

RESSALVA

Atendendo a solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação de Mestrado** será disponibilizado somente a partir de **13/09/2020**.

**Isolamento e caracterização de peptídeos do
gastrópode marinho *Olivancillaria urceus***

LETÍCIA ROSSI MALIMPENSA

São Vicente / SP
2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

**Isolamento e caracterização de peptídeos do
gastrópode marinho *Olivancillaria urceus***

Mestrando: Letícia Rossi Malimpensa

Orientador: Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Bociências do Campus do Litoral Paulista São Vicente, Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de Bioquímica, Biologia Molecular e Moléculas Biologicamente Ativas

M251i Malimpensa, Letícia Rossi
Isolamento e caracterização de peptídeos do
gastrópode marinho Olivancillaria urceus / Letícia Rossi
Malimpensa. -- São Vicente, 2019
37 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente
Orientador: Leandro Mantovani de Castro

1. Fauna acompanhante. 2. Peptídeos antimicrobianos.
3. Olivancillaria urceus. 4. Espectrometria de massas. 5.
Cromatografia líquida. I. Título.

À minha família linda, minha mãe, meus avós e meu tio, por todo o amor e apoio, sem eles nada teria se concretizado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me guiar nesta jornada.

Ao meu orientador Professor Dr. Leandro Mantovani de Castro, por acreditar em mim, pela confiança, paciência, amizade e por todos os ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Hirochi Yamamura e a Dra. Elsa Yamamura pela amizade, carinho e incentivo para ingressar na Pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Junior e a todos que fazem parte do laboratório LETA, do Instituto Butantan, Débora, Thiago, Bruna, Yumi, Laura, Andréa, Norton, Soraia, Paula e Rosa, por me acolherem e me auxiliarem em tudo e principalmente pela amizade, risos e por todos os momentos.

A todos os demais amigos e colegas da UNESP-CLP que doaram um pouco de si e contribuíram para a realização deste trabalho.

Naturaleza

*Canto a la madre naturaleza
A tu misterio invisible
Canto a la fuerza que alimenta
Nuestra danza para esta vida
Canto a la fuerza que va abriendo
El camino de nuestros sueños*

Danit

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Da	Daltons
ESI	Electrospray
HPLC	High performance liquid chromatography
kDa	Kilodaltons
LC/MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
m/z	Razão massa/carga
PAM	Peptídeo Antimicrobiano
RT	Tempo de retenção
TFA	Ácido Trifluoroacético

LISTA DE SÍMBOLOS

Aminoácidos

Alanina	A
Cisteina	C
Ácido Aspartico	D
Ácido Glutâmico	E
Fenilalanina	F
Glicina	G
Histidina.....	H
Lisina	K
Isoleucina	I
Leucina	L
Metionina	M
Asparagina	N
Prolina	P
Glutamina	Q
Arginina	R
Serina	S
Treonina	T
Valina	V
Triptofano	W
Tirosina.....	Y

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Concha Olivancillaria urceus	2
Figura 2 - Estrutura peptídeo Pv-Def	5
Figura 3 - Estrutura histatina-5	6
Figura 4 - Peptídeo myticalin A5	8
Figura 5 - Perfil cromatográfico dos extratos peptídicos de O. urceus 8, 10 e 11 eluídos a 40% ACN	17
Figura 6 - Perfil cromatográfico dos extratos peptídicos de O. urceus eluídos a 80% ACN	17
Figura 7 - Perfil cromatográfico das frações do extrato peptídico 11 de O. urceus eluído a 40% ACN	19
Figura 8 - Cromatograma da segunda etapa de purificação dos picos 18 (A) e 21 (B) respectivamente	20
Figura 9 - Cromatograma purificação fração 18-M	21
Figura 10 - Perfil cromatográfico da fração 18-M-3 submetidas à análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS/MS)	22
Figura 11 - Localização subcelular das proteínas de origem dos peptídeos identificados	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de seqüências primárias de peptídeos lineares antimicrobianos	5
Tabela 2 - Peptídeos ricos em prolina, arginina e triptofano	7
Tabela 3 - Peptídeos isolados de moluscos marinhos	8
Tabela 4 - Concentração total de peptídeos fração eluída à 40%	16
Tabela 5 - Concentração total de peptídeos fração eluída à 80%.....	16
Tabela 6 - Ensaio de atividade antimicrobiana das frações do extrato 11 eluído a 40% ACN	18
Tabela 7 - Frações provenientes da segunda etapa de purificação dos picos 18 e 21. Em destaque as frações 18-M, 21-G e 21-H que apresentaram atividade contra <i>Micrococcus luteus</i> A720	20
Tabela 8 - Picos coletados da fração 18-M e teste para atividade antimicrobiana	21
Tabela 9 - Ensaio MIC fração 18-M-3 (Concentração Mínima Inibitória)	22
Tabela 10 - Proteínas precursoras e peptídeos identificados	24
Tabela 11 - Ensaio concentração mínima inibitória dos peptídeos sintetiza.....	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Fauna acompanhante: um recurso a ser explorado	1
1.2. <i>Olivancillaria urceus</i> (Roding, 1798)	2
1.3. Compostos bioativos de organismo marinhos	2
1.4. Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)	3
<i>1.4.1. Peptídeos lineares antimicrobianos</i>	<i>4</i>
<i>1.4.2. Peptídeos antimicrobianos ricos no aminoácido cisteína.....</i>	<i>5</i>
<i>1.4.3. Peptídeos antimicrobianos ricos em outros aminoácidos específicos.....</i>	<i>5</i>
1.5. Peptídeos antimicrobianos isolados de moluscos marinhos	7
1.6. Estratégias utilizadas para o isolamento de peptídeos bioativos marinhos	9
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Amostras.....	12
3.2. Extratos peptídicos.....	12
3.3. Dosagem da concentração total de peptídeos.....	13
3.4. Fracionamento dos extratos de peptídeos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .	13
3.5. Atividade Antimicrobiana - Ensaio de inibição de crescimento em meio líquido.....	14
3.6. Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	14
3.7. Análise por Espectrometria de Massas.....	14
4. RESULTADOS.....	15
4.1. Obtenção e estimativa da concentração total de peptídeos nos extratos.....	15
4.2. Fracionamento Inicial dos extratos de peptídeos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	16
4.3. Teste Atividade Antimicrobiana - Ensaio de inibição de crescimento em meio líquido.....	18
4.4. Ensaio de MIC da fração 18-M-3.....	21
4.5. Identificação dos peptídeos da Fração 18-M-3 por espectrometria de massas.....	22
4.6. Ensaio de MIC para peptídeos sintéticos.....	26

5. DISCUSSÃO.....27

6. CONCLUSÃO.....30

7. REFERÊNCIAS.....31

Anexo 1.....38

RESUMO

A *Olivancillaria urceus* é uma das espécies de gastrópode marinho mais abundante na região subtropical da costa sudeste brasileira, frequentemente capturada na pesca de arrasto de fundo do camarão sete barbas. Nos últimos anos, a investigação química em moluscos marinhos têm revelado informações sobre uma variedade de compostos de interesse clínico, em especial os peptídeos, apresentando propriedades farmacológicas distintas, como por exemplo, ação antimicrobiana. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi o isolamento e caracterização de peptídeos que existam naturalmente nos tecidos do gastrópode marinho *Olivancillaria urceus* utilizando-se de um método específico de extração, seguido de fracionamento por cromatografia líquida em coluna C18, ensaio de atividade antimicrobiana contra os microorganismos: *M. luteus*, *E. coli* e *C. albicans*, e identificação das frações com atividade por espectrometria de massas. Nossas análises identificaram uma fração do extrato peptídico, denominada 18-M-3, com atividade antimicrobiana contra a bactéria *Micrococcus luteus*, apresentando uma concentração média de 2,18 mg/ml. A análise por espectrometria revelou tratar-se de uma fração complexa, constituída principalmente por um conjunto de peptídeos descritos pela primeira vez, fragmentos de proteínas citosólicas e nucleares conservados em diferentes espécies de moluscos. Estes resultados abrem novas perspectivas sobre o potencial farmacológico de extratos *O. urceus*.

Palavras-chaves: Fauna acompanhante, peptídeos antimicrobianos, *Olivancillaria urceus*, espectrometria de massas, cromatografia líquida.

ABSTRACT

Olivancillaria urceus is one of the most abundant marine gastropod species in the subtropical region of the Brazilian southeast coast, often caught in shrimp trawling. In recent years, chemical research in marine molluscs has revealed information on a variety of compounds of clinical interest, especially peptides, exhibiting distinct pharmacological properties, such as antimicrobial action. In this context, the aim of this work was the isolation and characterization of peptides that exist naturally in the tissues of the marine gastropod *O. urceus* using a specific extraction method, followed by liquid chromatography fractionation on C18 column, antimicrobial activity tests against microorganisms *M. luteus*, *E. coli* e *C. albicans*, and identification of the fractions with activity by mass spectrometry of. Our analyzes identified a fraction of the peptide extract, designated 18-M-3, with antimicrobial activity against the bacterium *Micrococcus luteus*, presenting an average concentration of 2.18 mg / ml of peptides. Spectrometric analysis revealed a complex fraction consisting mainly of a set peptides, fragments of cytosolic and nuclear proteins conserved in different species of mollusks. These results open new perspectives about the pharmacological potential of *O. urceus* extracts.

Keywords: Bycatch, antimicrobial peptides, *Olivancillaria urceus*, mass spectrometry, liquid chromatography.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fauna acompanhante: um recurso a ser explorado

A prática do arrasto-de-fundo utilizada na pesca artesanal e industrial do camarão-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) e camarão-rosa (*Farfantepenaeus brasiliensis* e *Farfantepenaeus paulensis*) na costa sul e sudeste do Brasil é um método de captura que apresenta uma baixa seletividade. Estima-se que para cada quilograma de camarão cerca de 5 a 21 quilos de outras espécies indesejáveis são capturadas. No litoral do estado de São Paulo entre os anos de 2008 e 2011 foram desembarcados cerca de 3.000 toneladas de camarão-sete-barbas (MENDONÇA *et al.*, 2013; TANGERINA, 2016). e aproximadamente 60.000 toneladas de fauna acompanhante foram capturadas e descartadas por ano no mesmo período.

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) aproximadamente sete milhões de toneladas/ano de fauna acompanhante são descartados, valor equivalente a 8% da captura mundial da pesca marinha. Deste percentual, aproximadamente um terço corresponde à pesca de arrasto de camarões em águas tropicais (EYARS, 2007).

A fauna acompanhante pode ser definida como um conjunto de organismos capturados acidentalmente durante a atividade pesqueira de uma determinada espécie alvo. Os organismos capturados incluem peixes, tartarugas, crustáceos, moluscos, esponjas, corais, dentre outros. Esta fauna geralmente é composta por duas porções: uma que é desembarcada, representada por espécies de interesse comercial e outra que é rejeitada, composta por indivíduos sem valor econômico. Na maioria dos casos, este material ocupa espaço nas embarcações e praticamente todos os organismos são devolvidos ao mar já mortos, alterando o equilíbrio ecológico das áreas de pesca (GRAÇA-LOPES, 1996; BRANCO, *et al.* 2015; GRAÇA-LOPES *et al.*, 2002a; GRAÇA-LOPES *et al.*, 2002b; TANGERINA, 2016).

As espécies do filo dos moluscos estão entre os organismos mais representativos durante as capturas, com a presença de Gastrópodes, Bivalves e Cefalópodes. Dentro da classe dos gastrópodes, a espécie *Olivancillaria urceus* (*O. urceus*) está entre as mais frequentes nas redes de arrasto durante a pesca do camarão, devido a sua abundância na região subtropical da costa sul e sudeste brasileira (BRANCO, *et al.* 2015; GRAÇA-LOPES *et al.*, 2002c; FRAMESCHI *et al.* 2015; AYRES-PERES *et al.*, 2012).

1.2. *Olivancillaria urceus* (Roding, 1798)

A *O. urceus* (Roding, 1798) (BOLTEN,1906), também conhecida como *O. brasiliensis*, pertencente à família da Olividae, é umas das espécies endêmicas no Atlântico Sudeste, sua distribuição geográfica compreende desde o estado da Bahia no Brasil até Golfo San Matias na Argentina. Esses moluscos habitam fundos de areia rasa variando de 0-53m de profundidade (TESO & PASTORINO, 2011).

Possuem conchas com até 63,5mm de comprimento, subquadrangular, grossa, lisa, polida, com até 1 mm de espessura. Apresentam coloração rosada suja, com linhas claras ou escuras irregulares axiais, espiral e faixa fasciolar marrom-ocre (Figura 1). Os animais vivos possuem pé e sifão de coloração rosa escuro (TESO & PASTORINO, 2011).



Figura 1: Concha *O. urceus* (TESO & PASTORINO, 2011 modificado).

Estes organismos são carnívoros e se alimentam principalmente de bivalves. Vivem em simbiose com outros microrganismos, como por exemplo, bactérias Gram-positivas, Firmicutes e Actinobacteria, e bactérias Gram-negativas, Proteobactérias. (PENCHASZADEH et al. 2006; TANGERINA et al. 2017).

1.3. Compostos bioativos de organismo marinhos

Os mares e oceanos ocupam 70% da superfície terrestre oferecendo um considerável e vasto espectro de biodiversidade. Dos 35 filos animais conhecidos, apenas um não tem representantes no ambiente marinho, e 14 são encontrados apenas nos oceanos (JOLY, et al. 2011). Entretanto, o número de espécies marinhas conhecidas é relativamente baixo, cerca de

200 mil, o que representa apenas 10% do total estimado (MORA, et al. 2011).

Este ambiente abriga uma ampla variedade de organismos que diferem tanto em aspectos morfofisiológicos como na capacidade de adaptação (ANEIROS & GARATEIX 2004). Esta adaptação se deve ao fato de viverem em um ambiente extremo, competitivo e agressivo, diferente em muitos aspectos do ambiente terrestre, gerando condições que demandam muitas vezes a produção específica de potentes moléculas bioativas, tornando-se uma rica fonte de produtos naturais (DE VRIES & BEART 1995; CARTER 2011; ZHENG, et al. 2011).

Dentre a diversidade de moléculas já isoladas, os peptídeos tem se destacado por apresentarem propriedades farmacológicas distintas como atividade citotóxica, antitumoral, antifúngica, antimicrobiana, antiviral, cardioprotetora e antimalárica, sendo obtidos a partir de inúmeros organismos marinhos, como esponjas, moluscos, cnidários, cordados, crustáceos, algas, fungos e bactérias. Neste contexto, são uma classe de moléculas candidatas a descoberta e o desenvolvimento de novos medicamentos (ANEIROS & GARATEIX, 2004; ANJUM, *et al.*, 2016; SUAREZ-JIMENEZ, *et al.*, 2012; SABLE; PARAJULI e JOIS, 2017).

1.4. Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

Há anos sabe-se que a defesa antimicrobiana do hospedeiro está relacionada tanto com o sistema imune adaptativo, com memória imunológica, quanto ao sistema imune inato e natural. No entanto, a imunidade inata representa a primeira linha de defesa de vertebrados e invertebrados contra infecções a exposição à microorganismos patogênicos. Dentre os mecanismos que contribui com a defesa inata está a síntese de potentes peptídeos antimicrobianos (HOFFMANN et al., 1999).

Estima-se que mais de 1.000 PAMs já foram isolados e caracterizados de uma grande variedade de animais, tanto vertebrados e invertebrados, como anfíbios, peixes, répteis, pássaros, insetos, aranhas, escorpiões, moluscos, crustáceos e chelicerata, quanto de plantas, bactérias e fungos (BULET et al., 2004; WANG et al., 2016).

Esses peptídeos frequentemente apresentam um maior número de resíduos de aminoácido arginina e lisina, como também amidação C-terminal que lhes confere carga positiva. Além de catiônicos, possuem característica anfipática, ou seja, apresentam uma superfície hidrofílica e outra hidrofóbica que permite sua interação e permeação no núcleo lipídico da membrana de bactérias, sendo uma característica essencial para sua ação

antimicrobiana (BULET et al., 2004; OREN & SHAI, 1998).

São relativamente pequenos (>10kDa), com comprimento, sequência e estrutura primária diversas. Podem ser classificados baseados em sua estrutura secundária em: peptídeos α -hélice, β -folha, mistos α/β e helicoidal aleatório, bem como agrupados de acordo com a composição de aminoácidos em (i) lineares; (ii) peptídeos ricos em cisteína e (iii) peptídeos ricos em aminoácidos específicos, como glicina, prolina, arginina ou histidina (LAKSHMAIAH NARAYANA & CHEN, 2015; REDDY, YEDERY & ARANHA, 2004).

1.4.1. Peptídeos lineares antimicrobianos

Os peptídeos de estrutura linear estão representados principalmente pela família de peptídeos das cecropinas, clavaninas, styelinas e magaininas (Tabela 1) (LAKSHMAIAH NARAYANA & CHEN, 2015).

As Cecropinas são peptídeos isolados principalmente de insetos com aproximadamente 35 resíduos de aminoácidos, a grande maioria desprovidos do aminoácido cisteína, são anfipáticos e apresenta estrutura α -hélice (WU, PATOCKA E KUCA, 2018; REDDY, YEDERY & ARANHA, 2004). Como exemplo estão os peptídeos cecropin B e D que foram isolados a partir da pupa da mariposa *Antheraea pernyi*, apresentam 32 e 36 resíduos de aminoácidos respectivamente e exibem atividade contra bactérias Gram + e Gram- (QU et al., 1982).

Os peptídeos da classe das magaininas foram isolados da pele do sapo africano *Xenopus laevis*. Magainina 1 e 2 são peptídeos extremamente similares com 23 aminoácidos diferindo em apenas duas substituições. Em baixas concentrações inibem o crescimento de bactérias e fungos e induzem a lise osmótica de protozoários (ZASLOFF, 1987).

As duas famílias de polipeptídeos antimicrobianos, clavaninas e styelins, obtidos a partir dos hemócitos da ascídia *Styela clava*, apresentam estrutura α -hélice e amidação C-terminal. Clavaninas são ricos em histidina com 23 resíduos de aminoácidos, os peptídeos clavanina A, B, C e D possuem atividade contra *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Candida albicans*, apresentando considerável similaridade estrutural e funcional à magainina 1 (LEE et al., 1997). Os styelinas possuem 32 resíduos de aminoácidos e ricos em fenilalanina, o peptídeo Styelin D apresenta extensas modificações pós-traducionais e dois novos aminoácidos di-hidroxiargininas e di-hidroxisinas (TAYLOR et al., 2000).

Tabela 1: Exemplos de sequências primárias de peptídeos lineares antimicrobianos

Cecropin B	KWKIFKKIEKVGRNIRNGIIKAGPAVAVLGEAKAL
Cecropin D	WNPFKELERAGQRVRDAIISAGPAVATVAQATALAK
Magainin 1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS
Magainin 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS
Styelin D	GWLRKAAKSVGKFYKHKYYIKAAWQIGKHAL
Clavanin A	VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHFV

1.4.2. Peptídeos antimicrobianos ricos no aminoácido cisteína.

A classe de peptídeos ricos em cisteína é representada principalmente pela grande família de Defensinas onde mais de 300 peptídeos já foram identificados das mais variadas espécies de plantas e animais. Possuem de 6 a 8 resíduos de cisteína com pontes dissulfeto intramoleculares, apresentando estrutura secundária α -hélice e β -folha. Exibem um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos e vírus (WU, PATOCKA E KUCA, 2018; GANZ, 2003).

Em invertebrados, inúmeras defensinas já foram isoladas das mais diversas espécies de insetos, moluscos e nematóide, apresentando de três a quatro pontes dissulfeto e estrutura cíclica (BULET et al, 2004). Recentemente um novo peptídeo do grupo das defensinas foi identificado e caracterizado a partir do mexilhão *Perna viridis*. Denominado Pv-Def (Figura 2) é composto por um peptídeo sinal de 19 aminoácidos e um peptídeo maduro de 45 aminoácidos com 6 resíduos de cisteína formando 3 pontes dissulfeto, possui elevada porcentagem de resíduos hidrofóbicos, característica comum em PAMs (WANG et al., 2018).

MLKLILVACLVLTLSGS APQRRATCDLFSIFGVGDSA CAAHCLVLGHRGGY CNSQSVCI CRD
E

Figura 2: Estrutura peptídeo Pv-Def. A sequência é dividida em duas parte, à esquerda representa o peptídeo sinal à direita o peptídeo maduro com 6 resíduos de cisteína em vermelho (WANG et al., 2018, modificado).

1.4.3. Peptídeos antimicrobianos ricos em outros aminoácidos específicos

Diversos PAMs também podem apresentar um alto conteúdo de aminoácidos específicos como, histidina, prolina, arginina, triptofano ou glicina. Essa variação na composição de aminoácidos é muitas vezes responsável pelos diferentes mecanismos de ação

dos PAMs (MISHRA et al., 2018).

Dentro desta classificação está o grupo das histatinas, peptídeos catiônicos ricos em histidina que variando de 7 a 38 resíduos de aminoácidos. Presente na saliva do homem e alguns primatas exibem propriedades antifúngicas com potente efeito de morte contra *Candida albicans*, desempenhando um papel importante na manutenção da saúde bucal (HELMERHORST et al., 1997). Nesta família a histatina 5 é um dos peptídeos com maior atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*, apresenta estrutura linear com 24 aminoácidos e sete resíduos de histidina (Figura 3) (XU et al., 1991; KAVANAGH & DOWD, 2003).

DSHAKRHHGYKRKFFHEKHHSHRGY

Figura 3: Estrutura histatina-5, em vermelho os resíduos de histidina (XU et al., 1991, modificado).

As catelicidinas são uma grande família de peptídeos antimicrobianos identificados em várias espécies de mamíferos que apresentam estrutura, tamanho e sequência variada. O peptídeo representa o domínio C-terminal, apresentando de 10 a 40 resíduos de aminoácidos, ligados ao domínio catelin, um segmento propeptídeo N-terminal altamente conservado de aproximadamente 100 aminoácidos. Os peptídeos catelicidinas se tornam ativos após clivagem da pró-proteína em sítios específicos, apresentando atividade contra bactéria, vírus e fungos (GENNARO & ZANETTI, 2000; BULET et al, 2004).

Dentro da classe das catelicidinas está o grupo de peptídeos lineares que apresentam um alto conteúdo de resíduos específicos, normalmente representando mais de 25% da composição de aminoácidos, sendo ricos em prolina, arginina ou em triptofano (Tabela 2; MISHRA et al., 2018; ZANETTI et al.,1997).

Dentro desta família estão os peptídeos Bactenecinas isolados de neutrófilos bovinos, denominados Bac5 e Bac7. Ambos apresentam um alto conteúdo de prolina e arginina, com aproximadamente 45% e 23%, respectivamente, dos resíduos de aminoácidos. Bac7 possui 59 aminoácidos com uma massa de 7 kDa, o Bac5 apresenta 42 resíduos com uma massa de 5kDa, com eficiente efeito antibacteriano contra Gram-positivas e negativas (FRANK et al., 1990). Também isolada de neutrófilos bovinos, a indolicidina é um peptídeo composto de 13 aminoácidos com cinco resíduos de triptofano em sua sequência. Os múltiplos resíduos de triptofano desempenham um papel importante na função destes peptídeos, sendo altamente ativos contra bactérias e fungos (Tabela 2; ZANETTI et al.,1997; SELSTED et al., 1992).

Tabela 2: Peptídeos ricos em prolina, arginina e triptofano

Bac7	RRIRPRPPRLPRPRRPLPFPRPGPRPIPRPLPFPRPGPRPIPRPLPFPRPGPRPIPRP L
Bac5	RFRPPIRRPPIRPPFYPPFRPPIRPPIFPPIRPPFRPPLGPF
Indolicidin	ILPWKWPWWPWR

1.5. Peptídeos antimicrobianos isolados de moluscos marinhos

Os organismos marinhos são uma rica fonte de PAMs, sendo que praticamente todos os organismos produzem compostos antibacterianos naturais como uma linha essencial de defesa para sobreviver, os quais apresentam um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, vírus e protozoários (SEMREEN et al., 2018). No entanto, diferente dos vertebrados que possuem um sistema imune adaptativo, os invertebrados marinhos dependem exclusivamente de mecanismos imunológicos inatos para sua defesa, sendo um recurso espetacular para a obtenção de PAMs (TINCUI & TAYLOR, 2004).

Nos últimos anos, dentro do filo dos moluscos, inúmeros peptídeos com ação antimicrobiana foram identificados (Tabela 3; ANJUM, et al., 2016). Nas espécies de mexilhão *Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis* uma variedade de pequenos peptídeos catiônicos foram isolados a partir do plasma e hemócitos. De acordo com sua estrutura primária e arranjo de cisteínas esses peptídeos foram classificados em quatro grupos, sendo identificados como: defensinas, miticinas, mitilinas e mitimicinas. Possuem característica anfifílica e seu tamanho variam de 3,7 a 4,5 kDa, os diferentes grupos e isoformas apresentam atividades biológicas distintas contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e antifúngicas (MITTA, VANDENBULCKE e ROCH, 2000; ANJUM, et al., 2016, CHARLET et al., 1996). O peptídeo antifúngico mitimicina, com uma massa molecular de 6,2 kDa contendo 12 cisteínas, foi parcialmente sequenciado não apresentando similaridade com nenhuma outra molécula conhecida (CHARLET et al., 1996)

Dois novos PAMs também foram isolados e caracterizados a partir do mexilhão *Mytilus coruscus*, sendo denominados myticusin-1 e mytichitina-CB. O peptídeo myticusin-1 com 104 aminoácidos incluindo 10 resíduos de cisteína, apresenta notável atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas, inibindo fortemente o crescimento de *Sarcina luteus* e *Escherichia coli* (LIAO et al., 2013). O peptídeo mytichitina-CB possui 55 resíduos

de aminoácidos com 6 resíduos de cisteína envolvidos em três pontes de dissulfeto intramoleculares, exibindo predominante atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Monilia albican* e atividade antibacteriana contra cepas Gram-positivas incluindo *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina luteus* e *Bacillus megaterium* (QIN, *et al.*, 2014).

Tabela 3. Peptídeos isolados de moluscos marinhos

Peptídeo	Espécie	Referência
Defensina A e B	<i>Mytilus edulis</i>	CHARLET <i>et al.</i> , 1996
Defensina 1 e 2 (MGD-1 & MGD-2)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	HUBERT, NOEL e ROCH, 1996; MITTA <i>et al.</i> , 1999b
Mitilina A e B	<i>Mytilus edulis</i>	CHARLET <i>et al.</i> , 1996
Mitilina B, C, D e G1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MITTA <i>et al.</i> , 2000
Mitimicina	<i>Mytilus edulis</i>	CHARLET <i>et al.</i> , 1996
Miticina A e B	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MITTA <i>et al.</i> , 1999a
Myticusin-1	<i>Mytilus coruscus</i>	LIAO <i>et al.</i> , 2013
Mytichitina-CB	<i>Mytilus coruscus</i>	QIN, <i>et al.</i> , 2014

Recentemente, através da análise do genoma e transcriptoma do mexilhão *Mytilus galloprovincialis*, uma nova família de PAMs lineares foi identificada. Denominados myticalins, variam tanto no comprimento, de 23 a 42 resíduos, quanto na composição de aminoácidos sendo classificados em quatro subfamílias: (i) A, ricos em resíduos de Arginina, Prolina e Tirosina (>10% cada); (ii) B, rico em Arg, Pro e Tre; (iii) C, rico em Arg, mas quase desprovido de resíduos de Pro; (iv) D, rico em Pro, Arg e Trp (ou Tre). Como exemplo, temos o peptídeo myticalin A5, rico em prolina e arginina que apresenta um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas (LEONI, *et al.*, 2017).

Myticalin A5 YSW**PRMPRI**PR**LPRYPRYPRYPRWPRWPRQPTIYA**

Figura 4: Peptídeo myticalin A5, em vermelho os resíduos de arginina e prolina (LEONI, *et al.*, 2017, modificado)

1.6 Estratégias utilizadas para o isolamento de peptídeos bioativos marinhos

Um procedimento típico para a descoberta de peptídeos bioativos, lineares ou cíclicos, envolvem etapas de extração, um fracionamento guiado pelo tipo de atividade que se deseja investigar e finalmente purificação para produzir um único peptídeo bioativo. Em geral, podem ser utilizados solventes orgânicos como metanol ou acetato de etila, assim como particionado com outros solventes, como hexano ou diclorometano. Também podem ser extraídos a partir de uma solução aquosa (WANG, et al, 2017) .

Os extratos podem ser submetidos à cromatografia em gel de sílica ou exclusão por tamanho e o produto eluído com solventes de polaridade crescente. A cromatografia de fase reversa tem sido muito utilizada no passo de purificação final (WANG, et al, 2017). Para os peptídeos lineares, o procedimento geral inclui normalmente cromatografia por exclusão de tamanho, HPLC de fase reversa e cromatografia de troca iônica.

Peptídeos bioativos marinhos, principalmente de uma diversidade de espécies de peixes são obtidos por uma etapa inicial de digestão de proteínas dos organismos. As enzimas digestivas mais utilizadas são a pepsina, a tripsina, a α -quimotripsina, a papaína e alguns coquetéis comerciais de protease. A maioria dos hidrolisados são rastreados para várias bioatividades após a digestão e fracionados de acordo com o tamanho por ultrafiltração e submetidos a técnicas e cromatografia citadas anteriormente (VENKATESAN, et al, 2017). Finalmente, as frações peptídicas individuais são identificadas usando as técnicas combinadas de espectrometria de massa e sequenciamento de proteínas (WANG, et al, 2017).

Apesar de alguns protocolos baseados na digestão de proteínas apresentarem sucesso para a identificação de peptídeos bioativos, estas são moléculas criadas artificialmente in vitro. Recentemente, técnicas de inativação rápida de proteases pelo calor, principalmente radiação microondas, seguida da utilização de filtros de exclusão de peso molecular associado à espectrometria de massas tem revelado um conjunto constante de peptídeos, fragmentos de proteínas citosólicas, mitocondriais e nucleares identificados em tecidos de camundongos (FRICKER, et al, 2010), linhagens celulares humanas (GELMAN, et al, 2011), e mais recentemente em fungos (DASGUPTA, et al 2016). Estes peptídeos são produtos intermediários do metabolismo proteico e muitas sequências depois de sintetizadas quimicamente e reintroduzidas em células de mamíferos, são capazes de regular a transdução de sinal (CUNHA, et al, 2008), a captação de glicose (BERTI, et al, 2012) e induzir a morte celular em várias células tumorais (ARAÚJO, et al, 2014).

Até o presente momento não há relatos na literatura com relação à investigação de moléculas de interesse econômico presentes no gastrópode marinho *Olivancillaria urceus*, sendo completamente desconhecido o seu potencial para a descoberta de novos compostos bioativos. Considerando a importância da identificação de novas fontes de produtos naturais (SARUMATHI et al., 2012), faz-se relevante o estudo deste organismo como fonte promissora a obtenção de novos peptídeos.

6. CONCLUSÃO

As análises de extratos peptídicos de baixo peso molecular de *O. urceus* revelaram a presença de uma fração, denominada 18-M-3, com atividade antimicrobiana contra *Micrococcus luteus*, apresentando uma concentração média de 2,18 mg/ml de peptídeos. A análise por espectrometria revelou tratar-se de uma fração complexa, constituída principalmente por um conjunto de peptídeos fragmentos de proteínas citosólicas e nucleares conservadas em diferentes espécies de moluscos.

7. REFERÊNCIAS

- ANJUM, K., ABBAS, S. Q., AKHTER, N., SHAGUFTA, B. I., SHAH, S. A. A. e HASSAN, S. S. 2016. "Emerging Biopharmaceuticals from Bioactive Peptides derived from Marine Organisms". *Chemical Biology & Drug Design*, 90(1): 12-30.
- ANEIROS, A. e GARATEIS. 2004. A. "Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures." *J. Chromatogr B. Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 803(1): 41-53.
- ARAUJO CB, RUSSO LC, CASTRO LM, FORTI FL, DO MONTE ER, RIOLI V, GOZZO FC, COLQUHOUN A, FERRO ES. A novel intracellular peptide derived from g1/s cyclin d2 induces cell death. *J Biol Chem*. 2014 Jun 13;289(24):16711-26.
- AYRES-PERES, L., QUADROS, A. F. & MANTELATTO, F. L. 2012. "Comparative analysis of shell occupation by two southern populations of the hermit crab *Loxopagurus loxochelis* (Decapoda, Diogenidae)". *Brazilian Journal of Oceanography*, 6(3): 299-310.
- BARRACCO, M.A.; & SILVA, P. M. (2015). "Hemolinfa e sistema imune de Perna perna", 1-22. In: IMUNOLOGIA. Disponível em: <http://www.ufpb.br/labipi/contents/capitulos-de-livro/cap1-imunologia-perna-book-chapter-imunologia-perna-perna.pdf> Acessado: 20/12/2018
- BERTI DA, RUSSO LC, CASTRO LM, CRUZ L, GOZZO FC, HEIMANN JC, LIMA FB, OLIVEIRA AC, ANDREOTTI S, PRADA PO, HEIMANN AS, FERRO ES. Identification of intracellular peptides in rat adipose tissue: Insights into insulin resistance. *Proteomics*. 2012 Aug;12(17):2668-81.
- BOLTEN, J. F. *Museum Boltenianum sive Catalogus cimeliorum e tribus regnis naturae quae olim collegerat*. [London: British Museum (Natural History)], 1906.
- BULET, P.; DIMARQ, J. L.; HETRU, C.; LAGUEUX, M.; CHARLET, M.; HEGY, G.; VAN DORSSELAER, A.; HOFFMAN, J. A. 1993. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 14893-14897.
- BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. (2004). "Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates", *Immunol Rev.*, 198:169–184.
- BRANCO, J.O., FREITAS JÚNIOR, F. e CHRISTOFFERSEN, M.L. 2015. "Bycatch fauna of seabob shrimp trawl fisheries from Santa Catarina State, southern Brazil." *Biota Neotropica*, 15(2)
- CARTER, G. T. (2011). "Natural products and Pharma 2011: strategic changes spur new opportunities." *Nat Prod Rep.*, 28(11): 1783-9.
- CASTRO, L. M.; BERTI, D. A., RUSSO, L. C.; COELHO, V., GOZZO, F. C., OLIVEIRA, V., FERRO, E. S. 2010. "Similar intracellular peptide profile of TAP1/beta2 microglobulin double-knockout mice and C57BL/6 wild-type mice as revealed by peptidomic analysis." *AAPS Journal*, 12(4): 608-16.

CHAPARRO, E.; SILVA JUNIOR, P.I. (2016). "Lacrain: the first antimicrobial peptide from the body extract of the brazilian centipede scolopendra viridicornis." *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(3):277-85 .

CHARLET, M., CHERNYSH, S., HETRU, C., HOFFMANN, J. A., & BULET, P. (1996). "Innate Immunity". *The Journal Of Biological Chemistry*, 271(36), 21808–21813.

CHE, F. Y. & FRICKER, L. D. 2002. "Quantitation of neuropeptides in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice using differential isotopic tags and mass spectrometry." *Anal Chem*, 74(13): 3190-8.

CHEN, B., FAN, D.Q., ZHU, K.X., SHAN, Z.G., CHEN, F.Y., HOU, L., CAI, L., WANG, K.J. (2015). "Mechanism study on a new antimicrobial peptide Sphistin derived from the N-terminus of crab histone H2A identified in haemolymphs of *Scylla paramamosain*" *Fish Shellfish Immunol*, 47(2):833-46.

CUNHA, F.M.; BERTI, D.A.; FERREIRA, Z.S.; KLITZKE, C. F.; MARKUS, R. P. e FERRO, E.S. "Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling." 2008. *Journal of Biological Chemistry*, 283(36): 24448-59.

CUTILLAS, PR. Principles of Nanoflow Liquid Chromatography and Applications to Proteomics. *Current Nanoscience*, 2005, 1, 65-71.

CUTRONA KJ, KAUFMAN BA, FIGUEROA DM, ELMORE DE. Role of arginine and lysine in the antimicrobial mechanism of histone-derived antimicrobial peptides. *FEBS Lett*. 2015 Dec 21;589(24 Pt B):3915-20.

DASGUPTA S, YANG C, CASTRO LM, TASHIMA AK, FERRO ES, MOIR RD, WILLIS IM, FRICKER LD. Analysis of the Yeast Peptidome and Comparison with the Human Peptidome. *PLoS One*. 2016 Sep 29;11(9).

DE VRIES, D. J. & P. M. BEART (1995). "Fishing for drugs from the sea: status and strategies." *Trends Pharmacol Sci* 16(8): 275-9.

EAYRS, S. 2007. "A guide to bycatch reduction in tropical shrimp-trawl fisheries". Revis edn. FAO, Rome, p.108.

EHRET-SABATIER, L., LOEW, D., GOYFFON, M., FEHLBAUM, P., HOFFMANN, J. A., VAN DORSSELAER, A., AND BULET, P., 1996. "Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood." *J. Biol. Chem.* 271, 29537–29544

FRANK, R. W., GENNARO, R., SCHNEIDER, K., PRZYBYLSKI, M., & ROMEO, D. (1990). "Amino Acid Sequences of Two Proline-Rich Bactenecins." *Journal of Biological Chemistry*, 265(31), 18871–1887.

FRAMESCHI, I. F., ANDRADE, L.S., FRANSOZO,V., FERNANDES-GOES, L.C., CASTILHO, L. 2015. "Shell occupation by the hermit crab *Dardanus insignis* (Decapoda, Diogenidae) from the north Coast of São Paulo state, Brazil." *Brazilian Journal of Biology*,

75(4): S35-S44.

FRICKER LD. Analysis of mouse brain peptides using mass spectrometry-based peptidomics: implications for novel functions ranging from non-classical neuropeptides to microproteins. *Mol Biosyst.* 2010 Aug;6(8):1355-65.

GANZ, T. (2003). “Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity”. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 710–720.

GASU EN, AHOR HS, BORQUAYE LS. Peptide Extract from *Olivancillaria hiatula* Exhibits Broad-Spectrum Antibacterial Activity. *Biomed Res Int.* 2018 Dec 23;2018:6010572.

GELMAN JS, SIRONI J, CASTRO LM, FERRO ES, FRICKER LD. Peptidomic analysis of human cell lines. *J Proteome Res.* 2011 Apr 1;10(4):1583-92.

GENNARO, R., & ZANETTI, M. (2000). Structural Features and Biological Activities of the Cathelicidin-Derived Antimicrobial Peptides. *Biopolymers*, 55(1):31-49.

GERDOL, M., PULLANDRE, N., DE MORO, G., GUARNACCIA, C., LUCAFÒ, M., BENINCASA, M., ZLATEV, V., MANFRIN, C., TORBOLI, V., GIULIANINI, P. G., SAVA, G., VENIER, P., PALLAVICINI, A. 2015. “Identification and Characterization of a Novel Family of Cysteine-Rich Peptides (MgCRP-I) from *Mytilus galloprovincialis*.” *Genome Biol. Evol.*, 7(8): 2203–2219.

GRAÇA LOPES, R. 1996. “A pesca do camarão-sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri*, Heller (1862) e sua fauna acompanhante no litoral do Estado de São Paulo”. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, UNESP. 96p.

GRAÇA-LOPES, R., TOMÁS, A.R.G., TUTUI, S.L.S., SEVERINO RODRIGUES, E. e PUZZI, A. 2002a. “Fauna acompanhante da pesca camaroeira no litoral do estado de São Paulo, Brasil.” *Bol. Instituto Pesca*, São Paulo, 28(2): 173-188.

GRAÇA-LOPES, R., TOMÁS, A.R.G., TUTUI, S.L.S., SEVERINO RODRIGUES, E. e PUZZI, A. 2002b. “Comparação da dinâmica de desembarques de frotas camaroeiras do Estado de São Paulo, Brasil”. *Bol. Instituto de Pesca*, São Paulo, 28(2): 163-171.

GRAÇA-LOPES, R., PUZZI, A., SEVERO-RODRIGUES, E., BARTOLOTTA, A.S., GUERRA, S. F. e FIGUEIREDO, K.T.B. 2002c. “Comparação entre a produção de camarão-sete-barbas e de fauna acompanhante pela frota-de-pequeno-porte sediada na Praia de Perequê, Estado de São Paulo, Brasil.” *Bol. Instituto Pesca*, São Paulo, 28(2): 189-194.

HELMERHORST, E. J., VAN ' W., HOF, T., VEERMAN, E. C. I., SIMOONS-SMIT, I., & NIEUW AMERONGEN, A. V. (1997). “Synthetic histatin analogues with broad-spectrum antimicrobial activity”. *Biochem. J.* 326, 39–45.

HOFFMANN, J. A., KAFATOS, F. C., JR, C. A. J., & EZEKOWITZ, R. A. B. (1999). “Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity”, *Science*, 284 (5418):1313–1319.

HUBERT, F., NOEL, T., & ROCH, P. (1996). “A member of the arthropod defensin family

from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*)". *J. Biochem.*, 204, 302–306.

JODOIN J, HINCKE MT. Histone H5 is a potent Antimicrobial Agent and a template for novel Antimicrobial Peptides. *Sci Rep*. 2018 Feb 5;8(1):241.

JOLY, C., HADDAD, C., VERDADE, L., OLIVEIRA, M., BOLZANI, V., & BERLINCK, R. (2011). "Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil". *Revista USP*, (89), 114–113.

KAVANAGH, K., & DOWD, S. (2004). "Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential". *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(3), 285–289. <https://doi.org/10.1211/0022357022971>

LAKSHMAIAH NARAYANA, J., & CHEN, J. Y. (2015). "Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents." *Peptides*, 72, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.05.012>

LEE, I. H., ZHAO, C., CHO, Y., HARWIG, S. S. L., COOPER, E. L., & LEHRER, R. I. (1997). "Clavanins, α -helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes." *FEBS Letters*, 400(2), 158–162.

LEE, D.G., KIM, H.N., PARK, Y., KIM, H.K., CHOI, B.H., CHOI, C.H., HAHM, K.S. (2002). "Design of novel analogue peptides with potent antibiotic activity based on the antimicrobial peptide, HP (2-20), derived from N-terminus of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1." *Biochim Biophys Acta.*, 1598(1-2):185-94

LEONI, G., DE POLI, A., MARDIROSSIAN, M., GAMBATO, S., FLORIAN, F., VENIER, P., ... GERDOL, M. (2017). "Myticalins: A novel multigenic family of linear, cationic antimicrobial peptides from marine mussels (*Mytilus* spp.)". *Marine Drugs*, 15(8), 1–23. <https://doi.org/10.3390/md15080261>

LIAO, Z., WANG, X. CHAO, LIU, H. HUI, FAN, M. HUA, SUN, J. JING, & SHEN, W. 2013. "Molecular characterization of a novel antimicrobial peptide from *Mytilus coruscus*." *Fish and Shellfish Immunology*, 34(2): 610–616.

MENDONÇA, J.T., GRAÇA-LOPES, R., AZEVEDO, V.G. 2013. "Estudo da CPUE da Pesca Paulista Dirigida ao Camarão Sete-barbas entre 2000 e 2011". *Bol. Instituto Pesca*, São Paulo, 39(3): 251 – 261.

MISHRA, A. K., CHOI, J., MOON, E., & BAEK, K. H. (2018). "Tryptophan-rich and proline-rich antimicrobial peptides." *Molecules*, 23(4), 1–23.

MITTA, G.; VANDENBULCKE, F. & ROCH, P. 2000. "Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity". *FEBS Letters*, 486: 185-190.

MITTA, G., HUBERT, F., NOËL, T., & ROCH, P. (1999a). "Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*." *European Journal of Biochemistry*, 265(1), 71–78. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00654.x>

MITTA, G., VANDENBULCKE, F., HUBERT, F., & ROCH, P. (1999b). "Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge". *Journal of Cell Science*, 112, 4233–4242.

MITTA, G., VANDENBULCKE, F., HUBERT, F., SALZET, M., & ROCH, P. (2000). "Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense". *Journal of Biological Chemistry*, 275(17), 12954–12962. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.17.12954>

MORA, C., TITTENSOR, D.P., ADL, S., SIMPSON, A.G., WORM, B. (2011). "How many species are there on Earth and in the ocean?" *PLoS Biol* 9(8): e1001127.

MORANO, C., ZHANG, X., FRICKER, L. D. 2008. "Multiple isotopic labels for quantitative mass spectrometry". *Anal Chem*, 80(23): 9298-9309.

MARCUS, E. & MARCUS, E. (1959) Studies on Olividae. In: *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo (Ed), Zoologia*, 232, 99–188.

OREN, Z., & SHAI, Y. (1998). "Mode of Action of Linear Amphipathic alpha-Helical Antimicrobial Peptides". *Peptide Science*, 47(6), 451–463.

PENCHASZADEH, P. E., ARRIGHETTI, F., CLEDÓN, M., LIVORE, J. P., BOTTO, F., IRIBARNE, O. 2006. "Bivalve contribution to shallow sandy bottom food web off Mar del Plata (Argentina): Inference from stomach contents and stable isotope analysis." *Journal of Shellfish Research*, 25(1): 51-54.

QIN, C. L., HUANG, W., ZHOU, S. Q., WANG, X. C., LIU, H. H., FAN, M. H., WANG, R., GAO, P., LIAO, Z. 2014. Characterization of a novel antimicrobial peptide with chitin-binding domain from *Mytilus coruscus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 41(2): 362–370.

QU, Z., STEINER, H., ENGSTRÖM, Å., BENNICH, H., & BOMAN, H. G. (1982). "Insect Immunity: Isolation and Structure of Cecropins B and D from Pupae of the Chinese Oak Silk Moth, *Antheraea pernyi*." *European Journal of Biochemistry*, 127(1), 219–224.

REDDY, K. V. R., YEDERY, R. D., & ARANHA, C. (2004). "Antimicrobial peptides: Premises and promises." *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 536–547. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>

RICILUCA, K.C.T., SAYEGH, R.S.R. *et al.* 2012 "Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph". *Results Immunol* ;2:66–7

ROBINETTE, D., WADA, S., ARROLL, T., LEVY, M.G., MILLER, W.L., NOGA, E.J. (1998) "Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins". *Cell Mol Life Sci.*, 54(5):467-75.

SABLE, R.; PARAJULI, P.; JOIS, S. 2017. "Peptides, Peptidomimetics, and Polypeptides from Marine Sources: A Wealth of Natural Sources for Pharmaceutical Applications." *Marine Drugs*, 15(124): 2-37.

SARUMATHI, G., ARUMUGAM, M., KUMARESAN, S., BALASUBRAMANIAN, T. 2012. "Studies on bioprospecting potential of a gastropod mollusc *Cantharus tranquebaricus* (Gmelin, 1791)." *Asian Pac J, Trop Biomed*, 2(10): 759-764.

SAYEGH, R.S.; BATISTA, I.F.; MELO, R.L.; RISKE, K.A.; DAFFRE, S.; MONTICH, G.; DA SILVA JUNIOR, P.I; (2016)." Longipin: An Amyloid Antimicrobial Peptide from the Harvestman *Acutisoma longipes* (Arachnida: Opiliones) with Preferential Affinity for Anionic Vesicles." *PLoS One*, 11(12).

SELSTED M.E., NOVOTNY, M.J., MORRIS, W.L., TANG, Y.Q., SMITH, W., CULLOR, J.S. (1992). "Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils." *J Biol Chem.*, 267(7) : 4292-5.

SEMREEN, M.H., EL-GAMALA, M.I., ABDINA, S., ALKHAZRAJI, H., KAMAL, L., HAMMADA, S., EL-AWADY, F., WALEEDA, D., KOURBAJ, L. (2018) "Recent updates of marine antimicrobial peptides". *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(3) : 396-409.

SHAMOVA, O.V., ORLOV, D.S., BALANDIN, S.V., SHRAMOVA, E.I., TSVETKOVA, E.V., PANTELEEV, P.V., LEONOVA, Y.F., TAGAEV, A.A., KOKRYAKOV, V.N., OVCHINNIKOVA, T.V. (2014). "Acipensins – Novel Antimicrobial Peptides from Leukocytes of the Russian Sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*". *Acta Naturae*, 6(4):99-109.

SIM S, WANG P, BEYER BN, CUTRONA KJ, RADHAKRISHNAN ML, ELMORE DE. Investigating the nucleic acid interactions of histone-derived antimicrobial peptides. *FEBS Lett.* 2017 Mar;591(5):706-717.

SUAREZ-JIMENEZ, G.M., BURGOS-HERNANDEZ, A., EZQUERRA-BRAUER, J.M. 2012. "Bioactive Peptides and Depsipeptides with Anticancer Potential: Sources from Marine Animals." *Marine Drugs*, 10(5): 963-986.

TANGERINA, M. M. P. 2016."Fauna Acompanhante: Um Universo Químico a Ser Explorado." Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

TANGERINA, M. M. P, CORREA, H., HALTLI, B., VILEGAS, W., KERR, R. G. 2017. "Bioprospecting from cultivable bacterial communities of marine sediment and invertebrates from the underexplored Ubatuba region of Brazil." *Arch Microbiol*, 199: 155-169

TAYLOR, S. W., CRAIG, A. G., FISCHER, W. H., PARK, M., & LEHRER, R. I. (2000). "Styelin D, an extensively modified antimicrobial peptide from ascidian hemocytes." *Journal of Biological Chemistry*, 275(49), 38417–38426.

TESO, V. & PASTORINO, G. 2011. "A revision of the genus *Olivancillaria* (Mollusca: Olividae) from the southwestern Atlantic". *Zootaxa*, 2889: 1-34.

TINCU, J.A., TAYLOR, S.W. (2004). "Antimicrobial Peptides from Marine Invertebrates."

Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 48(10): 3645-3654.

VENKATESAN J, ANIL S, KIM SK, SHIM MS. Marine Fish Proteins and Peptides for Cosmeceuticals: A Review. *Mar Drugs*. 2017 May 18;15(5)

WANG X, YU H, XING R, LI P. “Characterization, Preparation, and Purification of Marine Bioactive Peptides”. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9746720.

WANG, J., MA, K., RUAN, M., WANG, Y., LI, Y., FU, Y. V., WANG, J. (2018). “A novel cecropin B-derived peptide with antibacterial and potential anti-inflammatory properties.” *PeerJ*, 2018(7), 1–21.

WANG, G., LI, X., & WANG, Z. (2016). “APD3 : the antimicrobial peptide database as a tool for research and education”, *Nucleic Acids Res*. 44 : 1087–1093.

WU, Q., PATOČKA, J., & KUČA, K. (2018). “Insect Antimicrobial Peptides, a Mini Review.” *Toxins*, 10(11), 1–17.

XU, T., LEVITZ, S. M., DIAMOND, R. D., & OPPENHEIM, F. G. (1991). “Anticandidal activity of major human salivary histatins”. *Infection and Immunity*, 59(8), 2549–2554.

ZHENG, L. H., WANG, Y. J., SHENG, J., WANG, F., ZHENG, Y., LIN, X. K. AND SUN, M. 2011. “Antitumor Peptides from Marine Organisms”. *Marine Drugs*, 9(10): 1840-1859.

ZANETTI, M., GENNARO, R., & ROMEO, D. (1997). “The cathelicidin family of antimicrobial peptide precursors: A component of the oxygen-independent defense mechanisms of neutrophils.” *Annals of the New York Academy of Sciences*, 832, 147–162.

ZASLOFF, M. (1987). “Magainins, a Class of Antimicrobial Peptides from *Xenopus* Skin: Isolation, Characterization of Two Active Forms, and Partial cDNA Sequence of a Precursor”. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 84 (15): 5449–5453.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Isolamento e caracterização de peptídeos do gastrópode marinho *Olivancilaria urceus*

AUTORA: LETÍCIA ROSSI MALIMPENSA

ORIENTADOR: LEANDRO MANTOVANI DE CASTRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIODIVERSIDADE DE AMBIENTES COSTEIROS, área: Biodiversidade pela Comissão Examinadora:

Leandro Mantovani de Castro

Prof. Dr. LEANDRO MANTOVANI DE CASTRO

Instituto de Biociências / Câmpus do Litoral Paulista da UNESP

Cristiane Angélica Ottoni

Profa. Dra. CRISTIANE ANGÉLICA OTTONI

Instituto de Biociências - Campus do Litoral Paulista / UNESP

(PARTICIPAÇÃO NÃO PRESENCIAL)

Prof. Dr. EMER SUAVINHO FERRO

Instituto de Ciências Biomédicas / USP

São Vicente, 13 de março de 2019