

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

MARCOS ALEJANDRO SULCA LÓPEZ

**Desenvolvimento de novos peptídeos  
antimicrobianos a partir de proteínas dos venenos  
das serpentes peruanas *Bothrops pictus* e  
*Bothriopsis oligolepis***

TESE DE DOUTORADO – PROGRAMA DE BIOQUÍMICA

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

**30/08/2016**

S949d Sulca López, Marcos Alejandro  
Desenvolvimento de novos peptídeos antimicrobianos a partir de proteínas dos venenos das serpentes peruanas *Bothrops pictus* e *Bothriopsis oligolepis* / Marcos Alejandro Sulca López. – São Paulo, 2016.  
190p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica  
Orientador: Machini, Maria Terêsa

1. Bioquímica 2. Macromolécula : Estrutura 3. Proteínas: Estrutura 4. Peptídeos : Estrutura I. T. II. Machini, Maria Terêsa, orientador.

574.192 CDD

MARCOS ALEJANDRO SULCA LÓPEZ

**Desenvolvimento de novos peptídeos antimicrobianos  
a partir de proteínas dos venenos das serpentes  
peruanas *Bothrops pictus* e *Bothriopsis oligolepis***

Tese apresentada ao Instituto de Química  
da Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Doutor em Ciências  
(Bioquímica)

Orientadora: Profa. Dra. Maria Terêsa Machini

São Paulo

2016

Marcos Alejandro Sulca López

**Desenvolvimento de novos peptídeos antimicrobianos a partir de proteínas dos venenos das serpentes peruanas *Bothrops pictus* e *Bothriopsis oligolepis*.**

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Aprovada em: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DEDICO MINHA TESE**

*A las personas que más amo en esta vida:  
Primeramente, a mi padre Marcos y a mi madre Gertrudis, gracias pero muchas gracias por sus grandes sacrificios y esfuerzos que hicieron para ofrecerme la gran oportunidad de estudiar, brindarme apoyo moral para luchar, alcanzar y cumplir mis objetivos.*

*A mis hermanos, Orlando y Rosamaría, que en los buenos y malos momentos siempre estuvieron conmigo.*

*A mi abuela Leandra, a quien amo de manera especial, que por estar muy lejos de ella no pude decirle un último adiós.*

*Gracias totales.*

*À minha orientadora, a Dra. Maria Terêsa Machini, muito obrigado por sua amizade, carinho, ajuda e saber como me incentivar no trabalho, estudo e pesquisa tanto nos momentos bons e ruins na dura fase do doutorado. Muito obrigado por todo o seu apoio.*

*Ao Dr. Cesar Manuel Remuzgo Ruiz pela sua amizade, ajuda e conselhos que me forneceu para realizar meu trabalho de teses.*

*Ao Dr. Juan Armando Casas Mollano, quem me outorgou muitos conselhos e me ajudar tanto no acadêmico, no laboral e no pessoal.*

*Ao Dr. Cleber W. Liria, pela sua ajuda nas análises de aminoácidos e LC/ESI-MS.*

*Ao Dr. Marcelo Porto Bemquerer pela colaboração e por seu apoio e tempo gasto para me transmitir os seus conhecimentos para eu aprender a usar MALDI-TOF e com ela sequenciar os fragmentos tripticos.*

*À Dra. Sumika Kiyota pela ajuda nos testes de aglutinação.*

*À Dra. Elisabeth Cheng, pela ajuda nos testes de coagulação e pelo auxílio na realização de fracionamento por FPLC.*

*À Dra. Iolanda Midea Cuccovia e à Dra. Luciana Coutinho pelo auxílio na realização de fracionamento por FPLC.*

*À Dra. Carla Columbano e ao Dr. Fernando Gonzales, pelo auxílio na realização de fracionamento por FPLC.*

*Aos meus amigos peruanos, brasileiros e de outras nacionalidades no geral.*

*Ao CNPq pela bolsa recebida.*

*À FAPESP e ao CNPq pelos apoios financeiros ao nosso laboratório e projetos.*

*El buen marinero no se hace experto cuando el mar está calmado.*

*No escalé la montaña para que todo el mundo me pueda ver, lo escalé para que yo pueda ver el mundo.*

*Las experiencias son los únicos libros que necesitamos y la experiencia es adquirida después de una cadena de errores.*

*Nadie llega a la cima sin antes haber estado abajo.*

*Muchas veces esas cosas que parecen pequeñas nos prepara para grandes cosas.*

*Cuando te sientas que estás a punto de rendirte, acuérdate porque lo has comenzado.*

*A veces las personas a quien considerastes débiles, en ciertas situaciones son más fuertes que tú.*

*Cuatro "nuncas" para tu vida: Nunca bajes la cabeza, nunca debes decir no, nunca te limites y nunca pares de creer en tí.*

*Cuando alguien te diga: no podrás hacerlo, tu respóndele: siéntate y mira como lo hago..*

*Decídete por grandes metas y no descanses hasta que lo consigas.*

## RESUMO

Sulca, MA. **Desenvolvimento de novos peptídeos antimicrobianos a partir de proteínas dos venenos das serpentes peruanas *B. pictus* e *B. oligolepis***. 2016. (190p). Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A resistência aos antibióticos adquirida por micro-organismos patogênicos é um problema de saúde mundial e, por isso, o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos vem sendo amplamente estimulado. Sabendo que muitos peptídeos bioativos correspondem a fragmentos peptídicos de proteínas e/ou seus análogos, este trabalho teve o objetivo de desenvolver novos peptídeos antimicrobianos (AMPs) a partir das sequências aminoacídicas e das estruturas 3D de proteínas possivelmente envolvidas na atividade antimicrobiana de venenos de serpentes pouco estudados. As etapas iniciais seguidas foram: a) escolher uma fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>) de veneno de serpente peruana do gênero *Bothrops* da família Viperidae com sequência de aminoácidos conhecida e modelar por homologia a sua estrutura 3D; b) verificar atividade antimicrobiana em venenos de serpentes peruanas dos gêneros *Bothrops* e *Bothriopsis* da família Viperidae, selecionar um veneno ativo, fracioná-lo para isolar proteínas provavelmente envolvidas nessa atividade, tripsinizar as proteínas isoladas, sequenciar os fragmentos trípticos para identificá-las, localizar esses fragmentos em sequências aminoacídicas de proteínas com estruturas 3D disponíveis correlatas às proteínas isoladas/identificadas em classe, função e fonte natural. Em seguida, foram escolhidos fragmentos peptídicos da PLA<sub>2</sub> (item a) e das proteínas isoladas do veneno ativo (item b) e/ou desenhados análogos que apresentassem características exibidas por AMPs conhecidos. Os peptídeos desenhados foram sintetizados, purificados, caracterizados e testados em suas atividades antimicrobianas. Os modelos estruturais 3D da PLA<sub>2</sub> de *Bothrops pictus* e quatro peptídeos (PLA2-1 a -4) amidados derivados dela foram obtidos, sendo o PLA2-1 ativo frente a



*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* (MICs de 6,25-200  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ). Dos três venenos de serpentes peruanas testados, *Bothrops taeniata*, *Bothrops barnetti* e *Bothriopsis oligolepis*, os dois últimos inibiram o crescimento de *S. aureus* (MICs 0,78-50  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ), mas apenas *B. oligolepis* demonstrou espectro de ação amplo. O seu fracionamento sequencial, acompanhado de ensaios de inibição do crescimento de *S. aureus*, gerou frações ativas relativamente homogêneas que, tripsinizadas e os fragmentos trípticos sequenciados, continham metalo-peptidases do tipo III, serino-peptidase ou lectinas do tipo C. A verificação de atividade enzimática e de coagulação sanguínea nessas frações confirmaram as naturezas das proteínas isoladas. Dos três peptídeos amidados (Bo-Ser1, Bo-Met1 e Bo-Lec1) desenhados a partir de suas estruturas, um deles foi ativo frente às leveduras *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (Bo-Met1; MIC de 6,25 - 200  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ). Pela primeira vez, foi demonstrado que: a) os venenos das serpentes peruanas *B. barnetti* e *B. oligolepis* apresentam ação antimicrobiana, sendo o último de espectro amplo; b) que as proteínas acima citadas, que incluem uma serino-peptidase, estão envolvidas com essa propriedade do veneno de *B. oligolepis*; c) que as sequências aminoacídicas e modelo 3D de uma PLA2 ácida e de proteínas presentes nos venenos das serpentes peruanas *B. pictus* e *Bothriopsis oligolepis* podem funcionar como fontes naturais para o desenvolvimento de novos AMPs de ação potente em micro-organismos de interesse clínico e científico.

**Palavras-chave:** Atividade antimicrobiana, veneno de serpente, peptídeo antimicrobiano, fosfolipase ácida, metalo-peptidase, serino-peptidase, lectina tipo C.

## ABSTRACT

Sulca MA. **Development of new antimicrobial peptides based on the structures of proteins found in the venoms of the Peruvian snakes *B. pictus* e *B. oligolepis*.**

2016. (190p). PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Resistance to antibiotics obtained by pathogenic microorganisms is a global health problem, so the search for new antimicrobial agents has been encouraged. Knowing that many protein fragments and analogues are bioactive peptides, the aim of this work was to develop new antimicrobial peptides (AMPs) based on the amino acid sequences and 3D structures of proteins apparently involved in the antimicrobial activity of snake venoms very little or not studied so far. The first steps taken were: a) selection of a phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>) present in the venom from a Peruvian *Bothrops* sp. belonging to the family *Viperidae*, whose amino acid sequence was known, to model by homology its 3D structure; b) detection of antimicrobial activity in venoms from other Peruvian *Viperidae* *Bothrops* and *Bothriopsis* snakes, selection of an active venom, fractionation of it for isolation of proteins possibly involved in the antimicrobial activity, trypsinization of the isolated proteins, sequencing of the tryptic fragments for protein identification, location of such fragments in the amino acid sequences and 3D structures of proteins directly related in class, function and natural source to the isolated proteins. Then, peptide fragments from the chosen PLA<sub>2</sub> (item a) and from the isolated proteins (item b) that presented structural features found in the known AMPs were selected and/or their analogues were designed. Finally, synthesis, purification and characterization of the peptides with AMP potential, (viii) verification on whether or not they display antimicrobial activity. The 3D-structure models of *Bothrops pictus* PLA<sub>2</sub> and four amidated peptides (PLA<sub>2</sub>-1 to -4) derived from it were obtained, being PLA<sub>2</sub>-1 active against Gram negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* as well as the yeasts *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida*

*parapsilosis* (MICs de 6.25-200  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ). Among the three Peruvian snake venoms tested *Bothrops taeniatta*, *Bothrops barnetti* and *Bothriopsis oligolepis*, the last two inhibited the growth of *S. aureus* (MICs 0.78-50  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) and *B. oligolepis* presented a wide spectrum of bacterial action. Sequential fractionation followed by *S. aureus* growth inhibition assays of the main fractions led to active relatively homogeneous ones. Their trypsinization and sequencing of the tryptic fragments indicated that they contained metalloproteinases type III, serine-proteinase or lectins type CTL. Enzymatic activity and blood coagulation assays confirmed the nature of the isolated proteins. From the three amidated peptides (Bo-Ser1, Bo-Met1 e Bo-Lec1) derived from them, Bo-Met1 showed to be active against *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (MIC 6,25 - 200  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ). In summary, for the first time, it was demonstrated that: a) the venoms of the Peruvian snakes *B. barnetti* and *B. oligolepis* display antimicrobial activity, being the last of wide spectrum of action, b) the proteins isolated from *B. oligolepis* snake venom, including a serine-peptidase, are involved in the antimicrobial activity of the *B. oligolepis* snake venom, c) the amino acid sequences and 3D structures of acidic PLA<sub>2</sub> and of other proteins found in the venoms of the Peruvian *B. pictus* e *Bothriopsis oligolepis* snakes can be used as safe and natural sources for the development of new AMPs potent against microorganisms of clinical and scientific interest.

**Keywords:** Antimicrobial activity, snake venom, antimicrobial peptide, metalloproteinase, serine-proteinase, lectin type-C.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

As abreviaturas dos aminoácidos estão de acordo a IUPAC [União Internacional de Química Pura e aplicada, Eur. J.Biochem. 138:9-37 (1984)]

Aminoácido	Código de três letras	Código de uma letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

**ACN:** Acetonitrila

**AgNO<sub>3</sub>:** Nitrato de Prata

**α-CHCA:** Ácido α-ciano 4-hidroxicinâmico

**AMP:** Peptídeo/proteína antimicrobiano (a)

**ATCC:** American Type Culture Collection

**But:** *t*-butil

**CHAPS:** [3-[(3- colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano sulfonato]

**Da:** Dalton

**DEAE:** Dietilaminoetil

**DIC:** *N,N'*-diisopropilcarbodiimida

**DIPEA:** *N,N'*-diisopropiletilamina

**DMF:** *N,N'*-dimetilformamida

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DTT:** 1,4-Ditiotreitol

**Fmoc:** 9-fluorenilmetiloxicarbonil

**FPLC:** Cromatografia líquida rápida de proteínas (Fast Protein Liquid Chromatography)

**HOBt:** *N*-hidroxibenzotriazol

**IPG:** Gradiente de pH imobilizado

**LAAO:** L-amino oxidase

**LC:** Cromatografia líquida

**LC/ESI-MS:** Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por electrospray

**MALDI-TOF:** Matriz assistida por dessorção/ionização por laser-Tempo de vôo (Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of Flight)

**MIC:** Concentração mínima inibitória

**Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:** Tiosulfato de Sódio

**NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>**: Bicarbonato de amônio

**pH**: Potencial de hidrogênio, que indica a acidez ou basicidade de uma solução

**PLA<sub>2</sub>**: Fosfolipase A2

**Rink amida**: Resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoximetil

**RP-HPLC**: Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa

**SDS**: Dodecilsulfato sódico

**SDS-PAGE**: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato sódico

**SPFS**: Síntese de peptídeos em fase sólida

**TEMED**: N,N,N',N'-tetrametilenediamina

**TBTU**: Tetrafluoroborato de 2-(1-*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio

**TFA**: Ácido trifluoroacético

**TIC**: Cromatograma de íons totais

**TIS**: Triisopropilsilano

**TRIS**: Tris(hidroximetil)aminometano

**V**: Volt

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
1.1. Considerações gerais sobre infecções microbianas e o seu tratamento .....	21
1.2. Proteínas e peptídeos antimicrobianos (AMPs) .....	25
1.2.1. Noções gerais .....	25
1.2.2 Mecanismos de ação dos AMPs .....	30
1.3 Venenos de serpentes, suas propriedades e composições .....	36
1.4 Enzimas de venenos de serpentes com atividade antimicrobiana .....	39
1.5 AMPs relacionados a venenos de serpentes .....	43
1.6 AMPs provenientes de proteínas encontradas em outras fontes naturais .....	46
1.6.1 AMPs provenientes de proteínas do leite .....	48
1.6.2 AMPs provenientes de proteínas do músculo .....	49
1.6.3 AMPs provenientes de hemoglobinas .....	50
1.7. Necessidade de prospecção e desenvolvimento de novos AMPs .....	53
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>54</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>55</b>
3.1 Materiais, reagentes, resinas, solventes e micro-organismos .....	55
3.1.1 Química de peptídeos .....	55
3.1.2 Digestão proteica .....	56
3.1.3 Reagentes utilizados nas eletroforeses .....	56
3.1.4 Meios de cultura .....	57
3.1.5 Micro-organismos .....	57
3.1.6 Venenos .....	57

3.2 Desenvolvimento de novos AMP derivados da fosfolipase A2 de <i>B. pictus</i> (PLA2).....	58
3.2.1 Construção de modelo por homologia da estrutura tridimensional da PLA2..	58
3.2.2 Predição do potencial antimicrobiano dos peptídeos PLA2-1, PLA2-2, PLA2-3 e PLA2-4 .....	59
3.2.3 Análise do potencial de agregação dos peptídeos PLA2-1, PLA2-2, PLA2-3 e PLA2-4 .....	59
3.2.4 Predição da estrutura secundária dos peptídeos PLA2-1, PLA2-2, PLA2-3 e PLA2-4 .....	60
3.3 Sínteses, análises, purificações e caracterizações químicas de peptídeos.....	60
3.3.1 Síntese em fase sólida (SPFS) .....	60
3.3.2 Clivagem do peptídeo da resina e desproteção total .....	63
3.3.3 Análise dos peptídeos brutos por RP-HPLC .....	63
3.3.4 Caracterização dos peptídeos brutos e purificados por LC/ESI-MS .....	64
3.4 Purificação do peptídeo desejado por RP-HPLC em escala preparativa.....	65
3.5 Determinação dos graus de pureza dos peptídeos sintéticos purificados .....	66
3.6 Determinação do conteúdo peptídico dos purificados .....	66
3.7 Ensaios antimicrobianos dos venenos e dos peptídeos sintéticos .....	67
3.7.1 Ação antibacteriana dos peptídeos sintéticos .....	67
3.7.2 Ação antifúngica dos peptídeos sintéticos .....	68
3.8 Dosagem de proteína pelo método de Bradford .....	68
3.9 Ensaios antimicrobianos dos venenos, frações e proteínas purificadas deles ....	69



3.9.1 Ação antibacteriana.....	69
3.9.2 Ação antifúngica.....	69
3.9.3 Ação antimicrobiana observando a cinética de crescimento.....	69
3.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	70
3.11 PAGE de peptídeos em condição redutora.....	71
3.12 Coloração dos géis de PAGE com nitrato de prata .....	72
3.13 Fracionamento do veneno de <i>B. oligolepis</i> .....	73
3.13.1 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC).....	73
3.13.2 Cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC) de troca aniônica.....	73
3.13.3 FPLC de troca catiônica .....	74
3.13.4 FPLC de filtração em gel.....	75
3.14 Identificação de proteínas nas frações com atividade antibacteriana .....	76
3.14.1 Digestão das proteínas presentes nos géis de SDS-PAGE .....	76
3.14.2 Espectrometria de massa por MALDI-TOF das amostras tripsinizadas para identificação de proteínas .....	77
3.15 Atividades enzimáticas dos venenos, frações e/ou proteínas isoladas .....	78
3.15.1 Atividade gelatinolítica de proteínas isoladas.....	78
3.15.2 Atividade hemaglutinante (AHE) .....	79
3.15.3 Atividade coagulante .....	80
3.16 Prospecção e desenho de potenciais AMPs derivados das proteínas detectadas nas frações com ação antibacteriana do veneno de <i>B. oligolepis</i> ....	81
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>82</b>

4.1 Estabelecimento de condições para uso dos micro-organismos disponíveis .....	82
4.2 Desenvolvimento de novos AMP derivados da sequência aminoacídica da PLA <sub>2</sub> de <i>B. pictus</i> .....	83
4.2.1 Predição do potencial antimicrobiano dos peptídeos PLA2-1, PLA2-2, PLA2-3 e PLA2-4 .....	84
4.2.2 Predição da estrutura dos peptídeos.....	84
4.2.3 Síntese, análise, purificação e caracterização química dos peptídeos .....	86
4.2.4 Atividade antimicrobiana dos peptídeos derivados da PLA <sub>2</sub> de <i>B. pictus</i> .....	93
4.3 Estudo do veneno de <i>B. oligolepis</i> : busca por enzimas envolvidas na atividade antimicrobiana .....	95
4.3.1 Seleção do veneno pela atividade antimicrobiana .....	95
4.3.2 Determinação da concentração proteica dos venenos.....	97
4.3.3 Perfis proteicos e peptídicos dos venenos .....	99
4.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) dos venenos.....	102
4.3.5 Fracionamento do veneno de <i>B. oligolepis</i> .....	104
4.3.6 Fracionamento da fração P1 de <i>B. oligolepis</i> por cromatografia líquida de troca aniônica manual .....	112
4.3.7 Fracionamento da fração P1.3 do veneno de <i>B. oligolepis</i> por cromatografia líquida de troca aniônica manual.....	118
4.3.8 Repetição do fracionamento do veneno de <i>B. oligolepis</i> por cromatografia líquida de troca aniônica .....	119
4.3.9 Fracionamento da fração F2 por cromatografia líquida de troca catiônica...	128

4.3.10	Fracionamento de F4 por RP-HPLC .....	128
4.3.11	Tentativa de fracionamento de F6 por filtração em gel .....	131
4.3.12	Tentativa de fracionamento de F8 por RP-HPLC.....	133
4.4	Demonstração de atividades de metalo-peptidase, serino-peptidase e lectina tipo C em frações do veneno de <i>B. oligolepis</i> ativas frente <i>S. aureus</i> .....	137
4.4.1	Atividade gelatinolítica das frações F2-I e F4-II .....	139
4.4.2	Atividade hemaglutinante do veneno de <i>B. oligolepis</i> e da fração F8-II.....	139
4.4.3	Atividade coagulante do veneno de <i>B. oligolepis</i> da fração F8 e da fração F8-II em plasma humano.....	140
4.5	Desenvolvimento de novos AMPs derivado das sequências aminoacídicas das metalo-peptidase, serino-peptidase e lectina tipo C isoladas do veneno de <i>B. oligolepis</i> .....	141
4.5.1	Desenho de potenciais AMPs .....	141
4.5.2	Predição da estrutura dos peptídeos.....	143
4.5.3	Síntese, análise, purificação e caracterização química dos peptídeos desenhados.....	145
4.5.4	Atividade antimicrobiana dos peptídeos.....	148
<b>5.</b>	<b>DISCUSÃO GERAL.....</b>	<b>154</b>
5.1	Desenvolvimento de novos AMPs provenientes da PLA2 do veneno de <i>B. pictus</i> .....	154
5.2	Atividades antimicrobianas dos venenos das serpentes peruanas <i>B. barnetti</i> e <i>B. oligolepis</i> .....	157

5.3 Desenvolvimento de novos AMPs derivados das metalo-peptidase, serino-peptidase e lectina tipo C isoladas do veneno de <i>B. oligolepis</i> .....	159
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>161</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>162</b>
<b>SÚMULA CURRICULAR .....</b>	<b>183</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Considerações gerais sobre infecções microbianas e o seu tratamento

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as infecções bacterianas atuais estão mais associadas à *Escherichia coli* (envolvida em infecções do trato urinário), *Klebsiella pneumoniae* (causadora da pneumonia) e *Staphylococcus aureus* (envolvida em infecções de feridas e infecções da corrente sanguínea) e as fúngicas aos gêneros *Candida* (causador da candidíases), *Aspergillus* (causador da aspergilosis), e *Microsporium* (causador da dermatofitose), bem como ao *Histoplasma capsulatum* (causador da histoplasmose) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

A cada ano, dois milhões de pessoas se internam em hospitais devido a alguma infecção intra-hospitalar e aproximadamente 100,000 desses casos são fatais. No futuro, esta situação irá piorar devido à ineficácia dos antibióticos usados atualmente e ao pouco interesse das empresas farmacêuticas em descobrir e produzir novos antibióticos sintéticos ou semissintéticos (YAP, 2013).

Em 1929, o bacteriologista escocês Alexander Fleming de maneira casual descobriu um tipo de fungo filamentoso (*Penicillium chrysogenum*) que sintetizava um composto que inibia o crescimento de uma cultura de *S. aureus* e o chamou de penicilina (FLEMING, 1929). Esta descoberta fez que ele ganhasse o prêmio Nobel de Medicina em 1945. Em uma das partes da sua Nobel *Lecture* ele menciona: “*The time may come when penicillin can be bought by anyone in the shops. Then there is the danger that the ignorant man may easily underdose himself and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug make them resistant*” (FLEMING, 1945),

descrevendo que o uso não adequado de algum antibiótico poderia selecionar bactérias resistentes a ele. De fato, atualmente, a resistência microbiana aos antibióticos de uso clínico é uma séria ameaça à saúde pública em nível mundial.

Tal resistência aparece quando as infecções produzidas por micro-organismos patogênicos não são controladas ou inibidas pelas drogas antimicrobianas convencionais. Portanto, tais infecções se tornam difíceis de tratar, o que aumenta o risco de morte e/ou a disseminação dos patógenos resistentes em pacientes ainda não infectados.

Os antibióticos hoje disponíveis no mercado interferem no crescimento das células patogênicas, tendo alvos macromoleculares como os componentes que participam na montagem e estabilização da membrana celular (MALOTT et al., 2014) e na síntese de peptidoglicanos da parede celular (DÖRRIES et al., 2014), a topoisomerase (KLOSKOWSKI et al., 2012), a DNA polimerase (FROLOVA et al., 1977), a RNA polimerase (CAMPBELL et al., 2001) e a di-hidrofolato redutase (metabolismo do folato) (ADRIAN; KLUGMAN, 1997) ou alvos supramoleculares, como o ribossomo (SIIBAK et al., 2009). A resistência aos antibióticos se deve majoritariamente à reprogramação e camuflagem destes alvos moleculares através de pelo menos quatro mecanismos gerais de resistência: alterações na permeabilidade da membrana ao antibiótico, modificação do alvo macromolecular ou supramolecular (mutações), degradação ou inativação das drogas (DEVER; DERMODY, 1991) e estado metabólico dos micro-organismos (BIGGER, 1944; MEDANEY et al., 2016). Estes tipos de mecanismos são comuns nas bactérias ambientais, clínicas e comensais (YAP, 2013). A origem genética destes diversos tipos de resistência se dá pela transferência

horizontal de genes de resistência via plasmídeos (NYBERG et al., 2016), transposons (HARMER; HALL, 2016), integrons (ELSHERIF et al., 2016), bacteriófagos (SUBIRATS et al., 2016) e mutações em diferentes loci do cromossomo (JORGENSEN et al., 1999; LIAO et al., 2011).

A resistência relacionada ao estado metabólico dos micro-organismos se dá quando eles entram em estresse pelo contato com os antibióticos ocorrendo a redução do crescimento celular com aumento do estado de dormência e, portanto, entrada a um estado chamado de metabolicamente inativo (WOOD et al, 2013). Este tipo de comportamento celular foi observado pela primeira vez por Hobby et al (1942) que estudaram o efeito bacteriostático e bactericida da penicilina frente ao crescimento de *Staphylococcus aureus* (HOBBY et al, 1942). Posteriormente, Bigger (1944) também verificou os tais efeitos e denominou de células persistentes aquelas células resistentes ao antibiótico devido à sua capacidade de entrar em latência, uma fase onde não tem divisão celular, tornando-se resistentes ao antibiótico já que ele atua quando a célula entra na fase de crescimento celular (fase log). Bigger também observou que quando a penicilina era metabolizada, muitas das células persistentes voltavam a crescer, mas outras permaneciam na fase de latência por longos períodos de tempo (BIGGER, 1944).

Como nas diversas infecções de origem clínica, estão presentes bactérias metabolicamente ativas e latentes, o tratamento dessas infecções exige agentes microbicidas que também matem as bactérias latentes (HURDLE et al., 2011). A busca deste tipo de compostos já se iniciou. Exemplos estão nos trabalhos de Kamoda et al (2006), que desenvolveram o TG44 ativo contra isolados de *Helicobacter pylori* na fase

estacionária (KAMODA et al., 2006), de Hu e colaboradores (2010), que desenvolveram o antibiótico HT61 (derivado das quinolonas) ativo contra células dormentes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (HU et al., 2010) e o de Kong e colaboradores (2011), que desenvolveram os ácidos quenodesoxicólico e ursodesoxicólico que inibem o crescimento de *E. coli* metabolicamente ativas ou latentes (KONG et al., 2011).

A maioria dos antibióticos usados atualmente tem proteínas como alvos, o que significa que qualquer mutação nos genes que as codificam faz que os micro-organismos que as produzem se tornem resistentes. (BLÁZQUEZ, 2003). Por exemplo, a resistência aos antibióticos pertencentes ao grupo das quinolonas é relacionada a uma mutação no gene *gyrA* que codifica à DNA girase bacteriana em várias linhagens de *Salmonella* que causa a febre tifóidea (HASSING et al., 2016); linhagens de *Mycoplasma genitalium* resistentes às quinolonas (2-16 vezes em relação à selvagem) apresentam mutações nos genes *parC* e *parE* da topoisomerase IV (YAMAGUCHI et al., 2013).

As penicilinas têm como alvos às Proteínas de ligação das Penicilinas (PBPs), enzimas responsáveis pela síntese da parede celular. Assim, a ocorrência de mutações nos genes de PBPs, *ftsI*, *dacB* e *dacC*, que correspondem às enzimas PBP3, PBP4 e PBP6 em linhagens de *Salmonella enterica*, faz que essa bactéria aumente a sua resistência contra diversas classes de penicilinas (SUN et al, 2014).

Em resumo, a facilidade de adquirir resistência a um ou a vários antibióticos, especialmente dos micro-organismos provenientes dos ambientes hospitalares, torna necessário que se pesquise novas alternativas e tipos de antimicrobianos capazes de



agir via mecanismos e alvos celulares diferentes daqueles dos antibióticos empregados. Steinbuch e Fridman (2016) sugerem novos agentes antimicrobianos que tenham como principal atividade perturbar a estrutura da bicamada lipídica das membranas plasmáticas celulares (STEINBUCH; FRIDMAN, 2016). Escolher a membrana celular como alvo teria muitas vantagens, tais como: 1) os componentes da bicamada lipídica são relativamente conservados em comparação a alvos de origem proteicas que são facilmente mutáveis e, assim, a pressão seletiva para resistência seria menor; 2) como mencionado anteriormente, os micro-organismos podem entrar em estado de latência e, portanto, um antibiótico que tem a membrana celular como alvo iria ajudar a combater infecções relacionadas com esta classe de micro-organismos, não importando o estado metabólico deste (BLÁZQUEZ, 2003; ZUROFF et al, 2010; STEINBUCH; FRIDMAN, 2016).

## **1.2. Proteínas e peptídeos antimicrobianos (AMPs)**

### **1.2.1. Noções gerais**

Esses compostos têm sido considerados uma alternativa aos antibióticos convencionais pela sua capacidade de inibir o crescimento ou matar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, algumas multidroga-resistentes, e fungos (CHILEVERU et al, 2015).

A história da descoberta desses peptídeos começa em 1928 quando Rogers e Whittier (1928) observaram que um fator ou metabolito secundário inibia o crescimento de bactérias no processo de fermentação do leite, mas não conseguiram identificá-lo (ROGERS; WHITTIER, 1928). Anos mais tarde, Whitehead (1933), que trabalhava com

este tipo de fermentação para a produção de queijos, descreveu que o leite continha duas linhagens de bactérias do gênero *Streptococcus* (atualmente classificado como *Lactococcus*) que produziam um inibidor de crescimento microbiano de natureza proteica (WHITEHEAD, 1933). Em 1957, esse inibidor foi produzido pela bactéria *Lactococcus lactis* e é usado como preservante de alimentos, tendo sido introduzido no mercado pelo Aplin & Barrett Ltd. (agora parte da Danisco) com o nome de nisaplin (DAVIDSON et al, 2005).

Em 1971, Gross & Morell (1971) descreveram este composto antimicrobiano como um peptídeo que passou a ser chamado de nisina pois ele contém 34 resíduos de aminoácidos, é modificado e pertencente à família dos lantibióticos (pois contém um resíduo de aminoácido não usual chamado lantionina (GROSS; MORELL, 1971; VAN DE VEN et al., 1991), é ativo contra uma grande variedade de bactérias Gram-positivas e o seu uso na indústria alimentar não mostrou indícios de gerar a sua resistência a ele (JENSSEN et al, 2006).

Atualmente, sabe-se que os AMPs são produzidos por bactérias, arqueas, protistas, fungos, plantas, animais superiores e que eles pertencem à primeira linha do sistema de defesa natural, pois apresentam atividade antifúngica/fungicida, antiparasítica e anticancerígena. (HANCOCK; LEHRER, 1998; JENSSEN et al, 2006; LI et al., 2012) mas também propriedades inseticidas (JOHNSON et al., 1998), espermicidas (ZARE-ZARDINI et al., 2016), quimiotáticas (BLOES et al, 2014), ação cicatrizante de feridas (LIU et al., 2014; TANG et al., 2014a), antioxidante (FAN et al., 2012) e inibitória de proteases (NITSCHKE et al., 2013).

Muitos antibióticos peptídicos produzidos por micro-organismos apresentam biossínteses complexas: são codificados por um único gene, que codificam uma proteína precursora ou pré-proteína que é processada para gerar o peptídeo maduro. Muitos deles sofrem modificações pos-traducionais (MARTIN et al, 1995; WANG, 2012). Em 2013, por exemplo, foram descritos dois AMPs ativos contra fungos que são gerados por uma família de genes de *Triticum kiharae*, que codificam os precursores polipeptídicos (UTKINA et al., 2013). Diferentes estágios do inseto *Trichoplusia ni* levam ao aumento na expressão de diversos genes que codificam AMPs, tais como a atacina, gloverina e lelocina, que são expressos quando o inseto está exposto a linhagens de *Bacillus thuringiensis* (um bacilo usado para o controle de pragas) (TAMEZ-GUERRA et al., 2008). A formiga *Camponotus floridanus* dispõe de genes chamados de *defensina-1* e *defensin-2* que codificam proteínas precursoras, que processadas geram vários AMPs como a himenoptaecina (RATZKA et al., 2012).

Em relação às modificações pos-traducionais, as principais são: proteção “capping” do lado terminal, substituição de L-aminoácidos por D-aminoácidos, halogenação (Br ou Cl), hidroxilação, oxidação, fosforilação, glicosilação, sulfatação, redução, formação de pontes dissulfeto e tioéter, amidação e ciclização C-N. Essas modificações conferem as atividades desejadas e estabilidade química aos AMPs finais (WANG, 2012).

Os AMPs são classificados dependendo da atividade biológica ou estrutura química. Em relação à primeira, temos peptídeos antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas, espermicidas, anticancerígenos. Quanto à segunda, temos os que contêm ligações dissulfeto ou não, os que apresentam estruturas secundárias

predominantes, tais como  $\alpha$ -hélice, folha  $\beta$ -pregueada, estrutura estendida (NGUYEN et al, 2011) (Ver **Figura 1**).

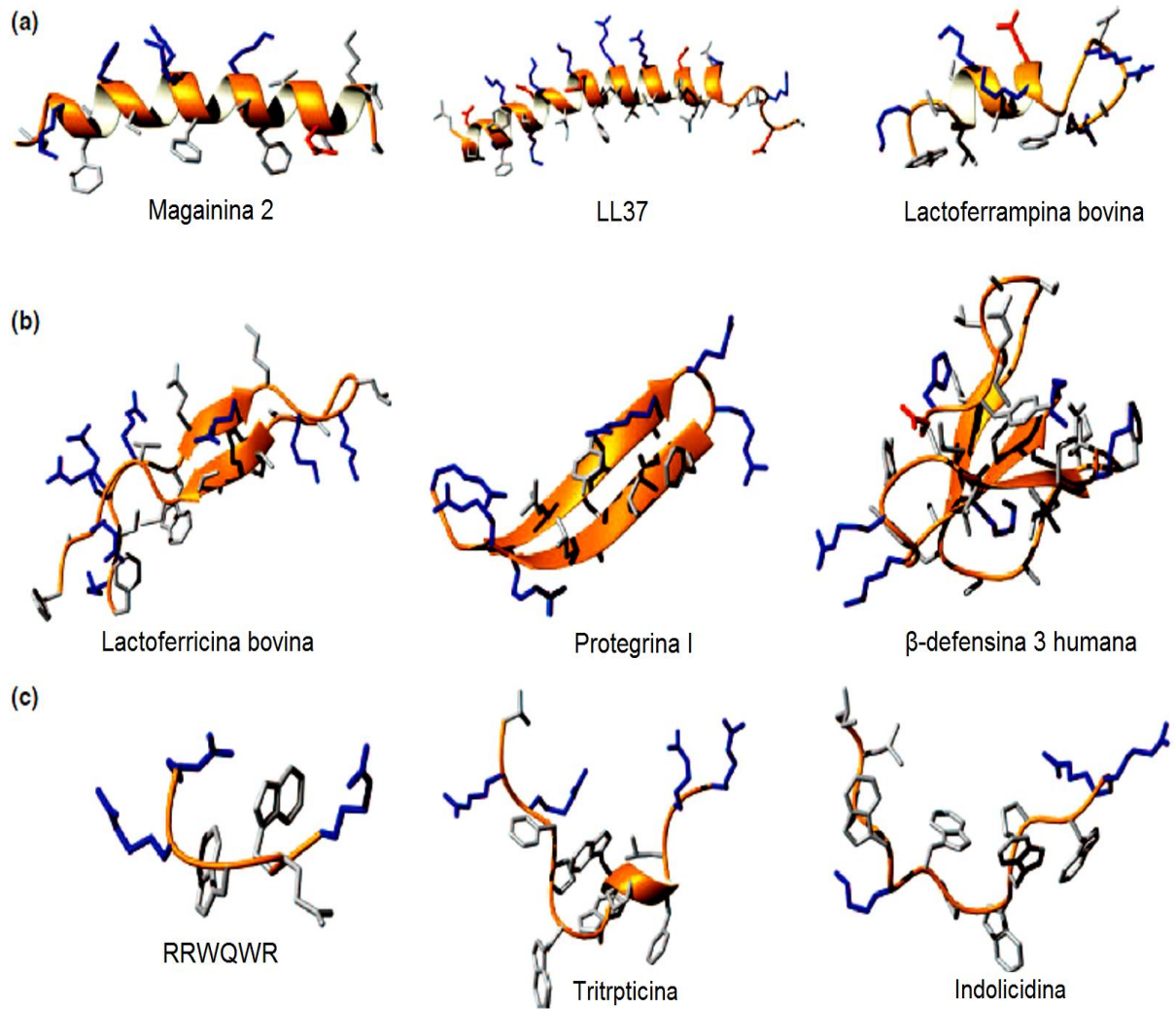


Figura 1. Estruturas de (a) AMP com estrutura alfa-hélice, (b) AMP com estrutura de folha  $\beta$ -pregueada, (c) AMP com estrutura estendida. As cadeias laterais com grupos carregados positivamente, negativamente e não ionizáveis são coradas de cor azul, vermelho e cinza, respectivamente (Adaptado de NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011).

Outro tipo de classificação é devido ao tipo de ligação entre os diferentes peptídeos ou modificações químicas entre os resíduos de aminoácidos: a) classe I, que inclui os AMPs lineares que são modificados na cadeia peptídica ou nas cadeias

laterais dos resíduos de aminoácidos (Ex.: LL-37, magaininas); b) classe II, que inclui AMPs com ligações químicas entre as cadeias laterais dos aminoácidos (Ex.: lantabióticos, defensinas-like); c) classe III, que inclui AMPs que possuem uma ligação entre uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido e a cadeia principal do peptídeo (Ex.: Microcina J25, fusaricidina A); d) classe IV, que é composta pelos peptídeos cíclicos (Ex.: AS-48, ciclotídeos) (WANG, 2015).

A maioria dos AMPs são catiônicos, com carga líquida entre +2 e +6 em pH neutro graças aos resíduos de aminoácidos, tais como a arginina e/ou lisina ou modificados, como acontece nos lantabióticos e nas polimixinas. Esses AMPs anfifílicos podem adquirir diferentes estruturas secundárias, especialmente a  $\alpha$ -hélice anfipática com uma face hidrofóbica contendo os resíduos de aminoácidos com cadeias laterais apolares e uma face hidrofílica contendo os polares e/ou carregados positivamente (MARTIN et al, 1995; HANCOCK, 1997). Como eles não induzem a geração de microorganismos mutantes resistentes mesmo após exposição sequencial a eles numa concentração próxima ao MIC, esses AMPs inibem o crescimento ou matam microorganismos patogênicos com maior eficiência em comparação com os antibióticos convencionais (HANCOCK, 1997). Nas plantas e animais, esses AMPs são produzidos continuamente após uma infecção ou ferimento (HANCOCK; LEHRER, 1998).

As plantas usam AMPs como defesa contra as infecções causadas por diversos patógenos. Majoritariamente esses peptídeos são ricos em cisteínas (CRPs), característica que permite a formação de duas a seis ligações dissulfeto e a estrutura compacta e resistente à degradação proteolítica ou química. Dependendo da sequência de aminoácidos, esses CRPs/AMPs são classificados em várias famílias como as  $\alpha$ -

defensinas, tioninas, “knottins”, proteínas de transferência de lipídeos, ciclotídeos, “snakins” e “hevein-like” (HAMMAMI et al., 2009; TAM et al., 2015). A *Clitoria ternatea*, planta pertencente à família Fabaceae, mostrou ter aproximadamente 15 CRPs estáveis ao calor que pertencem à família dos ciclotídeos e estão distribuídos em todos os seus tecidos. Esses AMPs são ativos contra *Escherichia coli* (NGUYEN et al., 2011). Um AMP de 5.4 kDa foi encontrado em sementes de *Phaseolus vulgaris* (feijão) com atividade contra *Mycosphaerella arachidicola*, *Setosphaeria turcica* e *Bipolaris maydis*, tendo sequência de aminoácidos altamente homóloga às das defensinas e sendo estável nas faixas de pH 3-12 e de temperatura 0°C-80°C (CHAN et al., 2012). A partir do *Solanum tuberosum* (batata), foi isolado o peptídeo termoestável PG-2 de 3.2 kDa com atividade frente *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, que afetam na saúde humana, e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, que afeta a cultura desta planta (KIM et al., 2013). Peptídeos com esta atividade também foram isolados de *Zea mays* (milho), tal como o peptídeo MPB-1 de 4.1 kDa com estrutura predominantemente em  $\alpha$ -hélice, e atividade contra a germinação do esporo ou alongamento da hifa de fungos que afetam as sementes desta planta (como os *Fusarium moniliforme* Sheld. e *Fusarium graminearum*), bem como contra a bactéria *Clavibacter michiganense* ssp. *nebraskense* (patógena desta planta) (DUVICK et al., 1992).

### 1.2.2 Mecanismos de ação dos AMPs

Os AMPs apresentam diferentes modos de ação. Muitos artigos descrevem que a atividade antimicrobiana está dirigida especialmente à membrana celular dos micro-organismos, mas tem sido observado que compostos orgânicos intracelulares ou que

participam da síntese de DNA/RNA ou de proteínas-chave também são seus alvos. Os modelos mais clássicos de ação em que o alvo é a membrana celular estão descritos abaixo e são ilustrados na **Figura 2** (NGUYEN et al, 2011).

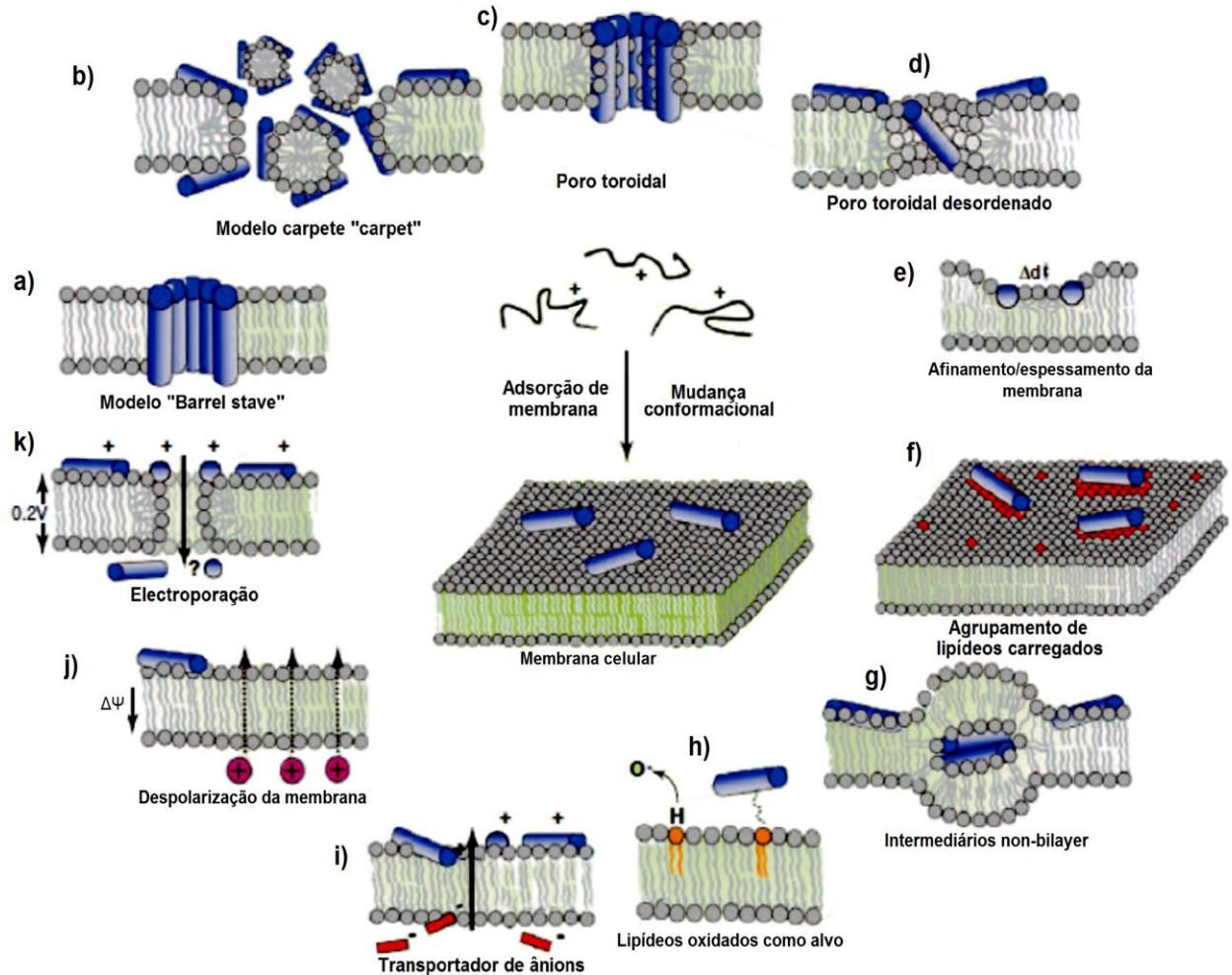


Figura 2. Modelos de ação e/ou ruptura na membrana celular causadas ou induzidas por AMPs (Adaptado de NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011).

a) **"barrel-stave"**: os peptídeos atingem a membrana plasmática em conformação  $\alpha$ -hélice e se inserem na membrana de forma alinhada e paralela às caudas hidrofóbicas dos fosfolipídeos da bicamada lipídica. A ligação à membrana alvo se deve às

interações hidrofóbicas, pois a face hidrofóbica da hélice interage com o núcleo lipídico da membrana e o lado hidrofílico interage com a molécula vizinha de AMP formando um poro. Este ordenamento de peptídeos faz com que mais AMP se ligue à membrana, aumentando o diâmetro do poro que adquire forma de barril. O poro deixa vazar o material citoplasmático, levando à morte celular (OREN; SHAI, 1998). Um exemplo é a alameticina (BAUMANN; MUELLER, 1974; YANG et al., 2001).

**b) *carpete*:** os lipídeos carregados negativamente entram em contacto com uma elevada concentração de AMP, formando agregados de alta densidade do peptídeo sobre a membrana, similar a um carpete. Portanto, os peptídeos interferem com a estrutura da bicamada lipídica, solubilizando a membrana plasmática em estruturas micelares e causando o seu rompimento (BECHINGER; LOHNER, 2006). A dermaseptina B2 segue este modelo (GALANTH et al., 2009) e, aparentemente, o Hb40-61 amidado (CARVALHO et al., 2015).

**c) *poro toroidal*:** os peptídeos se agregam e ligam à membrana dobrando a monocamada lipídica de forma contínua, fazendo com que os lipídeos adquiram uma curvatura positiva. Em consequência, o poro é formado tanto pelas moléculas de peptídeo e lipídeos alinhados a eles (as cabeças polares dos lipídeos estão voltadas para o interior do poro) (MIHAJLOVIC; LAZARIDIS, 2010). São exemplos as magainina (LUDTKE et al., 1996; MURZYN; PASENKIEWIECZ-GIERULA, 2003), melitina (YANG et al., 2001; LEE et al., 2013) e protegrinas (LAZARIDIS et al., 2013).

**d) *poro toroidal desordenado*:** A diferença desse mecanismo com o do poro toroidal é que neste os lipídeos também são curvados positivamente no interior do poro, mas a formação deste é mais desordenada ou aleatória e só uma ou duas moléculas de AMP estão localizados no centro do poro interagindo com as cabeças polares dos lipídeos e



também com as moléculas de água. Os demais peptídeos estão posicionados no lado externo da boca do poro, estabilizando a curvatura dos lipídeos. A magainina-H2 (um análogo da magainina) e melitina (SENGUPTA et al., 2008) também atuam de acordo a este modelo.

**e) afinamento/espessamento da membrana:** Há relação entre o alinhamento dos peptídeos na membrana e a capacidade para modular a espessura da membrana. Os peptídeos localizados na região das cabeças polares dos fosfolipídeos se alinham paralelamente à superfície da membrana externa celular de bactérias Gram-negativas, causando o afinamento e aumento da área superficial da bicamada lipídica. A membrana é considerada um fluido incompressível, portanto, a expansão da área requer redução da espessura da bicamada para manter um volume constante. Como exemplos temos as magainina 2, gramicidina S, o BP100 (GRAGE et al., 2016) e a indolicidina (NEALE et al., 2014). Peptídeos transmembranares, com um comprimento superior ao da espessura hidrofóbica da bicamada causam o espessamento da membrana. Devido à adaptação da espessura da membrana com o comprimento do peptídeo transmembranar, este também causa a desestabilização da membrana. Como exemplo, temos o peptídeo TisB (GRAGE et al., 2016).

**f) agrupamento de lipídeos carregados:** este mecanismo se dá com peptídeos ricos em arginina, que outorga a eles uma elevada carga líquida positiva. Esses AMPs podem agrupar os lipídeos aniônicos como consequência da sua interação com eles, formando regiões ricas em lipídeos aniônicos separadas das outras com lipídeos zwitteriônicos ou não carregados. Este evento permitiria que os AMPs recrutassem lipídeos aniônicos de outros locais da membrana, nos quais eles eram necessários para a função estabilizadora. Este rearranjo é um remodelamento que produz, portanto,

defeitos na membrana. Os peptídeos amidados como os PR-9, RR-9, PI-9 ricos em Arg tem essa capacidade (EPAND et al., 2010).

**g) intermediários non-bilayer:** o peptídeo se liga à membrana bacteriana, em especial aos lipídeos com capacidade para organizar fases não lamelares, particularmente a fase II hexagonal (HII). O AMP induz uma curvatura negativa da membrana favorecendo a organização desta em micelas invertidas, que se localizam no interior da membrana: o chamado de intermediário non-bilayer. Este tipo de estrutura não produz o vazamento dos componentes intracelulares, mas produz o colapso do intermediário non-bilayer e o peptídeo é liberado no interior da célula. Como exemplo cita-se a gramicidina S (PRENNER et al, 1999; HANEY et al., 2010).

**h) lipídeos oxidados como alvo:** a oxidação de lipídeos é favorecida pela liberação de espécies reativas de oxigênio durante a fagocitose como parte da defesa imune, o que aumenta a susceptibilidade da membrana celular bacteriana a AMPs. É o caso do lipídeo fosfatidilcolina oxidada e outros tipos de fosfolipídios. A sua ligação aos peptídeos se deve provavelmente à formação da base de Schiff decorrente de reação dos grupos amino do peptídeo com os grupos aldeídicos dos lipídeos, mas esta afirmação ainda não está confirmada. A temporina L e a indolicidina podem atuar por este mecanismo (MATTILA et al, 2008).

**i) transportador de ânions:** os AMPs ricos em Arg facilitam a liberação de compostos aniônicos orgânicos formando complexos com eles, os atravessam regiões da bicamada contendo lipídeos não carregados, sem formação de poros da membrana mas através de translocação. Este mecanismo mostra um tipo de atividade ionófora do peptídeo em membranas só observado em presença de lipídeos não carregados, sendo que este tipo de atividade pode alterar a permeabilidade da membrana plasmática para

os metabolitos aniônicos importantes por perturbar a regulação do equilíbrio osmótico que causa a ruptura da membrana. A indolicidina tem esta propriedade de transporte de ânions (ROKITSKAYA et al., 2011).

**j) despolarização da membrana:** a despolarização é o movimento dos íons através da membrana plasmática, diminuindo o seu potencial e a viabilidade da célula. Os oligômeros dos peptídeos podem formar canais iônicos ou estruturas de agregados irregulares que perturbam a integridade funcional da membrana, liberando íons intracelulares de  $K^+$  (sendo esta liberação dependente da presença de íons de  $Ca^{2+}$ ), conduzindo à morte celular. É proposto que outros íons, como  $Na^+$  ou  $H^+$ , e moléculas maiores, como o ATP e proteínas, também poderiam ser liberados por meio deste mecanismo. AMPs como a lactoferricina (AGUILERA et al., 1999) e a daptomicina (SILVERMAN et al., 2003) são bons exemplos de ação por este mecanismo.

**k) eletroporação:** a acumulação do peptídeo na membrana bacteriana afeta a diferença do potencial elétrico através dela. Quando esta diferença atinge 0,2 V, a membrana se torna permeável a várias moléculas, incluindo os próprios AMPs. O peptídeo “NK-Lysin” tem esta propriedade (MITEVA et al., 1999).

Em relação aos AMPs que tem alvos intracelulares, temos:

**AMPs que interferem com a síntese de proteínas:** os peptídeos pirrocoricina e drosocina interagem com um tipo de chaperona (proteína que facilita o dobramento correto das proteínas recém-sintetizadas) da *E. coli* chamada proteína de choque térmico DnaK. O peptídeo se liga à DnaK, impedindo a abertura e fechamento da sua tampa multihelical, não permitindo a entrada de cadeias polipeptídicas no seu interior, inibindo a atividade ATPásica desta enzima e a assistência do dobramento proteico (KRAGOL et al., 2001).

**AMPs que interferem com a síntese de DNA:** o peptídeo WRWYCR inibe a recombinação genética, afetando a junção de Holliday que é uma junção móvel entre quatro cadeias de DNA típica da recombinação gênica. Este AMP é seletivo para estas estruturas de DNA ramificadas, causando o aumento de quebras no DNA e produzindo defeitos na segregação cromossômica. Ele também inibe a atividade de enzimas que participam no reparo do DNA (SU et al, 2010).

### **1.3 Venenos de serpentes, suas propriedades e composições**

O veneno de serpente é composto por uma mistura de íons inorgânicos, tais como potássio, cálcio, ferro, cobalto, cobre, magnésio, fósforo, manganês, sódio e zinco; compostos orgânicos, tais como hidratos de carbono, serotonina, histamina, nucleosídeos, aminoácidos, citrato (BIEBER, 1979). Em relação ao conteúdo proteico dos venenos, as proteínas com atividade enzimáticas mais abundantes são as pertencentes às famílias das metalo-peptidases, fosfolipases A2, serino-peptidases, L-aminoácido oxidases incluindo as isoformas delas. As proteínas sem atividade enzimática são as lectinas tipo C, desintegrinas, proteínas secretadas ricas em cisteína (CRISPs), proteínas homólogas ao fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Os venenos também contêm um número variável de peptídeos (AIRD et al., 2013; GUÉRCIO et al., 2006; KOHLHOFF et al., 2012). A presença de peptídeos como os peptídeos potenciadores da bradicinina (BPP) (FERREIRA et al, 1970) e peptídeos antimicrobianos como a catelicidina (WANG et al., 2008) também foram descritos.

Muitos trabalhos indicam que aproximadamente 90-95% do peso seco desses venenos corresponde a proteínas e outros 5% a lipídeos, carboidratos, nucleotídeos, aminoácidos e metais (DE LIMA et al., 2005; NAIR et al., 2007), mas outros trabalhos

descrevem que a concentração proteica nos venenos de diferentes serpentes da família Viperidae pode oscilar entre 24 e 100 % (PERUMAL SAMY et al., 2007).

Esse veneno é uma secreção de animais peçonhentos sintetizada em glândula específica (**Figura 3**) que permite a captura das presas. Inicialmente, a glândula de veneno era uma glândula salivar que lubrificava os alimentos (GANS, 1978). A super-expressão dos genes de algumas enzimas, a ativação de outros genes e as mutações aleatórias causaram a sua subsequente duplicação e diversificação, originando novas estruturas e funções biológicas como de imobilizar, matar, digerir e dissuadir concorrentes e predadores (REEKS et al, 2015).

## LÚMEN DA GLÂNDULA

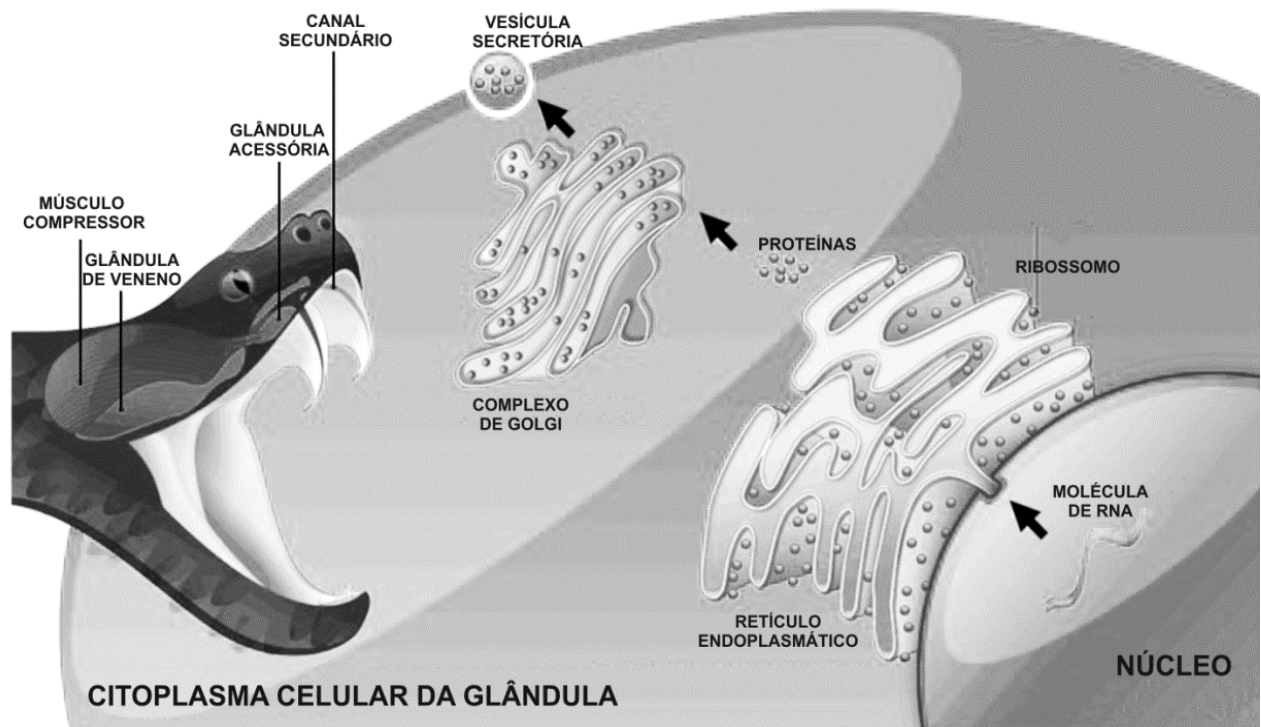


Figura 3. Processo da síntese do veneno de serpente nas células da glândula de veneno (Adaptado de DE OLIVEIRA JUNIOR et al, 2013)

O veneno de cada serpente é diferente, como também existe uma diferença sutil entre as diferentes espécies, entre jovens e adultos, entre serpentes da mesma espécie de diferentes regiões geográficas (ORTIZ et al., 2012). Ademais, o contato destes animais com os humanos gera milhões de acidentes anuais no mundo, com alta incidência na África, Ásia, América Latina e Nova Guiné (CHIPPAUX, 1998). No Peru, as serpentes do gênero *Bothrops* (Familia Viperidae) são responsáveis por 80% dos acidentes (MINISTÉRIO DE SALUD, PERÚ, 2004).

As serpentes peruanas, cujos venenos foram estudados, são encontradas em diversas regiões geográficas de Peru. A serpente *B. barnetti* é encontrada no litoral norte de Perú, *B. taeniatta* na floresta de Ecuador, Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname, French Guiana, Brasil, Peru e Bolivia; e *B. oligolepis* é encontrada no lado oriental dos Andes de Peru e da Bolivia.

Muitas das enzimas que compõem o veneno estão associadas às propriedades farmacológicas que se manifestam durante o envenenamento, como é o caso da formação de edema, hemorragia e hipotensão (PAREDES MEDINA, 2012), processos que fazem com que estes venenos apresentem um potencial reconhecido pela indústria farmacêutica para a busca de novos compostos químicos que levem ao desenvolvimento de novas drogas. Alguns deles já foram estudados e testados com tal propósito como a bradicinina (FERREIRA et al, 1970) e crotalina (KONNO et al., 2008), p. ex., mas até hoje nenhum composto antimicrobiano proteico ou peptídico do veneno de uma serpente foi licenciado para uso clínico.

De fato, a boca das serpentes e as suas presas contêm muitas bactérias patogênicas. Como o envenenamento é geralmente associado à baixa incidência de

infecção bacteriana, é proposto que os venenos desses animais contêm compostos antimicrobianos peptídeos e enzimas (DE LIMA et al., 2005). Já em 1948, Glaser descreveu que o veneno de *Crotalus* demonstrou ter maior ação sobre as bactérias com formas bacilares do que sobre as bactérias cocoidais (GLASER, 1948). Em 1970, foi mostrado que tal atividade antimicrobiana não provinha só de peptídeos, mas também de enzimas (SKARNES, 1970). Em 1991, Stiles e colaboradores descreveram que venenos de serpentes africanas, norte-americanas, asiáticas e australianas são capazes de inibir o crescimento bacteriano (STILES et al., 1991).

#### **1.4 Enzimas de venenos de serpentes com atividade antimicrobiana**

Em relação às L-amino oxidases (LAAO) de serpentes do gênero *Bothrops*, LAAO do veneno de *Bothrops matogrosensis* (Bm-LAAO) é ativo frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (OKUBO et al., 2012). Do veneno de *Bothrops leucurus* foi isolada uma LAAO de 80 kDa com capacidade de inibir *S. aureus*, *Leishmania* sp. e *T. cruzi* (TORRES et al., 2010). Várias outras LAAO de venenos de serpentes com atividade antibacteriana têm sido descritas (DU; CLEMETSON, 2002; TOYAMA et al., 2006; LAZO et al., 2007; CISCOTTO et al., 2009; ZHONG et al., 2009; OKUBO et al., 2012). Estudos de proteômica feitos em três espécies de serpentes peruanas (*Bothrops atrox*, *B. barnetti* e *B. pictus*) encontraram só uma isoforma de LAAO nas duas primeiras espécies de 55 e 60 kDa, respectivamente (KOHLHOFF et al., 2012). Guércio e colaboradores (2006) estudaram a variação ontogenética dos componentes proteicos do veneno de exemplares jovens, sub-adultos e adultos de *B. atrox* brasileiro, tendo observado que as LAAO estavam presentes nos três estágios de

vida e que as isoformas tinham pIs de 5,9-6,2 e massas molares entre 55 e 61 kDa (GUÉRCIO et al., 2006). Portanto, essas enzimas apresentam um alto potencial biotecnológico para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos, antitumorais e antiprotozoários (IZIDORO et al., 2014).

As LAAO também mostraram ter atividades anti-leishmania e anti-HIV, porém estas atividades dependem da produção de  $H_2O_2$  (MACKESSY, 2010). BI-LAAO, o componente majoritário do veneno de *B. leucurus*, foi descrito como uma citotoxina que gera uma grande quantidade de  $H_2O_2$  e que tem atividade antiparasitária contra promastigotos de *Leishmania* sp. (NAUMANN et al., 2011). LAAO de *B. atrox* também apresentou atividade antiparasítica contra diferentes espécies de *Leishmania* que foi inibida pela catalase, que também tem atividade bactericida contra *E. coli* e *S. aureus* (DE MELO ALVES PAIVA et al., 2011).

Têm sido descritas várias fosfolipases  $A_2$  (PLA2s) de veneno de serpente do tipo Asp49 (com atividade catalítica) e Lys49 (sem atividade catalítica) que apresentam atividades antibacterianas e/ou antifúngicas. Dentre elas podemos citar a miotoxina II de *Bothrops asper* (PÁRAMO et al., 1998a), a toxina BnpTx-1 de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (RODRIGUES et al., 2004), a toxina Cdcoll-F6 de *Crotalus durissus collilineatus* (TOYAMA et al., 2005), a miotoxina MjTX-II de *Bothrops moojeni* (STÁBELI et al., 2006), a BFPA de *Bungarus fasciatus* (XU et al., 2007), a toxina AgkTX-II de *Agkistodon halys* (PERUMAL SAMY et al., 2008), a PnPLA2 de *Porthidium nasutum* (VARGAS et al., 2012), a toxina NN-XIb-PLA2 de *Naja naja* (SUDARSHAN; DHANANJAYA, 2016).



A maior parte das PLA<sub>2</sub>s que apresentam ação antimicrobiana são de carácter básico, sendo responsáveis pelos vários efeitos tóxicos dos venenos (FERNÁNDEZ et al., 2010; VARGAS et al., 2012; SUDARSHAN; DHANANJAYA, 2016). A PLA<sub>2</sub> ácida de *B. jararacussu* apresenta atividade bactericida (contra *E. coli* e *S. aureus*) e efeitos antitumorais (ROBERTO et al., 2004). A BmarPLA<sub>2</sub> é uma proteína monodimérica de 28 kDa de *Bothrops marajoensis* capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*, *Candida albicans*, *P. aeruginosa* e *Leishmania* sp. (COSTA TORRES et al., 2010). Durante a separação dos componentes proteicos no veneno de *B. asper*, foram obtidas duas frações contendo diversas isoformas de PLA<sub>2</sub> ácida ativa e não ativa (de 25 e 14 kDa por SDS-PAGE em condições não redutoras e redutoras, respectivamente) com atividade antiplasmodial (CASTILLO et al., 2012). Outros trabalhos mostraram a existência de PLA<sub>2</sub> em três espécies de serpentes peruanas (*Bothrops atrox*, *Bothrops barnetti* e *Bothrops pictus*), sendo as suas massas molares de 14-32 kDa (KOHLHOFF et al., 2012). As isoformas das PLA<sub>2</sub> estão presentes em todos os estágios de vida da serpente (GUÉRCIO et al., 2006).

Em relação às metalo-peptidases (SVMPs), uma de 23.1 kDa de veneno de *Agkistrodon halys* (*Gloydius halys*) inibiu o crescimento de *S. aureus* e das bactérias Gram-negativas *Burkholderia pseudomallei*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (SAMY et al., 2008). Muitos outros estudos as associaram à atividade hemorrágica (PAINE et al., 1992; KOHLHOFF et al., 2012; ABDEL-ATY; WAHBY, 2014) e necrotizante (PEICHOTO et al., 2004; KUMAR et al., 2010; GOWDA et al., 2011). As SVMPs de venenos de serpentes pertencem a quatro classes organizadas segundo o seu domínio catalítico e sua massa

molar: Classe PI = 20-30 kDa; Classe PII = 30-50 kDa; Classe PIII = 50-80 kDa e Classe PIV = 80-100 kDa (HITE et al., 1994; FOX; SERRANO, 2008). No que se refere às lectinas tipo C, estas são proteínas que ligam reversivelmente carboidratos e glicoconjugados, pertencem à grande família de lectinas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e possuem um domínio de reconhecimento aos carboidratos (CRD). Podem ser agrupadas em 17 grupos dependendo de suas características estruturais e funcionais (ZELENSKY; GREARY, 2005). Inibem ou ativam receptores específicos das plaquetas e fatores de coagulação (WANG, 2008), promovem uma grande diversidade de efeitos biológicos como induzir edemas (PANUNTO et al., 2006), aglutinar eritrócitos *in vitro* (KASSAB et al., 2001), inibir proliferação de células cancerosas (PEREIRA-BITTENCOURT et al., 1999). Os glicoconjugados da superfície das células bacterianas, como os peptidoglicanos e ácido teicóico são alvos potenciais para as lectinas do tipo C (NUNES et al., 2011). A atividade antimicrobiana deste tipo de proteína foi descrita em bactérias Gram-positivas, mas não contra Gram-negativos (NUNES EDOS et al., 2011; CASTANHEIRA et al., 2013).

Outro grupo de lectinas encontrados também no veneno são as proteínas similares à lectina tipo C (CTL), pois tem homologia de 15-40 % com o CRD das lectinas tipo C (MORITA, 2005). Muitas destas CTLs perderam a função de reconhecer carboidratos e ligar  $\text{Ca}^{2+}$ . As CTLs podem ter atividade anticoagulante gerando hemorragias. Outros CTLs, pelo contrário, ativam fatores de coagulação sem precisar de algum co-factor. Estes CTLs coagulantes provocam uma perda de hemostasia, causando hemorragia.

Em relação às serino-peptidases (SVSPs) de veneno de serpente, atualmente não há nenhum relato sobre sua atividade antimicrobiana. Essas enzimas apresentam massa molar variando entre 26 e 67 kDa com diversos níveis de glicosilação (SERRANO, MAROUN, 2005)

### 1.5 AMPs relacionados a venenos de serpentes

Algumas secreções produzidas por animais têm servido de fonte de compostos químicos que levam ao desenvolvimento de novos medicamentos (GOMES et al., 2010). Apesar da picada de serpentes ser assunto de saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007), os venenos de serpentes têm sido investigados, por exemplo, para o tratamento de câncer com a crotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (CURA et al., 2002), para desfribinização com o Ancrod (Arvin®) de *Calloselasma rhodostoma* e batroxobin (Defibrase®) de *Bothrops moojeni* (STOCKER; BARLOW, 1976; KINI, 2006; SPIEKERMANN et al., 2016) e para hipertensão com os peptídeos potenciadores de bradicinina que levaram ao desenvolvimento e o uso do captopril a partir do veneno da serpente *Bothrops jararaca* (FERREIRA et al, 1970; VYAS et al., 2013) e para analgesia com a crotalfina (KONNO et al., 2008).

No veneno da serpente *Bothrops jararaca* o peptídeo denominado Pep5Bj de 1370 Da tem atividade antifúngica contra fitopatógenos, como *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum*, e leveduras, como *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*; a ação deste peptídeo em fungo *F. oxysporum* se dá por desestabilização e permeabilização da membrana celular (GOMES et al., 2005).

Sabe-se que as catelicidinas são uma família de AMPs que atuam na defesa imune inata (ZANETTI, 2004). No veneno de *Bungarus fasciatus* existe a catelicidina-BF (KFFRKLKKS VKKRAKEFFKKPRVIGVSIPF) de massa molar 3637,5 Da, ativo contra levedura *C. albicans*, fungos filamentosos como o *Aspergillus*, bactérias Gram-positivas, mas especialmente bactérias Gram-negativas, que incluem linhagens isoladas dos ambientes hospitalares resistentes a alguns antibióticos convencionais (WANG et al., 2008). O análogo catelicidina BF-30 (KFFRKLKKS VKKRAKEFFKKPRVIGVSIPF) feito sinteticamente foi testado contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* resistentes aos antibióticos, tendo se mostrado mais potente do que a gentamicina, ampicilina ou bacitracina; testes *in vivo* em ratos com queimaduras e infectados com *Pseudomonas aeruginosa* revelaram que o BF-30 impediu a colonização desta bactéria, evitando a infecção e inflamação, o seu mecanismo de ação inclui desestabilização e permeabilização da membrana celular (ZHOU et al., 2011).

Um outro AMP de 11 resíduos de aminoácidos [KR(F/A)KKFFKK(L/P)K] chamado de motivo ATRA, pertencente à família das catelicidinas também foi isolado do veneno de *Naja atra*. Este AMP e quatro análogos dele (ATRA-1, -2, -1A e -1P) foram sintetizados: dois deles dos análogos (ATRA-1: KRFKKFFKCLK-NH<sub>2</sub> e ATRA-1A: KRAKKFFKCLK-NH<sub>2</sub>) se mostrou equipotente ao peptídeo original frente a *Escherichia coli* K12 e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4. Esses peptídeos não foram tóxicos com as células do hospedeiro (DE LATOUR et al., 2010). O AMP crotamina de 42 resíduos de aminoácidos (YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWRWKCKKGGSG) foi isolado do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, tendo estrutura similar às  $\beta$ -defensinas. As atividades antimicrobianas do peptídeo nativo, recombinante ou sintetizado quimicamente são equivalentes. Eles foram ativos contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas,

inativos contra alguns fungos filamentosos, altamente ativos contra fungos leveduriformes como a *Candida* spp., *Trichosporon* spp., e *Cryptococcus neoformans* e pouco tóxicos nas linhas celulares HEK293, PC12 e células de astrocitos todos eles não tumorais. Análises por microscopia eletrônica de transmissão revelaram que o peptídeo alterava a morfologia da célula da *Candida albicans* pelo colapso da membrana e coagulação do citoplasma (YAMANE et al., 2013).

Gebirim e colaboradores descreveram que o peptídeo KKYRYHLKPFCKK, correspondente ao fragmento 115-129 de uma PLA<sub>2</sub> básica de *Bothrops jararacuçu* apresenta atividade antitumorogênica, o que sugere que o mesmo também funcione como um AMP (GEBRIM et al, 2009), pois Costa e col (2008) demonstraram que peptídeos catiônicos, tais como o pepMTX-I (<sup>115</sup>RKYMAYLRVLCKK<sup>129</sup>) e o pepMTX-II (<sup>115</sup>KKYRYHLKPLCKK<sup>129</sup>) derivados da sequência de aminoácidos de PLA<sub>2</sub> ácida do veneno de *Bothrops brazili*, são ativos contra *Escherichia coli* e *Candida albicans*. A localização destes peptídeos é mostrada na **Figura 4**; como se observa eles estão localizados na superfície das PLA<sub>2</sub>s.

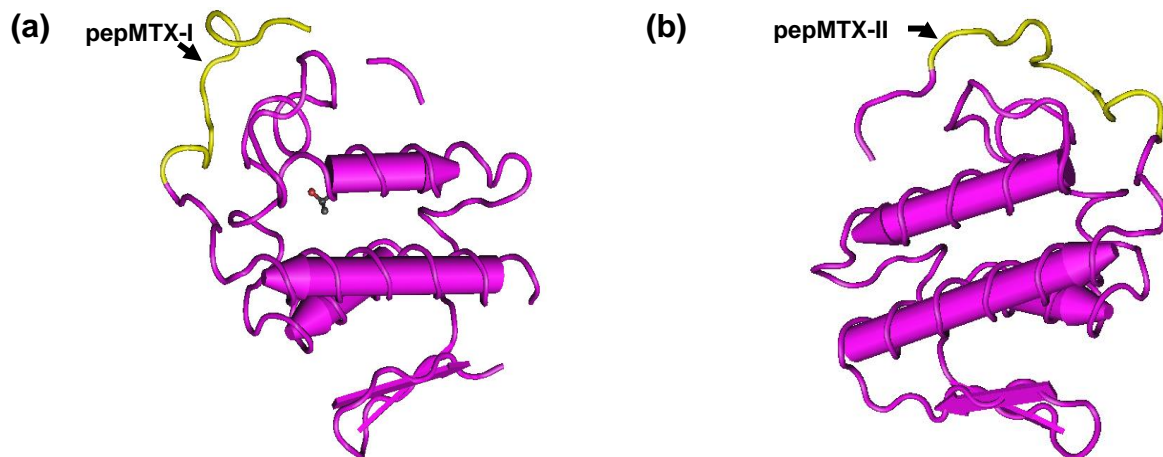


Figura 4. Localização (em amarelo) dos peptídeos pepMTX-I (<sup>115</sup>RKYMAYLRVLCKK<sup>129</sup>) e pepMTX-II (<sup>115</sup>KKYRYHLKPLCKK<sup>129</sup>) nas estruturas **(a)** da PLA<sub>2</sub> Piratoxina III do veneno de *Bothrops pirajai* (PDB: 1GMZ\_A) e **(b)** da PLA<sub>2</sub> BbTX-II do veneno de *Bothrops brazili* (PDB: 4K09\_A).

Fragmentos peptídicos da proteína Bm-LAAO de *Bothrops mattogrosensis* como BmLAO-f1 (IKFEPPLPPKKAH-NH<sub>2</sub>), BmLAO-f2 (KKFWEDDG-NH<sub>2</sub>) e BmLAO-f3 (IYYPPNHNFP- NH<sub>2</sub>) também se mostram ativos contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* (OKUBO et al., 2012).

### 1.6 AMPs provenientes de proteínas encontradas em outras fontes naturais

Atualmente também se tem buscado peptídeos bioativos de origem natural com potencial para o uso na indústria farmacêutica e alimentícia. Muitos resultam de hidrólise de proteínas que pode ocorrer no trato gastrointestinal durante a fermentação de alimentos ou por proteólise realizada *in vitro*, pois em sequências de aminoácidos de proteínas de funções variadas existem peptídeos com funções biológicas diferentes delas. Estes peptídeos podem afetar o sistema imune, cardiovascular e/ou endócrino (FADAEI, 2012; MILAN et al., 2014; ZAMBROWICZ et al., 2014). Seguem abaixo alguns exemplos, cujas sequências de aminoácidos são descritas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Exemplos de AMPs derivados de proteínas encontradas em algumas fontes naturais

Nome do peptídeo	Fonte natural	Sequência de aminoácidos	MICs(*), IC <sub>50</sub> (**)	Referência
HLH	Leite	<sup>1</sup> KVFERCELARTLKRLGMDGYRGISLANWMCLAKWESGY <sup>38</sup>	*50-250 µg.mL <sup>-1</sup>	(IBRAHIM et al., 2011)
H1		<sup>1</sup> KVFERCELARTLKRLGM <sup>17</sup>	*100-250 µg.mL <sup>-1</sup>	
Lactoferricina H	Leite	<sup>12</sup> VSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPIC <sup>47</sup> <sup>1</sup> GRRRRSVQWCA <sup>11</sup>	*0,1mmol.L <sup>-1</sup>	(BELLAMY et al., 1992)
Lactoferricina B		<sup>17</sup> FKCRRWQWRMCKLGAPSITCVRRAF <sup>41</sup>	*0,006 mmol <sup>-1</sup>	
Isracidina	Leite	<sup>1</sup> RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF <sup>23</sup>	*1-0,1 mg.mL <sup>-1</sup>	(LAHOV; REGELSON, 1996)
Peptídeo GFHI	Músculo	GFHI	**117 µg.mL <sup>-1</sup>	(JANG et al., 2008)
Peptídeo DFHING		DFHING	** 64,3 µg.mL <sup>-1</sup>	
Peptídeo FHG		FHG	** 52,9 µg.mL <sup>-1</sup>	
Peptídeo GLSDGEWQ		GLSDGEWQ	** 50,5 µg.mL <sup>-1</sup>	
Apep10	Músculo	GLARCLAGTL	*8-64 µg.mL <sup>-1</sup>	(TANG et al., 2014b)
CgPep33	Músculo	Não determinada	** 18.6 to 60 µg.mL <sup>-1</sup>	(LIU et al., 2008)
Peptídeo LDT 1	Leite (α-lactoalbumina)	<sup>1</sup> EQLTK <sup>5</sup>	*0,1-0,77 mmol.L <sup>-1</sup>	(PELLEGRINI et al., 1999)
Peptídeo LDT 2		<sup>17</sup> GYGGVSLPEWVCTTF <sup>31</sup> <sup>109</sup> ALCSEK <sup>114</sup>	0,18-1,1 mmol.L <sup>-1</sup>	
Peptídeo LDC		<sup>61</sup> CKDDQNPH <sup>68</sup> <sup>75</sup> ISCDKF <sup>80</sup>	0,10-1,38 mmol.L <sup>-1</sup>	

MIC: Concentração mínima inibitória

IC 50: 50 % da concentração inibitória máxima

### 1.6.1 AMPs provenientes de proteínas do leite

O leite é uma fonte natural de proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana como as imunoglobulinas e proteínas não imunes como a lisozima, a lactoferrina, a lactoperoxidase, a caseína, lactoalbuminas, lactoglobulinas e peptídeos antimicrobianos como a lactoferricina, a lactoferrampina, a kappacina, a *k*-caseidina. De fato, o consumo de leite materno ou não pelos recém-nascidos evita que estes fiquem doentes por diversos tipos de enfermidades, especialmente a diarreia (LIEPKE et al., 2001; FADAEI, 2012).

Ibrahim e col (2011) fragmentaram a lisozima do leite humano por catálise da pepsina em condições semelhantes às do estômago dos recém-nascidos e obtiveram 5 peptídeos que mostraram atividade contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e contra *Candida albicans* (**Tabela 1**). Em bactérias Gram-negativas, estes AMPs desestabilizam a membrana externa, em Gram-positivas eles alteram o potencial de membrana comprometendo a respiração celular (IBRAHIM et al, 2011).

Bellamy e col (1992) digeriram a lactoferrina do leite humano e bovino usando a pepsina gástrica como catalisador, tendo chegado a os peptídeos lactoferricina H (humana) e lactoferricina B (bovina) mostrados na **Tabela 1**. Os seus análogos: TKXFQWQRNMRKVRGPPVVSXIKR da lactoferricina humana e FKXRRWQWRMKKLGAPSITXVRRAF da lactoferricina bovina (onde X: acetamidometilcisteína) foram ativos contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BELLAMY et al., 1992).



A proteólise da caseína em presença de quimosina gerou o peptídeo caseidina, que mostrou atividade *in vitro* contra *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* (LAHOV; REGELSON, 1996). A proteólise da  $\alpha$ 1-caseína B mediada pela quimosina gerou um peptídeo de 23 resíduos de aminoácidos chamado de isracidina (**Tabela 1**), que foi ativo contra *Staphylococcus aureus in vivo* e contra a mastite no gado bovino e ovino (LAHOV; REGELSON, 1996).

Enquanto a digestão de  $\alpha$ -lactalbumina catalisada pela tripsina gerou dois peptídeos, um com 5 resíduos de aminoácidos (<sup>1</sup>EQLTK<sup>5</sup>) e outro de duas cadeias peptídicas contendo 21 resíduos de aminoácidos (<sup>17</sup>GYGGVSLPEWVCTTF<sup>31</sup>ALCSEK<sup>114</sup>). Quando  $\alpha$ -lactalbumina foi digerido por ação da quimiotripsina, gerou um outro peptídeo composto de duas cadeias peptídicas (<sup>61</sup>CKDDQNP<sup>68</sup><sup>75</sup>ISCDKF<sup>80</sup>) e 14 resíduos de aminoácidos (**Tabela 1**). Todos se mostram ativos contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e *C. albicans* (PELLEGRINI et al., 1999).

### 1.6.2 AMPs provenientes de proteínas do músculo

As proteínas musculares também são fontes naturais de AMPs, pois a sua fragmentação enzimática gera fragmentos peptídicos com ação antioxidante, antimicrobiana e outras (MILAN et al., 2014). A digestão da carne catalisada pela termolisina, proteinase A, tripsina, proteinase K, tirosinase, pepsina ou papaína geraram os peptídeos (**Tabela 1**) com atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e linhagens de células cancerígenas (JANG et al., 2008).

AMPs também foram encontrados em músculos de anchovas secas, tais como o Apep10 (**Tabela 1**), peptídeo de natureza catiônica que inibe o crescimento de

bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, desestabilizando as suas membranas celulares e alterando as suas morfologias (TANG et al., 2014b). Na parte solúvel do homogeneizado muscular da ostra *Crassostrea gigas* submetido a tratamento com alcalase e bromelina, foi encontrado um AMP rico em cisteína (23,6 %) chamado de CgPep33 (**Tabela 1**) ativo contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (LIU et al., 2008).

### 1.6.3 AMPs provenientes de hemoglobinas

O sangue, em especial a proteína hemoglobina, é também uma fonte natural de AMPs denominados de hemocidinas gerados a partir de sua digestão *in vivo* e *in vitro* (CRUZ et al., 2010). Na **Tabela 2** são listadas algumas hemocidinas assim obtidas a partir da  $\alpha$  ou  $\beta$ -hemoglobina.

O primeiro relato sobre eles serem gerados *in vivo* a partir da  $\alpha$ -hemoglobina bovina tem a contribuição do nosso grupo de pesquisa, já que auxiliamos na detecção no conteúdo intestinal do *Boophilus microplus* (carrapato), isolamento e identificação de um peptídeo de 3.2 kDa que corresponde ao fragmento 33-61(Hb 33-61; listado na tabela), ativo contra bactérias Gram-positivas e fungos (FOGAÇA et al., 1999). Trabalhos posteriores para saber o origem deste AMP, descreveram a presença no conteúdo instestinal do carrapato da proteinase aspártica chamada de BmAP e de uma cisteína protease similar à catepsina L chamada de BmCL1 como responsáveis pelo aparecimento dessa hemocidina a partir da digestão da  $\alpha$ -hemoglobina sugada do boi (CRUZ et al., 2010).

Tabela 2. Hemocidinas obtidas *in vivo* ou *in vitro* obtidas da hemoglobina.

Nome do peptídeo	Fonte	Sequência de aminoácidos	MICs	Referência
Hb 40-63	$\alpha$ -hemoglobina bovina	KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAA	3.12-6.25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	(CRUZ et al., 2010)
HbA 35-56	$\alpha$ -hemoglobina humana	SFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVK	105-281 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	(MAK et al., 2004)
HbB 115-146	$\beta$ -hemoglobina humana	AHHFGKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYH	27-61 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	
hHEM- $\gamma$ (130–146)	$\gamma$ -hemoglobina humana do tecido placentar humano	WQKMVTAVASALSSRYH	52-100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	(LIEPKE et al., 2003)
hHEM- $\beta$ (111–146)	$\beta$ -hemoglobina humana do tecido placentar humano	VCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYH	8-51,3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	
SH $\beta$ AP	$\beta$ -hemoglobina do extrato do fígado da “atum” <i>Katsuwonus pelamis</i>	TQQAFQKFLAAVTSALGKQYH	2-57 $\mu\text{g mL}^{-1}$	(SEO et al., 2014)
Hb 98-114	$\alpha$ -hemoglobina bovina	FKLLSHSLLVTLASHLP	1,6-50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	(BELMONTE et al., 2012)
P3	$\alpha$ -hemoglobina bovina	VNFKLLSHSLLVTLASHL	3.125-50 $\text{mg.ml}^{-1}$	(ZHANG et al., 2015)
Hb $\beta$ P-1	Extrato epitelial de guelras do “bagre” <i>Ictalurus punctatus</i>	AAKFGPSVFTPEVHETWQKFLNVVVAALGKQYH	1,2-5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	(ULLAL et al., 2008)
$\alpha$ -Hb(107-141)	$\alpha$ -hemoglobina bovina	VTLASHLPDFTPAVHASLDKFLANVSTVLT SKYR	43-87 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	(NEDJAR-ARROUME et al., 2006)
$\alpha$ -Hb(107-136)		VTLASHLPDFTPAVHASLDKFLANVSTVL	38-76 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	
$\alpha$ -(137-141)		TSKYR	1-9 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	
$\alpha$ -Hb(133-141)		STVLT SKYR	2-15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	
$\beta$ -(126-145)	$\beta$ -hemoglobina bovina	QADFQKVVAGVANALAHRYH	35-71 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	
Hb 33-61a	$\alpha$ -hemoglobina bovina	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH <sub>2</sub>	3,12-6,25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	(MACHADO et al., 2007)

MIC: Concentração mínima inibitória

O mecanismo de ação e estrutura da Hb 33-61a, peptídeo já amidado sintetizado por nós e mais ativo que a hemocidina original, mostrou que o peptídeo age por desestabilização da membrana plasmática de *Candida*. A análise da estrutura 3D em micelas de SDS mostrou uma estrutura com dobras beta no N-terminal e uma estrutura  $\alpha$ -hélice no lado C-terminal formando um grampo anfipático (SFORÇA et al., 2005). O fragmento do HB 40-61a, feito e estudado pelo nosso grupo, mostrou a mesma atividade antimicrobiana que o peptídeo Hb 33-61a (MACHADO et al., 2007).

Em relação à hemoglobina humana, o sangue vaginal proveniente da menstruação feminina é também uma fonte natural de hemocidinas com propriedades antimicrobianas (**Tabela 2**). Mak et al (2004) descreveram o isolamento de vários fragmentos peptídicos da hemoglobina de origem menstrual, mostrando diferentes padrões contra o crescimento de *Escherichia coli* ou em geral contra bactérias Gram-negativas e com menos efetividade contra as bactérias Gram-positivas. Estes peptídeos poderiam ajudar a manter a flora bacteriana vaginal e que o decaimento do sangrado vaginal permitiria a colonização bacteriana na vagina (MAK et al., 2004).

O peptídeo Hb $\beta$ P-1 (**Tabela 2**) encontrado na sequência de aminoácidos da  $\beta$ -hemoglobina presente nos estratos epiteliais de guelras do “bagre” *Ictalurus punctatus*, mostrou ter atividade antiparasitária contra *Ichthyophthirius multifiliis*, mas também ação contra bactérias patogênicas de origem aquáticas como das bactérias do gênero *Aeromonas* e *Vibrio* (ULLAL et al, 2008).

## 1.7. Necessidade de prospecção e desenvolvimento de novos AMPs

A cada ano, milhões de pessoas são vítimas de infecções causadas por micro-organismos, sendo os mais perigosos dos multidroga-resistentes, como o *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). Segundo estudos do ano 2008 na União Européia, os gastos com saúde e as perdas de produtividade eram de aproximadamente 1,5 bilhões de euros. Dos milhões de pessoas vítimas do MRSA, poucas conseguem sobreviver devido à falta de antibióticos com novos mecanismos de ação para inibir o crescimento desta bactéria. Este aumento de resistência é agravado pelas mudanças na demografia humana, globalização e procedimentos adotados nos hospitais para combater os patógenos. O problema se torna maior por um motivo comercial porque para as indústrias farmacêuticas é mais rentável produzir e vender fármacos para o tratamento de enfermidades crônicas do que investir dinheiro em desenvolver novos antibióticos (BARON, 1996; LIVERMORE, 2007; BRAINE, 2011).

Neste panorama, é urgente pesquisar e desenvolver uma nova classe de antibióticos, cujo modo de ação seja diferente daqueles dos antibióticos convencionais e que não gere nenhum tipo de resistência. Como se mencionou, uma alternativa seria a classe dos AMPs. Inicialmente, esses compostos não foram estudados para uso clínico, mas nos últimos anos esta visão mudou devida a: 1) disponibilidade e descoberta delas em fontes naturais, 2) à descoberta de doenças produzidas por sua ausência ou mau funcionamento (RIVAS; GANZ, 1999), 3) à descoberta de que muitos AMPs interagem diretamente nas membranas celulares, o que diminuiria o risco de gerar resistência microbiana a eles (STEINBUCH; FRIDMAN, 2016). Assim, os AMPs passaram a ser vistos como antibióticos potenciais eficientes *in vitro* e *in vivo* contra os micro-organismos resistentes aos antibióticos convencionais.

## 2. OBJETIVOS

Sabendo que muitos peptídeos bioativos correspondem a fragmentos peptídicos de proteínas, este trabalho teve como objetivo primário desenvolver novos AMPs a partir de proteínas provavelmente envolvidas na atividade antimicrobiana de venenos de serpentes pouco ou ainda não estudados.

Para atingi-lo, foram estabelecidos os seguintes objetivos secundários:

1. Escolha de uma fosfolipase do tipo 2 (PLA<sub>2</sub>) de veneno de serpente peruana do gênero *Bothrops* da família Viperidae com sequência de aminoácidos conhecida, modelagem, obtenção por homologia de sua estrutura tridimensional e escolha de fragmentos com potencial de AMP;
2. Verificação de atividade antimicrobiana em venenos de serpentes peruanas dos gêneros *Bothrops* e *Bothriopsis* da família Viperidae;
3. Seleção de um dos venenos ativos, fracionamento, identificação de seus componentes proteicos por digestão trípica/sequenciamento dos fragmentos peptídicos obtidos, verificação de atividades referentes a essas proteínas;
4. Análise das sequências de aminoácidos e estruturas tridimensionais das proteínas das mesmas classes também encontrados em venenos de serpentes da família Viperidae para escolha de fragmentos com potencial de AMP;
5. Síntese, purificação e caracterização química dos potenciais AMPs;
6. Verificação de atividade antimicrobiana nos sintéticos purificados caracterizados.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Exceto pelos fracionamentos por FPLC e análises por MALDI-TOF, todos os experimentos que se seguem foram realizados no nosso laboratório.

#### 3.1 Materiais, reagentes, resinas, solventes e micro-organismos

##### 3.1.1 Química de peptídeos

Os suportes poliméricos utilizados nas sínteses dos peptídeos foi a resina Rink amida de graus de substituição 0,4; 0,59; 0,7 e 0,8 mmol.g<sup>-1</sup>. Elas foram adquiridas da Advanced ChemTech (EUA).

Os derivados de aminoácidos utilizados foram os seguintes: Fmoc-Asp(OBut)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH. Eles foram adquiridos da Bachem Califórnia, Inc. (EUA) e da Novabiochem (EUA).

O TBTU foi adquirido da Advanced Chemtech (EUA), o HOBt e o DIC da Sigma Chemical Co. (EUA), a 4-metilpiperidina 96 % da Vetec-Sigma-Aldrich (Brasil).

Os solventes empregados nas sínteses dos peptídeos foram: DMF, metanol, éter diisopropílico, DMSO, tolueno (procedentes da Vetec-Sigma-Aldrich, Brasil). Todos os solventes foram de grau analítico ou de síntese.

Piperidina, DIPEA, TIS de grau analítico ou de síntese, provenientes da Merck KgaA (Alemanha), Sigma Chemical Co. (EUA) ou da Applied Biosystems (EUA) e foram

empregados sem purificação prévia. O bicarbonato de amônio foi adquirido da Fluka analytical-Sigma Aldrich (Alemanha).

Para o monitoramento dos acoplamentos por meio do teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) foram empregados os reagentes: fenol/etanol 76 % (v/v), cianeto de potássio/piridina  $0,0002 \text{ mol.L}^{-1}$ , ninidrina/etanol  $0,28 \text{ mol.L}^{-1}$ ; de grau síntese. Eles foram adquiridos da Applied Biosystems (EUA).

As hidrólises ácidas dos peptídeos purificados foram realizadas em presença de HCl 6N (Sigma Chemical Co., EUA).

Na preparação dos solventes para RP-HPLC e LC/ESI-MS foram utilizados ACN (Sigma-Aldrich, China) e TFA (Merck KGaA, Alemanha) de grau espectroscópico.

### **3.1.2 Digestão proteica**

A tripsina usada Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, foi adquirida da Promega Corporation (EUA).

### **3.1.3 Reagentes utilizados nas eletroforeses**

$\beta$ -Mercaptoetanol, iodoacetamida, ditioneitol, glicina, tricina, acrilamida, azul de bromofenol, persulfato de amônio, TEMED, Triton X-100, Tris, SDS, Brilliant Coomassie Blue R-250, uréia, tiouréia foram adquiridos da Bio-Rad (EUA).  $\text{CaCl}_2$  (Labsynth, Brasil). Os marcadores de massa molar proteicos eram da Bio-Rad (Brasil).

Os anfólitos 3-10, CHAPS e a fita IPG de 7 cm foram adquiridos da GE Healthcare, Upsala, Suécia.



O nitrato de prata, o formaldeído, o  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e o  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil).

### 3.1.4 Meios de cultura

O caldo Luria-Bertani era da Sigma-Aldrich (Brasil), o caldo potato-dextrose da BD Difco (EUA) e o ágar bacteriológico da Neogen Corporation (EUA).

### 3.1.5 Micro-organismos

Foram usados os micro-organismos estocados no nosso laboratório e gentilmente cedidos por diferentes pesquisadores da USP:

Bactérias Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708;

Bactérias Gram positivas: *S. aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 9341;

Leveduras: *Candida albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258.

### 3.1.6 Venenos

Os venenos das serpentes peruanas de *Bothrops taeniatta*, *Bothrops barnetti* e *Bothriopsis oligolepis* (<http://www.reptile-database.org>), pertencentes à família Viperidae, Subfamília Crotalinae, foram obtidos de espécimes adultos mantidos no Serpentário da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade do Callao, Lima, Peru, pelo nosso colaborador M.Sc. Javier Cárdenas Tenorio. A cada coleta, o veneno era colocado em um frasco escuro, liofilizado e estocado a  $-20^\circ\text{C}$  até que uma nova

alíquota de veneno coletado e liofilizado fosse adicionada e a nova mistura fosse liofilizada e estocada.

### 3.2 Desenvolvimento de novos AMP derivados da fosfolipase A2 de *B. pictus* (PLA2)

#### 3.2.1 Construção de modelo por homologia da estrutura tridimensional da PLA2

A sequência aminoacídica de uma PLA2 ácida de *B. pictus* armazenada no GenBank (GenBank NCBI: AAF91498) mostrada na **Figura 5**, foi submetida a uma análise comparativa contra proteínas de base de dados “RCSB Protein Data Bank (PDB)” utilizando o programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) para proteínas e o algoritmo PSI-BLAST (Position-specific iterative BLAST), que está disponível para uso em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

```

1 SLVQFETLIM KIAKRSGVWF YGSYGCF CGS GGQGRPQDAS DRCCFVHDCC YGKVTDCDPK
                PLA2-1                                PLA2-3

61 TDIYTYSEEN GVVVCGGDDP CKKQICECDR VAAVCFRDNK DTYDNKYWFF PANNCQEESE
                PLA2-2                                PLA2-4

```

121 PC

Figura 5. Sequência da PLA<sub>2</sub> de *B. pictus* (GenBank NCBI: AAF91498) com as sequências dos peptídeos eleitos para síntese: PLA2-1, PLA2-2, PLA2-3 e PLA2-4.

Posteriormente, foi realizada uma modelagem por homologia de nossa PLA<sub>2</sub> através do programa Modeller 9v14 (WEBB; SALLI, 2014) utilizando como molde a estrutura tridimensional de uma PLA2 ácida de *Agkistrodon halys pallas* (PDB: 1M8R\_A) que possui 77% de identidade com a nossa PLA<sub>2</sub>, como foi indicado pela

análise por BLAST. Em seguida, os modelos gerados foram validados com o programa RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>), que utiliza o plot de Ramachandran para indicar se os aminoácidos de nosso modelo se encontram em regiões permitidas, para a escolha do melhor modelo. Os peptídeos a estudar (PLA2-1, PLA2-2, PLA2-3 E PLA2-4) foram eleitos dependendo dos seus posicionamentos na estrutura obtida da PLA<sub>2</sub> de *B. pictus*, detalhada na **Figura 8** de resultados. Para a escolha daqueles a serem sintetizados foram consideradas as sequências de aminoácidos, as cargas líquidas em pH 5 e 7,4, os potenciais antimicrobianos teóricos e os potenciais de agregação teóricos a serem descritos a seguir.

### **3.2.2 Predição do potencial antimicrobiano dos peptídeos PLA2-1, PLA2-2, PLA2-3 e PLA2-4**

As sequências de aminoácidos dos peptídeos foram comparadas ou alinhadas com diferentes sequências de AMPs registradas na base de dados “The Antimicrobial Peptide Database” (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) (WANG et al, 2016) com vistas a determinar a porcentagem de similaridade deles com AMPs de fontes naturais já descritos e estudados.

### **3.2.3 Análise do potencial de agregação dos peptídeos PLA2-1, PLA2-2, PLA2-3 e PLA2-4**

Para determinar tal potencial para cada um deles (tal potencial auxilia na escolha de condições reacionais na síntese química de peptídeos) foi usado o software Peptide Companion 1.25 (CoshiSoft/PeptiSearch, EUA). Este software permite também predizer

se a sequência de aminoácidos tem capacidade de agregação (MIRANDA; LIRIA; REMUZGO, 2011). Um potencial de agregação  $>1,2$  indica sequências com capacidade agregante (PIPKORN et al., 2002).

### **3.2.4 Predição da estrutura secundária dos peptídeos PLA2-1, PLA2-2, PLA2-3 e PLA2-4**

A predição do modelo tridimensional dos peptídeos a serem sintetizados foi realizada utilizando o programa PEP-FOLD (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>), que utiliza campos de força “coarse grained” para prever estruturas tridimensionais de peptídeos entre 9 e 36 aminoácidos em solução aquosa. A avaliação do melhor modelo foi realizada utilizando o programa RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) que utiliza o plot de Ramachandran para indicar se os aminoácidos de nosso modelo se encontram em regiões permitidas. Para a visualização da estruturas tridimensionais foi utilizado o programa PyMOL (LAM; SIU, 2016).

## **3.3 Sínteses, análises, purificações e caracterizações químicas de peptídeos**

### **3.3.1 Síntese em fase sólida (SPFS)**

Foi empregada a estratégia Fmoc (REMUZGO e col., 2009) a partir da resina Rink amida e protocolos a 60 °C c em todas as etapas da síntese (VARANDA; MIRANDA, 1997; SOUZA et al., 2004; REMUZGO RUIZ, 2008; LOFFREDO, 2009), a temperatura elevada permite um maior número de choques entre os reagentes

facilitando o aumento da velocidade das reações químicas acelerando a SPFS (LOFFREDO, 2009).

As sínteses manuais foram feitas em um frasco de vidro com placa de vidro sinterizado de baixa porosidade, jaquetado e acoplado a um banho termostatizado da PolyScience modelo 8001 (Niles/IL, EUA).

As sínteses a 60 °C mediadas pelas microondas foram feitas no equipamento semiautomático Biotage Initiator + SP Wave (Biotage®, EUA).

As etapas são mostradas na **Figura 6**.

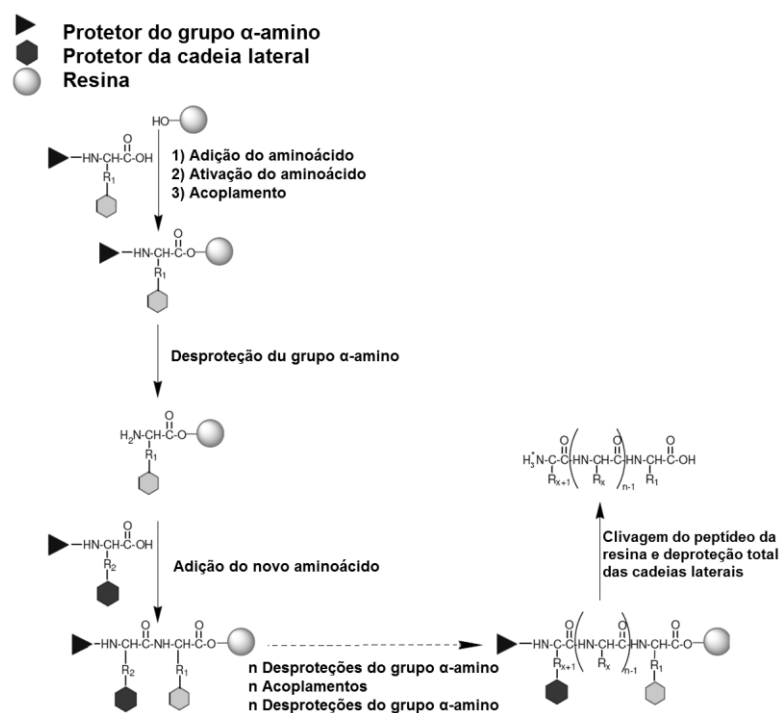


Figura 6. Processo das sínteses de peptídeos pelo método SPFS (MERRIFIELD, 1963).

No geral, a resina primeiramente foi submetida à desproteção do grupo Fmoc usando uma solução de 25 % 4-Metilpiperidina/DMF e incubado por 5 min. Em seguida, a resina foi lavada e o teste de ninidrina foi feito. As etapas de desproteção, lavagem e acoplamento estão descritas na **Tabela 3**. O monitoramento foi feito com o teste de

ninidrina (KAISER et al., 1970). A peptidil-Rink amida obtida foi lavada com metanol e seca sob vácuo por 1 h e estocada a 4°C.

Tabela 3. Protocolo de SPFS com a resina Rink a 60 °C

<b>Etapa de desproteção:</b>	<b>Fmoc-aminoácidos usados:</b>
Solução 25 % 4-Metilpiperidina/DMF	Fmoc-Asp(OBut)-OH
<b>Etapa de lavagem pós-desproteção:</b>	Fmoc-Glu(tBu)-OH
DMF ou DMSO 25 %/Tolueno	Fmoc-Ala-OH
Metanol	Fmoc-Arg(Pbf)-OH
Teste de ninidrina	Fmoc-Asn-OH
<b>Etapa de acoplamento:</b>	Fmoc-Phe-OH
Fmoc-aminoácido+HOBt+1M DIC/DCM	Fmoc-Gly-OH
ou TBTU+DIPEA em DMF ou DMSO	Fmoc-Gln(Trt)-OH
25 %/tolueno.	Fmoc-Ile-OH
<b>Etapa de lavagem pós-acoplamento:</b>	Fmoc-Leu-OH
DMF ou DMSO 25 %/Tolueno	Fmoc-Lys(Boc)-OH
Metanol	Fmoc-Pro-OH
Teste de ninidrina	Fmoc-Ser(tBu)-OH
	Fmoc-Tyr(tBu)-OH
	Fmoc-Thr(tBu)-OH
	Fmoc-Trp(Boc)-OH
	Fmoc-Val-OH

### 3.3.2 Clivagem do peptídeo da resina e desproteção total

Resumidamente, a peptidil-Rink amida foram colocadas em tubos de plástico de 1,5 mg e depois 100  $\mu\text{L}$  de soluções descritas na **Tabela 6** de resultados. A mistura foi incubada a 37 °C por 1-4 h. Depois do tempo de incubação, foi feita a precipitação do peptídeo livre, com éter diisopropílico gelado, a mistura foi imediatamente centrifugada a 5000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi desprezado. Este procedimento se repetiu por algumas vezes. Em seguida, foi adicionado o solvente B (60 % ACN/0,09 % TFA/água) ou DMSO 10 %/Solvente B para solubilizar o peptídeo, permitindo a separação dele da resina depois da centrifugação a 2000 rpm por 2 min. Este procedimento se repetiu por quatro vezes. As soluções de peptídeo foram coletadas para liofilização e obtenção do peptídeo bruto seco.

Quando feito em escala preparativa, 120 - 150 mg de peptidil-Rink amida foram colocadas em solução para clivagem do peptídeo da resina e desproteção total foram agregados e a precipitação do peptídeo feita com 8 mL de éter diisopropílico gelado.

### 3.3.3 Análise dos peptídeos brutos por RP-HPLC

Uma solução de cada peptídeo ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em solvente A (TFA 0,1 %/água) ou DMSO 10 %/Solvente A foi feita. Desta solução, 10 ou 20  $\mu\text{L}$  foram utilizados para a análise por cromatografia.

Estas análises foram feitas no sistema LDC que consiste em duas bombas (ConstaMetric 3200 e 3500), um detector UV (Spectronic Monitor 3100), um injetor de amostras manual (Rheodyne 7125), um integrador Waters 745 B e uma coluna analítica (Vydac  $\text{C}_{18}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 300Å, 0,46x25 cm) que foi equilibrada com o Solvente A.

O registro dos perfis cromatográficos foi feito usando o software Clarity HPLC Data System (Laserchrom, UK). As cromatografias foram feitas usando o solvente A (TFA 0,1 %/água) e o solvente B (60 % ACD/ TFA 0,1 %/água) em gradiente linear de 5-95 % do solvente B por 30 min com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. A detecção foi a 210 nm. Previamente foi feita uma cromatografia sem injeção de peptídeo nas mesmas condições experimentais (branco).

### **3.3.4 Caracterização dos peptídeos brutos e purificados por LC/ESI-MS**

Para confirmar a presença dos peptídeos desejados nos brutos, 5 µL da solução do peptídeo bruto ou purificado foram injetadas em um sistema de RP-HPLC da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan) composto por um degaseificador modelo DGU-20A<sub>3</sub>, duas bombas modelo LC-20AD, um injetor Rheodyne 8125, um forno de coluna modelo CTO-20A (T=32°C), uma coluna C<sub>18</sub> (0,46 cm x 25,00 cm, diâmetro de partícula de 5mm e o diâmetro do poro de 300Å, Grace-Vydac, Hesperia, CA, USA) acoplada a um espectrômetro de massas AmaZon X da Bruker Daltonics (Fahrenheitstrasse, Germany) com fonte de ionização do tipo electrospray, modo ESI positivo e com analisador do tipo Ion trap. A voltagem aplicada no capilar foi de 4500V e a voltagem na saída do capilar (End plate offset) foi de 500V (para o modo positivo).

Nas cromatografias foi usado o solvente A (TFA 0,1 %/água) e o solvente B (60 % ACD/ TFA 0,1 %/água) em gradiente linear de 5-95 % do solvente B por 30 min com fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>. A detecção foi a 210 e 280 nm. Os perfis de UV e de concentração total de íons (TIC) foram obtidos e analisados com a ajuda do software HyStar 3.2.



### 3.4 Purificação do peptídeo desejado por RP-HPLC em escala preparativa

Confirmada a presença do peptídeo desejado nos materiais brutos, foram estabelecidas as condições ótimas de separação dos peptídeos dos demais subprodutos (**Tabela 7** de Resultados).

A massa total dos peptídeos brutos obtidos depois da liofilização (**Tabela 7**), foram dissolvidos em 7 mL de solvente A (TFA 0,1 %/Água), as soluções foram centrifugadas e os sobrenadantes foram injetados em um sistema RP-HPLC Waters (EUA), modelo 600E preparativo, composto de uma bomba Delta 600, um detector UV 2487 Dual Absorbance Detector, um injetor de amostras manual Rheodyne 3725i-119, um controlador de gradiente (Waters 600 Controller), um registrador Kipp & Zonen SE 124 e uma coluna preparativa (Vydac C18, 10  $\mu\text{m}$ , 300  $\text{\AA}$ , 2,2 x 25 cm) que foi equilibrada com o Solvente A.

Os solventes A e B usados e as condições de purificação estão descritas na **Tabela 7** de Resultados. Em todas as purificações o fluxo foi de 10 mL.min<sup>-1</sup> e a detecção a 210 nm. As frações foram coletadas manualmente em tubos de vidro.

Todas as frações que poderiam ter o peptídeo de interesse foram analisadas por LC/ESI-MS ou por infusão direta no ESI-MS. As frações que mostraram conter só o peptídeo puro foram colocados em um frasco para liofilização, foram juntadas, congeladas e liofilizadas para pesagem e análise.

### **3.5 Determinação dos graus de pureza dos peptídeos sintéticos purificados**

Um volume de 20  $\mu\text{L}$  dos peptídeos purificados ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) diluídos em solvente A (TFA 0,1 %/água) ou DMSO 10 %/ Solvente A foram injetados em um sistema RP-HPLC analítico (ver item 3.3.6).

As cromatografias foram feitas usando o solvente A (TFA 0,1 %/água) e o solvente B (60 % ACN/ TFA 0,1 %/água) a um gradiente linear de 5-95 % do solvente B por 30 min. A detecção foi a 210 nm. O software Clarity HPLC Data System (Laserchrom, UK) também foi usado para calcular o grau de pureza dos peptídeos, pela integração dos picos e comparação com o branco.

### **3.6 Determinação do conteúdo peptídico dos purificados**

O peptídeo foi submetido à hidrólise ácida gasosa com HCl 6N em presença de fenol cristalizado e sob atmosfera de  $\text{N}_2$  a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas em uma estação de trabalho Pico Tag da Waters. Posteriormente, as amostras foram secas utilizando uma bomba de vácuo acoplada à estação de trabalho Pico-Tag. Os hidrolisados secos foram dissolvidos em  $\text{H}_2\text{O}$  e analisados no Dionex BioLC® Chromatography System (Dionex, EUA) que emprega um método de separação dos aminoácidos livres por HPLC de troca iônica, em uma coluna AminoPac PA10 (2,0 cm x 25 cm) da Dionex e detecção por amperometria integrada, usando o detector eletroquímico ED50. As análises foram feitas em triplicata (CLARKE et al, 1999; DING et al, 2002).

A proporção molar dos aminoácidos pertencentes ao peptídeo foi calculada baseando-se aos resultados obtidos de uma curva de calibração em triplicata, resultante de uma solução padrão de aminoácidos de concentração conhecida.

### 3.7 Ensaios antimicrobianos dos venenos e dos peptídeos sintéticos

#### 3.7.1 Ação antibacteriana dos peptídeos sintéticos

Foi determinada segundo o método de ensaio de inibição de crescimento celular em meio líquido em microplaca (FEHLBAUM et al., 1994; MACHADO et al., 2007; REMUZGO et al., 2014). O protocolo foi adaptado no nosso laboratório. As concentrações das soluções-estoque de cada peptídeo sintético após diluição seriada foram de 2, 1, 0,5, 0,25, 0,13, 0,063, 0,03, 0,015, 0,008, 0,004 mmol.L<sup>-1</sup>.

Resumidamente, em cada poço foram adicionados 10 µL de H<sub>2</sub>O, 10 µL das diluições descritas no parágrafo anterior e 80 µL de uma suspensão de bactérias ( $Abs_{595\text{ nm}} = 0,001$ ) em caldo LB (pH 7). Como controle de esterilidade, foram adicionados 100 µL do meio de cultura nos poços laterais da placa. Nos poços dos demais extremos foram colocados 20 µL de H<sub>2</sub>O e 80 µL da suspensão de células, esse último para comparar com o crescimento celular sem a solução de peptídeo via espalhamento de luz (medida de absorbância). As microplacas foram mantidas em um shaker a 37 °C por 18-24 h sob agitação orbital constante até 150 rpm (bactérias). Para a quantificação do crescimento microbiano, as microplacas foram colocadas dentro de uma leitora de microplacas Infinite®M200 (Männedorf, Switzerland) ou na leitora de SpectraMax Paradigm Multi-Mode Detection Platform da Molecular Devices (Lagerhausstrasse, Austria). Para uma boa homogeneização das células dentro dos poços, estas microplacas foram agitadas orbital ou linearmente por 2 ou 3 vezes por 1 ou 2 min. Depois foi lida a absorbância em 595 nm.

O valor da concentração mínima inibitória (MIC) obtida corresponde à menor concentração do peptídeo que causou 100 % de inibição do crescimento celular após incubação.

### **3.7.2 Ação antifúngica dos peptídeos sintéticos**

Foi determinada usando o protocolo descrito acima no item 3.5.1. Todos estes ensaios foram feitos com caldo PDB (pH 5). As microplacas foram mantidas sob agitação orbital constante até 150 rpm em um shaker a 30 °C, fazendo leituras às 24 e 48 h.

### **3.8 Dosagem de proteína pelo método de Bradford**

Com vistas a determinar a concentração proteica do veneno bruto e das frações isoladas em diferentes etapas de fracionamento foi feita uma curva padrão usando albumina sérica bovina (BRADFORD, 1976). Brevemente, uma solução 5 mg.mL<sup>-1</sup> foi diluída 100X, para produzir uma solução de 0,05 mg.mL<sup>-1</sup> (0,05 µg.µL<sup>-1</sup>). Foram usados diferentes volumes desta solução completando com H<sub>2</sub>O (Milli-Q) para a obtenção de soluções entre 0,25 e 5 µg.µL<sup>-1</sup>. Em cada poço da microplaca, foi colocado volume de 160 µL de H<sub>2</sub>O (Milli-Q) (branco) ou 160 µL de cada solução de albumina recém-preparada e 40 µl do reagente “Protein Assay Dye Reagent Concentrate” (Bio-Rad Cat. #5000-0006). Após 5 min à temperatura ambiente, a absorbância das misturas a 595 nm foi feita na leitora de microplacas SpectraMax Paradigm Multi-Mode Detection Platform (Austria-Lagerhausstrasse). Foram feitas triplicatas e usados todos os valores obtidos na construção da curva-padrão (Ver item 4.3.2 de resultados).

Foi usada uma massa de 5 mg de cada veneno bruto e à essa massa foi adicionado um volume de H<sub>2</sub>O (Milli-Q) para obter uma solução 5 mg.mL<sup>-1</sup>, que foi diluída 50X para gerar uma solução 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> (0,1 µg.µL<sup>-1</sup>). Volumes variando de 10-60 µL desta solução foram completados com H<sub>2</sub>O (Milli-Q) para 160 µL finais aos quais foram adicionados 40 µL do reagente de Bradford. A determinação foi feita segundo descrito no item 3.4.1. Foram feitas triplicatas.

### **3.9 Ensaios antimicrobianos dos venenos, frações e proteínas purificadas deles**

#### **3.9.1 Ação antibacteriana**

Os ensaios foram feitos segundo o item 3.7.1 com algumas modificações.

As concentrações das soluções-estoque de veneno após diluição seriada foram 2, 1, 0,5, 0,25, 0,13 mg.mL<sup>-1</sup> e 62.5, 31.25, 15.63 µg.mL<sup>-1</sup> e 7.8, 3.9 ng.mL<sup>-1</sup>. As soluções-estoque das frações resultantes do fracionamento do veneno e as proteínas purificadas não necessariamente atingiram as concentrações descritas. O ensaio com o veneno bruto foi feito em caldo Luria-Bertani (pH 7) sem e com NaCl 0,5 e 0,9 %.

#### **3.9.2 Ação antifúngica**

Foi determinada usando o protocolo descrito acima no item 3.7.2.

#### **3.9.3 Ação antimicrobiana observando a cinética de crescimento**

Foi determinada em frações ou proteínas isoladas do veneno. Foi utilizada o protocolo descrito acima no item 3.9.1 com a diferença de a placa ser colocada na

leitadora de SpectraMax Paradigm Multi-Mode Detection Platform da Molecular Devices (Lagerhausstrasse, Austria), após programá-la para manutenção da temperatura a 37 °C por 18-24 h, leituras a 595 nm a cada 30 min após agitação linear por 30 s. Os resultados são mostrados nas **Figuras 39 e 48** de Resultados.

### **3.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)**

Foi feito segundo Laemmli (1970). A confecção dos géis foi realizada em um molde formado por duas placas de vidro e separadores de acrílico. O molde foi preenchido até 1,5 cm da borda superior com solução de acrilamida de 8,10,12,15 ou 17 % (gel de corrida) e, após a polimerização, com acrilamida 4% (gel de empilhamento). Neste gel foram moldadas cavidades para aplicação de amostras de 10 a 20 µL. O tempo da corrida eletroforética foi de 60 min, em cuba vertical de acrílico contendo tampão Tris-Glicina 50 m.mol.L<sup>-1</sup>, pH 8,3 a 120 volts. As placas de gel foram coradas com: 1) Brilliant Coomassie Blue R-250 por 1 h à temperatura ambiente, descoradas em ácido acético a 10 % (v/v) e 90 % de H<sub>2</sub>O miliQ:metanol (1:1). 2) Nitrato de prata como descrito no item 3.10.5.

As bandas proteicas foram comparadas com as do padrão de massa molar (Bio-Rad) contendo uma mistura de: fosforilase b (97,4 kDa), albumina de soro bovino (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa) e padrão de proteínas coradas (Bio-Rad #161-0374) de massas molares 250, 150 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 e 10 kDa.

A preparação das diferentes amostras dos venenos ou frações foi feita tendo em conta a concentração proteica destas e a sua diluição com água até uma concentração de 20, 30 ou até 80  $\mu\text{g}$  de proteína. $\text{mL}^{-1}$ .

Na preparação das amostras: 1) quando a concentração de proteínas era baixa, 50 ou 100  $\mu\text{L}$  da amostra foram colocadas em um tubo de plástico de 1,5 mL, liofilizadas, e a elas adicionados 20  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra [4X (Tris base 0,5 mol. $\text{L}^{-1}$  pH 6,8; SDS 10 %;  $\beta$ -mercaptoetanol, glicerol, azul de bromofenol, água destilada)]; 2) em amostras com alto conteúdo proteico, volumes de 5, 10, 15 ou 20  $\mu\text{L}$  de amostra foram também colocados em tubos de plástico de 1,5 mL e depois acrescentados 10 ou 15  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra. A mistura foi homogeneizada por agitação, centrifugada a 5000 g por 20 s, levada a banho por 4-5 min a 94 °C para a desnaturação das proteínas. Depois foi aplicada no gel.

No caso de condições não redutoras, não foi usado o  $\beta$ -mercaptoetanol nem SDS.

### **3.11 PAGE de peptídeos em condição redutora**

Os perfis eletroforéticos de peptídeos de massa molar inferior a 14 kDa foram obtidos usando tampão com Tricina e SDS (SCHÄGGGER, 2006) e diferentes concentrações de acrilamida nos géis: o gel de empilhamento a 4 % de acrilamida, um centímetro do gel espaçador a 10 % de acrilamida e o gel de separação a 16%/6 mol. $\text{L}^{-1}$  uréia. A corrida ocorreu a 120 V por 50-60 min, sendo que após a mesma os géis foram mantidos em solução corante de Brilliant Coomassie Blue R-250 a 0,25 % por 1 - 2 h e descorados em ácido acético a 10 % (v/v) e 90 % de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ:metanol (1:1, v:v). As

massas molares dos peptídeos foram determinadas utilizando-se como padrões os peptídeos Hb40-61a de  $\approx 2,5$  kDa (MACHADO et al., 2007) e acetato de octreotida de  $\approx 1,02$  kDa (Bachem, Torrence, CA, EUA).

As amostras de peptídeos vieram de soluções de  $2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Um volume de  $5 \mu\text{L}$  foi juntado com  $15 \mu\text{L}$  de tampão de amostra [4X (Tris base  $0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 6,8, SDS 10 %,  $\beta$ -mercaptoetanol, glicerol, azul de bromofenol, água destilada)] em tubos de plástico de  $1,5 \text{ mL}$ . A mistura foi homogeneizada por agitação e depois centrifugada a  $5000 \text{ g}$  por  $20 \text{ s}$  para concentrar a amostra no fundo do tubo. Depois o tubo foi deixado por 4-5 min a  $94^\circ\text{C}$ . A amostra foi aplicada no gel.

### 3.12 Coloração dos géis de PAGE com nitrato de prata

As bandas de proteínas ou peptídeos dos géis obtidos foram reveladas através da coloração com nitrato de prata (GROMOVA; CELIS, 2006) com algumas modificações. As etapas foram as seguintes: 1) fixar em solução a 50 % metanol, 12 % ácido acético, 0,05 % formaldeído por 20-30 min ou *overnight*; 2) Lavar com solução de lavagem (35 % de etanol) por 5 min, seguida de sensibilização com solução a 0,02 %  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  por 2 min; 3) Três etapas de lavagem com água destilada, sendo 5 min para cada lavagem; 4) Coloração com solução de nitrato de prata (0,2 %  $\text{AgNO}_3$ , 0,076 % formaldeído) por 10 min; 5) Três etapas de lavagem com água destilada, sendo 5 min para cada lavagem, seguida de tratamento com a solução de revelação (6 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,05 % formaldeído (35 % formaldeído), 0,0004 %  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) por 5 min ou até aparecer as bandas; 6) Interrupção da revelação usando solução Stop (50 % metanol, 12 % ácido acético).



### 3.13 Fracionamento do veneno de *B. oligolepis*

#### 3.13.1 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC)

As cromatografias dos venenos brutos (1,46-1,612 mg de proteína, **Figura 19**), das frações obtidas da Fração F8 (0,147 mg de proteína, **Figura 44**) e Fração F4 (**Figura 40**) e dos peptídeos sintéticos foram feitas utilizando um cromatógrafo da marca Waters, o qual é composto de duas bombas Waters 510, um detector Waters 486, um injetor Rheodyne 7125, um integrador Waters 745B Data Module e uma coluna de RP-HPLC C<sub>18</sub> ou C<sub>4</sub> Vydac (0,45 cm x 25,0 cm, 5µm e 300 Å).

Como solventes foi utilizado o solvente A (0,1 % TFA em água), e diversos solventes B com diferentes concentrações de 25-90 % ACN, 0,09 % TFA em água. No geral foi usado o gradiente linear de 5-95 % de solvente B e fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Todas as cromatografias foram feitas a temperatura ambiente. A detecção foi feita pela absorvância a 210 nm. As amostras foram coletadas manualmente dependendo da leitura de absorvância feita pelo detector.

#### 3.13.2 Cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC) de troca aniônica

Esta cromatografia foi feita no laboratório da Profa. Dra. Iolanda Midea Cuccovia no IQ-USP com a supervisão da Dra. Luciana Coutinho.

O veneno de *B. oligolepis* (64,5 mg de proteína) foi diluído em tampão bicarbonato de amônio 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8 (Solvente A), centrifugado a 5 000 g por 2-3 min, o sobrenadante foi coletado e centrifugado de novo. O sobrenadante sem o “pellet” foi mantido no gelo até a injeção da amostra.

Foi usado um cromatógrafo AKTA FPLC (Amersham Biociences) P-920 e uma coluna DEAE-celulose 16 x 300 mm equilibrada com o solvente A que foi utilizado para diluir o veneno. Para a eluição e separação dos componentes proteicos do veneno foi empregado o tampão bicarbonato de amônio 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8 suplementado com 1 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl (Solvente B), o gradiente linear de NaCl 0 – 1,0 mol.L<sup>-1</sup> em pH constante a 20 °C e um fluxo de 19,8 mL.h<sup>-1</sup>. A detecção foi feita pela leitura de absorbância a 280 nm. As frações de 2 mL foram coletadas automaticamente em tubos de vidro utilizando o coletor Frac-920. Imediatamente, as frações foram colocadas em tubos de plásticos e depois armazenadas no gelo. Após finalizar a cromatografia, as frações foram estocadas a -20 °C para posterior análise e combinação.

### 3.13.3 FPLC de troca catiônica

A cromatografia foi feita sob supervisão da Dra. Elizabeth Cheng no Laboratório de Bioprocessos do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan (São Paulo).

A fração F2 (3 mg de proteína) do veneno de *B. oligolepis*, que continha proteínas com carga líquida positiva no pH usado (**Figura 30** de Resultados) estava diluído em tampão bicarbonato de amônio 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8 (Solvente A).

A cromatografia foi realizada utilizando um cromatógrafo AKTA FPLC (Amersham Biociences) P-920 e uma coluna Hiprep CM FF 16/10, 16 x 100 mm (GE Healthcare) que foi equilibrada com o Solvente A. Para a eluição e separação dos componentes proteicos da fração foi empregado o tampão bicarbonato de amônio 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8 suplementado com 1 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl (Solvente B), o gradiente linear de NaCl 0 – 1,0

mol.L<sup>-1</sup> foi feita em pH constante a 20 °C com um fluxo de 5 mL.mL<sup>-1</sup>. A detecção foi feita pela leitura de absorvância a 280 nm.

As frações de 1 mL foram coletadas automaticamente em tubos de plástico utilizando o coletor Frac-920, as frações foram armazenadas no gelo imediatamente. Após finalizar a cromatografia, as frações foram estocadas a -20 °C.

### 3.13.4 FPLC de filtração em gel

Esta cromatografia também foi feita no laboratório da Profa. Dra. Iolanda Midea Cuccovia no IQ-USP com assistência da Dra. Luciana Coutinho usando as frações ativas contra o crescimento de *S. aureus* provenientes da cromatografia de troca aniônica: F2, F6, F7. Para isso, 2 mL de cada fração diluída em tampão bicarbonato de amônio 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8, foi liofilizada até atingir um volume de 0,5 mL que foi injetado num cromatógrafo AKTA FPLC (Amersham Biociences) P-920 e uma coluna *Superose 12<sup>TM</sup> 10/300* (GE Healthcare) equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4. A eluição foi feita usando o mesmo tampão em pH constante a 20 °C com um fluxo de 18 mL.h<sup>-1</sup>. As frações de 0,5 mL foram coletadas de acordo com a absorvância a 280 nm.

Já a cromatografia com a fração F8 (1,5 mg prot) foi feita no laboratório da Profa. Dra. Carla Columbano no IQ-USP com a assistência do Dr. Fernando Gonzales. A amostra estava diluída em tampão bicarbonato de amônio 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8. A cromatografia foi feita no mesmo tipo de equipamento já mencionado e a amostra foi eluída com o mesmo tampão em pH constante a 20 °C com um fluxo de 0,2 mL.h<sup>-1</sup>. As frações de 0,25 mL por tubo de acordo com a absorvância a 280 nm.

Nas cromatografias, as frações foram coletadas automaticamente em tubos de plástico utilizando o coletor Frac-920, as frações obtidas foram imediatamente armazenadas no gelo. Após finalizar a cromatografia, as frações foram estocadas a -20°C.

### **3.14 Identificação de proteínas nas frações com atividade antibacteriana**

#### **3.14.1 Digestão das proteínas presentes nos géis de SDS-PAGE**

As regiões de migração das proteínas de interesse foram recortadas dos géis e colocadas em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL, um tubo para cada banda. Os pedaços foram descorados ao serem agitados por 3-5 min em 200 µL de solução aquosa de etanol 30 % (quando as proteínas estavam coradas com Azul de Coomassie) ou em uma solução de 50 % de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100  $\text{mmol.L}^{-1}$  em ACN 50 % quando as proteínas foram coradas com  $\text{AgNO}_3$  e depois com ACN. O procedimento foi seguido de uma lavagem com 400 µL de solução de 50 % de ACN em 25  $\text{mmol.L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  por 15 min sob em agitação vigorosa, sendo este repetido por três vezes. Aos géis foram adicionados 200 µL de ACN 100 % e as misturas foram agitadas vigorosamente por 5 min e secas em um SpeedVac por 5-10min. A cada uma foram adicionados 20 µL de solução de tripsina (10  $\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$ ) diluída com 40  $\text{mmol.L}^{-1}$  bicarbonato de amônio em ACN a 10 %. Após 30 min em banho de gelo, a mistura recebeu um volume de 20 µL de solução  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50  $\text{mmol.L}^{-1}$  e a nova mistura foi incubada por 17 h a 37 °C. A sua secagem foi feita em SpeedVac por 1 h com resfriamento. Os tubos foram selados para evitar umidade e para futuros análises por espectrometria de massas feitas como citado abaixo (3.14.2).

### **3.14.2 Espectrometria de massa por MALDI-TOF das amostras tripsinizadas para identificação de proteínas**

As análises foram feitas com um espectrômetro de massas Bruker UltraFlex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA) pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) de EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia - EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Brasília, DF, Brasil. As análises e sequenciamentos dos peptídeos foram feitos pelo ou sob supervisão do Dr. Marcelo Porto Bemquerer.

Para as análises por MALDI, a matriz era a mistura de uma solução de  $\alpha$ -CHCA 20 mg.mL<sup>-1</sup> diluído em ACN/TFA 0,1 % (70:30, v:v) que foi chamado aqui de: solução  $\alpha$ -CHCA.

As amostras de peptídeos foram dissolvidas com 20  $\mu$ L de água. Para a dessalinização das amostras, a ponteira ZIP-TIP contendo coluna C18 no seu interior foi ativada pipetando 10  $\mu$ L de ACN 100 % por duas vezes, depois foi pipetada 10  $\mu$ L d'água também por duas vezes. Com a ponteira ativada, foi introduzido 10  $\mu$ L da amostra (por dez vezes) para saturar a coluna e depois a coluna foi lavada duas vezes com 10  $\mu$ L de água. Para liberar os peptídeos retidos na coluna, a lavagem dela foi feita com 10  $\mu$ L de ACN 50 %, sendo cada uma chamada de solução peptídica.

Um volume de 10  $\mu$ L da solução  $\alpha$ -CHCA foi pipetado e colocado na placa para MALDI. A matriz foi seca à temperatura ambiente por 5-10 min. Depois um volume de 10  $\mu$ L da solução peptídica foi colocada na matriz que foi também seca à temperatura ambiente por 5-10 min. A placa já pronta foi colocada dentro do aparelho.

A ionização foi feita em modo refletido positivo usando os seguintes parâmetros no aparelho: Fonte de íon 1: 25,00 kV; Fonte de íon 2: 21,50 kV; Lentes: 9,00 kV; Refletores 1: 26,30 kV; Refletores 2: 13,70 kV. Os dados foram salvos na faixa de  $m/z$  de 600 a 4.000 e analisado pelo software Flex Analysis (Bruker Daltonics, Bilerica, MA). A fragmentação do peptídeo foi feita pela metodologia LIFT™ (SUCKAU et al., 2003) com os seguintes parâmetros de voltagens: IS1, 8,00 kV, IS2, 7,15 kV; LIFT 1, 19,00 kV. Íons no espectro MS com intensidade (em unidades arbitrárias) mais alta que  $10^4$  e sem contaminantes em uma faixa de  $m/z$  de 5-10 foram selecionadas para a fragmentação LIFT™ (com típica faixa de  $m/z$  de 8-10). O sequenciamento de peptídeos foi feito manualmente usando o software Flex Analysis para assinalar as séries *y* e *b*. Algumas fragmentações preferenciais da cadeia peptídica foram consideradas.

Os peptídeos foram usados para identificação das proteínas, das quais são fragmentos, usando o programa Flex Analysis e o banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information).

### **3.15 Atividades enzimáticas dos venenos, frações e/ou proteínas isoladas**

#### **3.15.1 Atividade gelatinolítica de proteínas isoladas**

As frações F2-1 (0,5 µg de proteína) contendo a metalo-peptidase e F4-II (1 µg de proteína) contendo a serino-peptidase foram dissolvidas com 20 µL de tampão bicarbonato de amônio 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8.

Foi feita uma zimografia mediante PAGE em condição não redutora e não desnaturante. O procedimento é similar ao descrito no item 3.10 com a diferença da

ausência do  $\beta$ -mercaptoetanol ou DTT e a incorporação de gelatina (0,3 %) no gel de acrilamida. Depois da eletroforese, o gel foi lavado duas vezes em uma solução de 0,5 % Triton X-100 (v/v) por 30 min cada para a remoção do SDS. Depois, o gel foi incubado em 50 m.mol.L<sup>-1</sup> de Tris-HCl pH 8.0 e 5 m.mol.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> a 37 °C por 20 h e corado com Azul de Coomassie R-250 e depois descorado para visualização (ZAQUEO et al., 2014a).

A verificação de bandas transparentes no gel confirma a atividade proteolítica das proteínas.

### **3.15.2 Atividade hemaglutinante (AHE)**

Foi feita no Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto Biológico sob supervisão da Dra. Sumika Kiyota.

As amostras do veneno bruto (1mg de proteína.mL<sup>-1</sup>) ou da fração F8-II (0,064 mg de proteína.mL<sup>-1</sup>) foram diluídas em tampão bicarbonato de amônio 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8. Como controle positivo foi usado uma lectina Dg-Lec isolada de sementes de *Dioclea grandiflora* diluída na água. Uma suspensão de eritrócitos a 2 % (v:v) foi feita usando amostras de sangue humano de pessoas saudáveis do grupo sanguíneo O Rh+: um volume de 3 mL de sangue foi coletado usando 1 mL de citrato 0,08 % (p/v) como anticoagulante, o sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 3 min e depois o plasma foi desprezado, os eritrócitos foram lavados por centrifugação (2000 rpm por 3 min) três vezes com tampão fosfato salino (NaCl 137 m.mol.L<sup>-1</sup>, fosfato 10 m.mol.L<sup>-1</sup>, KCl 2,7 m.mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4) e o precipitado foi resuspenso no mesmo tampão, gerando uma suspensão final de eritrócitos a 2 % (v:v).

O ensaio foi feito em placas de microtitulação de 96 poços, os quais foram incubados com 50  $\mu\text{L}$  da solução stock do veneno bruto ou da fração F8-II e 50  $\mu\text{L}$  de suspensão de eritrócitos a 2 % (v:v). A incubação foi feita a temperatura ambiente por 30 min. Como controle negativo foi utilizado o tampão fosfato salino.

### **3.15.3 Atividade coagulante**

Este ensaio também foi feito sob supervisão da Dra. Elizabeth Cheng no Laboratório de Bioprocessos, no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan (São Paulo).

As amostras do veneno bruto (1mg de proteína. $\text{mL}^{-1}$ ), a fração F8 (0,74 mg de proteína. $\text{mL}^{-1}$ ) e a fração F8-II (0,064 mg de proteína. $\text{mL}^{-1}$ ), foram diluídas em tampão bicarbonato de amônio 0,05 mol. $\text{L}^{-1}$ , pH 8 ou em Tampão Imidazol (0,1 mol. $\text{L}^{-1}$ , pH 7,3). O plasma humano pobre em plaquetas (PPP) foi doado pelo laboratório da Dra. Elizabeth Cheng, que recebeu doação do Colsan-Associação Beneficente de Coleta de Sangue de diferentes doadores.

Um volume de 20  $\mu\text{L}$  de cada amostra diluída foi colocado no tubo de teste contendo 80  $\mu\text{L}$  de PPP, 80  $\mu\text{L}$  de APT (Tromboplastina parcialmente ativada) e uma pequena barra magnética. O tubo foi deixado em banho-Maria por 3 min a 37 °C. Para as medições do tempo de coagulação o tubo de teste foi colocado dentro de um coagulômetro (Modelo Raf ® Clot-1a), nesse momento a barra magnética começa a girar e imediatamente foi agregado no tubo 80  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{CaCl}_2$  (0,025 mol. $\text{L}^{-1}$ ) para começar a coagulação. O tampão imidazol foi utilizado como branco. O tempo em



segundos que demora a barra magnética para parar de girar é o tempo que a amostra demora causar a coagulação.

### **3.16 Prospecção e desenho de potenciais AMPs derivados das proteínas detectadas nas frações com ação antibacteriana do veneno de *B. oligolepis***

Os peptídeos gerados por tripsinização (**Tabela 19** de Resultados) das proteínas ativas do veneno foram localizadas por alinhamento com as sequências de aminoácidos e nas estruturas cristalográficas de proteínas similares a elas pertencentes à família Viperidae disponíveis na base de dados GenBank NCBI.

Para localizar os peptídeos pertencentes a metalo-peptidases identificadas foi eleita a estrutura 3D da cadeia A da metaloproteinase/desintegrina Vap2 do veneno de *Crotalus atrox* (PDB: 2DW0\_A); para os peptídeos da serino-peptidase identificada no veneno foi eleita a estrutura 3D da serino-peptidase Aav-sp-i de *Agkistrodon acutus* (PDB: 1OP0\_A); para os peptídeos da lectina tipo C identificados foi eleita a estrutura 3D da Botrocetina (Lectin Type C) do veneno de *Bothrops jararaca* (PDB: P22029.2) (**Figura 52** de Resultados).

Para a escolha dos peptídeos a serem sintetizados foram também considerados as sequências de aminoácidos, as cargas líquidas em pH 5 e 7,4, os potenciais antimicrobianos teóricos, os potenciais de agregação teórica e as predições teóricas de suas estruturas secundárias, como descrito nos itens 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estabelecimento de condições para uso dos micro-organismos disponíveis

A primeira etapa do presente trabalho foi conseguir as cepas de bactérias e fungos de nosso interesse já indicados, bem como estabelecer os procedimentos de sua estocagem e dos ensaios de atividade em nosso próprio laboratório. Como não tínhamos grande experiência com leveduras, precisávamos saber qual era o tempo e a absorbância adequada para obter as alíquotas na fase exponencial de crescimento. Portanto, foram feitas curvas de crescimento de três leveduras. A 30°C as cepas de *Candida* apresentaram um ótimo crescimento no meio de cultura usado comparável aos resultados obtidos por Cobián (2007). A fase lag (fase de adaptação) cerca de 4 horas foi seguida de uma fase exponencial [com densidade óptica (absorbância) a 595 nm variando entre 0,1 e 0,6] que durou aproximadamente 6 horas (**Figura 7**). Esta última forneceu as alíquotas para os testes antimicrobianos. Preferiu-se usar aquelas com absorbância entre 0,3 e 0,4.

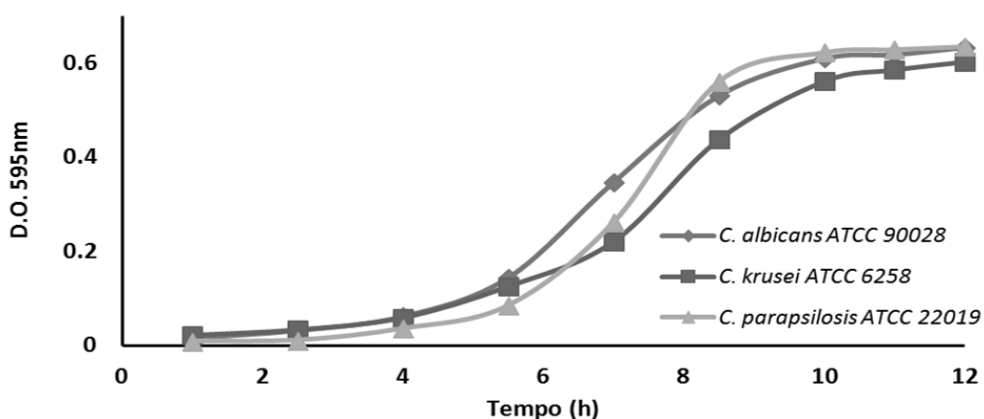


Figura 7. Curvas de crescimento das leveduras usadas. Foi feita em volumens de 50 mL de meio PDB, 30 °C, 150 rpm.

As curvas de crescimento das bactérias não foram feitas porque tínhamos experiência e elas são bem conhecidas, existindo algumas variações no tempo de acordo com os meios de cultura e as cepas utilizadas.

#### 4.2 Desenvolvimento de novos AMP derivados da sequência aminoacídica da PLA<sub>2</sub> de *B. pictus*

A tentativa de confirmar que novos AMPs podem ser prospectados em proteínas de venenos ainda não estudados, elegemos a sequência de aminoácidos da PLA<sub>2</sub> da serpente *B. pictus* (GenBank NCBI: AAF91498) como proteína de partida, segundo os critérios descritos, quatro peptídeos foram eleitos. A localização dos peptídeos no modelo por homologia da estrutura tridimensional da proteína é mostrada na **Figura 8**. Esta etapa do trabalho pôde ser feita porque a sequência de PLA<sub>2</sub> de *B. pictus* foi alinhada com a sequência aminoacídica da PLA<sub>2</sub> do veneno de *Agkistrodon halys pallas* (PDB: 1M8R\_A), tendo demonstrado 77 % de identidade.

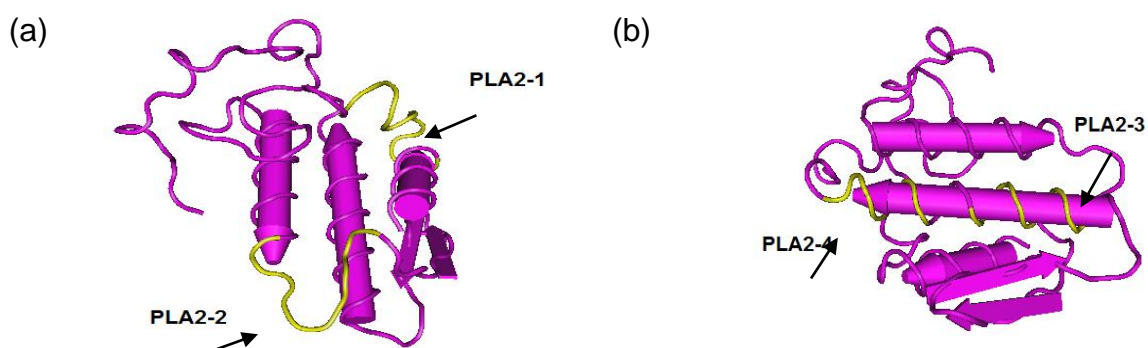


Figura 8. Localização (em amarelo) dos peptídeos PLA2-1, PLA2-2 (a) e PLA2-3, PLA2-4 (b) na estrutura tridimensional de PLA<sub>2</sub> do veneno de *B. pictus*.

#### 4.2.1 Predição do potencial antimicrobiano dos peptídeos PLA2-1, PLA2-2, PLA2-3 e PLA2-4

Os resultados são mostrados na **Tabela 4**. Pode-se observar uma similaridade de 36,36 a 45,45 % dos AMPs descritos com os peptídeos eleitos para síntese e estudo. Esta porcentagem é alta, pois são sequências compostas por poucos aminoácidos.

#### 4.2.2 Predição da estrutura dos peptídeos

A próxima etapa do trabalho foi feita com o auxílio do servidor PEP-FOLD3, um método *de novo* que possibilita modelar entre 5 e 50 resíduos de aminoácidos em solução aquosa de uma maneira rápida. Os modelos gráficos aceitos segundo o Diagrama de Ramachandran e visualizados usando o software PyMOL estão apresentados na **Figura 9**. No caso dos peptídeos PLA2-3 e PLA2-4 foram feitas trocas de Cys por Ser e de Asp por Ala, respectivamente com o objetivo de evitar oxidação, aumentar a anfipaticidade e carga líquida em pH 7.

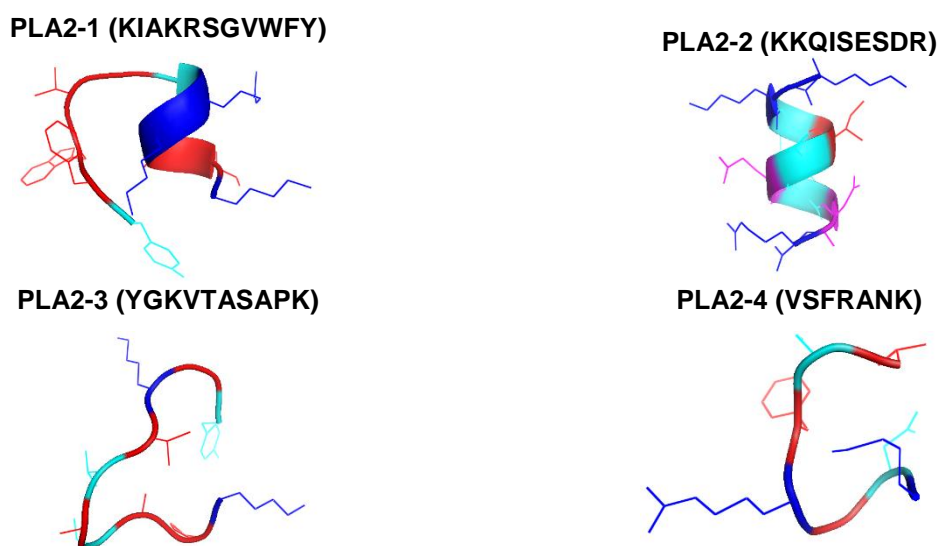


Figura 9. Predição de estrutura dos peptídeos derivados da PLA<sub>2</sub> de *B. pictus*. Aminoácidos hidrofóbicos (vermelho), aminoácidos polares (ciano), aminoácidos com carga positiva (azul), aminoácidos com carga negativa (magenta).

Tabela 4. Alinhamento dos peptídeos com peptídeos antimicrobianos da base de dados do APD3.

Peptídeo	Sequência	Carga líquida em pH 7	Código de alinhamento (% de similaridade)	Alinhamento	Carga líquida em pH 7	Atividade antimicrobiana	Fonte natural	Referência
PLA2-1	KIAKRSGVWFY	+3	AP02351 (46,15 %)	Alig Result: QKIAEKFSGTRRG Input Seq : +KIA+KRSGVWFY	+3	Anti Gram (+)	<i>Bos taurus</i>	(STRUB et al., 1995)
			AP02201 (36,36 %)	Alig Result: KI+KFLKV+LT Input Seq : KIAKRSGVWFY	+3	Anti Gram (+) e (-), antifúngico	<i>Paenibacillus ehimensis B7</i>	(HUANG et al., 2013)
PLA2-2	KKQISESDR	+1	AP02034 (36,36 %)	Alig Result: +EQCREEEDDR Input Seq : KKQ++ISESDR	-4	Antiviral, antifúngico, anti-HIV	<i>Cocos nucifera</i>	(WANG; NG, 2005)
			AP02351 (35,71 %)	Alig Result: QK+IAEKFSGTRRG Input Seq : KKQISE++S++DR+	+3	anti-Gram (+)	<i>Bos taurus</i>	(STRUB et al., 1995)
PLA2-3	YGKVTASAPK	0	AP02347 (40,0 %)	Alig Result: ++KVTKSVKSIPVKI Input Seq: YGKVT+++ASAP+K+	+41	Anti Gram (+) e (-)	<i>Paenibacillus sp.</i>	(GUO et al., 2012)
			AP02438 (36,36 %)	Alig Result: AY++V+LDEPK Input Seq: +YGKVTASAPK	-1	Anti Gram (+) e (-), antifúngico	<i>Ovis aries</i>	(CHEN et al., 2015)
PLA2-4	VSFRANK	+1	AP01714 (37,5 %)	Alig Result: KV+FLGLK Input Seq : +VSFRANK	+2	anti-Gram (+) e (-)	<i>Jatropha curcas</i>	(XIAO et al., 2011)
			AP02624 (36,36 %)	Alig Result: EVASFDKSKLK Input Seq: +V+SF++RANK	+1	anti-Gram(+) e (-), Antibiofilme	<i>Paracentrotus lividus</i>	(SCHILLACI et al., 2014)

Nos estudos que se seguem a a) Cys foi trocada por Ser, b) o Asp foi trocado por Ala.

Os resultados mostram peptídeos com estrutura secundária  $\alpha$ -hélice (peptídeo PLA2-1 e PLA2-2) e randômica (peptídeo PLA2-3 e PLA2-4). Vários AMPs têm estrutura  $\alpha$ -hélice e, portanto, o PLA2-1 e PLA2-2 poderiam ter atividade antimicrobiana. O PLA2-1 mostra uma estrutura anfipática, a diferença de outros AMPs anfipáticos com estrutura secundária  $\alpha$ -hélice por exemplo, que tem um lado hidrofílico e outro lado hidrofóbico como a hemocidina Hb 98-114 (BELMONTE et al., 2012), o PLA2-1 tem o lado hidrofílico formado pela estrutura  $\alpha$ -hélice e o lado hidrofóbico formado por uma cadeia randômica de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. O PLA2-2 não apresenta os lados hidrofílico e hidrofóbico como o PLA2-1, mas devido à estrutura  $\alpha$ -hélice, este poderia interagir com a membrana celular. A atividade antimicrobiana não se limita a peptídeos com estrutura  $\alpha$ -hélice, AMP com estrutura randômica como o Hb33-61a (SFORÇA et al., 2005) também tem atividade antimicrobiana, portanto, os peptídeos PLA2-3 e PLA2-4 também poderiam ter atividade.

#### **4.2.3 Síntese, análise, purificação e caracterização química dos peptídeos**

A **Figura 10** mostra que, no geral, os peptídeos apresentaram baixos potenciais de agregação, com exceção do peptídeo PLA2-3 e, portanto, não seriam esperados problemas sintéticos relacionados à agregação peptídica. Na **Tabela 5** estão listados os peptídeos amidados que foram sintetizados.

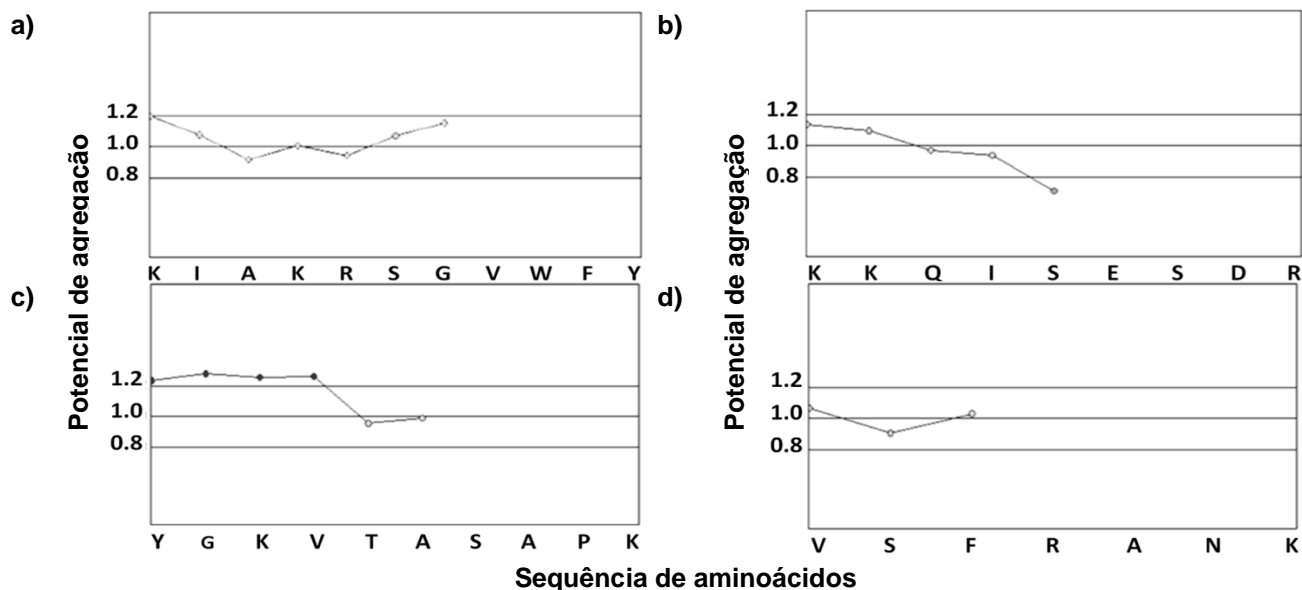


Figura 10. Potencial de agregação dos peptídeos a) PLA2-1, b) PLA2-2, c) PLA2-3, d) PLA2-4. Neste programa os primeiros 4 aminoácidos na direção C→N não são considerados (CSPS PHARMACEUTICALS, 1994).

Tabela 5. Sequências de aminoácidos e propriedades dos peptídeos escolhidos para síntese e estudo.

Peptídeo	Sequência	Massa molar (Da) teórica	Carga iônica
PLA2-1	KIAKRSGVWFY-NH <sub>2</sub>	1,353.65	+4
PLA2-2	KKQISESDR-NH <sub>2</sub>	1,089.23	+2
PLA2-3	YGKVTASAPK-NH <sub>2</sub>	1,020.21	+3
PLA2-4	VSFRANK-NH <sub>2</sub>	819.97	+3

Uma vez que a maioria dos AMPs são moléculas catiônicas (MACHADO et al., 2007; REMUZGO et al., 2014) foi feita amidação para aumentar as cargas líquidas em pH 7 de todos eles (**tabela 5**). O processo de alongamento das sequências peptídicas na resina Rink-amida a 60 °C ocorreu sem problemas, com exceção de alguns aminoácidos que requereram ser reacoplados. Em todas as sínteses houve um ganho na massa da resina evidenciando que elas foram bem-sucedidas.

A **Tabela 6** mostra as condições de clivagem de cada peptídeo da resina e desproteção total das cadeias laterais. Os cromatogramas obtidos para os peptídeos brutos (**Figura 11**) mostraram diversos subprodutos. Para confirmar se o analito mais

abundante era o peptídeo desejado, foi feita a análise por LC/ESI-MS (**Figura 11 inset**). Os resultados mostraram que os analitos mais abundantes eram mesmos os peptídeos desejados, confirmando o sucesso das sínteses.

Tabela 6. Condições da clivagem do peptídeo da resina e desproteção total das cadeias laterais.

Peptídeo	Coquetel de clivagem	Tempo da reação(min)	Temperatura (°C)
PLA2-1	Reagente K (TFA/Água/Fenol/Tioanisol/EDT [82,5:5:5:5:2,5])	60	60
PLA2-2	Reagente K (TFA/Água/Fenol/Tioanisol/EDT [82,5:5:5:5:2,5])	60	60
PLA2-3	TFA/Água/Tioanisol (95:2,5:2,5)	60	60
PLA2-4	TFA/Água/Tioanisol (95:2,5:2,5)	60	60

A preparação semi-preparativa dos peptídeos brutos a partir de 150 mg das peptidil-resinas e forneceram 59, 54, 78 e 75 mg, que foram dissolvidas em solvente B e injetados em um sistema de RP-HPLC preparativo para a separação dos peptídeos desejados dos demais subprodutos da síntese em maior escala. Os cromatogramas da purificação de cada peptídeo por RP-HPLC preparativa são mostrados na **Figura 12** e os cromatogramas dos purificados na **Figura 13**. As condições de purificação, rendimentos, graus de pureza dos purificados e os seus conteúdos peptídicos estão listadas na **Tabela 7**.

Depois da purificação, foi realizada a LC-MS/ESI de cada peptídeo purificado e os valores de massa molar obtidos confirmaram a sua identidade: PLA2-1 (1353,65 Da), PLA2-2 (1089,23 Da), PLA2-3 (1020,21 Da) e PLA2-4 (819,97 Da) (**Figura 13**). A hidrólise total seguida de análise do hidrolisado também confirmou a presença dos aminoácidos esperados (dados não mostrados).



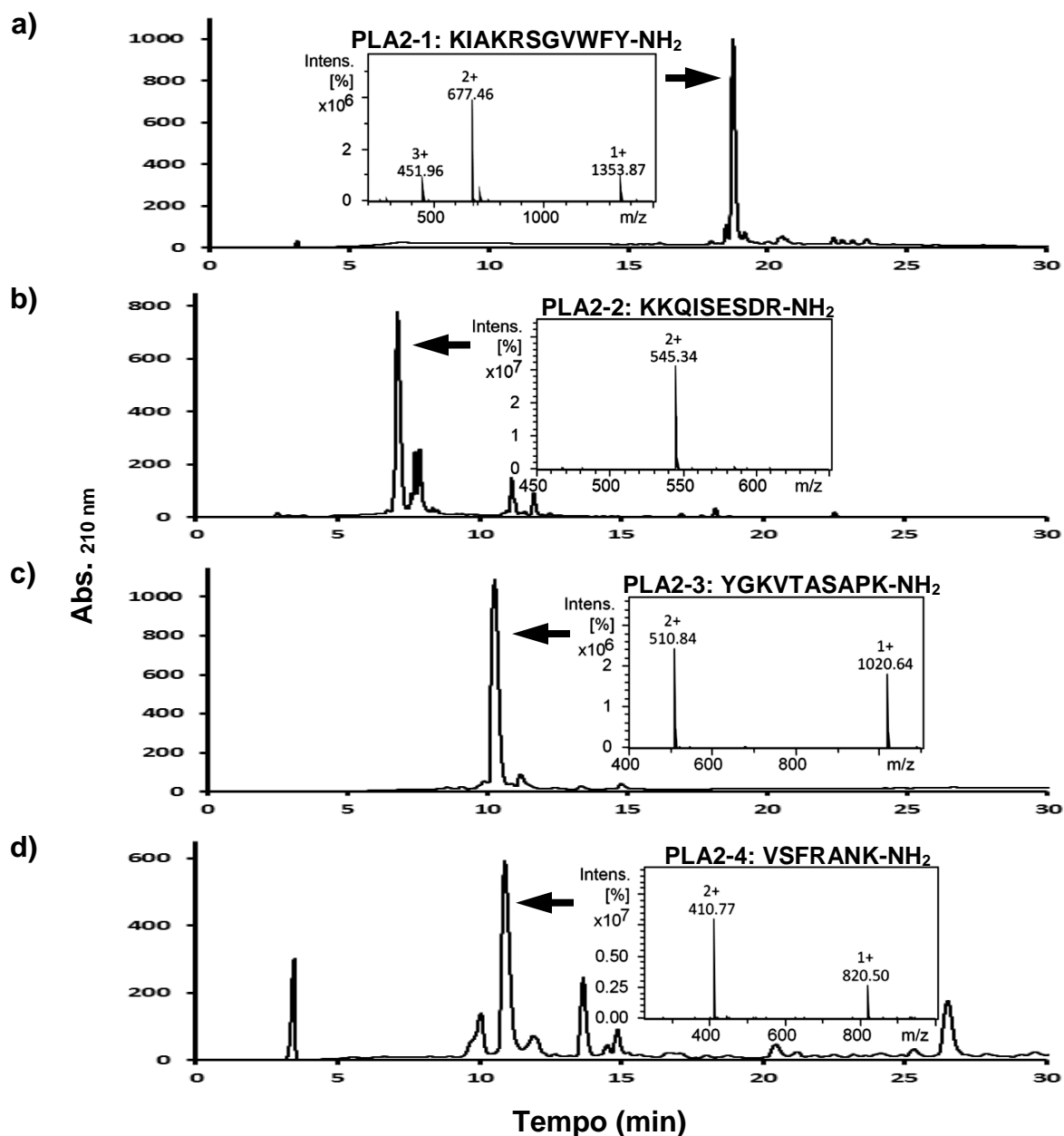


Figura 11. RP-HPLC dos peptídeos brutos e LC-MS/ESI (inset) do analito mais abundante, indicando o peptídeo desejado. a) PLA2-1:  $(M+H)^+ = 1353,87$ ,  $(M+2H)^{+2} = 677,46$ ,  $(M+3)^{+3} = 451,96$ ; b) PLA2-2:  $(M+2H)^{+2} = 545,34$ , c) PLA2-3:  $(M+H)^+ = 1020,64$ ,  $(M+2H)^{+2} = 510,84$ , d) PLA2-4:  $(M+H)^+ = 820,50$ ,  $(M+2H)^{+2} = 410,77$ . Condições de análise por RP-HPLC: 0,1% TFA/água como solvente A e 60 % ACN/0,09% TFA/água como solvente B, fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> em temperatura ambiente usando gradiente linear de 5 a 95 % em 30 min do solvente B, detecção em 210 nm. Condições de análise ESI-MS: voltagem no capilar: 4,5k V, voltagem na saída do capilar: 500 V, modo de ionização: ESI+, fonte de ionização do tipo electrospray, tipo de analisador: Ion trap

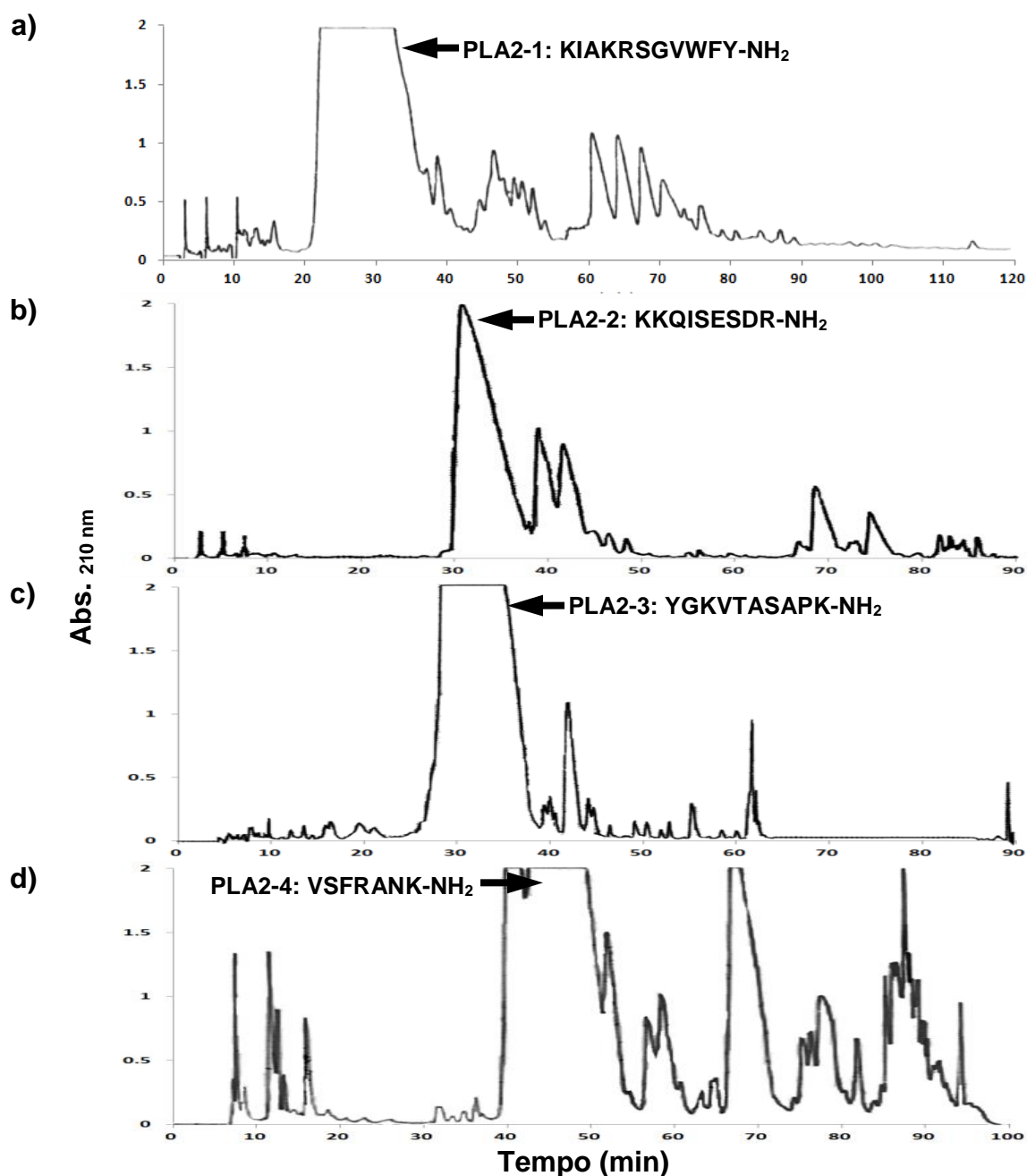


Figura 12. Perfil de RP-HPLC preparativo e perfis dos purificados (inset) dos peptídeos. Condições de purificação por RP-HPLC: a) PLA2-1: solvente A (0,1% TFA/água), solvente B (60 % ACN/0,09% TFA/água), fluxo de 10 mL.min<sup>-1</sup>, gradiente linear de 30-70 % B/120 min do solvente B, b) PLA2-2: solvente A (0,1% TFA/água), solvente B (25 % ACN/0,09% TFA/água), fluxo de 10 mL.min<sup>-1</sup>, gradiente linear de 5-50 % B/90 min, c) PLA2-3: solvente A (0,1% TFA/água), solvente B (25 % ACN/0,09% TFA/água), fluxo de 10 mL.min<sup>-1</sup>, gradiente linear de 20-80 % B/90 min, d) PLA2-4: solvente A (0,1% TFA/água), solvente B (60 % ACN/0,09% TFA/água), fluxo de 10 mL.min<sup>-1</sup>, gradiente linear de 5-30 % B/100 min. Condições de análise por RP-HPLC (Inset): solvente A (0,1% TFA/água), solvente B (60 % ACN/0,09% TFA/água), fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> usando gradiente linear de 5 a 95 %/30 min do solvente B, detecção em 210 nm.

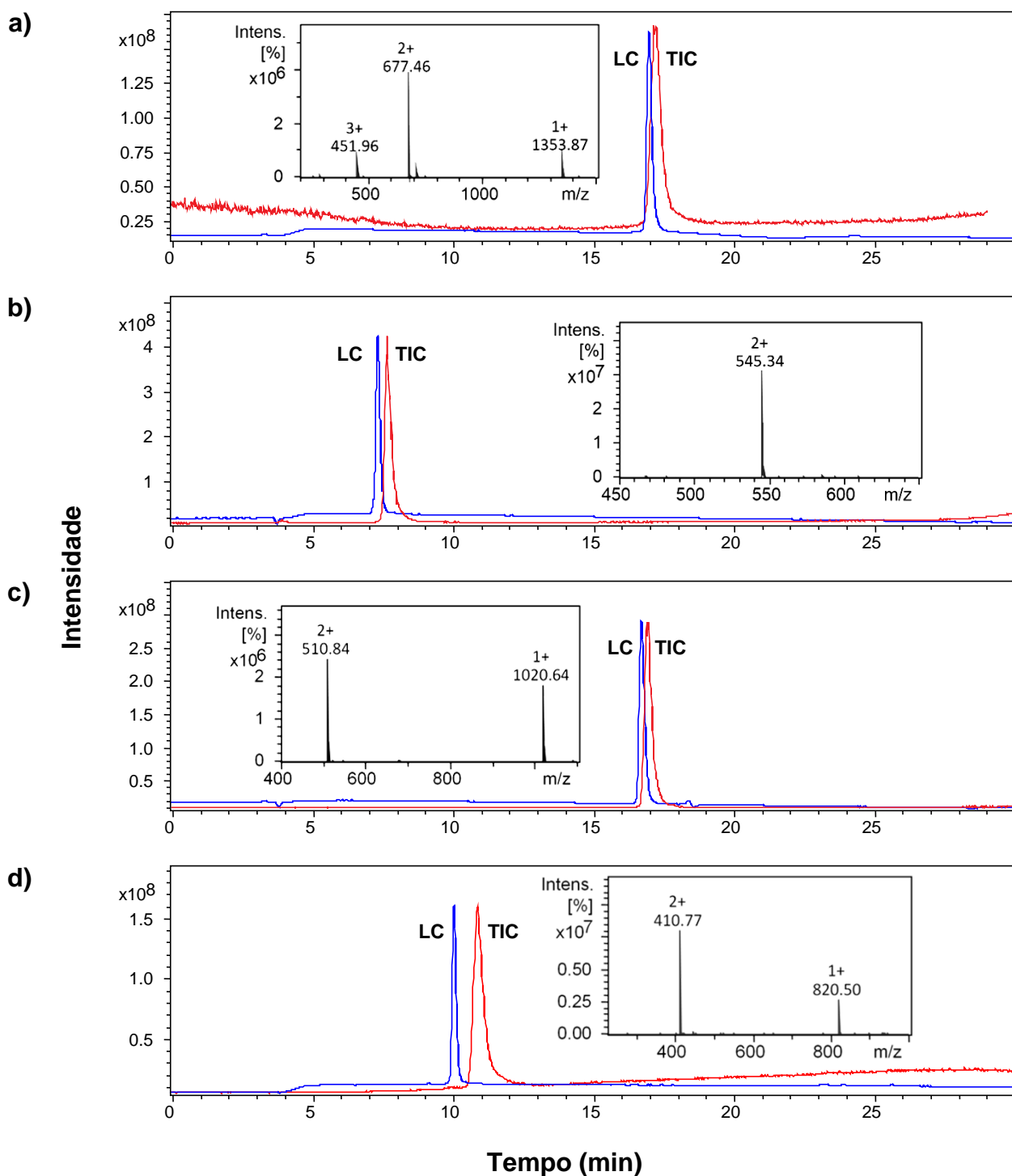


Figura 13. Perfil de RP-HPLC e ESI-MS (inset) dos peptídeos purificados: a) PLA2-1, b) PLA2-2, c) PLA2-3, d) PLA2-4. Condições de análise por RP-HPLC: solvente A (0,1% TFA/água) e solvente B (60 % ACN/0,09% TFA/água), fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura ambiente, gradiente linear de 5-95 % em 30 min do solvente B, detecção em 210 nm. Condições de análise ESI-MS: voltagem no capilar: 4,5k V, voltagem na saída do capilar: 500 V, modo de ionização: ESI<sup>+</sup>, fonte de ionização do tipo electrospray, tipo de analisador: Ion trap. (LC: Cromatografia líquida, TIC: Cromatograma de íons totais).

Tabela 7. Condições de purificação, rendimentos e caracterização dos peptídeos sintetizados.

Peptídeo	Fluxo (mL.min <sup>-1</sup> )	Solvente B (%)*	Gradiente linear/tempo (min)	Peptídeo injetado (mg)	Peptídeo purificado (mg)	Rendimento da purificação (%)	Grau de pureza (%)**	Conteúdo peptídico (%)
PLA2-1	10	60	30-70 % B/120	59	31,33	53,1	98,6	56,6
PLA2-2	10	25	5-50 % B/90	54	24,7	45,7	99,1	75,67
PLA2-3	10	25	20-80 % B/90	78	48,8	63	97,4	59,21
PLA2-4	10	60	5-30 % B/100	75	35	46,7	97	51,86

\*Solvente B: 25 ou 60 % ACN/0,09 % TFA/água

\*\*Solvente B: 60 % ACN/0,09 % TFA/água

#### 4.2.4 Atividade antimicrobiana dos peptídeos derivados da PLA<sub>2</sub> de *B. pictus*

Como mostra a **tabela 8**, deste grupo de peptídeos, desenhados, sintetizados, purificados e caracterizados só o peptídeo PLA2-1 foi ativo contra as bactérias Gram negativas testadas (MIC de 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), mas este peptídeo mostrou atividade maior contra todas as linhagens de *Candida* testadas, especialmente contra *C. parapsilosis* ATCC 22019 (MIC de 6,25-3,25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).

Há AMPs com potente atividade antimicrobiana que possuem Trp e Arg na estrutura, sendo que o resíduo Trp dá caráter apolar e a Arg outorga ao peptídeo carga positiva, dando ao peptídeo propriedades de interação com os componentes lipídicos da membrana celular. Estes dois resíduos participam em um tipo de interação cátion- $\pi$ , facilitando a interação peptídeo-membrana (CHAN; PRENNER; VOGEL, 2006; YAU et al., 1998). O peptídeo PLA2-1 (KIAKRSGVWFY-NH<sub>2</sub>) também contém Arg e Trp na estrutura, resíduos de Lys e outros resíduos de aminoácidos como a Val e Phe. Estas características tornariam o peptídeo um bom AMP anfipático, o que também é apoiado pela sua estrutura teórica mostrada na **Figura 9**.

Tabela 8. Atividade antimicrobiana dos peptídeos sintetizados

Peptídeo	MICs ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )					
	<i>S. aureus</i> ATTC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019
PLA2-1	>200	200	200	25-12,5	25	6,25-3,25
PLA2-2	>200	>200	>200	>200	>200	>200
PLA2-3	>200	>200	>200	>200	>200	>200
PLA2-4	>200	>200	>200	>200	>200	>200

Os MICs foram obtidos em baixa concentração salina no meio LB 0,5 % de NaCl.

### 4.3 Estudo do veneno de *B. oligolepis*: busca por enzimas envolvidas na atividade antimicrobiana

#### 4.3.1 Seleção do veneno pela atividade antimicrobiana

Como mostra a **tabela 9**, dentre os três venenos disponíveis, apenas os de *Bothrops barnetti* e *Bothriopsis oligolepis* foram ativos contra algumas linhagens bacterianas testadas, mas não contra as linhagens de leveduras (*Candida*), sendo o de *B. oligolepis* de mais amplo espectro. Em comparação com as bactérias Gram negativas, esses venenos foram mais ativos especialmente contra *S. aureus* ATCC 25922 (MIC de 0,78-50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Este resultado é comparável com o obtido por Samy e col (2007), que estudaram diferentes venenos de serpentes e encontraram atividade maior contra Gram positivos do que contra outras bactérias Gram negativas. Talan e col (1991) também mostraram que venenos de espécies da família Crotalidae apresentaram maior atividade frente a *S. aureus* e *S. epidermidis* (MIC de 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do que frente a bactérias Gram negativas (MIC de 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A maior sensibilidade das Gram positivas pode ser devido ao reconhecimento dos grupos aniônicos da parede celular pelos AMPs do veneno e facilidade de sua interação com a membrana plasmática celular e, no caso de fosfolipases, de hidrólise dos seus fosfolipídios (DE OLIVEIRA JUNIOR et al, 2013); as células das bactérias Gram negativas têm duas membranas (externa e interna) com estrutura, composição e funcionalidade diferentes, sendo a membrana externa uma barreira seletiva que normalmente protege melhor a bactéria da ação de compostos antibióticos (BOS; TOMMASSEN, 2004; GUPTA, 2011).

Tabela 9. Atividade antimicrobiana dos venenos disponíveis.

		Micro-organismos					
Veneno	<i>S. Aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> PA14	<i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>Micrococcus Luteus</i> ATCC 9341		
MICs ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )							
Bb ■	25	25	>200	>200	>200	>200	>200
Bb ¥	25	25	>200	>200	>200	>200	>200
Bb ●	50	50	50	25	>200	>200	>200
Bt ■	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Bt ¥	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Bt ●	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Bo ■	1.56	0.78	25	25	25	25	50
Bo ¥	0.78	1.56	0.78	25	50	25	50
Bo ●	1.56	1.56	1.56	6.25	50	50	50

■ Meio de cultura LB sem NaCl, ¥ meio de cultura LB com 0.5% NaCl, ● meio de cultura LB com 0.9% NaCl, **Bb**: veneno de *Bothriopsis barnetti*; **Bt**: veneno de *Bothriopsis taeniatta*; **Bo**: veneno de *Bothriopsis oligolepis*. **Não foi observada atividade antifúngica usando diferentes linhagens de *Candida*.**



### 4.3.2 Determinação da concentração proteica dos venenos

A existência de proteínas e peptídeos nos venenos foi comprovada com o auxílio de uma curva padrão obtidas com reagente de Bradford e de Albumina sérica bovina cujos dados estão listados na **Tabela 10** e na **Figura 14**.

Tabela 10. Absorbância mostrada para cada concentração de Albumina

Albumina [ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ]	0	10	20	30	40	50
Absorbâncias (595 nm)	0.3188	0.6702	0.8496	1.0392	1.2391	1.4158
	0.3205	0.6641	0.8674	1.1183	1.4296	1.4517
	0.3282	0.6595	0.8467	1.0263	1.226	1.4773
Média	0.3225	0.6646	0.8546	1.0613	1.2982	1.4483
Média-Branco	0	0.3421	0.5321	0.7388	0.9757	1.1258

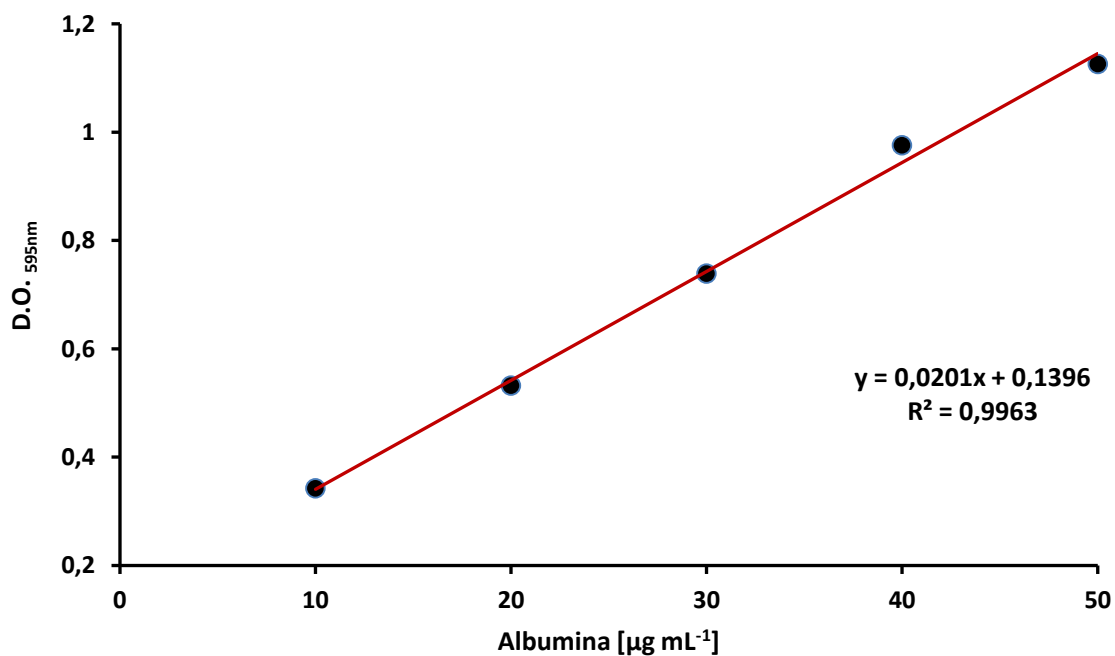


Figura 14. Curva padrão da albumina.

As concentrações proteicas de cada veneno estão descritas na **Tabela 11** onde se observa maior concentração proteica para o veneno de *B. oligolepis*.

Tabela 11. Concentração proteica dos venenos estudados

Veneno	µg de proteína/mg de veneno bruto (%)
<i>Bothrops barnetti</i>	73
<i>Bothriopsis taeniata</i>	75,3
<i>Bothriopsis oligolepis</i>	80,6

Muitos artigos da literatura descrevem concentrações proteicas de venenos de serpentes acima de 95 % (DE LIMA et al., 2005; NAIR et al., 2007), porém outros descrevem porcentagens variáveis de 24 a 100 % (PERUMAL SAMY et al., 2007). Estudando venenos de serpentes peruanas, Yarlequé e col (2012) obtiveram concentrações proteicas de 71 % para *Lachesis muta* e *B. atrox*, bem como 69 % para *B. pictus*. É importante considerar que (YARLEQUÉ, 2000) descreveu que nos venenos dos vipéridos são frequentes as associações de proteínas com carboidratos (glicoproteínas), e que estes últimos podem reduzir o grau de sensibilidade de reações colorimétricas e medidas de absorvância a 280 nm, geralmente usados para a quantificação de proteínas. Adicionalmente, os venenos ofídicos contêm polinucleotídeos, peptídeos e pigmentos com anéis heterocíclicos que poderiam incrementar a absorvância a 280 nm (YARLEQUÉ, 2000), superestimando as dosagens de proteínas. Ademais, diversos fatores que poderiam afetar a produção do veneno

como a idade, sexo, fonte de alimentação, as condições de cativeiro poderiam também afetar tal propriedade nos venenos.

#### 4.3.3 Perfis proteicos e peptídicos dos venenos

A **Figura 15** apresenta o perfil eletroforético dos venenos testados usando SDS-PAGE Tris/Glicina. Pode-se observar que o perfil do veneno de *Bothrops barnetti* (Bb), com atividade antimicrobiana, é diferente dos demais. Os perfis dos venenos de *Bothriopsis oligolepis* (Bo) e *Bothrops taeniata* (Bt) foram muito similares, apesar do primeiro ter um espectro de atividade mais amplo.

Com base nas migrações eletroforéticas relativas das proteínas padrões de massas molares conhecidas, foi obtida a curva mostrada na **Figura 16**, que relaciona o logaritmo de peso molecular (Log MW) e a mobilidade relativa das proteínas padrão (Rf). A determinação da massa molar de cada proteína presente nos venenos, baseada na curva padrão, mostrou três grupos distintos: 14-18, 31-37 e 49-66 kDa.

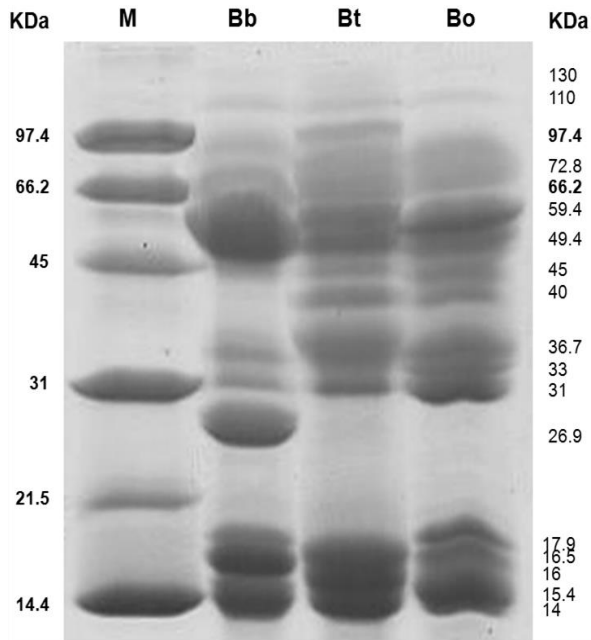


Figura 15. Perfil eletroforético e Massa molar das proteínas (kDa) que compõem os venenos estudados por SDS-PAGE usando Tris/Glycine. **M**: Marcador de massa molar proteica; **Bb**: *Bothrops barnetti* venom; **Bt**: veneno de *Bothriopsis taeniatta*; **Bo**: veneno de *Bothriopsis oligolepis*.

Condições: Gel de empilhamento: 5%; Gel de separação: 17%; Massa de proteínas aplicada: 30µg.

Condições da eletroforese: 30V x 20 min, 120V x 70 min. Coloração feita com corante Azul de Coomassie.

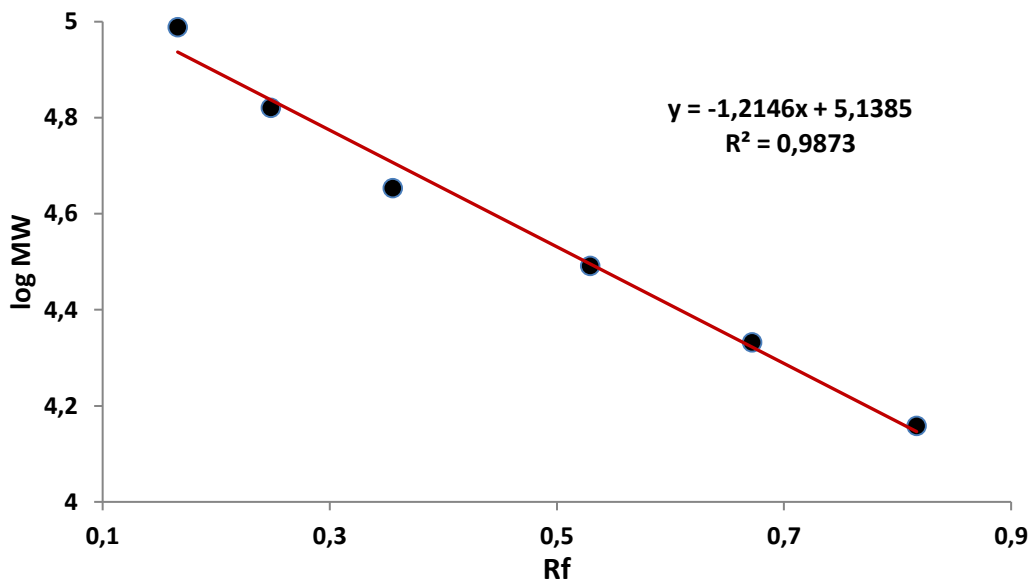
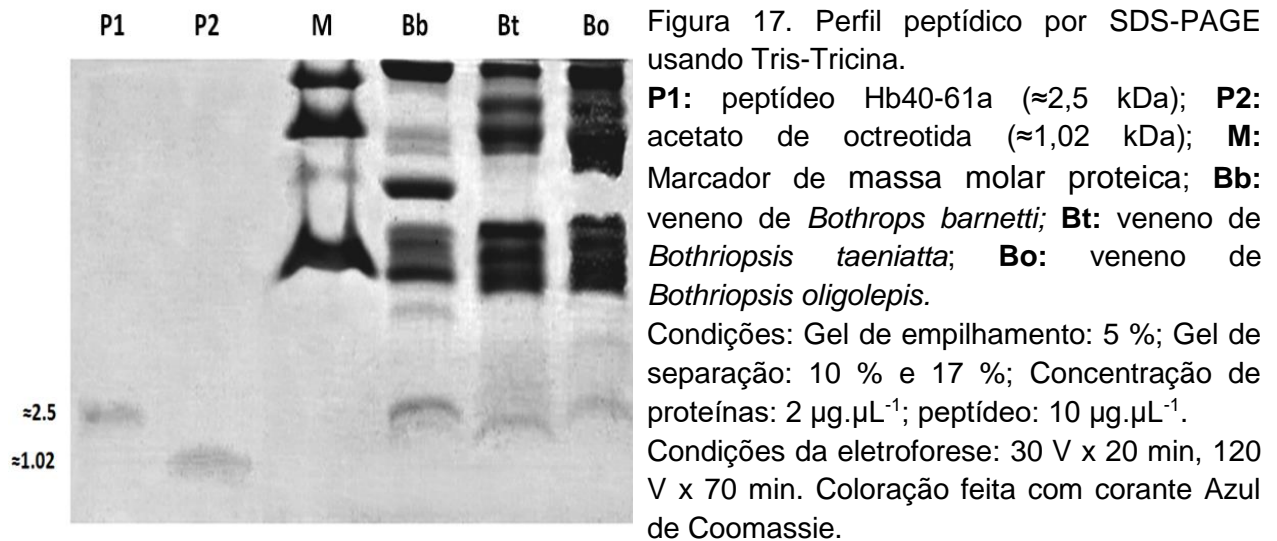


Figura 16. Variação massas molares (log MW) de proteínas padrão em função de suas mobilidades eletroforéticas relativas.

Nova análise por SDS-PAGE Tris/Tricina foi realizada com a finalidade de verificar a presença de compostos peptídicos de baixa massa molar nos três venenos.

Como mostra a **Figura 17**, compostos de aproximadamente 2,5 kDa foram detectados. Nessas novas condições, o perfil proteico e peptídico dos venenos mostrou padrões variáveis.



Os padrões obtidos não permitem identificar as proteínas e peptídeos que compõem cada veneno em estudo, mas os cálculos de suas massas molares poderiam fornecer informações valiosas. De fato, eles corroboram os dados de Mackessy e col. (2010), que descreveram que os componentes mais comuns dos venenos das serpentes da família Viperidae são proteínas de 85-150 kDa com atividade fosfodiesterase, alcalino fosfomonoesterase e L-amino oxidase; proteínas de 53-82 kDa que são nucleotidasas e hialuronidasas; proteínas de 28–36 kDa que são serino-peptidasas; proteínas de 13-15 kDa que são fosfolipases  $A_2$ .

Já que inicialmente observamos a presença de componentes de baixa massa molar ( $\leq 10$  kDa), é possível que eles sejam resultado de proteólise ocorrida em água, pois quando o veneno de *B. oligolepis* foi suspenso em tampão a SDS-PAGE

Tris/Tricina não detectou tais componentes. Esses resultados concordam com os de Okubo et al (2012) que observaram no veneno de *Bothrops mattogrosensis* a presença de fragmentos peptídicos vindos da degradação da proteína Bm-LAAO com atividade antimicrobiana.

#### **4.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) dos venenos**

Sabendo que os venenos brutos de *Bothrops barnetti*, *Bothriopsis oligolepis* provavelmente continham AMPs de massa molar próxima de 2,5 kDa, foi feita a cromatografia dos três venenos.

A **Figura 18** apresenta o perfil cromatográfico obtido para cada veneno com as condições já estabelecidas (0,1% ácido trifluoroacético (TFA) em água como solvente A, 60% ACN/0,09% TFA/água como solvente B, fluxo de A e B de 1 mL.min<sup>-1</sup> cada, temperatura ambiente, gradiente linear de B em função de A de 5-95 % em 30 min, detecção a 210 nm. Os resultados mostraram perfis diferentes, com componentes comuns e distintos. Estas condições cromatográficas permitiram uma tentativa preliminar de análise por RP-HPLC acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI/MS) desses venenos que serviram de ponto de partida para futuro fracionamento. Mais ainda, elas serviram para auxiliar na escolha de veneno de *B. oligolepis* como modelo de estudo, pois demonstrou que ele contém um espectro amplo de componentes com polaridades diversas a serem isolados e caracterizados que podem estar associados ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana.

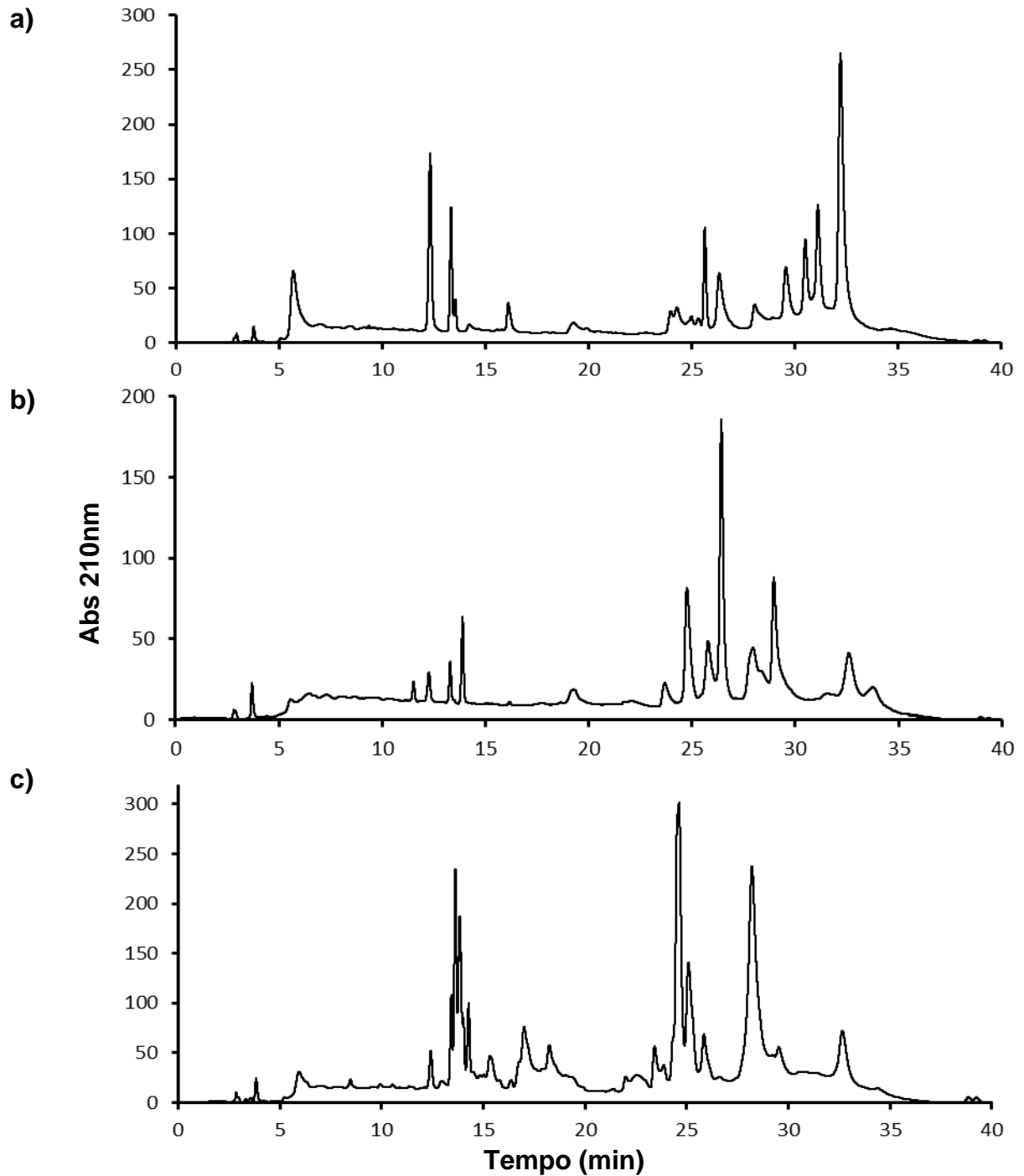


Figura 18. Perfis de RP-HPLC dos venenos brutos. a) Veneno de *Bothrops barnetti*, b) Veneno de *Bothriopsis taeniata*, c) Veneno de *Bothriopsis oligolepis*. Condições de análise das amostras: 60  $\mu\text{L}$  de soluções de 5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dos venenos, 0,1% ácido trifluoroacético (TFA) em água como solvente A, 60% ACN/0,09% TFA/água como solvente B, fluxo de A e B de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  cada, temperatura ambiente, gradiente linear de 5-95 % de B em 30 min, detecção em 210 nm.

#### 4.3.5 Fracionamento do veneno de *B. oligolepis*

##### a) 1ª tentativa: RP-HPLC

Com os resultados do perfil cromatográfico obtidos na **Figura 18**, 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de concentração de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  do veneno bruto foi fracionado nas condições já estabelecidas e citadas. O perfil cromatográfico e condições são mostrados na **Figura 19**. As frações coletadas foram congeladas, liofilizadas, dissolvidas em água e armazenadas a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Não foi observada uma boa separação entre os componentes como era esperado, por exemplo: quando analisados por RP-HPLC analítica, as frações 4 e 5 do veneno de *B. oligolepis* mostraram perfis muito similares ao do veneno bruto, mostrando a necessidade de uso de outros métodos cromatográficos, para conseguir a separação entre eles.

De fato, os resultados de SDS-PAGE indicam que essas frações contêm componentes comuns, mas também diferentes (**Figura 19**). Os resultados da dosagem de proteínas nas frações usando a curva padrão anterior estão descritos na **Tabela 12**.

Tabela 12. Concentração de proteínas das frações obtidas do fracionamento do veneno de *B. oligolepis*

	Frações	1	2	3	4	5	6	7	8	Total de prot ( $\mu\text{g}$ )
<i>B. oligolepis</i>	$\mu\text{g prot}$	0	2,39	36,39	111,34	90,49	0	0	0	240,61



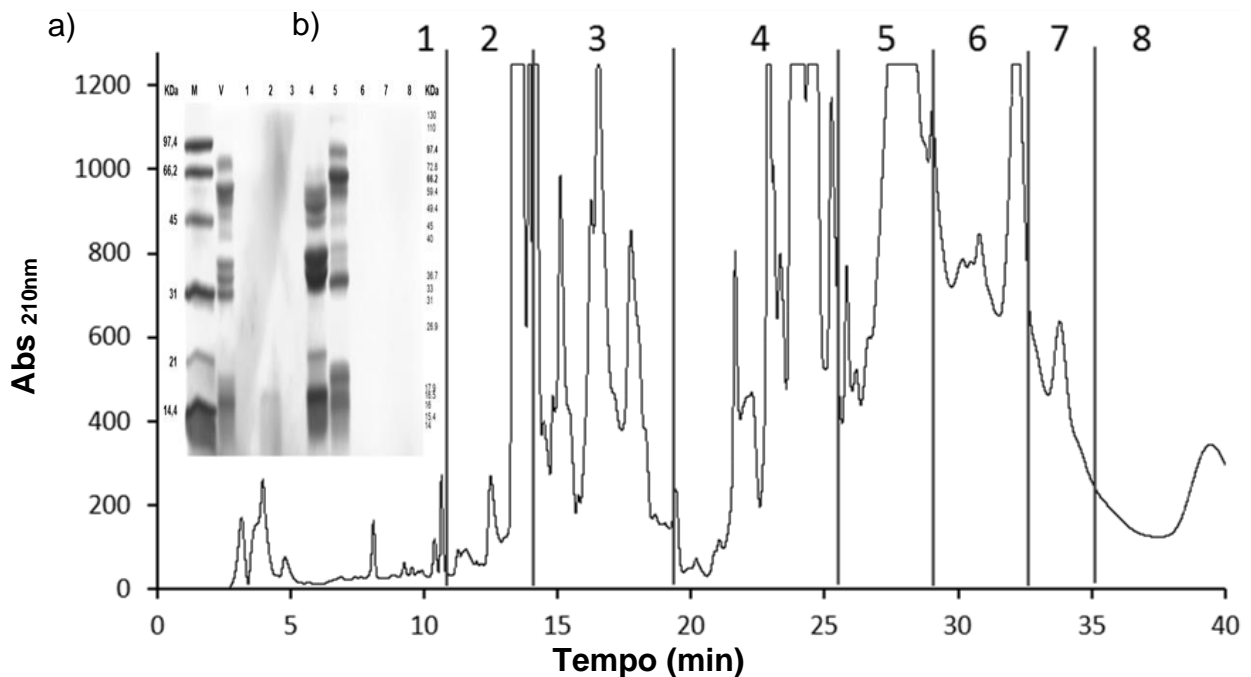


Figura 19. Perfis de fracionamento por RP-HPLC (a) e SDS-PAGE (b) do veneno bruto de *B. oligolepis*. Condições de RP-HPLC: 0,1 % TFA/água como solvente A e 60% ACN/0,09% TFA/água como solvente B, fluxo 1 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura ambiente, gradiente linear de 5 a 95 % de B em 30 min, detecção em 210 nm. SDS-PAGE usando Tris/Glycine. Coloração feita com corante azul de Coomassie. M: Marcador de peso molecular, V: Veneno bruto, 1-8: frações, condições: 20 µL de cada veneno (2 µg.µL<sup>-1</sup>), 1 µL do marcador, 15 µL de cada fração, 30 V x 15 min e 120 V x 60 min.

Das frações 2 a 5, nenhuma foi ativa contra as bactérias testadas como representantes da atividade do veneno (*S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922), sugerindo que a atividade estava relacionada às proteínas do veneno e não a seus peptídeos. Portanto, a alta pressão, a interação das proteínas com o solvente orgânico ACN ou com a superfície hidrofóbica da coluna, podem ter comprometido a estrutura nativa das proteínas relacionadas à atividade antimicrobiana ampla do veneno (AGUILAR, 2004). Lindeberg e colaboradores (2009) descreveram que a RP-HPLC leva a uma boa recuperação de compostos contendo menos do que 30-40 resíduos de aminoácidos, mas proteínas são desnaturadas e a atividade enzimática pode ser perdida.

## b) 2ª tentativa: Cromatografia líquida de troca catiônica manual

Os resultados do perfil cromatográfico obtido são mostrados na **Figura 20**. As frações P1-P5 coletadas foram analisadas a 280 nm e depois foram congelados a -20 °C. Neste caso, uma vez que no pH usado a coluna apresentava carga negativa, conclui-se que as proteínas presentes nas frações P1-P3 não interagiram com ela por apresentarem carga líquida negativa ou zero neste pH, o que significa que elas tenham  $pI \leq 8$ . As proteínas de P4-P5 foram retidas, o que significa proteínas de  $pI > 8$ .

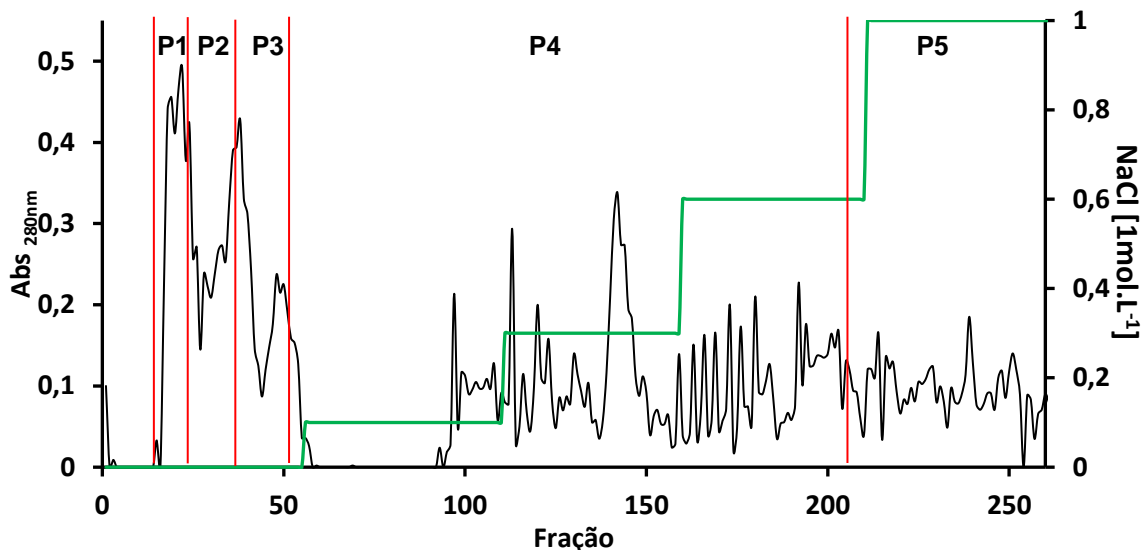


Figura 20. Perfil cromatográfico do veneno de *B. oligolepis* (55,2 mg) obtido nas seguintes condições: coluna de 19 mm x 195 mm com resina CM-SEPHADEX C50-120 equilibrada com tampão Bicarbonato de Amônia 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8, eluição com NaCl a 20 °C com um fluxo de 20 mL.h<sup>-1</sup>, as frações coletadas de 1 mL/tubo, leitura de absorvância a 280 nm.

Os ensaios antimicrobianos em microplaca de P1-P5 feitos novamente com *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922 porque estas duas espécies também são os mais representativos pela classificação do método de coloração de Gram, e são importantes sob o ponto de vista clínico (MCTAGGART et al, 1990; RANGEL et al., 2001), mostraram que:

a) as sub-frações P1 e P2 inibiram o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 e apenas a P1 inibiu o crescimento de *E. coli* ATCC 25922 na ausência e em alta concentração de NaCl, o que já havia sido observado para o veneno (**Tabela 9**).

b) como as concentrações proteicas dessas frações ativas e do veneno bruto de *B. oligolepis*, determinadas pelo método de Bradford usando a curva padrão com albumina sérica bovina obtida anteriormente (**Tabela 14**), P1 e P2 continham 14,0 mg e 2,53 mg de proteína, respectivamente. Portanto, os MICs contra *S. aureus* ATCC 25923 foram de 0,39  $\mu\text{g prot.mL}^{-1}$  para P1, 12,5  $\mu\text{g prot.mL}^{-1}$  para P2 contra 0,78  $\mu\text{g prot.mL}^{-1}$  para o veneno bruto, indicando que P1 era duas vezes mais rico em componentes ativos em comparação com o veneno bruto e muito mais rico em relação a P2.

Tabela 14. Quantificação de proteínas das frações P1 e P2 em comparação com o veneno de *B. oligolepis* bruto.

	Fração 1	Fração 2	Veneno Bo bruto
Volume no tubo (mL)	12,5	11	5
Fator de diluição (FD)	1:30	1:8	1:20
	0,497	0,412	0,438
	0,504	0,412	0,392
D.O. 595 nm	0,516	0,4	0,417
	0,517	0,408	0,417
Média	0,509	0,408	0,416
[prot ug.mL <sup>-1</sup> ]	1119,48	231,17	591,15
R <sup>2</sup> = 0.9963			
[mg)	14,0	2,53	32,568

c) componentes proteicos de  $\text{pI} \leq 8$  do veneno parecem estar relacionadas com a sua ampla atividade antimicrobiana.

A **Figura 21** apresenta o perfil eletroforético de P1 e P2 ativos. Foi observado que o P1 contém proteínas de massa molar de 31-95 kDa, o P2 contém majoritariamente proteínas menores (massa molar de 14-20 kDa), e mais o componente de  $\approx 33$  kDa. Como eles também estão presentes no veneno e em P1 a proteína de massa molar próxima de 33 kDa, e outras menores (14-20 kDa) poderiam ser os agentes antimicrobianos do veneno de *B. oligolepis*.

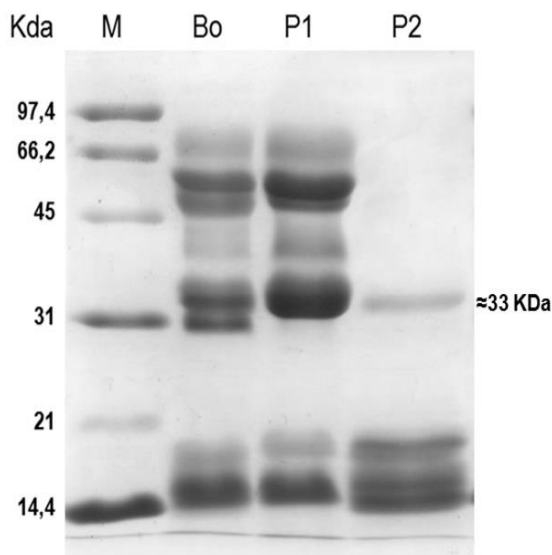


Figura 21. Perfil eletroforético do veneno de *B. oligolepis* e das frações P1 e P2 ativos. **M**: Marcador de peso molecular; **Bo**: veneno de *B. oligolepis* e das frações P1 e P2 ativos.

Condições: Gel de empilhamento: 5 %; Gel de separação: 17 %; Concentração de proteínas: 30  $\mu$ g.

Condições da eletroforese: 30 V x 20 min, 120 V x 70 min. Coloração feita com corante azul de Coomassie.

Na tentativa de identificar se existiam peptídeos menores nas frações P1 e P2 ativas foram feitos géis usando 80  $\mu$ g de proteína de cada fração revelando-os com Azul de Coomassie e Nitrato de Prata. Como mostra a **Figura 22a**, o primeiro corante não foi eficiente, o segundo corante permitiu propor que P1 e P2 não continha peptídeos ou as continha em quantidade não detectável nas condições de análises empregadas.

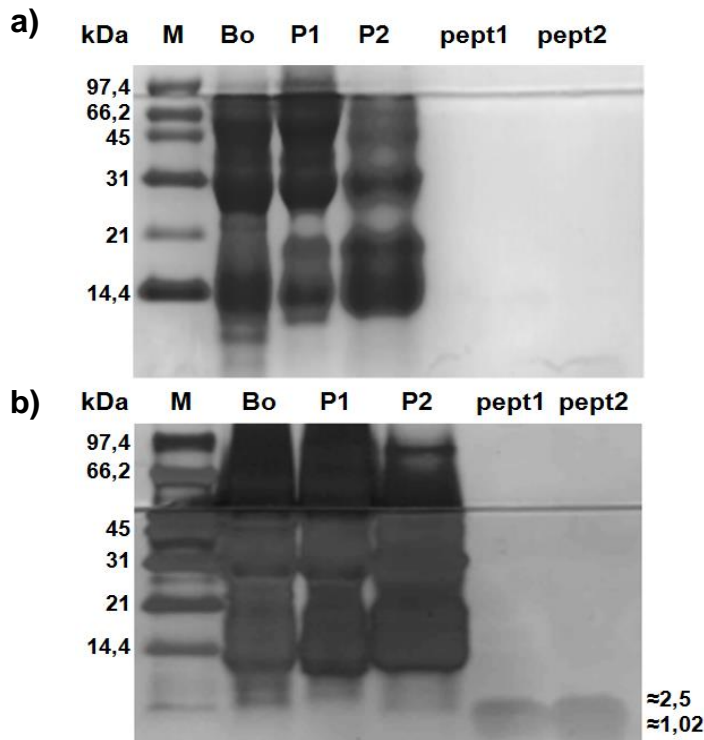


Figura 22. Perfil eletroforético do veneno de *B. oligolepis* e das frações P1 e P2 ativos.

a) Coloração com azul de Coomassie

b) Coloração com Nitrato de Prata

**M:** Marcador de peso molecular; **Bo:** veneno de *B. oligolepis*, frações P1 e P2 ativos, pept1: peptídeo Hb40-61a ( $\approx 2,5$  kDa) (Machado et al, 2007); pept2: acetato de octreotida ( $\approx 1,02$  kDa).

Condições: Gel de empilhamento: 5%; Gel de separação: 10% (1 cm de altura), 16 %/Ureia 6 mol.L<sup>-1</sup>; concentração de proteínas: 80  $\mu$ g.

Condições das eletroforeses: 30 V x 20 min, 120V x 70 min.

A presença de peptídeos no veneno (**Figura 17**) e a ausência desses nas frações (**Figura 22b**) sugere que houve algum tipo de degradação de proteínas na análise do veneno. Isso pode ter ocorrido por fatores enzimáticos, manuseio das amostras ou armazenamento (temperatura, tampão). Novamente, a ocorrência de peptídeos produtos da degradação de proteínas presentes nos venenos durante as análises por SDS-PAGE de venenos e de suas frações têm sido descrita (DE OLIVEIRA JUNIOR et al, 2013).

Diante desses resultados, as proteínas presentes na faixa 14-18 kDa na fração P2, por serem majoritárias em relação à proteína de 33 kDa, foram tripsinizadas e os fragmentos trípticos analisados por espectrometria de massas. Os resultados (**Figura 23**) permitiram o sequenciamento dos peptídeos obtidos, que levou em consideração que leucina e isoleucina apresentam a mesma massa molar. O “protein blast”

(<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com sequências aminoacídicas de proteínas da família Viperidae da sequência EINVWIGLR de E(I/L)NVW(I/L)G(I/L)R (**Figura 23a**), mostrou uma identidade de 100 % com a subunidade alfa de proteínas agonistas ou antagonistas da agregação plaquetária como a Botrocetina-2 alfa de *B. jararaca* [uma proteína heterodimérica formada por duas subunidades ( $\alpha$  and  $\beta$ ) com uma massa molar de  $\approx 25$  kDa e que ademais tem motivos similares aos de lectina tipo C (YAMAMOTO-SUZUKI et al., 2012)] e proteínas como a Rhodocetinina de *Calloselasma rhodostoma*, um inibidor de agregação plaquetária formado por duas subunidades ( $\alpha$  e  $\beta$  de 16 kDa e 15 kDa respectivamente) (WANG et al, 1999).

A sequência DIYVWIGLR de D(I/L)YVW(I/L)G(I/L)R (**Figura 23b**) mostrou 78-100 % de identidade com fragmentos de lectinas de tipo C como a bothroinsularina de *B. insularis* (OLIVEIRA-CARVALHO et al., 2008) e glicoproteínas como a GPIb-BP (KAWASAKI et al., 1996), bothrojaracina (AROCAS et al., 1997), Botrocetin-2 de *B. jararaca* (YAMAMOTO-SUZUKI et al., 2012). Em todas elas, o peptídeo está presente na subunidade  $\alpha$  destas proteínas. Assim também, o peptídeo HLVSIESQEEADFVAEVVSANIKR do H(I/L)VS(I/L)ESQEEADFVAEVVSAN(I/L)KR (**Figura 23c**) mostrou pertencer às proteínas mencionadas neste parágrafo só que com identidade de 74%.

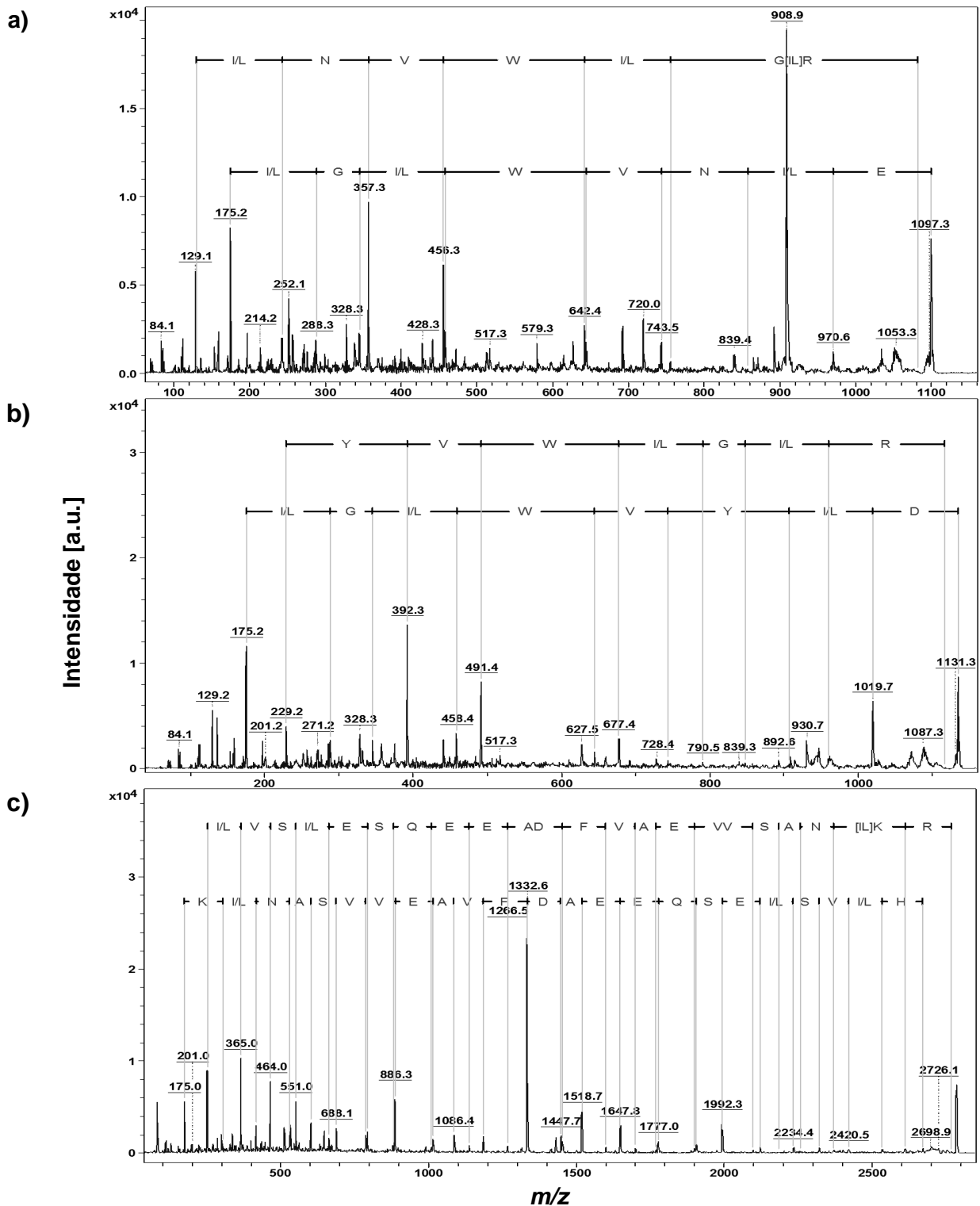


Fig 23. Espectros de massas (MS/MS) de fragmentos trípticos oriundos de proteínas isoladas de 14-18 kDa presentes na fração P2. a) íon de  $(M+H)^+ = 1099,7$ , Sequência parcial: E(I/L)N $\overline{W}$ (I/L)G(I/L)R, b)  $(M+H)^+ = 1134,7$ , Sequência parcial: D(I/L)Y $\overline{VW}$ (I/L)G(I/L)R, c)  $(M+H)^+ = 2785,7$ , Sequência parcial: H(I/L)VS(I/L)ESQEEAD $\overline{FVIAE}$ VVSIAN(I/L)KR.

Portanto, as proteínas identificadas na fração P2 poderiam ser lectinas tipo C (MORITA, 2005) e atuar como agonistas ou antagonistas para o GPIb plaquetário, GPIa/IIa, fatores de coagulação IX e X e trombina (YAMAMOTO-SUZUKI et al., 2012).

#### 4.3.6 Fracionamento da fração P1 de *B. oligolepis* por cromatografia líquida de troca aniônica manual

Sendo os componentes de P1 de  $pI \leq 8$ , foi escolhido este tipo de fracionamento, cujos resultados estão mostrados na **Figura 24**.

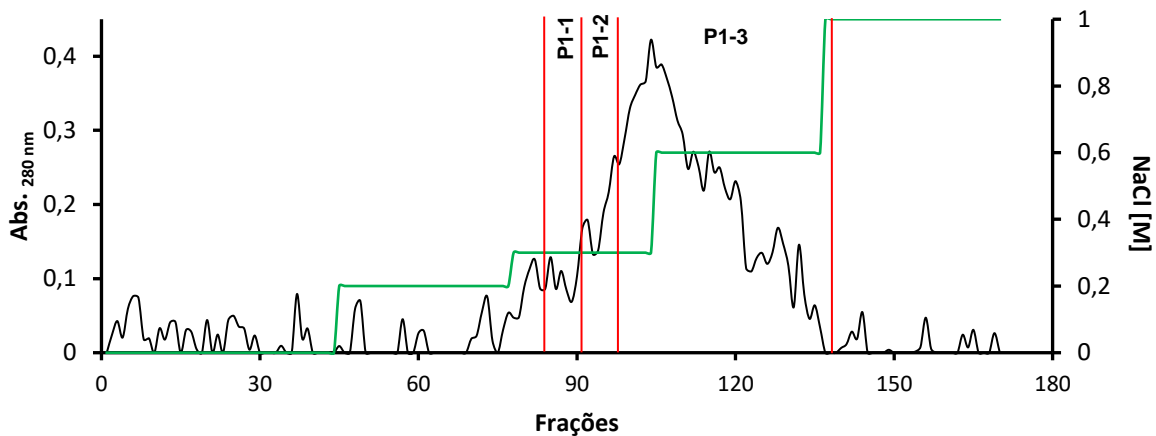


Figura 24. Perfil cromatográfico da fração P1 do veneno de *B. oligolepis* (14,0 mg) em coluna de 19 mm x 195 mm com resina DEAE-celulose montada manualmente e equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8, com eluição com NaCl a 20 °C, fluxo de 20 mL.h<sup>-1</sup> variando de 0,33 mL.min<sup>-1</sup> até 4mL.min<sup>-1</sup>, frações de 0,5 mL/tubo, leitura de absorvância a 280 nm. Os cortes indicam o agrupamento das novas frações.

Infelizmente, o fluxo não foi constante durante a cromatografia, não permitindo uma ótima separação das proteínas. Mesmo assim tentamos coletar as frações e fazer bioensaios.

O teste com *S. aureus* ATCC 25923 foi feito com todas as sub-frações de P1 revelando que as sub-frações 84-120 eram ativas. Os perfis eletroforéticos de algumas são mostrados na **Figura 25**. É possível observar que todas as frações contém duas



proteínas ou dois tipos de proteínas de massas molares próximas a 33 e 59,4 kDa e que as sub-frações 84-90 contém só elas, o que indica que uma ou as duas proteínas poderiam ser o(s) agente(s) antimicrobiano(s) no veneno de *B. oligolepis*. Os resultados descritos anteriormente sugerem que a proteína menor é a que tem atividade.

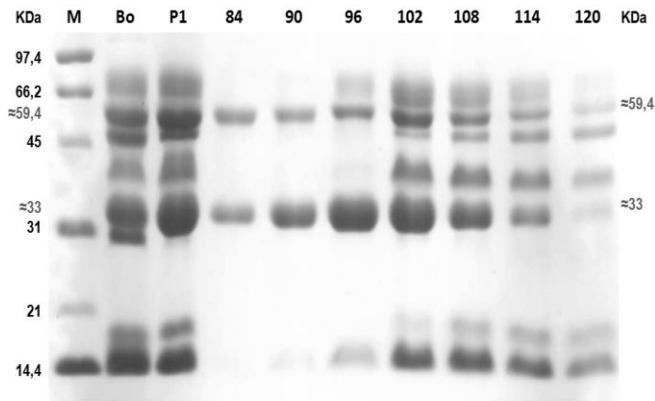


Figura 25. Perfis eletroforéticos do veneno de *B. oligolepis* (**Bo**), P1 (**P1**) e das frações obtidas. **M**: Marcador de peso molecular. Gel de empilhamento: 5 %; Gel de separação: 17 %; Massa de proteínas: 20 µg; 20 µL de cada fração.

Condições da eletroforese: 30 V x 20 min, 120 V x 70 min. Coloração feita com corante Azul de Coomassie.

Assim, as sub-frações foram agrupadas para gerar P1.1, P1.2 e P1.3 descritos na **Tabela 15**. Estas novas frações foram congeladas a -20 °C e só a fração 1.3 (20,5 mL) foi liofilizado a vácuo até um volume final de 5 mL para diálise overnight a 4 °C em tampão bicarbonato de amônia 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8.

Tabela 15. Frações da cromatografia de P1 do veneno de *B. oligolepis*

Fração total	Frações	Volume das frações totais (mL)
P 1.1	84-90	3,5
P 1.2	91-96	3,0
P 1.3	97-137	20,5

As suas concentrações proteicas determinadas pelo Bradford usando a curva padrão com albumina sérica bovina obtida anteriormente, são mostrados na **Tabela 16**.

Tabela 16. Quantificação de proteínas de P1.1, P1.2 e P1.3.

	P1.1	P1.2	P1.3
Volume no tubo (Vol)	3,5	3	20,5
Fator de diluição (FD)	1:10	1:15	1:15
D.O. 595 nm	0,294	0,314	0,429
	0,296	0,317	0,428
Média	0,295	0,315	0,429
[prot ug.mL <sup>-1</sup> ]	19,16	20,92	30,66
[prot ug.mL <sup>-1</sup> ]*FD*Vol (mg.mL <sup>-1</sup> )	0,67	0,94	9,43

Assim, as duas bandas de proteínas, de 59,4 kDa e de 33 kDa, foram também tripsinizadas e analisadas por espectrometria de massas, gerando os espectros da **Figura 26**.

Os resultados permitiram o sequenciamento dos peptídeos obtidos a partir da proteína de 59,4 kDa, que gerou dúvidas sobre a existência de lisina ou glutamina nas sequências. O “protein blast” (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com sequências aminoacídicas de proteínas da família Viperidae do peptídeo AFTAE(K/Q)GR (**Figura 26a**) mostrou identidade de 88% com fragmento de jararagina de *B. jararaca* (PAINE et al., 1992), uma metalo-peptidase do tipo IV que contém a desintegrina na sua porção central e tem uma região rica em cisteínas no seu C-terminal. O peptídeo DQHWR (**Figura 26b**) tem 100% de identidade com a porção da metalo-peptidase do tipo I BOJUMET-I de *B. jararacussu* (KASHIMA et al., 2004), esse peptídeo também se encontra presente na sequência de uma metalo-peptidase similar à crotastatina VAP1 de *B. atrox* (TAVARES et al., 2008).

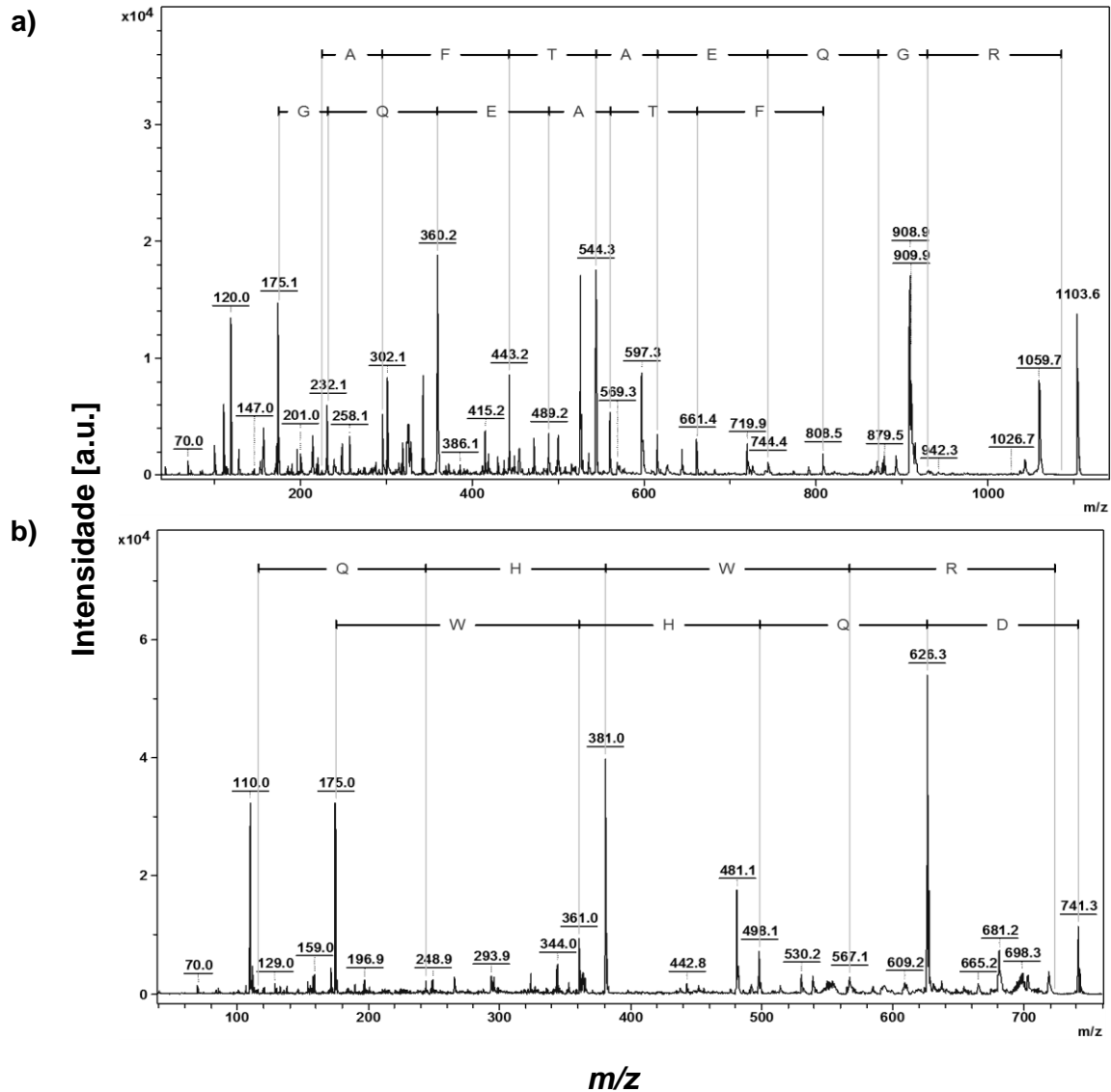


Fig 26. Espectros de massas (MS/MS) de fragmentos trípticos oriundos de proteínas de 59,4 kDa contidas na fração P1.1. a)  $(M+H)^+ = 1103,6$ , Sequência parcial: AFTAE(K/Q)GR, b)  $(M+H)^+ = 741,3$ , Sequência parcial: DQHWR

Os espectros obtidos a partir da banda de proteínas de 33 kDa mostraram que o peptídeo SPN(Q/K)DE(Q/K)TR (**Figura 27a**) tem 100% de identidade com a serino-peptidase HS114 encontrada em exemplares adultos de *B. jararaca* (SAGUCHI et al., 2005), 86 % de identidade com uma serinopeptidase similar à Trombina (BjussuSP-I) de

*B. jararacussu* (SANT' ANA et al., 2008) e 63 % de identidade com a serino-peptidase conhecida como serino-peptidase BthaTL de *B. alternatus* (VITORINO-CARDOSO et al., 2006).

O peptídeo (I/L)MGWG(I/L)(I/L)SPTR (**Figura 27b**) tem 90 % de identidade com a serino-peptidase similar à tripsina de *B. jararacussu* (KASHIMA et al., 2004), 78 % de identidade a uma proteína similar à serino-peptidase de *B. jararaca* (SAGUCHI et al., 2005).

O peptídeo (I/L)MGWGS(I/L)P(I/L) (**Figura 27c**) tem 100% de identidade com a serino-peptidase HS112, HS114 de *B. jararaca* (SAGUCHI et al., 2005) e 78 % com a serino-peptidase BITS01A de *B. insularis* (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO et al., 2006).

Como se mencionou anteriormente, a presença de isoformas são resultado de duplicações e modificações de um mesmo gene. Estas enzimas estão presentes em muitos venenos. Guércio e colaboradores, (2006), trabalhando com *B. atrox*, e Serrano e colaboradores (2005), trabalhando com *Crotalus atrox* e *B. jararaca*, também observaram isoformas de metalo-peptidases, além de PLA<sub>2</sub>, serino-peptidase, lectina tipo C e L-amino oxidase. Uma análise de P1.1 por SDS-PAGE em gradiente não linear de pH também revelou a presença de isoformas da proteína de 33 kDa em estudo.

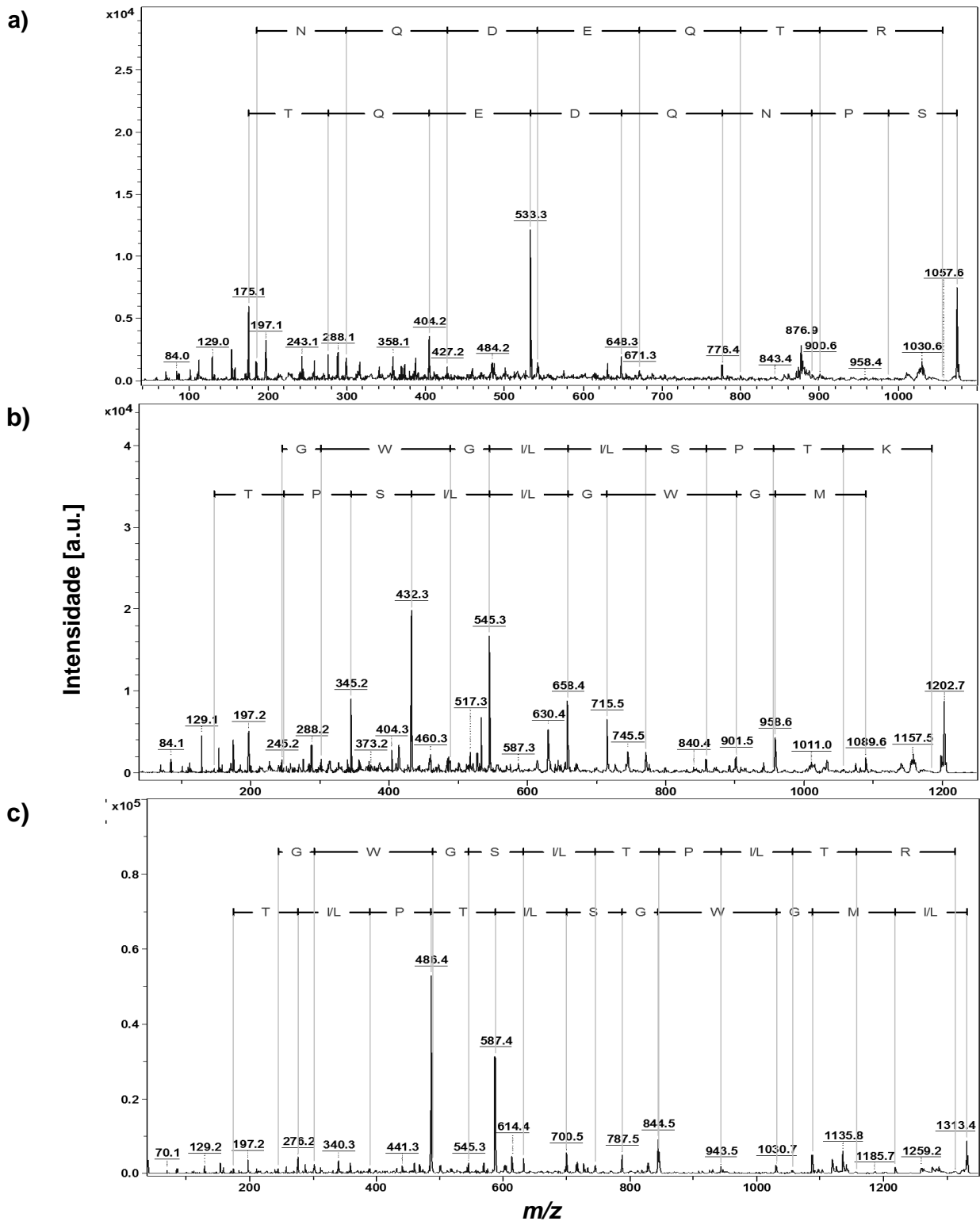


Fig 27. Espectros de massas (MS/MS) de fragmentos trípticos oriundos de proteínas de 33 kDa contidas na fração P1.1. a)  $(M+H)^+ = 1074,6$ , Sequência parcial: SPN(Q/K)DE(Q/K)TR, b)  $(M+H)^+ = 1202,7$ , Sequência parcial: (I/L)MGWG(I/L)(I/L)SPTR, c)  $(M+H)^+ = 1331,6$ , Sequência parcial: (I/L)MGWGS(I/L)P(I/L).

#### 4.3.7 Fracionamento da fração P1.3 do veneno de *B. oligolepis* por cromatografia líquida de troca aniônica manual

Após diálise de P1.3 (sub-frações 97-137 da **tabela 15**) foi feita nova cromatografia, pois como explicado anteriormente, a variação do fluxo do eluente não permitiu fazer uma boa separação das proteínas contidas nesta fração. A quantidade de proteína recuperada e re-cromatografada foi de 3,65 mg de proteína. O perfil cromatográfico obtido é mostrado na **Figura 28**.

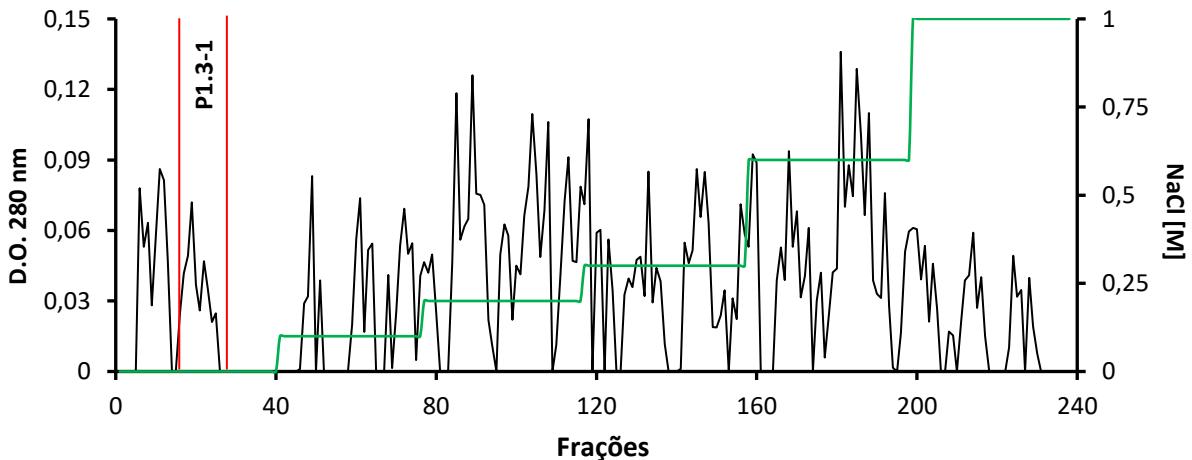


Figura 28. Perfil cromatográfico do fracionamento de P1.3 do veneno de *B. oligolepis* feito numa coluna de 19 mm x 195 mm com resina DEAE-celulose montada manualmente e equilibrada com tampão bicarbonato de amônia 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8, eluição com NaCl a 20 °C, o fluxo de 20 mL.h<sup>-1</sup> (0,33 mL.min<sup>-1</sup>), frações de 0,5 mL/tubo, a leitura de absorvância feita a 280 nm. Os cortes indicam o agrupamento das novas frações.

Neste caso, as proteínas presentes nas sub-frações 5-26 não ficaram retidas na coluna, mostrando que em pH 8 este grupo de proteínas apresenta carga líquida positiva ou não era carregada. O aumento da concentração de NaCl mostrou que outras foram retidas por apresentarem carga líquida negativa no pH de trabalho, mas a baixa D.O. a 280 nm indicou baixa quantidade de proteína e, por isso, dificuldade de visualização dos picos no cromatograma.

Por outro lado, atividade contra *S. aureus* ATCC 25923 foi detectada nas sub-frações 13-26 que não ficaram retidas na coluna. Por isso, elas foram juntadas e liofilizadas, sendo esta nova fração chamada P1.3-1 (**Figura 28**). A concentração proteica de P1.3-1 foi de 0,216 mg e o seu MIC de 0,107  $\mu\text{g prot.mL}^{-1}$ , atividade 7,3 vezes maior em comparação ao veneno bruto de 0,78  $\mu\text{g prot.mL}^{-1}$ .

#### **4.3.8 Repetição do fracionamento do veneno de *B. oligolepis* por cromatografia líquida de troca aniônica**

Como resultado da segunda tentativa de fracionamento do veneno de *B. oligolepis*, foram obtidas P1 (que inibiu o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 e de *E. coli* ATCC 25922) e P2 (que só inibiu a *S. aureus* ATCC 25923). A **Figura 21** mostrou que essas frações continham proteínas de 33, 14 e 17 kDa que poderiam ter atividade contra *S. aureus*. P1 continha proteínas de maior massa molar em comparação com P2, sugerindo que a proteína inibidora do crescimento de *E. coli* tem massa molar maior do que 33 kDa. Os MICs frente a *S. aureus* foram de 0,39  $\mu\text{g prot.mL}^{-1}$  para P1, 12,5  $\mu\text{g prot.mL}^{-1}$  para P2 e do veneno bruto foi 0,78  $\mu\text{g prot.mL}^{-1}$ , mostrando que P1 tinha maior efeito inibidor do crescimento bacteriano.

No fracionamento posterior de P1 por cromatografia de troca catiônica o fluxo não foi constante. As frações obtidas de P1 continham proteínas de massas molares próximas de 33 e de 59,4 kDa, que mostraram ser uma serino-peptidase e uma metalopeptidase, respectivamente (MACKESSY, 2010) com ação antimicrobiana. Resultado posterior indicou que a proteína menor é a que poderia ter atividade contra *S. aureus* e a maior ter atividade contra *E. coli* e, por isso, foram geradas as frações P1.1, P1.2 e P1.3 que foram ativos, sendo o último o menos purificado.

A fração P2 mostrou conter proteínas de massa molar entre 14 e 17 kDa, que poderiam ser fosfolipases (MACKESSY, 2010), proteínas importantes sob o ponto de vista clínico por sua atividade antimicrobiana e que poderiam ser desnaturadas, tripsinizadas e sequenciadas por MALDI-TOF para encontrar peptídeos com tal atividade que poderiam ser sintetizados, modificados e testados no nosso laboratório como já havíamos feito com a PLA<sub>2</sub> de *B. pictus*. Páramo e colaboradores(1998) descreveram que um fragmento da proteína PLA<sub>2</sub> do veneno de *Bothrops asper* contém a porção responsável pela ação inibitória do crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas (PÁRAMO et al., 1998b). Murillo e colaboradores (2007) também descreveram peptídeos derivados da PLA<sub>2</sub> de *B. asper* ativos contra *Candida albicans* (MURILLO et al., 2007).

Devido aos problemas de purificação feitos manualmente e pela presença de isoformas nas proteínas purificadas, resolveu-se realizar a purificação das proteínas usando o sistema automático AKTA FPLC (Amersham Biociences) P-920. Os resultados obtidos são mostrados na **Figura 29**. As frações coletadas foram congeladas a -20 °C.



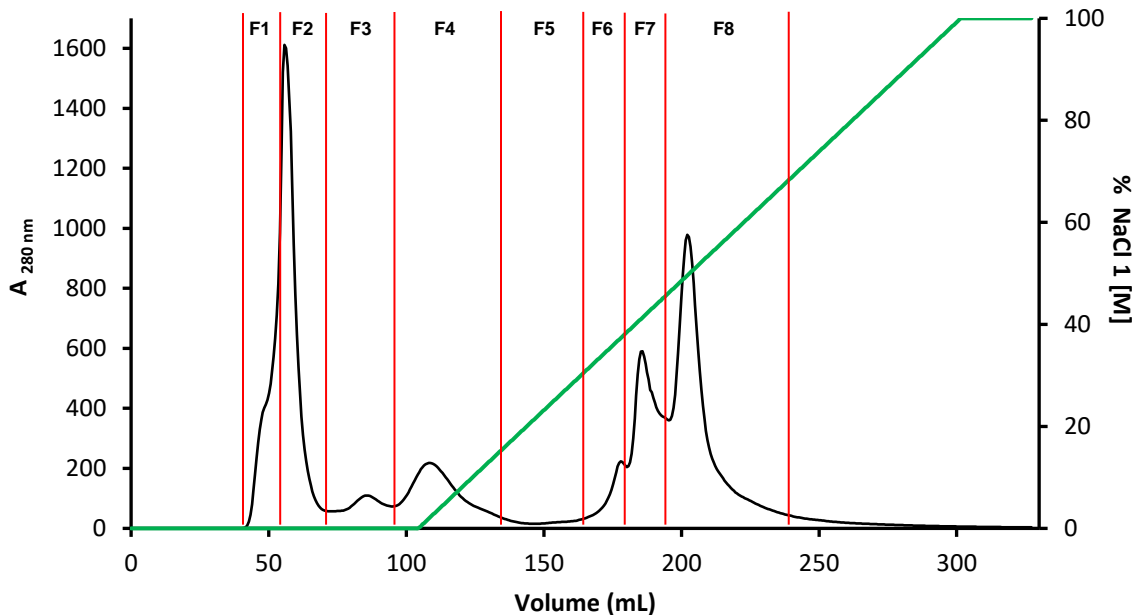


Figura 29. Perfil cromatográfico do fracionamento do veneno de *B. oligolepis* (80 mg) realizado por FPLC em coluna DEAE-celulose 16 x 300 mm equilibrada com tampão Bicarbonato de Amônia 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8, com eluição inicial com este tampão e depois com um aumento linear da concentração de gradiente de NaCl (0–1,0 M) no mesmo tampão em pH constante a 20 °C com um fluxo de 19,8 mL.h<sup>-1</sup>. Frações: 2 mL por tubo. A leitura de absorbância: 280 nm.

Como se observa, as proteínas presentes nas frações 20-50 (F1) não foram retidas na coluna reproduzindo os resultados do fracionamento anterior. As frações 28-31 (F2), 49-65 (F4), 88-97 (F6), 93-98 (F7) e 102-105 (F8) se mostraram ativas contra *S. aureus* ATCC 25923. Assim, comparando a **Figura 29** e os resultados do teste antimicrobiano, foi feito o perfil eletroforético destas frações ativas e as frações próximas a elas (Ver **Figura 30**).

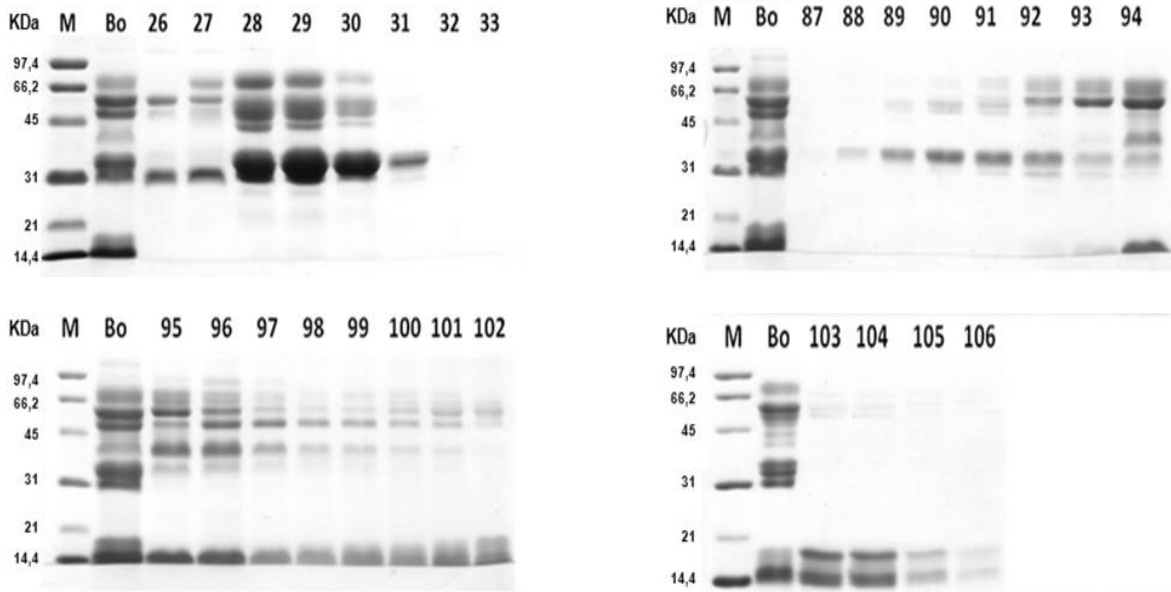


Figura 30. Perfil eletroforético do veneno de *B. oligolepis*, das frações com atividade antimicrobiana e frações próximas a elas. M: Marcador de peso molecular; Bo: veneno de *B. oligolepis*. Gel de empilhamento: 5 %; Gel de separação: 17 %; Concentração do veneno: 20 µg; e 20 µL de cada fração. Condições das eletroforeses: 30 V x 20 min, 120 V x 70 min. Coloração feita com corante Azul de Coomassie.

Pela similaridade de massas molares das proteínas que compõem cada sub-fração, elas foram juntadas segundo a **Tabela 17** para fornecer F1-F9. As suas concentrações proteicas e do veneno bruto de *B. oligolepis* foram determinadas pelo método de Bradford usando a curva padrão com albumina sérica bovina. Os resultados estão mostrados na **Tabela 18**.

Tabela 17. Frações obtidas do veneno de *B. oligolepis*

Fração total	Frações
F1	21-27
F2	28-35
F3	36-48
F4	49-65
F5	66-81
F6	82-92
F7	93-98
F8	99-106
F9	107-120

Tabela 18. Quantificação de proteínas das frações F1-F9.

	B0	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
Volume no tubo (mL)	5	14	16	26	34	32	22	12	16	28
Fator de diluição (FD)	560	35	50	1	1	1	20	50	50	10
	0,315	0,26	0,195	0,193	0,173	0,174	0,159	0,361	0,22	0,169
Abs 595 nm	0,291	0,251	0,178	0,187	0,172	0,207	0,17	0,359	0,199	0,179
	0,294	0,262	0,191	0,191	0,175	0,192	0,167	0,386	0,195	0,165
Média	0,3	0,258	0,188	0,190	0,173	0,191	0,165	0,369	0,205	0,171
ug prot.mL <sup>-1</sup>	22,47	19,05	13,44	13,62	12,25	13,68	11,61	28,01	14,78	12,06
ug prot mL <sup>-1</sup> * FD	12581,94	666,88	671,77	13,62	12,25	13,68	232,15	1400,27	738,98	120,65
Prot total (ug)	62909,68	9336,34	<sup>10748,39</sup>	354,22	416,59	437,68	5107,31	16803,23	11823,7	3378,06
Prot total (mq)	62,91	9,34	10,75	0,35	0,42	0,44	5,11	16,80	11,82	3,38

Um volume de 2 mL das frações de F2, F6 (rica na proteína de  $\approx 33$  kDa) e F7 foi liofilizado até um volume de 0,5 mL, que foi cromatografado como mostra a **Figura 31**.

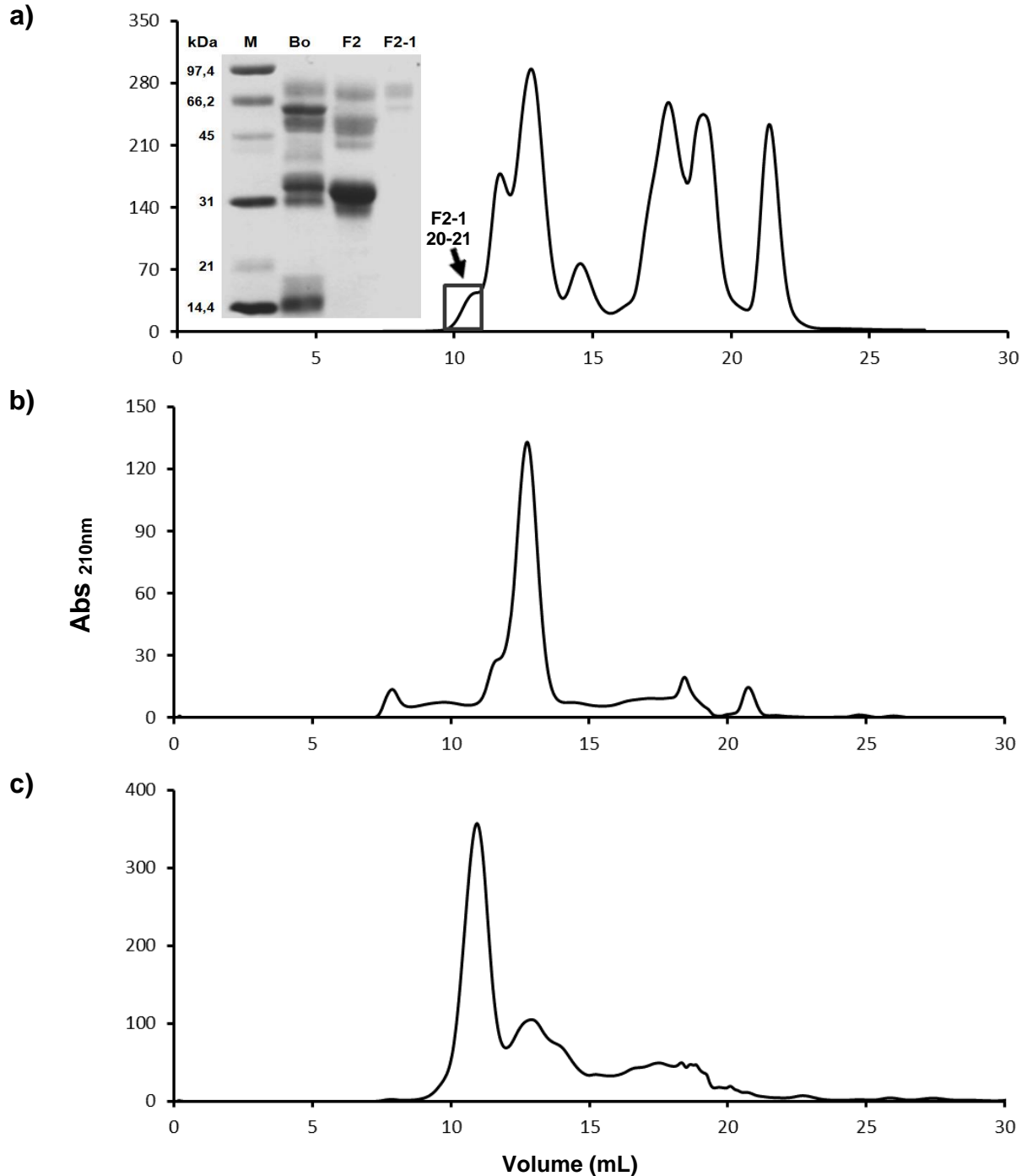


Figura 31. Perfis de FPLC obtidos nos fracionamentos de (a) F2, (b) F6 e (c) F7 usando coluna Superose 12 TM 10/300 equilibrada com tampão Tris-HCl  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7,4, temperatura de  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , fluxo de  $18 \text{ mL.h}^{-1}$  e detecção em  $280 \text{ nm}$ . Volumes coletados:  $0,5 \text{ mL/tubo}$ .

Só as frações 20-22 de F2 mostraram ter atividade de inibir o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923, sendo que 20 e 21 se mostraram mais homogêneas como mostrada na **Figura 31** e, por isso, foram juntadas para dar F2-1 com MIC de 2 µg de proteína.

Uma vez que as sub-frações F6 e F7 não se mostraram ativas, não foi possível explicar a perda dessa propriedade que existia em F6 e F7.

F2-1 e as sub-frações próximas dela foram submetidas à SDS-PAGE em condição redutora desnaturante (**Figura 32**).

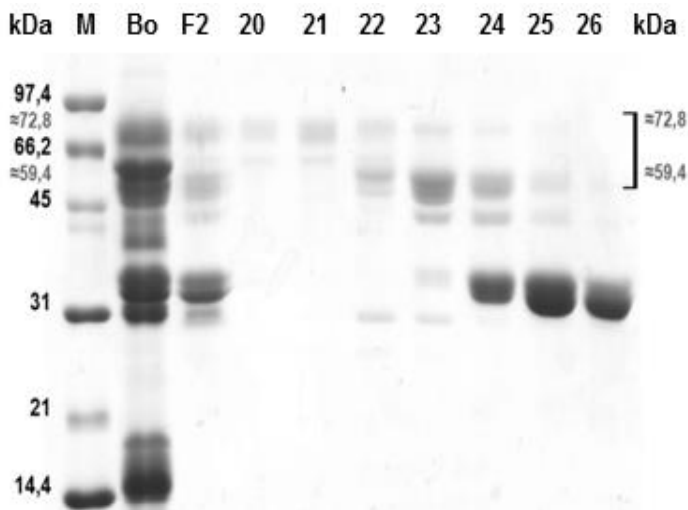


Figura 32. Perfis eletroforéticos F2, do veneno de *B. oligolepis* e de subfrações 20 a 26. M: Marcador de massa molar; Bo: veneno de *Bothriopsis oligolepis*. Gel de empilhamento: 5 %; Gel de separação: 17 %; Concentração do veneno: 20µg; e 20 µL de cada fração. Condições da eletroforese: 30 V x 20 min, 120 V x 70 min. Coloração feita com corante Azul de Coomassie.

Novamente, foi observado que na F2 e nas sub-frações ativas existiam proteínas de massas molares de 59,4-72,8 kDa e de massas molares próximas de 33 kDa. A maior (de 72,8 kDa) pode ser uma metalo-peptidase, mas ensaios enzimáticos teriam que ser feitos para confirmar a suspeita, mesmo assim, a sua banda no gel foi recortada, a(s) proteína(s) extraída(s), tripsinizada(s) e analisada(s) por espectrometria de massas, que forneceu os espectros da **Figura 33**.

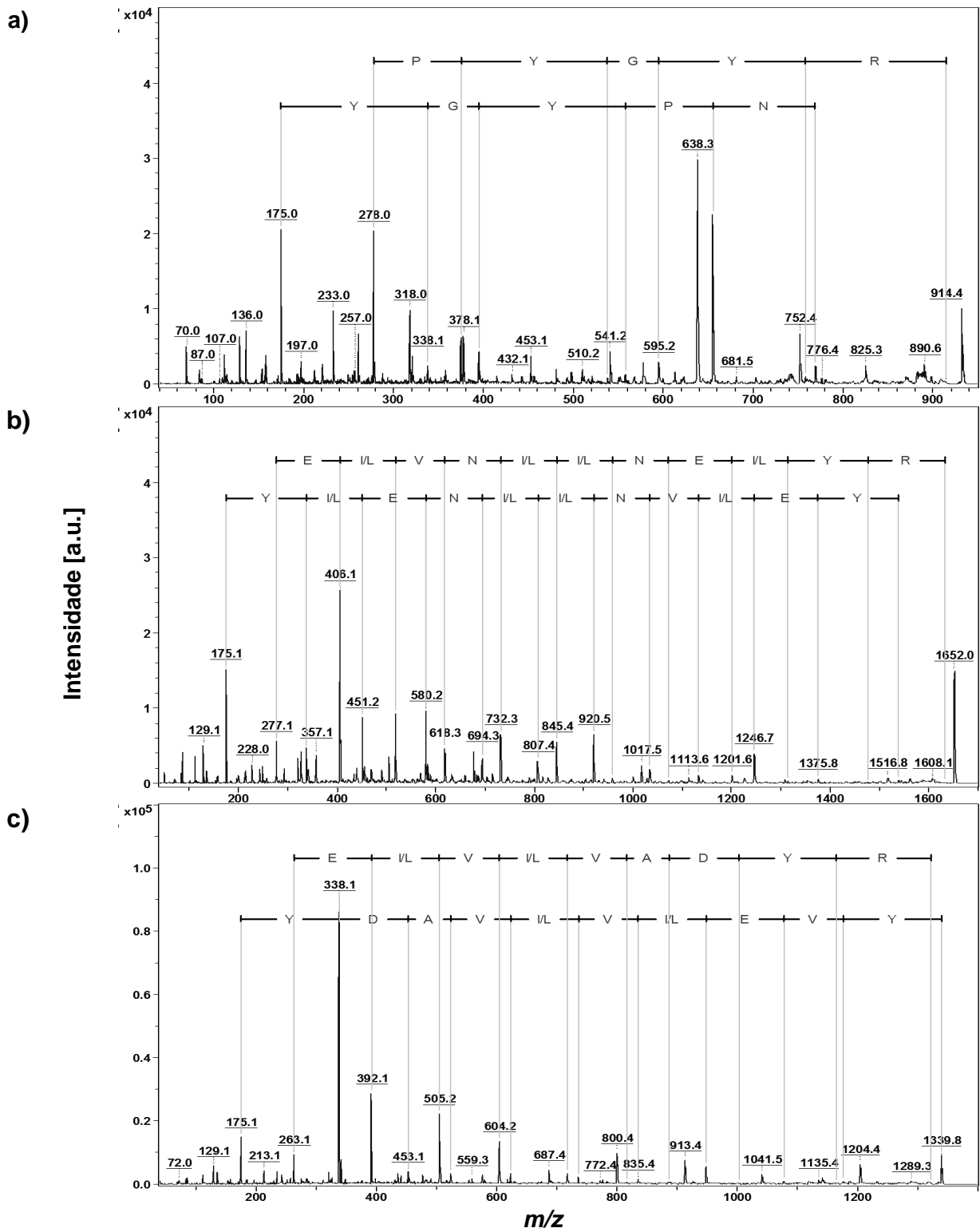


Figura 33. Espectros de massas (MS/MS) de fragmentos trípticos oriundos de proteínas de 72,8 kDa contidos na fração F2-I. a)  $(M+H)^+ = 932,5$ , Sequência parcial: YNPYGYR,  $(M+H)^+ = 1652$ , Sequência Parcial: (I/L)YE(I/L)VN(I/L)(I/L)NE(I/L)YR,  $(M+H)^+ = 1339,8$ , Sequência parcial: YVE(I/L)V(I/L)VADYR.

A sequência YNPYGYR (**Figura 33a**) mostrou 83 % de identidade com a metalopeptidase P-II Bilitoxin-1 do veneno de *Agkistrodon bilineatus* [proteína de massa molar 80 kDa em condições não redutoras e 48 kDa em condições redutoras (NIKAI et al., 2000)] e com a metalopeptidase P-II [sequenciada de diferentes transcritos do veneno de *B. neuwiedi* (MOURA-DA-SILVA et al., 2011)].

A sequência IYEIVNILNEIYR do peptídeo (I/L)YE(I/L)VN(I/L)(I/L)NE(I/L)YR (**Figura 33b**) mostrou 100 % de identidade com a sequência parcial de uma metalopeptidase de *Echis coloratus*, também da família Viperidae (CASEWELL et al., 2011). Esta sequência tem 92 % de identidade com a sequência parcial da metalopeptidase P-III dependente de zinco chamada HF3 de *B. jararaca* clonada por Silva e col (2004).

A sequência YVELVIVADYR de YVE(I/L)V(I/L)VADYR (**Figura 33c**) mostrou 91 % de identidade com metalopeptidase tipo P-III de *B. neuwiedi* caracterizada por Moura-da-Silva et al., 2011).

Em conjunto, todos os resultados acima indicaram que metalopeptidases podem ser as proteínas mais abundantes no veneno estudado. Vindo de um exemplar adulto, esse resultado foi relacionado com o trabalho de Guércio e colaboradores (2006) com venenos de serpentes da espécie *B. atrox*, os quais descreveram que para exemplares adultos as metalopeptidases estavam presentes em grande quantidade e como isoformas de diferentes graus de glicosilação.

Assim, nesta terceira tentativa de purificação (repetição da 2ª tentativa), foram obtidas as frações F2, F4, F6, F7 e F8 ativas contra *S. aureus* e mostraram ter proteínas de 14, 17, 33, 59,4 kDa que poderiam ser lectinas, serino-peptidase e um tipo de metalopeptidase segundo Mackessy (2010). A filtração em gel das frações F4 e F8

não foram feitas porque os compostos majoritários são proteínas com massa molar de 14-17 e 33 kDa, sendo a última já identificada e as primeiras possivelmente separáveis por RP-HPLC. A filtração em gel de F2 forneceu as frações 21, 22, 23 ativas contra *S. aureus* ATCC 25923, tendo a SDS-PAGE (**Figura 32**) mostrado nelas proteínas de 59,4 e 72,8 kDa que confirmaram metalo-peptidases.

#### 4.3.9 Fracionamento da fração F2 por cromatografia líquida de troca catiônica

Foi feito com a finalidade de otimizar a separação entre os componentes majoritários da fração F2 já identificados. As frações coletadas foram congeladas a -20 °C. Infelizmente, os resultados não foram melhores do que os obtidos anteriormente e, por isso, não foram descritos.

#### 4.3.10 Fracionamento de F4 por RP-HPLC

De acordo com a **Figura 34**, esta fração apresentou componentes de baixa massa molar 25-30 kDa que poderiam suportar as condições empregadas para RP-HPLC, pois serino-peptidases de 29 e 39 kDa de venenos de serpentes já foram purificadas usando RP-HPLC como último passo de purificação (VALERIANO-ZAPANA et al., 2012; ZAQUEO et al., 2014). O fracionamento do F4 em coluna C<sub>4</sub> gerou 3 frações: F4-I, F4-II e F4-III (**Figura 34**). O analito F4-II de  $\approx$  27 kDa foi o único ativo contra o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 com um MIC de 80  $\mu$ g de prot.mL<sup>-1</sup> de proteína.



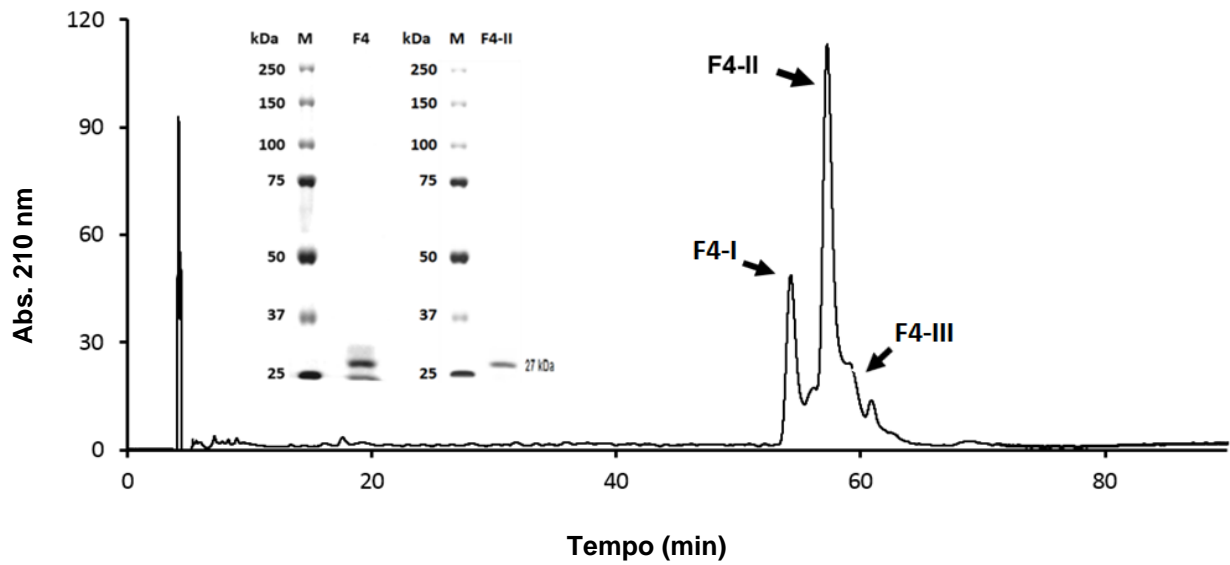


Figura 34. RP-HPLC de F4 do veneno de *B. oligolepis* e SDS-PAGE dela e da proteína purificada, sendo o gel corado com Azul de Coomassie (inset). Condições de RP-HPLC: 0,1% TFA/água como solvente A e 25 % ACN/0,09% TFA/água como solvente B, fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura ambiente, gradiente linear de 20 a 70 % em 95 min do solvente B, detecção em 210 nm.

A única banda do gel corresponde a proteína(s) de  $\approx 27$  kDa da fração F4 foi extraída, tripsinizada e analisada por espectrometria de massas fornecendo os espectros da **Figura 35**. Como nos demais sequenciamentos, foi considerado que leucina e isoleucina apresentam a mesma massa molar. O alinhamento dos quatro peptídeos obtidos com seqüências aminoacídicas de proteínas da família Viperidae no protein-BLAST, mostrou que eles aparecem em seqüências aminoacídicas da família das serino-peptidases.

De fato, a seqüência YPE(I/L)PAEYR (**Figura 35a**) tem uma identidade do 100 % com uma das isoformas de serino-peptidase, como a HS114 isolado do *B. jararaca* (SAGUCHI et al., 2005).

A seqüência SEH(I/L)AP(I/L)S(I/L)PSSSPSVGSV (**Figura 35b**) tem 89 % de identidade, tanto com a serino-peptidase HS114 assim como com muitas outras várias isoformas de serino-peptidases.

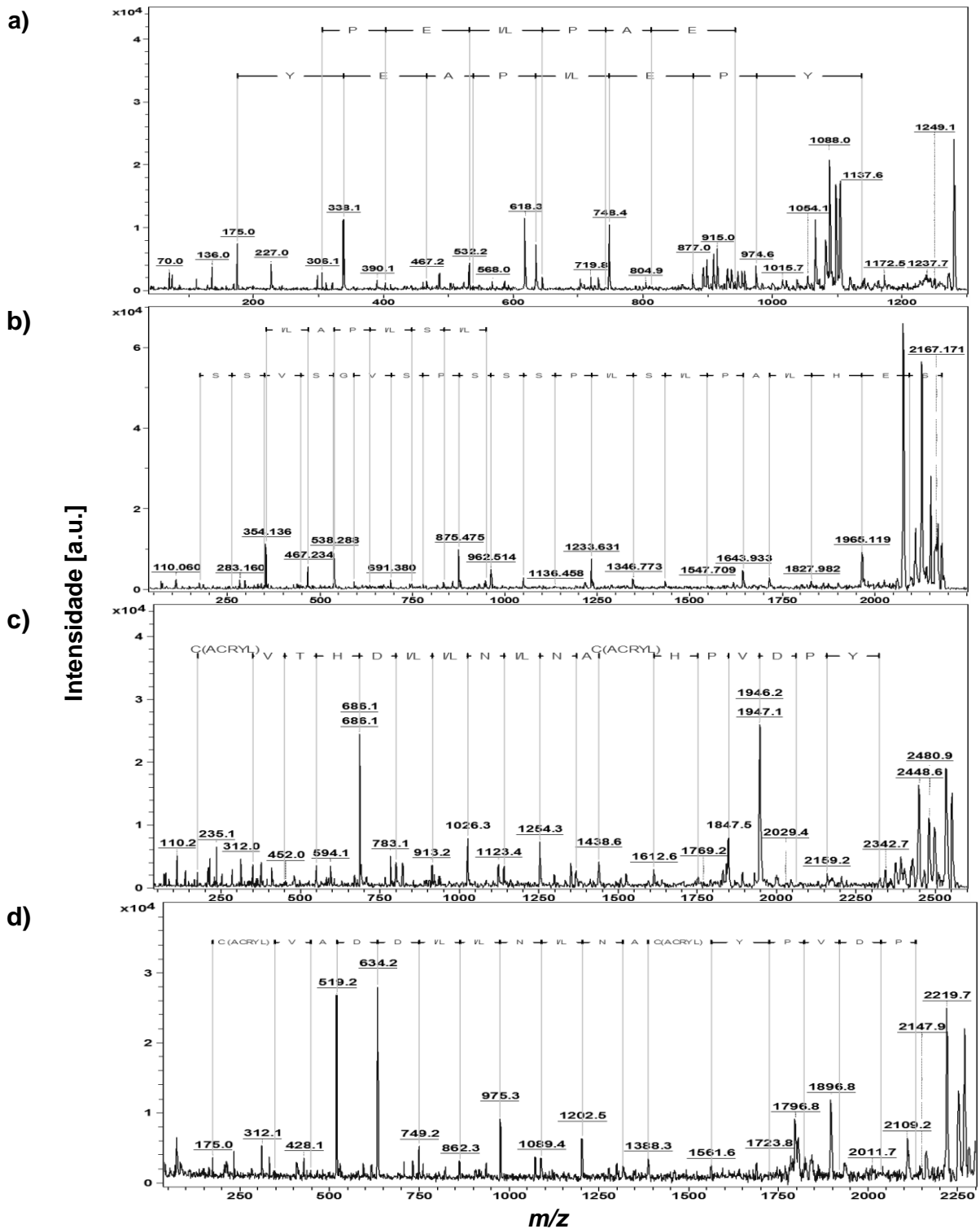


Fig 35. Espectros de massas (MS/MS) de fragmentos trípticos oriundos de proteínas de 27 kDa contidos na fração F4-II. a)  $(M+H)^+ = 1279,548$  Sequência parcial: YPE(I/L)PAEYR, b)  $(M+H)^+ = 2180,9$  Sequência Parcial: SEH(I/L)AP(I/L)S(I/L)PSSSPSVGSV, c)  $(M+H)^+ = 2552,045$  Sequência parcial: YPDVPHCAN(I/L)N(I/L)(I/L)DHTVC, d)  $(M+H)^+ = 2323,179$  Sequência parcial: PDVPYCA(I/L)(I/L)N(I/L)(I/L)DDAVC

A sequência YPDVPHCAN(I/L)N(I/L)(I/L)DHTVC (**Figura 35c**) tem 89 % de identidade com a serino-peptidase de *Agkistrodon contortrix contortrix* (ROKYTA et al, 2015) e 83 % com a serino-peptidase de *Protobothrops flavoviridis* (AIRD et al., 2013).

A sequência PDVPYCA(I/L)(I/L)N(I/L)(I/L)DDAVC (**Figura 35d**) tem identidade de 88 % também com outras isoformas de serino-peptidases como de *Crotalus horridus* (ROKYTA et al, 2015) e *Crotalus adamanteus* (ROKYTA et al., 2012).

Resultados anteriores mostrados nas **Figuras 11 e 14** também mostraram banda de proteína com a massa molar de  $\approx 33$  kDa próxima à da proteína F4-II de  $\approx 27$  kDa e o sequenciamento de aminoácidos por MALDI-TOF também mostrou que ela pertence à mesma família de proteases. Até onde sabemos, esta é a primeira observação de uma serino-peptidase de veneno de serpente com atividade antimicrobiana. Tsuji e colaboradores (1998) observaram atividade antimicrobiana de uma serino-peptidase de *Sarcophaga peregrine*, um inseto, e propuseram que esta se deve à ligação seletiva da proteína aos fosfolipídeos de carga negativa (mas não aos fosfolipídeos com carga neutra), da membrana bacteriana e não à atividade proteolítica.

#### 4.3.11 Tentativa de fracionamento de F6 por filtração em gel

A **Figura 36** mostra o perfil cromatográfico obtido na tentativa do fracionamento do F6 por cromatografia de exclusão molecular. As frações obtidas não mostraram grupos proteicos com comportamentos cromatográficos diferenciados para a fácil separação entre eles (**Figura 37**). Portanto, outras técnicas de separação precisarão ser usadas para tal, o que evidencia a grande complexidade dos componentes do

veneno já ilustrada pela detecção de diferentes tipos de proteínas e suas isoformas, especialmente metalo-peptidases e serino-peptidases.

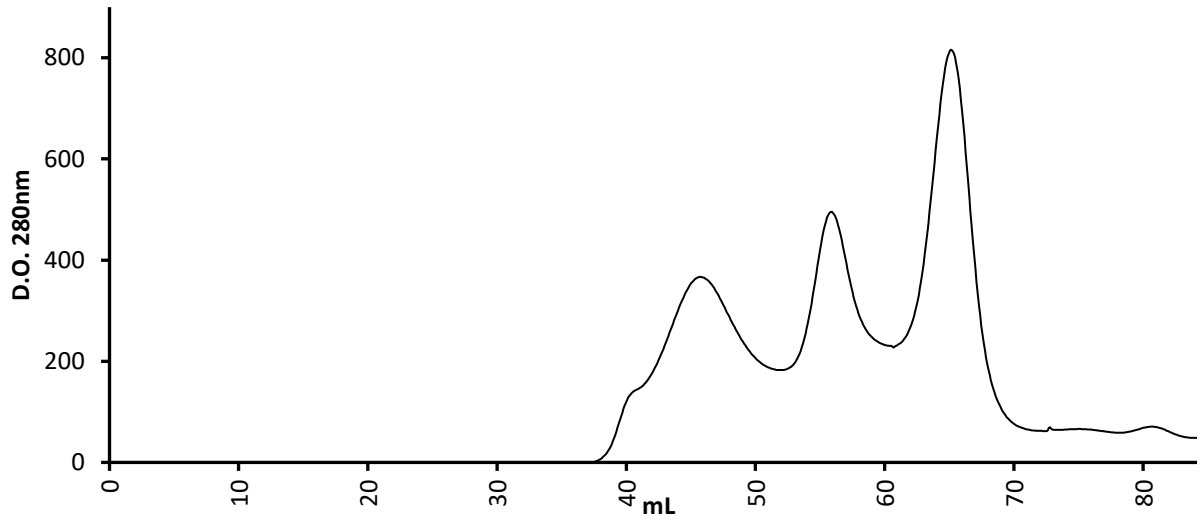


Fig 36. Perfil cromatográfico da fração F6 ( $\approx 2$  mg) do veneno de *B. oligolepis* obtido numa coluna de Superose 12 TM 10/300 equilibrada com tampão bicarbonato de amônio  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 8 a  $20^\circ \text{C}$ , fluxo de  $500 \mu\text{L.h}^{-1}$ , frações de  $0,75 \text{ mL/tubo}$ , leitura de absorbância a  $220 \text{ nm}$ .

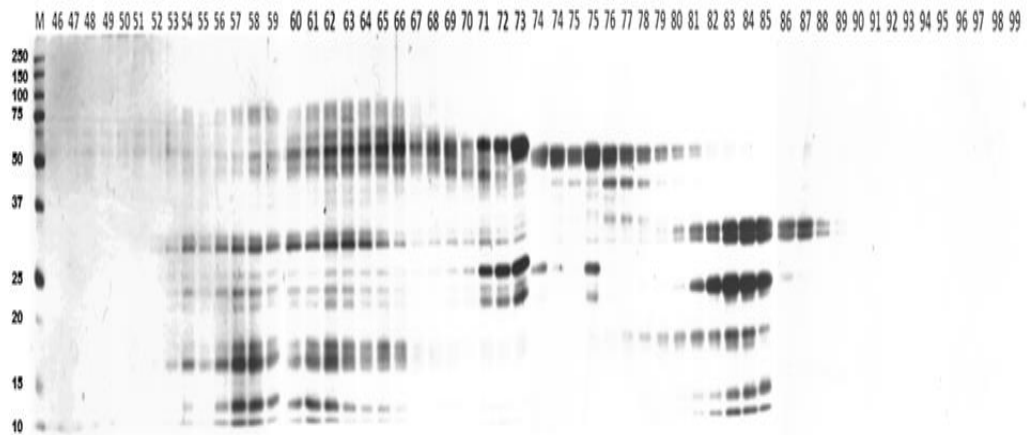


Figura 37. Perfil eletroforético das frações de P6 do veneno de *B. oligolepis*. **M**: Marcador de massa molar. **46-98**: frações obtidas. Gel de empilhamento: 5%; Gel de separação: 15%;  $20 \mu\text{L}$  de cada fração. Condições da eletroforese:  $55 \text{ mA} \times 40 \text{ min}$  e  $65 \text{ mA} \times 40 \text{ min}$ . Coloração com Nitrato de Prata.

#### 4.3.12 Tentativa de fracionamento de F8 por RP-HPLC

O gel do SDS-PAGE corado da fração F8 (**Figura 30 e Tabela 17**) mostrou que os seus componentes majoritários eram proteínas de baixa massa molar de 14-18 kDa, que poderiam suportar as condições empregadas em RP-HPLC. O fracionamento do F8 por esse tipo de cromatografia gerou 10 sub-frações. O gel de SDS-PAGE delas corado com nitrato de prata (inset) é mostrado na **Figura 38**. Foi observado que cada uma delas tinha vários componentes proteicos de massas molares entre 14 e 70 kDa.

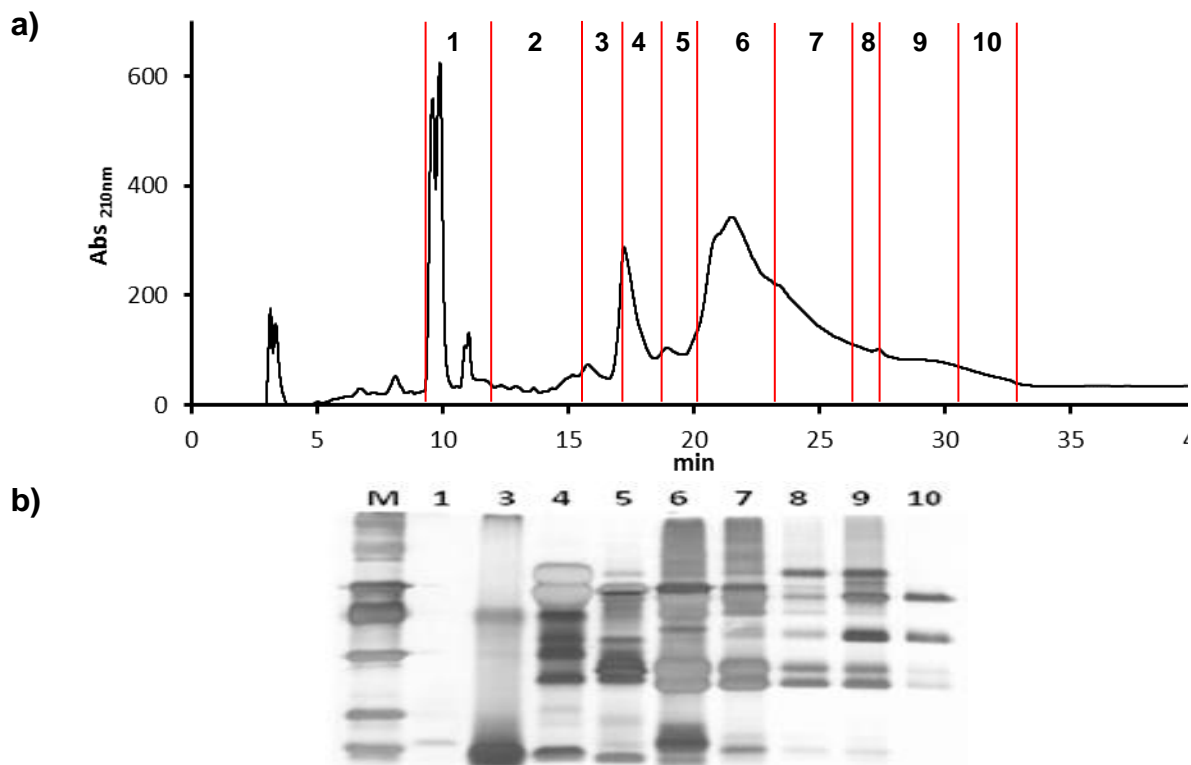


Fig 38. Perfil de RP-HPLC semipreparativa de F8 (200  $\mu$ L) do veneno de *B. oligolepis* (a) e SDS-PAGE das suas frações, corado com  $\text{AgNO}_3$  (b). Condições de RP-HPLC: 0,1% TFA/água como solvente A e 90% ACN/0,09% TFA/água como solvente B, fluxo de 3 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura ambiente, gradiente linear de 5 a 95 % em 30 min do solvente B, detecção em 210 nm. M: marcador de massa molar proteica.

Sendo, portanto, frações complexas, foi feita nova tentativa usando cromatografia de filtração em gel. A **Figura 39** mostra o perfil cromatográfico obtido.

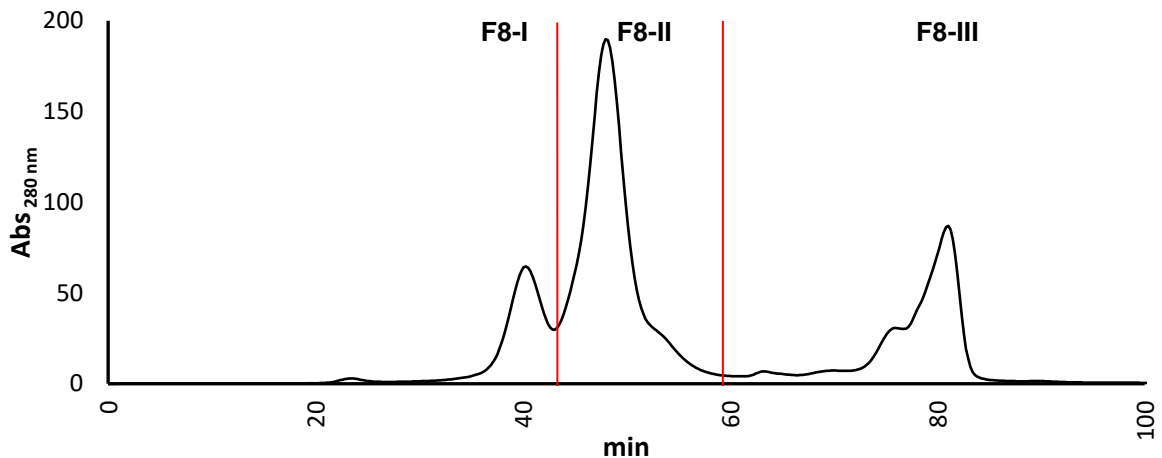


Fig 39. Perfil cromatográfico da fração F8 ( $\approx 1,5\text{mg}$ ) do veneno de *B. oligolepis* obtido numa coluna de Superose 12<sup>TM</sup> 10/300 equilibrada com tampão bicarbonato de amônia  $0,05\text{ mol.L}^{-1}$ , pH 8,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , fluxo de  $250\text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$ , frações foram de  $0,25\text{ mL/tubo}$ , leitura de absorbância a  $280\text{ nm}$ . Os cortes indicam o agrupamento das sub-frações.

As frações obtidas foram divididas em três grupos (1-3), dependendo do perfil eletroforético observado na **Figura 40**. O primeiro grupo tem proteínas de  $38\text{-}70\text{ kDa}$  e o segundo de  $14\text{-}18\text{ kDa}$ . Segundo as massas molares, as proteínas do primeiro grupo poderiam estar relacionadas com a família das serino-peptidases e metalo-peptidases, enquanto as proteínas do segundo grupo poderiam estar relacionadas a diferentes tipos de lectina tipo C. O terceiro grupo F8-III, concentrado por liofilização, contém material proteico de aproximadamente  $11\text{ kDa}$  (Ver **Figura 41**).

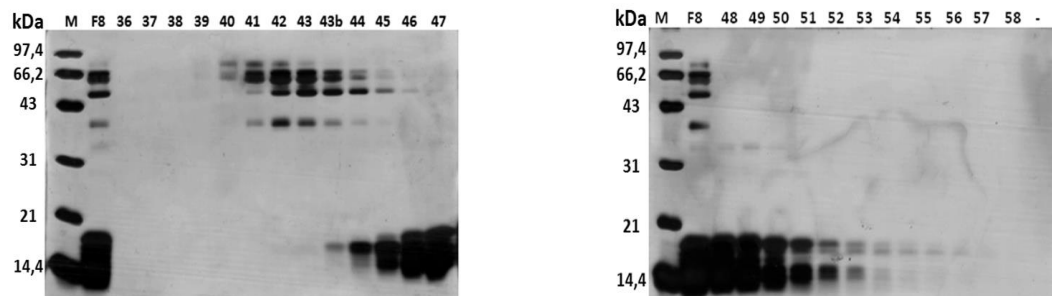


Fig 40. Perfis eletroforéticos das frações de F8 do veneno de *B. oligolepis*. M: Marcador de massa molar. Gel de empilhamento:  $5\%$ ; Gel de separação:  $15\%$ ;  $20\text{ }\mu\text{L}$  de cada fração. Condições da eletroforese:  $40\text{ V} \times 90\text{ min}$ ,  $120\text{ V} \times 90\text{ min}$ . Coloração com  $\text{AgNO}_3$ .

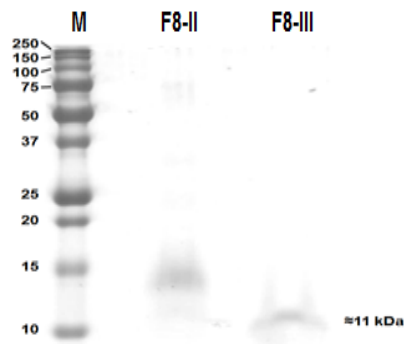


Fig 41. Perfil eletroforético da proteína F8-II e do F8-III do veneno de *B. oligolepis*. **M**: Marcador de massa molar. Condições: Gel de empilhamento: 5%; Gel de separação: 15%. Condições da eletroforese: 25 mA x 90 min. Coloração com azul de Coomassie.

A sua tripsinização e sequenciamento dos peptídeos obtidos serão feitos para confirmar esta hipótese.

A **Figura 42** mostra as cinéticas de crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 obtidas no teste de inibição de seu crescimento por F8, F8-I, F8-II, F8-III. Só F8-II (14-18 kDa) afetou totalmente no crescimento microbiano mostrando um MIC de 100  $\mu\text{g}$  de  $\text{prot.mL}^{-1}$ .

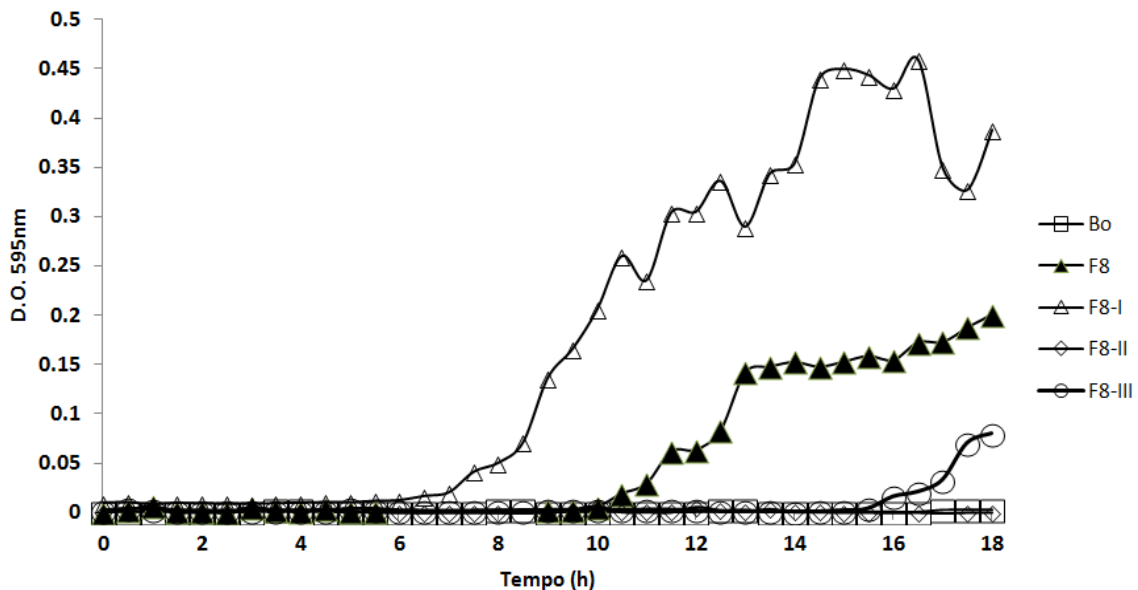


Fig 42. Resultados do efeito do veneno, F8 e das frações F8-I, F8-II e F8-III na cinética de crescimento de *S. aureus* ATCC 25923. Bo: Veneno bruto de *B. oligolepis* (10  $\mu\text{g}$  de proteína), F8: fração F8 (45  $\mu\text{g}$  de proteína); F8-I, F8-II e F8-III: 10  $\mu\text{g}$  de proteína.

As bandas referentes às proteínas de 14-18 kDa da fração F8-II foram tripsinizadas e os peptídeos gerados foram sequenciados por espectrometria de massas, fornecendo os espectros da **Figura 43**. Dois deles foram alinhados com sequências aminoacídicas de proteínas do veneno de serpentes da família Viperidae mostraram que os peptídeos pertencem à família das lectinas tipo C. De fato, resultados anteriores deste trabalho mostrados nas **Figuras 21 e 23** e obtidos a partir de proteínas da mesma faixa de massa molar (14-18 kDa) serviram de suporte para esta conclusão. A sequência STDN(Q/K)W(I/L)SR (**Figura 43a**) mostrou ter 100 % de identidade com várias lectinas tipo C e suas isoformas, como, por exemplo, lectinas Jerdunoxin purificadas do veneno de *Protobothrops flavoviridis*, *Protobothrops jerdonii* (CHEN et al., 2011) e *Sistrurus miliarius barbouri* (ROKYTA et al, 2015). A sequência WSDYSSVSYEN(I/L)V (**Figura 43b**) tinha 100 % de identidade com a sequência da sub-unidade alfa de uma lectina tipo C isolada do veneno de *B. jararaca* chamado de GPIb-BP com potencial de agregação de plaquetas (KAWASAKI, 1996). Ademais, esse peptídeo apresenta também 92 % de identidade com a estrutura alfa da lectina purificada do veneno de *Gloydius intermedius* (Número de acesso: AIC75910).



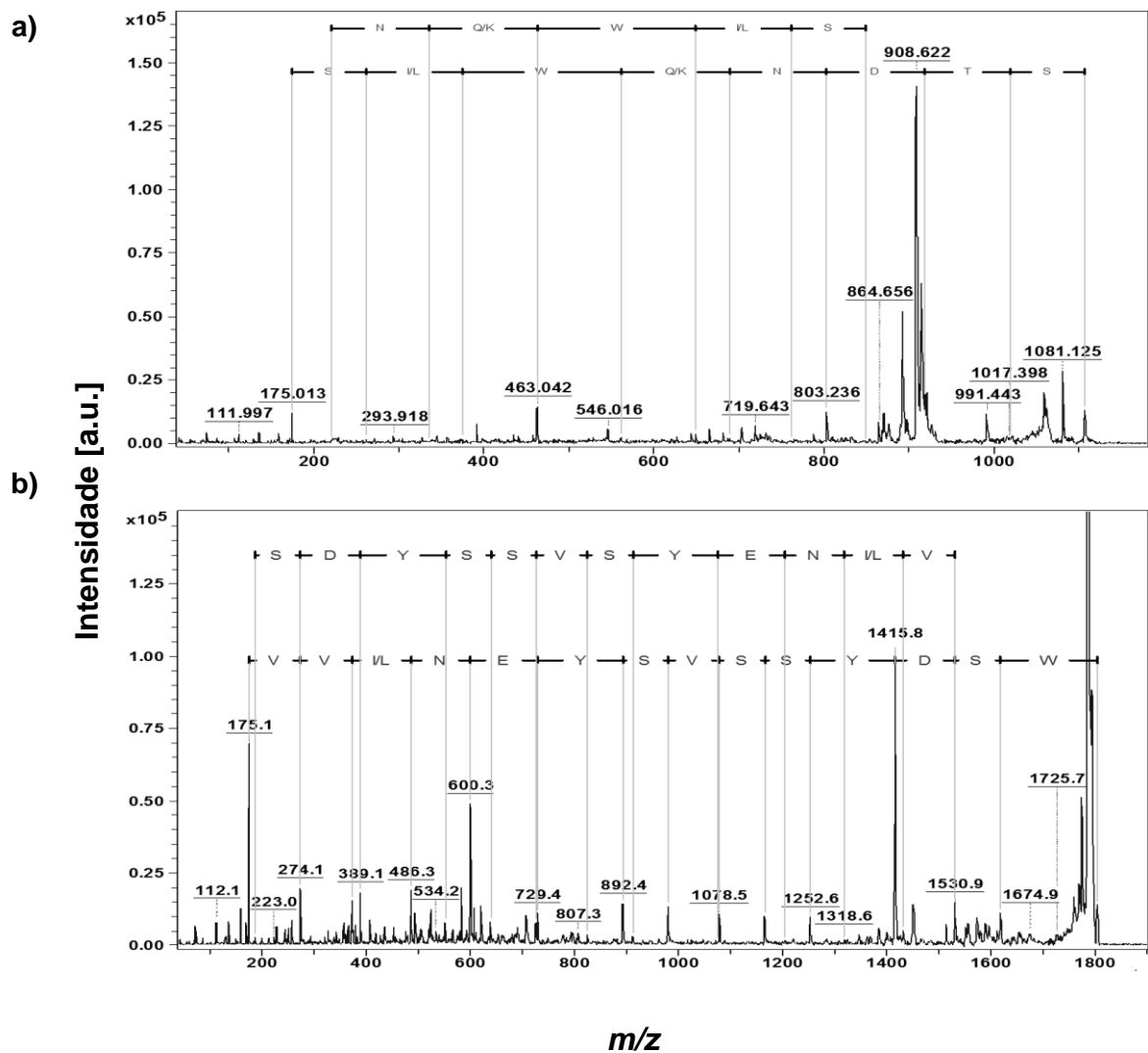


Fig 43. Espectros de massas (MS/MS) de fragmentos trípticos oriundos de proteínas na faixa de 14-18 kDa contidos na fração F8-II. a)  $(M+H)^+ = 1106,53$  Sequência parcial: STDN(Q/K)W(I/L)SR,  $(M+H)^+ = 1803$  Sequência Parcial: WSDYSSVSYEN(I/L)V. Foi considerado que Leu/Ile e Gln/Lys apresentam mesmas massas molares.

#### 4.4 Demonstração de atividades de metalo-peptidase, serino-peptidase e lectina tipo C em frações do veneno de *B. oligolepis* ativas frente *S. aureus*

Como já descrito, as proteínas contidas nas frações F2-I, F4-II e F8-II inibiram o crescimento de *S. aureus* foram selecionadas para a identificação via tripsinização seguida de análise por MALDI TOF/TOF dos fragmentos gerados e comparação dos mesmos a proteínas pertencentes ao veneno de serpente da família Viperidae. Três

tipos de proteínas foram identificados: serino-peptidase em F4-II, metalo-peptidase em F2-I e lectina tipo C em F8-II. O mesmo foi feito com as frações P1 e P2. A **Tabela 19** resume todos os fragmentos peptídicos sequenciados neste trabalho.

Tabela 19. Identificação de proteínas do veneno de *B. oligolepis* através da sequência de aminoácidos de seus fragmentos trípticos.

Amostra	Ion (m/z)	Sequência peptídica	Acesso no.	Proteína
F4-II	1279,548	YPELPAEYR	Q5W959.1	"Serine protease HS114"
	2323,179	PDVPYCA(I/L)(I/L)N(I/L)(I/L)DDAVCR		
	2180,9	SEHIAPLSLPSSSPSVGSV		
	2552,045	YPDVPHCAN(I/L)N(I/L) (I/L)DHTVCR		
P1	1331,6	(I/L)MGWGS(I/L)P(I/L)L	Q8QG86.1	"Serine protease BITS01A"
	1202,7	IMGWG(I/L)ISPTR	Q7T229.1	"Snake venom serine protease homolog"
	1074,6	SPNKDEQTR	Q2PQJ3.1	"Serine protease Thrombin-like enzyme BjussuSP-1"
F8-II	1803,8	WSDYSSVSYEN(I/L)VR	Q9PSM6.1	"C-type lectin GPIB-binding protein subunit alpha"
	1106,53	STDN(Q/K)W(I/L)SR	AIC75911.1	"C-type lectin beta (Gloydus intermedius)"
P2	2785,7	HLVSIESQEEADFAEVVSANIKR	Q9PSM6.1	"C-type lectin GPIB-binding protein subunit alpha"
	1099,7	EINVWIGLR	D2YW39.2	"Rhodocetin subunit gamma"
	1134,7	D(I/L)YVWIGLR	BAM94436.1	"C-type lectin Botrocetin-2 alpha"
F2-I	1652	IYEIVNILNEIYR	P0C6E3.1	"Zinc metalloproteinase-disintegrin bilitoxin-1"
			ADO21507.1	"MP_I1b2 SVMP precursor"
	1339,8	YVELV(I/L)VADYR	ADI47653.1	"Metalloproteinase"
			Q98UF9.3	"Zinc metalloproteinase-disintegrin-like HF3"

Para confirmar que a identificação das proteínas feita por MALDI-TOF, foram feitos testes com F2-I, F4-II e F8-II.

#### 4.4.1 Atividade gelatinolítica das frações F2-I e F4-II

Como descrito, a determinação da atividade proteolítica usando gelatina como substrato foi feita mediante zimografia usando 1  $\mu\text{g}$  da F4-II e 0,5  $\mu\text{g}$  da F2-I. O gel obtido mostrou regiões claras comprovando a atividade gelatinolítica-proteolítica (**Figura 44**) e que F4-II contém uma peptidase. A proteína também se mostrou ativa frente ao substrato BAPNA (VALERIANO-ZAPANA et al., 2012), apesar da baixa velocidade da atividade amidásica observada (método e dados não mostrados). A F2-I apresentou atividade gelatinolítica mais significativa do que a de F4-II e, quando ensaiada frente à caseína (ABDEL-ATY; WAHBY, 2014) foi pouco ativa (método e dados não mostrados).

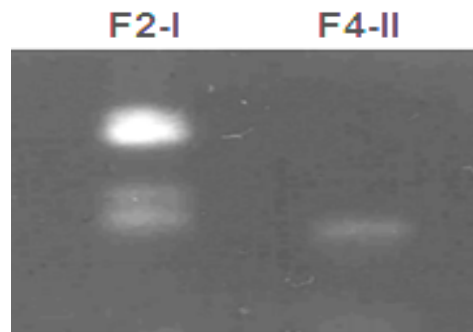


Figura 44. Atividade gelatinolítica-proteolítica por zimografia de a) F2-I (0,5  $\mu\text{g}$  de proteína) e b) F4-II (1  $\mu\text{g}$  de proteína).

#### 4.4.2 Atividade hemaglutinante do veneno de *B. oligolepis* e da fração F8-II

Como mostra a **Figura 45** tanto o veneno bruto (1 mg de proteína.mL<sup>-1</sup>) quanto a proteína F8-II não apresentaram atividade hemaglutinante em comparação ao controle

positivo (lectina de *Dioclea grandiflora*). Clemetson e colaboradores (2006) descreveram que em veneno de serpentes existem dois tipos de lectinas tipo C: 1) as que ligam cálcio e tem um domínio que reconhece carboidratos (CRD), que são as lectinas tipo C verdadeiras; 2) as similares à lectina tipo C (*C-type lectin-like protein: CLD*), que não têm estas propriedades e, portanto, não hemaglutinam os eritrócitos mas tem propriedades coagulantes. Assim, é possível que a nossa F8-II seja do segundo tipo.

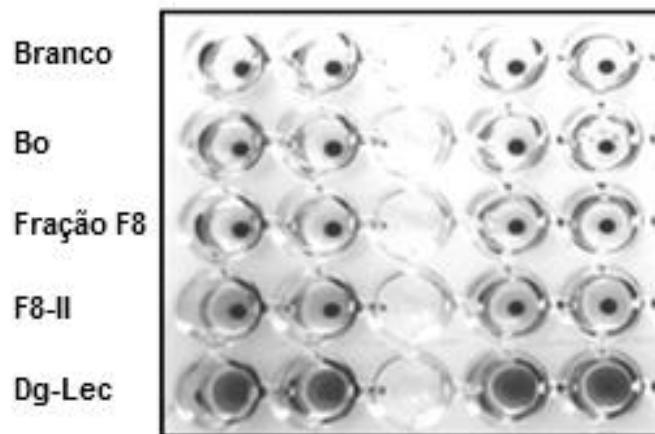


Figura 45. Teste de hemaglutinação. **Branco**: tampão Imidazol. **Bo**: Veneno bruto de *B. oligolepis*. **Dg-Lec**: lectina de *Dioclea grandiflora*.

#### 4.4.3 Atividade coagulante do veneno de *B. oligolepis* da fração F8 e da fração F8-II em plasma humano

Na **tabela 20**, observa-se que o veneno bruto e a fração F8 mostraram ter atividade coagulante. A alta atividade do veneno bruto estaria relacionada com a presença de serino-peptidases, além das lectinas e as suas isoformas. Diferentes concentrações da proteína F8-II foram capazes de induzir a formação do coágulo, sendo 1,58 µg de proteína a quantidade mínima necessária. Tal capacidade já foi descrita para outras lectinas que não hemaglutinam eritrócitos como a Botrocetina-2

recombinante de *B. jararaca*, que precisa de 0,5-1 µg de proteína (YAMAMOTO-SUZUKI et al., 2012). Assim, foi confirmado que o veneno e a F8-II contêm lectina do tipo CTL (*C-type lectin-like protein*: CTL), já que ela induz coagulação, mas não hemaglutinação. Cabe mencionar que as CTLs podem ter funções opostas como de induzir a agregação plaquetária e a aglutinação (ARLINGHAUS; EBLE, 2012).

Tabela 20. Tempo de coagulação do plasma.

Amostra	Diluição	Volume (µL)	µg de proteína	Tempo de coagulação (seg)
Tampão Imidazol	1:1	20	-	31,3
Bo*	1:1	20	20	1
Fração F8	1:1	20	15	17,2
F8-II	1:1	20	6,35	24,3
	1:2	20	3,18	25,5
	1:4	20	1,58	27,6
	1,8	20	0,79	31

\*Veneno bruto de *B. oligolepis*

#### 4.5 Desenvolvimento de novos AMPs derivado das sequências aminoacídicas das metalo-peptidase, serino-peptidase e lectina tipo C isoladas do veneno de *B. oligolepis*

##### 4.5.1 Desenho de potenciais AMPs

Tendo as sequências de aminoácidos dos peptídeos da **tabela 19**, foram selecionados três deles como ponto de partida para a obtenção de novos AMPs: um derivado da serino-peptidase (YPELPAEYR), um derivado da metalo-peptidase (IYEIVNILNEIYR) e um derivado da lectina do tipo CTL (DLYVWIGLR). Sabendo que a carga líquida em pH 7 e a anfipaticidade são propriedades determinantes na expressão de atividade antimicrobiana de peptídeos, foram incluídas modificações nas sequências acima citadas para gerar os seguintes peptídeos (**Tabela 21**):

**Bo-Met1:** adição da sequência LGKIRTK que antecede a IYEIVNILNEIYR no N-terminal e deleção da sequência IYEIVNILNEI do C-terminal (Q98UF9.3): **LGKIRTKIY**.

**Bo-Ser1:** inclusão de Gly geralmente no N-terminal: **GYPELPAEYR**.

**Bo-Lec1:** adição de Val no C-terminal: **DLYVWIGLRV**.

A seguir, as sequências de aminoácidos dos peptídeos denominados de Bo-Met1, Bo-Ser1 e Bo-Lec1 (**tabela 21**) foram alinhados às sequências de proteínas conhecidas encontradas em venenos de serpentes da família Viperidae. O objetivo era verificar se novos AMPs podem ser projetados em proteínas do veneno de *B. oligolepis*, assim como foi feito para a PLA2 de *B. pictus* e, por isso, como contra-ponto foram mantidos no Bo-Lec1 os dois resíduos de Glu originais.

O peptídeo Bo-Met1 da metalo-peptidase de *B. oligolepis* foi alinhado com a sequência de aminoácidos da cadeia A da metalo-peptidase/desintegrina Vap2 do veneno de *Crotalus atrox* (PDB: 2DW0\_A), o peptídeo Bo-Ser1 (GYPELPAEYR) da serino-peptidase de *B. oligolepis* foi alinhada com a sequência de aminoácidos da serino-peptidase Aav-sp-i de *Agkistrodon acutus* (PDB: 1OP0\_A). O peptídeo Bo-Lec1 se alinhou com a sequência da botrocetina (Lectin Type C) de *Bothrops jararaca* (PDB: P22029.2). Os alinhamentos evidenciaram 90, 100, 80 % de identidade com os fragmentos correspondentes dessas proteínas, respectivamente. A localização desses todos os peptídeos nas estruturas 3D das proteínas para o alinhamento é mostrada na **Figura 46**.

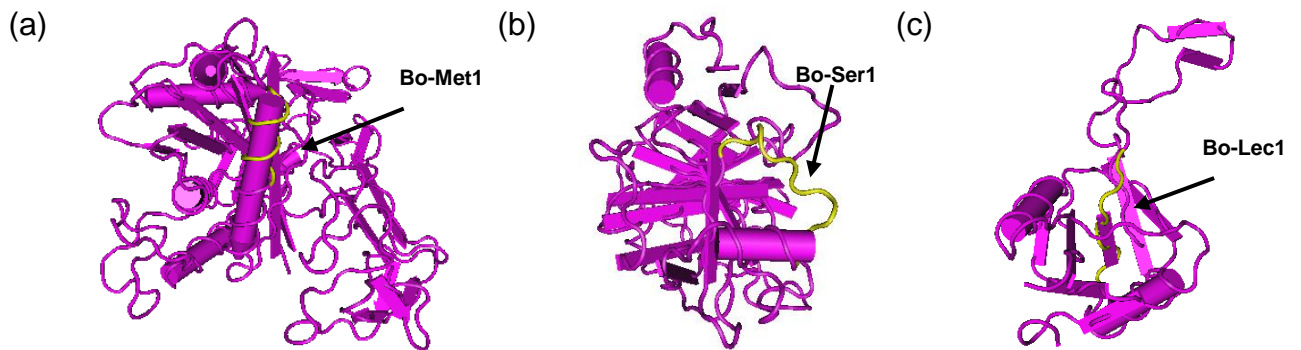


Figura 46. Localização (em amarelo) de Bo-Met1, Bo-Ser1 e Bo-Lec1 nas proteínas Vap2 do veneno de *Crotalus atrox* (a), Aav-sp-i de *Agkistrodon acutus* (b) e botrocetina de *Bothrops jararaca* (c).

Os resultados da predição do potencial antimicrobiano desses peptídeos a partir do seu alinhamento com AMPs conhecidos estão mostrados na **Tabela 21**.

#### 4.5.2 Predição da estrutura dos peptídeos

A próxima etapa foi feita com auxílio do servidor PEP-FOLD (MAUPETIT et al, 2009). Os modelos gráficos obtidos usando o software PyMOL estão apresentados na **Figura 47**.

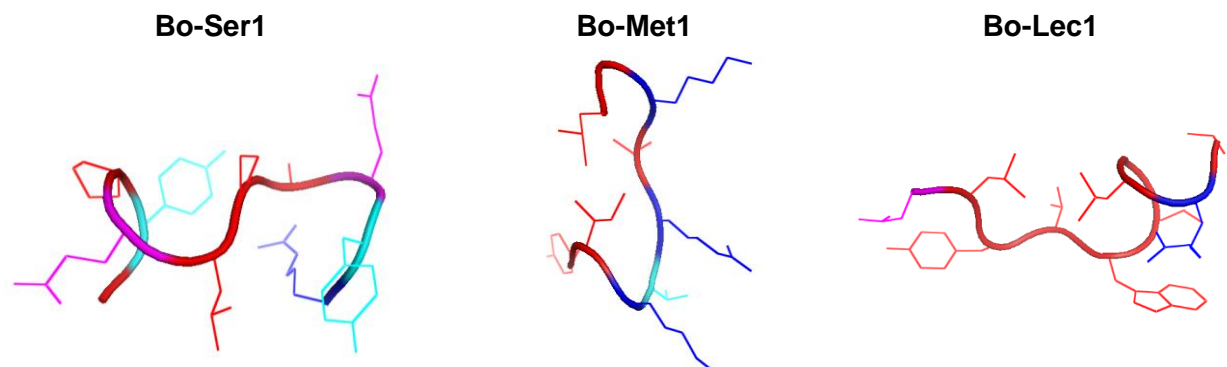


Figura 47. Predição da estrutura dos peptídeos da F4-II serino peptidase (Bo-Ser1), F2-I Metalo peptidase (Bo-Met1) e Lectina tipo C (Bo-Lec1). Aminoácidos hidrofóbicos (vermelho), aminoácidos polares (ciano), aminoácidos com carga positiva (azul), aminoácidos com carga negativa (magenta).

Tabela 21. Alinhamento dos peptídeos com peptídeos antimicrobianos da base de dados do APD3.

Peptídeo	Sequência	Carga líquida em pH 7	Código de alinhamento (% de similaridade)	Alinhamento	Carga líquida em pH 7	Atividade antimicrobiana	Fonte natural	Referência
Bo-Ser1 <sup>a</sup>	GYPELPAEYR	-1	AP02450 (45.45 %)	Alig Result:EKYTEAP+EYI Input Seq : +GYPELPAEYR	-2	anti-Gram (+) e (-), antiviral	Bacillus sp. strain P34	(SCOPEL E SILVA et al., 2014)
			AP02336 (45.45 %)	Alig Result:EKYTEVP+EYV Input Seq : +GYPELPAEYR	-2	antifúngico	<i>Bacillus thuringiensis</i>	(ROY et al., 2013)
Bo-Met1 <sup>b</sup>	LGKIRTKIY	+3	AP02334 (46.15 %)	Alig Result:ILGKIWEGIKSIF Input Seq : +LGKI++RTK+IY	+1	antiviral	<i>Heterometrus petersii</i>	(HONG et al., 2014)
			AP01921 (42.85 %)	Alig Result:ILPTIIGKILST+IF Input Seq : +L+++GKI+RTKIY	+2	anti-Gram(+)	<i>Rana chensinensis</i>	(ZHAO et al., 2011)
Bo-Lec1 <sup>c</sup>	DLYVWLGLRV	0	AP01900 (46.15 %)	Alig Result:FLPV+LAGVLSRA Input Seq : DLYVWL+G+L+RV	+1	anti-Gram (+) e (-)	<i>Rana ridibunda</i>	(Asoodeh et al, 2012)
			AP00999 (45.45 %)	Alig Result: D+Y+HHGVRVL Input Seq : DLYVWLGLRV+	0	anti-Gram (+) e (-)	<i>Serratia plymuthica</i>	(JABRANE et al., 2002)

<sup>a</sup>Bo-Ser1: inclusão de Gly geralmente no N-terminal: GYPELPAEYR.

<sup>b</sup>Bo-Lec1: adição de Val no C-terminal: DLYVWIGLRV.

<sup>c</sup>Bo-Met1: adição da sequência LGKIRTK que antecede a IYEIVNILNEIYR no N-terminal e deleção da sequência IYEIVNILNEI do C-terminal (Q98UF9.3): LGKIRTKIY.



### 4.5.3 Síntese, análise, purificação e caracterização química dos peptídeos desenhados

A **Figura 48** mostra que os peptídeos Bo-Ser1 e Bo-Met1 apresentaram baixos potenciais de agregação (<1,2) e que o mesmo não ocorre com Bo-Lec1. Assim, não seriam esperados problemas sintéticos relacionados à agregação peptídica pelo menos para os dois primeiros. Na **Tabela 22** estão listados os peptídeos amidados que foram sintetizados. A amidação foi feita para aumentar as cargas líquidas em pH 5 e 7 de todos eles, pois grande parte dos AMPs são moléculas catiônicas (MACHADO et al., 2007).

Tabela 22. Sequências de aminoácidos e propriedades dos peptídeos escolhidos para síntese e estudo

Peptídeo	Sequencia	Massa molar (Da) teórica	Carga iônica
Bo-Ser1	GYPELPAEYR-NH <sub>2</sub>	1193,33	0
Bo-Met1	LGKIRTKIY-NH <sub>2</sub>	1090,39	+4
Bo-Lec1	DLYVWLGLRV-NH <sub>2</sub>	1232,50	+1

Como previsto, o processo de alongamento das sequências peptídicas na resina Rink-amida a 60 °C ocorreu sem grandes problemas. Em todas as sínteses houve ganho de massa da resina evidenciando que elas foram bem sucedidas. A **Tabela 23** mostra as condições de clivagem dos peptídeos da resina e desproteção total das cadeias laterais. Os cromatogramas obtidos para os peptídeos brutos (**Figura 49**) mostraram os produtos desejados e diversos subprodutos. Para confirmar se o analito mais abundante era o peptídeo desejado, foi feita a análise por LC/ESI-MS (**Figura 49 inset**). Os resultados mostraram que os analitos mais abundantes eram mesmo os peptídeos desejados, confirmando o sucesso das sínteses.

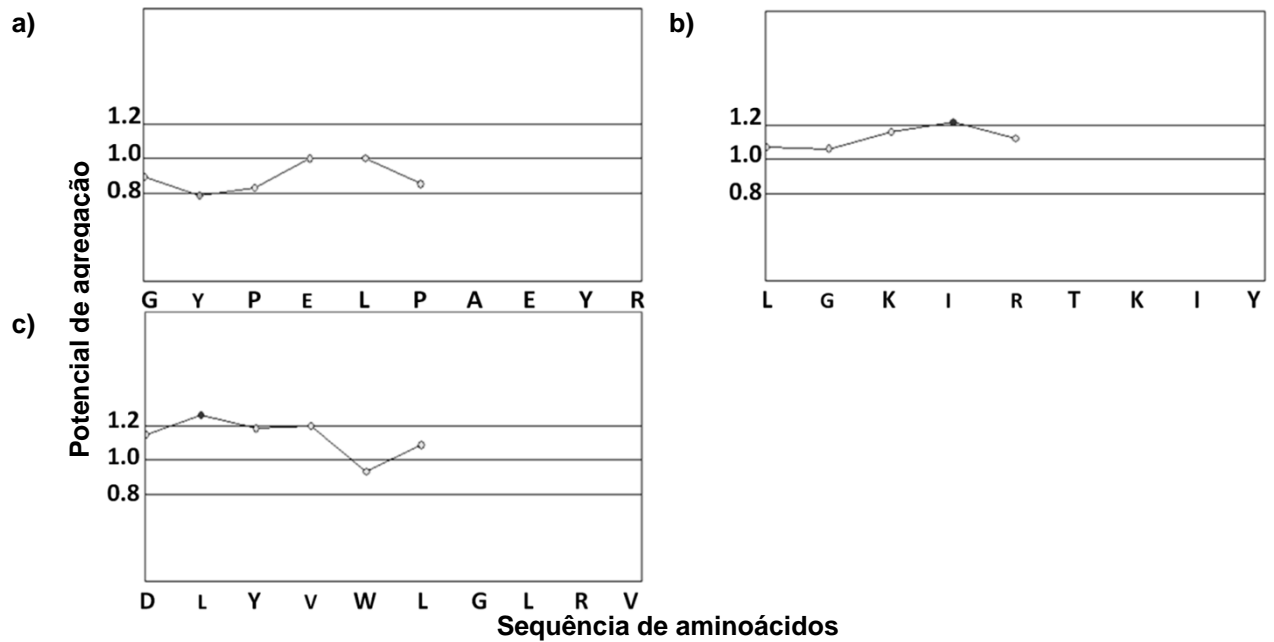


Figura 48. Potencial de agregação dos peptídeos a) Bo-Ser1, b) Bo-Met1, c) Bo-Lec1 Neste programa os primeiros 4 aminoácidos na direção C→N não são considerados (CSPS PHARMACEUTICALS, 1994)

Tabela 23. Condições da clivagem dos peptídeos da resina e desproteção total das cadeias laterais.

Peptídeo	Coquetel de clivagem	Tempo da reação (min)	Temperatura (°C)
Bo-Ser1	TFA/Água/Tioanisol (95:2,5:2,5)	60	60
Bo-Met1	TFA/Água/Tioanisol (95:2,5:2,5)	60	60
Bo-Lec1	TFA/Água/Tioanisol (95:2,5:2,5)	60	60

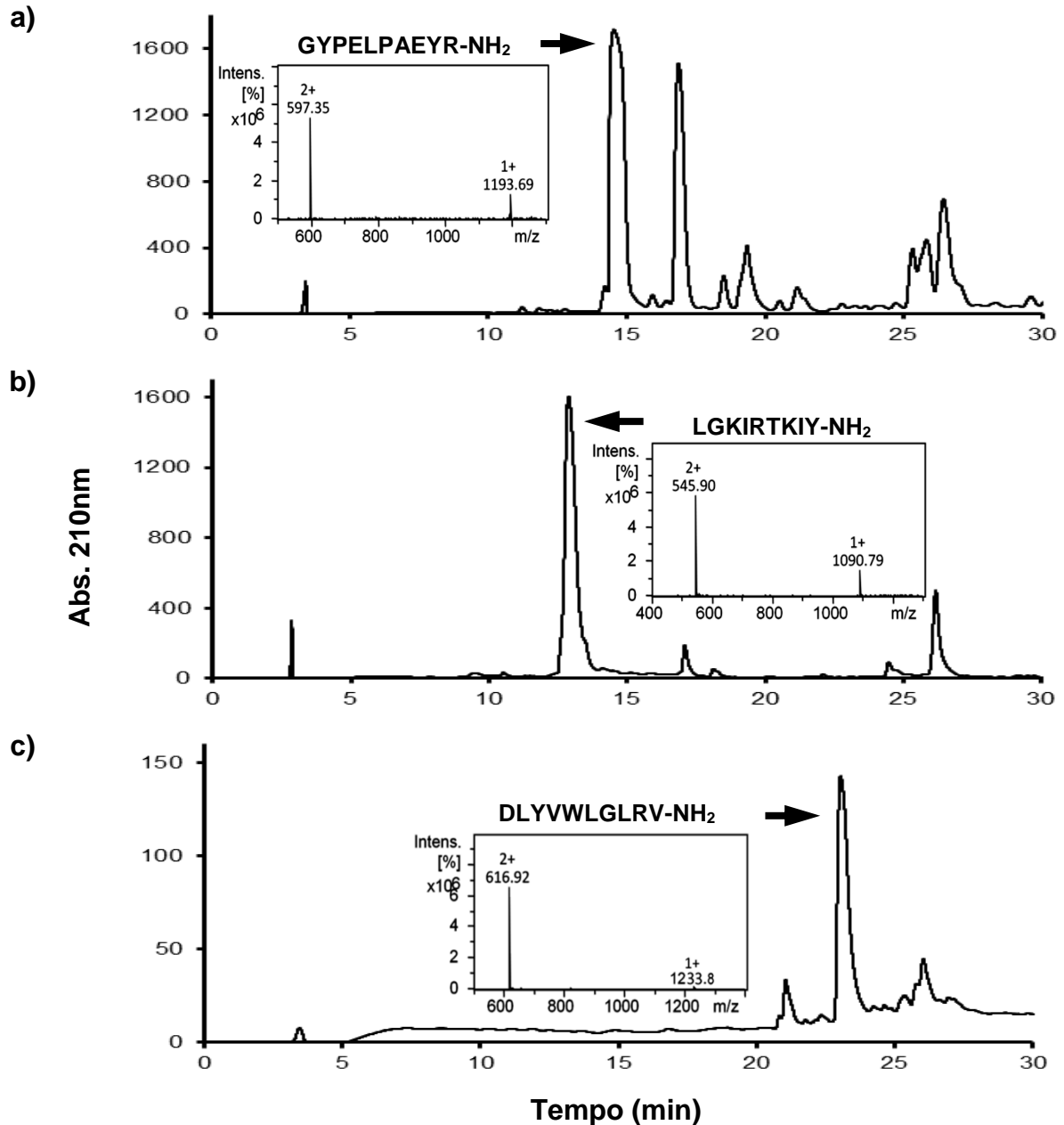


Figura 49. Perfil de RP-HPLC dos peptídeos brutos e ESI-MS (inset) do analito mais abundante, indicando o peptídeo desejado. a) Bo-Ser1:  $(M+H)^+ = 1193,69$ ,  $(M+2H)^{2+} = 597,35$ ; b) Bo-Met1:  $(M+H)^+ = 1090,79$ ,  $(M+2H)^{2+} = 545,90$  e c) Bo-Lec1:  $(M+H)^+ = 1233,8$ ,  $(M+2H)^{2+} = 616,92$ . Condições de análise por RP-HPLC: solvente A (0,1% TFA/água) e solvente B (60 % ACN/0,09% TFA/água), fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura ambiente, gradiente linear de 5-95 % em 30 min do solvente B, detecção em 210 nm. Condições de análise ESI-MS: voltagem no capilar: 4,5k V, voltagem na saída do capilar: 500 V, modo de ionização: ESI<sup>+</sup>, fonte de ionização do tipo electrospray, tipo de analisador: Ion trap.

A preparação semi-preparativa dos brutos a partir de 150 mg das peptidil-resinas forneceram entre 61 e 62 mg de peptídeo bruto, que foram dissolvidos em solvente B e injetados em um sistema de RP-HPLC preparativo para a separação dos peptídeos desejados dos demais subprodutos da síntese em maior escala. Os cromogramas da purificação de cada peptídeo por RP-HPLC são mostrados na **Figura 50**. As condições de purificação, rendimentos, graus de pureza dos purificados e os seus conteúdos peptídicos estão listados na **Tabela 24**.

Depois da purificação, foi realizada a LC-MS/ESI de cada peptídeo purificado e os valores de massa molar obtidos confirmaram a suas identidades (**Figura 51**). A hidrólise total seguida de análise do hidrolisado também confirmaram a presença dos aminoácidos esperados (dados não mostrados).

#### **4.5.4 Atividade antimicrobiana dos peptídeos**

Só um peptídeo (Bo-Met1) foi ativo só frente a leveduras (Candida). Os MICs obtidos estão descritos na **Tabela 25**.

É possível que os peptídeos derivados da serino-peptidase e da lectina tipo CTL não tenham sido ativos dadas as suas características estruturais, pois a estrutura randômica do Bo-Met1 ativo, concorda com outros peptídeos antimicrobianos que apresentam este tipo de estrutura.

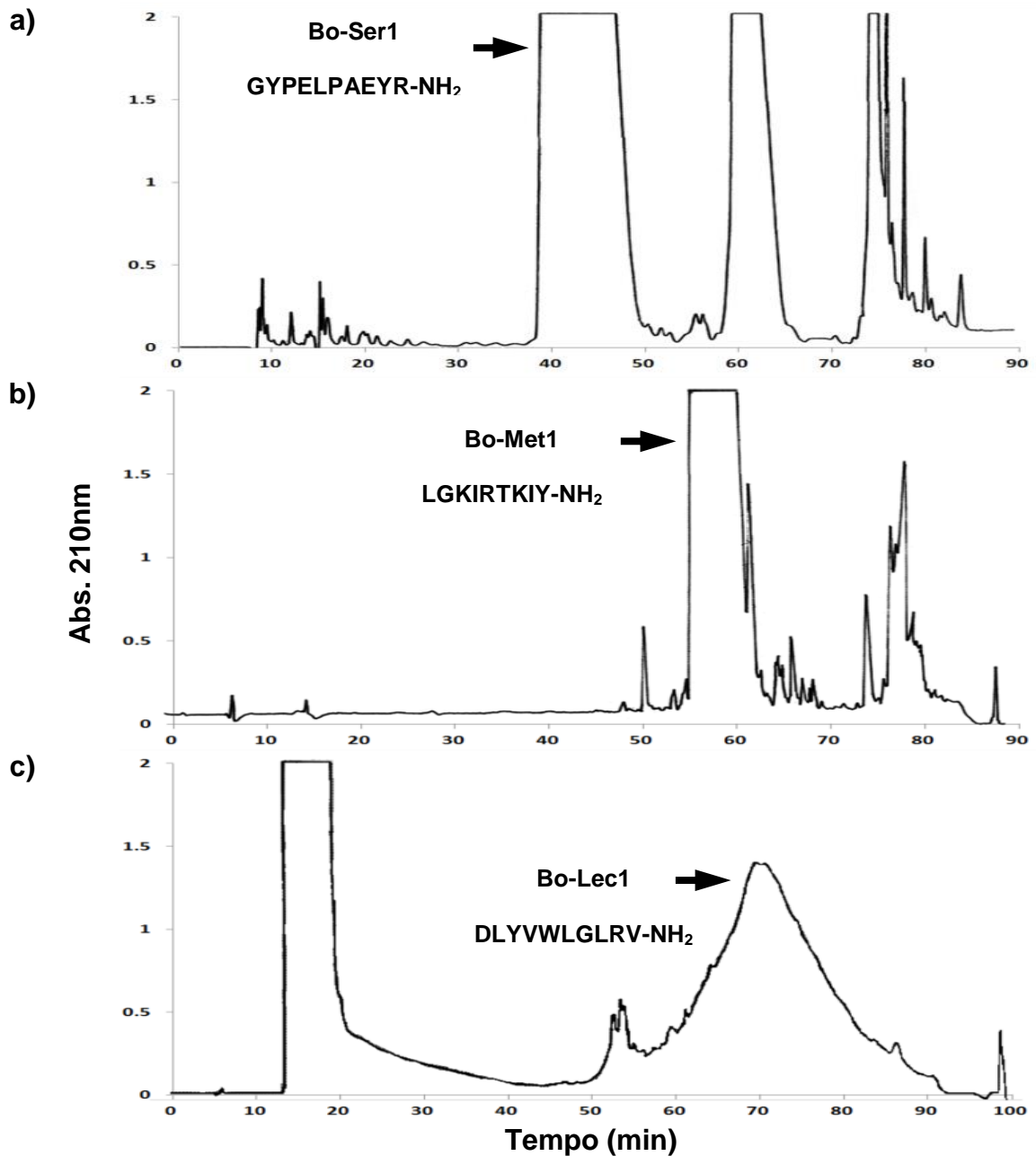


Figura 50. Perfil de RP-HPLC preparativo dos peptídeos. Condições de purificação por RP-HPLC: a) Bo-Ser1: solvente A (0,1% TFA/água), solvente B (25 % ACN/0,09% TFA/água), fluxo de 10 mL.min<sup>-1</sup>, gradiente linear de 50-95 % B/90 min do solvente B, b) Bo-Met1: solvente A (0,1% TFA/água), solvente B (60 % ACN/0,09% TFA/água), fluxo de 10 mL.min<sup>-1</sup>, gradiente linear de 5-40 % B/90 min, c) Bo-Lec1: solvente A (0,1% TFA/água), solvente B (60 % ACN/0,09% TFA/água), fluxo de 10 mL.min<sup>-1</sup>, gradiente linear de 30-85 % B/100 min, detecção em 210 nm.

Tabela 24. Condições de purificação, rendimentos e caracterização dos peptídeos sintetizados.

Peptídeo	Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	Solvente B (%)*	Gradiente linear	Tempo do gradiente (min)	Peptídeo injetado (mg)	Peptídeo purificado (mg)	Rendimento da purificação (%)	Grau de pureza (%)**	Conteúdos peptídicos (%)
Bo-Ser1	10	25	50 a 95 % B	90	61	34	55,7	97,3	62,62
Bo-Met1	10	60	5 a 40 % B	90	62	40	64,5	97,8	48,04
Bo-Lec1	10	60	30 a 85 % B	100	62	13	21	94,4	60,19

\*Solvente B: 25 ou 60 % ACN/0,09 % TFA/água

\*\*Solvente B: 60 % ACN/0,09 % TFA/água

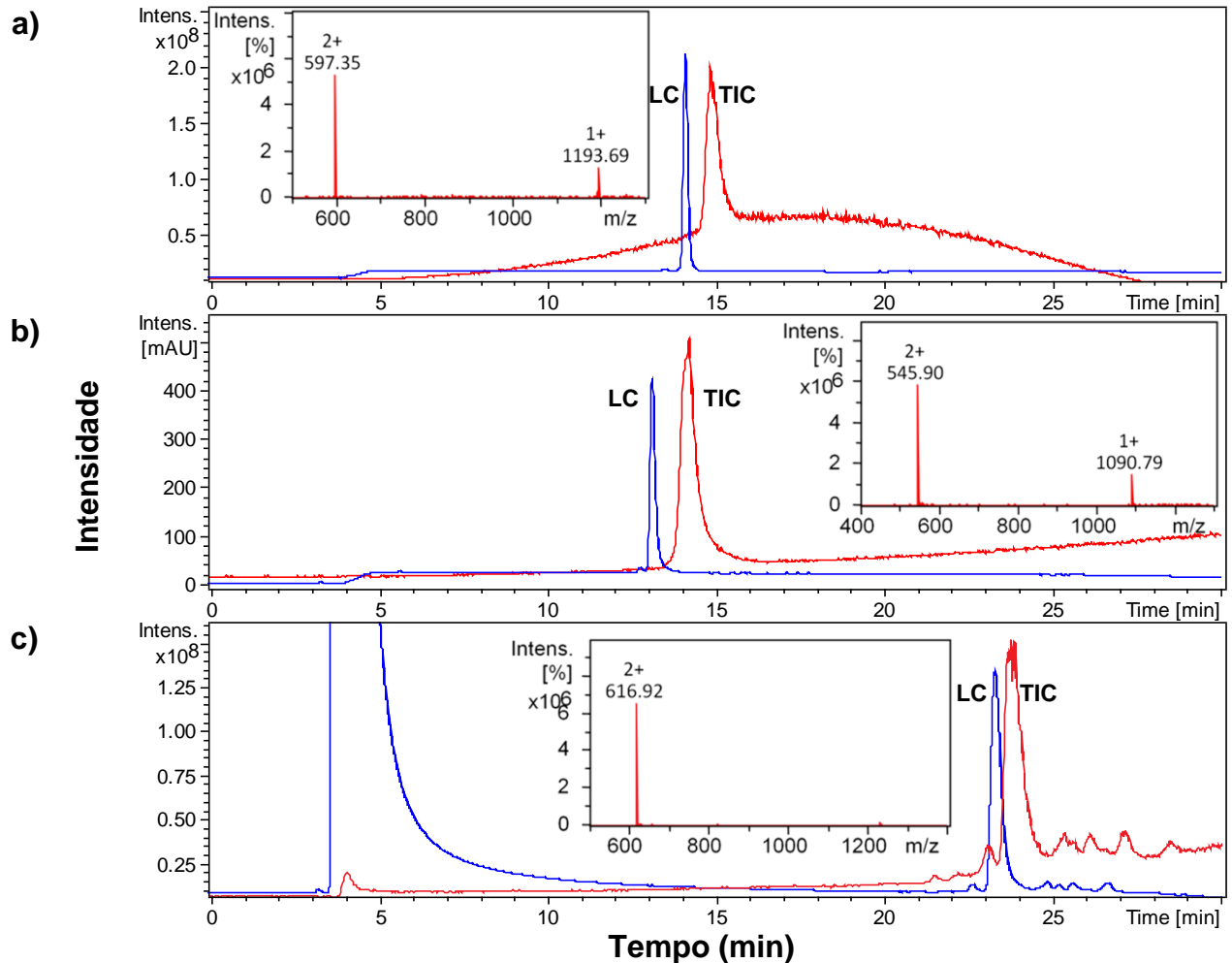


Figura 51. Perfil de RP-HPLC e ESI-MS (inset) dos peptídeos purificados: a) Bo-Ser1:  $(M+H)^+ = 1193,69$ ,  $(M+2H)^{2+} = 597,35$ ; b) Bo-Met1:  $(M+H)^+ = 1090,79$ ,  $(M+2H)^{2+} = 545,90$  e c) Bo-Lec1:  $(M+H)^+ = 1233,8$ ,  $(M+2H)^{2+} = 616,92$ . Condições de análise por RP-HPLC: solvente A (0,1% TFA/água) e solvente B (60 % ACN/0,09% TFA/água), fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura ambiente, gradiente linear de 5-95 % em 30 min do solvente B, detecção em 210 nm. Condições de análise ESI-MS: voltagem no capilar: 4,5k V, voltagem na saída do capilar: 500 V, modo de ionização: ESI<sup>+</sup>, fonte de ionização do tipo electrospray, tipo de analisador: Ion trap. (LC: Cromatografia líquida, TIC: Cromatograma de íons totais).





A presença de peptídeos com potencial antimicrobiano proveniente da sequência de aminoácidos de proteínas com ou sem atividade antimicrobiana também foi descrita. Os peptídeos pepMTX-I e pepMTX-II derivados da região 115-129 do domínio N-terminal de duas PLA<sub>2</sub> com atividade miotóxica (MTX-I e MTX-II, respectivamente) de *B. brazili*, mostraram ter atividade contra *C. albicans* e *E. coli* (COSTA et al., 2008). Peptídeos derivados da hemoglobina também podem ser ativos contra o crescimento de leveduras, por exemplo o peptídeo Hb33-61a da  $\alpha$ -hemoglobina bovina mostra atividade contra *C. albicans* MDM8 com MICs entre 3,12 e 6,25  $\mu\text{mol}^{-1}$  (MACHADO et al., 2007). Estes MICs são similares aos obtidos com o Bo-Met1 contra o crescimento de *C. parapsilosis*. Peptídeos antimicrobianos derivados da Lactoferrina como a HLR1r mostra ter atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram negativas e fungus como a *C. albicans* com uma concentração de entre 3 e 50  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  (BJÖRN et al., 2016). O peptídeo Bo-Met1 é um peptídeo catiônico. Portanto, a sua ação pode ser similar a de outros AMPs catiônicos, que interagem com grupos de carga negativa da superfície celular microbiana e promovem a desestabilização da membrana plasmática com consequente inibição de crescimento e/ou morte celular.

## 5. DISCUSÃO GERAL

### 5.1 Desenvolvimento de novos AMPs provenientes da PLA<sub>2</sub> do veneno de *B. pictus*

Como já descrito anteriormente, um problema global de saúde pública é a aparição de micro-organismos resistentes aos antibióticos, pois ela causa perda de muitas vidas e gastos. O desenvolvimento de novos antibióticos que melhorem o tratamento das doenças causadas por este tipo de micro-organismo é tema de pesquisa relevante e urgente.

A maioria dos antibióticos presentes no mercado farmacêutico inibem o crescimento das células microbianas na fase *log*, podendo deixar viáveis as células que ainda estão no estado de latência. Por isso, os novos antibióticos deveriam também atingir este tipo de células.

Os AMPs provenientes de fontes naturais, como secreções de animais, e dos hidrolisados de inúmeras proteínas têm essa capacidade. De fato, sabe-se que a hidrólise de proteínas não antimicrobianas, como as proteínas do leite, a hemoglobina e as proteínas do músculo são fontes naturais de AMPs quando hidrolisadas *in vivo* ou *in vitro*. Sendo o veneno de serpente peruana uma fonte natural de proteínas antimicrobianas, é lógico pensar que elas devam conter em suas sequências porções que possam ser AMPs.

A PLA<sub>2</sub> de *B. pictus* teve sua sequência de aminoácidos elucidada e depositada no Genbank (GenBank NCBI: AAF91498), mas não foi estudada depois. Neste trabalho, portanto, foram desenhados quatro peptídeos provenientes de sua sequência aminoacídica. Depois de observar a alta similaridade entre as suas sequências de

aminoácidos com as sequências de aminoácidos de AMPs armazenados na base de dados PDB3, eles foram sintetizados, purificados e, após caracterização química, foram ensaiados frente a micro-organismos. Só o peptídeo PLA2-1, inibiu o crescimento de bactérias Gram-negativas e de linhagens de *Candida* envolvidas em candidíase. Portanto, este é o primeiro trabalho que descreve um AMP localizado na sequência de resíduos de aminoácidos da PLA<sub>2</sub> proveniente do veneno de uma serpente de origem peruana.

A estrutura do PLA2-1 (Figura 9) sugere anfipaticidade e similaridade com a estrutura da porção a que ele correspondente no modelo estrutural obtido da proteína-enzima, o que também pode sugerir que essa pode ser a estrutura mais estável para o peptídeo. Porém, não houve tempo hábil para comprová-la experimentalmente. Muitos AMPs apresentam estrutura  $\alpha$ -hélice, mas AMPs de estrutura randômica como o Hb 98–114 (BELMONTE et al., 2012), leucrocina I (PATA et al., 2011), também foram descritos. A observação de atividade do PLA2-1 amidado frente a linhagens de *Candida* e bactérias Gram-negativas está de acordo com a dos AMPs aos quais ele foi alinhado e mostrou alta similaridade de sequência, tamanho, presença de Lys e Arg (que outorgam a carga líquida positiva +4 em pH > 5 necessária para a interação com os componentes lipídicos (que possuem carga negativa) da membrana celular, também exibida por outros AMPs como o Hb33-61a (carga líquida +4) (MACHADO et al., 2007) e a cheferina I (carga líquida +8) (REMUZGO et al., 2014) que vimos estudando, e presença de Trp, que também está na sequência de outros AMPs como a tritripticina (YANG et al., 2002) e indolicidina (MATTILA et al., 2008). Este resíduo de aminoácido contribuiu para a anfipaticidade da molécula, facilitando a interação com a bicamada

lipídica das paredes e membrana plasmática, ademais, observando a localização do Trp na sequência de resíduos de aminoácidos do PLA<sub>2</sub>-1.

Está descrito que a atividade antimicrobiana das PLA<sub>2</sub> está mais relacionada às PLA<sub>2</sub> básicas, mas nesse trabalho a PLA<sub>2</sub> usada como proteína modelo foi a ácida de *B. pictus*. AMPs correspondentes a fragmentos das PLA<sub>2</sub> básica no veneno de serpente do gênero *Bothrops* foram descritos por: (i) Páramo e colaboradores (1998) descreveram o peptídeo miotoxina II (115-129) (KKYRYYLKPLCKK), com carga líquida +7 a pH>5 e atividade frente a bactérias Gram-negativas, cuja sequência de aminoácidos se localiza na região C-terminal de uma PLA<sub>2</sub> básica miotóxica isolada do veneno de *B. asper* (PÁRAMO et al., 1998a); (ii) Costa e colaboradores (2008), isolaram PLA<sub>2</sub>s básicas miotóxicas do veneno de *B. brazili*, descrevendo os peptídeos localizados na região C-terminal das PLA<sub>2</sub>: pepMTX-I: <sup>115</sup>RKYMAYLRVLCKK<sup>129</sup> e pepMTX-II: <sup>115</sup>KKYRYHLKPLCKK<sup>129</sup> com cargas líquidas +6 e +8, respectivamente, em pH > 5 e atividade frente a *E. coli* e *C. albicans*. O PLA<sub>2</sub>-1 (<sup>11</sup>KIAKRSGVWFY<sup>21</sup>) está localizado na porção N-terminal da PLA<sub>2</sub> ácida de *B. pictus* (COSTA et al., 2008).

Em resumo, este resultado positivo também dá suporte a outros estudos que mostram que sequências curtas peptídicas provenientes da hidrólise de proteínas *in vivo* ou em *in vitro* ou mesmo da análise de suas estruturas primárias e comparação com AMPs já conhecidos podem gerar novos AMPs ou peptídeos com outras funções biológicas importantes.

## 5.2 Atividades antimicrobianas dos venenos das serpentes peruanas *B. barnetti* e *B. oligolepis*

Tal resultado estimulou tentativas de isolamento de proteínas com atividade antimicrobiana presentes em outros venenos de serpentes peruanas pouco ou não estudados para usar estratégia similar no desenvolvimento de novos AMPs. Assim, foram escolhidos os venenos de *B. barnetti*, *B. taeniatta* e *B. oligolepis*, que só tinham sido caracterizados em suas atividades enzimáticas e toxicidade. Pela primeira vez, a atividade antimicrobiana dos venenos *B. barnetti* e de *B. oligolepis* foi observada, sendo o segundo o mais potente e de espectro de ação mais amplo.

Dada a importância clínica de *S. aureus*, causador de vários tipos de infecções e morte da população em nível global, este micro-organismo foi escolhido para monitorar o fracionamento do *B. oligolepis*. Também pela primeira vez foram obtidas frações contendo proteínas capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*. Cada fração continha: uma metalo-peptidase, uma serino-peptidase ou uma lectina tipo C identificadas depois da tripsinização do material presente no gel de acrilamida, sequenciamento dos peptídeos obtidos e alinhamento dos mesmos com sequências proteicas conhecidas de venenos do mesmo gênero e família.

A P1 continha uma proteína de 59,2 kDa identificada como uma metalo-peptidase. A fração F2-I continha proteína de mesma massa molar e outra de 72,8 kDa também identificada como metalo-peptidase. Essas enzimas poderiam pertencer ao grupo das metalo-peptidases tipo III segundo a classificação de Fox e colaboradores (FOX; SERRANO, 2008). A zimografia feita confirmou que a proteína na fração F2-I tinha atividade proteolítica. Estes resultados concordam com o conhecimento de que

este tipo de enzima é abundante nos venenos de serpentes, especialmente na fase adulta (CALVETE, 2010) e o veneno de *B. oligolepis* veio de um espécimen adulto. Até a atualidade, só Samy e colaboradores (2008) descreveram uma metalo-peptidase de 23,1 kDa isolada do veneno de *Agkistrodon halys* que apresenta atividade frente ao crescimento de bactérias Gram-negativas e positivas, entre elas o *S. aureus* (SAMY et al., 2008). Portanto, este seria o segundo trabalho que descreveria um novo tipo de metalo-peptidase com ação antimicrobiana neste tipo de veneno.

A fração (F4-II) continha uma serino-peptidase de 27 kDa, massa molar similar aos de outras serino-peptidases isoladas de diversos venenos de serpentes (SAGUCHI et al., 2005; VALERIANO-ZAPANA et al., 2012). A zimografia feita, mostrou atividade gelatinolítica evidenciando atividade proteolítica. Até agora nenhuma serino-peptidase com atividade antimicrobiana isolada do veneno de serpente foi descrita. Portanto, este seria outra observação inédita deste trabalho de Tese.

A fração (F8-II) continha uma lectina tipo C (14-18 kDa em condições redutoras) de massas molares similares às de lectina jerdonuxina isolada do veneno de *Trimeresurus jerdonii*, cuja massa molar em condições redutoras é de 14-18 kDa (CHEN et al., 2011). A nossa lectina foi inativa no teste de hemaglutinação, mas no teste de coagulação ela se mostrou ativa, evidenciando que ela pertence a um tipo de lectina denominada de lectina CTLD (com domínio semelhante à lectina tipo C). De fato, em venenos de serpentes podem existir dois tipos de lectinas: lectina tipo C e lectina CTLD (CLEMETSON 2005). A lectina CTLD pode gerar coagulação, mas o outro tipo de lectina tipo C que só gera aglutinação também pode ter atividade antimicrobiana, como a crotacetina isolada do veneno de *Crotalus durissus* que se mostrou ativa frente ao

crescimento bacteriano (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2005). Portanto, também seria a primeira vez que se descreve uma lectina CTLD com envolvimento na inibição de crescimento de *S. aureus*.

### **5.3 Desenvolvimento de novos AMPs derivados das metalo-peptidase, serino-peptidase e lectina tipo C isoladas do veneno de *B. oligolepis***

Uma vez que estas proteínas foram identificadas e tendo as sequências aminoacídicas dos seus fragmentos trípticos listados na Tabela 19, foi feita a localização deles em sequências aminoacídicas de proteínas correlatas às identificadas e todas as outras análises já descritas no item acima 5.1. A partir dos resultados e do conhecimento dos requisitos estruturais para a expressão de atividade de AMP já citados acima, foi desenhado um peptídeo derivado de cada proteína identificada para síntese, purificação, caracterização química e ensaio antimicrobiano. Todos eram amidados, continham pelo menos um resíduo de Arg ou Lys e dois resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Entretanto, um deles continha dois Glu e teria carga líquida neutra em pH<5. Como esperado, o Bo-Ser1 não foi ativo frente aos micro-organismos testados, mas o peptídeo Bo-Met1 (proveniente da metalo-peptidase) inibiu o crescimento de linhagens de *Candida* relacionadas à candidíase, especialmente a *C. parapsilosis*. A localização deles em modelos 3D de proteínas correlatas às proteínas identificadas revelou que boa parte do fragmento correspondente a Bo-Met1 apresentava estrutura secundária  $\alpha$ -hélice e aqueles correspondentes aos Bo-Ser1 e Bo-Lec1 apresentavam estrutura randômica. A predição teórica de estrutura de Bo-Met1, entretanto, não revela tendência de formação de  $\alpha$ -hélice, e sim estrutura randômica, mas nota-se que as cadeias laterais dos aminoácidos com carga positiva e

hidrofóbicos estão dispostas em faces opostas, o que também foi observado para o novo AMP proveniente da PLA2 do veneno de *B. pictus*. Para comprovar se tais considerações estruturais são, de fato, viáveis e suficientes para explicar a ação antimicrobiana observada, assim como a ausência dela nas condições de teste para os três peptídeos desenhados, será necessária uma análise estrutural detalhada empregando dicroísmo circular (CD) e RMN em condições que mimetizem o ambiente membranar.

Se comparados entre si o PLA2-1 (KIAKRSGVWF-NH<sub>2</sub>) e o Bo-Met 1 (LGKIRTKIY-NH<sub>2</sub>) ativos apresentam as seguintes características comuns: (i) atividade antifúngica e nenhuma ação em bactérias até 100 µmol.L<sup>-1</sup>; (ii) carga líquida +4 em pH < 5; (iii) dez ou nove resíduos de aminoácidos, sendo três básicos carregados e 3-5 hidrofóbicos, além dos polares não carregados Gly e Ser ou Tyr e/ou Thr, sugerindo que falta nos outros potenciais AMPs desenhados que não apresentaram atividade um ou mais dos últimos três requisitos citados.

É interessante mencionar que o Bo-Met1 está localizado em região central, porém mais próxima da N-terminal, da metalo-peptidase Vap2 do veneno de *Crotalus atrox* e importante ressaltar que, também pela primeira vez, um novo AMP foi desenvolvido a partir de uma metalo-peptidase proveniente do veneno de *B. oligolepis* peruana.



## 6. CONCLUSÕES

Os resultados do trabalho aqui descrito nos permitem concluir que os objetivos citados se mostraram possíveis de ser atingidos, pois:

1. Pela primeira vez foi proposto um modelo 3D para a PLA<sub>2</sub> do veneno da serpente peruana de *B. pictus*, que tinha apenas a sua sequência aminoacídica conhecida;
2. Este é o primeiro trabalho que a utiliza como uma fonte natural para o desenvolvimento de novos AMPs; o peptídeo PLA2-1 inibiu o crescimento de bactérias Gram-negativas e de linhagens de *Candida* de interesse clínico.
3. Pela primeira vez foi verificada a atividade antimicrobiana dos venenos das serpentes peruanas *B. barnetti* e *B. oligolepis*, sendo que o primeiro inibiu o crescimento de *S. aureus* (Gram+) e o segundo os do *S. aureus* e *M. luteus* (Gram+), *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis* (Gram-).
4. O fracionamento do veneno selecionado para estudo, o de *B. oligolepis*, e ensaios de inibição do crescimento de *S. aureus* das frações geradas possibilitaram o isolamento de duas metalo-peptidases do tipo III, de duas serino-peptidases e de uma lectina do tipo CTL.
5. Este seria o primeiro relato de serino-peptidases como componentes majoritários de fração com atividade antimicrobiana proveniente do veneno de uma serpente peruana.
6. Pela primeira vez, uma metalo-peptidase do veneno da serpente peruana *B. oligolepis* foi usada como fonte natural para o desenvolvimento de novos AMPs; o peptídeo Bo-Met1 inibiu o crescimento de linhagens de *Candida*, especialmente *C. parapsilosis*.
7. Os dois novos AMPs apresentam características comuns que devem ser melhor investigadas, assim como os seus comportamentos conformacionais em solução e seus mecanismos de ação. Em outras palavras, esse trabalho abriu uma nova frente de pesquisa para o nosso grupo e laboratório que deverá ser continuada.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-ATY, A. M.; WAHBY, A. F. Purification and characterization of five snake venom metalloproteinases from Egyptian *Echis pyramidum pyramidum* venom. *J. Toxicol. Sci.*, 2014, vol. 39, n. 4, p. 523–536.
- ADRIAN, P. V.; KLUGMAN, K. P. Mutations in the dihydrofolate reductase gene of trimethoprim-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 1997, vol. 41, n. 11, p. 2406–2413.
- AGUILAR, MI. HPLC of Peptides and Proteins. In: *Methods in Molecular Biology-Clifton Then Totowa*. Totowa, NJ: Springer New York, 2004, vol. 251, p. 9–22.
- AGUILERA, O.; OSTOLAZA, H.; QUIRÓS, L. M.; FIERRO, J. F. Permeabilizing action of an antimicrobial lactoferricin-derived peptide on bacterial and artificial membranes. *FEBS Letters*, 1999, vol. 462, n. 3, p. 273–277.
- AIRD, S.D.; WATANABE, Y.; VILLAR-BRIONES, A.; ROY, M.C.; TERADA, K.; MIKHEYEV, A.S. Quantitative high-throughput profiling of snake venom gland transcriptomes and proteomes (*Ovophis okinavensis* and *Protobothrops flavoviridis*). *BMC genomics*, 2012, vol. 14, n. 1, p. 1-26.
- ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A. C-type lectin-like proteins from snake venoms. *Toxicon*, 2012, vol. 60, n. 4, p. 512–519.
- AROCAS, V.; CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B.; GUILLIN, M.C.; JANDROT-PERRUS, M.; BON, C.; WISNER, A. Molecular cloning and expression of bothrojaracin, a potent thrombin inhibitor from snake venom. *Eur. J. Biochem*, 1997, vol. 248, n. 2, p. 550–557.
- BARON, S. *Medical Microbiology*. [s.l.] University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- BAUMANN, G.; MUELLER, P. A molecular model of membrane excitability. *J. Supramol. Struct.*, 1974, v. 2, n. 5-6, p. 538–557.
- BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1758, n. 9, p. 1529–1539, 2006.
- BELLAMY W.; TAKASE, M.; YAMAUCHI, K.; WAKABAYASHI, H.; KAWASE, K.; TOMITA, M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta*. 1992, vol. 1121, n. 1-2, p. 130–136.
- BELMONTE, R.; CRUZ, C.E.; PIRES, J.R.; DAFFRE, S. Purification and characterization of Hb 98-114: A novel hemoglobin-derived antimicrobial peptide from the midgut of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Peptides*, 2012, vol. 37, n. 1, p. 120–127.
- BIEBER, A. L. *Snake Venoms*. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 1979.
- BIGGER, J. W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin. 1944, *The Lancet*, vol. 244, n. 6320, p. 497–500.
- BJÖRN, C.; MAHLAPUU, M.; MATTSBY-BALTZER, I.; HAKANSSON, J. Anti-infective efficacy of the lactoferrin-derived antimicrobial peptide HLR1r. *Peptides*, vol. 81, p. 21–28, 2016.

- BLÁZQUEZ, J. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clin. Infect. Dis.*, 2003, vol. 37, n. 9, p. 1201–1209.
- BLOES, D. A.; KRETSCHMER, D.; PESCHEL, A. Enemy attraction: bacterial agonists for leukocyte chemotaxis receptors. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, vol. 13, n. 2, p. 95–104.
- BOS, M. P.; TOMMASSEN, J. Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2004, vol. 7, n. 6, p. 610–616.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, p. 248–254.
- BRAINE, T. Race against time to develop new antibiotics. *Bull. World. Health. Organ.*, 2011, vol. 89, n. 2, p. 88–89.
- CAMPBELL E.A.; KORZHEVA, N.; MUSTAEV, A.; MURAKAMI, K.; NAIR, S.; GOLDFARB, A.; DARST, S.A. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell*, 2001, vol. 104, n. 6, p. 901–912.
- CARVALHO, L.A.; REMUZGO, C.; PEREZ, K.R.; MACHINI, M.T. Hb40-61a: Novel analogues help expanding the knowledge on chemistry, properties and candidacidal action of this bovine  $\alpha$ -hemoglobin-derived peptide. *Biochim Biophys Acta*. 2015, vol. 1848, n. 12, p. 3140-3149.
- CASEWELL, N.R.; WAGSTAFF, S.C.; HARRISON, R.A.; WÜSTER, W. Gene tree parsimony of multilocus snake venom protein families reveals species tree conflict as a result of multiple parallel gene loss. *Mol. Biol. Evol.*, 2011, vol. 28, n. 3, p. 1157–72.
- CASTANHEIRA, L.E.; NUNES, D.C.; CARDOSO, T.M.; SANTOS PDE, S.; GOULART, L.R.; RODRIGUES, R.S.; RICHARDSON, M.; BORGES, M.H.; YONEYAMA, K.A.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Int. J. Biol Macromol.*, 2013, vol. 54, n. 1, p. 57–64.
- CASTILLO, J.C.; VARGAS, L.J.; SEGURA, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; PÉREZ, J.C. In vitro antiplasmodial activity of phospholipases A2 and a phospholipase homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxins*, 2012, vol. 4, n. 12, p. 1500–1516.
- CHAN, D. I.; PRENNER, E. J.; VOGEL, H. J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2006, vol. 1758, n. 9, p. 1184–1202.
- CHAN, Y.S.; WONG, J.H.; FANG, E.F.; PAN, W.L.; NG, T.B. An antifungal peptide from *Phaseolus vulgaris* cv. brown kidney bean. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 2012, vol. 44, n. 4, p. 307–315.
- CHEN C, KU C, BO X, WANG X. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from sheep reproductive tract. *Biotechnol Lett*, 2015, vol. 37, n. 2, p. 327–332.

- CHEN Z.M.; WU, J.B.; ZHANG, Y.; YU, G.Y.; LEE, W.H.; LU, Q.M.; ZHANG, Y. Jerdonuxin, a novel snake lectin (snake C-type lectin) with platelet aggregation activity from *Trimeresurus jerdonii* venom. *Toxicon*, 2011, vol. 57, n. 1, p. 109–116.
- CHILEVERU, H.R.; LIM, S.A.; CHAIRATANA, P.; WOMMACK, A.J.; CHIANG, I.L.; NOLAN, E.M. Visualizing attack of *Escherichia coli* by the antimicrobial peptide human defensin 5. *Biochemistry*, 2015, vol. 54, n. 9, p. 1767–1777, 2015.
- CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: Appraisal of the global situation. *Bull. World Health Organ.*, 1998, vol. 76, n. 5, p. 515–524.
- CISCOTTO, P.; MACHADO DE AVILA, R.A.; COELHO, E.A.; OLIVEIRA, J.; DINIZ, C.G.; FARIAS, L.M.; DE CARVALHO, M.A.; MARIA, W.S.; SANCHEZ, E.F.; BORGES, A.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*, 2009, vol. 53, n. 3, p. 330–341.
- CLARKE, A.P.; JANDIK, P.; ROCKLIN, R.D.; LIU, Y.; AVDALOVIC, N. An integrated amperometry waveform for the direct, sensitive detection of amino acids and amino sugars following Anion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.*, 1999, vol.71, p. 2774-2781.
- CLEMETSON, K. J.; LU, Q.; CLEMETSON, J. M. Snake C-type lectin-like proteins and platelet receptors. *Pathophysiol Haemost Thromb.*, 2006, vol. 34, n. 4-5, p. 150–155.
- COBIÁN, G. Evaluación de extractos de las hojas de *Gliricidia sepium* ( jacq .) en la inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Mexico D.F. Tese [Mestrado em Tecnologia avançada] - Instituto Politécnico Nacional. 2007.
- COSTA TORRES, A.F.; DANTAS, R.T.; TOYAMA, M.H.; DIZ FILHO, E.; ZARA, F.J.; RODRIGUES DE QUEIROZ, M.G.; PINTO NOGUEIRA, N.A.; ROSA DE OLIVEIRA, M.; DE OLIVEIRA TOYAMA, D.; MONTEIRO, H.S.; MARTINS, A.M. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. *Toxicon*, 2010, vol. 55, n. 4, p. 795–804.
- COSTA, T.R.; MENALDO, D.L.; OLIVEIRA, C.Z.; SANTOS-FILHO, N.A.; TEIXEIRA, S.S.; NOMIZO, A.; FULY, A.L.; MONTEIRO, M.C.; DE SOUZA, B.M.; PALMA, M.S.; STÁBELI, R.G.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. Myotoxic phospholipases A(2) isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. *Peptides*, 2008, vol. 29, n. 10, p. 1645–56.
- CRUZ, C.E.; FOGAÇA, A.C.; NAKAYASU, E.S.; ANGELI, C.B.; BELMONTE, R.; ALMEIDA, I.C. MIRANDA, A.; MIRANDA, M.T.; TANAKA, A.S.; BRAZ, G.R.; CRAIK, C.S.; SCHNEIDER, E.; CAFFREY, C.R.; DAFFRE, S. Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides. *Parasit. Vectors*, 2010, vol. 3, p. 63–78.
- CSPS PHARMACEUTICALS. Peptide Companion -User's Manual. 1994.

- CURA, J.E.; BLANZACO, D.P.; BRISSON, C.; CURA, M.A.; CABROL, R.; LARRATEGUY, L.; MENDEZ, C.; SECHI, J.C.; SILVEIRA, J.S.; THEILLER, E.; DE ROODT, A.R.; VIDAL, J.C. Phase I and Pharmacokinetics Study of Crotoxin ( Cytotoxic PLA 2 , NSC-624244 ) in Patients with Advanced Cancer Phase I and Pharmacokinetics Study of Crotoxin ( Cytotoxic PLA 2 , NSC-624244 ) in Patients with Advanced Cancer 1. *Clin. Cancer Res.*, 2002, vol. 8, n. 4, p. 1033–1041.
- DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N.; BRANEN, A. L. Antimicrobials in food. [s.l.] Taylor & Francis, 2005. 720p.
- DE LATOUR, F.A.; AMER, L.S.; PAPANSTASIOU, E.A.; BISHOP, B.M.; VAN HOEK, M.L. Antimicrobial activity of the *Naja atra* cathelicidin and related small peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, vol. 396, n. 4, p. 825–830.
- DE LIMA, D.C.; ALVAREZ ABREU, P.; DE FREITAS, C.C.; SANTOS, D.O.; BORGES, R.O.; DOS SANTOS, T.C.; MENDES CABRAL, L.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. Snake Venom: Any Clue for Antibiotics and CAM? *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, 2005, vol. 2, n. 1, p. 39–47.
- DE MELO ALVES PAIVA, R.; DE FREITAS FIGUEIREDO, R.; ANTONUCCI, G.A.; PAIVA, H.H.; DE LOURDES PIRES BIANCHI, M.; RODRIGUES, K.C.; LUCARINI, R.; CAETANO, R.C.; LINHARI RODRIGUES PIETRO, R.C.; GOMES MARTINS, C.H.; DE ALBUQUERQUE, S.; SAMPAIO, S.V. Cell cycle arrest evidence, parasiticidal and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochimie*, 2011, vol. 93, n. 5, p. 941–947.
- DE OLIVEIRA JUNIOR, N. G.; E SILVA CARDOSO, M. H.; FRANCO, O. L. Snake venoms: attractive antimicrobial proteinaceous compounds for therapeutic purposes. *Cell. Mol. life Sci.*, 2013, vol. 70, n. 24, p. 4645–4658.
- DEVER, L. A.; DERMODY, T. S. Mechanisms of Bacterial Resistance to Antibiotics. *Arch. Intern. Med.*, 1991, vol. 151, n. 5, p. 886–895.
- DING, Y.; YU, H.; MOU, S. Direct determination of free amino acids and sugars in green tea by anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *J. Chromatography A*, 2002, vol. 982, p. 237–244.
- DÖRRIES, K.; SCHLUETER, R.; LALK, M. Impact of Antibiotics with Various Target Sites on the Metabolome of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, vol. 58, n. 12, p. 7151–7163.
- DU, X.-Y.; CLEMETSON, K. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon*, 2002, vol. 40, n. 6, p. 659–665.
- DUVICK, J.P.; ROOD, T.; RAO, A.G.; MARSHAK, D.R. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, n. 26, p. 18814–18820.
- ELSHERIF, R.H.; ISMAIL, D.K.; EL-KHOLY, Y.S.; GOHAR, N.M.; ELNAGDY, S.M.; ELKRALY, O.A. Integron-mediated multidrug resistance in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from fecal specimens in Egypt. *J. Egypt. Public. Health. Assoc.*, 2016, vol. 91, n. 2, p. 73–79.

- EPAND, R.M.; EPAND, R.F.; ARNUSCH, C.J.; PAPAHADJOPOULOS-STERNBERG, B.; WANG, G.; SHAI, Y. Lipid clustering by three homologous arginine-rich antimicrobial peptides is insensitive to amino acid arrangement and induced secondary structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, vol. 1798, n. 6, p. 1272–1280.
- FADAEI, V. Milk Proteins-derived antibacterial peptides as novel functional food ingredients. *Ann. Biol. Res.*, 2012, vol. 3, n. 5, p. 2520–2526.
- FAN, J.; HE, J.; ZHUANG, Y.; SUN, L. Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) frame protein. *Molecules*, 2012, vol. 17, n. 11, p. 12836–12850.
- FEHLBAUM, P.1.; BULET, P.; MICHAUT, L.; LAGUEUX, M.; BROEKAERT, W.F.; HETRU, C.; HOFFMANN, J.A. Insect immunity: Septic injury of drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J. Biol. Chem.*, vol. 269, n. 52, p. 33159–33163, 1994.
- FERNÁNDEZ, J.; GUTIÉRREZ, J.M.; ANGULO, Y.; SANZ, L.; JUÁREZ, P.; CALVETE, J.J.; LOMONTE, B. Isolation of an acidic phospholipase A2 from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: biochemical and toxicological characterization. *Biochimie*, 2010, vol. 92, n. 3, p. 273–283.
- FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*, 1970, vol. 9, n. 13, p. 2583–2593.
- FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Bull. World Health Org.*, 1929, vol. 79, n. 8, p. 780–790.
- FLEMING, S. A. Nobel Lecture, December 11, 1945. Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1942-1962.
- FOGAÇA, A.C.; DA SILVA, P.I. JR.; MIRANDA, M.T.; BIANCHI, A.G.; MIRANDA, A.; RIBOLLA, P.E.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, n. 36, p. 25330–25334.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS journal*, 2008, vol. 275, n. 12, p. 3016–3030.
- FROLOVA, L.Y.; MELDRAYS, Y.A.; KOCHKINA, L.L.; GILLER, S.A.; EREMEYEV, A.V.; GRAYEVSKAYA, N.A.; KISSELEV, L.L. DNA-polymerase inhibitors. Rifamycin derivatives. *Nucleic Acids Res.*, 1977, vol. 4, n. 3, p. 523–538.
- GALANTH, C.; ABBASSI, F.; LEQUIN, O.; AYALA-SANMARTIN, J.; LADRAM, A.; NICOLAS, P.; AMICHE, M. Mechanism of Antibacterial Action of Dermaseptin B2: Interplay between Helix–Hinge–Helix Structure and Membrane Curvature Strain. *Biochemistry*, 2009, vol. 48, n. 2, p. 313–327.
- GANS, C. Reptilian venoms: some evolutionary considerations. IN: Gans and Gans, *Biology of the Reptilia.*, 1978, 8(q.v.): 1-42.

- GLASER, H. S. R. Bactericidal Activity of Crotalus Venom in Vitro. *Copeia*, 1948, vol. 1948, n. 4, p. 245–247.
- GOMES, A.; BHATTACHARJEE, P.; MISHRA, R.; BISWAS, A.K.; DASGUPTA, S.C.; GIRI, B. Anticancer potential of animal venoms and toxins. *Indian J. Exp. Biol.*, 2010, vol. 48, n. 2, p. 93–103.
- Gomes, V.M.; Carvalho, A.O.; Da Cunha, M.; Keller, M.N.; Bloch, C. Jr.; Deolindo, P.; Alves, E.W. Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, 2005, vol. 45, n. 7, p. 817–827.
- GOWDA, C.D.; SHIVAPRASAD, H.V.; KUMAR, R.V.; RAJESH, R.; SAIKUMARI, Y.K.; FREY, B.M.; FREY, F.J.; SHARATH, B.K.; VISHWANATH, B.S. Characterization of major zinc containing myonecrotic and procoagulant metalloprotease “malabarin” from non lethal *Trimeresurus malabaricus* snake venom with thrombin like activity: its neutralization by chelating agents. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2011, vol. 11, n. 20, p. 2578–2588.
- Grage, S.; Afonin, S.; Kara, S.; Buth, G.; Ulrich, A. Membrane Thinning and Thickening Induced by Membrane-Active Amphipathic Peptides. *Front. Cell. Dev. Biol.*, 2016, vol. 4, n. June, p. 1–13.
- GROMOVA, I.; CELIS, J. E. Protein Detection in Gels by Silver Staining: A Procedure Compatible with Mass Spectrometry. In: *Cell Biology*, 2006, Four-Volume Set. vol. 4p. 219–223.
- GROSS, E.; MORELL, J. L. The structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, vol. 93, n. 18, p. 4634–4635.
- GUÉRCIO, R.A.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A.; LÓPEZ-LOZANO, J.L.; PABA, J.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci.*, 2006, vol. 4, p. 11.
- GUPTA, R. S. Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: Antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2011, vol. 100, n. 2, p. 171–182.
- HAMMAMI, R.; BEN HAMIDA, J.; VERGOTEN, G.; FLISS, I. PhytAMP: A database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Res.*, 2009, vol. 37,(Database issue), p.963–968.
- HANCOCK, R. E. Peptide antibiotics. *Lancet*, 1997, vol. 349, n. 9049, p. 418–422.
- HANCOCK, R. E. W.; LEHRER, R. Cationic peptides: A new source of antibiotics. *Trends Biotech*, 1998, vol. 16, n. 2, p. 82–88.
- HANEY, E.F.; NATHOO, S.; VOGEL, H.J.; PRENNER, E.J. Induction of non-lamellar lipid phases by antimicrobial peptides: a potential link to mode of action. *Chem. Phys. Lipids*, 2010, vol. 163, n. 1, p. 82–93.
- HARMER, C. J.; HALL, R. M. Carrying Antibiotic Resistance Genes. *mSphere*, 2016, vol. 1, n. 2, p. 1–8.
- HASSING, R.J.; GOESSENS, W.H.; ZENEYEDPOUR, L.; SULTAN, S.; VAN KAMPEN, J.J.; VERBON, A.; VAN GENDEREN, P.J.; HAYS, J.P.; LUIDER, T.M.; DEKKER,

- L.J. Detection of amino acid substitutions in the GyrA protein of fluoroquinolone-resistant typhoidal *Salmonella* isolates using high-resolution mass spectrometry. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2016, p. 1–6.
- HITE, L.A.; JIA, L.G.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. cDNA Sequences for Four Snake Venom Metalloproteinases: Structure, Classification, and Their Relationship to Mammalian Reproductive Proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994, vol. 308, n. 1, p. 182–191.
- HOBBY, G. L.; MEYER, K.; CHAFFEE, E. Observations on the Mechanism of Action of Penicillin. *Exp. Biol. Med.*, 1942, vol. 50, n. 2, p. 281–285.
- HOGUE, C. W. V. Cn3D: A new generation of three-dimensional molecular structure viewer. *Trends Biochem. Sci.*, 1997, vol. 22, n. 8, p. 314–316.
- HONG, W.; LI, T.; SONG, Y.; ZHANG, R.; ZENG, Z.; HAN, S.; ZHANG, X.; WU, Y.; LI, W.; CAO, Z. Inhibitory activity and mechanism of two scorpion venom peptides against herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res.*, 2014, vol. 102, n. 1, p. 1–10.
- HU, Y.; SHAMAEI-TOUSI, A.; LIU, Y.; COATES, A. A new approach for the discovery of antibiotics by targeting non-multiplying bacteria: A novel topical antibiotic for Staphylococcal infections. *PLoS ONE*, 2010, vol. 5, n. 7.
- HUANG, Z.; HU, Y.; SHOU, L.; SONG, M. Isolation and partial characterization of cyclic lipopeptide antibiotics produced by *Paenibacillus ehimensis* B7. *BMC microbiology*, 2013, vol. 13, n. 1, p. 87.
- HURDLE, J.G.; O'NEILL, A.J.; CHOPRA, I.; LEE, R.E. Targeting Bacterial Membrane Function: An Underexploited Mechanism for Treating Persistent Infections. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2011, vol. 9, n. 1, p. 62–75.
- IBRAHIM, H. R.; IMAZATO, K.; ONO, H. Human lysozyme possesses novel antimicrobial peptides within its N-terminal domain that target bacterial respiration. *J. Agricul. Food Chem.*, 2011, vol. 59, n. 18, p. 10336–10345.
- IZIDORO, L. F. M. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. *BioMed Res. Int.*, 2014, vol. 2014, p. 1–19.
- JABRANE, A.; SABRI, A.; COMPÈRE, P.; JACQUES, P.; VANDENBERGHE, I.; VAN BEEUMEN, J.; THONART, P. Characterization of serracin P, a phage-tail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Appl Environ Microbiol*, 2002, vol. 68, n. 11, p. 5704–5710.
- JANG, A.; JOB, C.; KANG, K.; LEE, M. Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Food Chem.*, 2008, vol. 107, n. 1, p. 327–336.
- JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, 2006, vol. 19, n. 3, p. 491–511.
- JOHNSON, J.H.; BLOOMQUIST, J.R.; KRAPCHO, K.J.; KRAL, R.M.JR.; TROVATO, R.; EPPLER, K.G.; MORGAN, T.K.; DELMAR, E.G. Novel insecticidal peptides from *Tegenaria agrestis* spider venom may have a direct effect on the insect central nervous system. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1998, vol. 38, n. 1, p. 19–31.



- JORGENSEN, J.H.; WEIGEL, L.M.; FERRARO, M.J.; SWENSON, J.M.; TENOVER, F.C. Activities of newer fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates including those with mutations in the *gyrA*, *parC*, and *parE* loci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol. 43, n. 2, p. 329–334.
- JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; CHING, A.T.; CARVALHO, E.; FARIA, F.; NISHIYAMA, M.Y. JR.; HO, P.L.; DINIZ, M.R. *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: Implications for snake toxin repertoire evolution. *Genetics*, 2006, vol. 173, n. 2, p. 877–889.
- KAISER, E.; COLESCOTT, R.L.; BOSSINGER, C.D.; COOK, P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.*, 1970, vol. 34, n. 2, p. 595–598.
- KAMODA, O.; ANZAI, K.; MIZOGUCHI, J.; SHIOJIRI, M.; YANAGI, T.; NISHINO, T.; KAMIYA, S. In vitro activity of a novel antimicrobial agent, TG44, for treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, vol. 50, n. 9, p. 3062–3069.
- KASHIMA, S.1.; ROBERTO, P.G.; SOARES, A.M.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J.O.; GIULIATI, S.; FARIA, M. JR.; XAVIER, M.A.; FONTES, M.R.; GIGLIO, J.R.; FRANÇA, S.C. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I--gene expression profile of highly expressed phospholipases A2. *Biochimie*, 2004, vol. 86, n. 3, p. 211–9, mar.
- KASSAB, B.H.; DE CARVALHO, D.D.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C. Characterization Of A Hemagglutinating Glycoprotein Isolated From *Bothrops moojeni* Snake Venom. *Protein and Peptide Lett.*, 2001, vol. 8, n. 1, p. 13–20.
- KAWASAKI. Complete Amino Acid Sequence and Identification of the Platelet Glycoprotein Ib-binding Site of Jararaca GPIb-BP, a Snake Venom Protein Isolated from *Bothrops jararaca*. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, n. 18, p. 10635–10639.
- KAWASAKI, T.; FUJIMURA, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; MIURA, S.; SAKURAI, Y.; MAKITA, K.; TANIUCHI, Y.; HIRANO, K.; TITANI, K. Complete Amino Acid Sequence and Identification of the Platelet Glycoprotein Ib-binding Site of Jararaca GPIb-BP , a Snake Venom Protein Isolated from *Bothrops jararaca* receptor blocker for von Willebrand factor binding to their peptides generated by di. *Biochemistry*, 1996, vol. 271, n. 18, p. 10635–10639.
- KIM, J.Y.; GOPAL, R.; KIM, S.Y.; SEO, C.H.; LEE, H.B.; CHEONG, H.; PARK, Y. PG-2, a potent AMP against pathogenic microbial strains, from potato (*Solanum tuberosum* L cv. Gogu Valley) tubers not cytotoxic against human cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, n. 2, p. 4349–4360.
- KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochem. J.*, 2006, vol. 397, n. 3, p. 377–387.
- KLOSKOWSKI, T.; GURTOWSKA, N.; OLKOWSKA, J.; NOWAK, J.M.; ADAMOWICZ, J.; TWORKIEWICZ, J.; DEBSKI, R.; GRZANKA, A.; DREWA, T. Ciprofloxacin is a

- potential topoisomerase II inhibitor for the treatment of NSCLC. *Int. J. Oncol.*, 2012, vol. 41, n. 6, p. 1943–1949.
- KOHLHOFF, M.; BORGES, M.H.; YARLEQUE, A.; CABEZAS, C.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. *J. Proteomics*, 2012, vol. 75, n. 7, p. 2181–2195.
- KONG, W.; WANG, J.; XING, X.; JIN, C.; XIAO, X.; ZHAO, Y.; ZHANG, P.; ZANG, Q.; LI, Z. Screening for novel antibacterial agents based on the activities of compounds on metabolism of *Escherichia coli*: A microcalorimetric study. *J. Hazar. Mater.*, 2011, vol. 185, n. 1, p. 346–352.
- KONNO, K.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V.P.; BRIGATTE, P.; ZAMBELLI, V.O.; CAMARGO, A.C.; CURY, Y. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Peptides*, 2008, vol. 29, n. 8, p. 1293–1304.
- KRAGOL, G.; LOVAS, S.; VARADI, G.; CONDIE, B.A.; HOFFMANN, R.; OTVOS, L. JR. The Antibacterial Peptide Pyrrocoricin Inhibits the ATPase Actions of DnaK and Prevents Chaperone-Assisted Protein Folding. *Biochemistry*, 2001, vol. 40, n. 10, p. 3016–3026.
- KUMAR, R.V.; GOWDA, C.D.; SHIVAPRASAD, H.V.; SIDDESHA, J.M.; SHARATH, B.K.; VISHWANATH, B.S. Purification and characterization of “Trimarin” a hemorrhagic metalloprotease with factor Xa-like Activity, from *Trimeresurus malabaricus* snake venom. *Thromb. Res.*, 2010, vol. 126, n. 5, p. e356–64.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, n. 5259, p. 680–685.
- LAHOV, E.; REGELSON, W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Casecidin, isracidin peptides. *Food Chemical Toxicol*, 1996, vol. 34, n. 1, p. 131–145.
- LAM, W. W. T.; SIU, S. W. I. PyMOL mControl: Manipulating molecular visualization with mobile devices. *Biochemistry and molecular biology education: a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 2016.
- LAZARIDIS, T.; HE, Y.; PRIETO, L. Membrane interactions and pore formation by the antimicrobial peptide protegrin. *Biophys. J.*, 2013, vol. 104, n. 3, p. 633–642.
- LAZO, F. et al. Actividad antimicrobiana de una flavoproteína aislada del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* (“Jergón”). *Rev. Soc. Quím. Perú*, 2007, vol. 73, n. 4, p. 197–207.
- LEE, M.T.; SUN, T.L.; HUNG, W.C.; HUANG, H.W. Process of inducing pores in membranes by melittin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2013, vol. 110, n. 35, p. 14243–14248.
- LI, Y.; XIANG, Q.; ZHANG, Q.; HUANG, Y.; SU, Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 2012, vol. 37, n. 2, p. 207–215.

- LIAO, M.; GU, W.M.; YANG, Y.; DILLON, J.A. Analysis of mutations in multiple loci of *Neisseria gonorrhoeae* isolates reveals effects of PIB, PBP2 and MtrR on reduced susceptibility to ceftriaxone. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2011, vol. 66, n. 5, p. 1016–1023.
- LIEPKE, C.; ZUCHT, H.D.; FORSSMANN, W.G.; STÄNDKER, L. Purification of novel peptide antibiotics from human milk. *Journal of chromatography. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 2001, vol. 752, n. 2, p. 369–377.
- LIEPKE, C. et al. Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: A class of host defense peptides. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2003, vol. 791, n. 1-2, p. 345–356.
- LIU, H.; MU, L.; TANG, J.; SHEN, C.; GAO, C.; RONG, M.; ZHANG, Z.; LIU, J.; WU, X.; YU, H.; LAI, R. A potential wound healing-promoting peptide from frog skin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2014, vol. 49, p. 32–41.
- Liu, Z.; Dong, S.; Xu, Jie.; Zeng, M.; Song, H.; Zhao, Y. Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin. *Food Control*, 2008, vol. 19, n. 3, p. 231–235.
- LIVERMORE, D. M. Introduction: the challenge of multiresistance. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2007, vol. 29, p. S1–S7.
- LOFFREDO, C. Estudo das sínteses de peptídeos em fase sólida passo a passo e convergente a 60 °C usando aquecimento convencional e micro-ondas. São Paulo. Tese [Doutorado em Ciências (Bioquímica)]. Instituto de Química-USP. 2009.
- LUDTKE, S.J.; HE, K.; HELLER, W.T.; HARROUN, T.A.; YANG, L.; HUANG, H.W. Membrane Pores Induced by Magainin. *Biochemistry*, 1996, vol. 35, n. 43, p. 13723–13728.
- MACHADO, A.; SFORÇA, M.L.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; PERTINHEZ, T.A.; SPISNI, A.; MIRANDA, M.T. Truncation of Amidated Fragment 33–61 of Bovine  $\alpha$ -Hemoglobin: Effects on the Structure and Anticandidal Activity. *Biopolymers*, 2007, vol. 88, n. 3, p. 413–426.
- MACKESSY, S. P. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. Boca Raton, FL.: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2010.
- Mak, P.; Wójcik, K.; Wicherek, L.; Suder, P.; Dubin, A. Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood. *Peptides*, 2004, vol. 25, n. 11, p. 1839–1847.
- Malott, R.J.; Wu, C.H.; Lee, T.D.; Hird, T.J.; Dalleska, N.F.; Zlosnik, J.E.; Newman, D.K.; Speert, D.P. Fosmidomycin decreases membrane hopanoids and potentiates the effects of Colistin on *Burkholderia multivorans* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, vol. 58, n. 9, p. 5211–5219.
- MARTIN, E.; GANZ, T.; LEHRER, R. I. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J. Leukoc. Biol.*, 1995, vol. 58, n. 2, p. 128–136.
- MATTILA, J.-P.; SABATINI, K.; KINNUNEN, P. K. J. Oxidized phospholipids as potential molecular targets for antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2008, vol. 1778, n. 10, p. 2041–2050.

- MAUPETIT, J.; DERREUMAUX, P.; TUFFERY, P. PEP-FOLD: An online resource for de novo peptide structure prediction. *Nucleic Acids Res.*, 2009, vol. 37, n. SUPPL. 2, p. 498–503.
- MCTAGGART, L. A.; RIGBY, R. C.; ELLIOTT, T. S. J. The pathogenesis of urinary tract infections associated with *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus* and *S. epidermidis*. *J. Med. Microbiol.*, 1990, vol. 32, n. 2, p. 135–141.
- Medaney, F.; Dimitriu, T.; Ellis, R.J.; Raymond, B. Live to cheat another day: bacterial dormancy facilitates the social exploitation of  $\beta$ -lactamases. *ISME J.*, 2016, vol. 10, n. 3, p. 778–787.
- MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, n. 14, p. 2149–2154.
- MIHAJLOVIC, M.; LAZARIDIS, T. Antimicrobial peptides bind more strongly to membrane pores. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2010, vol. 1798, n. 8, p. 1494–1502.
- MILAN, B.; MARIJA, B.; JELENA, I.; JELENA, J.; MARIJA, D.; RADMILA1, M.; BALTIĆ, T. Bioactive peptides from meat and their influence on human health. *Tehnologija Mesa*, 2014, vol. 55, n. 1, p. 8–21.
- MINISTÉRIO DE SALUD. Norma técnica sobre prevención y tratamiento de accidentes por animales ponzoñosos. 2004, p. 1-58.
- MIRANDA, M. T. M.; LIRIA, C. W.; REMUZGO, C. Difficult Peptides. In: Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. p. 549–569.
- MITEVA, M.; ANDERSSON, M.; KARSHIKOFF, A.; OTTING, G. Molecular electroporation: A unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. *FEBS Lett.*, 1999, vol. 462, n. 1-2, p. 155–158.
- MORITA, T. Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. *Toxicon*, 2005, vol. 45, n. 8, p. 1099–1114.
- MOURA-DA-SILVA, A.M.; FURLAN, M.S.; CAPORRINO, M.C.; GREGO, K.F.; PORTES-JUNIOR, J.A.; CLISSA, P.B.; VALENTE, R.H.; MAGALHÃES, G.S. Diversity of metalloproteinases in *Bothrops neuwiedi* snake venom transcripts: evidences for recombination between different classes of SVMPs. *BMC genetics*, 2011, vol. 12, n. 94, p. 1–14.
- MURILLO, L.A.; LAN, C.Y.; AGABIAN, N.M.; LARIOS, S.; LOMONTE, B. Original synthetic peptide variant against *Candida albicans*. *Rev. Esp. Quimioterap.*, 2007, vol. 20, n. 3, p. 330–333.
- MURZYN, K.; PASENKIEWIECZ-GIERULA, M. Construction of a toroidal model for the magainin pore. *J. Mol. Model.*, 2003, vol. 9, n. 4, p. 217–224.
- NAIR, D.G.; FRY, B.G.; ALEWOOD, P.; KUMAR, P.P.; KINI, R.M. Antimicrobial activity of omwaprin, a new member of the waprin family of snake venom proteins. *Biochem. J.*, 2007, vol. 402, n. 1, p. 93–104.

- NAUMANN, G.B.; SILVA, L.F.; SILVA, L.; FARIA, G.; RICHARDSON, M.; EVANGELISTA, K.; KOHLHOFF, M.; GONTIJO, C.M.; NAVDAEV, A.; DE REZENDE, F.F.; EBLE, J.A.; SANCHEZ, E.F. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2011, vol. 1810, n. 7, p. 683–94.
- NEALE, C.; HSU, J.C.; YIP, C.M.; POMÈS, R. Indolicidin binding induces thinning of a lipid bilayer. *Biophys. J.*, 2014, vol. 106, n. 8, p. L29–L31.
- NEDJAR-ARROUME, N.; DUBOIS-DELVAL, V.; MILOUDI, K.; DAOUD, R.; KRIER, F.; KOUACH, M.; BRIAND, G.; GUILLOCHON, D. Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides*, 2006, vol. 27, n. 9, p. 2082–2089.
- NGUYEN, G.K.; ZHANG, S.; NGUYEN, N.T.; NGUYEN, P.Q.; CHIU, M.S.; HARDJOJO, A.; TAM, J.P. Discovery and characterization of novel cyclotides originated from chimeric precursors consisting of albumin-1 chain a and cyclotide domains in the fabaceae family. *J. Biol. Chem.*, 2011, vol. 286, n. 27, p. 24275–24287.
- NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.*, 2011, vol. 29, n. 9, p. 464–472.
- NICASTRO, G. G. Busca por alvos de regulação pelo segundo mensageiro c-di-GMP em *Pseudomonas aeruginosa*. São Paulo. Tese [Doutorado em Ciências (Bioquímica)]. Instituto de Química-USP. 2013.
- NIKAI, T.; TANIGUCHI, K.; KOMORI, Y.; MASUDA, K.; FOX, J.W.; SUGIHARA, H. Primary structure and functional characterization of bilitoxin-1, a novel dimeric P-II snake venom metalloproteinase from *Agkistrodon bilineatus* venom. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, vol. 378, n. 1, p. 6–15.
- NITSCHKE, C.; SCHREIER, V.N.; BEHNAM, M.A.; KUMAR, A.; BARTENSCHLAGER, R.; KLEIN, C.D. Thiazolidinone–peptide hybrids as dengue virus protease inhibitors with antiviral activity in cell culture. *J. Med. Chem.* 2013, vol. 56, n. 21, p. 8389–8403.
- NUNES EDOS, S.; DE SOUZA, M.A.; VAZ, A.F.; SANTANA, G.M.; GOMES, F.S.; COELHO, L.C.; PAIVA, P.M.; DA SILVA, R.M.; SILVA-LUCCA, R.A.; OLIVA, M.L.; GUARNIERI, M.C.; CORREIA, M.T. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 2011, vol. 159, n. 1, p. 57–63.
- NUNES EDOS, S.; DE SOUZA, M.A.; VAZ, A.F.; SANTANA, G.M.; GOMES, F.S.; COELHO, L.C.; PAIVA, P.M.; DA SILVA, R.M.; SILVA-LUCCA, R.A.; OLIVA, M.L.; GUARNIERI, M.C.; CORREIA, M.T. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. *Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, Part B, Biochemistry & molecular biology, 2011, vol. 159, n. 1, p. 57–63.
- NYBERG, L.K.; QUADERI, S.; EMILSSON, G.; KARAMI, N.; LAGERSTEDT, E.; MÜLLER, V.; NOBLE, C.; HAMMARBERG, S.; NILSSON, A.N.; SJÖBERG, F.; FRITZSCHE, J.; KRISTIANSSON, E.; SANDEGREN, L.; AMBJÖRNSSON, T.;

- WESTERLUND, F. Rapid identification of intact bacterial resistance plasmids via optical mapping of single DNA molecules. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, p. 1–10.
- OKUBO, B.M.; SILVA, O.N.; MIGLIOLO, L.; GOMES, D.G.; PORTO, W.F.; BATISTA, C.L.; RAMOS, C.S.; HOLANDA, H.H.; DIAS, S.C.; FRANCO, O.L.; MORENO, S.E. Evaluation of an antimicrobial L-amino acid oxidase and peptide derivatives from *Bothropoides matogrosensis* pitviper venom. *PloS one*, 2012, vol. 7, n. 3, p. e33639.
- OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; GUIMARÃES, P.R.; ABREU, P.A.; DUTRA, D.L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; RODRIGUES, C.R.; HO, P.L.; CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B. Identification and characterization of a new member of snake venom thrombin inhibitors from *Bothrops insularis* using a proteomic approach. *Toxicon*, 2008, vol. 51, n. 4, p. 659–671.
- OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Peptide Sci.*, 1998, vol. 47, n. 6, p. 451–463.
- ORTIZ, C.; LAZO, F.; BELLIDO, C.; GONZALES, E.; YARLEQUÉ, A. Variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* “jergón”, de tres zonas geográficas del Perú. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública*, 2012, vol. 29, n. 2, p. 198–205.
- PAINE, M.J.; DESMOND, H.P.; THEAKSTON, R.D.; CRAMPTON, J.M. purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, Jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, n. 32, p. 22869–22876.
- PANUNTO, P.C.; DA SILVA, M.A.; LINARDI, A.; BUZIN, M.P.; MELO, S.E.; MELLO, S.M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*, 2006, vol. 47, n. 1, p. 21–31.
- PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOCHEA, J.A.; GORVEL, J.P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: Synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)- peptide identifies its bactericidal region. *Eur. J. Biochem.*, 1998a, vol. 253, n. 2, p. 452–461.
- PAREDES MEDINA, E. A. Informe del Evento Accidente Ofídico Final Año 2012. Informe Del Evento Accidente Ofídico Final Año 2012. 2012, n. 1, p. 1–22.
- PATA, S.; YARAKSA, N.; DADUANG, S.; TEMSIRIPONG, Y.; SVASTI, J.; ARAKI, T.; THAMMASIRIRAK, S. Characterization of the novel antibacterial peptide Leucrocin from crocodile (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts. *Dev. Com. Immunol.*, 2011, vol. 35, n. 5, p. 545–553.
- PEICHOTO, M.E.; ACOSTA, O.; LEIVA, L.; TEIBLER, P.; MARUÑAK, S.; RUÍZ, R. Muscle and skin necrotizing and edema-forming activities of Duvernoy’s gland secretion of the xenodontine colubrid snake *Philodryas patagoniensis* from the north-east of Argentina. *Toxicon*, 2004, vol. 44, n. 6, p. 589–596.

- PELLEGRINI, A.; THOMAS, U.; BRAMAZ, N.; HUNZIKER, P.; VON FELLEBERG, R. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine  $\alpha$ -lactalbumin molecule. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, vol. 1426, n. 3, p. 439–448.
- PEREIRA-BITTENCOURT, M.; CARVALHO, D.D.; GAGLIARDI, A.R.; COLLINS, D.C. The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. *Anticancer Res.*, 1999, vol. 19, n. 5B, p. 4023–4025.
- PERUMAL SAMY, R.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; THWIN, M.M.; CHOW, T.K.; BOW, H.; YAP, E.H.; THONG, T.W. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes. *J. Appl. Microbiol.*, 2007, vol. 102, n. 3, p. 650–659.
- PERUMAL SAMY, R.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; HO, B.; CHOW, V.T. Purification, characterization and bactericidal activities of basic phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon halys* (Chinese pallas). *Biochimie*, 2008, vol. 90, n. 9, p. 1372–1388.
- PIPKORN, R.; BOENKE, C.; GEHRKE, M.; HOFFMANN, R. High-throughput peptide synthesis and peptide purification strategy at the low micromol-scale using the 96-well format. *J. Pept. Res.*, 2002, vol. 59, n. 3, p. 105–114.
- PRENNER, E. J.; LEWIS, R. N. A.; MCELHANEY, R. N. The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1999, vol. 1462, n. 1-2, p. 201–221.
- RANGEL, D.; GARCIA, I.; VELASCO, J.; BUITRAGO, D. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* ( Ruiz et Pavon ) Pers. *Rev. Fac. Farm.*, 2001, vol. 42, p. 43–46.
- RATZKA, C.; FÖRSTER, F.; LIANG, C.; KUPPER, M.; DANDEKAR, T.; FELDHAAR, H.; GROSS, R. Molecular characterization of antimicrobial peptide genes of the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, n. 8, p. 1–10.
- REEKS, T. A.; FRY, B. G.; ALEWOOD, P. F. Privileged frameworks from snake venom. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2015, vol. 72, p. 1939–1958.
- REMUZGO RUIZ, C. M. Estudos de síntese, relação estrutura-atividade e modo de ação de peptídeos antimicrobianos ricos em glicina. São Paulo. Tese [Mestrado em Ciências (Bioquímica)]. Instituto de Química-USP. 2008.
- REMUZGO, C.; OEWEL, T.S.; DAFFRE, S.; LOPES, T.R.; DYSZY, F.H.; SCHREIER, S.; MACHADO-SANTELLI, G.M.; MACHINI M.T. Chemical synthesis, structure-activity relationship, and properties of shepherin I: A fungicidal peptide enriched in glycine-glycine-histidine motifs. *Amino Acids*, 2014 vol. 46, n. 11, p. 2573–2586.
- RIVAS, L.; GANZ, T. Eukaryotic antibiotic peptides: not only a membrane business. *Drug Discovery Today*, 1999, vol. 4, n. 6, p. 254–256.
- ROBERTO, P.G.; KASHIMA, S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, J.O.; ASTOLFI-FILHO, S.; NOMIZO, A.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.; SOARES, A.M.; FRANÇA, S.C. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* venom. *Protein J.*, 2004, vol. 23, n. 4, p. 273–285.

- RODRIGUES, V.M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R.S.; DE ARAÚJO, A.L.; MALTA-NETO, N.R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E.A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. *Toxicon*, 2004, vol. 44, n. 3, p. 305–314.
- ROGERS, L. A.; WHITTIER, E. O. Limiting factors in the lactic fermentation. *J. Bacteriol.*, 1928, vol. 16, n. 4, p. 211–229.
- ROKITSKAYA, T.I.; KOLODKIN, N.I.; KOTOVA, E.A.; ANTONENKO, Y.N. Indolicidin action on membrane permeability: Carrier mechanism versus pore formation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2011, vol. 1808, n. 1, p. 91–97.
- ROKYTA, D.R.; LEMMON, A.R.; MARGRES, M.J.; ARONOW, K. The venom-gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *BMC genomics*, 2012, vol. 13, p. 312.
- ROKYTA, D. R.; MARGRES, M. J.; CALVIN, K. Post-Transcriptional Mechanisms Contribute Little to Phenotypic Variation in Snake Venoms. *G3 (Bethesda)*, 2015, vol. 5, n. 11, p. 2375–2382.
- ROY, A.; MAHATA, D.; PAUL, D.; KORPOLE, S.; FRANCO, O.L.; MANDAL, S.M. Purification, biochemical characterization and self-assembled structure of a fengycin-like antifungal peptide from *Bacillus thuringiensis* strain SM. *Frontiers in Microbiology*, 2013, vol. 4, p. 1–6.
- SAGUCHI, K.; HAGIWARA-SAGUCHI, Y.; MURAYAMA, N.; OHI, H.; FUJITA, Y.; CAMARGO, A.C.; SERRANO, S.M.; HIGUCHI, S. Molecular cloning of serine proteinases from *Bothrops jararaca* venom gland. *Toxicon*, 2005, vol. 46, n. 1, p. 72–83.
- SAMY, R.P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; CHOW. V.T.; HO, B. Viper metalloproteinase (*Agkistrodon halys Pallas*) with antimicrobial activity against multi-drug resistant human pathogens. *J. Cell. Physiol.*, 2008, vol. 216, n. 1, p. 54–68.
- SANT'ANA, C.D.; TICLI, F.K.; OLIVEIRA, L.L.; GIGLIO, J.R.; RECHIA, C.G.; FULY, A.L.; SELISTRE DE ARAÚJO, H.S.; FRANCO, J.J.; STABELI, R.G.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. BjuSSU-SP-I: A new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 2008, vol. 151, n. 3, p. 443–454.
- SCHÄGGER, H. Tricine–SDS-PAGE. *Nature Protocols*, vol. 1, n. 1, p. 16–22, 2006.
- SCHILLACI, D.; CUSIMANO, M.G.; SPINELLO, A.; BARONE, G.; RUSSO, D.; VITALE, M.; PARRINELLO, D.; ARIZZA, V. Paracentrin 1, a synthetic antimicrobial peptide from the sea-urchin *Paracentrotus lividus*, interferes with staphylococcal and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *AMB Express*, 2014, vol. 4, p. 78.
- SCOPEL E SILVA, D.; DE CASTRO, C.C.; DA SILVA E SILVA, F.; SANT'ANNA, V.; VARGAS, G.D.; DE LIMA, M.; FISCHER, G.; BRANDELLI, A.; DA MOTTA ADE, S.; HÜBNER SDE, O. Antiviral activity of a *Bacillus* sp. P34 peptide against pathogenic viruses of domestic animals. *Braz. J. Microbiol.*, 2014, vol. 45, n. 3, p. 1089–1094.



- SENGUPTA, D.; LEONTIADOU, H.; MARK, A.E.; MARRINK, S.J. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, vol. 1778, n. 10, p. 2308–2317.
- SEO, J.K.; LEE, M.J.; JUNG, H.G.; GO, H.J.; KIM, Y.J.; PARK, N.G. Antimicrobial function of SH $\beta$ AP, a novel hemoglobin  $\beta$  chain-related antimicrobial peptide, isolated from the liver of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *Fish Shellfish Immunol.*, 2014, vol. 37, n. 1, p. 173–183.
- SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*, 2005, vol. 45, n. 8, p. 1115–1132.
- SFORÇA, M.L.; MACHADO, A.; FIGUEREDO, R.C.; OYAMA, S. JR.; SILVA, F.D.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; MIRANDA, M.T.; SPISNI, A.; PERTINHEZ, T.A. The micelle-bound structure of an antimicrobial peptide derived from the alpha-chain of bovine hemoglobin isolated from the tick *Boophilus microplus*. *Biochemistry*, 2005y, vol. 44, n. 17, p. 6440–6451.
- SIIBAK, T.; PEIL, L.; XIONG, L.; MANKIN, A.; REMME, J.; TENSON, T. erythromycin- and chloramphenicol-induced ribosomal assembly defects are secondary effects of protein synthesis inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, vol. 53, n. 2, p. 563–571.
- SILVA, C.A.; ZULIANI, J.P.; ASSAKURA, M.T.; MENTELE, R.; CAMARGO, A.C.; TEIXEIRA, C.F.; SERRANO, S.M. Activation of alpha(M)beta(2)-mediated phagocytosis by HF3, a P-III class metalloproteinase isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, vol. 322, n. 3, p. 950–956.
- SILVERMAN, J.A.; PERLMUTTER, N.G.; SHAPIRO, H.M. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, vol. 47, n. 8, p. 2538–2544.
- SKARNES, R. C. L-Amino-acid Oxidase, a Bactericidal System. *Nature*, 1970, vol. 225, p. 1072–73.
- SOUZA, M.P.; TAVARES, M.F.M.; MIRANDA, M.T. Racemization in stepwise solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures. *Tetrahedron*, 2004, vol. 60, p. 4671–4681.
- SPIEKERMANN, B.F.; LAKE, C.L.; RICH, G.F.; HUMPHRIES, J.E. Normal activated clotting time despite adequate anticoagulation with ancrod in a patient with heparin-associated thrombocytopenia and thrombosis undergoing cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology*, 2016, vol. 80, n. 3, p. 686–688.
- STÁBELI, R.G.; AMUI, S.F.; SANT'ANA, C.D.; PIRES, M.G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M.C.; ROMÃO, P.R.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.; SOARES, A.M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 2006, vol. 142, n. 3-4, p. 371–381.

- STEINBUCH, K. B.; FRIDMAN, M. Mechanisms of resistance to membrane-disrupting antibiotics in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Med. Chem. Commun.*, 2016, vol. 7, n. 1, p. 86–102.
- STOCKER, K.; BARLOW, G. H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin). *Methods Enzymol.*, 1976, vol. 45, p. 214–223.
- STRUB, J.M.; GARCIA-SABLONE, P.; LONNING, K.; TAUPENOT, L.; HUBERT, P.; VAN DORSSELAER, A.; AUNIS, D.; METZ-BOUTIGUE, M.H. Processing of chromogranin B in bovine adrenal medulla. Identification of secretolytin, the endogenous C-terminal fragment of residues 614-626 with antibacterial activity. *Eur. J. Biochem.*, 1995, vol. 229, n. 2, p. 356–368.
- SU, L. Y.; WILLNER, D. L.; SEGALL, A. M. An antimicrobial peptide that targets DNA repair intermediates in vitro inhibits *Salmonella* growth within murine macrophages. *Antimicrobial Agents Chem.*, 2010, vol. 54, n. 5, p. 1888–1899.
- SUBIRATS, J.; SÀNCHEZ-MELSIÓ, A.; BORREGO, C.M.; BALCÁZAR, J.L.; SIMONET, P. Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 2016, vol. 48, n. 2, p. 163–167.
- SUCKAU, D.; RESEMANN, A.; SCHUERENBERG, M.; HUFNAGEL, P.; FRANZEN, J.; HOLLE, A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, vol. 376, n. 7, p. 952–65.
- SUDARSHAN, S.; DHANANJAYA, B. L. Antibacterial activity of an acidic phospholipase A2 (NN-XIb-PLA2) from the venom of *Naja naja* (Indian cobra). *SpringerPlus*, 2016, vol. 5, p. 112.
- SUN, S.; SELMER, M.; ANDERSSON, D. I. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics conferred by point mutations in penicillin-binding proteins PBP3, PBP4 and PBP6 in *Salmonella enterica*. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, n. 5, p. 1–10.
- TALAN, D.A.; CITRON, D.M.; OVERTURF, G.D.; SINGER, B.; FROMAN, P.; GOLDSTEIN, E.J. Antibacterial activity of crotalid venoms against oral snake flora and other clinical bacteria. *J. Infect. Dis.*, 1991, vol. 164, n. 1, p. 195–198.
- TAM, J.P.; WANG, S.; WONG, K.H.; TAN, W.L. Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals (Base I)*, 2015, vol. 8, n. 4, p. 711–757.
- TAMEZ-GUERRA, P.; VALADEZ-LIRA, J.A.; ALCOCER-GONZÁLEZ, J.M.; OPPERT, B.; GOMEZ-FLORES, R.; TAMEZ-GUERRA, R.; RODRÍGUEZ-PADILLA, C. Detection of genes encoding antimicrobial peptides in Mexican strains of *Trichoplusia ni* (Hübner) exposed to *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 2008, vol. 98, n. 2, p. 218–227.
- TANG, J.; LIU, H.; GAO, C.; MU, L.; YANG, S.; RONG, M.; ZHANG, Z.; LIU, J.; DING, Q.; LAI, R. A small peptide with potential ability to promote wound healing. *PLoS ONE*, 2014a, vol. 9, n. 3, p. e92082.
- TANG, W.; ZHANG, H.; WANG, L.; QIAN, H. New cationic antimicrobial peptide screened from boiled-dried anchovies by immobilized bacterial membrane liposome chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 2014b, vol. 62, n. 7, p. 1564–1571.

- TAVARES, N.A.; CORREIA, J.M.; GUARNIERI, M.C.; LIMA-FILHO, J.L.; PRIETO-DA-SILVA, A.R.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Expression of mRNAs coding for VAP1/crotastatin-like metalloproteases in the venom glands of three South American pit vipers assessed by quantitative real-time PCR. *Toxicon*, 2008, vol. 52, n. 8, p. 897–907.
- TORRES, A.; DANTAS, R.; MENEZES, R.; TOYAMA, M.; FILHO, E.; OLIVEIRA, M. Antimicrobial activity of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops leucurus* snake venom. *J. Venom. Animals Tox. Trop. Dis.*, 2010, vol. 16, n. 4, p. 614–622.
- TOYAMA, M.H.; TOYAMA, D.O.; JOAZEIRO, P.P.; CARNEIRO, E.M.; BERIAM, L.O.; MARANGONI, L.S.; BOSCHERO, A.C. Biological and structural characterization of a new PLA2 from the *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Protein J.*, 2005, vol. 24, n. 2, p. 103–112.
- TOYAMA, M.H.; TOYAMA DDE, O.; PASSERO, L.F.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.; TOMOKANE, T.Y.; FONSECA, F.V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P.P.; BERIAM, L.O.; MARTINS, M.A.; MONTEIRO, H.S.; FONTELES, M.C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon*, 2006, vol. 47, n. 1, p. 47–57.
- TSUJI, Y.; NAKAJIMA, Y.; HOMMA, K.; NATORI, S. Antibacterial activity of a novel 26-kDa serine protease in the yellow body of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) pupae. *FEBS Letters*, 1998, vol. 425, n. 1, p. 131–133.
- ULLAL, A. J.; WAYNE LITAKER, R.; NOGA, E. J. Antimicrobial peptides derived from hemoglobin are expressed in epithelium of channel catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque). *Dev. Comp. Immunol.*, 2008, vol. 32, n. 11, p. 1301–1312.
- UTKINA, L.L.; ANDREEV, Y.A.; ROGOZHIN, E.A.; KOROSTYLEVA, T.V.; SLAVOKHOTOVA, A.A.; OPARIN, P.B.; VASSILEVSKI, A.A.; GRISHIN, E.V.; EGOROV, T.A.; ODINTSOVA, T.I. Genes encoding 4-Cys antimicrobial peptides in wheat *Triticum kiharae* Dorof. et Migush.: Multimodular structural organization, intraspecific variability, distribution and role in defence. *FEBS J.*, 2013, vol. 280, n. 15, p. 3594–3608.
- VALERIANO-ZAPANA, J.A.; SEGOVIA-CRUZ, F.S.; ROJAS-HUALPA, J.M.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; PONCE-SOTO, L.A.; MARANGONI, S. Functional and structural characterization of a new serine protease with thrombin-like activity TLBan from *Bothrops andianus* (Andean Lancehead) snake venom. *Toxicon*, 2012, vol. 59, n. 2, p. 231–240.
- VAN DE VEN, F.J.; VAN DEN HOOVEN, H.W.; KONINGS, R.N.; HILBERS, C.W. NMR studies of lantibiotics. The structure of nisin in aqueous solution. *Eur. J. Biochem.*, 1991, vol. 202, n. 3, p. 1181–1188.
- VARANDA, L. M.; MIRANDA, M. T. Solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures: a search for and optimized synthesis condition of unsulfated cholecystokinin-12. *J. Pept. Res*, 1997, vol. 50, n. 2, p. 102–108.
- VARGAS, L.J.; LONDOÑO, M.; QUINTANA, J.C.; RUA, C.; SEGURA, C.; LOMONTE, B.; NÚÑEZ, V. An acidic phospholipase A<sub>2</sub> with antibacterial activity from *Porthidium*

- nasutum* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 2012, vol. 161, n. 4, p. 341–347.
- VITORINO-CARDOSO, A.F.; PEREIRA RAMOS, O.H.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Insights into the substrate specificity of a novel snake venom serine peptidase by molecular modeling. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 2006, vol. 144, n. 3, p. 334–342.
- VYAS, V.K.; BRAHMBHATT, K.; BHATT, H.; PARMAR, U. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: Current perspectives. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2013, vol. 3, n. 2, p. 156–162.
- WANG, G. Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *J. Biol. Chem.*, 2008a, vol. 283, n. 47, p. 32637–32643.
- WANG, G. Post-Translational Modifications of Natural Antimicrobial Peptides and Strategies for Peptide Engineering. *Curr. Biotechnol.*, 2012, vol. 1, n. 1, p. 72–79.
- WANG, G. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. *Meth. Mol. Biol.*, 2015, vol. 1268, p. 43–66.
- WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.*, 2016, vol. 44, p. D1087–D1093.
- WANG, H. X.; NG, T. B. An antifungal peptide from the coconut. *Peptides*, vol. 26, n. 12, p. 2392–2396, 2005.
- WANG, R.; KINI, R. M.; CHUNG, M. C. Rhodocetin, a novel platelet aggregation inhibitor from the venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper): synergistic and noncovalent interaction between its subunits. *Biochemistry*, 1999, vol. 38, n. 23, p. 7584–93.
- WANG, W.-J. Agglucetin, a tetrameric C-type lectin-like venom protein, regulates endothelial cell survival and promotes angiogenesis by activating integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008b, vol. 369, n. 2, p. 753–760.
- WANG, Y.; HONG, J.; LIU, X.; YANG, H.; LIU, R.; WU, J.; WANG, A.; LIN, D.; LAI, R. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. *PLoS ONE*, 2008, vol. 3, n. 9, p. e3217.
- WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2014, vol. 47, p. 1-32.
- WHITEHEAD, H. R. A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci. *Biochem. J.*, 1933, vol. 27, n. 6, p. 1793–1800.
- WIMLEY, W.; HRISTOVA, K. Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. *J. Membrane Biol.*, 2011, vol. 239, n. 1-2, p. 27–34.
- WOOD, T. K.; KNABEL, S. J.; KWAN, B. W. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013, vol. 79, n. 23, p. 7116–7121.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Rabies and envenomings: a neglected public health issue. Report of a Consultative Meeting. Geneva. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://www.who.int/bloodproducts/animal\\_sera/Rabies.pdf](http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf)>.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014.
- XU, C. et al. A bactericidal homodimeric phospholipases A2 from *Bungarus fasciatus* venom. *Peptides*, 2007, vol. 28, n. 5, p. 969–973.
- YAMAGUCHI, Y. et al. Contribution of topoisomerase IV mutation to quinolone resistance in *Mycoplasma genitalium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, vol. 57, n. 4, p. 1772–1776.
- YAMAMOTO-SUZUKI, Y.; SAKURAI, Y.; FUJIMURA, Y.; MATSUMOTO, M.; HAMAKO, J.; KOKUBO, T.; KITAGAWA, H.; KAWSAR, S.M.; FUJII, Y.; OZEKI, Y.; MATSUSHITA, F.; MATSUI, T. Identification and Recombinant Analysis of Botrocetin-2, a Snake Venom Cofactor for von Willebrand Factor-Induced Platelet Agglutination. *Biochemistry*, 2012, vol. 51, n. 26, p. 5329–5338.
- YAMANE, E.S.; BIZERRA, F.C.; OLIVEIRA, E.B.; MOREIRA, J.T.; RAJABI, M.; NUNES, G.L.; DE SOUZA, A.O.; DA SILVA, I.D.; YAMANE, T.; KARPEL, R.L.; SILVA, P.I.JR.; HAYASHI, M.A. Unraveling the antifungal activity of a South American rattlesnake toxin crotamine. *Biochimie*, 2013, vol. 95, n. 2, p. 231–240.
- YANG, L.; HARROUN, T.A.; WEISS, T.M.; DING, L.; HUANG, H.W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.*, 2001, vol. 81, n. 3, p. 1475–1485.
- YAP, M.-N. F. The double life of Antibiotics. *Missouri medicine*, 2013, vol. 110, n. 4, p. 320–324.
- YARLEQUÉ, A. Las serpientes peruanas y sus venenos. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Fondo Editorial, 2000.
- YARLEQUÉ, M.; ORTIZ, C.; MORANTE, Y.; YARLEQUÉ, A. Estudio comparativo de algunas propiedades bioquímicas de venenos de serpientes de diferentes regiones del mundo. *Rev. Soc. Quím. Perú.*, 2012, vol. 78, n. 1, p. 27–36.
- YAU, W.M.; WIMLEY, W.C.; GAWRISCH, K.; WHITE, S.H. The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, 1998, vol. 37, n. 42, p. 14713–14718.
- ZAMBROWICZ, A.; DĄBROWSKA, A.; BOBAK, Ł.; SZOŁTYSIK, M. Egg yolk proteins and peptides with biological activity. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2014, vol. 68, p. 1524–1529.
- ZANETTI, M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukoc. Biol.*, 2004, vol. 75, n. 1, p. 39–48.
- Zaqueo, K.D.; Kayano, A.M.; Simões-Silva, R.; Moreira-Dill, L.S.; Fernandes, C.F.; Fuly, A.L.; Maltarollo, V.G.; Honório, K.M.; da Silva, S.L.; Acosta, G.; Caballol, M.A.; de Oliveira, E.; Albericio, F.; Calderon, L.A.; Soares, A.M.; Stábéli, R.G. Isolation and biochemical characterization of a new thrombin-like serine protease from *Bothrops pirajai* snake venom. *BioMed Res. Int.*, 2014a, vol. 2014.
- ZAUQUEO, K. D. et al. Isolation and biochemical characterization of a new thrombin-like serine protease from *Bothrops pirajai* snake venom. *BioMed Research International*, 2014b, p. 1–13.

- ZARE-ZARDINI, H.; FESAHAAT, F.; ANBARI, F.; HALVAEI, I.; EBRAHIMI, L. Assessment of spermicidal activity of the antimicrobial peptide sarcotoxin Pd: A potent contraceptive agent. *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care*, 2016, vol. 21, n. 1, p. 15–21.
- ZELENSKY, A. N.; GREASY, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.*, 2005, vol. 272, n. 24, p. 6179–6217.
- ZHANG, Q.; XU, Y.; WANG, Q.; HANG, B.; SUN, Y.; WEI, X.; HU, J. Potential of novel antimicrobial peptide P3 from bovine erythrocytes and its analogs to disrupt bacterial membranes In Vitro and display activity against drug-resistant bacteria in a mouse model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, n. 5, p. 2835–2841.
- ZHAO, J.; SUN, Y.; LI, Z.; SU, Q. Molecular cloning of novel antimicrobial peptide genes from the skin of the Chinese brown frog, *Rana chensinensis*. *Zoolog. Sci.*, 2011, vol. 28, n. 2, p. 112–117.
- ZHONG, S.R.; JIN, Y.; WU, J.B.; JIA, Y.H.; XU, G.L.; WANG, G.C.; XIONG, Y.L.; LU, Q.M. Purification and characterization of a new l-amino acid oxidase from *Daboia russellii siamensis* venom. *Toxicon*, 2009, vol. 54, n. 6, p. 763–771.
- ZHOU, H.; DOU, J.; WANG, J.; CHEN, L.; WANG, H.; ZHOU, W.; LI, Y.; ZHOU, C. The antibacterial activity of BF-30 in vitro and in infected burned rats is through interference with cytoplasmic membrane integrity. *Peptides*, 2011, vol. 32, n. 6, p. 1131–1138.
- ZUROFF, T.R.; BERNSTEIN, H.; LLOYD-RANDOLFI, J.; JIMENEZ-TARACIDO, L.; STEWART, P.S. CARLSON, R.P. Robustness analysis of culturing perturbations on *Escherichia coli* colony biofilm beta-lactam and aminoglycoside antibiotic tolerance. *BMC microbiol.*, 2010, vol. 10, n. 185, p. 1–10.

## SÚMULA CURRICULAR

### DADOS PESSOAIS

Nome: Marcos Alejandro Sulca López

Local e data de nascimento: Lima, 21 de dezembro de 1981

Nacionalidade: Peruano

E-mail: msulca@usp.br

### FORMAÇÃO ACADÊMICA

- 1º grau: Colégio Nacional: “Jorge Chávez”, Lima – Peru, 1987-1990.  
Colégio Nacional: Grande unidade escolar “Alfonso Ugarte”, Lima – Peru, 1991-1993.
- 2º grau: Colégio Nacional: Grande unidade escolar “Alfonso Ugarte”, Lima – Peru, 1994-1998.

#### **Graduação:**

- Bacharel em Biologia, na especialidade da Microbiologia pela Faculdade de Ciências Biológicas da Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Peru, 2001-2006.

#### **Mestrado em Biologia Molecular:**

- Faculdade de Ciências Biológicas da Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Peru, 2008 - 2010.

## **FORMAÇÃO COMPLEMENTAR**

### ***Estágios realizados:***

- Centro de Investigações Aquícolas "Alexander von Humboldt" - Instituto do Mar de Peru (IMARPE) – Laboratório da Microbiologia aquática. Callao – Peru. 2008-2011.
- Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), sob orientação da Mg. Débora Elizabeth Alvarado Iparraguirre. Lima – Peru. 2006-2010.
- Instituto Nacional de Enfermidades Neoplásicas (INEN). Laboratório de Microbiologia. Lima, Peru. 2006.
- Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión”. Laboratorio de Parasitologia y Sorologia Parasitaria. Lima–Peru. 2006.
- Hospital de Emergências “José Casimiro Ulloa”. Serviço de Microbiologia. Lima–Peru. Dezembro (2004) - Março (2005).

## **CURSOS DE ESPECIALIZAÇÃO**

- Temas Avançados em Bioquímica e Biologia Molecular. Instituto de Química-Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, 2009.
- Biologia das Células-tronco. Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Faculdade de Ciências Biológicas. Lima – Peru. 2009
- Biotecnologia Molecular. Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Faculdade de Ciências Biológicas. Lima – Peru. 2009.



## **BOLSA RECEBIDA**

- CNPq, 10/2011 a 09/2015 (Bolsa de Doutorado)

## **PUBLICAÇÕES**

- EFFENBERGER, FERNANDO B.; **SULCA, MARCOS A.**; MACHINI, M. TERESA; COUTO, RICARDO A.; KIYOHARA, PEDRO K.; MACHADO, GIOVANNA; ROSSI, LIANE M. Copper nanoparticles synthesized by thermal decomposition in liquid phase: the influence of capping ligands on the synthesis and bactericidal activity. *Journal of Nanoparticle Research* **JCR**, 2014.
- **SULCA MA**, REMUZGO CM, CÁRDENAS J, CHENG E, BEMQUERER MP, MACHINI MT. Antimicrobial activity of metalloprotease, serine protease, type-c lectin in the venom of *Bothriopsis oligolepis* from Peru (**em preparação**)

## **PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS**

- **Sulca, MA**; Remuzgo, C; Bemquerer, MP; Cárdenas, J; Machini, MT. Antimicrobial activity of the venom of the peruvian snake *Bothrops oligolepis*: Involvement of a Metalloprotease, a Type-c lectin and a Serineprotease. 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Florianópolis, SC, 2015.
- **Sulca M.** Prospecção, isolamento e caracterização química de compostos peptídicos/proteínicos com ação antimicrobiana de venenos de serpentes peruanas do gênero *Bothrops*. Seminários dos Pós-Graduandos e Pós-Doutorandos. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química-USP. 2014.

- **Sulca M**, Remuzgo C, Machini MT. Antimicrobial activity of venaoms from *Bothrops castelnaudi*, *Bothrops barnetti* e *Bothriopsis oligolepis*. XLI Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology. Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. 2012.
- **Sulca M**. Atividade antimicrobiana dos venenos de *Bothrops castelnaudi*, *Bothrops barnetti* e *Bothriopsis oligolepis*. II Congresso Institucional. Instituto de Química-USP. 2012
- **Sulca M**, Orozco R, García R, Ramírez P, Alvarado D. Isolamento e identificação de *Vibrio* spp da Bahia do Callao. XIX Reunião Científica ICBAR-UNMSM. Lima–Peru. 2010.
- Tito O, Orozco R, **Sulca M**, Alvarado D. Ocorrência de *Salmonella* entérica subsp. arizonae e outras enterobacterias na Bahia do Callao. XIX Reunião Científica ICBAR-UNMSM. Lima–Peru. 2010.
- **Sulca M**, Orozco R, Alvarado D. Avaliação da resistência a metais pesados e antibióticos em *Vibrio* spp. isolados da Bahia do Callao (Lima-Peru). II Congresso de ciências do mar de Peru (CONCIMAR). Piura-Peru. 2010.
- **Sulca M**. “Estudo epidemiológico molecular de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogoresistente em um hospital docente em Lima-Peru”. ICBAR XVIII. Lima–Peru. 2009.
- **Sulca M**. “Transferência de resistência ao mercúrio mediada por plasmídeos em *Escherichia coli* isoladas no mar de Lima-Peru”. II Workshop Internacional sobre Microbiologia Ambiental. Aracaju-Brasil. 2008.

- **Sulca M.** “Estudo de resistência ao mercúrio e sua associação com a resistência aos antimicrobianos de uso clínico em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de ambientes marinhos de Lima”. ICBAR XVI. Lima–Peru. 2007.
- Sumi A, Alvarado D, Jaramillo M, **Sulca M**, García R, Cocha J. “Transferência conjugativa de plasmídeos de resistência a antibióticos em espécies de gênero *Enterococcus* isoladas de águas do litoral limenho”. ICBAR XVI. Lima–Peru. 2007.
- **Sulca M.** (Expositor): “Papel da transferência horizontal de genes na emergência de patógenos”. Unidade de Pós-graduação. Faculdade de Ciências Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Peru. 2009.
- **Sulca M.** (Expositor): “A contaminação na Bahia do Callao e seu efeito na população bacteriana local”. Faculdade de Ciências Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Peru. 2008.
- **Sulca M.** (Expositor): “Resistência microbiana aos metais pesados e sua aplicação na biotecnologia”. Faculdade de Ciências Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Peru. 2007.

## **ATIVIDADE DE ENSINO**

### ***Monitoria PAE:***

- Bioquímica Experimental (QBQ-2463, Química Diurno), 08-12/2014, Departamento de Bioquímica- Instituto de Química – USP.
- Bioquímica Experimental (QBQ-5749 Química Noturno), 03-07/15, Departamento de Bioquímica- Instituto de Química – USP.

- Bioquímica de Macromoléculas e Metabolismo (QBQ-215, Farmácia Noturno), Departamento de Bioquímica - Instituto de Química – USP.

***Outras monitorias:***

- Palestrante: Bioinformática e aplicações em Biologia Molecular. Universidade de Piura. Piura – Peru. 2010.
- Professor convidado no curso de Bacteriologia. Faculdade de Ciências Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Peru. 2010.
- Professor convidado nos cursos de Microbiologia na Saúde, Genética Microbiana, Metodologia da investigação, Fisiologia Microbiana. Faculdade de Ciências Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Peru. 2009.
- Monitor no curso de Microbiologia molecular avançada (Mestrado). Escola de Pós-graduação. Faculdade de Ciências Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Peru. 2009.
- Professor convidado no curso de Genética Microbiana. Faculdade de Ciências Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Peru. 2008.
- Professor convidado nos cursos de Genética Microbiana, Microbiologia na Saúde, Microbiologia Agrícola, Metodologia da investigação. Faculdade de Ciências Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Peru. 2007.
- Monitor no Curso de Virologia e Fisiologia Microbiana. Faculdade de Ciências Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Peru. 2005.

- Monitor no Curso de Microbiologia General. Laboratório de microbiologia e Biotecnologia microbiana. Faculdade de Ciências Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Peru. 2004.

***Organização de eventos, congressos, exposições e feiras:***

- Bioinformática e aplicações em Biologia Molecular. 2010.
- XVI Reunião Científica ICBAR. 2007. (Congresso).
- Caracterização Molecular de micro-organismos de ambientes aquáticos e análises de riscos. 2007.
- X Seminário ICBAR. 2007.
- I Congresso Latino-americano de Estudantes de Microbiologia e Parasitologia (CLEMYP) e I Congresso Nacional de Estudantes de Microbiologia e Parasitologia (PCNEMYYP). 2005.

## Copper nanoparticles synthesized by thermal decomposition in liquid phase: the influence of capping ligands on the synthesis and bactericidal activity

Fernando B. Effenberger · Marcos A. Sulca · M. Teresa Machini · Ricardo A. Couto · Pedro K. Kiyohara · Giovanna Machado · Liane M. Rossi

Received: 1 July 2014 / Accepted: 24 July 2014 / Published online: 22 October 2014  
 © Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

**Abstract** We explored here the synthesis of copper nanoparticles (CuNPs) by thermal decomposition of copper(II) acetate in diphenyl ether in the presence of different capping ligands. To look for any specific role in thermal decomposition, we performed reactions in the presence of oleic acid, oleylamine, and 1,2-octanediol, or in the presence of different combinations of these capping ligands, or in the absence of them. The CuNPs obtained in the presence of oleic acid and oleylamine (in the presence or absence of 1,2-octanediol) were stabilized as Cu(0) NPs, and the “naked” NPs prepared in

solvent only easily oxidized to CuO. Therefore, both oleic acid and oleylamine can act as capping ligands to prepare air-stable Cu(0) NPs. The 1,2-alkyldiol is not necessary for metal reduction during the synthesis, but its presence improves size and morphology control. The presence of capping ligands significantly reduced the bactericidal activity exhibited by the Cu NPs against the gram-negative bacteria *Escherichia coli*.

**Keywords** Copper · Nanoparticles · Thermal decomposition · Oleic acid · Oleylamine · Composite nanoparticle · Bactericidal effect

Guest Editors: Carlos Lodeiro Espiño,  
 José Luis Capelo Martínez

This article is part of the topical collection on Composite Nanoparticles

F. B. Effenberger · R. A. Couto · L. M. Rossi (✉)  
 Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, São Paulo, SP 05508-000, Brazil  
 e-mail: lrossi@iq.usp.br

*Present Address:*

F. B. Effenberger  
 Departamento de Engenharia Química, Centro Universitário da FEL, Av. Humberto Castelo Branco 3972, São Bernardo do Campo, SP 09850-901, Brazil

M. A. Sulca · M. T. Machini  
 Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, São Paulo, SP 05508-000, Brazil

### Introduction

Particles size and shape are physical attributes that directly influence the physical and chemical properties

P. K. Kiyohara  
 Instituto de Física, Universidade de São Paulo,  
 CP 66318, São Paulo, SP 05315-970, Brazil

G. Machado  
 Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Av. Luiz Freire 01, Cidade Universitária, Recife, PE 50740-540, Brazil