

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

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

hemocitos, 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 primária 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.

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, Scutigeroformorpha 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 artrópodes, 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 lisar 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 menalizados/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 está menos derivada do que a presente em insetos holometabolos.

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 transmembranal *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 fosfolípidios (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).

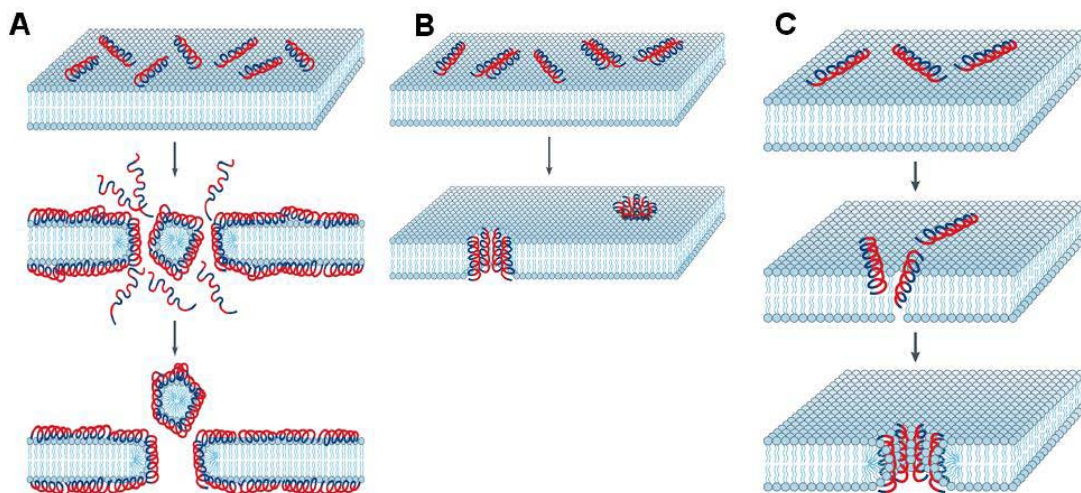


Figura 1- Mecanismos de ação dos peptídeos ao interagir com a bicamada fosfolipídica da membrana plasmática. Modelo *Carpet* (A). Modelo *Barrel Stave* (B). Modelo do *Poro toroidal* (C). As regiões hidrofóbicas estão representadas em azul e as hidrofílicas em vermelho.
Fonte: Brogden, 2005.

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 Coréia 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.

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 CO_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.; BENNICH, 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.; MEDZIHRADESKY, 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.

HAINÉ, 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 (*Tachyplesus 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

escriptions 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 acylpolyamine 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.

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

ULRICH, T.; SCHMIDT, 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, pharmacokinetics 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. Immunedefense 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.