Renan Lima de Araújo

Estudo do potencial antimicrobiano do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2015

Renan Lima de Araújo

Estudo do potencial antimicrobiano do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Àrea de concentração: Bioprospecção de moléculas antimicrobianas

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

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

© reprodução total

Araújo, Renan Lima de.
Potencial antimicrobiano do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* /
Renan Lima de Araújo. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Bioprospecção de moléculas com efeito antimicrobiano.

Versão do título para o inglês: Antimicrobial potential of *Phyllocaulis boraceiensis* mucus.

1. Peptídeos antimicrobianos 2. Lema terrestre 3. Bioprospecção 4. Produtos naturais I. Mendonça, Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0181/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Renan Lima de Araújo.

Título da Dissertação: Potencial antimicrobiano do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*.

Orientador(a): Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça.

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 13 de setembro de 2012.

Protocolo: I-958/12

Dr. Ronaldo Zucatelli Mendoça
Laboratório de Parasitologia
Instituto Butantan

Referente Projeto: "Estudo do potencial antimicrobiano do muco de *Phylocaulis boraceiensis*"

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) informa que o projeto acima referido é isento de análise por parte desta Comissão, pois não faz uso de animais vertebrados em sua execução.

Cordialmente,

Dr. Marcelo Larami Santoro
Coordenador da CEUAIB

Dedico este trabalho a
todos que de forma direta
ou indireta o tornaram
possível.

Agradecimentos

Ao Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça pela oportunidade de ingressar na experiência de realização deste trabalho e por sempre ter provido todos os meios necessários para que fosse realizado da melhor forma.

A Dra. Ana Rita de Toledo-Piza pela co-orientação, acolhimento em sua linha de pesquisa e suporte, principalmente na parte de obtenção de espécimes e material biológico.

Ao Dr. Pedro Ismael da Silva Jr. pelo acolhimento em seu grupo e linha de pesquisa e pela intensa colaboração tanto na área técnica e metodológica quanto nos fundamentos teóricos envolvidos nas diferentes etapas do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan pelo companheirismo e disponibilidade contínua para ajudar.

Aos colegas do grupo de Bioquímica de Peptídeos Antimicrobianos do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan pela amizade e prestatividade.

Aos demais colaboradores dos Laboratórios Especial de Toxinologia Aplicada e Parasitologia do Instituto Butantan por cada colaboração em suas variadas formas.

**“O que prevemos
raramente ocorre; o
que menos esperamos
geralmente acontece.”**

Benjamin Disraeli

RESUMO

ARAÚJO, R. L. **Estudo do potencial antimicrobiano do muco de *Phylocaullis boraceiensis***. 2015. 51 f. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os peptídeos antimicrobianos têm sido alvo cada vez mais de estudos como candidatos a antibióticos naturais devido seu amplo espectro de ação e baixa susceptibilidade a induzir resistência microbiana. Carentes de sistema imune específico, os invertebrados contam com um eficiente sistema imune inato para se defenderem de microrganismos patogênicos, incluindo diversos peptídeos antimicrobianos. Através de cromatografia, ensaios antimicrobianos, espectrometria de massas e análise em banco de dados, isolou-se frações do muco de lesmas da espécie *P. boraceiensis* com efeito antimicrobiano e obteve-se sequências mais prováveis de fragmentos de algumas das frações ativas encontradas, relacionando-os às proteínas e peptídeos conhecidos mais similares e estabelecendo relação entre às sequências encontradas, as proteínas e peptídeos similares sugerindo uma possível relação com a atividade antimicrobiana. Obteve-se uma gama de frações ativas contra bactérias e/ou leveduras e sequências e informações relacionadas que podem ser úteis para futuros estudos de isolamento e caracterização de moléculas com efeito antimicrobiano do muco de *P. boraceiensis*.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos. Lesma. Muco. Bioprospecção. Sequenciamento “de novo”.

ABSTRACT

ARAÚJO, R. L. **Antimicrobial potential of *Phyllocaulis boraceiensis* mucus**. 2015. 51 p. [Master thesis (Biotechnology)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Antimicrobial peptides are increasingly more targets of studies as natural antibiotics candidates since their broad spectrum of action and low susceptibility to induce microbial resistance. Lacking of specific immune system, invertebrates count with an efficient innate immune system to defend themselves from pathogenic microorganisms, including a sort of antimicrobial peptides. Using chromatography, antimicrobial tests, mass spectrometry and database analysis, fractions from the mucus of *P. boraceiensis* slugs showing antimicrobial effect were isolated. We obtained most probable sequences from several active fractions, relating them with most similar known peptides and proteins. There were suggested some connections between the found sequences and related peptides and proteins as well as possible antimicrobial activity relations. We found several active fractions against bacteria and/or yeast as well as sequences and related information that may be useful in further isolation and characterization studies of antimicrobial factors in *P. boraceiensis* mucus.

Keywords: Antimicrobial peptides. Slug. Mucucs. Bioprospection. *De novo* sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Exemplar da lesma <i>P. boraceiensis</i> durante ovoposição.....	20
Figura 2 - Distribuição de lesmas do gênero <i>Phyllocaulis</i> na região sul e sudeste do Brasil..	20
Figura 3 - Teste de inibição de crescimento em meio líquido.....	24
Figura 4 - Purificação de moléculas antimicrobianos do muco de <i>P. boraceiensis</i>	29
Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações Fr67 e Fr72.....	31
Figura 6 - Sequenciamento <i>de novo</i> do peptídeo CCDVCFK da fração Fr67.....	32
Figura 7 - Sequenciamento <i>de novo</i> do peptídeo MLKQLAR da banda t4.....	33
Figura 8 - Sequenciamento <i>de novo</i> do peptídeo FLKQLAR da banda t5.....	34
Figura 9 - Sequenciamento <i>de novo</i> do peptídeo FLKQLAR da fração Fr72.....	35
Figura 10 - Sequenciamento <i>de novo</i> do peptídeo FLKQLAR da banda t2.....	36
Figura 11 - Sequenciamento <i>de novo</i> do peptídeo MYELANLVNELLR da banda t3.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades antimicrobianas encontradas em frações obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) à partir do muco de <i>P. boraceiensis</i>	30
Tabela 2 - Sequências mais prováveis de peptídeos das frações Fr67 e Fr72 e bandas t2, t3, t4 e t5.....	38
Tabela 3 - Resultado da comparação das sequências encontradas nas frações Fr67 e Fr72 e bandas t2, t3, t4 e t5 com o banco de dados BLAST	39
Tabela 4 - Comparação das sequências encontradas nas frações Fr67 e Fr72 e bandas t2, t3, t4 3 t5 com o banco de dados de peptídeos APD2. *Foram considerados apenas os resultados com maior similaridade.....	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO	21
3 METODOLOGIA	22
3.1 Animais	22
3.2 Obtenção do extrato bruto do muco de <i>P boraceiensis</i>	22
3.3 Extração, solubilização e cromatografia	22
3.4 Determinação de atividade antimicrobiana das frações	23
3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida	24
3.6 Redução, alquilação e tripsinização	24
3.6.1 Digestão “in solução”	24
3.6.2 Digestão “in gel”	25
3.7 Espectrometria de massas	26
3.8 Análise bioinformática	26
4 RESULTADOS	28
4.1 Purificação e efeito antimicrobiano de frações	28
4.2 Detecção de proteínas em Fr67 e Fr72	30
4.3 Sequenciamento <i>de novo</i> de peptídeos de Fr67 e Fr72 e bandas t2, t3, t4 e t5...	31
4.4 Caracterização de peptídeos e proteínas encontrados em Fr67 e Fr72	38
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos heterotróficos amplamente distribuídos. Devido sua facilidade em se adaptar aos mais diversificados ambientes, podem exercer uma série de relações com outros organismos, desde simbiose até comensalismo e relações patogênicas. Não diferente, o homem também é alvo de relações ambientais com fungos em diversificadas estâncias, incluindo patológicas. Dessa forma, os fungos estão associados a um amplo espectro de doenças em seres humanos, sendo elas mais graves e letais quando associadas a pacientes imunodeprimidos (ROMANI, 2011).

Bactérias são microrganismos unicelulares que estão presentes em uma variedade de ambientes, mesmo aqueles considerados inóspitos (ROTHSCHILD; MANCINELLI, 2001). São capazes, assim como os fungos, de colonizar outros organismos e, da mesma forma, estabelecer relações ecológicas harmônicas e desarmônicas entre outras espécies, incluindo seus hospedeiros. Estão naturalmente presentes em diferentes partes do corpo humano, como pele e intestino, podendo inclusive desempenhar papéis importantes em processos fisiológicos humanos, como ocorre na microbiota intestinal (CHILLER; SELKIN; MURAKAWA, 2001; GUINANE; COTTER, 2013). Entretanto, podem também causar uma série de doenças, inclusive algumas fatais (TRACEY et al., 1987).

A diversidade de quadros patológicos que podem advir da intervenção bacteriana na saúde humana é notável. Tuberculose, hanseníase, difteria, coqueluche, tétano, tracoma, disenterias, gonorreia, sífilis e meningite são apenas algumas das doenças clinicamente importantes causadas por infecções bacterianas. (CHERRY et al., 1988; GOMEZ; MCKINNEY, 2004; LAJMANOVICH; YORKE, 1976; MACAMBIRA; FORMIGA; FORMIGA, 1994; MONTECUCCO; SCHIAVO, 1994; PREDTETCHENSKY; MOROZ, 1940; ROMANOWSKI et al., 1991; ROTBERG, 1969; THYLEFORS et al., 1987; TUNKEL et al., 2004). De um modo geral, a via para o desencadeamento de um quadro patológico humano em decorrência de infecção bacteriana envolve a produção e liberação de toxinas. Um exemplo clássico é a intoxicação alimentar advinda do consumo de toxinas produzidas por bactérias da espécie *Clostridium botulinum*, que atuam destruindo proteínas envolvidas na exocitose do neurotransmissor acetilcolina na placa nervosa motora, resultando em paralisia muscular (CHERINGTON, 1998).

As infecções fúngicas, não diferente das bacterianas, representam uma séria e contínua ameaça à saúde e vida humana e podem existir principalmente na forma de reações alérgicas a proteínas de fungos ou reações a toxinas presentes em determinadas

infecções. Indivíduos saudáveis são susceptíveis a infecções superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistêmicas que causam uma variedade de debilidades desde infecções de unha e superfície de pele até doenças disseminadas com risco de morte. Algumas infecções fúngicas são causadas por agentes patogênicos oportunistas que podem ser endógenos (*Candida*) ou adquiridos do ambiente (*Aspergillus* e *Cryptococcus*) (KATHIRAVAN et al., 2012).

Infecções invasivas e dermatomicoses são alvos de particular interesse clínico em indivíduos com maior vulnerabilidade como neonatos, pacientes com câncer e submetidos à quimioterapia, transplantados, queimados, além daqueles portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). Outro fator de risco está relacionado ao uso de corticosteroides e antibióticos, diabetes, lesões de derme e epiderme, má nutrição, neutropenia e processos cirúrgicos. Nos últimos anos, a incidência e severidade de doenças provocadas por fungos têm aumentado particularmente em pacientes imunodeprimidos. Existe também um crescente número de casos de fungos relacionados a problemas sépticos (KATHIRAVAN et al., 2012). Até 2008, houve um aumento significativo no número de pacientes imunocomprometidos em decorrência do aumento no número de transplantes, quimioterapia agressiva e portadores da SIDA. Concomitantemente, tem-se observado um aumento na prevalência de infecções fúngicas invasivas em pacientes imunossuprimidos, além de infecções fúngicas de outra natureza, como as que são provocadas por zigomicetos, fungos dos gêneros *Fusarium* e *Scedosporium* e os fungos negros, especialmente em pacientes em grau mais avançado de imunossupressão (SABLE; STROHMAIER; CHODAKEWITZ, 2008).

Em relação ao tratamento de infecções causadas por bactérias, os quais, da mesma forma, envolvem a erradicação do microrganismo invasor ou a interrupção de sua proliferação, frequentemente se utiliza um agente antimicrobiano: substância capaz de eliminar seletivamente um ou mais microrganismos-alvo. Agentes antimicrobianos podem atuar de diversas formas, em diferentes alvos celulares. Pode-se citar como exemplos de mecanismos de ação a inibição de síntese celular, a alteração da permeabilidade da membrana celular, a inibição da síntese de proteínas e de ácidos nucleicos (CANEPARI et al., 1990; HANNA et al., 2000; MCDERMOTT; WALKER; WHITE, 2003).

As infecções fúngicas invasivas estão historicamente relacionadas com mortalidade e morbidade, em parte devido a limitações das terapias antifúngicas disponíveis e as dificuldades em se obter diagnóstico rápido e preciso. Desde o fim da

década de 1950, o tratamento padrão adotado para infecções fúngicas severas tem sido essencialmente baseado no uso de anfotericina B, um agente de administração estritamente intravenosa e toxicidade significativa. A década de 1990 foi palco da introdução das formulações lipídicas de anfotericina B, dos triazóis, fluconazol e itraconazol. Embora tais agentes apresentem vantagens claras sobre a pioneira anfotericina B, ainda são limitados pela formulação, espectro de atividade ou mesmo pelo desenvolvimento de resistência (SABLE; STROHMAIER; CHODAKEWITZ, 2008).

Na década seguinte, houve ainda grande avanço terapêutico. Foram introduzidos triazóis com espectro mais amplo de ação (voriconazol e posaconazol) e novas classes de equinocandinas antifúngicas (caspofungina, micafungina e anidulafungina). Também foram desenvolvidos métodos não invasivos de diagnóstico (SABLE; STROHMAIER; CHODAKEWITZ, 2008).

Atualmente há uma preocupação considerável entre a categoria médica em relação a doenças causadas por fungos. Infecções por dermatófitos como *Tinea pedis* e candidíase, embora raramente fatais, são comuns e bem disseminadas em todo o mundo. Patógenos como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii* e *Aspergillus fumigatus* são causadores de morbidade e mortalidade elevadas em pacientes imunodeficientes (KATHIRAVAN et al., 2012).

Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Candida* respondem pela maioria dos casos de infecções. Dados epidemiológicos recentes indicam aumento na incidência de infecções por *Aspergillus spp* e leveduras do gênero *Candida* além de outros fungos até então considerados patologicamente atípicos, tendo estes últimos apresentado pouca susceptibilidade aos antifúngicos atuais (KATHIRAVAN et al., 2012).

Cerca da metade dos fármacos atualmente em utilização clínica tem sua origem em produtos naturais. Apesar da recente mudança de foco da indústria farmacêutica em relação ao desenvolvimento de novos fármacos, priorizando a síntese de novas moléculas a partir da química combinatória em detrimento do *screening* clássico em produtos naturais, tem-se notado uma relevante limitação técnica da abordagem em relação à síntese de fármacos mais complexos. Surge assim, a proposta de uma abordagem na qual se alie a caracterização de produtos naturais como candidatos a novos fármacos à processos de síntese química, sendo os produtos naturais modelos eficientes, uma vez lapidados funcionalmente pela seleção natural, e a síntese química, uma forma eficiente de aperfeiçoamento funcional molecular e disponibilização em larga escala. Nesse contexto,

os produtos naturais ressurgem como importantes elementos na busca por novas drogas (PATERSON; ANDERSON, 2005).

Em relação aos fármacos utilizados no tratamento de infecções, principalmente bacterianas, um fenômeno que tem se tornado importante é o desenvolvimento de resistência. Giedraitiene et al. (2011) afirmam que a resistência aos antibióticos está estreitamente ligada ao seu uso na prática clínica e que terapias prolongadas utilizando antibióticos podem levar ao desenvolvimento de resistência em um microrganismo inicialmente sensível, através de adaptação gradual. Quando um antibiótico age sobre um alvo antimicrobiano, as células susceptíveis morrem, porém aquelas que apresentam algum tipo de resistência sobrevivem. Se os fatores de resistência estiverem nos plasmídios ao invés de estarem em genes cromossômicos, a capacidade de resistência se espalha muito mais rapidamente inclusive gêneros (GIEDRAITIENĖ et al., 2011).

No caso das drogas antifúngicas, apesar de seu número estar se expandindo, as que estão disponíveis atualmente tendem a não mais se enquadrar nos parâmetros cada vez mais restritos para controlar infecções em populações de pacientes, fazendo-se dessa forma necessário o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas para terapia clínica (KATHIRAVAN et al., 2012).

De acordo com Odds et al. (2003), ao longo dos mais de 50 anos nos quais os agentes antifúngicos têm sido descobertos, as necessidades clínicas têm se modificado considerável e continuamente. Micoses superficiais permanecem em condições de fácil tratamento, contando com uma gama de produtos atualmente disponíveis. Por outro lado, o espectro de micoses disseminadas em indivíduos gravemente imunocomprometidos têm sofrido diversas alterações, uma vez que também se modificaram aspectos terapêuticos no tratamento de problemas associados ao HIV e mesmo o gerenciamento de outros tipos de doenças graves associadas à vulnerabilidade imunológica do paciente, tornando clara a necessidade primordial de agentes com um amplo espectro de alvos susceptíveis.

Odds et al. (2003) afirmam ainda que, da mesma forma que ocorre com os demais agentes antimicrobianos, o surgimento de resistência a agentes antifúngicos atualmente utilizados clinicamente é alarmante, sendo assim, novos alvos e novos inibidores continuarão a ser necessários em prol de serem obtidas terapias antifúngicas efetivas no futuro.

Em termos de número de classes de agentes que podem ser utilizados em micoses potencialmente letais, os alvos são, em sua maioria, direta ou indiretamente, direcionados ao envelope celular (parede e membrana plasmática) e, particularmente, na membrana de

esterol fúngico, ergosterol e sua biossíntese. Moléculas com alvos diversificados podem assim, ser uma inovação muito pertinente como agentes antifúngicos sistemicamente bio-disponíveis (ODDS; BROWN; GOW, 2003).

Odds et al. (2003) ressaltam ainda que a pesquisa em antifúngicos está repleta de alvos validados para novos agentes, mas ainda necessita-se de muitos anos para que inibidores úteis desses alvos possam ser descobertos e desenvolvidos, sendo esse fenômeno, segundo ele, uma consequência do alto investimento em abordagens focadas no estudo do genoma.

O sistema imune de invertebrados se distingue de seu análogo em vertebrados por ser constituído unicamente de componentes da imunidade inata, a qual compreende tanto resposta humoral quanto celular. A resposta humoral é exercida por peptídeos antimicrobianos presentes no sangue e no plasma. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) também estão envolvidos na imunidade celular, visto que são secretados na hemolinfa por hemócitos (FUSETANI, 2010; TINCU; TAYLOR, 2004).

Os PAMs tem recebido crescente atenção nos últimos anos uma vez que sua contribuição aos mecanismos de defesa do hospedeiro e seu potencial como novas substâncias farmacêuticas tem sido cada vez mais apreciado. Isso ocorre principalmente devido ao seu amplo espectro de atividade e devido ao crescente índice de desenvolvimento de resistência microbiana a antibióticos convencionais (SATHYAN et al., 2012).

Os gastrópodes representam a classe de animais mais diversificada em número de espécies no ambiente marinho, estando também presentes em ambientes terrestres e de água doce. Algumas espécies podem viver décadas, embora parte significativa desse período possa corresponder a fases de quiescência. A maior parte dos gastrópodes possui concha e são bentônicos, embora alguns sejam desprovidos de concha e possuam hábitos integralmente pelágicos. Podem ainda ser herbívoros ou carnívoros, clepto ou endoparasitas. Podem, assim como organismos dos demais filos de invertebrados, hospedar vírus, embora o desafio viral e a natureza da resposta antiviral para este grupo sejam praticamente desconhecidos (LOKER, 2010).

A superfície corporal mole e úmida dos gastrópodes é protegida por um epitélio ciliado capaz de produzir muco representando uma barreira física inicial a colonização de patógenos. O isolamento da molécula *achacina* a partir do muco de *Achatina fulica* sugere que o muco também representa uma barreira química. A achacina é uma l-amino oxidase

que gera H_2O_2 a partir da desaminação oxidativa de l-lisina e l-arginina e possui propriedades antibacterianas e antitumorais. A produção e exsudação regular de muco pela superfície do corpo a mantém livre de patógenos como bactérias, as quais são estimuladas a crescer em biofilmes em trilhas de muco deixadas pelo caminho (LOKER, 2010).

O tegumento dos gastrópodes desempenha funções nas trocas gasosas respiratórias, fluxo de água e regulação iônica. Além disso, também funciona como uma barreira protetora e tecido de absorção e transporte. Provavelmente sua propriedade mais notável seja a capacidade de produzir abundante quantidade de muco e fluidos proteicos. As secreções formam uma camada contínua ao longo de toda superfície do corpo (BARKER, 2001).

Já foi possível observar que a natureza da secreção do muco sobre o corpo é variável, o que sugere diferentes funções para o muco em diferentes áreas do epitélio. O tegumento dorsal é coberto com um muco viscoso, enquanto o muco pedal é mais fluido. As camadas de muco dorsal e pedal são separadas por um muco levemente ácido secretado por células no sulco parapodial, situado entre as porções basal e dorsal da superfície corporal. A viscosidade do muco é altamente dependente da quantidade de íons bivalentes que possui, a qual varia de acordo com a espécie e condição fisiológica do animal (BARKER, 2001).

Grande parte dos estudos voltados à descoberta de peptídeos antimicrobianos em moluscos está relacionada a bivalves, como MGD-1, MGD-2, mitilina B e miticina B, de *Mytilus galloprovincialis* (MITTA et al., 1999), Cg-Def e Cg-Prp de *Crassostrea gigas* (GONZALEZ et al., 2007; GUEGUEN et al., 2006) AiBDn de *Agropecten irradians* (ZHAO et al., 2007) e mitimicina de *Mytilus edulis* (CHARLET et al., 1996).

Dentre estudos feitos em gastrópodes, constam moléculas antimicrobianas ativas que são apenas bioacumuladas no organismo, advindas de fontes de alimento como a Dolastatina 10, encontrada em *Dolabella auricularia*, mas oriunda de cianobactérias do gênero *Lyngbya* (GARSON, 2001; PETTIT; PETTIT; HAZEN, 1998) e a Kahalalida F, encontrada em *Elysia rufescens*, mas oriunda de algas da espécie *Bryopsis pennata* (SHILABIN et al., 2007).

Nos últimos anos, os gastrópodes continuam a ser estudados como fonte natural de moléculas com efeito antimicrobiano. Iijima, Kisugi e Yamazaki (2003) isolaram a dolabelina B2 a partir do macerado corporal de *D. auricularia* e constataram seu efeito antimicrobiano contra leveduras da espécie *C. albicans*.

Kanagasabapathy, Samuthirapandian e Kumaresan (2011) testaram extratos de macerados de diferentes órgãos bem como o muco do gastrópode marinho da espécie *Melo melo* e verificaram atividade antimicrobiana contra mais de uma linhagem de bactéria, levedura e fungo filamentoso. Especificamente, o muco apresentou efeito antimicrobiano contra bactérias das espécies *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio parahemolyticus*, *Klebsilla pneumonia* e bolores da espécie *Trichophyton mentagrophytes* e *Alternaria ulternaria* e foi o composto testado que apresentou efeito antimicrobiano contra o maior número de espécies de microrganismos.

Zhong et al. (2013) isolaram e caracterizaram um potente e pouco hemolítico peptídeo antimicrobiano a partir do muco do caracol da espécie *Achatina fulica*. O peptídeo isolado, a mitimacina, demonstrou atividade antimicrobiana tanto contra bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus megatherium*, bactérias Gram negativas *Escherichia coli*, *Bacillus pyocyaneus*, *Bacillus dysenteriae* e *Klebsiella pneumoniae*, quanto contra levedura da espécie *Candida albicans*.

A família Veronicellidae é composta por lesmas terrestres hermafroditas que não possuem nenhum tipo de concha. Atualmente apresenta 23 gêneros, os quais são amplamente distribuídos pelas regiões dos trópicos e subtrópicos. Nas Américas, são distribuídos do sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e do Chile. Na América do Sul há 16 gêneros descritos. Várias espécies são classificadas como pestes agrícolas importantes. Algumas delas são hospedeiros intermediários de nematóides conhecidos por serem responsáveis pela transmissão de doenças, como a agiostrongilíase abdominal e meningoencefalite eosinofílica. A monofilia do gênero *Phyllocaulis* é suportada pela presença de uma estrutura foliácea peculiar adjacente ao pênis. A espécie *P. boraceiensis* (Figura 1), sendo uma das seis espécies até então descritas, está distribuída na região sul e sudeste do Brasil como ilustrado na Figura 2 (GOMES et al., 2010).

Figura 1 – Exemplar da lesma *Phyllocaulis boraceiensis* durante ovoposição.

Fonte: Notícias Malacológicas. (“Phyllocaulis boraceiensis e postura - Capoeiras, Florianópolis, SC (1).JPG :: Noticias-malacologicas”, [s.d.]

Figura 2 – Distribuição de lesmas do gênero *Phyllocaullis* na região sul e sudeste do Brasil.

Fonte: Gomes et al. 2010

Toledo-Piza (2007) estudou o efeito antimicrobiano do muco de *P. boraceiensis* e não constatou efeito antimicrobiano em ensaios utilizando bactérias da espécie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivas representantes de bactérias Gram negativas, Gram positivas e termotolerantes, sugerindo que o muco de *P. boraceiensis* exerceria apenas uma função física de proteção contra os microrganismos testados. Desconhece-se algum estudo de efeito antifúngico do muco de *P. boraceiensis*.

2 OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo elucidar a presença de peptídeos com efeito antimicrobiano no muco da lesma da espécie *P. boraceiensis*.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais.

Os procedimentos de criação e manutenção dos espécimes utilizados foram realizados segundo Toledo-Piza (2007, 2012). Espécimes da lesma terrestre *Phyllocaulis boraceiensis* provenientes de criação em cativeiro no Laboratório de Malacologia do Instituto Butantan foram utilizados para a coleta do muco utilizado nos experimentos. Os animais foram mantidos em viveiros de plástico contendo terra *in natura*, com tampa telada, em ambiente de laboratório livre de poluição, com controle de temperatura a ± 24 °C e 85% de umidade relativa do ar. Todos os espécimes foram alimentados com pequenas quantidades de vegetais diversos, segundo recomendação de Santos e Thomé (2000) e a higienização dos viveiros foi realizada a cada dois dias.

3.2 Obtenção do extrato bruto do muco de *P boraceiensis*.

A eliminação do muco foi estimulada por processos mecânicos os quais não sacrificaram ou causaram danos aos espécimes. Cada amostra de muco foi obtida a partir de quatro espécimes, estando estas livres em uma superfície lisa (placa de Petri) contendo uma fina camada de solução salina (NaCl) 0,06% por aproximadamente 5 minutos. O intuito de se adicionar solução de NaCl nas placas de coleta é facilitar a liberação do muco e a coleta do mesmo com o auxílio de uma espátula para recipiente de armazenagem em freezer a -80 °C (TOLEDO-PIZA, 2007, 2012).

3.3 Extração, solubilização e cromatografia.

Muco total suspenso em solução de coleta (NaCl 0,06%) foi diluído em proporção 1:1 em ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%. A extração das moléculas retidas na fase sólida da amostra foi feita por sonicação (TOMY® Ultrasonic Disrupter UD-201) em oito seções com duração de 15 segundos cada, intercaladas por 60 seg. de repouso, em frequência aproximada de 10 Hz em banho de gelo. Em seguida, a amostra foi mantida por 30 min. em banho de gelo com agitação (agitador magnético) e centrifugada por 30 min., à 16.000 x g, 4 °C (Centrifuge 5804R Eppendorf ®).

Instruments, Inc.). À seguir, o sobrenadante foi coletado e foi aplicado em um cartucho Sep-Pak C18 (Water Associates®) equilibrado com ácido trifluoroacético (TFA) 0,05%. Foi realizada uma eluição utilizando-se 80% de acetonitrila em TFA 0,05%.

A fração correspondente a fase eluída em 80% de acetonitrila foi liofilizada (Thermo® SuperModulyo® freeze dryer), ressuspensa em água ultrapura acidificada (TFA 0,05%), e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando sistema UFLC Shimadzu® modelo Prominence com coluna de fase reversa semipreparativa do tipo JUPITER C18 equipado com leitor UV acoplado (250 mm x 10 mm, Phenomenex™) em um gradiente de concentração 0 a 80% de acetonitrila (ACN) acidificada (ACN/TFA) durante 60 minutos com um fluxo de 1,5 mL/min. As frações coletadas manualmente, foram liofilizadas (Thermo® SuperModulyo® freeze dryer) e reconstituídas em água Milli-Q.

3.4 Determinação de atividade antimicrobiana das frações.

Para verificar a atividade antimicrobiana das frações, foi utilizado ensaio de inibição de crescimento em meio líquido (BULET et al., 1993).

Os microrganismos utilizados para teste das frações obtidas por cromatografia foram bactérias Gram negativas das espécies *Escherichia coli* SBS363 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, bactérias Gram positivas da espécie *Micrococcus luteus* A270 e leveduras da espécie *Candida albicans* MDM8. As cepas foram obtidas no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan, onde são mantidas em freezer a -80 °C e repicadas periodicamente.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços com uma alíquota de 20 µL de cada fração e 80 µL dos microorganismos em seu meio de cultivo, na concentração final de 10⁴ células/ mL de leveduras ou 10⁵ células/ mL de bactérias em cada poço. Os microrganismos da cepa *C. albicans* MDM8 foram ressuspensas em meio de cultura contendo dextrose de batata na concentração 12 g/ L ("Potato Dextrose Broth" - Difco™, Houston, EUA; half strength). As bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *M. luteus* foram ressuspensas em meio pobre em nutrientes (PB: peptona 10 g/ L; NaCl 5 g/ L; pH 7,4). Poços contendo apenas meio, meio e microrganismos e meio e antibiótico (penicilina/streptomycina 10 mg/mL) foram utilizados respectivamente como controle de contaminação do meio e controles negativo e positivo de crescimento de microrganismos (Fig. 3). A medida de

absorbância ($\lambda = 595 \text{ nm}$) da cultura foi realizada em um leitor de microplacas Victor 3 (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, EUA), após 18 horas de incubação a 30°C , com o intuito de avaliar o crescimento microbiano através da turbidez do meio. As frações que inibiram o crescimento dos microrganismos testados foram triadas com base na expressividade aparente da inibição (redução de turbidez) e submetidas a espectrometria de massas para verificação de homogeneidade.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	100 μL PB*
	100 μL H ₂ O mili-q
	10 μL H ₂ O mili-q + 90 μL meio+inóculo**
	10 μL Penicilina+streptomicina 10 mg/mL
	10 μL amostra*** 90 μL meio+inóculo**

* meio de cultura
 ** 50 μL de inóculo + 10 mL PB (10^3 células)

Figura 3 – Teste de inibição de crescimento em meio líquido. Esquema de utilização de microplaca utilizada em ensaio de inibição de crescimento em meio líquido para teste de efeito antimicrobiano de frações do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*.

3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença ou ausência de SDS (LAEMMLI, 1970), utilizando mini-géis de 10 cm x 10 cm x 1,5 mm em cuba Digel DGV-10. As amostras foram diluídas em um mesmo volume de tampão de amostra (4 vezes concentrado) (350 mM de Tris/ HCl; 30% de glicerol; 1,2 mg de azul de bromofenol). O material foi aplicado em um gel de

empilhamento 4,5% e gel de separação de 6% de poliacrilamida e submetido à eletroforese com corrente constante de 80 volts. Os géis foram corados com azul de Coomassie R-250. Foi utilizado o marcador de peso molecular Fermentas (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder).

3.6 Redução, alquilação e tripsinização

3.6.1 Digestão “*in solução*”

A redução e alquilação dos resíduos de Cys presentes nas moléculas possibilita a avaliação da presença de pontes de dissulfeto nos peptídeos purificados do muco.

Uma alíquota de 10 µL da fração seca foi dissolvida em 20 µL de NH_4HCO_2 0,4 M. A essa solução adicionou-se 5 µL ditioneitol (DTT) 45 mM. A amostra foi mantida a 50 °C por 15 minutos. Após ser resfriada em temperatura ambiente, foi adicionado 5 µL de iodocetamida 100 mM e mantida em temperatura ambiente por 15 min, protegida da luz. Adicionou-se 130 µL de água Milli-Q para diluição da Ureia e 2 µL de tripsina, incubada a 37°C por 12 horas. Para interromper a reação acrescentou-se 160 µL de água acidificada (TFA) 0,1%. O produto foi concentrado em centrífuga a vácuo e dessalinizado em colunas Zip Tip® C18.

3.6.2 Digestão “*in gel*”

As bandas presentes nos géis SDS-PAGE foram recortadas e submetidas ao processo de digestão *in gel* segundo protocolo descrito por Hanna et al. (2000), com algumas modificações.

Inicialmente os fragmentos do gel recortados foram incubados em 500 µL de uma solução de metanol 50% em água ultrapura contendo ácido acético 5% por 2 h. Em seguida, essa solução foi removida por aspiração com pipeta e 500 µL foram adicionados aos fragmentos de gel, que permaneceram por mais uma hora nesta solução. Os fragmentos de gel foram então desidratados pela incubação por 10 min

(2 vezes por 5 min) em 200 µL de acetonitrila (100%). A acetonitrila foi aspirada com pipeta e o restante foi evaporado em um sistema de concentração a vácuo (*speed vac*). Após esta etapa, os fragmentos de gel foram reidratados por 30 min em 30 µL (por fragmento de gel) da solução redutora (ditiotretitol 10 mM em bicarbonato de amônio 100 mM). Decorrido o tempo de reidratação com DTT, a solução foi aspirada com pipeta e os fragmentos de gel foram incubados por 30 min, protegidos da luz, em 30 µL (por fragmento de gel) da solução alquilante (iodoacetamida 50 mM em bicarbonato de amônio 100 mM). Em seguida, a solução alquilante foi removida por aspiração com pipeta e, os fragmentos de gel foram submetidos a incubação, por 10 min, em 100 µL (por fragmento de gel) de bicarbonato de amônio 100 mM. Após esta etapa, a solução de bicarbonato de amônio foi retirada e 200 µL (por fragmento de gel) de acetonitrila (100%) foram adicionados e os fragmentos de gel incubados nesta solução por 5 min. A acetonitrila foi retirada e, novamente os fragmentos de gel foram incubados, por 10 min, em 200 µL da solução de bicarbonato de amônio 100 M. Na última etapa de desidratação, a solução de bicarbonato de amônio foi retirada e os fragmentos de gel foram incubados por 10 min (duas vezes por 5 min) em 200 µL de acetonitrila 100%. A solução de A acetonitrila foi retirada por aspiração com pipeta e o restante foi evaporado num sistema *speed vac*. Os fragmentos de gel foram reidratados em 16 µL de uma solução fresca de tripsina (Sigma) (50 ng/ µL em bicarbonato de amônio 50 mM), em banho de gelo, por 30 min. Em seguida a solução de tripsina foi retirada, uma solução de bicarbonato de amônio 50 mM foi adicionada (em um volume suficiente para cobrir os fragmentos de gel) e os tubos contendo os fragmentos de gel foram incubados em estufa a 37 °C por 18 h.

A extração dos peptídeos do gel se deu com a adição de 30 µL (por fragmento de gel) da solução 1 – ácido fórmico 5% (em água ultrapura) – e incubação dos pedaços de gel por 10 min. nesta solução, em temperatura ambiente. Em seguida, a solução contendo os peptídeos foi transferida para um novo tubo e, ao pedaço de gel do tubo anterior, foi adicionado 12 µL (por fragmento de gel) da solução 2 – ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%. Os fragmentos de gel foram incubados por 20 min (duas vezes por 10 min) nesta solução, e a solução transferida para o tubo que continha os peptídeos extraídos com a solução 1. A solução foi concentrada em *speed vac* e os peptídeos resultantes foram ressuspensos em 15 µL (por amostra) de ácido fórmico 0,1%.

3.7 Espectrometria de massas

Os peptídeos foram ressuspensos em 20 μL de ACN/ H_2O 1:1 com ácido fórmico 0,1% e submetidos a análise por infusão direta em um LTQ-Orbitrap LC/MS Thermo Scientific (LTQ – Linear Trap Quadrupole), sob fluxo de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 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) para que os melhores espectros de MS/MS pudessem ser utilizados no sequenciamento. Os espectros de DIC contra moléculas de gás inerte (Ar) foram adquiridos a cada 0,5 segundo e a composição final de espectros foi obtida após 1,5 min de aquisição.

3.8 Análise bioinformática

Foram assinalados os valores de m/z (relação massa/carga) correspondentes as séries $-y$ e $-b$ com o auxílio do aplicativo Peaks (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, ON, Canada). Os dados (arquivos com extensão “.raw”) referentes às análises de MS/MS utilizando o espectrômetro LTQ foram carregados no programa Peaks, pelo qual se executou a deconvolução dos valores de m/z para a obtenção da massa molecular bem como o sequenciamento *de novo* de prováveis peptídeos presentes na amostra. Os fragmentos que contém a porção N-terminal da molécula são da série “b”, enquanto aqueles que possuem a parte C-terminal da molécula são da série “y”, logo a diferença de massa entre fragmentos adjacentes de uma mesma série corresponde à massa do resíduo de aminoácido presente naquela posição da molécula.

Os peptídeos sequenciados foram submetidos a buscas por similaridades com outras proteínas em bancos de dados públicos utilizando-se o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com a ferramenta *Protein blast*, algoritmo PSI-BLAST e filtro taxonômico para o filo Mollusca e em bancos de dados de peptídeos APD2 (WANG; WANG, 2004; WANG; LI; WANG, 2009).

4 RESULTADOS

4.1 Purificação e efeito antimicrobiano de frações

No intuito de se investigar a presença de peptídeos antimicrobianos no muco de lesmas da espécie *P. boraceiensis* coletou-se muco de 5 espécimes em *pool*. As moléculas em fase sólida foram extraídas utilizando coluna C-18 Sep-Pak. A fração eluída a 80% de ACN foi submetida à CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) utilizando-se coluna semipreparativa. As frações eluídas foram coletadas manualmente e testadas em relação ao efeito de inibição de crescimento de diferentes cepas microbianas: *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* (ver item 3.4).

As frações que apresentaram efeito antimicrobiano contra algum dos microrganismos testados se concentraram dentro de um intervalo de gradiente de ACN entre 31% até 63% (Fig. 4).

Conforme a Tabela 1, para a concentração testada, observou-se sete frações que inibiram o crescimento da bactéria Gram negativa *P. aeruginosa* ATCC27853: Fr48, Fr54, Fr58, Fr65, Fr 67, Fr72 e Fr79; quatro frações que inibiram o crescimento de *E. coli*: Fr47, Fr48, Fr58 e Fr60; sete frações que inibiram crescimento de *M. luteus*: Fr54, Fr65, Fr72, Fr73, Fr74, Fr79 e Fr84; seis frações que inibiram o crescimento de *C. albicans*: Fr48, Fr54, Fr65, Fr67, Fr74, Fr79; as quais estão assinaladas no cromatograma (Fig. 4).

Figura 4 – Purificação de moléculas antimicrobianas do muco de *P. boraceiensis*. Muco de *P. boraceiensis* analisado por cromatografia líquida em coluna semipreparativa Jupiter C18 com um gradiente linear de acetonitrila de 0 a 80% em água acidificada por 60 min, num fluxo de 1,5 mL/min. Frações assinaladas apresentaram atividade antimicrobiana respectivamente para **E**: *E. coli*; **C**: *C. albicans*; **M**: *M. luteus*; **P**: *P. aeruginosa*. Setas em vermelho indicam picos referentes às frações selecionadas para sequenciamento.

Fração	Tempo de eluição (min)	ACN (%)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>
Fr47	44,4	32	-	+	-	-
Fr48	44,9	33	+	+	-	+
Fr54	47,5	36	+	-	+	+
Fr58	48,7	38	+	+	-	-
Fr60	50,8	40	-	+	-	-
Fr65	53,4	46	+	-	+	+
Fr67	55,0	48	+	-	-	+
Fr72	58,5	49	+	-	+	-
Fr73	59,6	52	-	-	+	-
Fr74	60,1	53	-	-	+	+
Fr79	63,4	58	+	-	+	+
Fr84	65,7	62	-	-	+	-

Tabela 1 - Atividades antimicrobianas encontradas em frações obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) à partir do muco de *P. boraceiensis*. (+): inibição de crescimento detectada. (-): inibição de crescimento não detectada. ACN: acetonitrila.

4.2 Detecção de proteínas em Fr67 e Fr72

Para posterior purificação e sequenciamento, foram selecionadas duas frações ativas com base na expressividade de absorbância no cromatograma: Fr67 e Fr72 (Fig. 5). Alíquotas das frações selecionadas foram destinadas a eletroforese em gel de poliacrilamida.

Figura 5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações Fr67 e Fr72. As frações Fr67 e Fr72 foram aplicadas em um gel de empilhamento 4,5 % e gel de separação de 6% de poliacrilamida e submetidas à eletroforese com corrente constante de 80 volts. Os géis foram corados com azul de Coomassie.

À partir da observação do gel, após eletroforese e coloração, pôde-se notar a presença de duas bandas nas áreas referentes às corridas de cada fração. Na fração Fr67 pôde-se observar uma banda de peso aproximado de 13 kDa (t5) e uma banda de peso aproximado de 19 kDa (t4). Na fração 72, observou-se duas bandas, t3 e t2, também com pesos aproximados de 13 e 19 kDa respectivamente.

4.3 Sequenciamento *de novo* de peptídeos de Fr67 e Fr72 e bandas t2, t3, t4 e t5.

Alíquotas de Fr67 e Fr72 foram digeridas *in solução* com tripsina e as bandas t2, t3, t4 e t5 foram digeridas com tripsina *in gel*. As amostras digeridas foram analisadas em espectrômetro LTQ (ver itens 3.6 e 3.7). Os espectros gerados a partir das amostras digeridas foram deconvoluídos e sequenciados *de novo* através do programa Peaks (Figuras 5 - 10).

A

B

Figura 6 – Sequenciamento *de novo* do peptídeo CCDVCFK da fração Fr67. A: Espectro de massas com fragmentos assinalados para série b (azul) ou série y (vermelho). **B:** Espectro de massas assinalado com os intervalos entre fragmentos para estimativa da sequência de aminoácidos.

A

B

Figura 7 – Sequenciamento *de novo* do peptídeo MLKQLAR da banda t4. A: Espectro de massas com fragmentos assinalados para série b (azul) ou série y (vermelho). **B:** Espectro de massas assinalado com os intervalos entre fragmentos para estimativa da sequência de aminoácidos.

A

B

Figura 8 – Sequenciamento *de novo* do peptídeo FLKQLAR da banda t5. A: Espectro de massas com fragmentos assinalados para série b (azul) ou série y (vermelho). **B:** Espectro de massas assinalado com os intervalos entre fragmentos para estimativa da sequência de aminoácidos.

A

B

Figura 9 – Sequenciamento *de novo* do peptídeo FLKQLAR da fração Fr72. A: Espectro de massas com fragmentos assinalados para série b (azul) ou série y (vermelho). **B:** Espectro de massas assinalado com os intervalos entre fragmentos para estimativa da sequência de aminoácidos.

A

B

Figura 10 – Sequenciamento *de novo* do peptídeo FLKQLAR da banda t2. A: Espectro de massas com fragmentos assinalados para série b (azul) ou série y (vermelho). **B:** Espectro de massas assinalado com os intervalos entre fragmentos para estimativa da sequência de aminoácidos.

A

B

Figura 11 – Sequenciamento *de novo* do peptídeo MYELANLVNELLR da banda t3. **A:** Espectro de massas com fragmentos assinalados para série b (azul) ou série y (vermelho). **B:** Espectro de massas assinalado com os intervalos entre fragmentos para estimativa da sequência de aminoácidos.

Para se medir quão confiável é o sequenciamento de um dado aminoácido obtido a partir do espectro de massa e sua deconvolução, o programa Peaks utiliza um valor (*score*) expresso em porcentagem denominado *Local confidence* (LC). Numa dada sequência, a partir da soma dos valores de LC para cada aminoácido sequenciado, obtêm-se o valor de TLC (*Total local confidence*). Ao se dividir o valor de TLC pelo número de aminoácidos obtidos na sequência, obtêm-se o valor de ALC (*Average local confidence*), que é o índice utilizado pelo software para se determinar quão confiável é uma dada sequência obtida através da ferramenta de sequenciamento *de novo*.

As sequências obtidas com maior ALC em cada fração foram adotadas como sequências mais prováveis (Tabela 2).

Na fração Fr67 o fragmento mais provável obtido foi o de sequência **CCDVCFK**. A fração Fr72 e as bandas t2 e t5 apresentaram como fragmento mais

provável o de sequência **FLKQLAR**. Na fração t4 o fragmento mais provável obtido foi o de sequência **MLKQLAR**. A fração t3 apresentou como fragmento mais provável o de sequência **MYELANLVNELLR**. As quatro sequências consideradas apresentaram valor de ALC maior que 90% (Tabela 2).

Amostras MS	Sequência*	ALC (%)
Fr67	CCDVCFK	99
t4 (~19 kDa)	MLKQLAR	98
t5 (~13 kDa)		96
Fr72	FLKQLAR	97
t2 (~19 kDa)		91
t3 (~13 kDa)	MYELANLVNELLR	97

Tabela 2 – Sequências mais prováveis de peptídeos das frações Fr67 e Fr72 e bandas t2, t3, t4 e t5. As sequências foram obtidas à partir da deconvolução dos espectros de massa por ferramenta do software Peaks. Em cada amostra, a sequência considerada como mais provável foi aquela com maior valor de ALC. *Maior ALC.

4.4 Sequenciamento de peptídeos e proteínas encontrados em Fr67 e Fr72

As quatro sequências selecionadas (Tabela 2), as quais foram obtidas por sequenciamento *de novo* tanto à partir de bandas t2, t3, t4 e t5 digeridas por tripsina *in gel* (ver item 3.5.2) como das frações Fr67 e Fr72 digeridas por tripsina *in solução* (ver item 2.5.1) foram submetidas a busca em bancos de dados através da ferramenta BLAST *protein* (“BLAST: Basic Local Alignment Search Tool”, [s.d.]) (ver item 3.7) e o resultado de proteína não-preditiva ou hipotética com maior score total foi adotado como resultado mais relevante (Tabela 3).

Sequência	BLAST*	Score Total	Fonte
CCDVCFK	<i>Toll-like receptor m</i>	24.8	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
MLKQLAR	Coiled-coil domain-containing protein 17	26.1	<i>Crassostrea gigas</i>
FLKQLAR	Adenosine deaminase AGSA precursor	21.5	<i>Aplysia californica</i>
MYELANLVNELLR	Multiple epidermal growth factor-like domains 10	27.8	<i>Crassostrea gigas</i>

Tabela 3 – Resultado da comparação das sequências encontradas nas frações Fr67 e Fr72 e bandas t2, t3, t4 e t5 com o banco de dados BLAST. O alinhamento considerado mais relevante foi o de proteína não-preditiva/hipotética de maior score total. *Resultado de sequência não preditiva/hipotética de maior score total.

O fragmento de sequência **CCDVCFK**, obtida à partir de Fr67, apresentou 100% de identidade com o fragmento situado entre os aminoácidos 18 e 23 do receptor *toll like m* de *Mytilus galloprovincialis* (TOUBIANA et al., 2013). O fragmento de sequência **FLKQLAR**, obtida à partir de Fr72, t2 e t5 apresentou 100% de identidade com o fragmento situado entre os aminoácidos 476 e 481 de proteína precursora da enzima adenosina deaminase AGSA de *Aplysia californica* (AKALAL et al., 2003). O fragmento de sequência **MLKQLAR**, obtida à partir de t4, apresentou 100% de identidade com o fragmento situado entre os aminoácidos 849 e 855 de proteína portadora de domínio *coiled-coil* 17 oriunda de *Crassostrea gigas* (ZHANG et al., 2012). O fragmento de sequência **MYELANLVNELLR**, obtida à partir de t3, apresentou 80% de identidade com o fragmento situado entre os aminoácidos 178 e 187 de proteína portadora de domínios semelhantes a fatores de crescimento múltiplos edpidérmicos 10, oriunda de *Crassostrea gigas* (ZHANG et al., 2012) (Tabela 3).

As quatro sequências selecionadas à partir de Fr67, Fr72, t2, t3, t4 e t5 foram submetidas a busca em banco de dados de peptídeos APD2 (WANG; WANG, 2004; WANG; LI; WANG, 2009) (Tabela 4).

Sequência	APD2*	Similaridade (%)	Fonte
CCDVCFK	Patelamida D	30,00	<i>Lissoclinum patella</i>
MLKQLAR	Mastoparana-VT7	38,46	<i>Vespa tropica</i>
FLKQLAR	Temporina-Rb	41,66	<i>Rana ridibunda</i>
MYELANLVNELLR	Temporina-1PRb	42,85	<i>Rana pirica</i>

Tabela 4 – Comparação das sequências encontradas nas frações Fr67 e Fr72 e bandas t2, t3, t4 3 t5 com o banco de dados de peptídeos APD2.*Foram considerados apenas os resultados com maior similaridade.

O fragmento de sequência **CCDVCFK**, obtida à partir de Fr67, apresentou 30% de similaridade com o peptídeo antimicrobiano (PAM) Patelamida D, oriundo de *Lissoclinum patella* (DEGNAN et al., 1989). O fragmento de sequência **FLKQLAR**, obtida à partir de Fr72, t2 e t5 apresentou 41,66% de similaridade com o PAM Temporina-Rb, oriundo de *Rana ridibunda* (ASOODEH; ZARDINI; CHAMANI, 2012). O fragmento de sequência **MLKQLAR**, obtida à partir de t4, apresentou 38,46% de similaridade com o PAM Mastoparan-VT7, oriundo de *Vespa tropica* (YANG et al., 2013). O fragmento de sequência **MYELANLVNELLR**, obtida à partir de t3, apresentou 42,85% de similaridade com o PAM Temporina-1PRb, oriundo de *Rana pirica* (CONLON et al., 2004) (Tabela 4).

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho se propôs a elucidar moléculas com efeito antimicrobiano no muco da lesma *P. boraceiensis*. Após purificação do muco por cromatografia líquida e ensaio antimicrobiano observou-se inibição de crescimento por doze frações em pelo menos uma das cepas utilizadas. As duas frações escolhidas para sequenciamento, Fr67 e Fr72, se mostraram capazes de inibir o crescimento respectivamente de *P. aeruginosa* e *C. albicans*, e *P. aeruginosa* e *M. luteus*. (Figura 3)

Após eletroforese em gel de poliacrilamida, quatro proteínas foram reveladas: duas em Fr67 com cerca de 13 e 19 kDa de peso respectivamente; e duas em Fr72, também pesando cerca de 13 e 19 kDa respectivamente (Figura 4).

Após digestão com tripsina e sequenciamento *de novo* das frações Fr67 e 72 e suas bandas derivadas t2, t3, t4 e t5, o peptídeo sequenciado mais provável de cada fração e banda foi considerado (ver item 4.3) o que resultou em uma lista de quatro peptídeos distintos.

Duas bandas derivadas de diferentes frações, t5 de Fr67 e t2 de Fr72, apresentaram peptídeo mais provável com a mesma sequência: **FLKQLAR**. O sequenciamento feito à partir da fração total digerida Fr72 também apresentou **FLKQLAR** como sequência mais provável. Assim, verificou-se que a sequência encontrada consiste tanto em fragmento de uma proteína de cerca de 13 kDa presente em Fr67 quanto em um fragmento de uma proteína de cerca de 19 kDa presente em Fr72. Após ser submetida ao banco de dados BLAST, apresentou 100% de similaridade com fragmento situado entre os aminoácidos 476 e 481 da Proteína precursora da enzima adenosina deaminase (AGSA) de gastrópodes da espécie *Aplysia californica*.

Renomeada MGDF por Akalal et al. (2003) AGSA é uma proteína abundante em ovos de *A. californica* e possui papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso central de embriões. Ovos de gastrópodes da espécie *Aplysia kurodai* foram descobertos como sendo fonte do peptídeo Aplisianina E, o qual apresentou atividade antimicrobiana contra fungos das espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Candida albicans* (IIJIMA; KISUGI; YAMAZAKI, 1995). Outro peptídeo antimicrobiano, Aplisianina A, foi isolado por Kamiya et al. (1986) à

partir da glândula albumínica de gastrópodes da mesma espécie, apresentando atividade antimicrobiana em bactérias da espécie *Bacillus subtilis*. Caso as proteínas das bandas t2 e t5 sejam moléculas influentes nos efeitos antimicrobianos observados em Fr67 e Fr72 e o fragmento **FLKQLAR** estiver relacionado as atividades antimicrobianas observadas, este teria influência tanto sobre leveduras, quanto sobre bactérias Gram negativas e Gram positivas (Tabela 1). Estudos são necessários para elucidar a identidade e efeito específico das proteínas encontradas.

O peptídeo mais provável obtido à partir de Fr67, cuja sequência é **CCDVCFK**, não foi encontrado entre as sequências obtidas à partir das bandas t4 e t5, o que sugere que **CCDVCFK** represente ou constitua um peptídeo com peso menor que 10 kDa. Ao ser submetido a busca no banco de dados BLAST, apresentou 100% de identidade com o fragmento situado entre os aminoácidos 18 e 23 do receptor *toll like* m do mexilhão *Mytilus galloprovincialis*.

Entre os metazoários os receptores *toll like*, assim como seu correlato, Toll, podem funcionar tanto como receptores de citocinas como receptores de reconhecimento de patógenos (PAMPs) (TOUBIANA et al., 2013). Além disso, sabe-se que os receptores *toll like* estão envolvidos no controle da expressão de peptídeos antimicrobianos em invertebrados (TAUSZIG et al., 2000). Assim, sugere-se que o peptídeo semelhante a receptor *toll like* encontrado na fração Fr67, além de poder estar envolvido na promoção de efeito antimicrobiano através do controle de expressão de peptídeos antimicrobianos, possa apresentar efeito antimicrobiano direto, caso seja molécula influente no efeito observado na fração Fr67. Mais estudos são necessários para elucidar o peptídeo em questão, bem como sua função.

Constituindo a proteína de cerca de 19 kDa encontrada na fração Fr67, o peptídeo mais provável **MLKQLAR** sequenciado à partir da banda t4, apresentou 100% de identidade com o fragmento situado entre os aminoácidos 849 e 855 da proteína portadora de domínio *coiled-coil* 17 oriunda da ostra *Crassostrea gigas*.

Ryan et al. (2013) estudou antagonismo antimicrobiano mediado por interações complementares *coiled-coil* entre peptídeos antimicrobianos e antagonistas denominados anti-peptídeos antimicrobianos, demonstrando que os antagonistas podem interagir estruturalmente com peptídeos antimicrobianos formando oligômeros helicais funcionalmente inertes. Apesar da possível semelhança da proteína encontrada na fração Fr67 do muco com um anti-peptídeo antimicrobiano mais estudos são necessários para elucidar sua função e, eventualmente, qual seria

o papel de um anti-peptídeo antimicrobiano no muco, que a princípio teria função agonista em relação ao efeito antimicrobiano e papel imunobiológico (LOKER et al., 2004).

O peptídeo mais provável sequenciado à partir da banda t3, de sequência **MYELANLVNELLR**, constitui uma proteína de cerca de 13 kDa presente na fração Fr72 (Tabela 2). Ao ser submetida ao banco de dados BLAST, apresentou 80% de identidade com o fragmento situado entre os aminoácidos 178 e 187 de proteína portadora de domínios semelhantes a fatores de crescimento múltiplos epidérmicos 10, oriunda da ostra *Crassostrea gigas*.

Sabe-se que proteínas portadoras de domínios semelhantes a fatores de crescimento múltiplos epidérmicos (MEGF) são proteínas de membrana importantes para desenvolvimento e comunicação celular. Desconhece-se, no entanto, qualquer relação de MEGF com efeitos antimicrobianos. Sugere-se, dessa forma, que a sequência selecionada não apresente semelhança com alguma proteína conhecida com efeito antimicrobiano caso outra sequência não estudada da banda t3 não revele semelhança da proteína de aproximadamente 13 kDa observada em Fr72, com alguma proteína com sabido efeito antimicrobiano. Sendo assim, seria possível supor que o efeito antimicrobiano observado em Fr72 não estaria relacionado a proteína observada na banda t3. Mais estudos são necessários para suportar tal hipótese.

Ao serem submetidas a busca em banco de dados de peptídeos APD2 as sequências selecionadas apresentaram entre 30 e 43% de similaridade com peptídeos já estudados (Tabela 4). Embora três das quatro sequências estudadas pareçam ser fragmentos de proteínas, justifica-se sua comparação a bancos de dados de peptídeos, uma vez que é sabido que PAMs podem se originar à partir de proteínas (RICILUCA et al., 2012).

A Patelamida D, peptídeo que apresentou 30% de similaridade com a sequência **CCDVCFK** (Tabela 4), é produzida pela cianobactéria da espécie *Prochloron didemni* simbiote do invertebrado bentônico marinho da família das Ascidáceas, *Lissoclinum patela*. Sabe-se que as patelamidas apresentam citotoxicidade moderada e atividade contra linhagem de células cancerosas multiresistentes a drogas (DEGNAN et al., 1989; IRELAND et al., 1982; WILLIAMS; JACOBS, 1993). Embora desconheça-se evidência direta de que a Patelamida D possua efeito antimicrobiano, estudos demonstraram que alguns PAMs também podem apresentar citotoxicidade contra células cancerosas (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008).

A sequência **MLKQLAR** apresentou 38,46% de similaridade com o peptídeo Mastoparana-VT7, oriundo de vespa da espécie *Vespa tropica*. A Mastoparana-VT7 possui atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas das espécies *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*; bactérias Gram negativas das espécies *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus pyocyaneus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*; e levedura da espécie *C albicans* (YANG et al., 2013).

O fragmento de sequência **FLKQLAR**, obtida à partir de Fr72, t2 e t5 apresentou 41,66% de similaridade com o PAM Temporina-Rb, oriundo da rã *Rana ridibunda*. A Temporina-Rb apresentou efeito antimicrobiano contra bactérias das espécies *E coli*, *S dysgalactiae*, *S agalactiae*, *S aureus*, *S typhimurium* e *K pneumoniae* (ASOODEH; ZARDINI; CHAMANI, 2012).

O fragmento de sequência **MYELANLVNELLR**, obtida à partir de t3, apresentou 42,85% de similaridade com o PAM Temporina-1PRb, oriundo da rã *Rana pirica*. A Temporina-1PRb apresentou efeito antimicrobiano contra bactérias das espécies *E coli*, *S aureus* e contra leveduras da espécie *C albicans* (CONLON et al., 2004).

6 CONCLUSÃO

Foram analisados quatro peptídeos sequenciados *de novo* à partir de duas frações que apresentaram efeito antimicrobiano na concentração testada, do muco de *P. boraceiensis*. Nenhuma das quatro sequências analisadas, **CCDVCFK**, **MLKQLAR**, **FLKQLAR** e **CCDVCFK** apresentaram semelhança com fragmentos de proteínas com efeito antimicrobiano direto conhecido. No entanto, três das quatro proteínas comparadas curiosamente apresentaram alguma característica que de alguma forma se relacionada com o mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos, seja representando um receptor envolvido na produção de PAMs, uma proteína apresentando domínios característicos em anti-peptídeos antimicrobianos ou uma proteína embrionária presente em ovo, estrutura conhecida por possuir importantes peptídeos antimicrobianos. No entanto, não se pôde estabelecer relação entre tais informações com o efeito antimicrobiano observado.

Em relação as similaridades observadas em bancos de dados de peptídeos, três das quatro sequências comparadas apresentaram alguma similaridade com PAMs. A similaridade observada pode ser indício de que os fragmentos observados constituam peptídeos com efeito antimicrobiano. Mais estudos são necessários para elucidar tal hipótese.

Em suma, baseado nas comparações realizadas nos dois bancos de dados, propõe-se que seja mais provável que as moléculas relacionadas aos efeitos antimicrobianos observados sejam peptídeos do que proteínas visto que os fragmentos analisados, mesmo aqueles pertencentes a proteínas, estão mais relacionados a peptídeos com atividade antimicrobiana conhecida.

Futuros estudos são necessários para isolar, identificar e caracterizar as moléculas presentes nas frações do muco de *P. boraceiensis* com efeito antimicrobiano.

No entanto, este trabalho demonstrou a riqueza de moléculas com efeito antimicrobiano para leveduras e bactérias Gram positivas e negativas no muco de *P. boraceiensis*. Além disso, foram obtidas informações que podem ser úteis durante a continuidade do processo de isolamento e sequenciamento de moléculas com efeito antimicrobiano do muco de *P. boraceiensis*.

REFERÊNCIAS*

- AKALAL, D.-B. G. et al. Aplysia mollusk-derived growth factor is a mitogen with adenosine deaminase activity and is expressed in the developing central nervous system. **Molecular Brain Research**, v. 117, n. 2, p. 228–236, 7 out. 2003.
- ASOODEH, A.; ZARDINI, H. Z.; CHAMANI, J. Identification and characterization of two novel antimicrobial peptides, temporin-Ra and temporin-Rb, from skin secretions of the marsh frog (*Rana ridibunda*). **Journal of Peptide Science**, v. 18, n. 1, p. 10–16, 1 jan. 2012.
- BARKER, G. M. **The Biology of Terrestrial Molluscs**. Oxfordshire: CABI, 2001. 558 p.
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool**. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 4 dez. 2013.
- BULET, P. et al. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 20, p. 14893–14897, 15 jul. 1993.
- CANEPARI, P. et al. Lipoteichoic acid as a new target for activity of antibiotics: mode of action of daptomycin (LY146032). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 6, p. 1220–1226, 6 jan. 1990.
- CHARLET, M. et al. 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, 9 jun. 1996.
- CHERINGTON, M. Clinical spectrum of botulism. **Muscle & Nerve**, v. 21, n. 6, p. 701–710, 1 jun. 1998.
- CHERRY, J. D. et al. Report of the Task Force on Pertussis and Pertussis Immunization—1988. **Pediatrics**, v. 81, n. 6, p. 933–984, 1 jun. 1988.
- CHILLER, K.; SELKIN, B. A.; MURAKAWA, G. J. Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 6, n. 3, p. 170–174, dez. 2001.

*De acordo com:

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

CONLON, J. M. et al. A family of brevinin-2 peptides with potent activity against *Pseudomonas aeruginosa* from the skin of the Hokkaido frog, *Rana pirica*. **Regulatory Peptides**, v. 118, n. 3, p. 135–141, 15 maio 2004.

DEGNAN, B. M. et al. New cyclic peptides with cytotoxic activity from the ascidian *Lissoclinum patella*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 6, p. 1349–1354, jun. 1989.

FUSETANI, N. Antifungal peptides in marine invertebrates. **Invertebrate Survival Journal**, v. 7, p. 53–66, 2010.

GARSON, M. Ecological Perspectives on Marine Natural Product Biosynthesis. In: **Marine Chemical Ecology**. Marine Science. [s.l.] CRC Press, 2001. p. 71–114.

GIEDRAITIENĖ, A. et al. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 47, n. 3, p. 137–146, 2011.

GOMES, S. R. et al. Molecular phylogeny of the South American land slug *Phyllocaulis* (Mollusca, Soleolifera, Veronicellidae). **Zoologica Scripta**, v. 39, n. 2, p. 177–186, 1 mar. 2010.

GOMEZ, J. E.; MCKINNEY, J. D. M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. **Tuberculosis**, Tuberculosis and leprosy: potential novel drugs and vaccines against *Mycobacterium*. v. 84, n. 1–2, p. 29–44, 2004.

GONZALEZ, M. et al. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 31, n. 4, p. 332–339, 2007.

GUEGUEN, Y. et al. Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*: recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 1, p. 313–323, 1 jun. 2006.

GUINANE, C. M.; COTTER, P. D. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 6, n. 4, p. 295–308, jul. 2013.

HANNA, S. L. et al. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Microbiology (Reading, England)**, v. 146 (Pt 10), p. 2495–2508, out. 2000.

HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on Anticancer Activities of Antimicrobial

- Peptides. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1778, n. 2, p. 357–375, fev. 2008.
- IIJIMA, R.; KISUGI, J.; YAMAZAKI, M. Antifungal activity of Aplysianin E, A cytotoxic protein of sea hare (*Aplysia kurodai*) eggs. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 19, n. 1, p. 13–19, jan. 1995.
- IIJIMA, R.; KISUGI, J.; YAMAZAKI, M. A novel antimicrobial peptide from the sea hare *Dolabella auricularia*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 27, n. 4, p. 305–311, abr. 2003.
- IRELAND, C. M. et al. Antineoplastic cyclic peptides from the marine tunicate *Lissoclinum patella*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 1807–1811, 1 maio 1982.
- KAMIYA, H.; MURAMOTO, K.; YAMAZAKI, M. Aplysianin-A, an antibacterial and antineoplastic glycoprotein in the albumen gland of a sea hare *Aplysia kurodai*. **Experientia**, v. 42, n. 9, p. 1065–1067, 1 set. 1986.
- KANAGASABAPATHY, S.; SAMUTHIRAPANDIAN, R.; KUMARESAN, M. Preliminary studies for a new antibiotic from the marine mollusk *Melo melo* (Lightfoot, 1786). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 4, p. 310–314, abr. 2011.
- KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678–5698, 1 out. 2012.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.
- LAJMANOVICH, A.; YORKE, J. A. A deterministic model for gonorrhea in a nonhomogeneous population. **Mathematical Biosciences**, v. 28, n. 3–4, p. 221–236, 1976.
- LOKER, E. S. et al. Invertebrate immune systems – not homogeneous, not simple, not well understood. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 10–24, 1 abr. 2004.
- LOKER, E. S. Gastropod Immunobiology. In: SÖDERHÄLL, K. (Ed.). **Invertebrate Immunity**. Uppsala, Sweden: Springer, 2010.
- MACAMBIRA, R. P.; FORMIGA, L. B.; FORMIGA, L. C. D. Difteria: o grave prognóstico brasileiro. **J. bras. med**, v. 66, n. 3, p. 69–4, 76, pas, mar. 1994.
- MCDERMOTT, P. F.; WALKER, R. D.; WHITE, D. G. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. **International Journal of Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 135–143, abr. 2003.

- MITTA, G. et al. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **European Journal of Biochemistry**, v. 265, n. 1, p. 71–78, 1999.
- MONTECUCCO, C.; SCHIAVO, G. Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. **Molecular Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 1 jul. 1994.
- ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–279, jun. 2003.
- PATERSON, I.; ANDERSON, E. A. The Renaissance of Natural Products as Drug Candidates. **Science**, v. 310, n. 5747, p. 451–453, 21 out. 2005.
- PETTIT, R. K.; PETTIT, G. R.; HAZEN, K. C. Specific activities of Dolastatin 10 and peptide derivatives against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 11, p. 2961–2965, nov. 1998.
- Phyllocaulis boraceiensis e postura - Capoeiras, Florianópolis, SC (1).JPG :: Noticias-malacologicas.** Disponível em: <<http://noticias-malacologicas-am.webnode.pt/album/gastropoda-terrestre/phyllocaulis-boraceiensis-e-postura-capoeiras-florianopolis-sc-1-jpg/>>. Acesso em: 13 nov. 2015.
- PREDTETCHENSKY, S.; MOROZ, O. A Method for early and rapid diagnosis of (bacterial) dysentery. **Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology**, n. 7, p. 3–11, 1940.
- RICILUCA, K. C. T. et al. Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. **Results in Immunology**, v. 2, p. 66–71, 2012.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews. Immunology**, v. 11, n. 4, p. 275–288, abr. 2011.
- ROMANOWSKI, B. et al. Serologic response to treatment of infectious syphilis. **Annals of Internal Medicine**, v. 114, n. 12, p. 1005–1009, 15 jun. 1991.
- ROTBERG, A. “Hanseniasis”, the New Official Name for Leprosy in Sao Paulo, Brazil*. **International Journal of Dermatology**, v. 8, n. 1, p. 40–43, 1 jan. 1969.
- ROTHSCHILD, L. J.; MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1092–1101, 22 fev. 2001.
- RYAN, L. et al. Anti-antimicrobial Peptides: folding-mediated host defense antagonists. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 28, p. 20162–20172, 7 dez. 2013.
- SABLE, C. A.; STROHMAIER, K. M.; CHODAKEWITZ, J. A. Advances in antifungal therapy. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 361–379, 2008.
- SANTOS, P.; THOMÉ, J. Estudo biométrico e avaliação da conversão alimentar das

- espécies de *Phyllocaulis boraceiensis* (THOMÉ) e *Phyllocaulis soleiformis* (ORBIGNY) (Veronicellidae, Gastropoda, Mollusca). **Biociências**, v. 8, n. 1, p. 85–101, 2000.
- SATHYAN, N. et al. Identification and Molecular Characterization of Molluskin, a Histone-H2A-Derived Antimicrobial Peptide from Molluscs. **ISRN Mol Biol**, v. 2012, p. 1–6, 2012.
- SHILABIN, A. G. et al. Lysosome and HER3 (ErbB3) Selective Anticancer Agent Kahalalide F: Semisynthetic Modifications and Antifungal Lead-Exploration Studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 18, p. 4340–4350, 1 set. 2007.
- TAUSZIG, S. et al. Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 19, p. 10520–10525, 9 dez. 2000.
- THYLEFORS, B. et al. A simple system for the assessment of trachoma and its complications. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 65, n. 4, p. 477–483, 1987.
- TINCU, J. A.; TAYLOR, S. W. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3645–3654, 10 jan. 2004.
- TOLEDO-PIZA, A. R. **Muco de *Phyllocaulis boraceiensis*: efeito microbiológico e análise bioquímica**. 2007. 56 f. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, São Paulo, 2007.
- TOLEDO-PIZA, A. R. **Avaliação e caracterização proteica do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* sobre a capacidade proliferativa de fibroblastos, células endoteliais e em modelos de cicatrização**. 2012. 183 f. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- TOUBIANA, M. et al. Toll-like receptors and MyD88 adaptors in *Mytilus*: Complete cds and gene expression levels. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 40, n. 2, p. 158–166, jun. 2013.
- TRACEY, K. J. et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. **Nature**, v. 330, n. 6149, p. 662–664, 23 dez. 1987.
- TUNKEL, A. R. et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 9, p. 1267–1284, 11 jan. 2004.
- WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic acids research**, v. 37, n. Database issue, p. D933–937, jan. 2009.

- WANG, Z.; WANG, G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Database issue, p. D590–D592, 1 jan. 2004.
- WILLIAMS, A. B.; JACOBS, R. S. A marine natural product, patellamide D, reverses multidrug resistance in a human leukemic cell line. **Cancer Letters**, v. 71, n. 1–3, p. 97–102, 30 jul. 1993.
- YANG, X. et al. Antimicrobial peptides from the venom gland of the social wasp *Vespa tropica*. **Toxicon**, v. 74, p. 151–157, nov. 2013.
- ZHANG, G. et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 49–54, 4 out. 2012.
- ZHAO, J. et al. Molecular cloning, expression of a big defensin gene from bay scallop *Argopecten irradians* and the antimicrobial activity of its recombinant protein. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 4, p. 360–368, jan. 2007.
- ZHONG, J. et al. A novel cysteine-rich antimicrobial peptide from the mucus of the snail of *Achatina fulica*. **Peptides**, v. 39, p. 1–5, jan. 2013.