

**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 Biociências 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

São Vicente / SP
2019

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
Cisteína	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 sequências 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 Micrococcus luteus 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
1.4.1. <i>Peptídeos lineares antimicrobianos</i>	<i>4</i>
1.4.2. <i>Peptídeos antimicrobianos ricos no aminoácido cisteína.....</i>	<i>5</i>
1.4.3. <i>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 ($>10\text{kDa}$), 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-hidroxilisinas (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	GWLRKAAKSVGKFYYKHKYYIKA AWQIGKHAL
Clavanin A	VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVF

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 APQRRATCDLFSIFGVGDSACAAHCLVLGHRGGYCNSQSVCI
E CRD

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).



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	RRIRPRPPRLPRPRRPLPFPRPGPRPIRPLPFPRPGPRPIRPLPFPRPGPRPIRPL
Bac5	RFRPPIRRPPIRPPFYPPFRPPIRPPIFPPIRPPFRPPLGPFP
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 (TINCU & 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 et al., 1996
Defensina 1 e 2 (MGD-1 & MGD-2)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	HUBERT, NOEL e ROCH, 1996; MITTA et al., 1999b
Mitilina A e B	<i>Mytilus edulis</i>	CHARLET et al., 1996
Mitilina B, C, D e G1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MITTA et al., 2000
Mitimicina	<i>Mytilus edulis</i>	CHARLET et al., 1996
Miticina A e B	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MITTA et al, 1999a
Myticusin-1	<i>Mytilus coruscus</i>	LIAO et al., 2013
Mytichitina-CB	<i>Mytilus coruscus</i>	QIN, et al., 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**PRM****PRIPRL****PRYPRYPRYPRWPRWPRQPTIYA**

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., PUIILLANDRE, 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 Ampiphatic alpha-Helica 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.

Tabela 2: Peptídeos ricos em prolina, arginina e triptofano

Bac7	RRIRPRPPRLPRPRRPLPFPRPGPRPIRPLPFPRPGPRPIRPLPFPRPGPRPIRPL
Bac5	RFRPPIRRPPIRPPFYPPFRPPIRPPIFPPIRPPFRPPLGPFP
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 (TINCU & 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 et al., 1996
Defensina 1 e 2 (MGD-1 & MGD-2)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	HUBERT, NOEL e ROCH, 1996; MITTA et al., 1999b
Mitilina A e B	<i>Mytilus edulis</i>	CHARLET et al., 1996
Mitilina B, C, D e G1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MITTA et al., 2000
Mitimicina	<i>Mytilus edulis</i>	CHARLET et al., 1996
Miticina A e B	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MITTA et al, 1999a
Myticusin-1	<i>Mytilus coruscus</i>	LIAO et al., 2013
Mytichitina-CB	<i>Mytilus coruscus</i>	QIN, et al., 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**PRM****PRIPRL****PRYPRYPRYPRWPRWPRQPTIYA**

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.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo o isolamento e caracterização de peptídeos que existam naturalmente nos tecidos do gastrópode marinho *O. urceus*.

- Objetivos específicos:
 - 1) Extração de peptídeos pelo método de inativação de proteases pelo calor e exclusão de proteínas pelo tamanho.
 - 2) Fracionamento do extrato inicial por cromatografia líquida e caracterização das frações com ação antimicrobiana.
 - 3) Sequenciamento e caracterização através de espectrometria de massas e elaboração de banco de dados de proteínas dos peptídeos detectados em frações com bioatividade.
 - 4) Síntese química dos peptídeos e ensaios de bioatividade das sequências potencialmente candidatas ação antimicrobiana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

As amostras de *O. urceus* foram obtidas por meio da pesca de arrasto de fundo do camarão sete-barbas no município de Peruíbe, litoral sul do estado de São Paulo. Os organismos vivos foram transportados em recipiente com oxigenador até o Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista e mantidos em aquário para posterior utilização por um período de no mínimo 48 horas.

3.2. Extratos peptídicos

Os extratos de peptídeos foram preparados como descrito previamente (CHE; FRICKER, 2002; MORANO et al., 2008), com algumas modificações. Os organismos vivos foram incubados em banho-maria à 80° C em água deionizada por 20 minutos para remoção da concha e inativação de proteases. Em seguida foram congelados, macerados com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó e estocado à -20°C para posterior processamento. Os tecidos macerados foram ressuspensos em água deionizada até um volume de 20 mls, sonificados por 1 min à amplitude de 80 Hz e incubados novamente em banho maria à 80°C por 20 minutos. Após a incubação, as amostras foram resfriadas a 4°C no gelo por quarenta minutos e posteriormente acidificadas com HCl para uma concentração final de 10 mM, para precipitação das proteínas. As amostras resfriadas foram sonificadas no gelo três vezes, 20 pulsos de um segundo a 4 Hz, e os homogenatos centrifugados a 3000 rpm por 50 minutos à 4°C. Após esta etapa, os sobrenadantes foram filtrados em membrana Millipore que permite a passagem de moléculas com peso molecular inferior a 10 kDa (Amicon Ultra, Millipore, EUA). Os eluatos não retidos pela membrana foram ajustados para uma faixa de pH entre 2 e 4 com ácido trifluoracético (TFA) 50% e aplicados em pré-colunas C18 (OASIS – Waters, UK), lavado com solução de acetonitrila (ACN) 5% contendo TFA 0,1%, com o objetivo de pré-purificar as frações. Em seguida, duas eluições foram realizadas com diferentes concentrações de acetonitrila (40% e 80%) em água acidificada (TFA 0,1%). Os volumes das amostras foram reduzidos para 5 µL em uma centrífuga a vácuo, ressuspensos em 1,5 mls de água deionizada e estocados a - 80°C.

3.3. Dosagem da concentração total de peptídeos

Os peptídeos foram quantificados nas frações obtidas (40% e 80% ACN) pelo método fluorimétrico, utilizando o reagente fluorescamina (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA - $C_{17}H_{10}O_4$) como previamente descrito (CUNHA et al., 2008; CASTRO et al., 2010). Este método consiste na ligação de uma molécula de fluorescamina às aminas primárias presentes nos resíduos de lisina (K) e no N-terminal dos peptídeos. As concentrações de peptídeos nas amostras desconhecidas foram determinadas através de uma curva padrão utilizando o peptídeo 5A (LTLRTKL) como padrão. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda 370 nm (excitação) e 480 nm (emissão).

3.4. Fracionamento dos extratos de peptídeos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os extratos de peptídeos preparados foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para obtenção de frações. A separação foi realizada utilizando o sistema UFLC-Shimadzu modelo Prominence em coluna de fase reversa Preparativa-ODS C18 (250 mm x 20 mm; 5 μ m). As frações dos extratos 40% e 80% foram eluídas em um gradiente linear de 2-60% e 10-80% respectivamente de acetonitrila em TFA 0,05%, durante 80 minutos sob um fluxo de 2 mL/min. A absorbância foi monitorada a 225nm e 280nm. As frações correspondentes aos picos foram coletadas manualmente e concentradas em uma centrífuga a vácuo para remoção de solventes e estocados a -80°C. As frações foram reconstituídas em 500 μ l de água deionizada e então submetidas a ensaio de inibição de crescimento em meio líquido para determinação de atividade antimicrobiana.

As frações que apresentaram atividade antimicrobiana foram submetidas a uma segunda etapa de purificação por HPLC em coluna de fase reversa semipreparativa JUPITER C18 (250 mm x 10 mm; 10 μ m), em um gradiente de concentração de 2 a 60% para fração de 40% e de 20 a 80% para a fração de 80% de acetonitrila acidificada (ACN/TFA) durante 60 minutos com um fluxo de 2mL/min. As frações coletadas manualmente, foram concentrados em centrífuga a vácuo e reconstituídas em 150 μ l água Milli-Q e novamente avaliadas no ensaio de crescimento microbiano .

Quando necessário uma nova abertura de gradiente foi realizada em coluna analítica JUPITER C18 (200mm x 4,6mm; 10 μ m), para melhor purificação do pico de interesse. Posteriormente foram realizados novos testes de bioatividade e identificação dos peptídeos por espectrometria de massa.

3.5. Atividade Antimicrobiana - Ensaio de inibição de crescimento em meio líquido

Para avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizado o ensaio de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido (BULET et al., 1993), contra os microorganismos: *Micrococcus luteus* A270 (bactéria Gram-positiva), *Echerichia coli* SBS 363 (bactéria Gram-negativa) e levedura e *Candida albicans* MDM8.

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços com uma alíquota de 20 µL das frações coletadas do HPLC e 80 µL do microrganismo em meio de cultivo. Água ultrapura e meio de cultura foram usados como controle.

Para as bactérias foi utilizado caldo de peptona pobre em nutrientes (PB: peptona 10 g/L; NaCl 5 gr/L; pH 7,4) como meio de crescimento, para as leveduras o meio utilizado continha dextrose de batata na concentração 12 g/L (Potato Dextrose Broth– PDB- Difco™, Houston, EUA; half strength). Ambos em fase logarítmica de crescimento, na concentração final de 10^5 céls/mL para bactérias e 10^4 céls/mL para leveduras em cada poço. O crescimento microbiano é analisado por medida da densidade óptica da cultura, num leitor de microplaca Victor 3 – 1420 (PerkinElmer) a 595nm, após 18 horas de incubação a 30°C sob agitação constante.

3.6. Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A concentração inibitória mínima foi determinada utilizando um ensaio de microdiluição em caldo em placas de 96 poços. Onde foi realizada uma diluição seriadas com fator de diluição dois de 20µL da amostra aplicado a cada poço, por fim adicionado 80 µL do microrganismo em meio de cultivo. O crescimento microbiano foi medido por meio do monitoramento do aumento da DO em 595 nm após incubação a 30°C por 18h (modificado EHRETRIT-SABATIER et al, 1996).

3.7. Análise por Espectrometria de Massas

Após a última etapa de purificação do pico que apresentou atividade antimicrobiana, a fração foi seca e ressuspensa em volume 15 µL de ácido fórmico, e submetidas à análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS/MS). As misturas peptídicas foram separadas em gradiente de eluição de 0-40% durante 35min de uma mistura água/acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico, em coluna capilar de 75µm empacotada com sílica C18. Os dados foram adquiridos automaticamente em modo dependente de aquisição (DDA) após geração de múltiplos peptídeos protonados por ionização em

electrospray (ESI), seguido de dissociação em MS/MS por colisão com argônio em intensidade de 10 a 30 eV. Condições típicas de LC e ESI foram: fluxo de 600 nL/min, voltagem no capilar do nanofluxo de 3.5 kV, temperatura do bloco de 80°C, e voltagem do cone de 100 V. As análises de sequenciamento dos peptídeos foram realizadas através do programa PEAKS Studio versão 8.5, utilizando banco de dados para *Cassostrea gigas* e para o filo Mollusca construídos a partir de dados do site UNIPROT.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção e estimativa da concentração total de peptídeos nos extratos.

Os extratos peptídicos foram preparados a partir do tecido de *O. urceus* conforme descrito anteriormente. Proteínas de alto peso molecular possuem bioatividade limitada e em geral, os peptídeos bioativos originários de moluscos marinhos possuem 5-40 resíduos de aminoácidos (ANJUM *et al.*, 2016). Assim, após a passagem do sobrenadante em filtro Milipore foram obtidos apenas peptídeos com peso molecular inferior a 10 kDa. O tamanho relativamente menor dos peptídeos também os torna viáveis para a síntese química (BULET *et al.*, 2004).

Os filtrados foram pré-purificados em coluna OASIS C18 e submetidos à dois estágios sucessivos de eluição com diferentes concentrações de acetonitrila (40% e 80%). A concentração total de peptídeos foi estimada nas duas frações eluídas (Tabela 4 e 5) pelo método da fluorescamine.

As maiores concentrações de peptídeos foram eluídas à 40% de ACN. Alguns estudos relatam que a grande maioria dos peptídeos que apresentam atividade são comumente eluídos nesta concentração (RICILUCA, *et al.*, 2012; SAYEGH *et al.*, 2016; CHAPARRO & SILVA JUNIOR, 2016).

Tabela 4. Concentração total de peptídeos fração eluída à 40%

Amostra	Concentração (mg/ml)	Quantidade total (mg)
<i>O. urceus 1</i>	2,42	3,87
<i>O. urceus 2</i>	3,79	4,55
<i>O. urceus 3</i>	4,58	5,50
<i>O. urceus 4</i>	3,85	4,62
<i>O. urceus 5</i>	0,73	0,87
<i>O. urceus 6</i>	3,59	5,74
<i>O. urceus 7</i>	2,27	3,63
<i>O. urceus 8</i>	2,54	3,05
<i>O. urceus 9</i>	4,57	5,49
<i>O. urceus 10</i>	2,67	4,26
<i>O. urceus 11</i>	4,10	6,57
<i>O. urceus 12</i>	3,77	6,03

Tabela 5. Concentração total de peptídeos fração eluída à 80%

Amostra	Concentração (mg/ml)	Quantidade total (mg)
<i>O. urceus 1</i>	0,0403	0,0322
<i>O. urceus 2</i>	0,0832	0,0499
<i>O. urceus 3</i>	0,0461	0,0277
<i>O. urceus 4</i>	0,0681	0,0409
<i>O. urceus 5</i>	0,0105	0,0063
<i>O. urceus 6</i>	0,0317	0,0253
<i>O. urceus 7</i>	0,0271	0,0217
<i>O. urceus 8</i>	0,0241	0,0145
<i>O. urceus 9</i>	0,0665	0,0399
<i>O. urceus 10</i>	0,0559	0,0447
<i>O. urceus 11</i>	0,0650	0,0520
<i>O. urceus 12</i>	0,0817	0,0653

4.2. Fracionamento Inicial dos extratos de peptídeos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Alguns extratos peptídicos foram selecionados aleatoriamente (amostras 8, 10 e 11) e submetidos a cromatografia líquida de alta performance (CLAE) separadamente. Na Figura 5, podemos observar que as amostras apresentaram perfis cromatográficos muito semelhantes, indicando uma reprodutibilidade do método de extração. Adicionalmente, a sobreposição dos cromatogramas, revelou uma variação de intensidade dos picos presente em cada um dos extratos analisados, que pode ser atribuída as diferentes quantidades de peptídeos totais

estimados pelo método da fluorescamine, sendo o extrato 8 (verde) 3,05mg, 10 (azul) 4,26mg e 11(vermelho) 6,57mg.

Os extratos eluídos a 80% ACN, devido à baixa concentração dos peptídeos, foram agrupados em uma única amostra e fracionados por CLAE obtendo-se um perfil único (Figura 6).

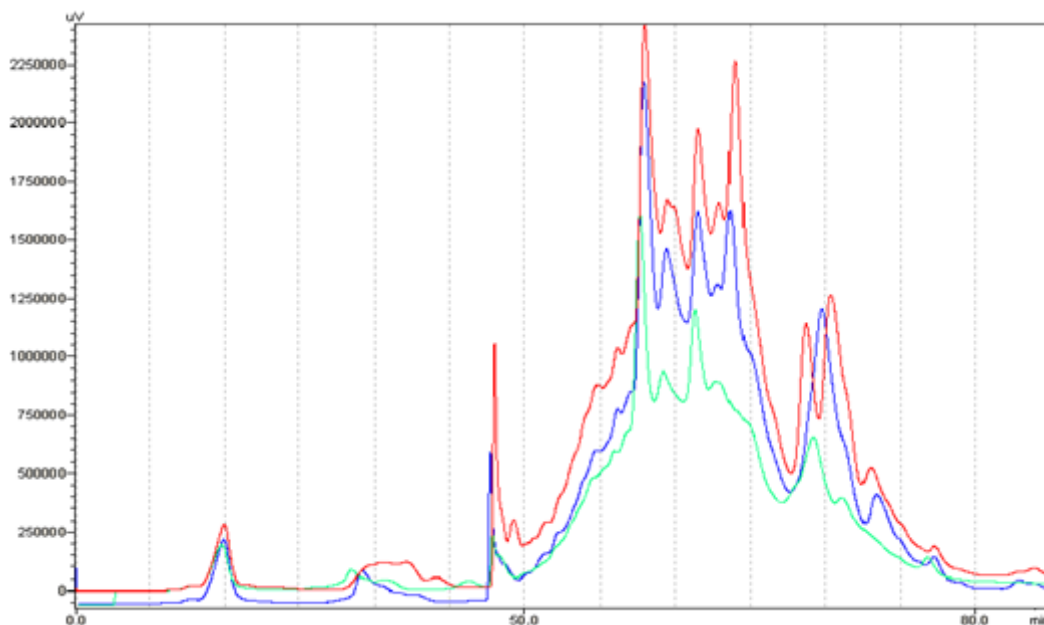


Figura 5: Perfil cromatográfico dos extratos peptídicos de *O. urceus* 8, 10 e 11 eluídos a 40% ACN. Fracionamento obtido com coluna Shimadzu Preparativa-ODS C18 em um gradiente linear de 2 a 60% de ACN durante 60 min., fluxo de 2 mL/min e $\lambda=225$ nm. Extratos 8 (verde), 10 (azul) e 11 (vermelho).

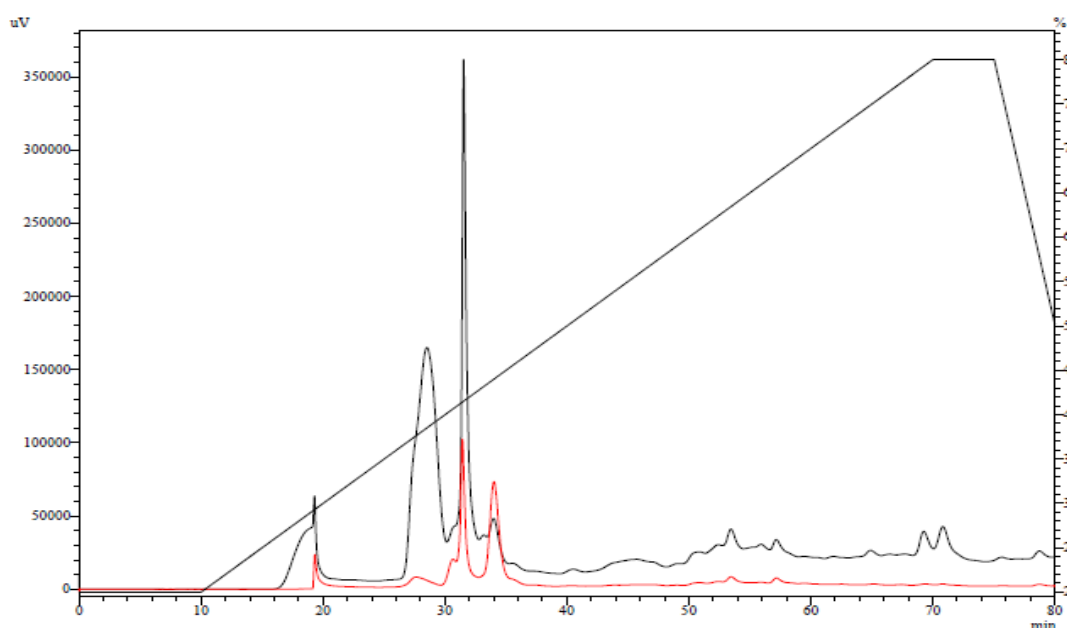


Figura 6: Perfil cromatográfico dos extratos peptídicos de *O. urceus* eluídos a 80% ACN. Fracionamento obtido com coluna Shimadzu Preparativa-ODS C18 em um gradiente linear de 10-80% de ACN durante 60 min., fluxo de 2mL/min e absorbância monitorada em $\lambda=225$ nm (preto) e $\lambda=280$ nm (vermelho). Extratos 2,4,10 e 11, quantidade total de 0,2081mg de peptídeos.

Os picos dos perfis cromatográficos obtidos foram analisados e 25 frações coletadas para cada um dos eluatos (40 e 80%). Estas frações coletadas foram concentradas e reconstituídas em 500 µls de água deionizada.

4.3. Teste de Atividade Antimicrobiana - Ensaio de inibição de crescimento em meio líquido

As frações coletadas foram analisadas quanto à atividade antimicrobiana através de ensaios de inibição em meio líquido contra bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* A720, bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* SBS 363, e levedura e *Candida albicans* MDM8. Nesta triagem somente cinco frações dos extratos eluídos a 40% resultaram em atividade antimicrobiana contra *Micrococcus luteus* A720 (Tabela 6; Figura 7). Não foi observada atividade antimicrobiana nas frações do eluato a 80% (dados não demonstrados).

Tabela 6. Ensaio de atividade antimicrobiana das frações do extrato 11 eluído a 40% ACN.

Fracões (40% ACN)	Minutos	Microorganismo		
		<i>M. luteus</i> A720	<i>E. coli</i> SBS 363	<i>C. albicans</i> MDM8
1	26.2-28.33	+	+	+
2	28.3-31.02	+	+	+
3	31.02-32.7	+	+	+
4	32.7-37.6	+	+	+
5	37.6-40.01	+	+	+
6	40.01-42.14	+	+	+
7	42.14-43.7	+	+	+
8	43.7-47.1	+	+	+
9	47.10-48.3	+	+	+
10	48.3-49.1	+	+	+
11	49.1-50	+	+	+
12	50-51.85	+	+	+
13	51.85-52.68	+	+	+
14	52.68-54.25	+	+	+
15	54.25-55.50	+	+	+
16	55.50-57	-	+	+
17	57-59.32	-	+	+
18	59.32-61.02	-	+	+
19	61.02-62.74	-	+	+
20	62.74-63.46	+	+	+
21	63.46-67.96	-	+	+
22	67.9-69.78	+	+	+
23	69.78-72.63	+	+	+
24	72.63-77.38	+	+	+
25	77.38	+	+	+

(-) Inibição; (+) Crescimento

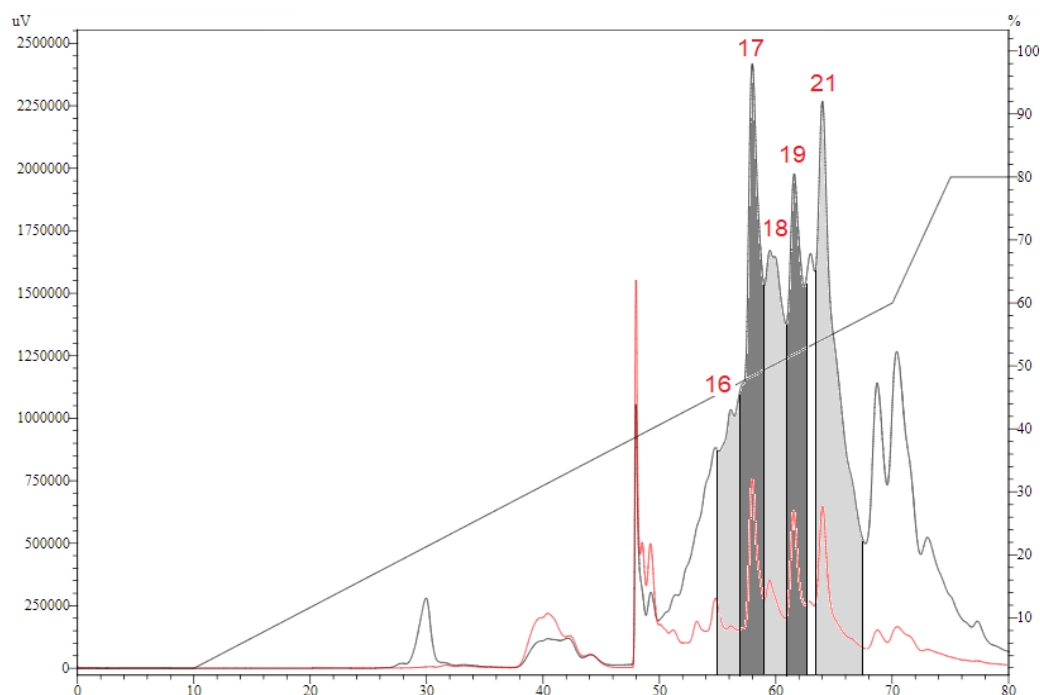


Figura 7: Perfil cromatográfico das frações do extrato peptídico 11 de *O. urceus* eluído a 40% ACN. Fracionamento obtido com coluna Shimadzu Preparativa-ODS C18 em um gradiente linear de 2 a 60% de ACN durante 60 min., fluxo de 2mL/min, $\lambda=225$ nm e $\lambda=280$ nm. Os respectivos picos 16, 17, 18, 19 e 21 apresentaram atividade antimicrobiana contra *Micrococcus luteus* A720.

Os picos 16, 17, 18, 19 e 21 que apresentaram atividade antimicrobiana, destacados no cromatograma acima (Figura 7), passaram por uma nova etapa de separação por CLAE em coluna de fase reversa semipreparativa JUPITER C18.

Novas frações foram obtidas, concentradas e reconstituídas em 150 μ l de água Milli-Q, onde 20 μ ls foram utilizados para novo teste de inibição de crescimento em meio líquido. Nesta segunda triagem apenas as frações provenientes dos picos 18 e 21 (Tabela 7) apresentaram atividade antimicrobiana contra *Micrococcus luteus* A720, denominadas 18-M e 21-G e 21-H, destacadas nos cromatogramas abaixo (Figura 8). As frações dos picos 16, 17, 19 e 21 não apresentaram atividade antimicrobiana (dados não demonstrados).

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 *Micrococcus luteus* A720.

Fração 18	Minutos	<i>M. luteus</i> A720	Fração 21	Minutos	<i>M. luteus</i> A720
18 - A	7,50 - 10,47	+	21- A	18,98 -19,95	+
18 - B	14,37 - 15,37	+	21- B	19,95 - 22,08	+
18 - C	18,57 - 19,57	+	21- C	27,14 -30,23	+
18 - D	19,57 - 20,63	+	21- D	30,23 - 32,33	+
18 - E	20,63 - 21,63	+	21- E	32,33 - 34,40	+
18 - F	27,22 - 28,33	+	21- F	34,40 - 35,87	+
18 - G	28,33 - 30,24	+	21- G	35,87 - 37,92	-
18 - H	30,24 - 31,23	+	21- H	37,92 - 40,10	-
18 - I	31,23 - 31,88	+	21- I	40,10 - 41,62	+
18 - J	31,88 - 32,89	+	21- J	41,62 - 43,52	+
18 - K	32,89 - 34,06	+	21- K	43,52 - 48,52	+
18 - L	34,06 - 34,98	+	21- L	65,96 - 66,99	+
18 - M	34,98 - 37,96	-			
18 - N	37,96 - 40,0	+			

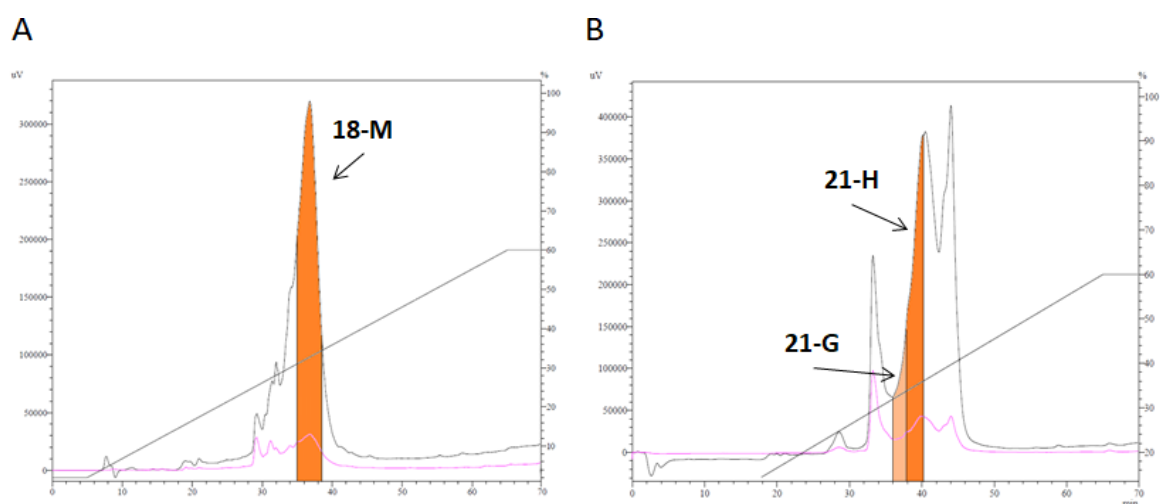


Figura 8 . Cromatograma da segunda etapa de purificação dos picos 18 (A) e 21 (B) respectivamente. Fracionamento obtido com coluna JUPITER Semipreparativa C18 (250mm x 10mm; 10µm), gradiente linear de 2 a 60% de ACN durante 60 min., fluxo de 2mL/min, $\lambda=225$ nm e $\lambda=280$ nm. As frações em destaque 18-M e 21-G e 21-H apresentaram atividade antimicrobiana contra *Micrococcus luteus* A720.

As respectivas frações 18-M, 21-G e 21-H passaram por uma nova abertura de gradiente em coluna analítica JUPITER C18, visando uma separação melhor dos peptídeos. As frações obtidas foram ressuspensas em 65µl de água deionizada para realização de novo teste de bioatividade, utilizando-se novamente 20µl. No entanto, apenas uma fração do pico 18-M,

denominada 18-M3, apresentou atividade antimicrobiana significativa contra *Micrococcus luteus* A720 (Tabela 8, Figura 9).

Tabela 8. Picos coletados da fração 18-M e teste para atividade antimicrobiana.

Fração 18	Minutos	<i>M. luteus</i> A720
18 - M - 1	9,57 - 10,82	+
18 - M - 2	10,82 - 12,28	+
18 - M - 3	12,28 - 16,09	-

(-) Inibição; (+) Crescimento

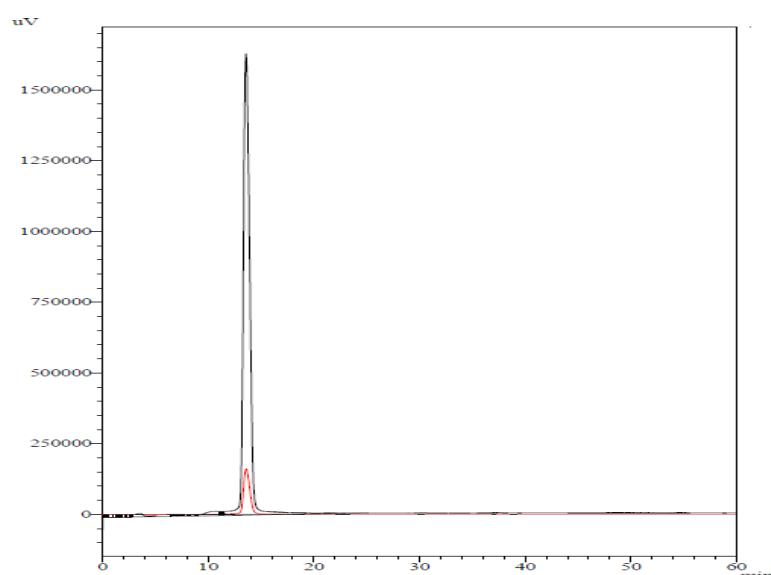


Figura 9 - Cromatograma purificação fração 18-M. Fracionamento obtido com coluna JUPITER Analítica C18 (250mm x 4,6mm; 10µm) em um gradiente linear de 26 a 36% de ACN durante 60 min., fluxo de 1mL/min, $\lambda=225$ nm e $\lambda=280$ nm (vermelho). O pico 18-M-3 em destaque apresentou atividade antimicrobiana contra *Micrococcus luteus* A720.

4.4. Ensaio de MIC da fração 18-M-3

A concentração de peptídeos da fração 18-M-3 foi medida em equipamento NanoDrop 2000 da Thermo Scientific em uma absorbância de 205 nm apresentando uma média de 2,17 mg/ml. Em seguida foi realizado o MIC (Concentração Mínima Inibitória) desta fração para identificar a menor concentração que apresenta atividade antimicrobiana. Entretanto conforme apresentado na tabela 11 abaixo, em comparação ao controle, na contração de 50% do valor

inicial já não apresentou atividade contra *Micrococcus luteus* A720, assim uma concentração de 1,085mg/ml já não apresenta atividade antimicrobiana significativa (Tabela 9).

Tabela 9. Ensaio MIC fração 18-M-3 (Concentração Mínima Inibitória). Uma contração de 50% do valor inicial não apresentou atividade antimicrobiana significativa contra *Micrococcus luteus* A720.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,036	0,487	0,436	0,457	0,442	0,462	0,448	0,445	0,442	0,435	0,457	0,036
B	0,034	0,365 50%	0,377 25%	0,369 12,5%	0,332 6,25%	0,413 3,12%	0,452 1,56%	0,448	0,454	0,397	0,443	0,035
C	0,035	0,445	0,400	0,360	0,350	0,358	0,399	0,454	0,439	0,443	0,034	0,034

Em vermelho controle positivo, em azul controle negativo.

4.5. Identificação dos peptídeos da Fração 18-M-3 por espectrometria de massas

Apesar das etapas de fracionamento realizadas por CLAE, os dados de espectrometria de massas revelaram uma fração com alta complexidade (Figura 10). Contudo, a maioria dos picos detectados foi identificada com sucesso a partir da utilização de dois bancos de dados de sequências de proteínas (um contendo proteínas de moluscos e outro com sequências de proteínas de ostra da espécie *Crassostrea gigas*).

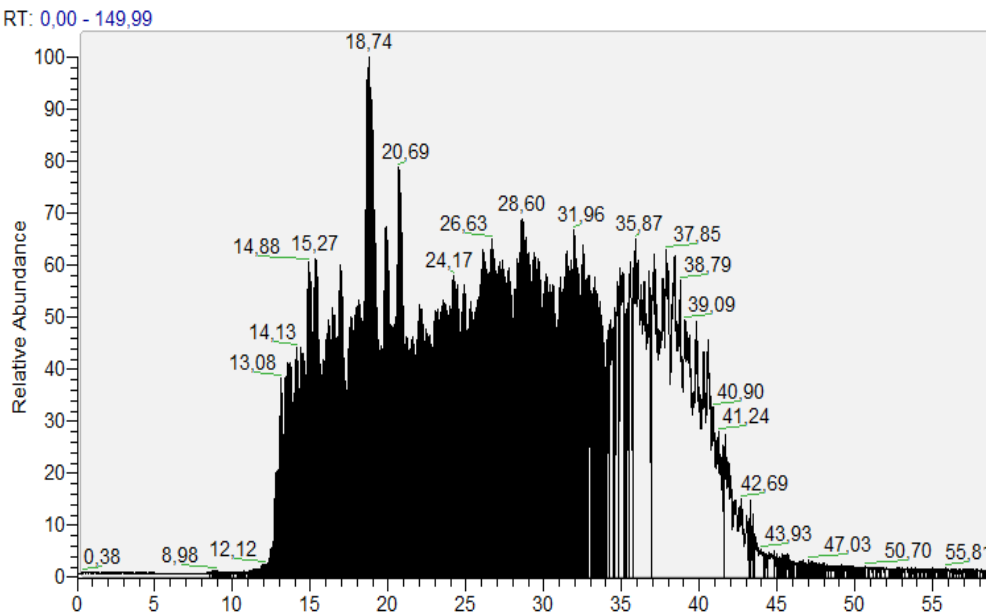


Figura 10. Perfil cromatográfico da fração 18-M-3 submetidas à análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS/MS). As misturas peptídicas foram separadas em gradiente de eluição de 0-40% durante 35min de uma mistura água/acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico, em coluna capilar de 75µm empacotada com sílica C18.

Quanto às características desses peptídeos, com o auxílio do programa Peaks Studio, 38 sequências foram identificadas, com fragmentos de 10 a 21 resíduos de aminoácidos, derivados das seguintes proteínas: actina, colágeno, filamina, proteína de macrófago, miosina, proteína ligante de oxysterol, proteína RFT-1, tropomiosina, neuropeptídeo LW amidado e uma proteína não caracterizada (Tabela 12, Anexo 1). Adicionalmente, muitos desses peptídeos foram provenientes de proteínas identificadas em mais de uma espécie de molusco, como por exemplo, os fragmentos da proteína actina, conservados nas espécies *Elysia chlorotica*, *Octopus bimaculoides*, *Nipponacmea fuscoviridis*, *Doryteuthis pealeii*, *Sepia officinalis*, *Azumapecten farreri*, *Meretrix meretrix*, *Rapana venosa*, *Hyriopsis cumingii*, *Littorina littorea* e entre outras (Tabela 12). Com relação a localização subcelular 82% das sequências eram fragmentos proteínas citosólicas (Figura 11).

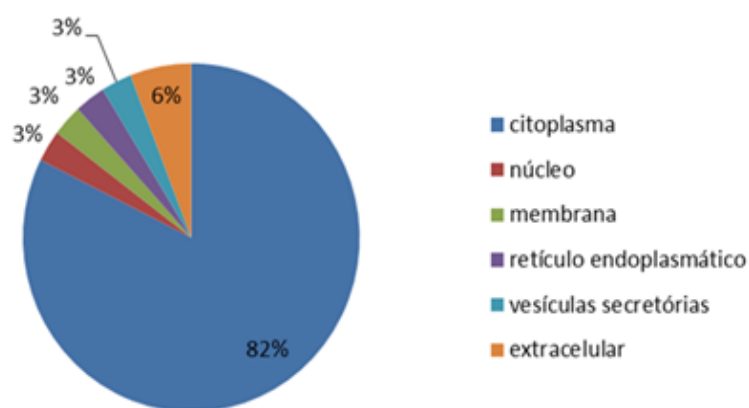


Figura 11. Localização subcelular das proteínas de origem dos peptídeos identificados.

Tabela 10. Proteínas precursoras e peptídeos identificados.

Proteína precursora	US - Upstream site	Peptide	DS - Downstream site	Banco de Dados Mollusca	Banco de Dados Crassostrea	-10lgP	Mass	Length	ppm	m/z	RT	Area Sample 1
Actin	E	APLNPKANREKMTQIM	F	X	X	71.20	1840.9651	16	7.8	921.4970	19.38	3.52E6
	T	EAPLNPKANREKMTQIM	F	X	X	50.55	1970.0077	17	4.8	986.0158	21.89	7.53E6
	G	MGQKDSYVGDEAQSKRGIL	T	X	X	45.93	2081.0210	19	4.6	694.6841	20.13	1.55E7
	G	M(+15.99)GQKDSYVGDEAQSKRGI L	T		X	32.07	2097.0161	19	3.3	700.015	18.58	4.27E6
	M	VGMGQKDSYVGDEAQSKRGIL	T	X	X	36.49	2237.1111	21	3.8	746.7138	23.68	2.47E6
	M	VGM(+15.99)GQKDSYVGDEAQSKRGIL	T		X	40.43	2253.1060	21	7.3	752.0481	19.90	1.51E6
	K	DSYVGDEAQSKRGILT	L	X	X	44.40	1737.8533	16	3.4	869.9368	23.49	4.15E6
	D	SYVGDEAQSKRGILT	L	X	X	54.72	1622.8264	15	4.1	812.4238	20.52	1.75E6
	S	YVGDEAQSKRGIL	T	X	X	32.53	1434.7466	13	4.9	718.3841	17.79	1.26E6
	W	DDM(+15.99)EKIWHHT	F		X	35.63	1326.5663	10	0.5	664.2908	13.47	4.7E5
Collagen alpha-1(IV) chain	G	ESGPLGPLGP	K		X	30.86	922.476	10	-0.2	462.2451	18.36	1.49E6
	K	G(+42.01)DKGNSGLPGIDGLSG(-.98)	Q		X	27.18	1483.7267	16	-2.7	742.8686	20.1	1.99E6
Filamin	L	SIKHKGMHISGSPF	I	X		70.59	1524.7871	14	1.3	763.4018	16.14	1.34E6
	S	IKHKGMHISGSPF	I	X		67.38	1437.7550	13	0.7	719.8853	15.42	7.47E5
Histone H2B	L	LPGELAKHAVSEGTKAVT	K	X	X	87.61	1806.9839	18	3.6	904.5024	25.08	2.86E6
LWamide neuropeptide	D	S(+42.01)GLSGLSGFGGGLG	G		X	23.80	1263.6095	15	3.8	632.8145	20.57	1.01E6
Macrophage expressed protein-like isoform 1	S	S(+42.01)SLSAGAAAGISIG	A	X		30.91	1202.6143	14	2.4	602.3159	18.68	1.34E6

Myosin heavy chain, striated muscle	R	IRKKLEQDINEL	E		X	29.1	1497.8514	12	3.6	749.9357	18.09	489E6
	R	KKLEQDINELE	V		X	27.36	1357.7089	11	1.8	679.8629	19.69	5.09E6
Myosin heavy chain	L	RIKKKLEQDINEL	E	X		43.46	1625.9464	13	3.5	813.9833	15.65	9.56E5
Oxysterol-binding protein	N	S(+42.01)ISAILDGTAKLT	F	X		33.82	1330.7344	13	-13.1	666.3657	20.93	1.21E6
RFT1-like protein	G	SLSSGAGPL	L		X	23.39	900.4916	10	-1	451.2527	16.31	1.7E6
Tropomyosin	Q	KEVDRLEDELVNEKEYK	S	X		48.50	2263.1694	18	5.4	755.4012	25.92	3.57E7
	K	EVDRLEDELVNEKEYK	S	X		78.56	2135.0745	17	7.9	1068.5530	27.58	3.11E6
	V	DRLEDELVNEKEYK	S	X		61.46	1906.9635	15	11.1	954.4996	24.90	1.31E6
	V	DRLEDELVNEKE	K	X		33.23	1487.7103	12	-1.9	744.8610	25.53	1.32E6
	E	ERMDALENQLKEAR	F	X		45.72	1701.8468	14	2.6	851.9329	25.31	2.81E6
	E	ARFLAEEADRYDEVA	R	X		52.74	1881.9220	16	4.9	941.9729	23.85	2.81E6
	E	ERAETGESKIVELE	E	X		37.01	1588.7944	14	3.2	795.4070	20.31	8.33E6
	N	NLKSLEVSEKANQREEAY	K	X		30.91	2236.0972	19	1.5	746.3741	21.57	2.43E6
	M	KMDKENALDRAEQL	E	X		41.24	1659.8250	14	7.9	830.9263	20.35	4.54E6
	M	DKENALDRAEQL	E	X		31.74	1400.6896	12	4.3	701.3551	23.33	5.88E6
	-	M(+15.99)(+42.01)DAIKKKMQ	A	X		40.01	1149.5886	9	1.3	575.8023	12.76	2.34E7
	K	DAENRAAEAEERVVNKLQ	K	X		29.96	1911.9762	17	4.4	956.9996	28.27	5.43E6
Uncharacterized protein	D	LDASQPAYHLPVTKNAR(-.98)	L	X		40.04	1879.0063	17	-9.5	940.5015	18.57	3.48E6
	A	M(+15.99)(+42.01)VAGKDGEIIF	Q		X	28.13	1236.606	11	-1.5	619.3093	11.12	2.61E4
	Y	N(+42.01)ELKKELTFK	T		X	24.87	1290.7183	10	14	646.3754	15.95	1.84E6
	G	S(+42.01)AAATAAAAGGSIGGI	N		X	28.11	1286.6466	16	10	644.337	23.91	149E6

4.6. Ensaio de MIC para peptídeos sintéticos

Dentre os peptídeos identificados, três foram selecionados, sintetizados e realizados os ensaios de concentração mínima inibitória contra *M. luteus* A720, *E. coli* SBS 363 e *C. albicans* MDM8, com uma concentração inicial de 200µM até 6,25µM. Contudo, nenhum dessas sequências sintetizadas apresentou atividade antimicrobiana (Tabela 11).

Tabela 11: Ensaio concentração mínima inibitória dos peptídeos sintetizados.

Sequência peptídeos sintetizados	<i>M. luteus</i> A720	<i>E. coli</i> SBS 363	<i>C. albicans</i> MDM8
LPGELAKHAVSEGTKAVT	+	+	+
KEVDRLEDELVNEKEYK	+	+	+
APLNPKANREKMTQIM	+	+	+

5. DISCUSSÃO

Nosso estudo é o primeiro a utilizar um método de extração através de inativação de proteases pelo calor para caracterizar peptídeos que existam naturalmente no gastrópode marinho *O. urceus*. O nosso principal achado foi a identificação de uma fração do extrato com ação antimicrobiana contra *Micrococcus luteus*. Porém, no ensaio de concentração inibitória mínima foi observado que apenas a fração de maior concentração (~2,0 mg/ml) apresentou atividade. Esta perda de atividade em concentrações menores pode ser explicada através dos resultados de espectrometria de massas. Como mencionado anteriormente, essas análises demonstraram que apesar das etapas de separação por CLAE a fração apresentou uma alta complexidade, o que possivelmente contribuiu para que o peptídeo ou conjunto deles com atividade antimicrobiana estivessem mais diluídos na concentração total de 1mg/ml não apresentando mais efeito bactericida.

Um aspecto também importante revelado pela espectrometria de massas, que ajuda a entender porque estes peptídeos permaneceram em um tempo de eluição muito próximo na CLAE, está relacionado à natureza das sequências identificadas. Muitas sequências são fragmentos de um mesmo peptídeo com formas extendidas, intermediárias ou curtas, como por exemplo, o peptídeo de sequência VGMGQKDSYVGDEAQS KRGIL (forma extendida) fragmento da proteína actina e mais quatro sequências menores detectadas. O mesmo foi observado para peptídeos das proteínas filamina, miosina e tropomiosina. Além disso, na tabela 10, podemos notar que esses peptídeos similares possuem tempos de eluição diferentes nos experimentos de massas. Contudo, o diâmetro de coluna C18 e o fluxo aplicado são diferentes nesta etapa. Em nanofluxo LC (nanoLC) separações cromatográficas são realizadas usando taxas de fluxo na faixa de baixo nanolitro por minuto, que resultam em alta sensibilidade analítica devido à grande eficiência de concentração proporcionada por este tipo de cromatografia (CUTILLAS, 2005).

Com relação ainda as características dos peptídeos identificados, a maioria eram derivados de proteínas relacionadas ao citoesqueleto como actina, miosina, filamina e tropomiosina quando utilizado o banco de dados de moluscos e ostras. Este dado é interessante quando comparados com aspectos estruturais e funcionais importantes para a biologia do gastrópode *O. urceus*. Esta espécie é carnívora e alimenta-se principalmente do bivalve *Donax hanleyanus*, necessitando agarrá-los (MARCUS, 1959). Por outro lado, tem sido descrito que fragmentos peptídicos gerados intracelularmente podem apresentar funções distintas da sua proteína de origem, como por exemplo, alguns derivados de histonas que

apresentam ação antimicrobiana (JODOIN et al, 2018; SIM, et al, 2017; CUTRONA, et al, 2015).

Diante dos resultados obtidos três peptídeos do extrato foram selecionados na tentativa de encontrar a molécula responsável pela bioatividade observada. A seleção dos peptídeos foi baseada com base no score apresentado e análise de similaridade da sequência primária com outros AMPs conhecidos com o auxílio um site de predição de peptídeos (software APD3) com potencial antimicrobiano (WANG et al., 2016) e dados da literatura. O primeiro candidato foi um fragmento derivado da proteína histona. O fragmento LPGELAKHAVSEGTKAVT, possui 18 aminoácidos com 38% de resíduos hidrofóbicos e peso molecular de 1808.06 Da. Possui 42,8% de similaridade da sequência com o peptídeo antimicrobiano de histona H2B-1 isolado da truta *Oncorhynchus mykiss* (ROBINETTE et al., 1998). Sabe-se que a histona participa da defesa imunológica através da geração de PAMs, assim muitos fragmentos derivados de histona têm sido caracterizados, apresentando propriedades antimicrobianas distintas (CHEN et al., 2015; BULET et al., 2004; Semreen et al., 2018). Como exemplo temos os seis peptídeos derivados da histona H2A, designados Acipensinas1 – 6, isolados do esturjão russo *Acipenser gueldenstaedtii*. Os peptídeos Acipensina 1 e 2 Apresentaram potente atividade antimicrobiana frente às bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e ao fungo *Candida albicans*, não revelando atividade hemolítica contra humanos (SHAMOVA et al., 2014). Já a sequência APLNPKANREKMTQIM da proteína foi escolhida, pois apresenta 16 aminoácidos com relação hidrofóbica total de 37%, carga catiônica de +2 e peso molecular de 1842.213 Da, com seus resíduos hidrofóbicos na mesma superfície, podendo interagir com a membrana de bactérias, apresentando de 37,5%-35% de similaridade com cinco sequências já caracterizadas de PAMs de anfíbios segundo APD3. Por fim, a sequência de 18 aminoácidos com peso molecular de 2264.507Da, KEVDRLEDELVNEKEKYK, mostrou 38% de homologia com o peptídeo antibacteriano sintético HP2-20 (LEE et al., 2002). Apesar destas características estes peptídeos testados individualmente não apresentaram atividade antimicrobiana.

Recentemente um estudo demonstrou um amplo espectro de atividade antibacteriana para extratos totais de peptídeos de *Olivancillaria hiatula*, onde bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram inibidas no ensaio de difusão em ágar. Além disso, na presença do extrato peptídico foi observado um retardo na fase de crescimento para todas as bactérias semelhantes ao antibiótico ciprofloxacina, e quando administrados em conjunto a este

antibiótico melhoraram a eficácia dos mesmos (GASU, et al 2018). Neste sentido, é possível que um conjunto de peptídeos seja responsável pelo efeito antibacteriano. Novos experimentos serão necessários para investigar esta hipótese.

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., PUILLANDRE, 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 Ampiphatic alpha-Helica 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.

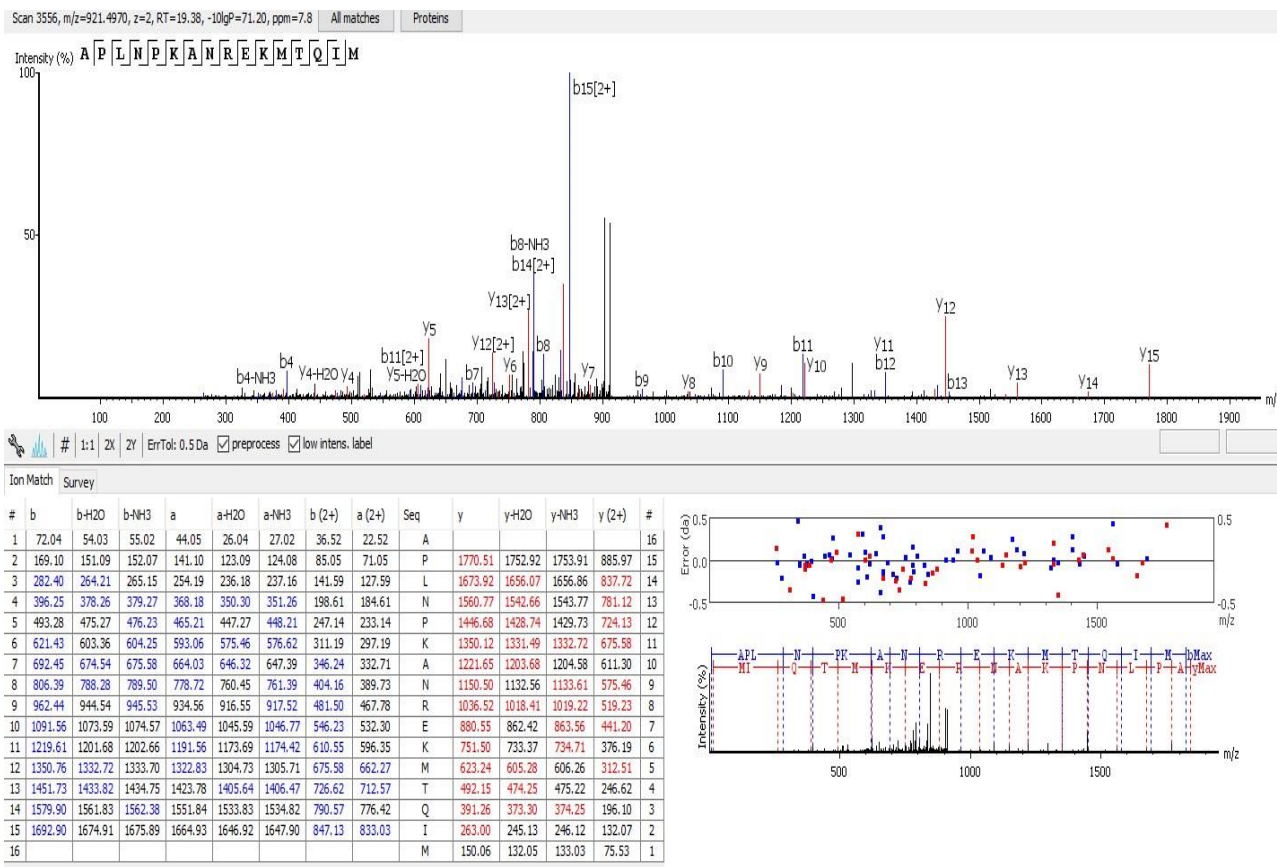
ZHENG, L. H., WANG, Y. J., SHENG, J., WANG, F., ZHENG, Y., LIN, X. K. AND SUN, M. 2011. “Antitumor Peptides from Marine Organisms”. *Marine Drugs*, 9(10): 1840-1859.

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.

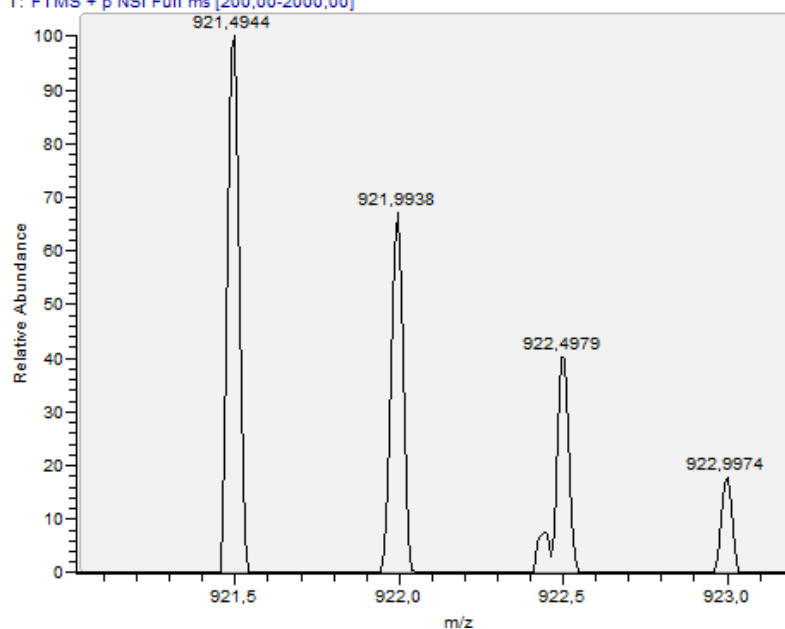
ZASLOFF, M. (1987). “Magainins, a Class of Antimicrobial Peptides from *Xenopus* Skin: Isolation, Characterization of Two Active Forms, and Partial cDNA Sequence of a Precursor”. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 84 (15): 5449–5453.

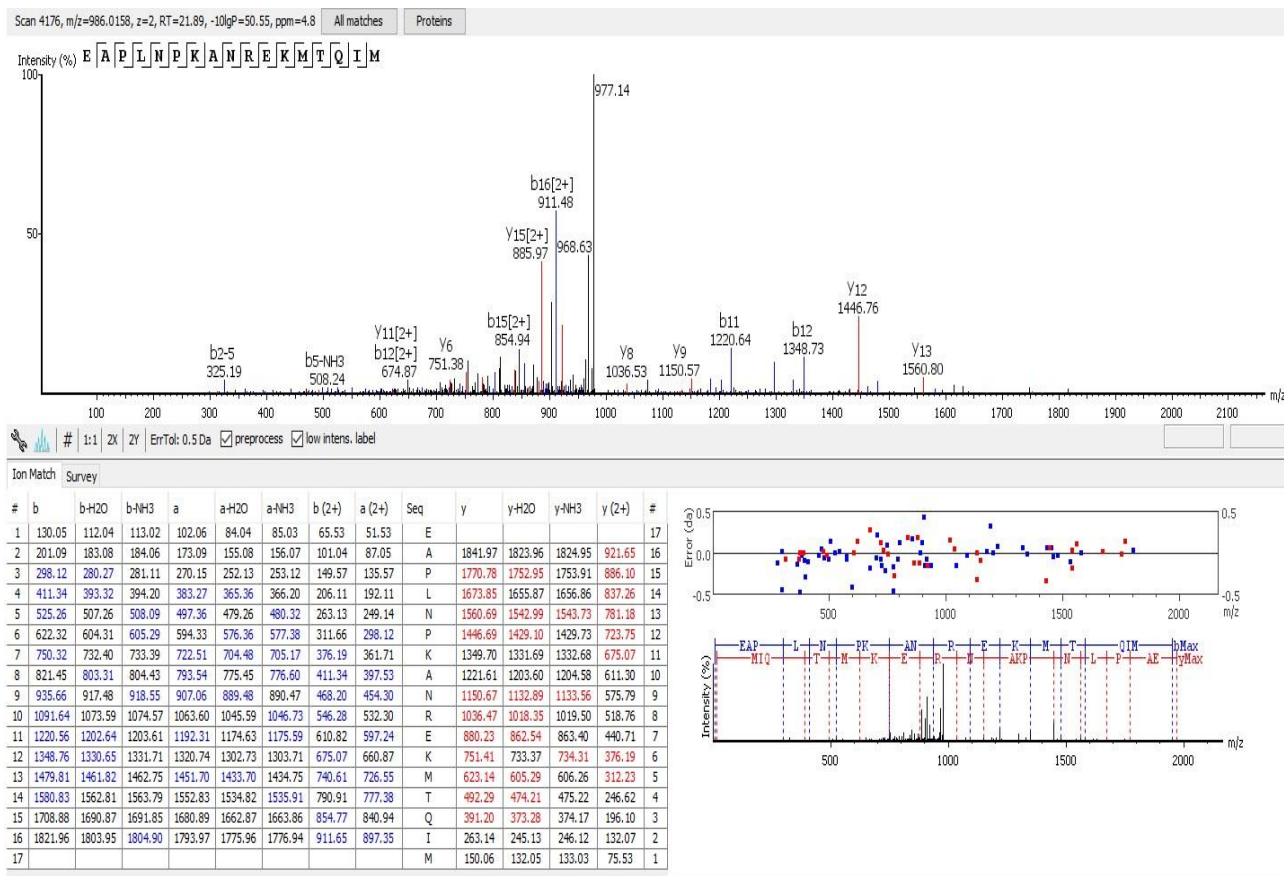
Anexo 1.

**Identificação de peptídeos do software Peaks Studio 8.5 e íons detectados nos espectros
MS para cada peptídeo**

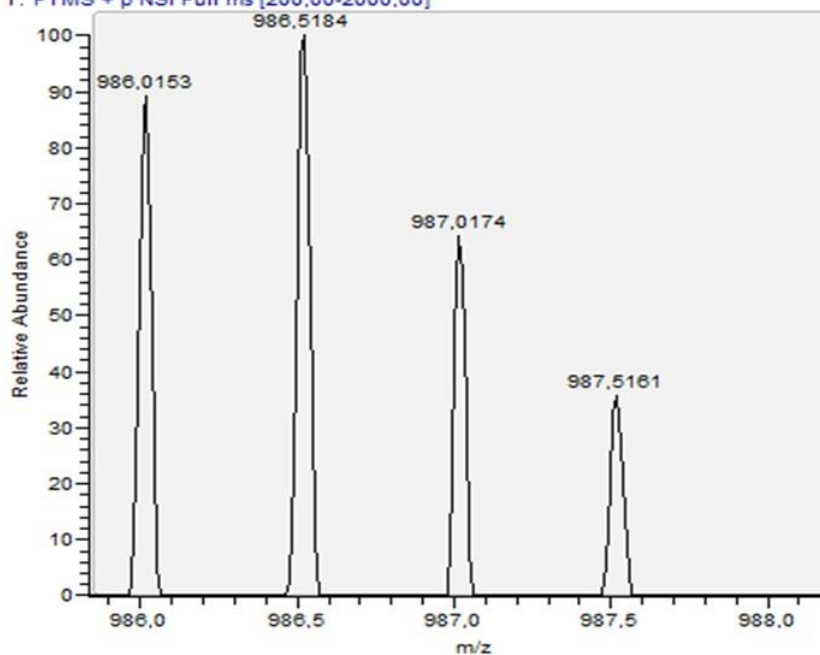


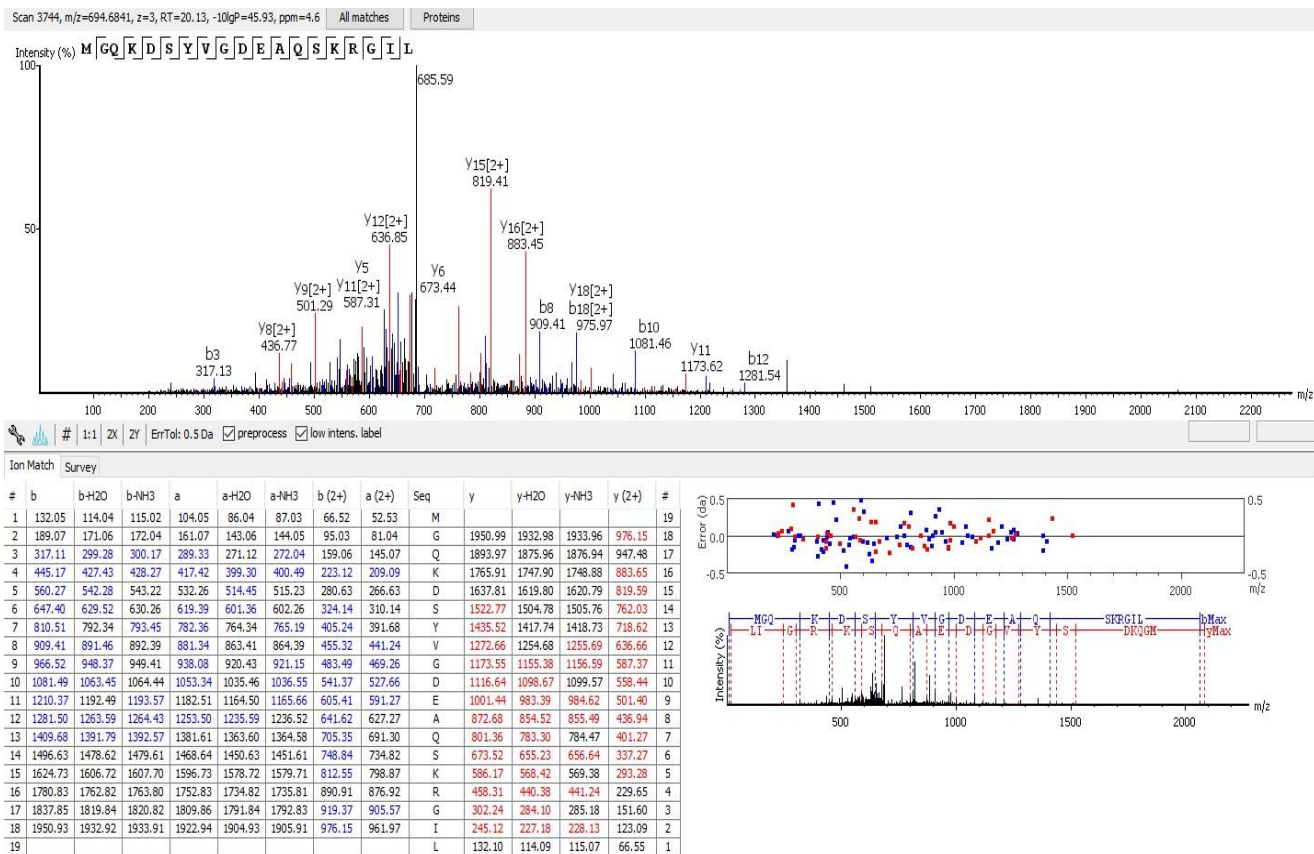
Orceus_peptidomica #3545 RT: 19.33 AV: 1 NL: 1.88E6
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]



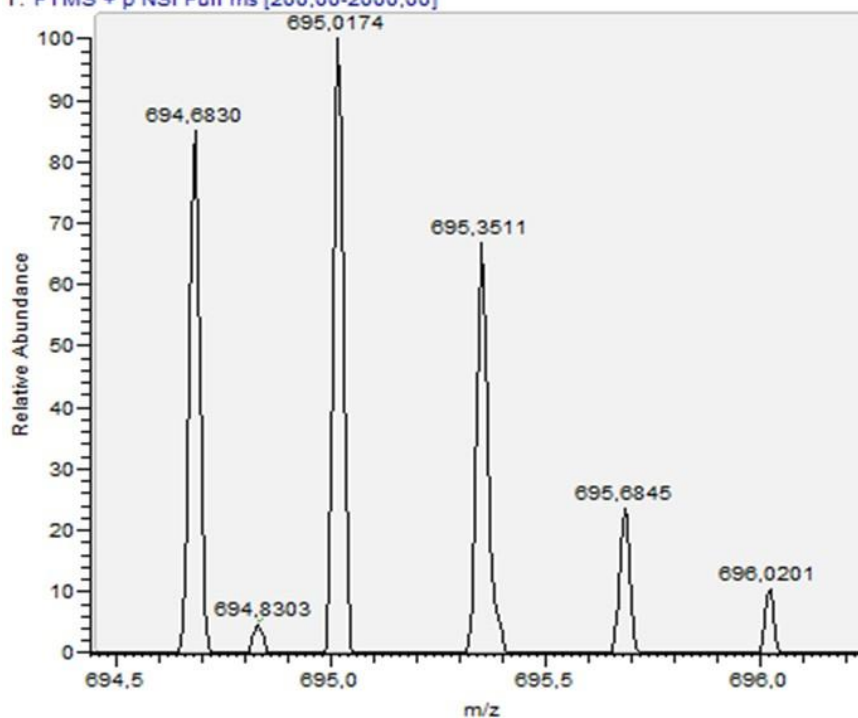


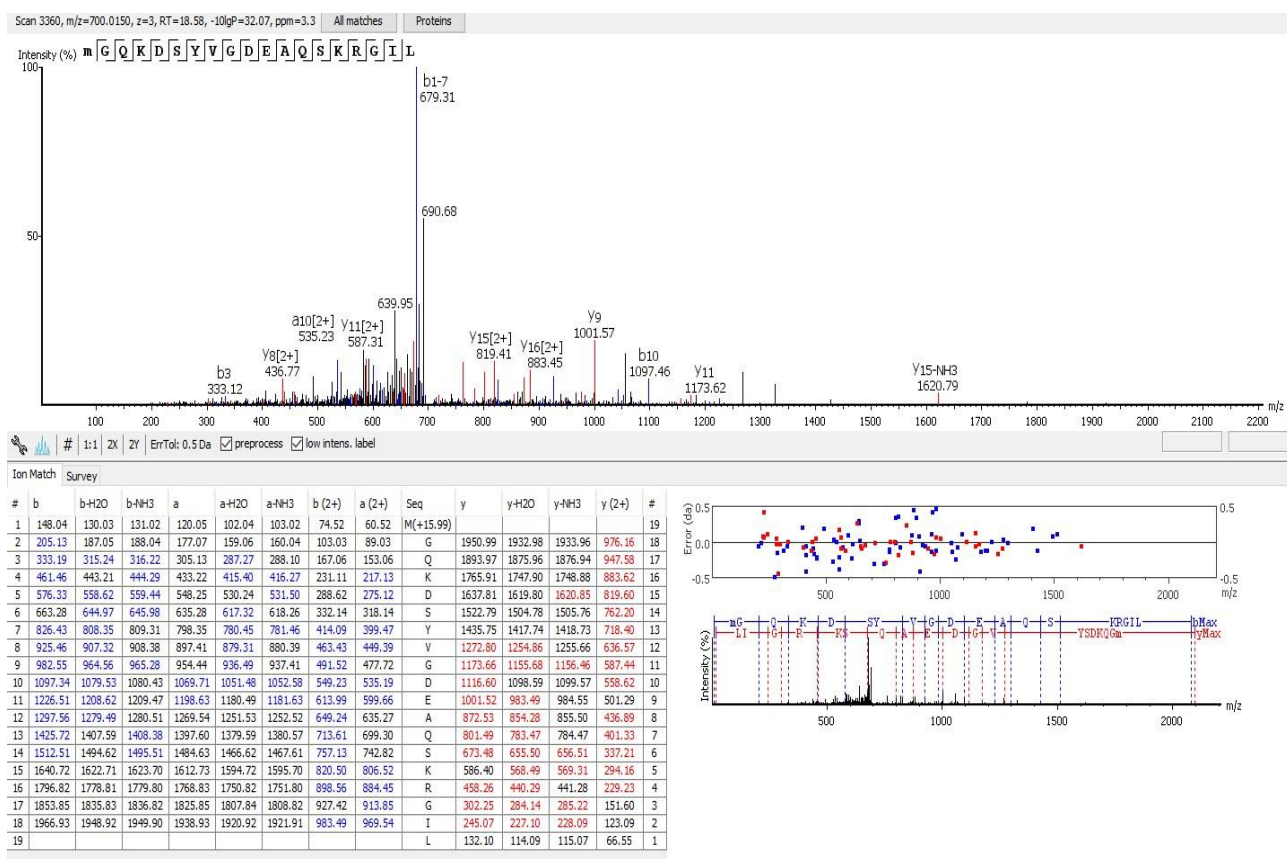
Oreus_peptidomica #4173 RT: 21.88 AV: 1 NL: 1,17E6
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]



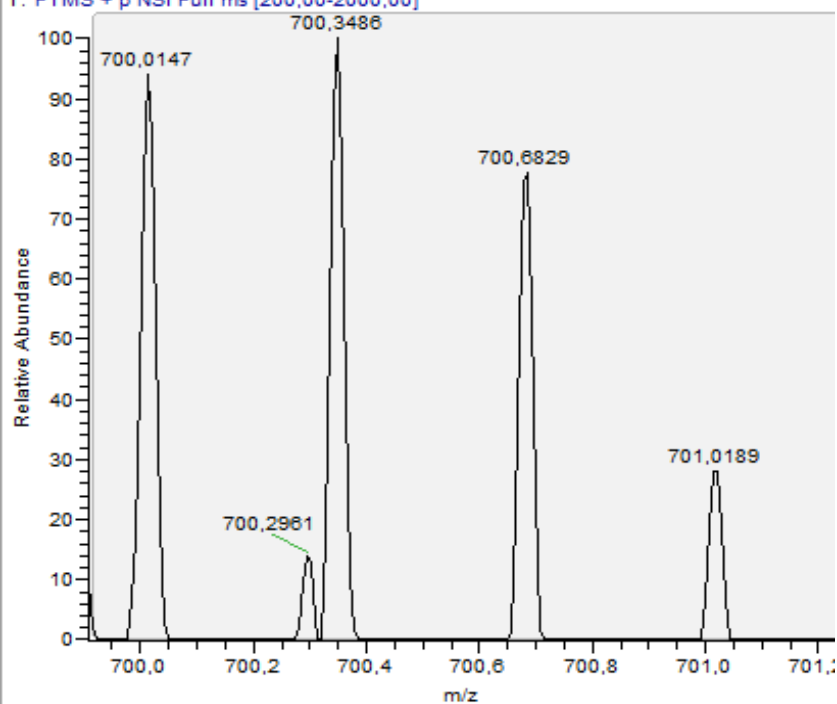


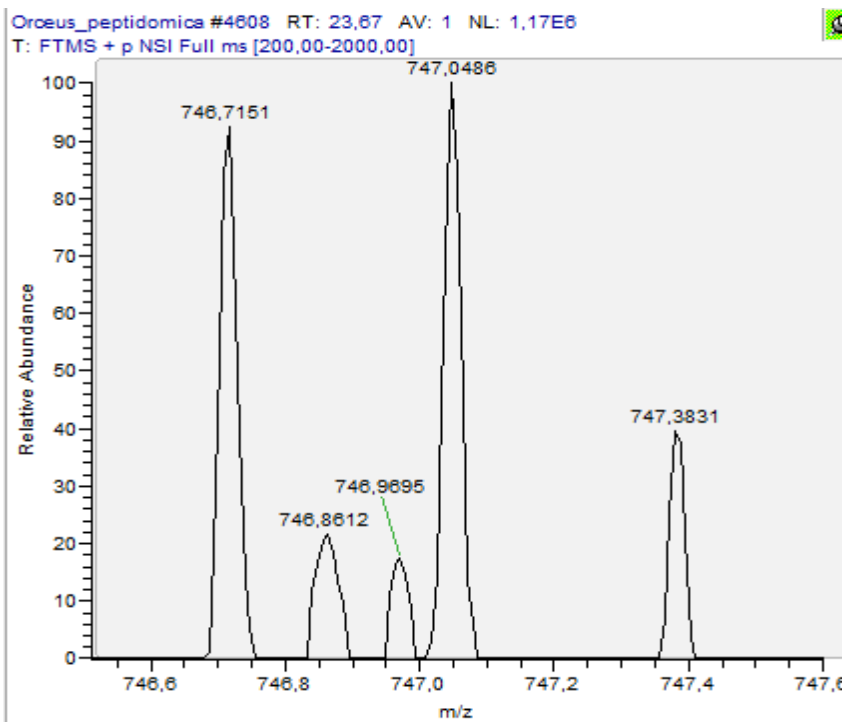
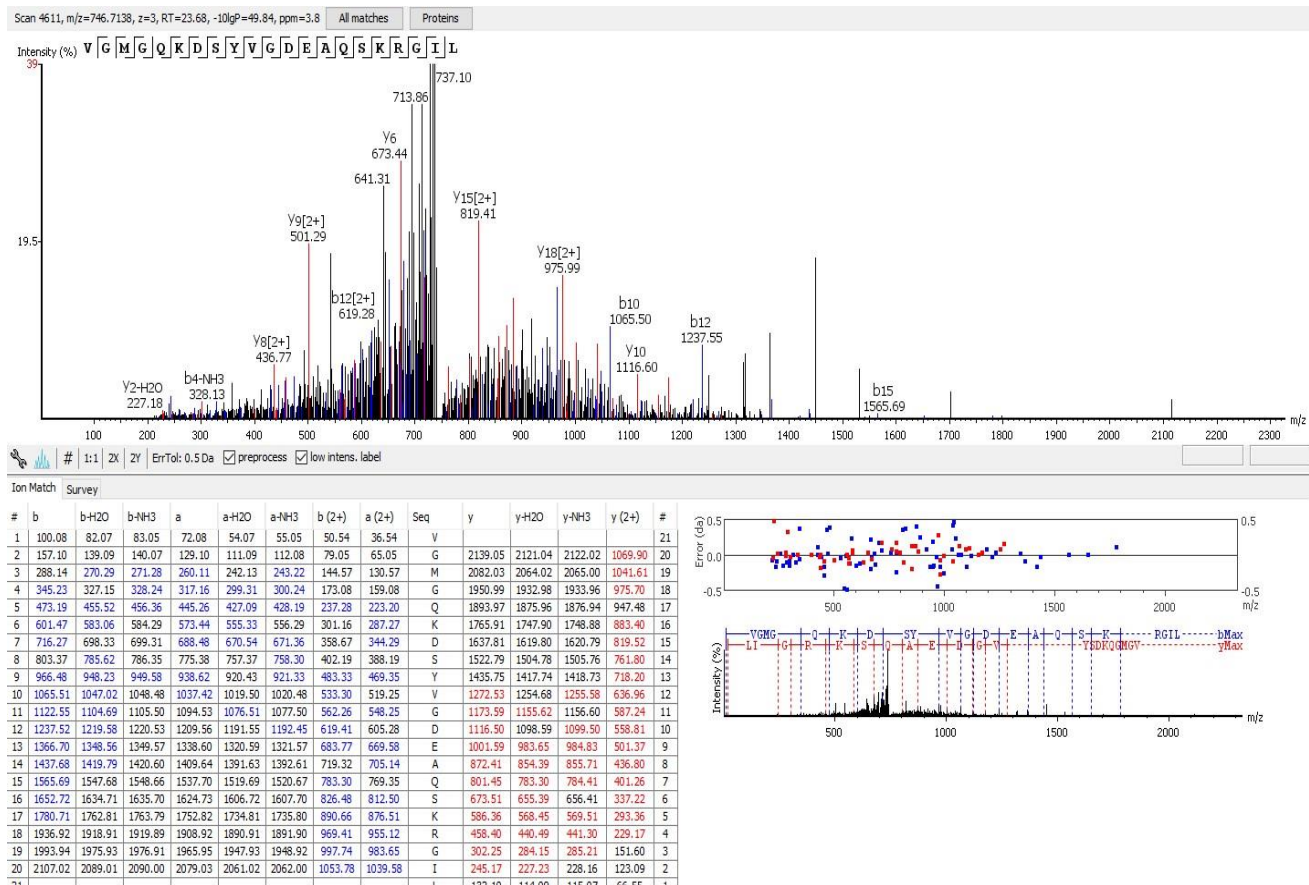
Orceus_peptidomica #3757 RT: 20.18 AV: 1 NL: 3,93E6
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]

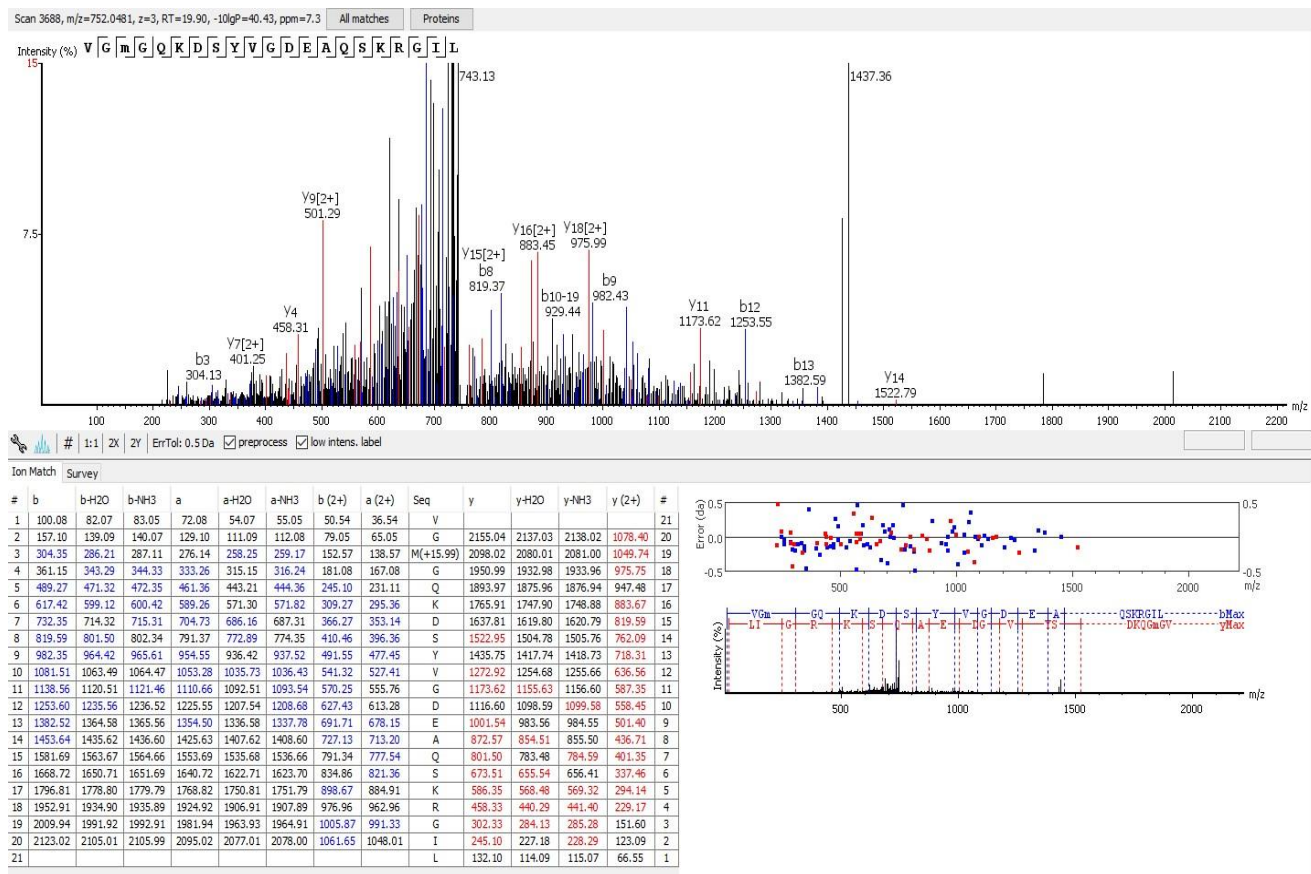


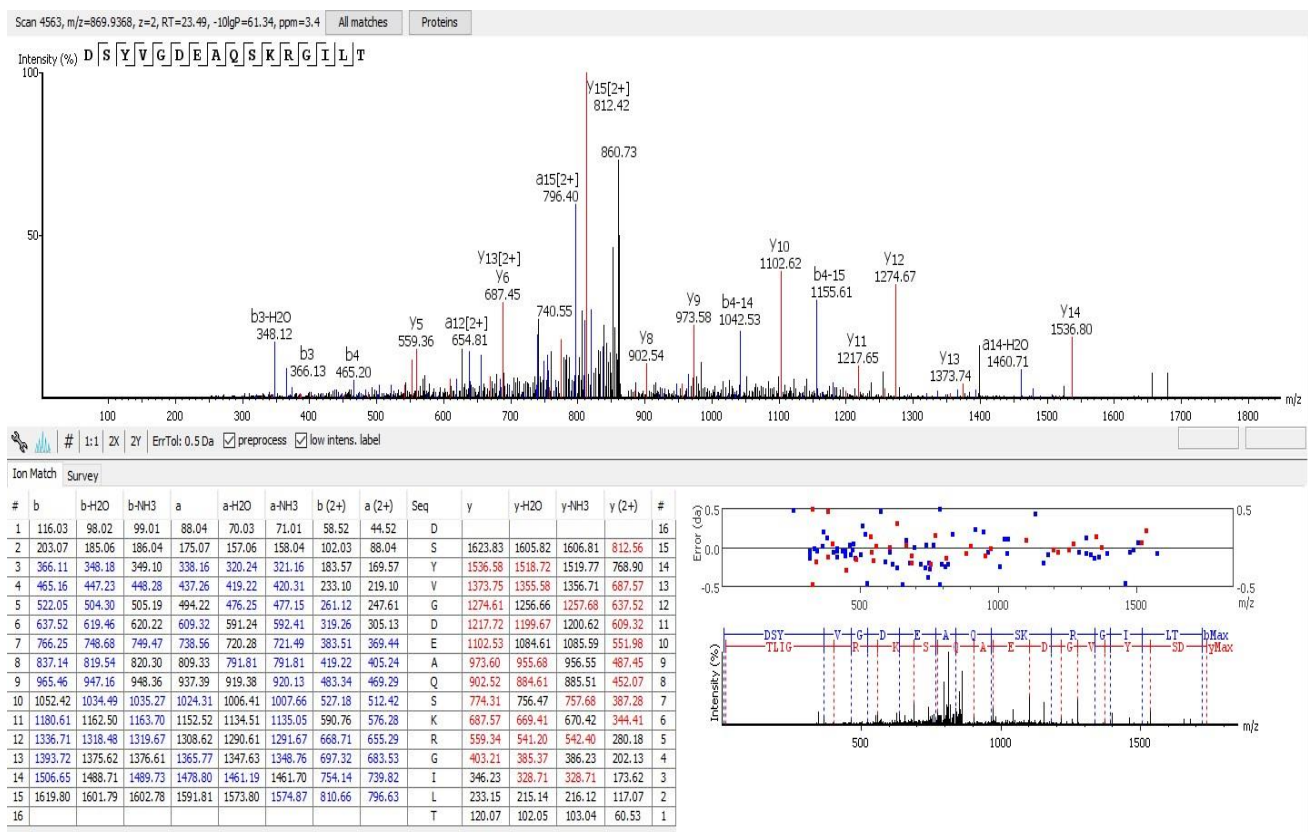


Orceus_peptidomica #3359 RT: 18,57 AV: 1 NL: 1,24E6
T: FTMS + p NSI Full ms [200,00-2000,00]

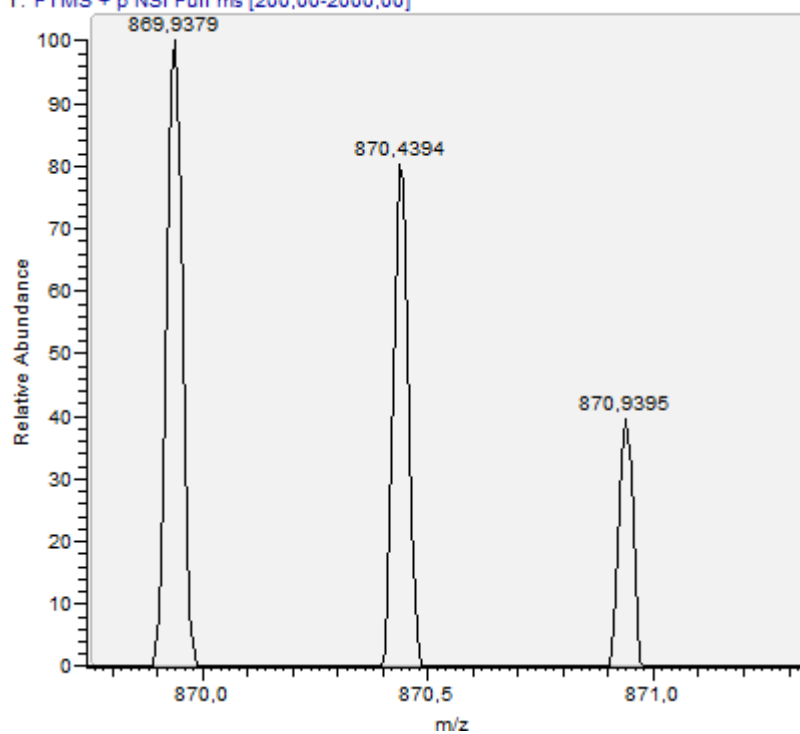


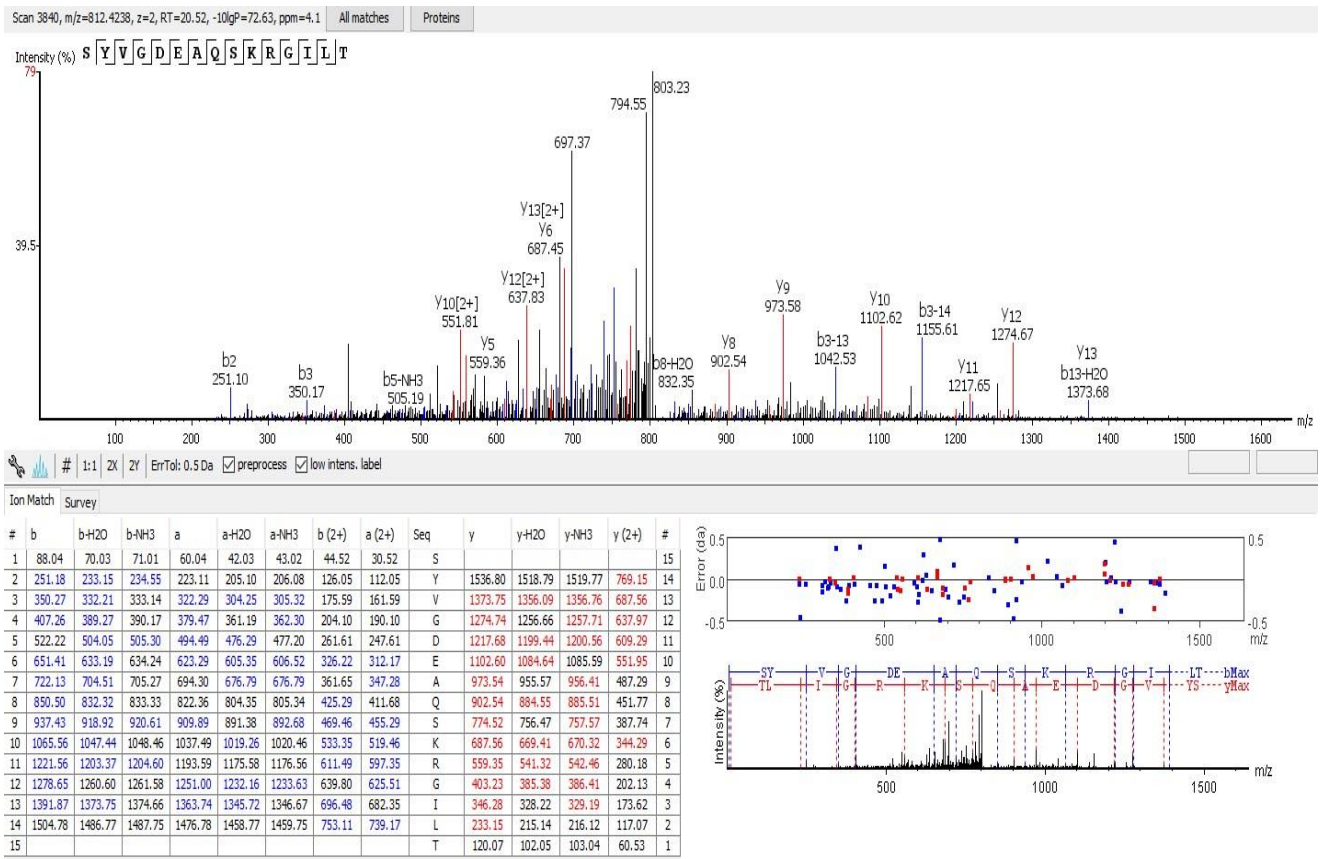




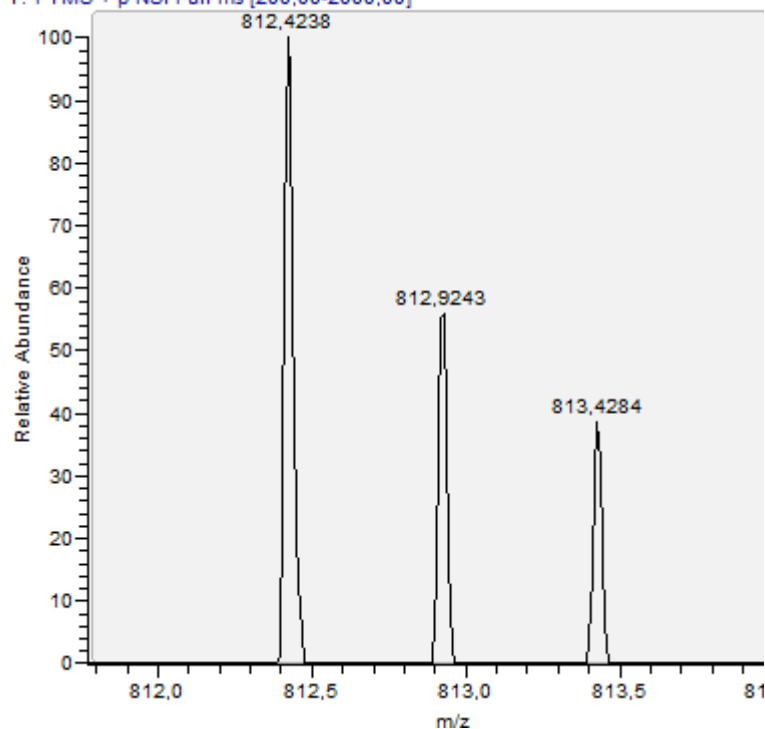


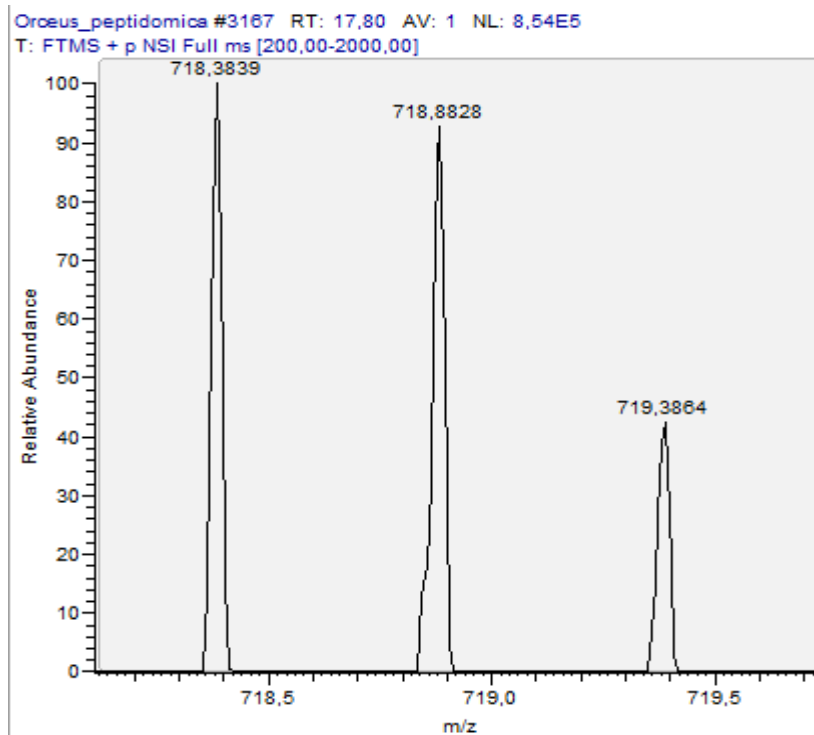
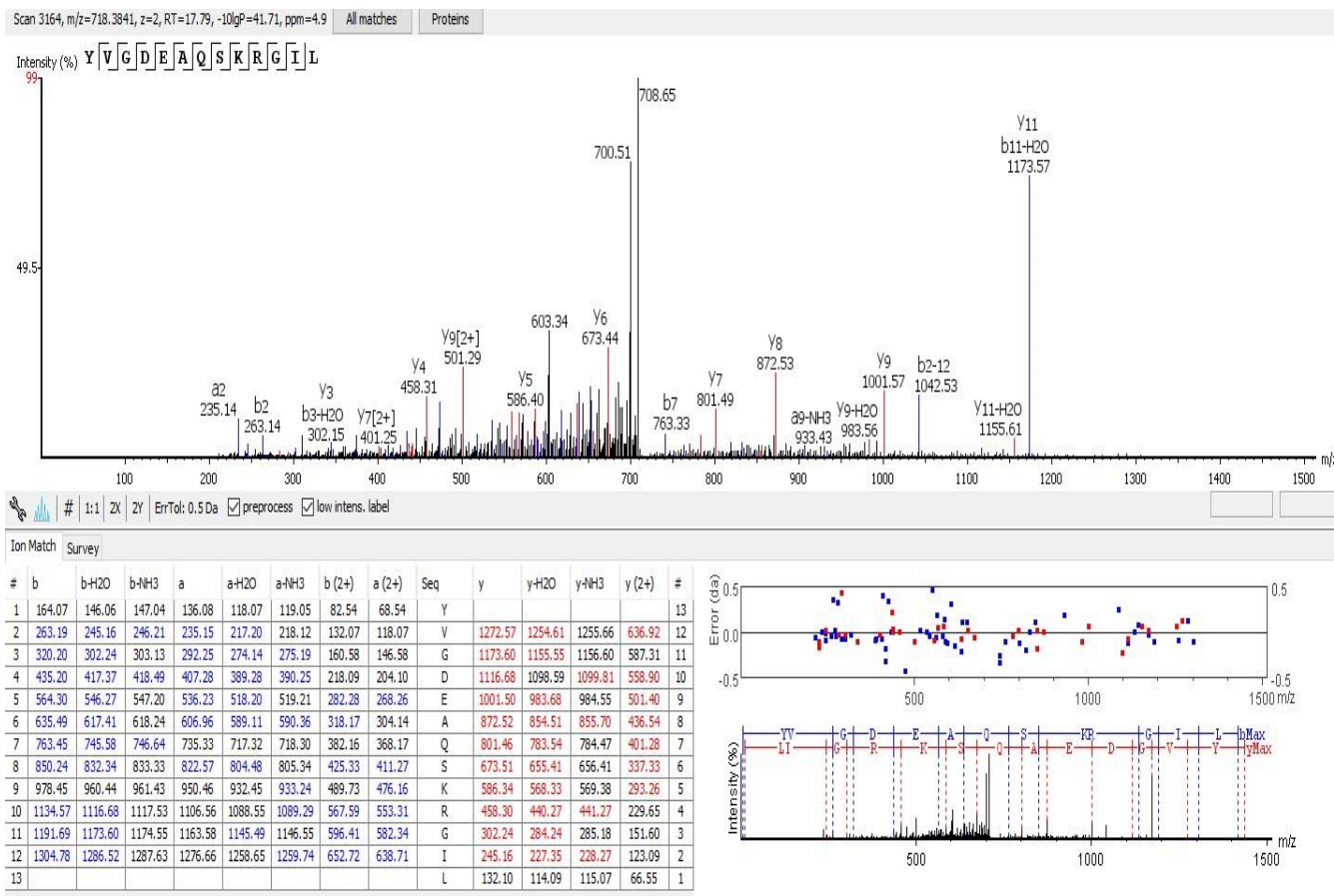
Oreus_peptidomics #4544 RT: 23.40 AV: 1 NL: 1,81E6
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]

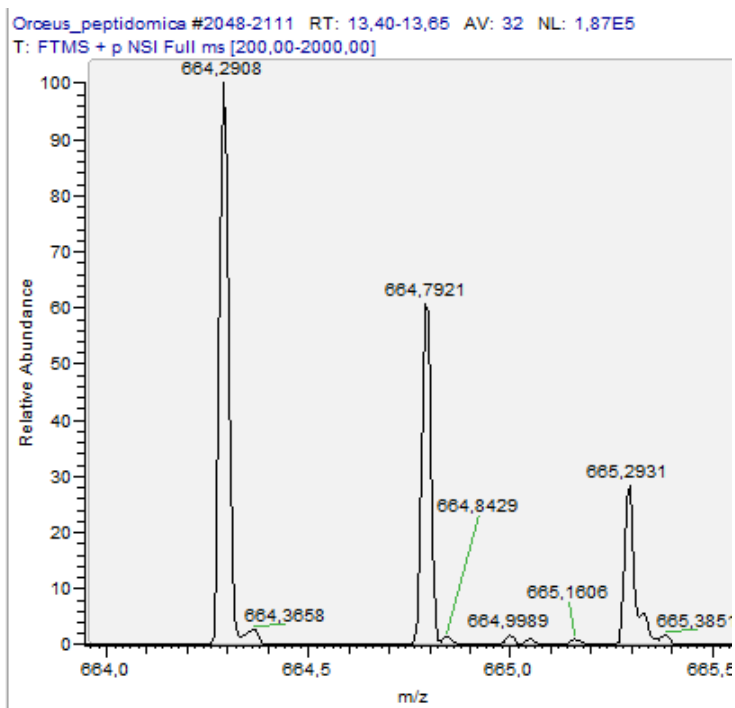
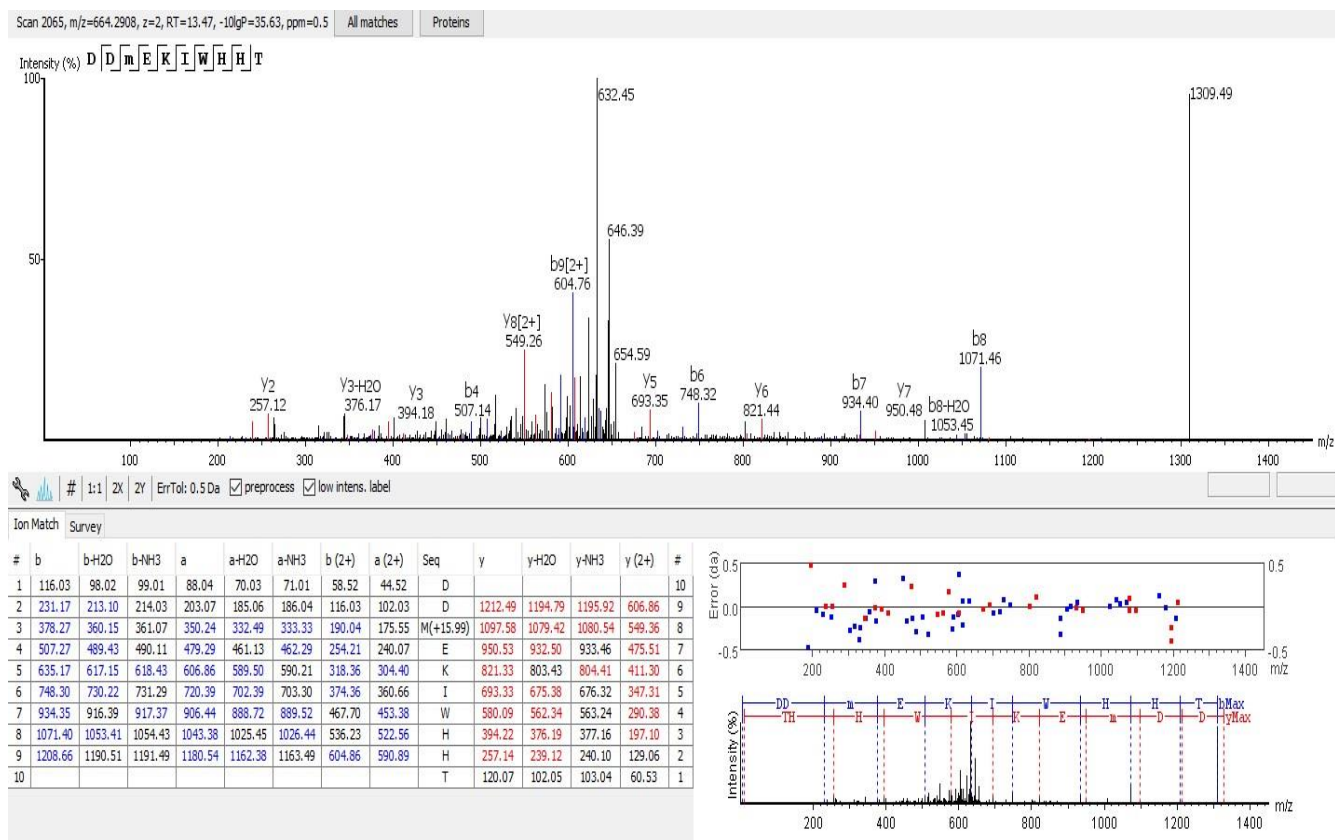


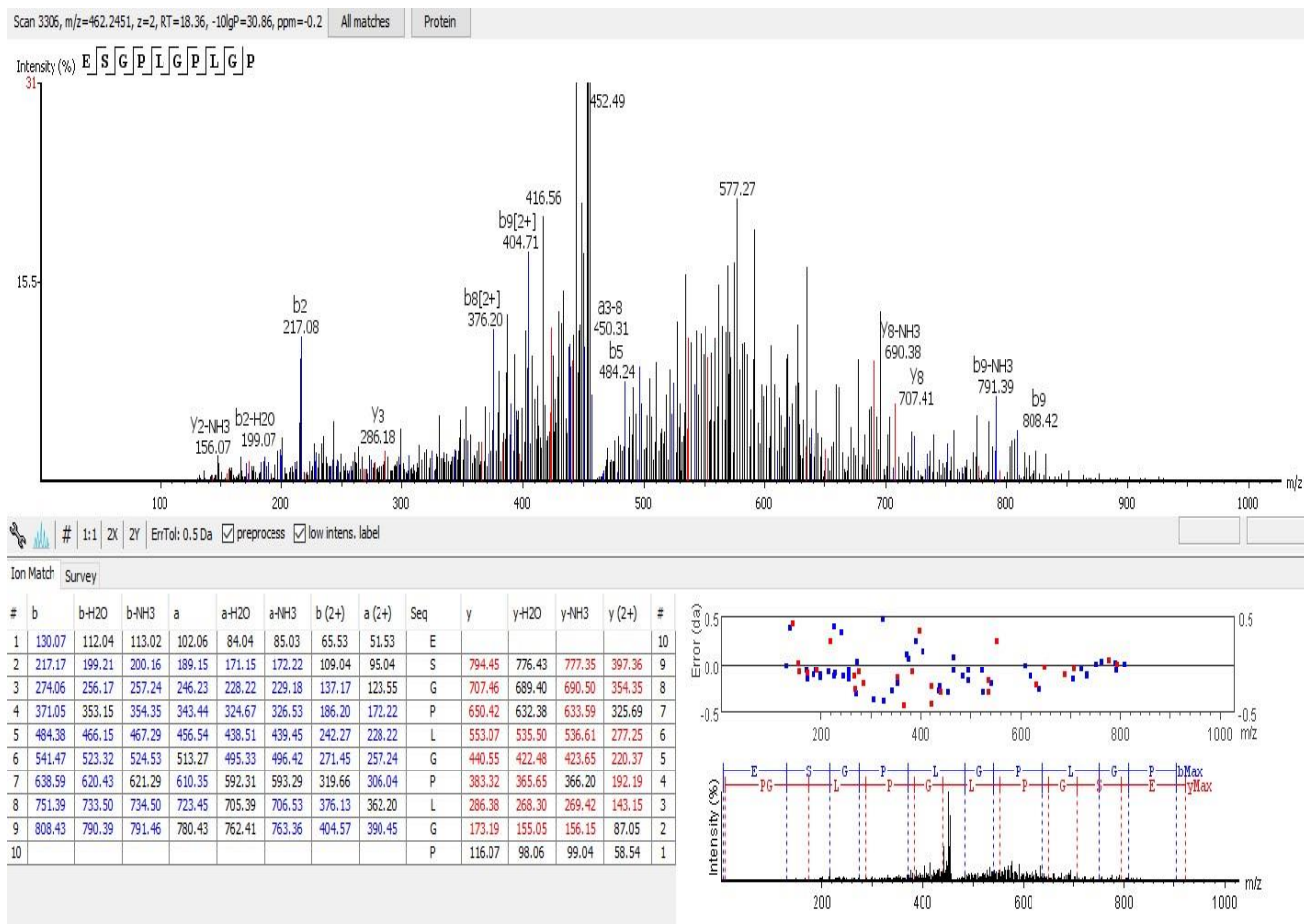


Oreus_peptidomica #3841 RT: 20.52 AV: 1 NL: 1.15E6
T: FTMS + p NSI Full ms [200,00-2000,00]

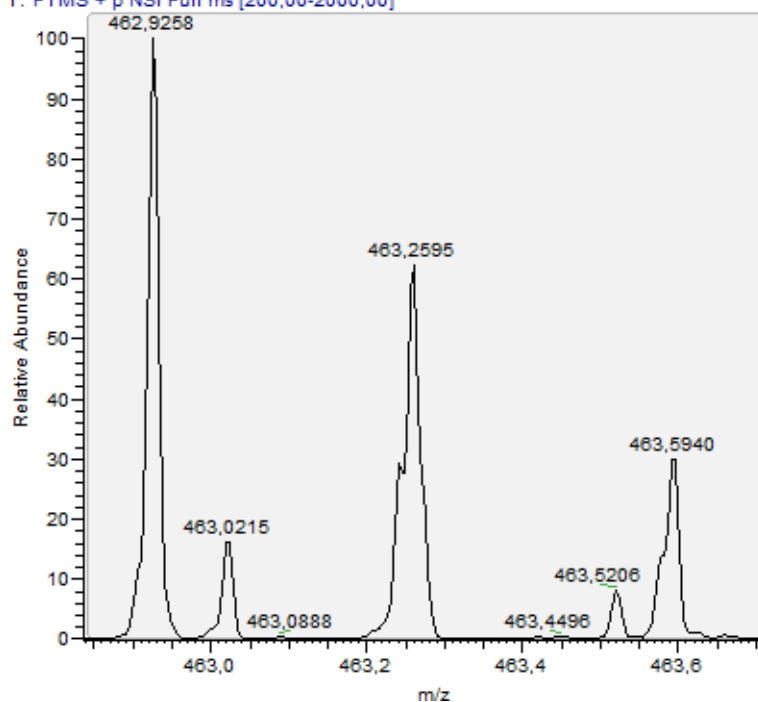


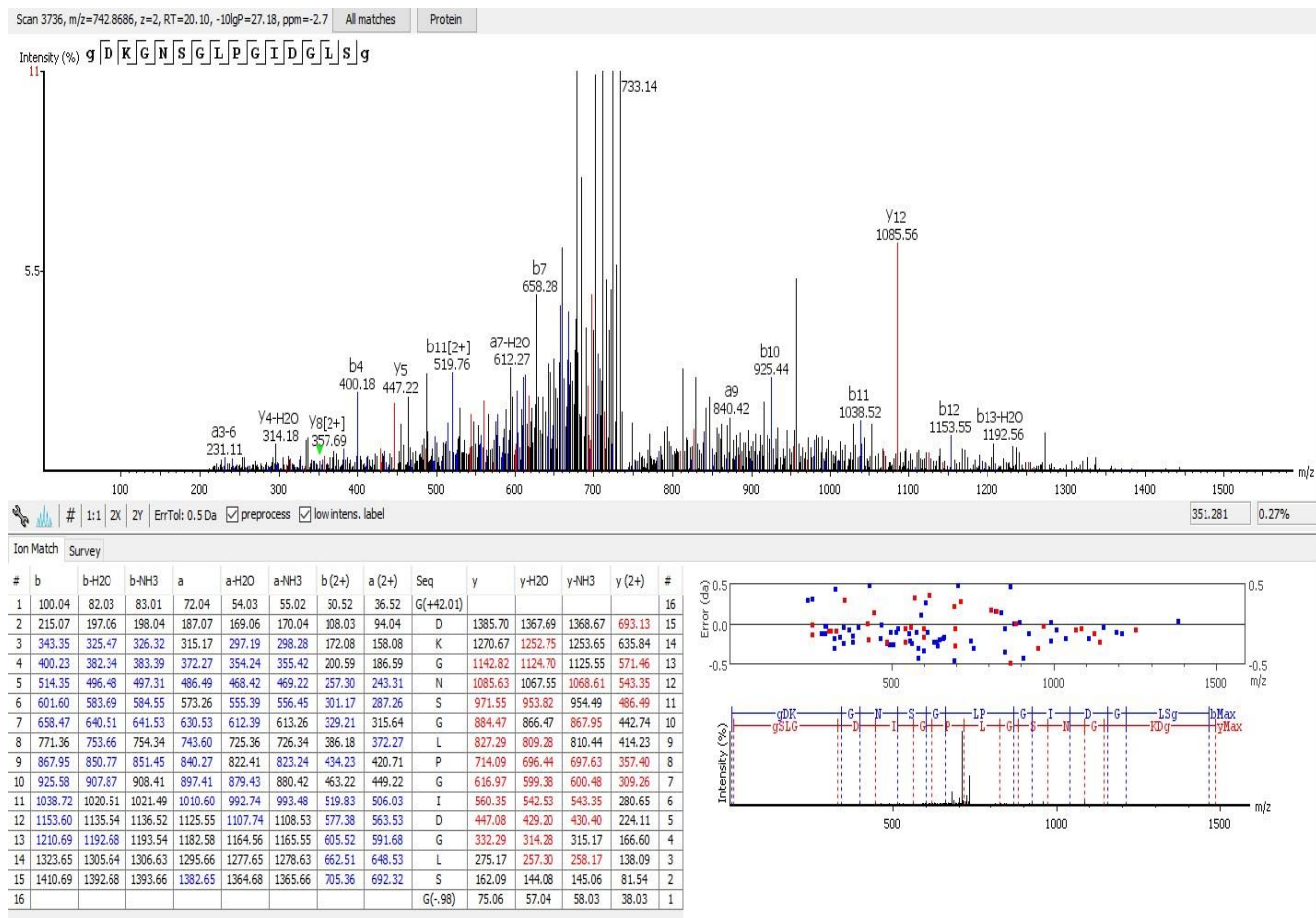




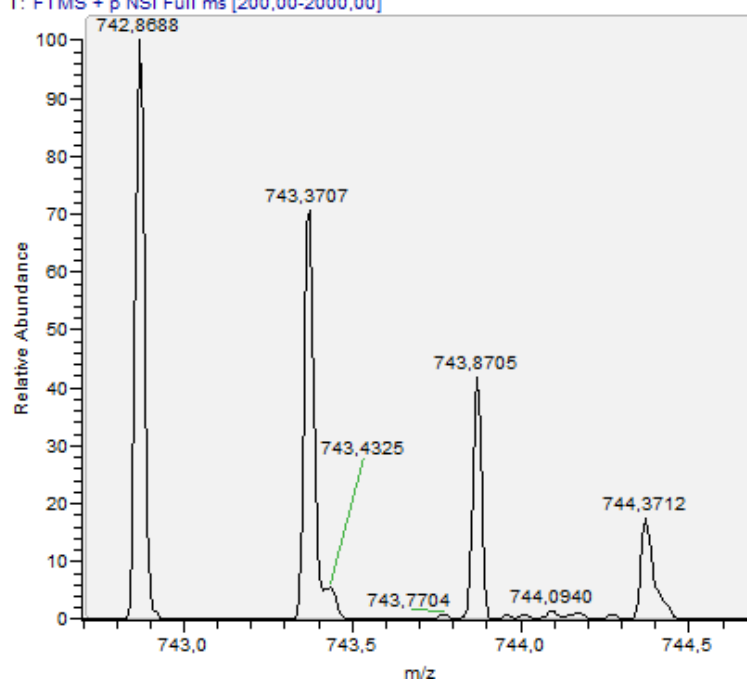


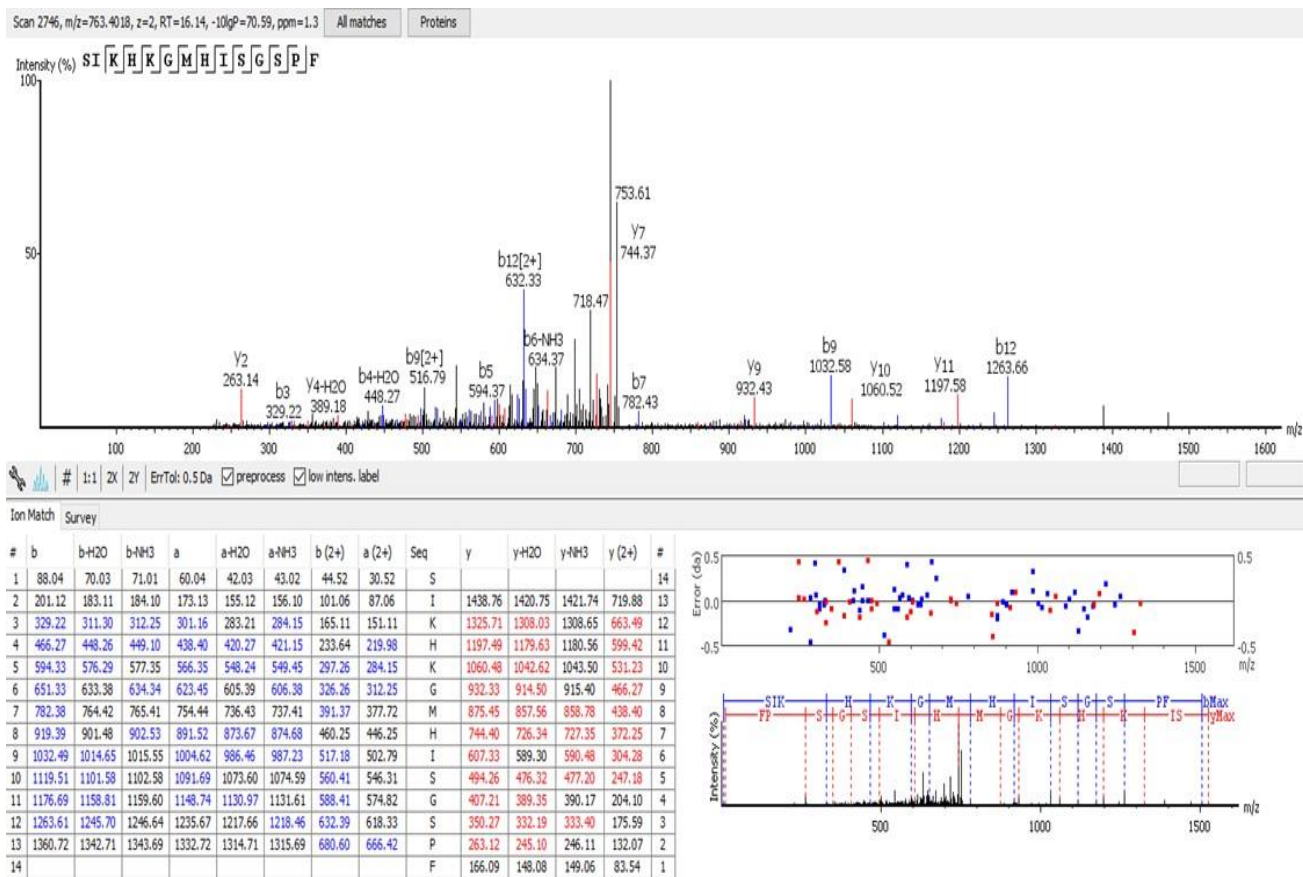
Orceus_peptidomica #3296-3379 RT: 18,32-18,65 AV: 42 NL: 1,01E6
T: FTMS + p NSI Full ms [200,00-2000,00]



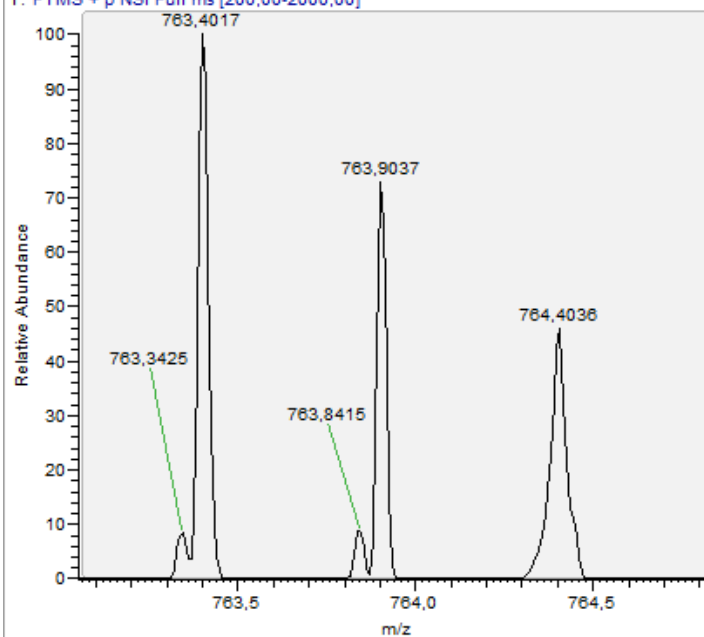


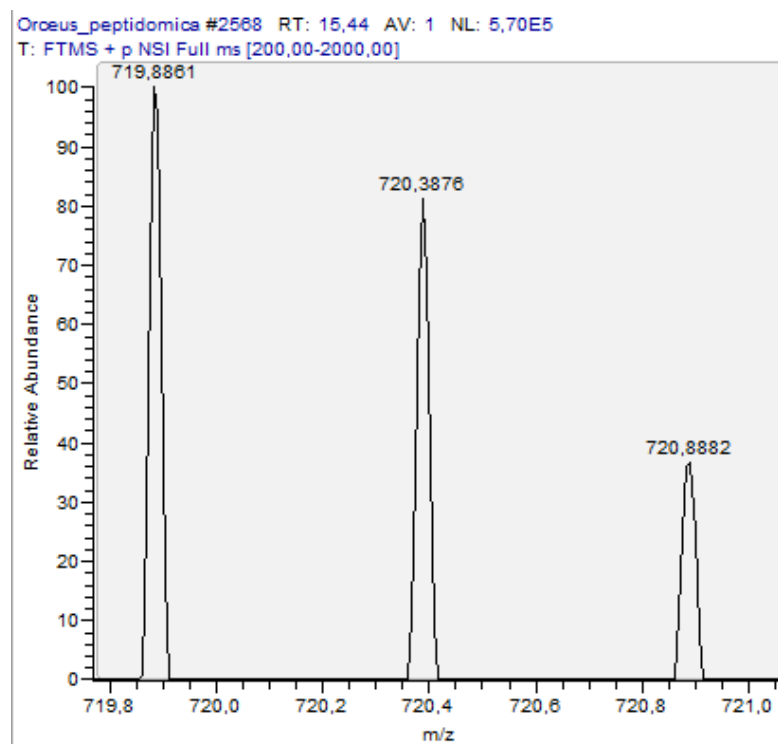
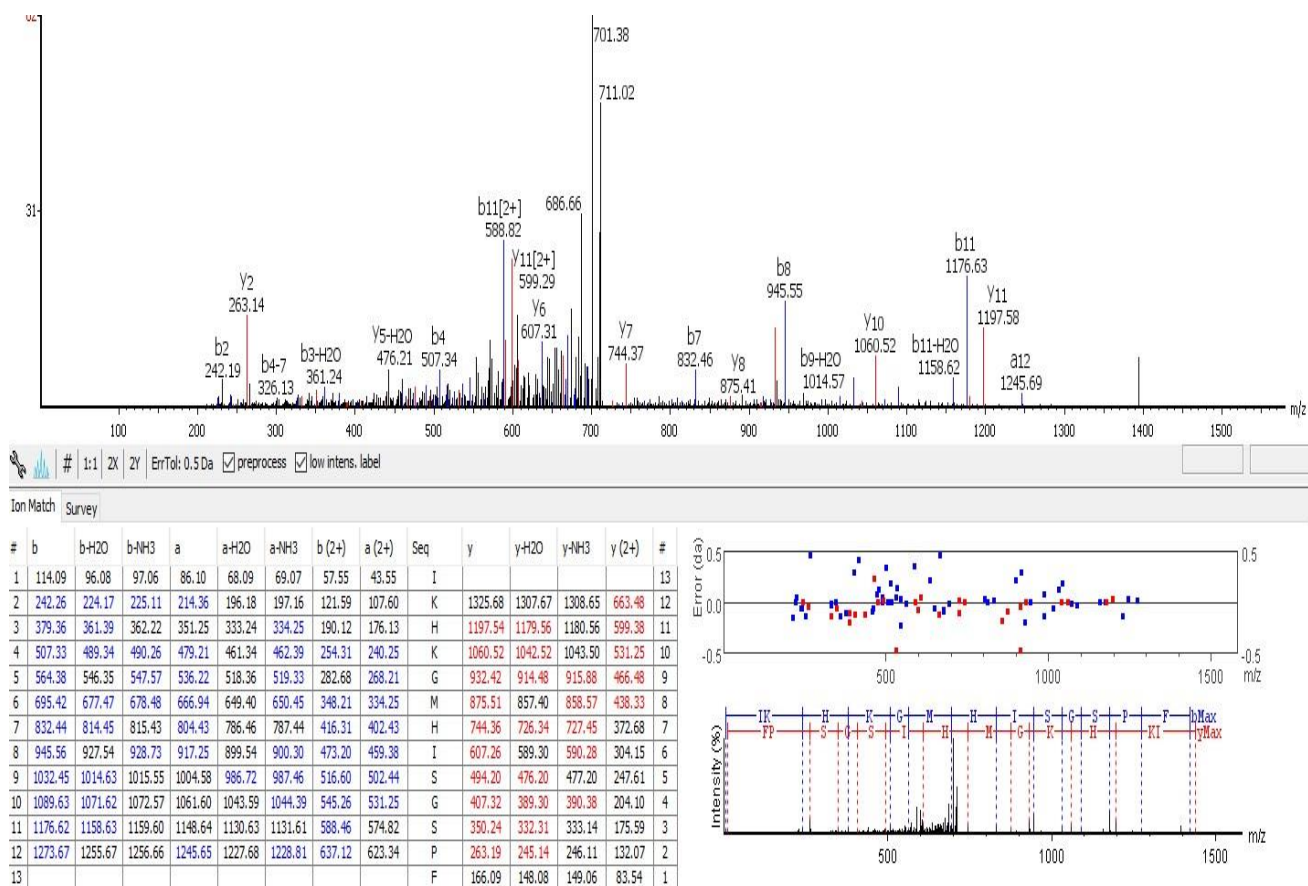
Orceus_peptidomica #3714-3757 RT: 20,01-20,18 AV: 22 NL: 9,87E5
T: FTMS + p NSI Full ms [200,00-2000,00]

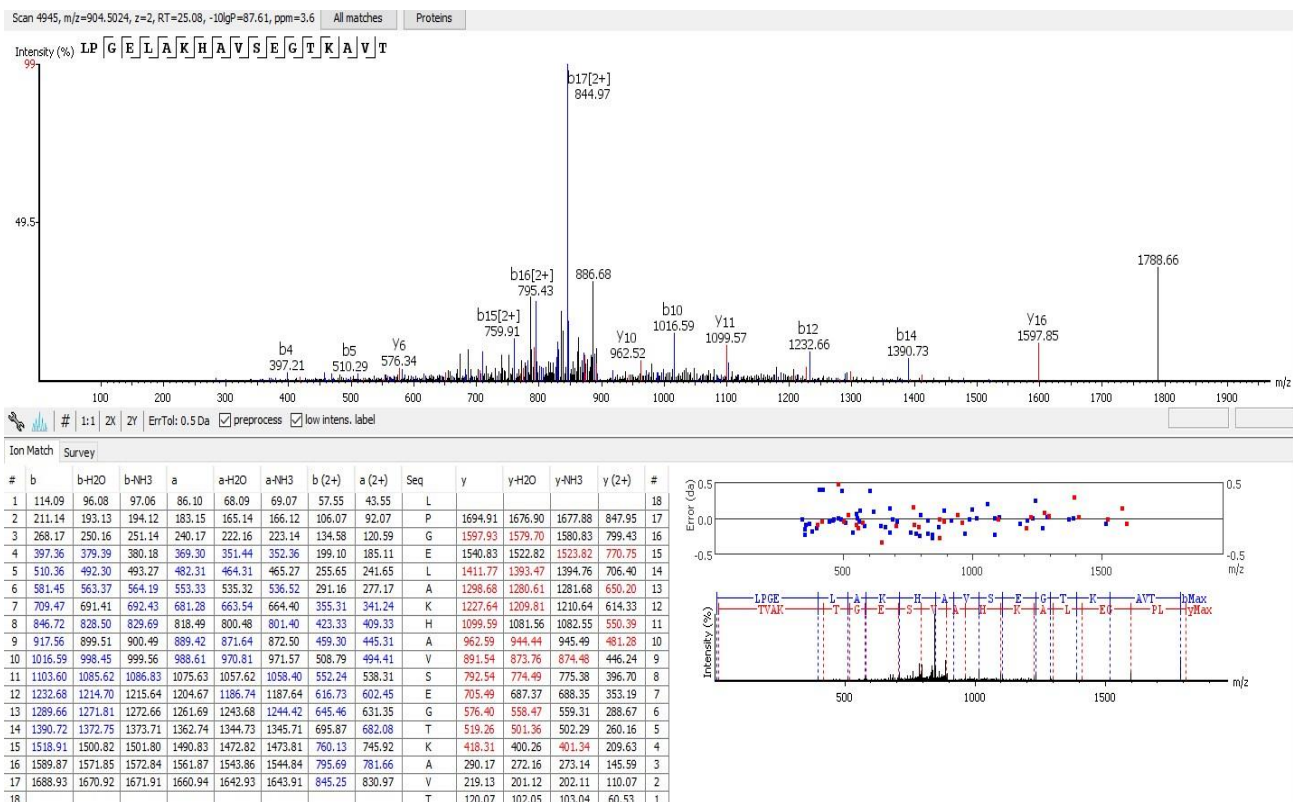




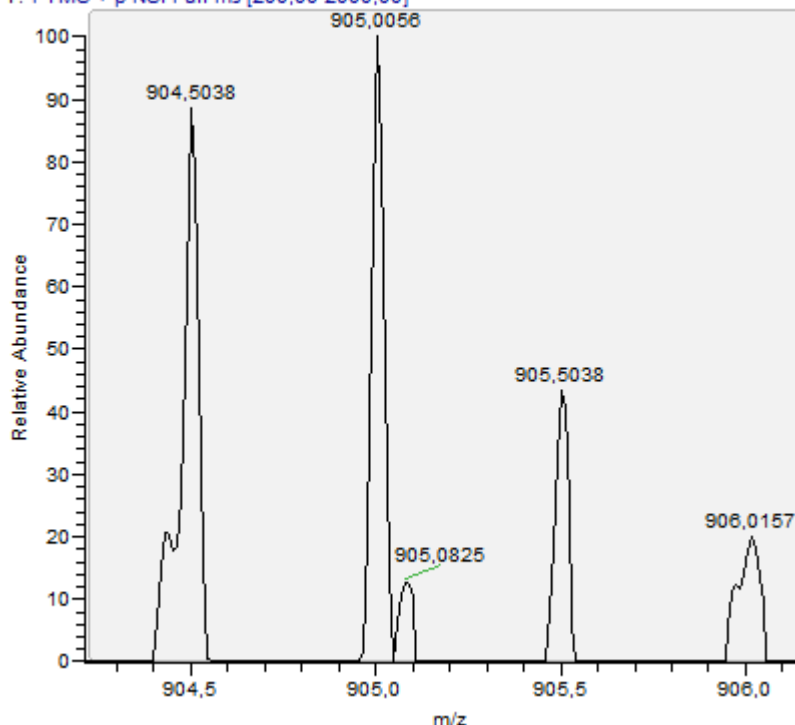
Oreus_peptidomica #2738-2802 RT: 16.11-16.36 AV: 32 NL: 4.05E5
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]

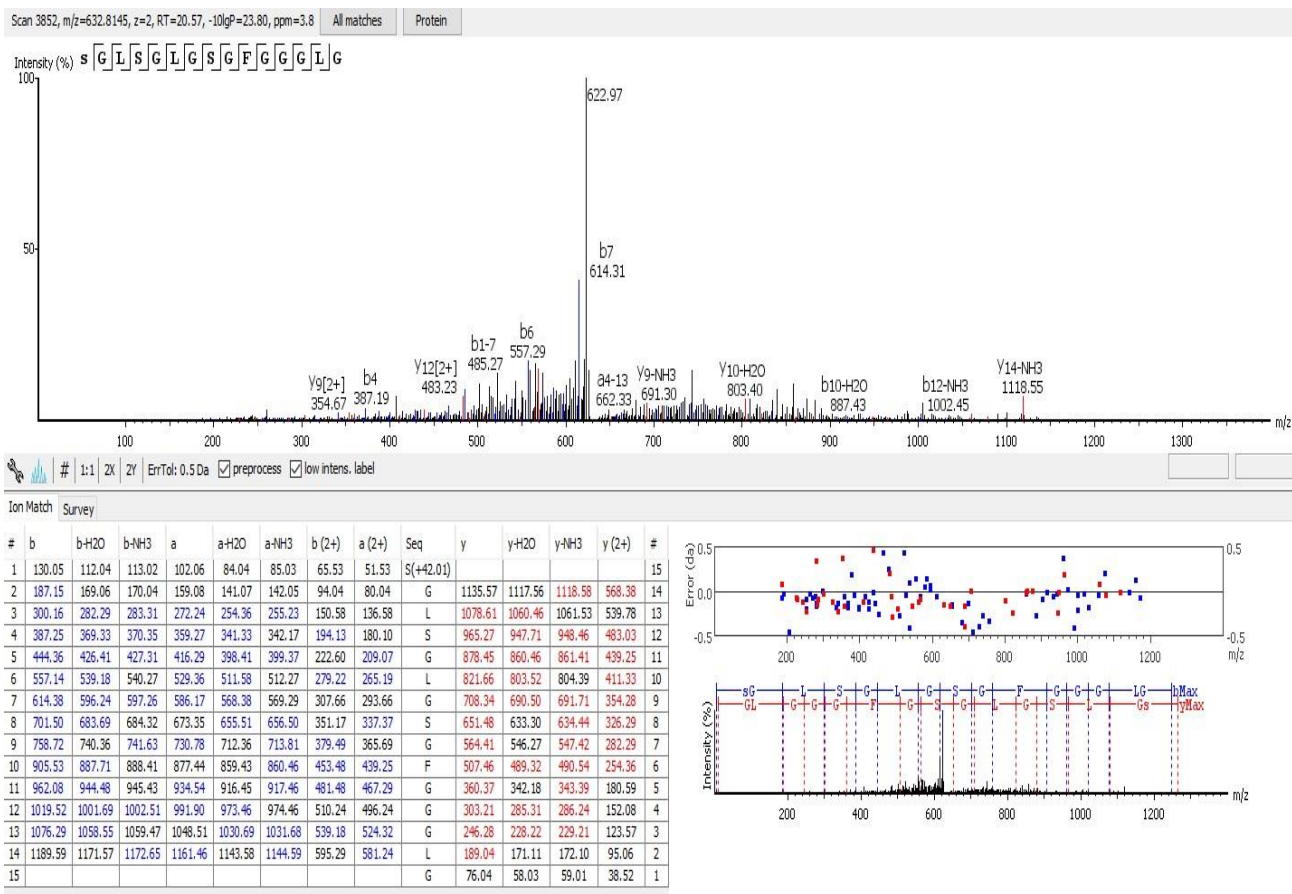




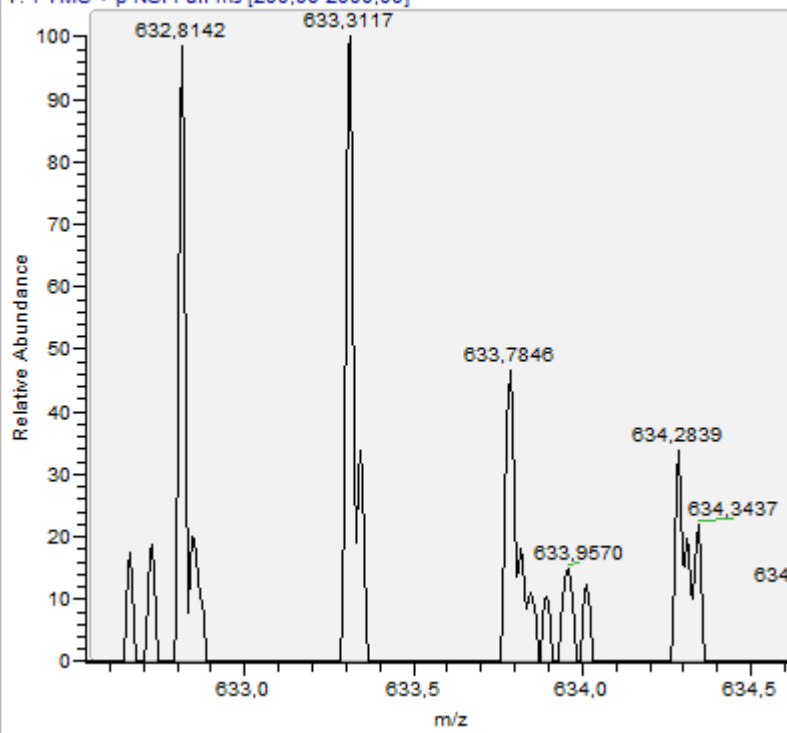


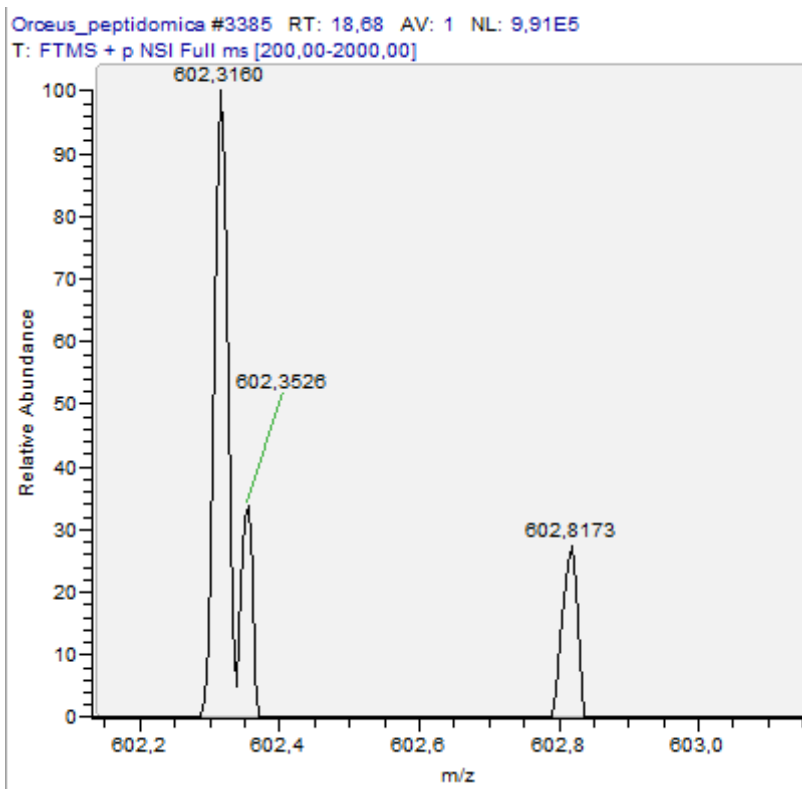
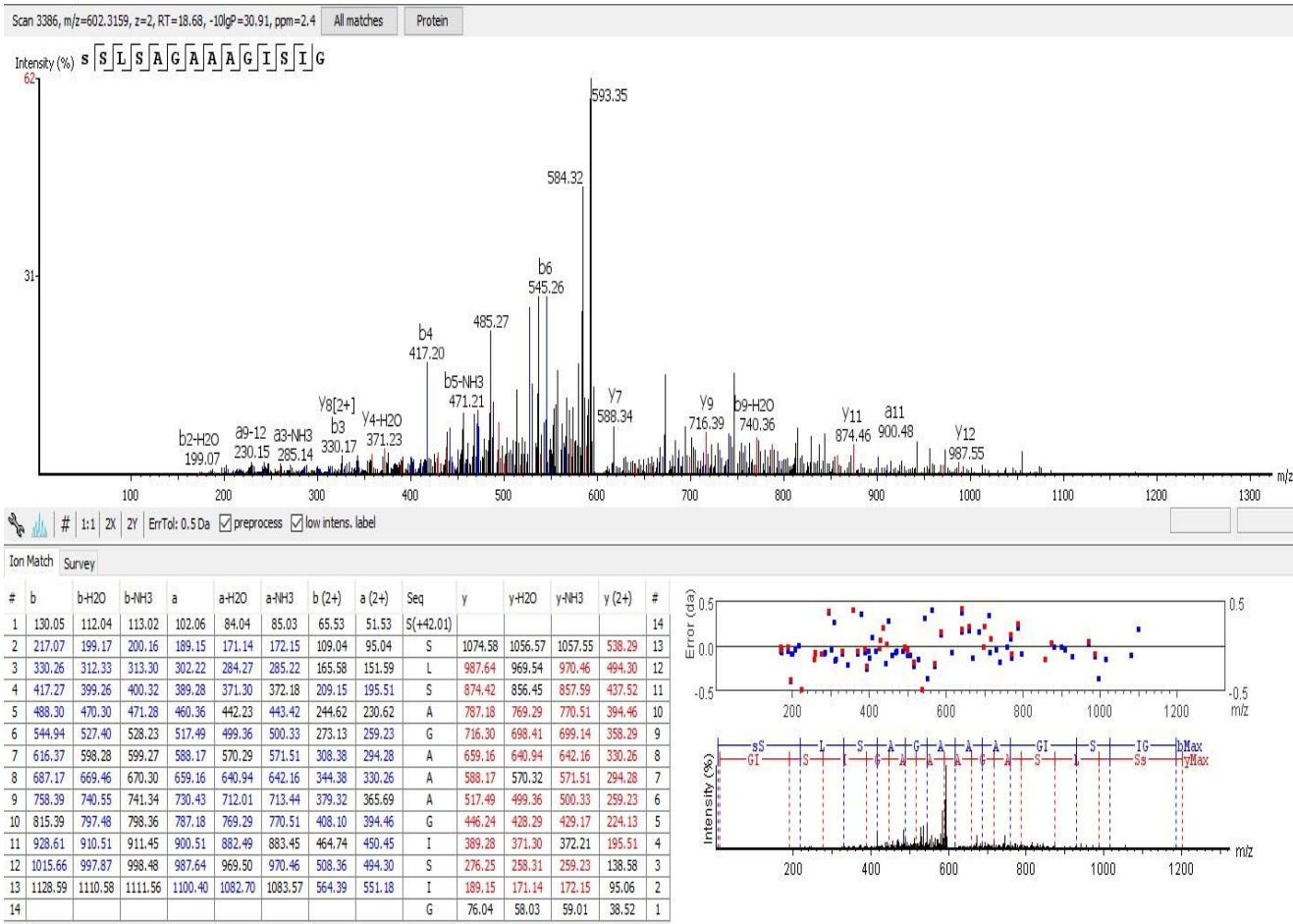
Oreoc_peptidomica #4930 RT: 25.01 AV: 1 NL: 1,34E6
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]

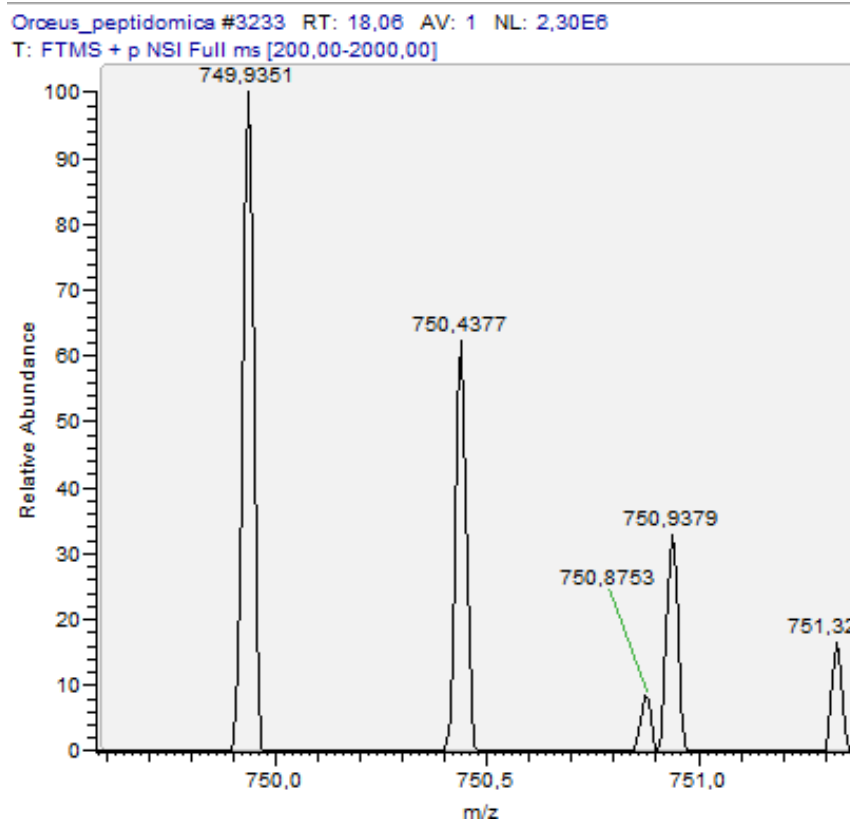
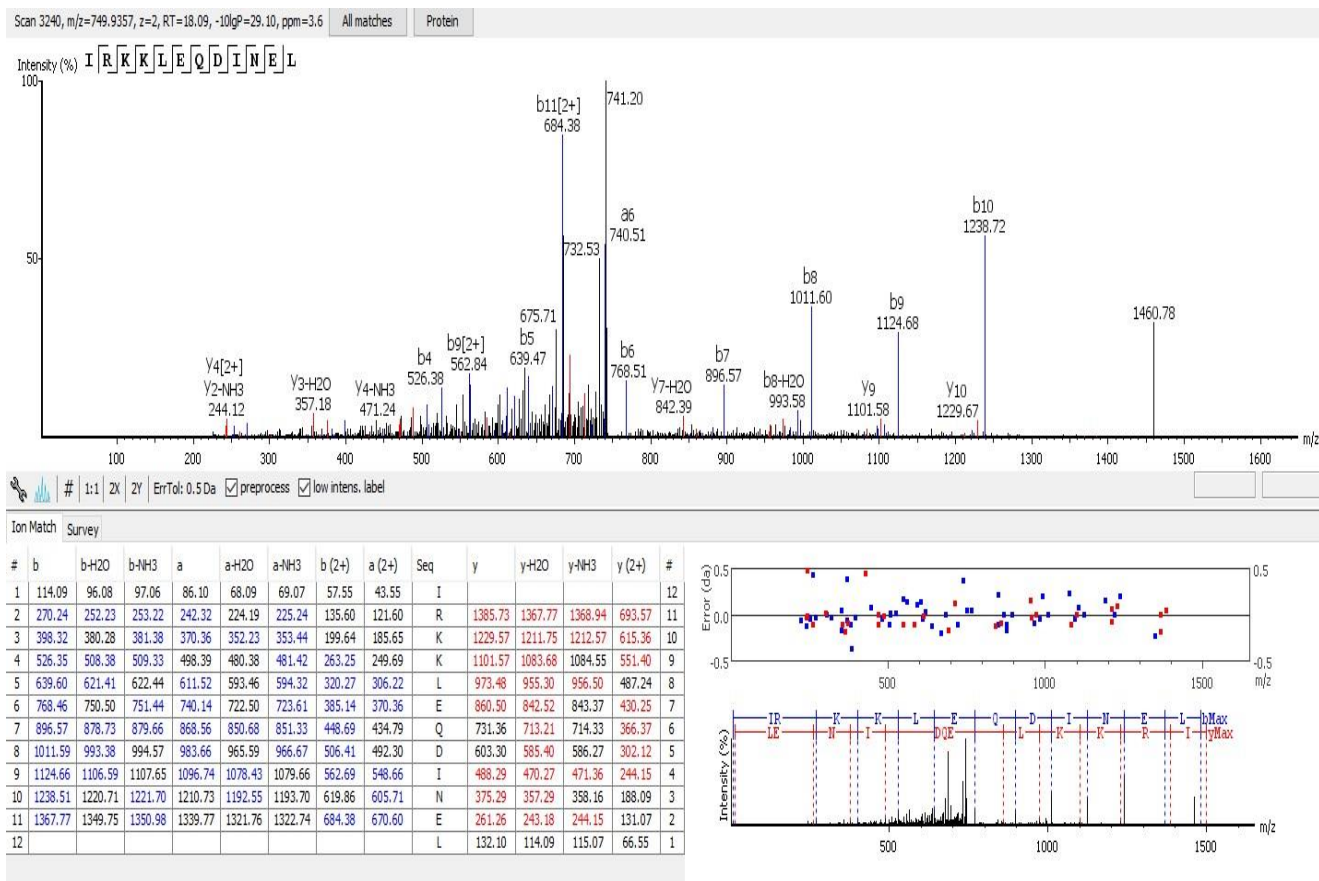


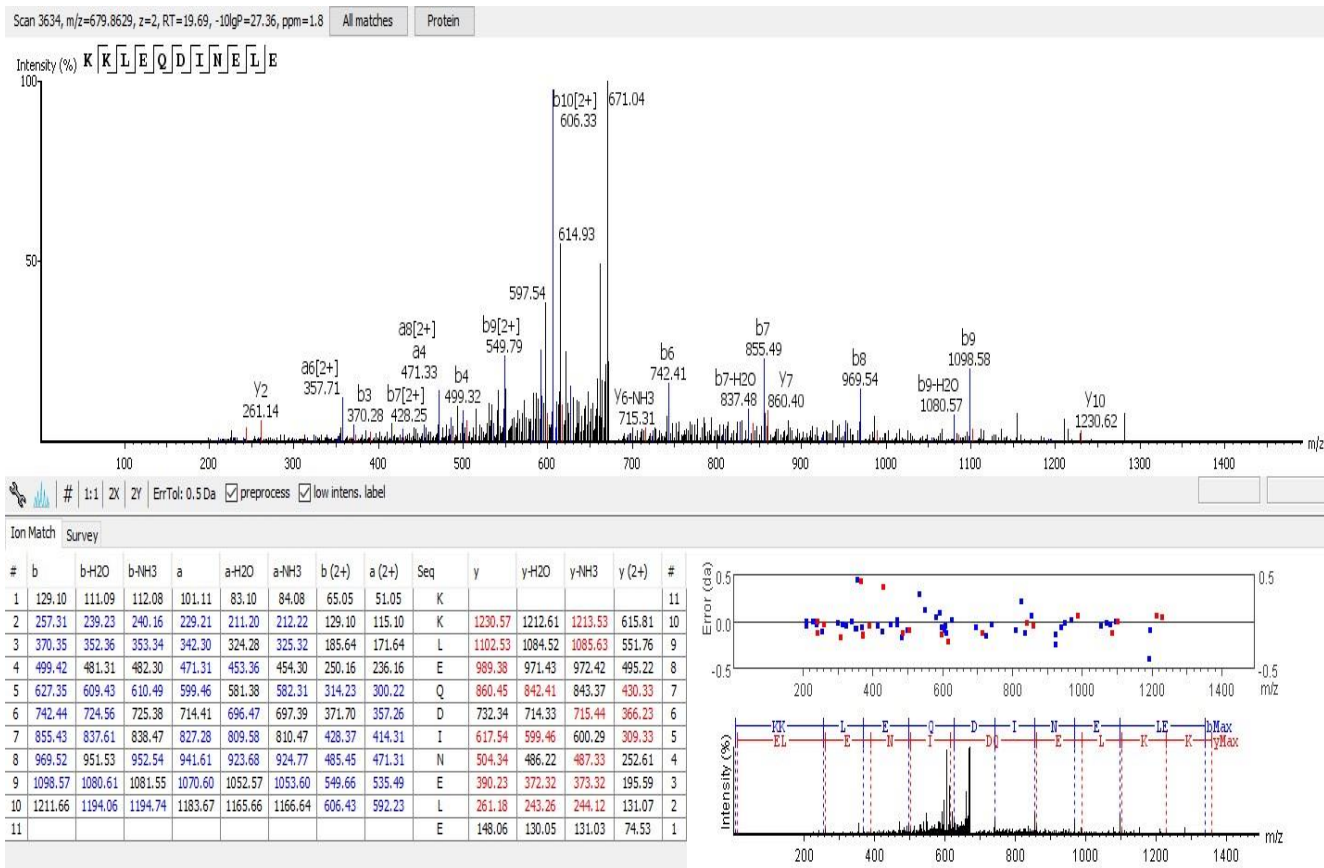


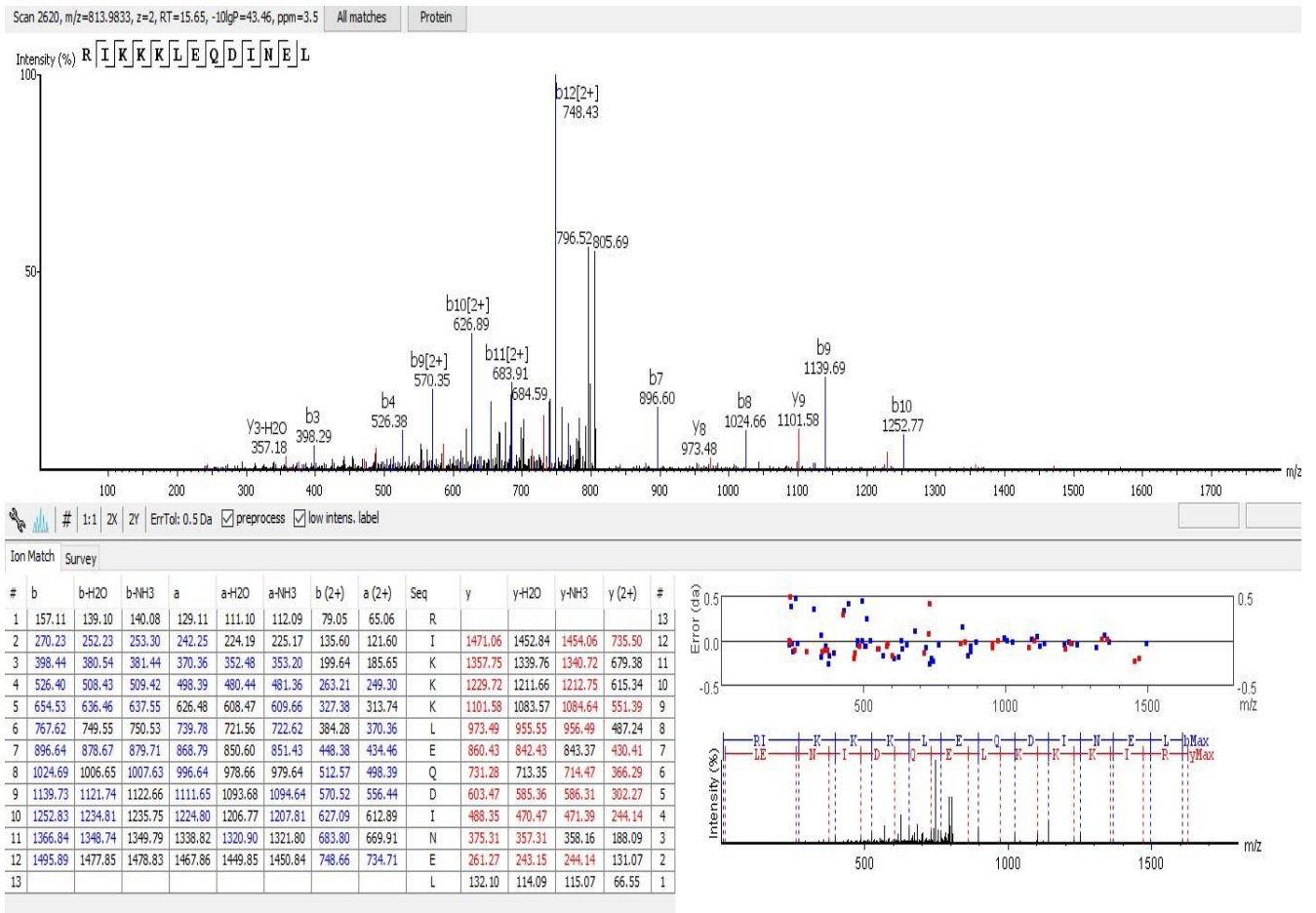
Oreoc_peptidomica #3841 RT: 20,52 AV: 1 NL: 1,40E6
T: FTMS + p NSI Full ms [200,00-2000,00]



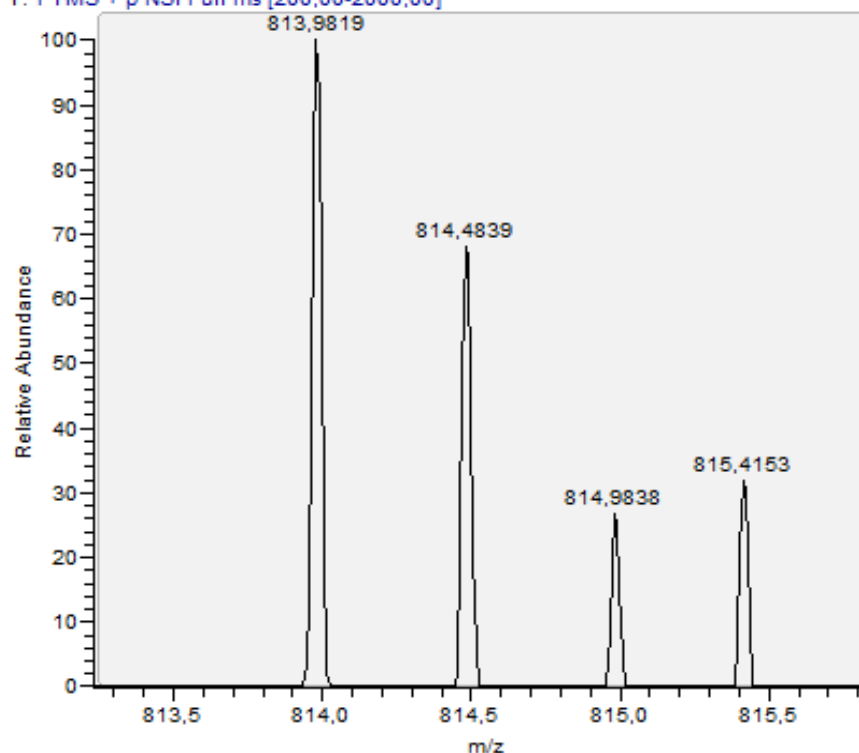


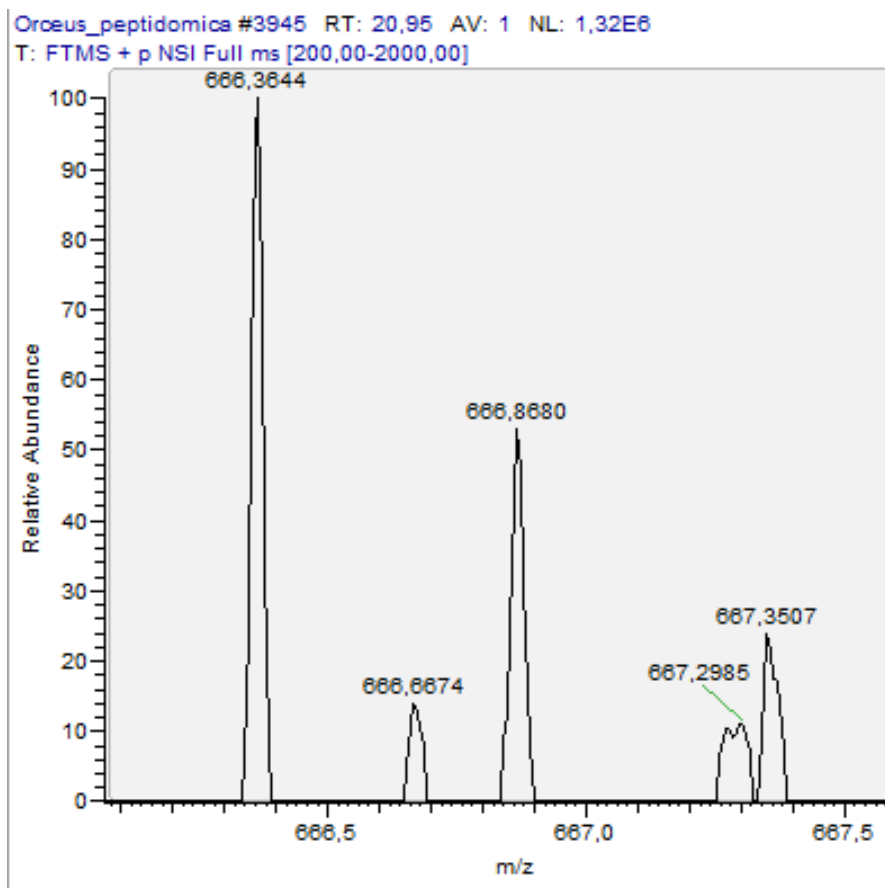
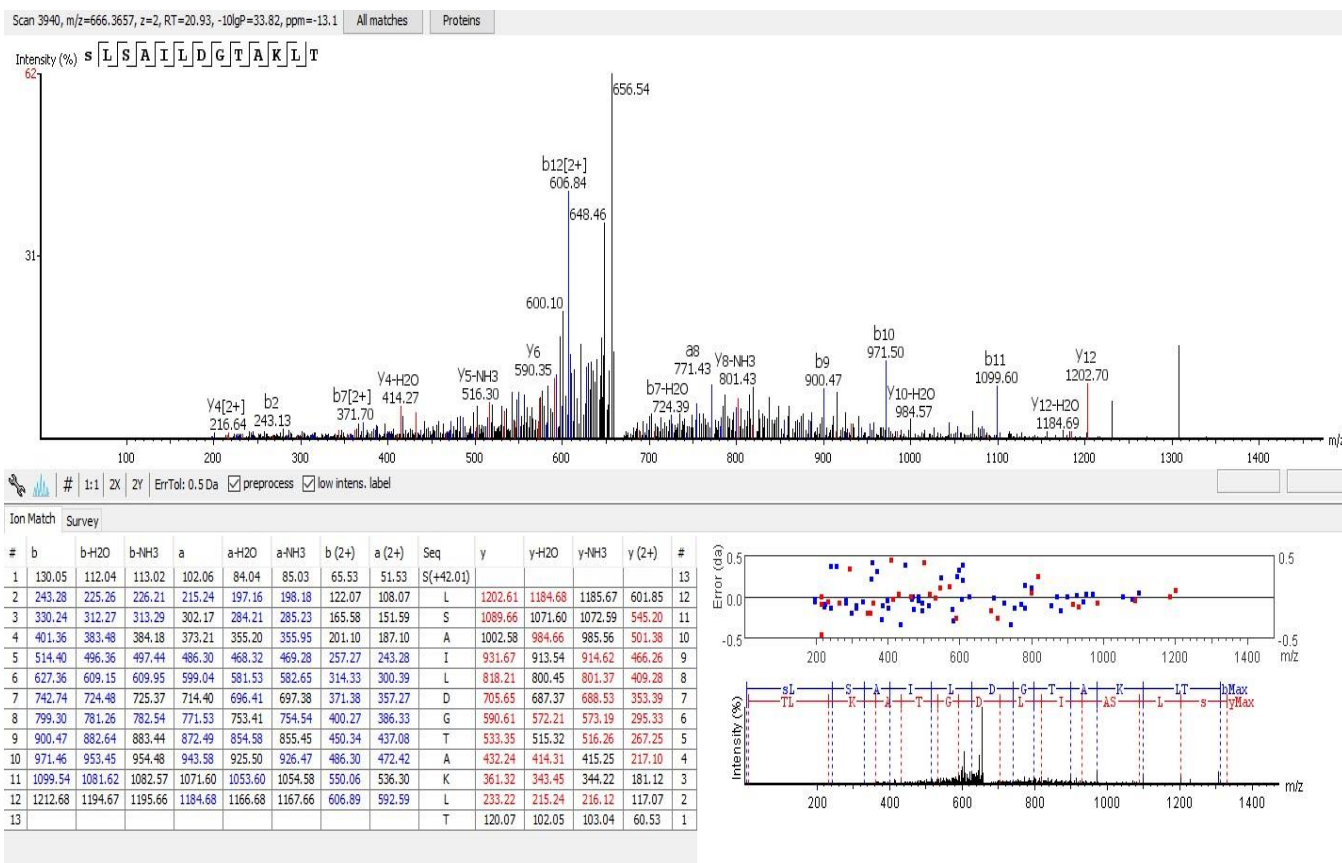


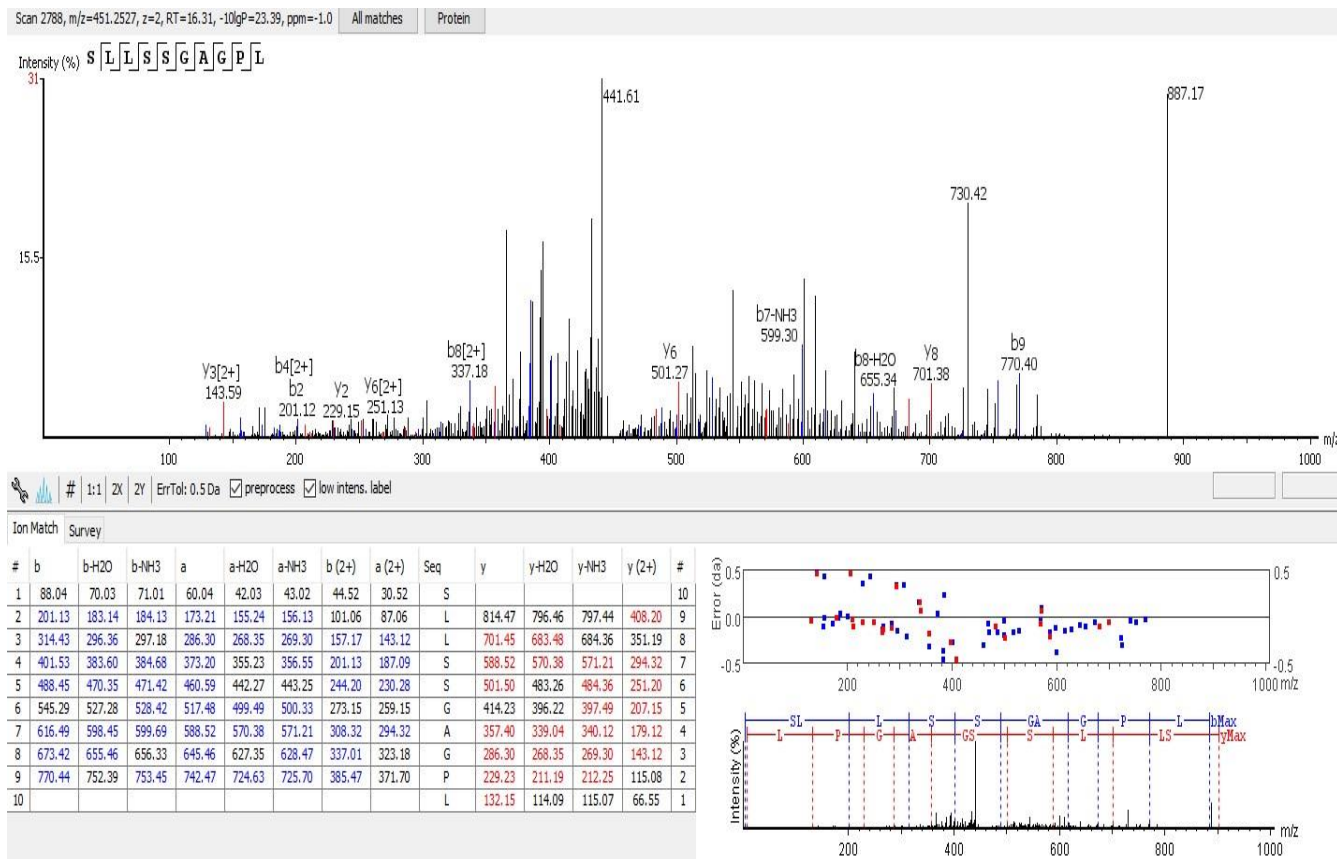




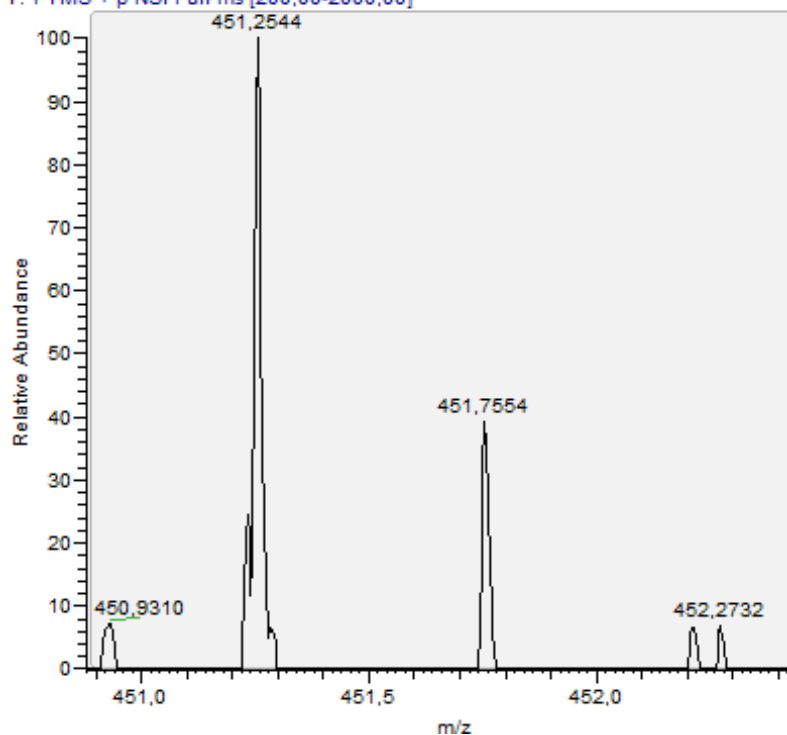
Oreoceus_peptidomica #2609 RT: 15,60 AV: 1 NL: 8,14E5
T: FTMS + p NSI Full ms [200,00-2000,00]

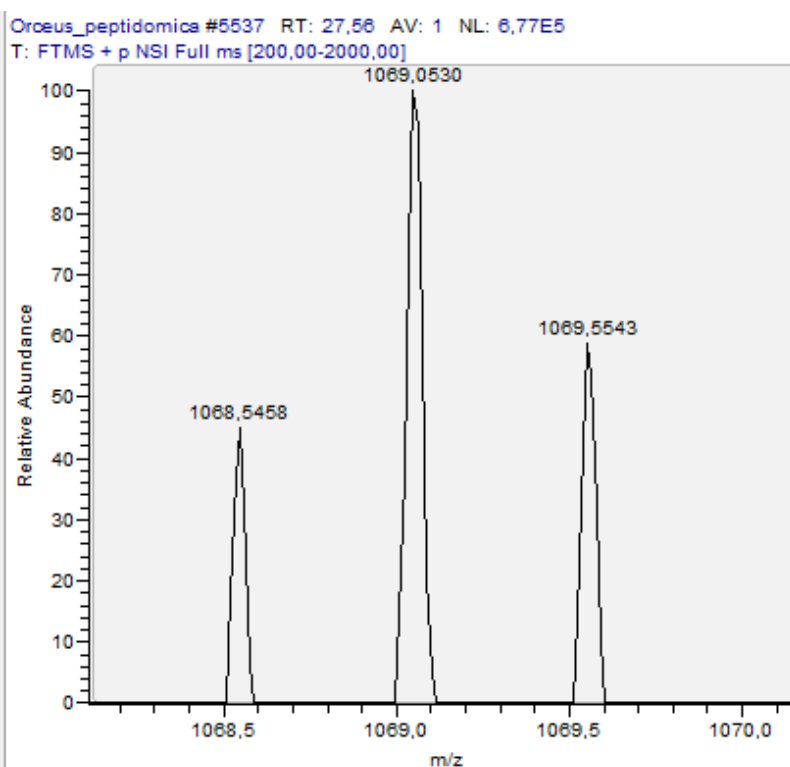
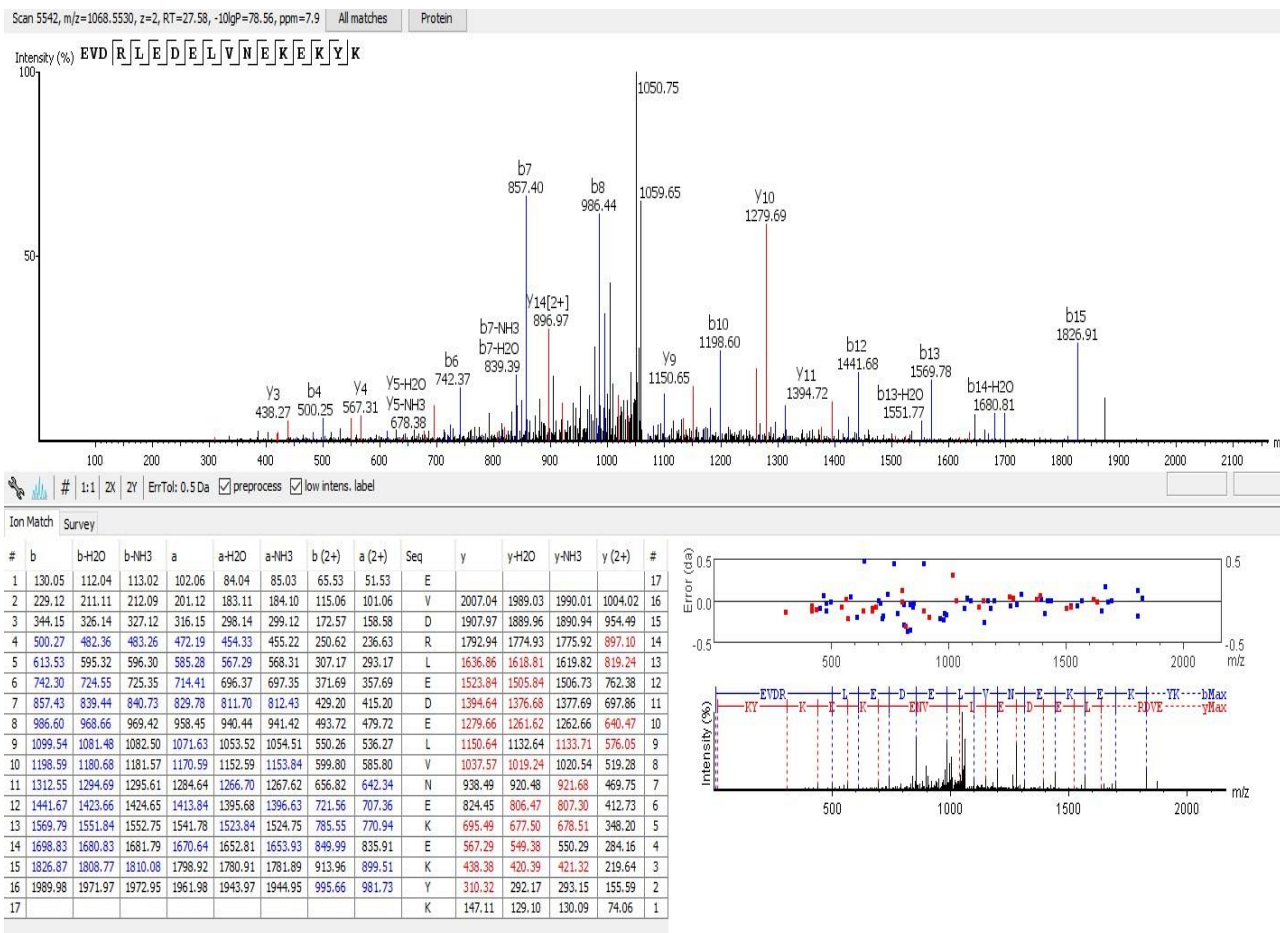


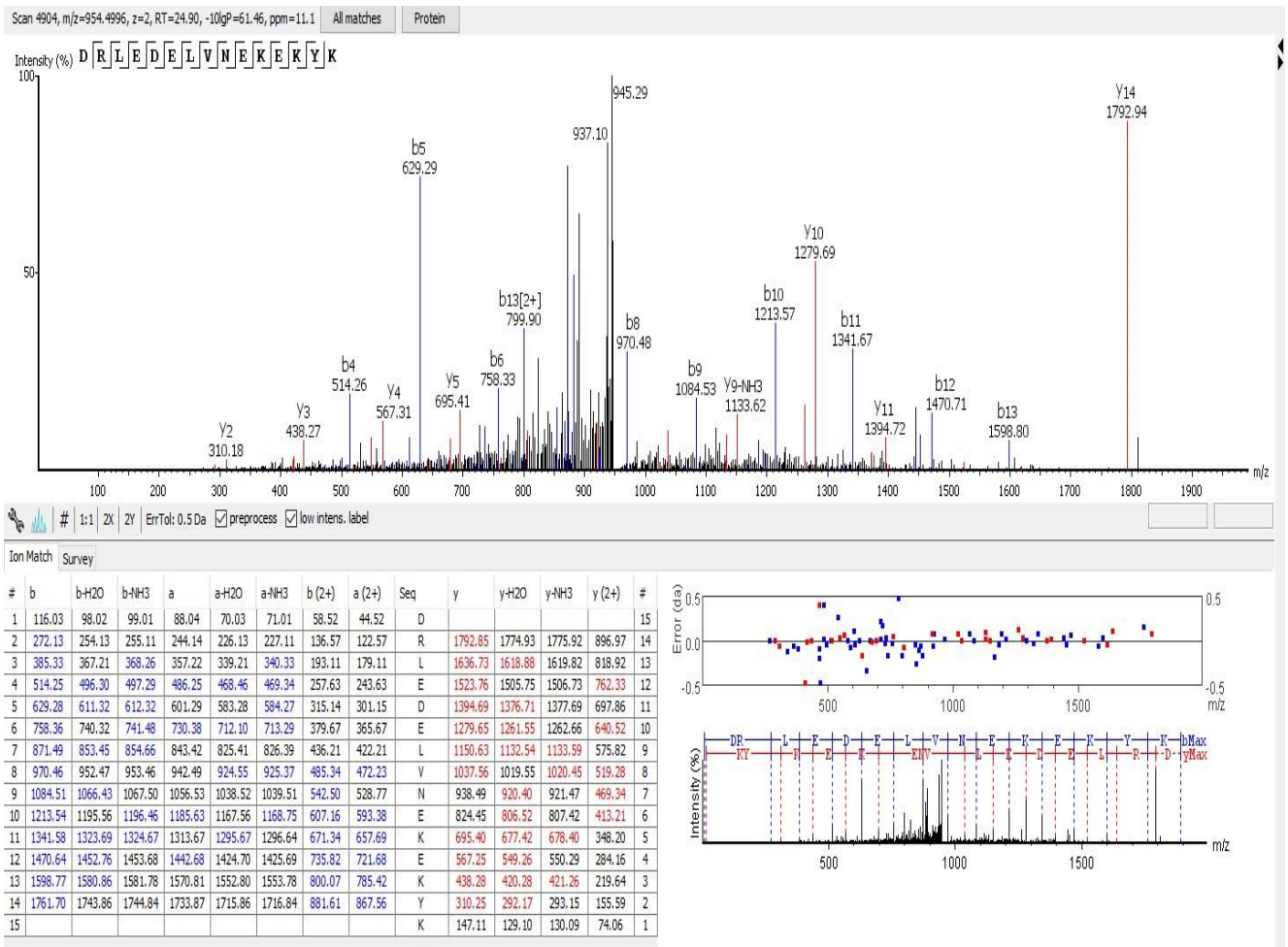




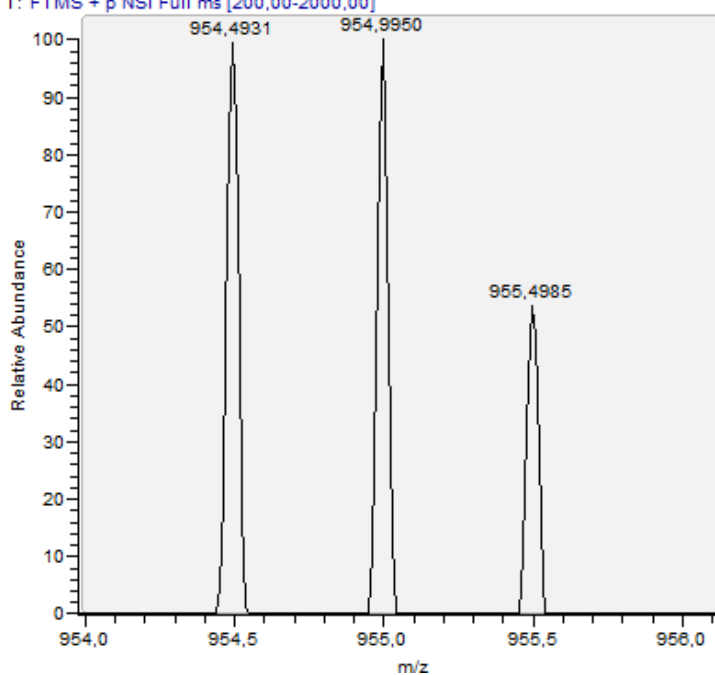
Oreus_peptidomica #2803 RT: 16,37 AV: 1 NL: 1,69E6
T: FTMS + p NSI Full ms [200,00-2000,00]

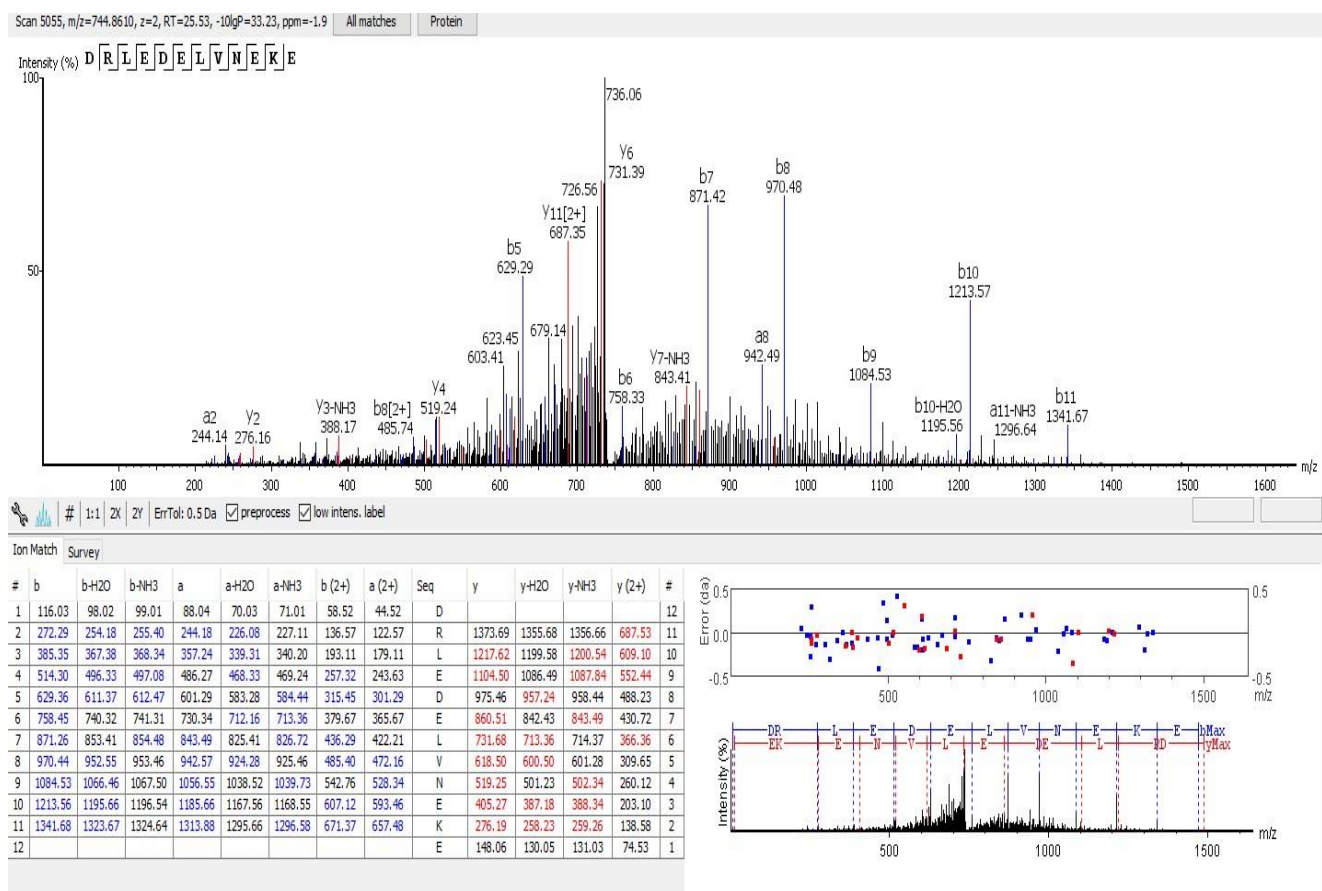




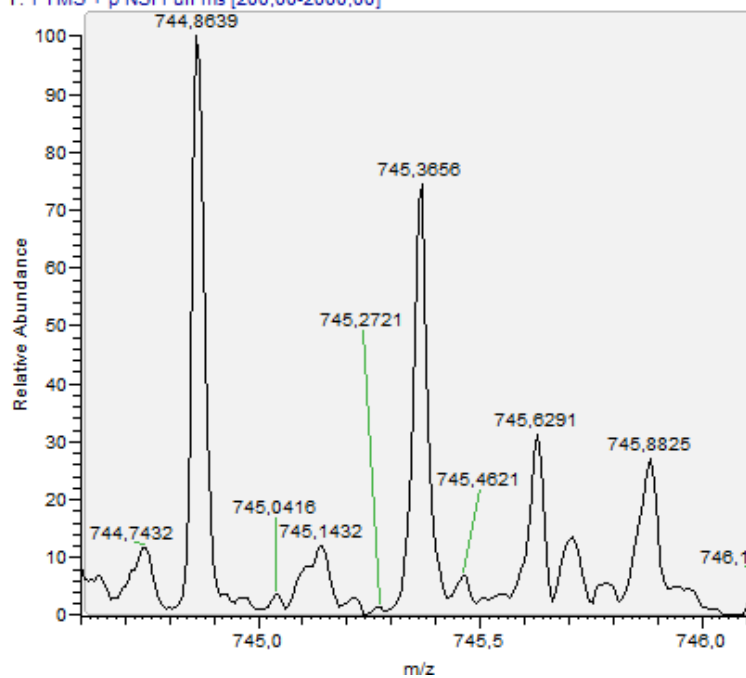


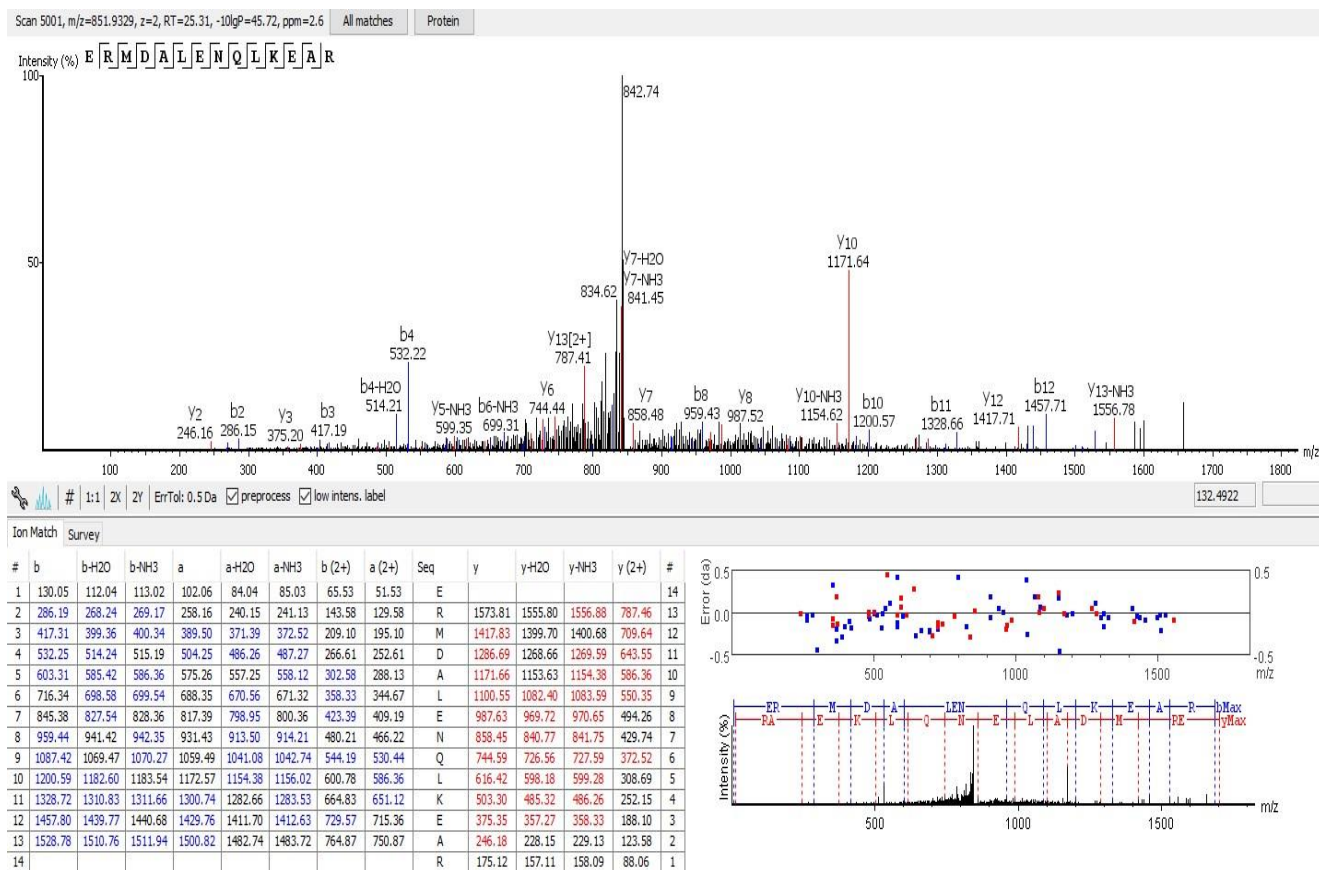
Orceus_peptidomica #4910 RT: 24.93 AV: 1 NL: 8.46E5
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]



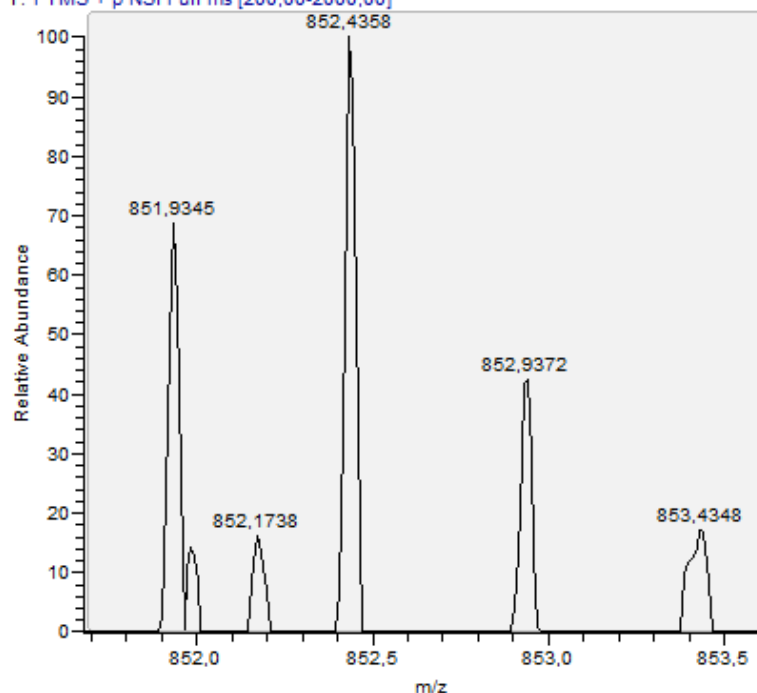


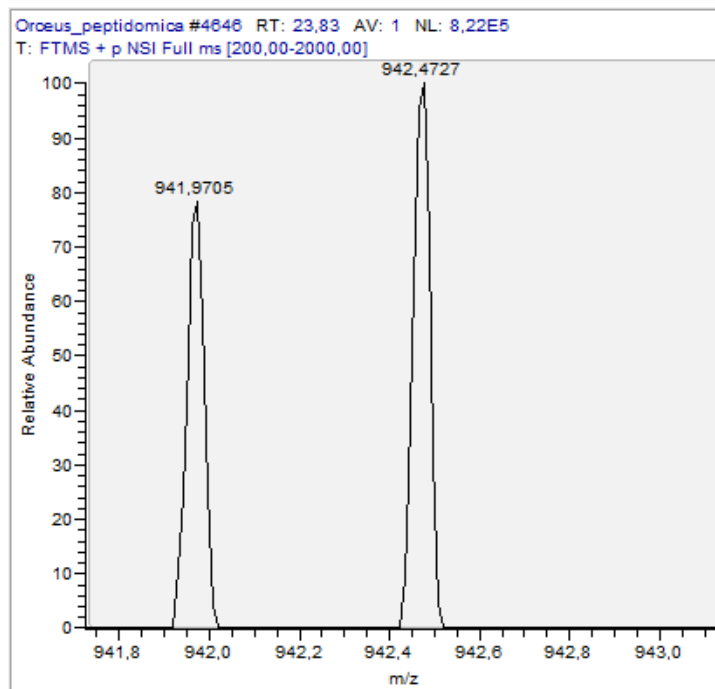
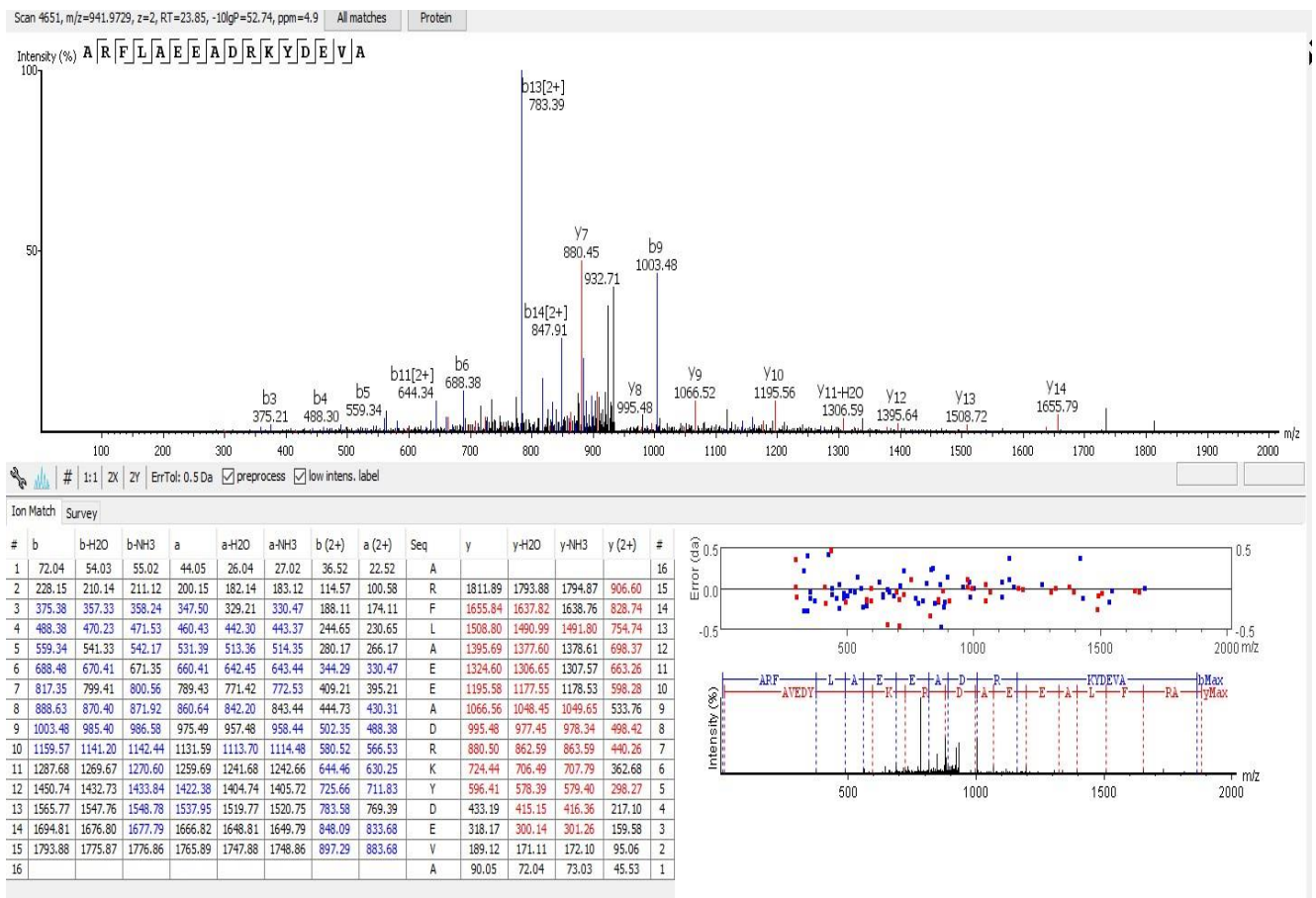
Orceus_peptidomica #5053-5113 RT: 25.53-25.77 AV: 30 NL: 4.35E5
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]

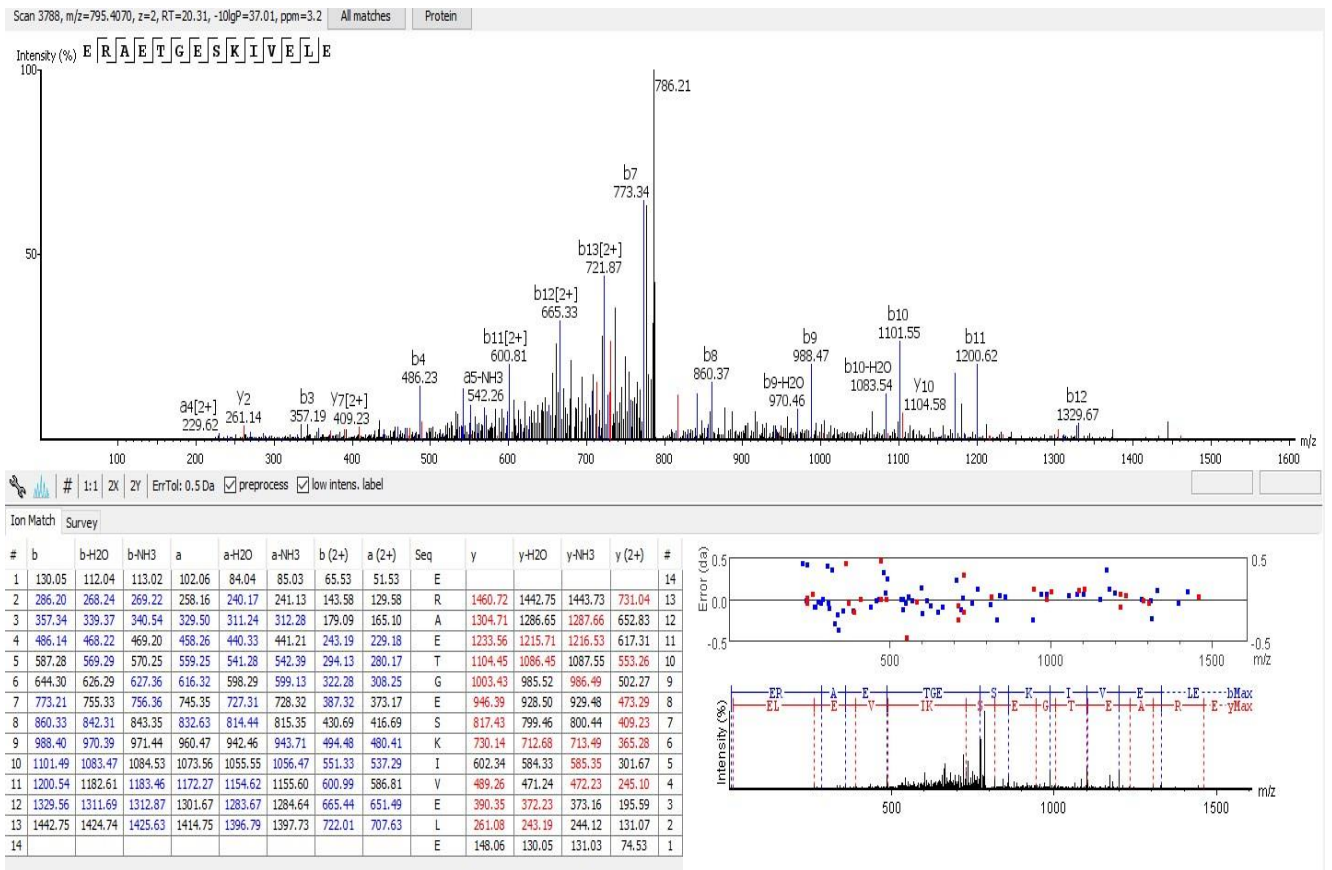




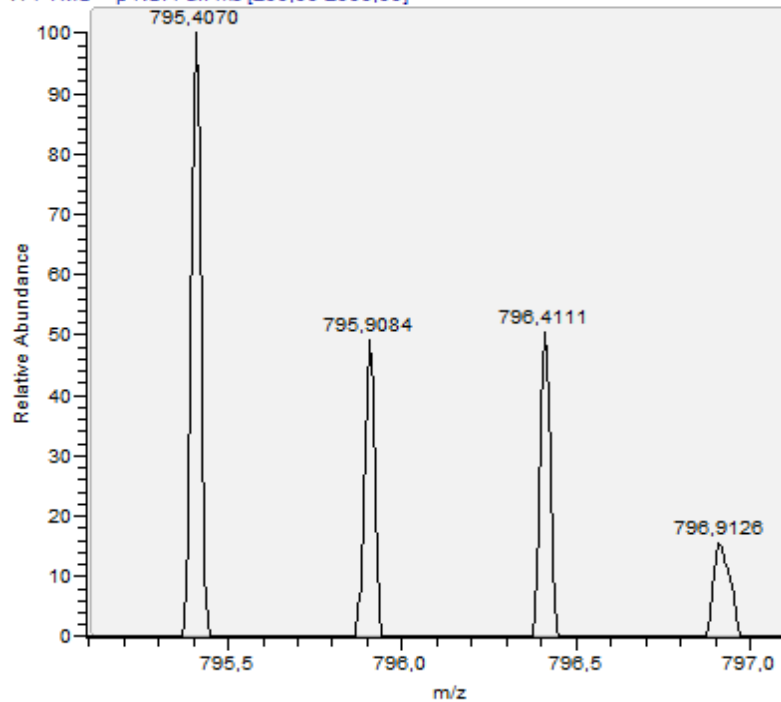
Oryza_peptidomica #5012 RT: 25.35 AV: 1 NL: 1,34E6
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]

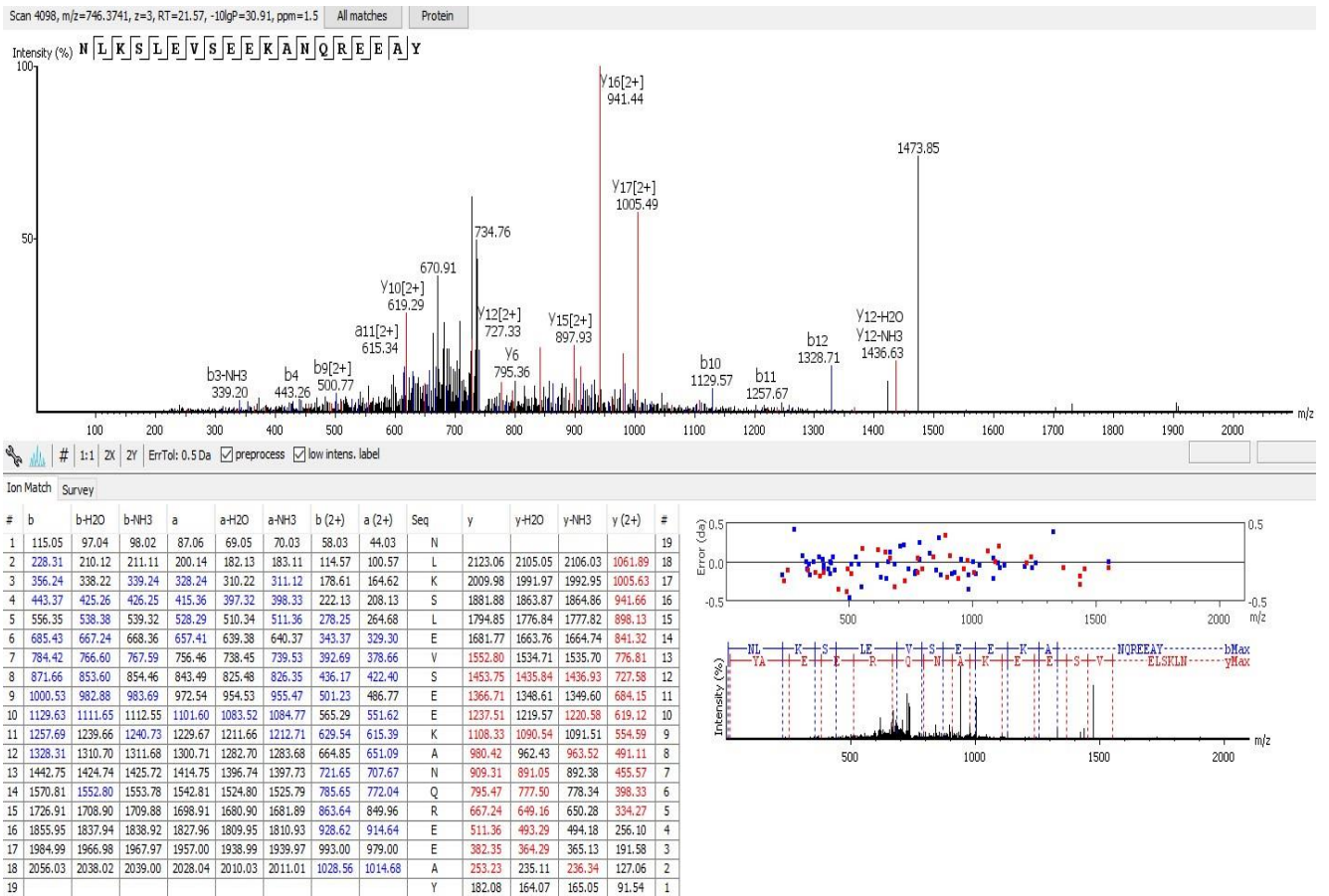




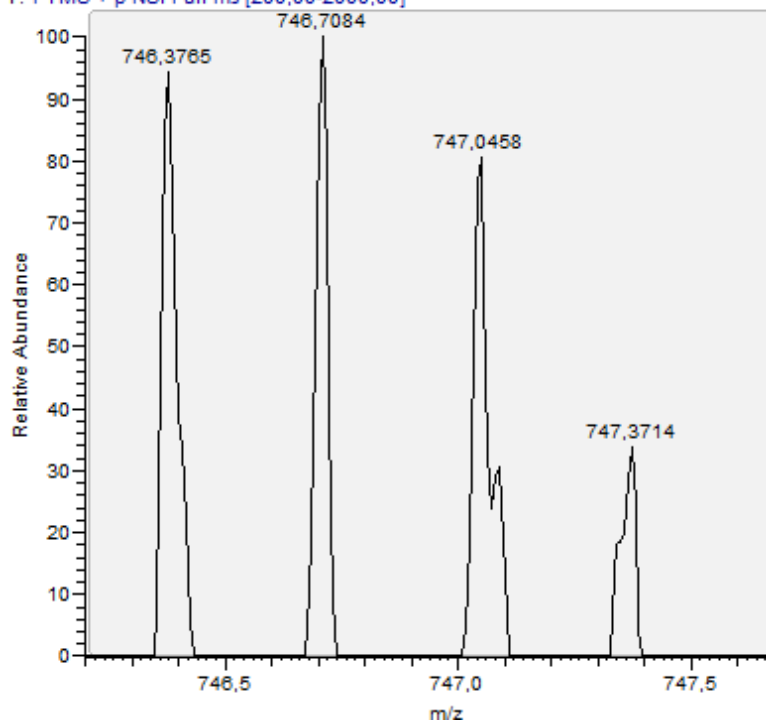


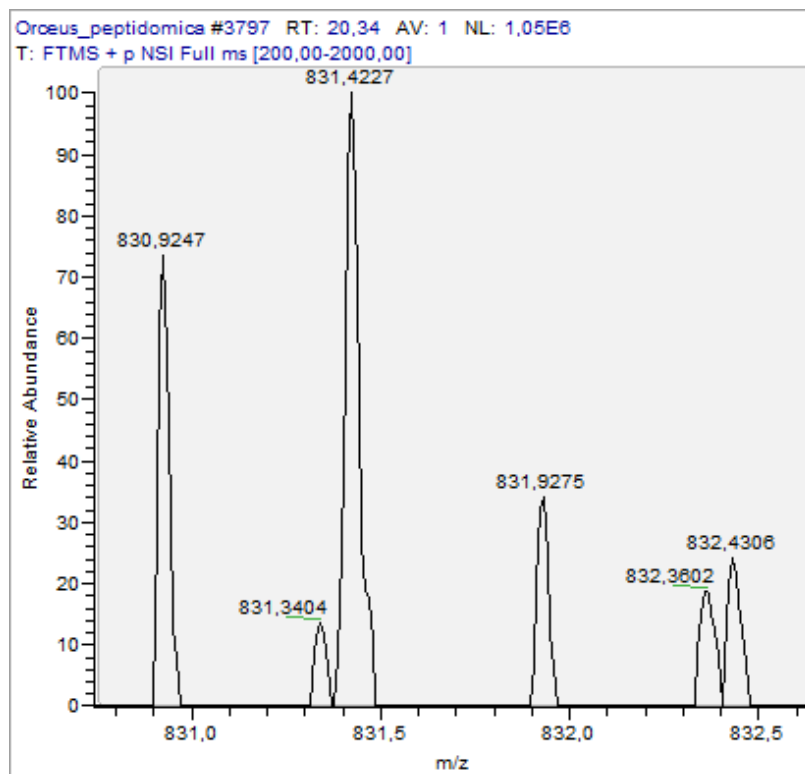
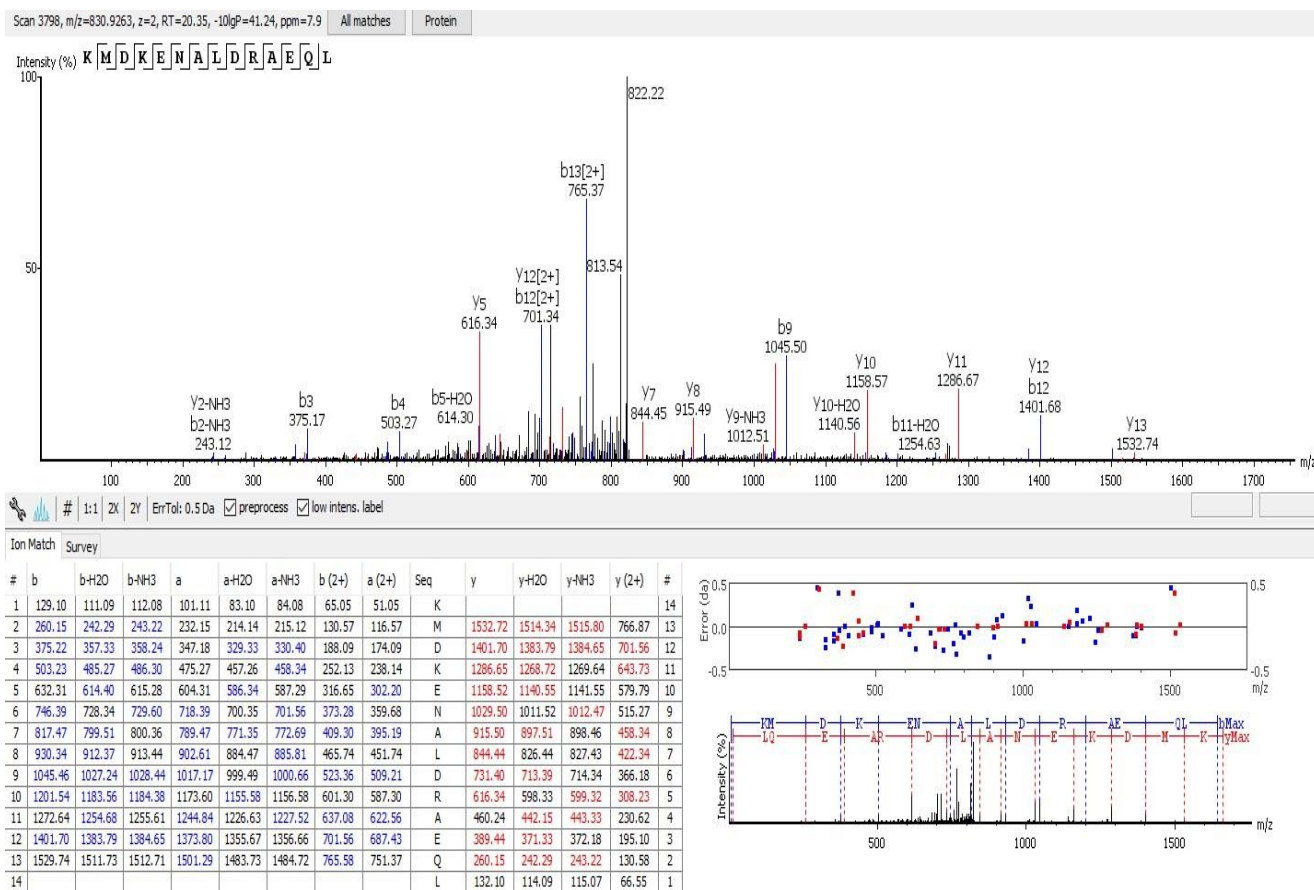
Orceus_peptidomica #3799 RT: 20.35 AV: 1 NL: 2.11E6
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]

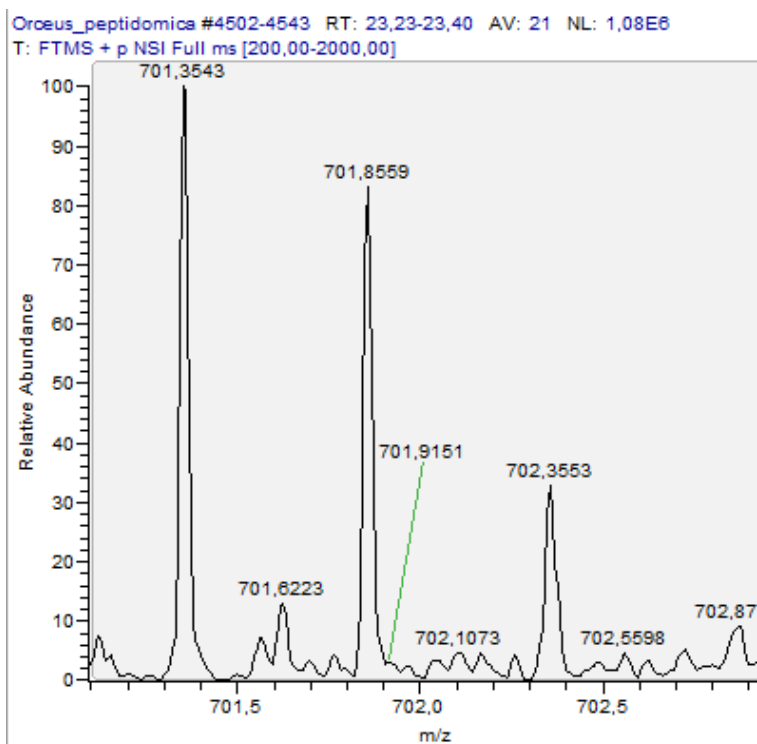
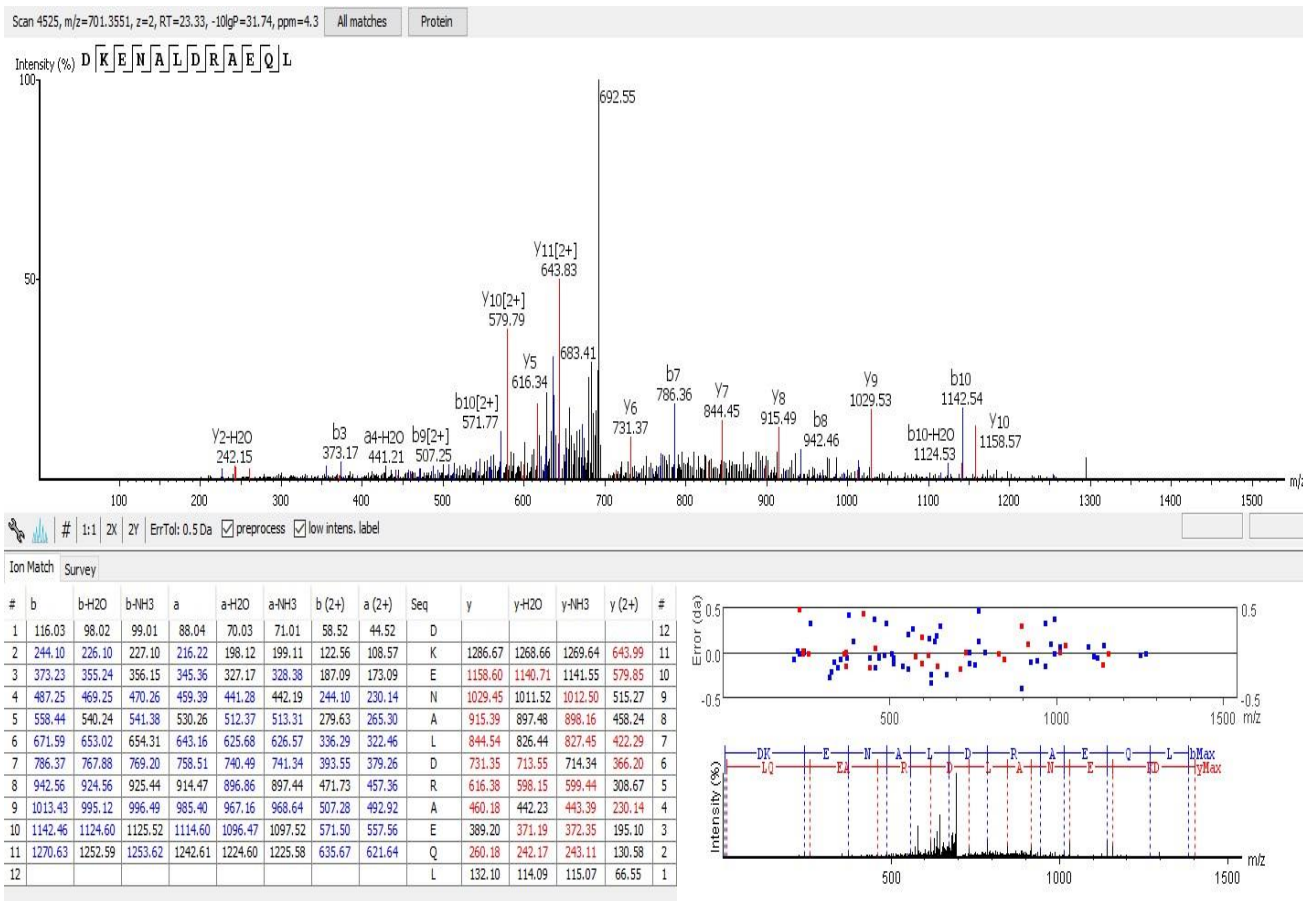


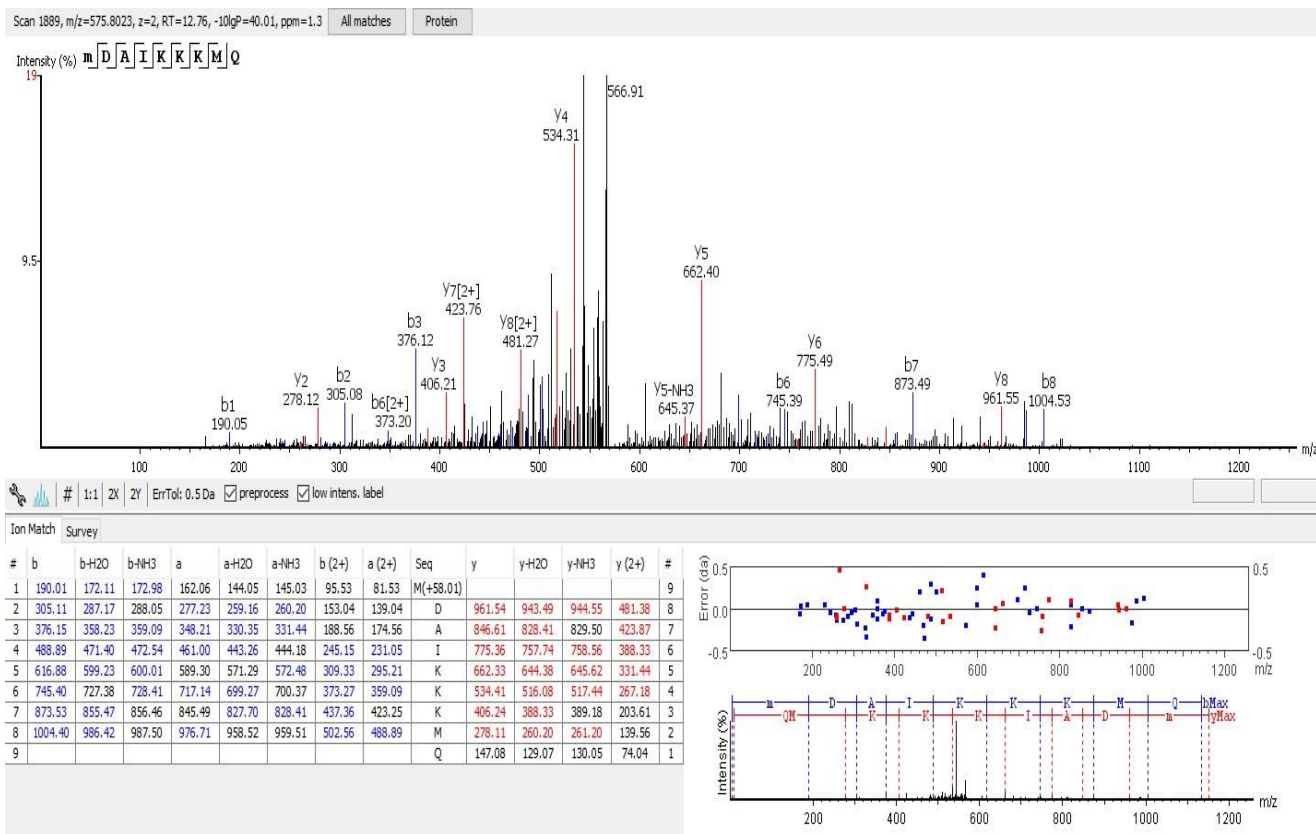


Orcus_peptidomica #4089 RT: 21.53 AV: 1 NL: 7.39E5
T: FTMS + p NSI Full ms [200,00-2000,00]

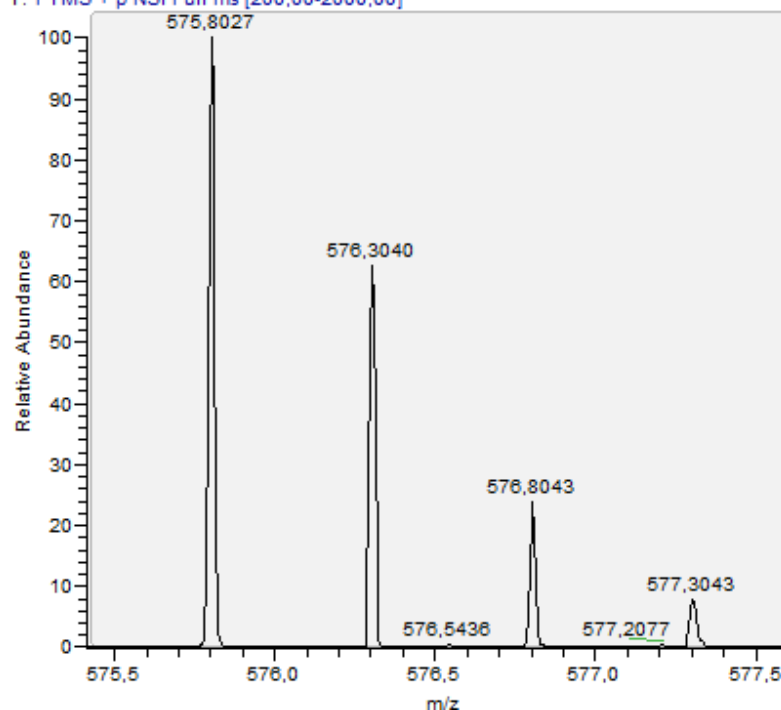


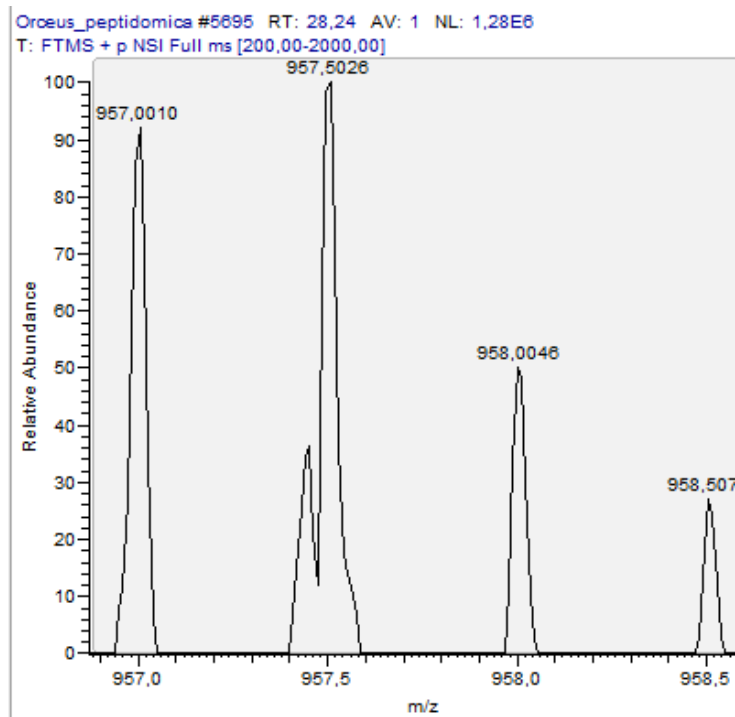
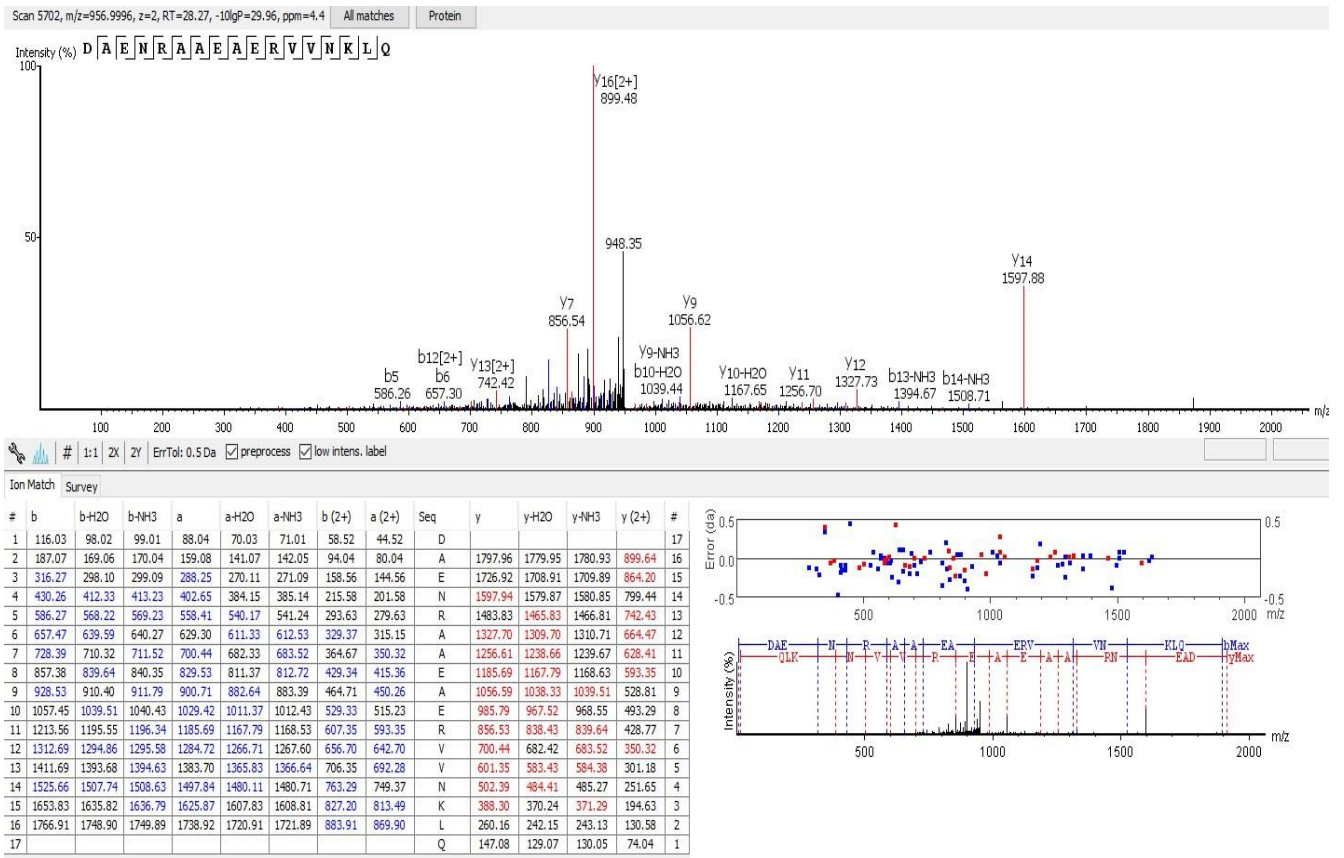


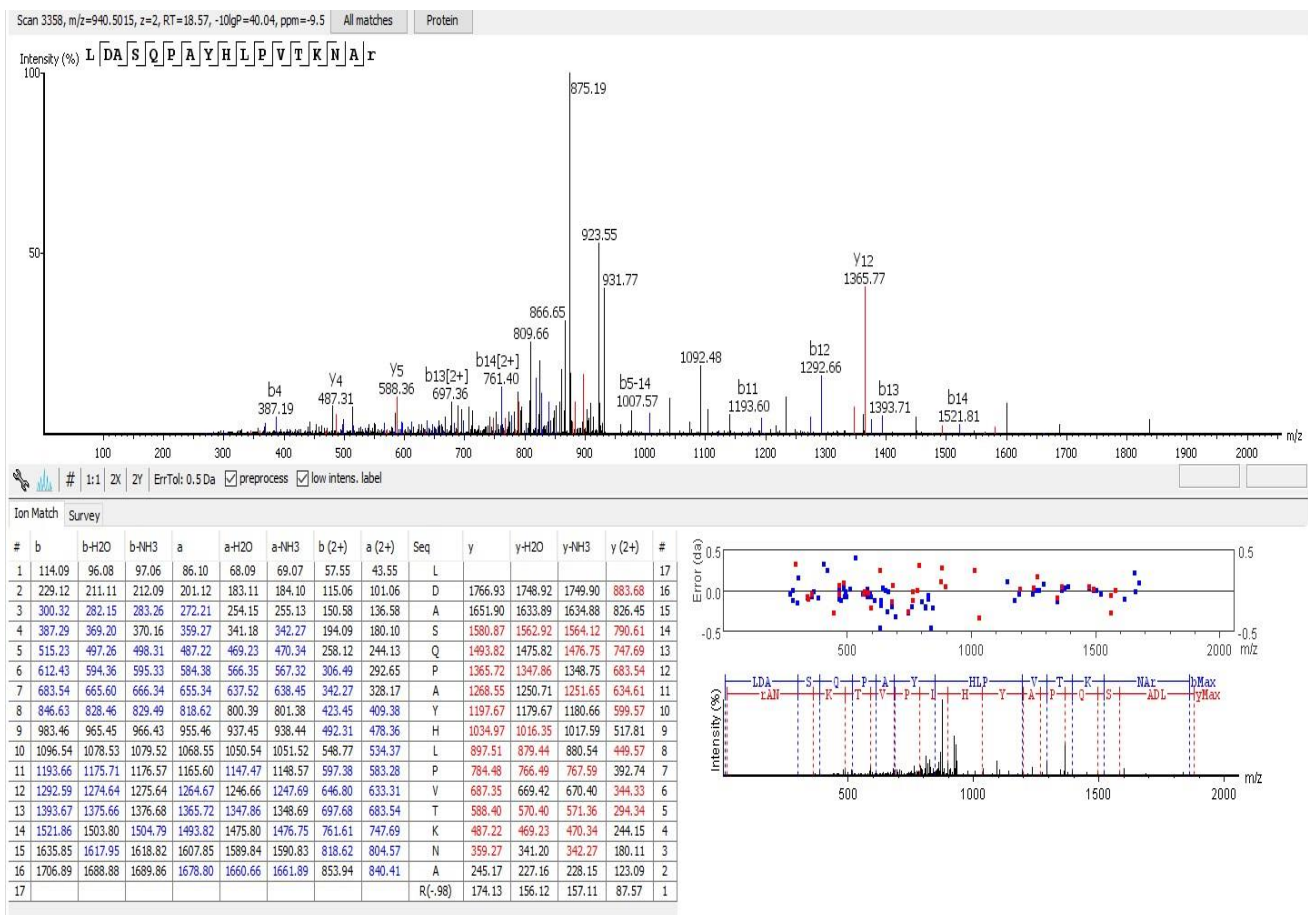




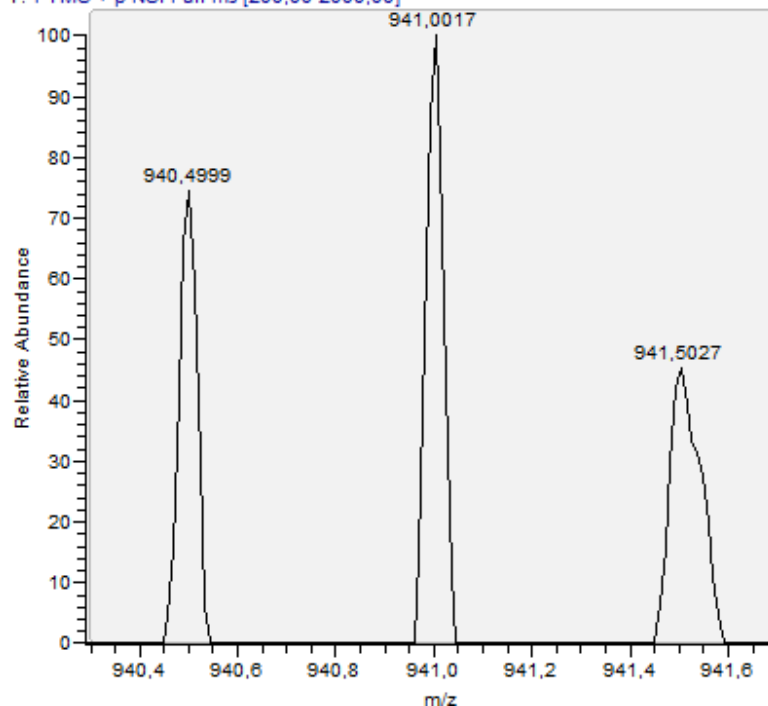
Orceus_peptidomica #1902 RT: 12.81 AV: 1 NL: 6,23E6
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]

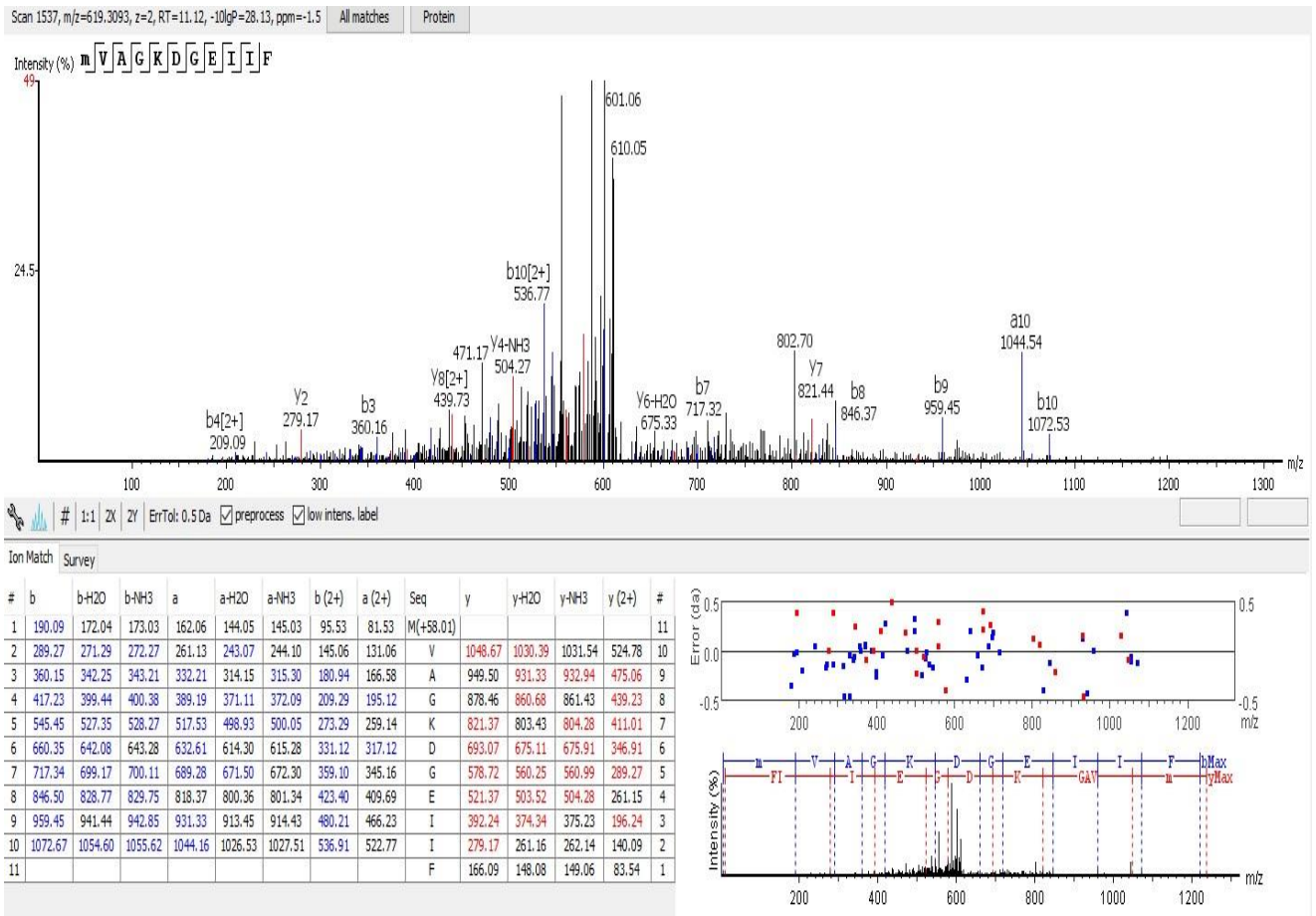




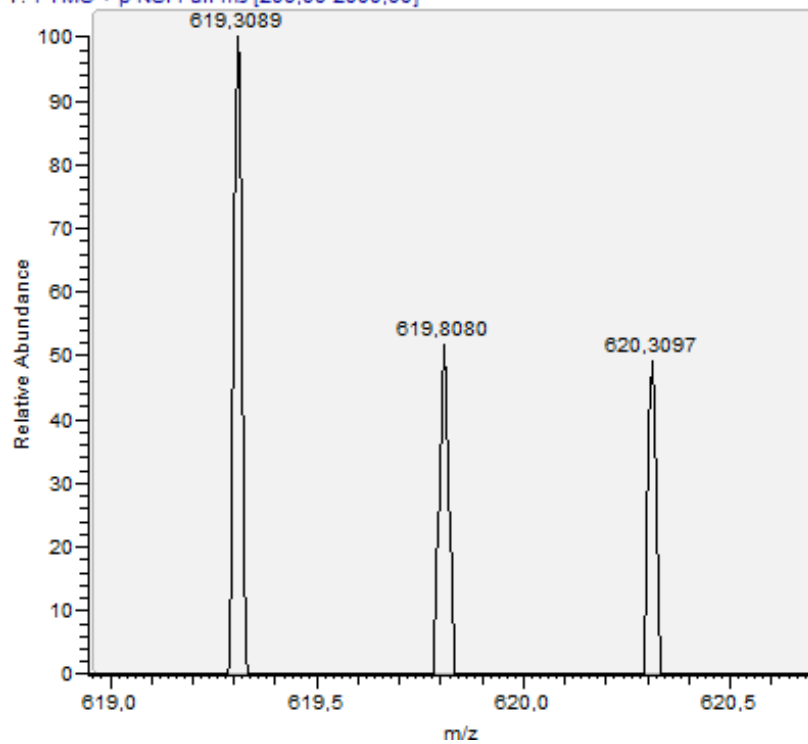


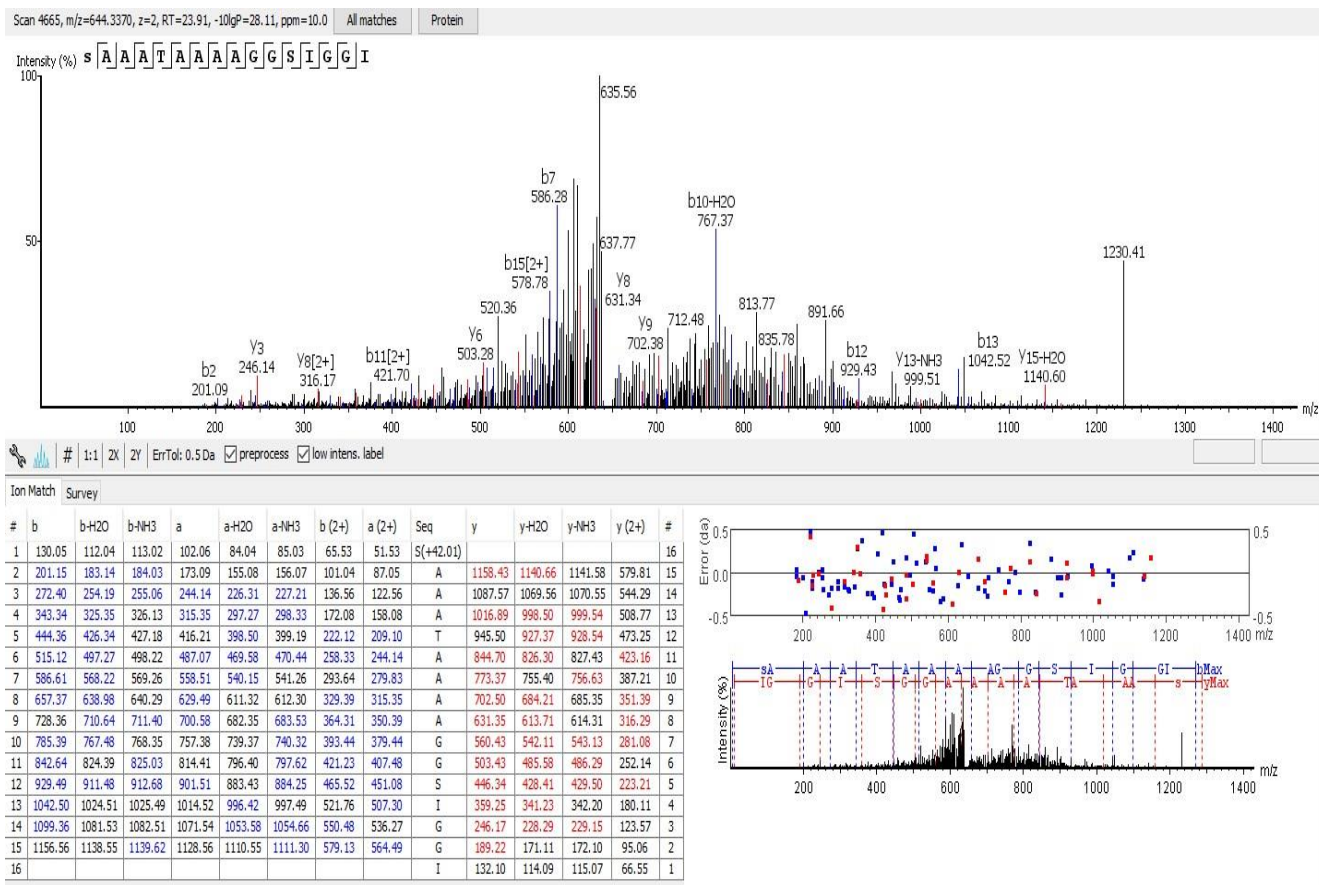
Oreus_peptidomics #3359 RT: 18.57 AV: 1 NL: 1,42E6
T: FTMS + p NSI Full ms [200.00-2000.00]



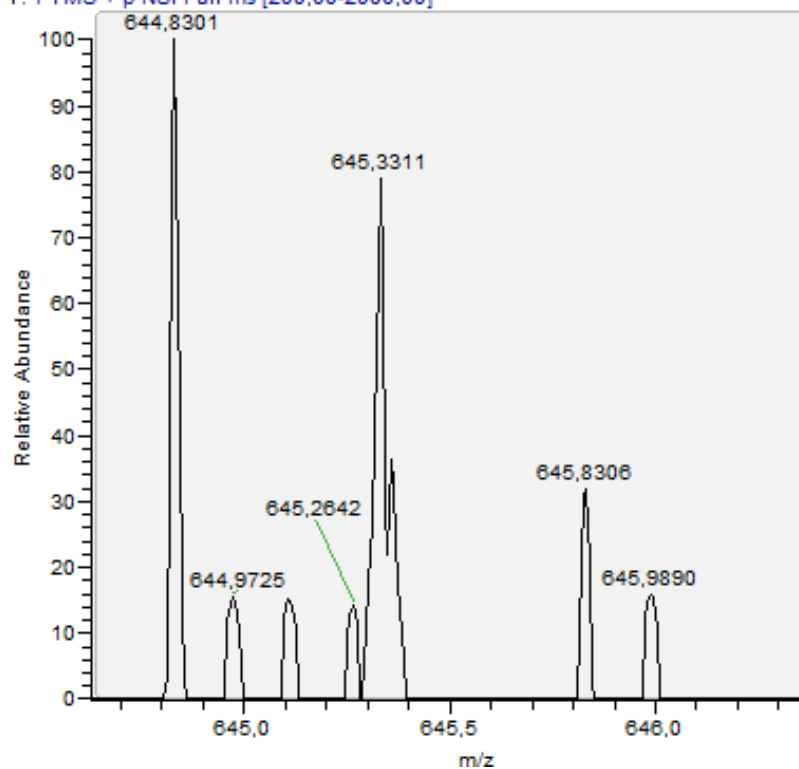


Orcus_peptidomica #1536 RT: 11.11 AV: 1 NL: 1,45E4
T: FTMS + p NSI Full ms [200,00-2000,00]





Oreus_peptidomica #4666 RT: 23.91 AV: 1 NL: 1,07E6
T: FTMS + p NSI Full ms [200,00-2000,00]



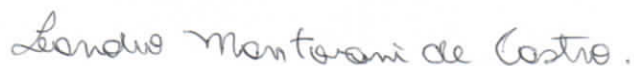
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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:



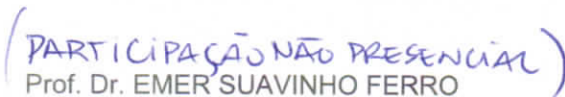
Prof. Dr. LEANDRO MANTOVANI DE CASTRO

Instituto de Biociências / Câmpus do Litoral Paulista da UNESP



Profa. Dra. CRISTIANE ANGÉLICA OTTONI

Instituto de Biociências - Campus do Litoral Paulista / UNESP



Prof. Dr. EMER SUAVINHO FERRO

Instituto de Ciências Biomédicas / USP

São Vicente, 13 de março de 2019