargas ($[M+2H]^{2+}$, m/z 463,69). Os íons pertencentes às séries -y (vermelho) e -b (azul), assinalados na parte superior do espectro, elucidaram sua estrutura primária: RYPAVGYT. Esse peptídeo foi nomeado LACRAINA. Na região de baixos valores de m/z (B), está assinalado o íon imônio do resíduo da Tirosina presente na seqüência como também os fragmentos internos formados por dipeptídeos. (O espectro da figura A está apresentado no ANEXO para facilitar a visualização das séries assinaladas).

A análise da sequência na ferramenta *protparam* do banco de dados ExPASy, permitiu elucidar o ponto Isoelétrico (pI), o coeficiente de Extinção Molar ϵ e a carga total (pH7) da lacraina (**Tabela 8**).

A estrutura primária e a massa teórica foram obtidas na análise do espectro no software MassLynx. Os outros parâmetros moleculares foram calculados no aplicativo *protparam* do ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Tabela 8- Estrutura Primária e outros parâmetros moleculares da Lacraina.

Estrutura primária (Lacraina)	Carga Total (pH7)	Massa Teórica (Da)	Massa Aferida (Da)	Ponto Isoelétrico (pI)	Coeficiente de Extinção Molar ϵ
RYPAVGYT	+1	925,4658	925,439	8,59	2.980 M⁻¹ cm⁻¹

O peptídeo possui características catiônicas (carga total +1) e um pI elevado (8,59), propriedades compartilhadas pela grande maioria dos peptídeos antimicrobianos conhecidos (DESIMONE et al., 2002; BROGDEN et al., 2005). Uma característica especial deste peptídeo é sua baixa massa molecular (menor a 1 kDa) e o fato de ser composto por oito resíduos de aminoácidos.

Na análise das moléculas presentes no corpo de miriápodes tem sido observadas moléculas de baixa massa molecular e de natureza não peptídica (KIM et al., 1998; NODA et al., 2001). Também já foi descrita a presença de uma serino protease (Escolonase) com uma massa molecular de 25 kDa.

A lacraina é o primeiro registro de um peptídeo com atividade antimicrobiana isolado do extrato total de quilópodes e miriápodes e não apresentou similaridade com nenhum outro peptídeo antimicrobiano conhecido após busca realizada em bancos de dados de PAMs.

Seria interessante em futuros estudos realizar a síntese deste peptídeo com o fim de realizar a análise das atividades contra um espectro de microorganismos maior e também determinar a sua citotoxicidade.

4.2.2.2 Fração hidrofílica do extrato total

Para avaliar a presença de atividade antimicrobiana na porção hidrofílica (0%), que não foi retida pela resina da Sep-Pak C18, o material “0%” foi concentrado em centrífuga a vácuo, ressuspenso em Acetato de Amônio 50 mM e submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (**Materiais e Métodos 3.3.1**) utilizando-se uma coluna Asahipack GS-320 com um gradiente isocrático de Acetato de amônio 50 mM (**Figura 29**). As frações obtidas foram avaliadas para atividade antimicrobiana por meio do ensaio de inibição de crescimento em meio líquido.

Figura 29- Cromatograma e atividade da primeira etapa de purificação da fração hidrofílica (0%) do extrato total de *S. viridicornis* por CLAE. As amostras obtidas da porção hidrofílica do extrato total de *S. viridicornis* foram purificadas utilizando uma Coluna Asahipack GS-320 com gradiente isocrático de Acetato de amônio durante 60 mins e fluxo contante de 1,0 mL/min. Três frações apresentaram atividade antimicrobiana e foram identificadas de CO_1 a CO_3 (referindo-se a Corpo 0%).

Três das frações coletadas após fracionamento por CLAE mostraram-se ativas. Estas foram identificadas como C0 (Corpo fração hidrofílica) e numeradas em ordem ascendente. Na **Tabela 9** podemos observar as atividades antimicrobianas. Nenhuma das frações apresentou atividade antifúngica.

A atividade antiparasítica das frações C0_1 e C0_2 foi determinada após aplicar o teste de Wilcox para a análise dos resultados e foi observada uma diferença significativa na densidade celular destas duas amostras com seus respectivos controles principalmente após 120 horas para *L.(L.) amazonensis* e 96 horas para *T. brucei* (**Figura 30**).

Tabela 9- Atividade antimicrobiana apresentada pelas diferentes frações obtidas da porção hidrofílica do extrato total do corpo de *S. viridicornis* (SVC0%).

CARACTERISTICA		MICROORGANISMO			
AMOSTRA	FRAÇÃO	<i>M. luteus</i> A270	<i>E. coli</i> SBS363	<i>L. (L.) amazonensis</i> LV79	<i>T. brucei</i> 427
SVC 0%	C0_1	X	X	X	X
	C0_2	--	X	X	--
	C0_3	X	--	--	--

A atividade antibacteriana foi testada em dois microorganismos *M. luteus* e *E. coli* e a anti-parasítica contra dois parasitas *L. (L.) amazonensis* e *T. brucei* e foi sinalizada como: **X** atividade; -- sem atividade.

Figura 30- Atividade antiparasítica de frações da porção hidrofílica (0%) de extrato total de *S. viridicornis* após a primeira purificação por CLAE. A atividade foi confirmada após o teste não paramétrico de Wilcoxon onde foi observada uma diferença significativa nas densidades celulares entre o controle positivo e a amostra em presença do parasita. **A)** Atividade das frações **C0_1** e **C0_2** contra o *L.(L.) amazonensis*. A maior diferença foi observada após 120 horas. **B)** Atividade da fração **C0_1** contra *T. brucei*. A maior diferença foi observada após 96 horas.

Com o intuito de purificar as moléculas com atividade antimicrobiana, as frações C0_1 e C0_2 passaram por uma segunda etapa de purificação por CLAE

utilizando-se uma coluna de filtração em gel (superdex peptide), com um gradiente isocrático de ACN 30%. As frações foram coletadas manualmente para serem utilizadas no ensaio de inibição antimicrobiana para confirmar sua atividade.

O perfil cromatográfico da fração **CO_2** (**Figura 31**) evidenciou a presença de diferentes moléculas na amostra, uma destas frações confirmou atividade contra *E. coli* (**CO_2A**).

Figura 31- Cromatograma da segunda etapa de purificação por CLAE da amostra CO_2. A fração com atividade antimicrobiana CO_2 obtida após a primeira etapa de purificação por CLAE da porção hidrofílica (0%) do extrato total da lacraia *S. viridicornis* foi submetida a uma segunda etapa de purificação por filtração em gel, modo isocrático, fluxo de 0,5 mL/min de ACN 30% por 50 min. As fração coletada que apresentou atividade contra *E. coli* foi identificadas como **CO_2A**.

A molécula que confirmou atividade após ser separada por CLAE com uma coluna Superdex peptide, eluiu numa faixa de massas moleculares abaixo

de 500 Da., o que indica que esta apresenta uma baixa massa molecular, porém não chegou a ser caracterizada.

Por isso, é bastante provável que as frações presentes na porção hidrofílica do corpo de *Scolopendra viridicornis* não sejam de natureza protéica e sim se assemelhem às moléculas já descritas na literatura (Quinolinas ou coumarinas).

A presença de atividade antiparasítica e antimicrobiana por parte de frações de baixa massa molecular em quilópodes, tem sido relatada em moléculas como o Jineol (161,0477 Da.) e seus derivados. O Jineol é uma quinolina com atividade antiparasítica, antibacteriana e antitumoral (CHO et al., 2008). Outra molécula com uma grande atividade antimicrobiana é a Escolopendrina, uma quinolina alcalóide isolada do pó do corpo da lacraia (NODA, 2001).

Os resultados das análises das frações com atividade antimicrobiana por MALDI-ToF e MS-MS foram inconclusivos. Provavelmente não foram observados resultados devido a uma baixa concentração das moléculas ativas presentes nas amostras ou porque estas não são facilmente ionizáveis.

Em relação ao perfil cromatográfico obtido após a segunda purificação por CLAE da fração **CO_1**, foi observada a presença de diferentes moléculas na amostra, duas destas (**CO_1A** e **CO_1B**) confirmaram sua atividade contra *E. coli* (**Figura 32**)

Figura 32- Cromatograma da segunda etapa de purificação por CLAE da amostra CO_1. A fração com atividade antimicrobiana CO_1 obtida após a primeira etapa de purificação por CLAE da porção hidrofílica (0%) do extrato total da lacraia *S. viridicornis* foi submetida a uma segunda etapa de purificação por filtração em gel, modo isocrático, fluxo de 0,5 mL/min de ACN 30% por 50 min. As frações coletadas que apresentaram atividade contra *E. coli* foram identificadas como **CO_1A** e **CO_1B**.

O perfil cromatográfico da fração **CO_1** evidenciou a presença de diferentes moléculas na amostra, duas destas frações confirmaram atividade contra *E. coli* (**CO_1A** e **CO_1B**).

Posteriormente, a fração CO_1A foi avaliada quanto a os valores de massa da molécula por LC-ESI/MS. A análise indicou a presença dos íons com duas ($[M+2H]^+$, $m/z = 176,0$) e três ($[M+3H]^+$, $m/z = 118,13$) cargas de uma molécula com 350,79 Da. Os valores de m/z foram deconvoluídos a partir da

combinação de espectros individuais do CTI do intervalo entre 2,91 e 3,14 min (**Figura 33**).

Figura 33- Análise de massas por LC-ESI/MS da fração ativa C0_1A. Espectro combinado do intervalo entre (2,9 a 3,14 min) do cromatograma total de íons da fração C0_1A, obtido por LC-ESI/MS, mostraram a presença dos íons com duas e três cargas de uma molécula de 350,79 Da.

Com o intuito de revelar a estrutura da molécula de 350,79 Da. realizou-se uma análise por ressonância nuclear magnética da fração C0_1A. Esta análise foi feita em espectrômetro de 500 MHz (modelo Avance DRX500), e o processamento do espectro foi realizado no TOPSPIN 1.3.

No espectro de RMN de ^1H da fração C0_1A, observa-se um sinal muito intenso da água deuterada e sem deutério o que dificultou a análise dos sinais correspondentes à fração analisada. No entanto, no intervalo entre 7,6 e 6,5 ppm podem ser vistos os sinais dos hidrogênios ligados a um anel aromático benzenoide (**Figura 34**). No intervalo de 2,2 a 1,9 ppm, indicado com um traço azul, se observa a presença dos sinais correspondentes aos solventes utilizados no processo de purificação e indicado com um traço vermelho entre 4,0 e 3,9

ppm, observa-se a presença de diferentes compostos na amostra (**Figura 35**). O anterior indica que na fração C0_1A tem presença de diferentes moléculas. Pelo que é necessária uma nova etapa de purificação.

Figura 34- Espectro de RMN ^1H da fração C0_1A. RMN realizado da amostra C0_1A ressuspensa em 200 μL de D_2O e 200 μL de H_2O , utilizando-se a sequência de pulsos zg30. Marcados com uma zeta estão os sinais da água e da água deuterada. As sinais em destaque do intervalo entre 7,6 e 6,5 ppm correspondem aos hidrogênios ligados a um anel aromático.

Figura 35- Espectro de RMN ^1H da fração CO_1A. RMN realizado da amostra CO_1A ressuspensa em 200 μL de D_2O e 200 μL de H_2O , utilizando-se a sequência de pulsos zg30. Destaque do intervalo entre 4,0 e 3,1 ppm apresentando a presença de diferentes compostos na fração CO_1A (Traço vermelho). O traço azul apresenta o intervalo entre 2,2 e 0,9 ppm onde se evidenciam os solventes utilizados no processo de purificação da fração (ACN, Acetato de amônia e etanol).

Desta forma a presença do sinal correspondente aos hidrogênios ligados aos anéis na amostra, e as baixas massas moleculares identificadas até este ponto da análise poderiam indicar a presença de alguma molécula similar às quinolinas já descritas em escolopendras (NODA, 2001; CHO et al., 2008).

Neste contexto, com a finalidade de purificar a fração CO_1A foi submetida a uma terceira etapa de purificação por cromatografia de interação hidrofóbica (**HIC**), utilizando-se uma coluna Zic-HILIC (Sequant- Merck), com um gradiente de ACN 90% (carregada com Formiato de amônio 5 mM com 0,05% de Acido Fórmico) de 100 a 30% e com um fluxo constante de 1,5 mL/min. O efluente da coluna foi dividido na razão 1:20, sendo uma parte

enviada ao MS e o resto coletado manualmente para novos testes de inibição em meio líquido, contra o microorganismo para o qual tinham apresentado atividade nas outras etapas de purificação.

O cromatograma evidenciou a presença de diferentes moléculas na amostra. Duas das frações resultantes após esta etapa de purificação, identificadas como **C01A_1A** e **C01A_1B**, confirmaram atividade contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* (**Figura 36**).

Figura 36- Perfil cromatográfico e atividade antimicrobiana das frações obtidas após a terceira etapa de purificação por HIC da fração C0_1A. A fração ativa C0_1A foi submetida a um terceiro passo de purificação por cromatografia de interações hidrofílicas, utilizando uma coluna Zic-HILIC sob um gradiente de 100 a 30% de ACN 90% (carregada com Formiato de amônio 5 mM com 0,05% de Ácido Fórmico) e Formiato de amônio 5 mM com 0,05% de Ácido Fórmico, e com um fluxo constante de 1,5 mL/min. As frações coletadas que apresentaram atividade contra *E. coli* foram sinalizadas com um traço vermelho e identificadas como C01A_1A e C01A_1B.

Foi determinada também por LC-ESI/MS a pureza e os valores de massa das moléculas presentes nas duas frações que apresentaram atividade antimicrobiana. A análise da fração **C01A_1A** mostrou a presença de três moléculas com baixa massa molecular, identificadas como **C0*1a**, **C0*1b** e **C0*1c** (**Figuras 37, 38, 39**).

A análise por espectrometria de massa da fração **C0*1a** indicou uma única molécula com massa de 210,2 Da., com padrões isotópicos, de picos espaçados em 1 Da., indicando que os íons são monocarregados, confirmando assim a massa obtida (**Figura 37 B e C**).

Figura 37- Cromatograma da terceira etapa de purificação por HIC da fração ativa contra *E. coli* C01A_1A (A) e espectro de massas (B e C) da fração C0*1a. A fração ativa C0_1A foi submetida a um terceiro passo de purificação por cromatografia de interações hidrofílicas. A fração C01A_1A (A) apresentou-se composta por três moléculas principalmente. O CL-ESI/MS da fração C0*1a evidenciou a presença de um íon majoritário com uma massa de 210,2 Da (B) esta apresentou padrões isotópicos, que indicam que os íons são monocarregados (C).

A análise por espectrometria de massa da fração **C0*1b** indicou uma molécula com massa de 442, 2 Da., com padrões isotópicos, de picos espaçados em 1 Da., indicando que os íons são monocarregados, confirmando assim a

massa obtida (**Figura 38 B e C**). Contudo é observado outro íon com um $m/z=340,2$ indicando a necessidade de outra etapa de purificação.

Figura 38- Cromatograma da terceira etapa de purificação por HIC da fração ativa contra *E. coli* C01A_1A (A) e espectro de massas (B e C) da fração C0*1b. A fração ativa C0_1A foi submetida a um terceiro passo de purificação por cromatografia de interações hidrofílicas. A fração C01A_1A (A) apresentou-se composta por três moléculas principalmente. O CL-ESI/MS da fração C0*1b evidenciou a presença de um íon majoritário com uma massa de 442,2 Da (B) esta apresentou padrões isotópicos, que indicam que os íons são monocarregados (C).

A análise por espectrometria de massa da fração **C0*1c** indicou uma molécula com massa de 273, 3 Da, com padrões isotópicos, de picos espaçados em 1 Da, indicando que os íons são monocarregados, confirmando assim a massa obtida (**Figura 39 B e C**). São observados dois íons com um $m/z= 318,3$ e 362,3, sendo espaçados com o íon majoritário em 44 Da, o que poderia corresponder a que a molécula ganhou CO₂.

Figura 39- Cromatograma da terceira etapa de purificação por HIC da fração ativa contra *E. coli* C01A_1A (A) e espectro de massas (B e C) da fração C0*1c. A fração ativa C0_1A foi submetida a um terceiro passo de purificação por cromatografia de interações hidrofílicas. A fração C01A_1A (A) apresentou-se composta por três moléculas principalmente. O CL-ESI/MS da fração C0*1c evidenciou a presença de um íon majoritário com uma massa de 273,3 Da (B) esta apresentou padrões isotópicos, que indicam que os íons são monocarregados (C).

Não obstante, a análise da fração **C01A_1B** por LC-ESI/MS não foi conclusiva devido à baixa capacidade de ionização desta molécula. Pelo que se sugere em futuros análises realizar APCI-MS para a análise das massas desta fração.

Por outro lado tanto a fração C01A_A e C01A_B evidenciaram a presença de diferentes moléculas, pelo que seria necessária outra etapa de purificação por HIC com um gradiente otimizado de ACN 90% (carregada com Formiato de amônio 5 mM com 0,05% de Acido Fórmico).

Seria interessante continuar com a caracterização destas moléculas para assim aprofundar mais no conhecimento dos componentes e do funcionamento do sistema imune dos quilópodes.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram apresentados resultados que podem contribuir para o conhecimento da imunidade das lacraias *Scolopendra viridicornis* e *Otostigmus cavalcanti* e de uma maneira mais ampla, do sistema imune dos quilópodes e miriápodes. Além de fornecer a estrutura primária de um novo peptídeo antimicrobiano, com atividade contra *E. coli*, isolado do extrato total do corpo de *S. viridicornis*.

Foi observada a presença de diferentes frações com atividade antimicrobiana na hemolinfa (plasma e hemócitos) e no extrato total de animais desafiados e não desafiados da sp. *Otostigmus cavalcanti*, apresentando um aumento na atividade antimicrobiana nos animais do grupo estimulado. O que pode significar que algumas das moléculas antimicrobianas estão presentes constitutivamente no animal enquanto outras precisam de um estímulo para ser expressas.

Na porção hidrofílica do extrato total de *O. cavalcanti* foram observadas frações com atividade antiparasítica (*Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma brucei*) e antibacteriana (*E. coli* e *M. luteus*).

Na molécula ativa 1A_1 apresentou-se pura e com uma massa molecular de 377,836 Da.

Também na porção hidrofílica do extrato total de *O. cavalcanti* foi observado uma molécula de massa molecular de 2270,08 Da., que apresentou um espectro de massa de LC-ESI/MS muito similar ao peptídeo antimicrobiano gomesina, isolado da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*.

No plasma de *S. viridicornis* foram observadas diferentes frações com atividade antimicrobiana, observando-se atividade contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* e contra a levedura *C. albicans*, mas não apresentando atividade contra a bactéria Gram-positiva *M. luteus*. No entanto, nos hemócitos, diferentes frações apresentaram atividade somente contra a bactéria Gram-positiva *M. luteus*.

Na porção hidrofóbica do extrato total do corpo de *S. viridicornis* também foram observadas diferentes frações com atividade antimicrobiana. No material eluído em 5% de ACN, na análise por ESI-MS de uma fração com atividade contra *M. luteus* foram observadas duas moléculas com massa molecular baixa (848,49 e 861,94 Da.). É necessária outra etapa de purificação para poder isolar a molécula com a atividade antimicrobiana.

Ainda no material do extrato total da fração hidrofóbica foram observadas duas moléculas que se apresentaram puras. A primeira destas mostrou uma massa molecular de 1,7 kDa mais não chegou a ser caracterizada. Enquanto a segunda evidenciou um peptídeo de 925,4658 Da e cuja estrutura primária apresentou um composto de 8 resíduos de aminoácidos (RYPAVGYT). Esta molécula foi nomeada *Lacraína*.

Já na porção hidrofílica do extrato total de *S. viridicornis* foram observadas frações de baixa massa molecular (< 500 Da.) com atividade antiparasítica (*Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma brucei*) e antibacteriana (*E. coli* e *M. luteus*) que não puderam ser caracterizadas nesse momento.

A análise da fração C0_1A indicou a presença de anéis aromáticos neste material.

Os dados obtidos nesta dissertação suscitam novas questões sobre o sistema imune dos quilópodes e as moléculas que o compõem. Também chama a atenção frente a continuar a análise científica da medicina tradicional oriental e as aplicações que as lacraias têm nesta. Estas abordagens podem abrir perspectivas para novos trabalhos.

REFERÊNCIAS¹

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, POBER, A. H.; JORDAN, S. **Cellular and molecular immunology**. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2005.

ANDREU, D.; RIVAS, L. Antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, v. 47, n. 6, p 415-433, 1998.

BARRAVIERA, B. **Venenos animais**: uma visão eintegrada. Rio de Janeiro, RJ: Editora de Publicações Biomédicas, 1994. 411 p.

BOMAN, H. G.; FAYE, I.; VAN HOFSTEN, P.; KOCKUM. K.; LEE, J. Y.; XANTHOPOULOS, K. G.; BENNICHI, H.; ENGSTROM, A.; MERRIFIELD, R. B.; ANDREU, D. Antibacterial proteins in insects: a review of some current perspectives. In: BREHELIN, M. (Ed.). **Immunity in invertebrates**: cells, molecules, and defense reactions (proceedings in life sciences). Berlin: Springer-Verlag, 1986. p. 63-73.

BOMAN, H. G.; HULTMARK, D. Cell-free immunity in insects. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 41, p. 103-126, 1987.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria?. **Nature**, v. 3, p. 238-250, 2005.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrates**. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2003.

BULET, P.; DIMARQ, J. L.; HETRU, C.; LAGUEUX, M.; CHARLET, M.; HEGY, G.; VAN DORSSELAER, A.; HOFFMAN, J. A. A novel inducible antibacterial peptide of Drosophila carries an O-glycosylated substitution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 14893-14897, 1993.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J. L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial Peptides in Insects; Structure and Function. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 23, p. 329-344, 1999.

BULET, P.; STOCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. **Protein & Peptide Letters**, v. 12, n. 1, p. 3-11, 2005.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, p. 669-675, 2008.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄL, K. Role of prophenoloxidase – activating system in Invertebrate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 23-28, 1998.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄL, K. The prophenoloxidase – activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 116-126, 2004.

CHARLET, M.; CHERNYSH, S.; PHILIPPE, H.; HETRU, C.; HOFFMANN, J. A.; BULET, P. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 36, p. 21808-21813, 1996.

CHAGAS-JR, A. **Revisão das espécies neotropicais de Scolopocryptopinae (Chilopoda: Scolopendromorpha: Scolopocryptopidae)**. 2003. 91 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.

COSCARÓN, S. Los Quilópodos Escolopendromorfos del Museo de La Plata. Revista del Museo de La Plata (nueva serie). **Zoología**, v. 6, n. 47, p. 359-418, 1955.

DE SIMONE, S. G.; SOUZA, A. L. A. Peptídeos microbicidas: uma alternativa viável para a terapia antimicrobiana. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasil**, v. 24, p. 12-16, 2002.

DESTOUMIEUXA, D.; MUNOZA, M.; BULETB, P.; BACHE`REA, E. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 1260–1271, 2000.

EHRET-SABATIER, L.; LOEW, D.; GOYFFON, M.; FEHLBAUM, P.; HOFFMANN, J. A.; DORSSELAER, A. V.; BULET P. Characterization of Novel Cysteine-rich Antimicrobial Peptides from Scorpion Blood. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 47, p. 29537–29544, 1996.

FALICK, A. M.; HINES, W. M.; MEDZIHRADSKY, K. F.; BALDWIN, M. A.; GIBSON, B. W. Low-mass ions produced from peptides by high-energy collision-induced dissociation in tandem mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 4, n. 11, p. 882–893, 1993.

FERRANDON, D.; IMLER, J. L.; HETRU, C.; HOFFMANN, J. A. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 11, p. 862–874, 2007.

FINLAY, B.; HANCOCK, R. E. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 497–503, 2004

FOGAÇA, A. C.; LORENZINI, D. M.; KAKU, L. M.; ESTEVES, E.; BULET, P.; DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 3, p. 191–200, 2004.

FOGAÇA, A. C.; ALMEIDA, I. C.; EBERLIN, M. N.; TANAKA, A. S.; BULET, P.; DAFFRE, S. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. **Peptides**, v. 27, p. 667–674, 2006.

FUKUZAWA, A. H.; VELLUTINI, B. C.; LORENZINI, D. M.; SILVA, P. I., JR.; MORTARA, R. A.; DA SILVA, J. M.; DAFFRE, S. The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 6, p. 716–725, 2008.

GATTIKER, A.; HOOGLAND, C.; IVANYI, I.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis Nucleic. **Acids Res.**, v. 31, p. 3784-3788, 2003.

GUPTA, A. P. **Hemocytic and humoral immunity in arthropods**. [S. l.]: Wiley-Interscience Publications, 1986. 535 p.

HAINE, E. R.; MORET, Y.; SIVA-JOTHY, M. T.; ROLFF, J. Antimicrobial Defense and Persistent Infection in Insects. **Science**, v. 322, n. 5905, p. 1257-1259, 2008.

HALE, J. D.; HANCOCK, R. E. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 5, n. 6, p. 951-959, 2007.

HANCOCK, R. E.; BROWN, K. L.; MOOKHERJEE, N. Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. **Immunobiology**, v. 211, n. 4, p. 315-322, 2006.

HOFFMANN, J. A. Primitive immune systems. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 5-9, 2004.

HOFFMANN, J. A. The immune response of Drosophila. **Nature**, v. 426, n. 6962, p. 33-38, 2003.

HOFFMANN, J. A. ; HETRU, C. ; REICHHART, J. M. The humoral antibacterial response of Drosophila. **FEBS Letters**, v. 325, p. 63-66, 1993.

HUANG, H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. **Biochemistry**, v. 39, n. 29, p. 8347-8352, 2000.

HWAYOUNGJUNG. Medicinal Centipedes. Fev. 2007. Disponível em: <<http://www.flickr.com/photos/96245092@N00/395080720>>. Acesso em: 30 ago. 2011.

IWANAGA, S.; MUTA, T.; SHIGENAGA, T.; MIURA, Y.; SEKI, N.; SAITO, T.; KAWABATA, S. Role of hemocyte-derived granular components in invertebrate defense. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 712, p. 102-116, 1994.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.

KANFU, P.; KONG, Y.; ZHAI, L.; WU, X.; JIA, P.; LIU, J.; YU, H. Two novel antimicrobial peptides from centipede venoms. **Toxicon**, v. 55, p. 274-279, Feb/Mar, 2010.

KESLER, R. C.; DAVIS, R. B.; FOSTER, D. F.; VAN ROMPAY, M. I.; WALTERS, E. E.; WILKEY, S. A.; KAPTCHUCK, T. J.; EISENBERG, D. M. Long-term trends in the use of complementary and alternative medical therapies in the unites states. **Complementary and Alternative Medicine Series**, v. 135, p. 262-268, 2001.

KIM, K.; KIM, H.; PARK, K.; CHO, K. Structural Characterization of a New Antibiotic Substance Purified from *Scolopendra Subspinipes Mutilans* L. Koch. **Journal of Korean Chemical Society**, v. 42, n. 2, p. 236-239, 1998.

LAMBERTY, M.; ZACHARY, D.; LANOT, R.; BORDEREAU, C.; ROBERT, A.; HOFFMANN, J. A.; PHILIPPE, B. P. Insect Immunity, Constitutive Expression of a Cysteine-Rich Antifungal and a Linear Antibacterial Peptide in a Termite Insect. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, p. 4085-4092, 2001.

MOON, S. S.; CHO, N.; SHIN, J.; SEO, Y.; LEE, C. O.; CHOI, S. U. Jineol, a cytotoxic alkaloid fom the centipede scolpendra subspinipes. **Jornal of Natural Products**, v. 59, n. 8, p. 777-779, 1996.

NAKAMURA, T.; FURUNAKA, H.; MIYATA, T.; TOKUNAGAS, F.; MUTAS, T.; IWANAGALL, S.; NIWA, M.; TAKAO, T.; SHIMONISHI, Y. Tachyplesin, a Class of AntimicrobiaPl eptide from the Hemocytes of the Horseshoe Crab (*Tachypleus tridentatus*). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 32, p. 16709-16713, 1988.

NEWPORT, G. A list of the species of Myriapoda, Order Chilopoda, contained in the cabinets of the British Museum, with synoptic descriptions of forty-seven new species. **Annals and Magazine of Natural History**, v. 13, p. 94-101, 1844.

PEMBERTON, R. W. Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 65, p. 207-216, 1999.

PEREIRA, L. S.; SILVA JR, P. I.; MIRANDA, M. T.; ALMEIDA, I. C.; NAOKI, H.; KONNO, K.; DAFFRE, S. Structural and biological characterization of one antibacterial aclypolyamine isolated from the hemocytes of the spider *acanthocurria gomesiana*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 352, p. 953-959, 2007.

REN, Y.; HOUGHTON, P.; HIDER, R. C. Relevant activities of extracts and constituents of animals used in traditional Chinese medicine for central nervous system effects associated with Alzheimer's disease. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 989-996, 2006.

ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J. Letter to the editors. **Biological Mass Spectrometry**, v. 11, n. 11, p. 601, 1984.

RUPPERT E. E.; BARNES, R. D. **Invertebrate zoology**. 6th ed. [S. l.]: Saunders College Publishing, 1994.

SAYEGH, R. S. R.; MONTICH, G.; SILVA JR, P. I. Interaction of the Antimicrobial Peptide Longipin with LUV's. CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, Foz de Iguazu, 2010. **Anais...** Foz do Iguazu: Sociedade Brasileira de Bioquímica, 2010. CD-ROM.

SEIDLER, J.; ZINN, N.; BOEHM, M. E.; LEHMANN, W. D. De novo sequencing of peptides by MS/MS. **Proteomics**, v. 10, n. 4, p. 634-649, 2010.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 66, n. 4, p. 236-248, 2002.

SHIGENAGA, T.; TAKAYENOKI, Y.; KAWASAKI, S.; SEKI, N.; MUTA, T.; TOH, Y.; ITO, A.; IWANAGA, S. Separation of large and small granules from horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) hemocytes and characterization of their components. **Journal of Biochemistry**, v. 114, n. 3, p. 307-316, 1993

SILVA JR, P. I. **Sistema Imune de Aracnídeos: Estrutura química e atividade de peptídeos antimicrobianos da Hemolinfa de *Acanthoscurria gomesiana***. 2000. 162 f. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA JR, P. I.; DAFFRE, S.; BULET, P. Isolation and full characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. **Journal of Biochemical Chemistry**, v. 275, p. 33464-33470, 2000.

SÖERHÄLL, K.; SMITH, V. J. Separation of the hemocyte opulation of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 7, n. 2, p. 229-339, 1983.

ULRICH, T.; SCHIMIDT, O.; SÖDERHÄLL, K.; DUSHAY, M. S. Coagulation in arthropods : defense, wound closure and healing. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 6, p. 289-293, 2004.

XIAO, PEI-GEN; CHANG-XIAO, L. Pharmacology, harmacokinetics and toxicology of Chinese traditional medicine for stroke therapy. **Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 5, n. 2, p. 83-124, 2005.

XYLANDER, W. Hemocytes in Myriapoda(Arthropoda): a review. In: MUSEUM FÜR NATURKUNDE GÖRLITZ. **Research Report, Senckenberg Museum für Naturkunde Görlitz, Görlitz, Germany**. 2009. p. 114-124.

XYLANDER, W. Antibacterial substances and characteristics of the haemolymph of Chilopoda and Diplopoda (Myriapoda, Arthropoda). **Soil Organisms**, v. 81, n. 3, p. 413-429, 2009.

XYLANDER, W. Physico-chemical properties of haemolymph of Chilopoda and Diplopoda (Myriapoda, Arthropoda): protein content, pH, osmolarity. **Soil Organisms**, v. 81, n. 3, p. 431-439, 2009.

XYLANDER, W. Immunodefense reactions of Myriapoda – A brief presentation of recent results. **8th International Congress of Myriapodology**. Innsbruck, Austria, v. 10, p. 101-110, 1992.

XYLANDER, W.; NEVERMANN, L. Antibacterial Activity in the Hemolymph of Myriapods (Arthropoda). **Journal of Invertebrates**, v. 56, p. 206-214, 1990.

WENHUA, R.; SHUANGQUAN, Z.; DAXIANG, S.; KAIYA, Z.; GUANG, Y. Induction, purification and characterization of an antibacterial peptide scolopendrin I from the venom of centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 43, p. 88-93, 2006.

YOON, M. A. ; JEONG, T. S.; PARK, D. S.; XU, M. Z.; OH, H. W.; SONG, K. B.; LEE, W. S.; PARK, H. Y. Antioxidant effects of quinoline alkaloids and 2,4-di-tert-butylphenol isolated from scolopendra subspinipes. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 4, p. 735-739, 2006.

YOU, W-K.; SOHN, Y-D.; KIM, K-Y.; PARK, D-H.; JANG, Y.; CHUNG, K-H. Purification and Molecular Cloning of a Novel Serine Protease from the Centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 239-250, 2004.

YUEN, M-F.; TAM, S.; FUNG, J.; WONG, D. K-H.; WONG, B. C-Y.; LAI, C-L. Traditional Chinese Medicine Causing Hepatotoxicity in Patients with Chronic Hepatitis B Infection: a 1- Year Prospective Study. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 24, p. 1179-1186, 2006.

ZHANG, Z.; MARSHALL, A. G. A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 9, n. 3, p. 225-233, 1998.

ANEXO- Sequenciamento “de novo” do peptídeo de 925,439. Da Lacraina, peptídeo antimicrobiano com atividade contra *E.coli*.

O espectro de DIC do peptídeo foi adquirido com diferenças de potenciais de 20 V na célula de colisão do seu íon com quatro cargas ($[M+2H]^+$, m/z 463,69). Os íons pertencentes às séries -y (vermelho) e -b (azul), assinalados na parte superior do espectro, elucidaram sua estrutura primária: RYPAVGT. Esse peptídeo foi nomeado **lacraina**. Os fragmentos internos do peptídeo seqüenciado, cujos íons foram encontrados no espectro, estão representados com o código de uma letra de aminoácidos.