



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
CAMPUS IV – CHAPADINHA - MA
CURSO DE AGRONOMIA**



**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE PEPTÍDEOS
COM POTENCIAL CONTRA PRAGAS AGRÍCOLA**

STEPHANY SAELLY OLIVEIRA SILVA

Chapadinha – MA
2017



STEPHANY SAELLY OLIVEIRA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE PEPTÍDEOS
COM POTENCIAL CONTRA PRAGAS AGRÍCOLA**

Monografia apresentada ao Curso de Agronomia da Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, como pré-requisito para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Chapadinha - MA
2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Silva, Stephany Saelly Oliveira.

Identificação e caracterização estrutural de peptídeos com potencial contra pragas agrícolas / Stephany Saelly Oliveira Silva. - 2017.

21 f.

Orientador(a): Claudener Souza Teixeira.

Monografia (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, 2017.

1. Alinhamento global. 2. Bioinseticida. 3. Ligação peptídica. I. Teixeira, Claudener Souza. II. Título.

STEPHANY SAELLY OLIVEIRA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE PEPTÍDEOS
COM POTENCIAL CONTRA PRAGAS AGRÍCOLA**

Monografia, apresentada a Universidade Federal do Maranhão, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira
Centro de Ciências Agrárias e Ambientais
Universidade Federal do Maranhão-UFMA
Orientador

Bióloga. Karla Lilian Rodrigues Batista
Centro de Ciências Agrárias e Ambientais
Universidade Federal do Maranhão-UFMA
Examinador

Prof. Dr. Wellington Ferreira do Nascimento
Centro de Ciências Agrárias e Ambientais
Universidade Federal do Maranhão-UFMA
Examinador

Dedico este trabalho aos meus pais Francisco das Chagas Candeira da Silva e Ana Paula de Carvalho Oliveira e aos meus avós Antônio de Paulo Costa de Oliveira (*in memoria*) e Maria Edite Carvalho de Oliveira.

Agradecimentos

Quero deixar neste registro, meu sincero agradecimento às várias pessoas que impulsionaram minha caminhada durante esses anos nesta graduação.

Agradeço primeiramente a Jeová Deus, por ser essencial em minha vida, ser meu guia, socorro presente na hora da angústia, por ser misericordioso e benevolente mesmo sem eu merecer.

Agradeço aos meus pais Ana Paula e Francisco Candeira, principalmente minha mãe que acreditou mais em mim do que eu mesma, que foi minha base, meu chão, minha fortaleza nos momentos de dificuldade, que é o meu maior exemplo, obrigada por ser luz na minha vida, pelo incentivo, pela força, amor e paciência, minha eterna gratidão ao amor que você tem por mim. Gratidão ao meu pai pela ajuda, amor, ensinamentos, carinho e companheirismo.

Ao meu querido orientador Claudener Teixeira com muita paciência, dedicação, e trabalho dedicou seu valioso tempo para me orientar e compartilhar seus conhecimentos, minha sincera gratidão.

A minha professora de estágio Izumy Pinheiro pelos ensinamentos repassados e paciência.

Gratidão aos meus irmãos Andrew Maklay pelo companheirismo, incentivo e por me ajudar sempre que preci sei, a Joanna Viana pelos conselhos, irmandade, carinho, hombridade e por sempre me apoiar nos momentos difíceis, a minha sobrinha Julia Viana que é e será sempre um dos motivos da minha alegria, as minhas tias amadas e que são referência em minha vida Meire Maciel e Leila Viana pelo amor e incentivo de sempre a minha sincera gratidão, ao meu cunhado Edinaldo Nascimento, ao meu tio que é meu segundo pai Edmilson Maciel, a minha vizinha amada Maria Edite pelas orações, amor e carinho no decorrer não somente dessa jornada acadêmica, mas durante minha vida.

A minha melhor amiga Lorena Mesquita que ao longo de anos de amizade sempre foi uma das minhas maiores incentivadoras, e esteve ao meu lado em momentos bons e ruins. A minha amiga que a agronomia me deu Allana Tereza foi minha companheira de curso e que sempre me ajudou no decorrer dessa jornada. Ao meu amigo Cadu Catanhede que além de chefe se tornou um grande amigo, parceiro e irmão pra mim. As minhas amigas amadas Beatriz Oliveira , Rafaela Nilo e Joana Machado que mesmo

longe sempre me apoiaram, aconselharam e não me deixaram desistir. Aos meus amigos queridos Elício Lopes, Henrique Aurélio, Alberto Lima (calango), Luis Felipe Balbino, Jonathan Ribeiro, Vanessa Glenda, Gabriela Rodrigues, Diana Araújo, Beatriz Soares, Leandro Carvalho, Sabrina Andrade, Suellen Santos, Noelya Oliveira, Mabson de Jesus e, a minha sincera gratidão a cada um de vocês.

RESUMO

Peptídeos são as moléculas que se formam a partir da ligação de aminoácidos podendo variar de acordo com o número de aminoácidos presentes. Atualmente, vários trabalhos têm sido descritos sobre o potencial inseticida dos peptídeos de espécies de plantas, fungos, bactérias e animais, os estudos se intensificaram à medida que muitas espécies tem apresentado resistência a inseticidas químicos, novas pragas tem surgido, no qual esses bioinseticidas tem sido um método alternativo, sustentável e eficiente em combater pragas e doenças que atingem as culturas sem agredir o meio ambiente. Com base nestas informações, o presente estudo visa identificar e analisar as sequências primária de peptídeos que tem efeito inseticida sobre algumas pragas agrícolas. Foi feito um levantamento bibliográfico dos peptídeos com atividade contra pragas agrícola, depois se realizou um levantamento de mecanismos de ação desses peptídeos e foi feita uma comparação das sequencias primárias dos peptídeos encontrados e em seguida foram avaliadas as estrutura tridimensionais desses peptídeos depositadas em bancos de dados. O presente trabalho identificou 17 peptídeos com atividade contra pragas agrícolas descrito na literatura. O alinhamento das sequências primárias não mostrou regiões conservadas nas diferentes sequências alinhadas, indicando assim, que esses peptídeos apresentam diferentes mecanismos de ação para diferentes patógenos. Porém ainda se faz necessário mais estudos para se compreender melhor os efeitos do uso desses peptídeos no meio agrícola.

Palavras-chave: Ligação peptídica. Bioinseticida. Alinhamento global.

ABSTRACT

Peptides are the molecules that form from the binding of amino acids and can vary according to the number of amino acids present. Nowadays, several works have been described on the insecticidal potential of peptides of plant, fungal, bacterial and animal species, studies have intensified as many species has shown resistance to chemical insecticides, new pests have emerged, in which these bioinsecticides have been an alternative, sustainable and efficient method to combat pests and diseases that hit crops without harming the environment. Based on this information, the present study aims to identify and analyze the primary peptide sequences that have an insecticidal effect on some agricultural pests. A bibliographic survey of the peptides with activity against agricultural pests was carried out. A survey of the mechanisms of action of these peptides was carried out and a comparison was made of the primary sequences of the peptides found and then the three - dimensional structure of these peptides deposited in databases. The present work identified 17 peptides with activity against agricultural pests described in the literature. The alignment of the primary sequences did not show conserved regions in the different aligned sequences, thus indicating that these peptides present different mechanisms of action for different pathogens. However, further studies are needed to better understand the effects of the use of these peptides in the agricultural environment.

Keywords: Peptide bond. Bioinseticide. Global alignment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Alinhamento global das sequencias dos peptídeos identificados.....	8
Figura 2- Alinhamento global das sequências dos peptídeos esculetina.....	9
Figura 3- Alinhamento global das sequências dos peptídeos licotoxina.....	9
Figura 4- Alinhamento global das sequências dos peptídeos Mu agatoxina.....	10
Figura 5- Alinhamento global das sequências dos peptídeos parigidina br.	10
Figura 6- Estrutura tridimensional do peptídeo Esculetina	11
Figura 7- Estrutura tridimensional do peptídeo Mu-Agatoxina	12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela de organismos e atividade peptídicas.....6

Tabela 2. Tabela da sequência primária dos organismos encontrados.....7

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	4
3. METODOLOGIA	5
3.1. Levantamento bibliográfico dos peptídeos	5
3.2. Análise da sequência de aminoácidos	5
3.3. Análise da estrutura tridimensional dos peptídeos	5
4. RESULTADOS	5
4.1. Levantamento bibliográfico	6
4.2. Análise da sequência de aminoácidos	7
4.2.1 Esculetina-1	9
4.2.2 Lycotoxina-1	9
4.2.3 Mu-Agatoxina	9
4.2.4 Pariguidina-br	10
4.3. Análise da estrutura tridimensional dos peptídeo	11
5. DISCUSSÃO.....	12
6. CONCLUSÃO	16
7. REFERÊNCIAS	16

1. INTRODUÇÃO

A palavra peptídeo tem origem grega que significa: (πεπτός, peptós "digerido", derivado de πέσσειν, péssein "para digerir"). Peptídeos são as moléculas que se formam a partir da ligação de aminoácidos. O termo peptídeo refere-se à união de dois ou mais aminoácidos por intermédio de ligações peptídicas, que ocorrem entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amina de outro. (NELSON, 2002). Pode ocorrer variação de acordo com o número de aminoácidos presentes na molécula podendo ser classificados como: dipeptídeos, tripeptídeos, tetrapeptídeos, oligopeptídeos e polipeptídios (WARKEN, 2012).

Os primeiros relatos de peptídeos ativos e sua organização química foram encontrados na década de 1950, devido a número enorme de espécies que apresentam peptídeos e aos poucos estudos sobre essa macromolécula, foi visto a necessidade de aprimorar os estudos para análise, purificação, isolamento e quantificação de peptídeos para estudos mais avançados que pudessem contribuir para diversas áreas como farmacologia, fisiologia, bioquímica, química, física e agronomia (MACHADO et al, 2004). Os peptídeos possuem múltiplas finalidades tais como: regulação da atividade de vários sistemas (HENRIQUES et al, 2006), modulação da síntese de DNA (MACHADO et al, 2004), transporte de aminoácido (KREHBIEL, 2003) participação no sistema imunológico (SANTIN, 2005), potencial antifúngico (COSTA, 2014), bactericida (LI et al, 2013), utilizados no estudo da estrutura e função das proteínas (SHPAKOV et al 2017) e ferramenta agrícola no combate à pragas e insetos de plantações (WHESTONE, 2006).

Desde a antiguidade os problemas fitossanitários têm causado inúmeros prejuízos à agricultura. Os danos causados pelos insetos às plantas são variados e podem ser observados em todos os órgãos vegetais. Um inseto só pode ser considerado praga quando atinge um determinado índice de dano econômico para a cultura plantada. (EMPRAPA, 2017). A abertura de fronteiras agrícolas, modificações no ecossistema, além de maior demanda em produção de alimentos que fez com que as pragas se expandissem pelo mundo, causando enormes estragos, tanto para pequenos como para grandes produtores. Na evolução tecnológica da agricultura, o avanço da monocultura, associado à redução da rotação de culturas, desencadeou um aumento da incidência de pragas e

doenças nas lavouras, acarretando, assim, o desenvolvimento de técnicas para a proteção das culturas (BORGES, 1993). Algumas pragas que antes não existiam em nosso país hoje são comuns, podendo algumas outras entrar e se instalar, afetando assim o valor agronômico, diminuir a qualidade e quantidade do produto, aumentar o custo de controle entre outros fatores. O desafio da vigilância sanitária no Brasil é grande, dada sua vasta fronteira com países vizinhos, com mais de 15,5 mil km de extensão, sendo uma parte por linha seca, outra ao longo de rios, lagos e canais (EMBRAPA, 2016).

A Embrapa Gestão Territorial, com o suporte de sua base de dados georreferenciados, tem trabalhado para identificar as prováveis vias de ingresso das pragas no País e por onde é mais fácil ocorrer sua disseminação, como rodovias federais e estaduais, apoiando a prevenção da entrada e do estabelecimento de pragas quarentenárias no Brasil. (EMPRAPA, 2016). Visando combater essas pragas e diminuir o prejuízo causado por elas é importante a utilização dos defensivos químicos e a tendência é aumentar a procura à medida que os países em desenvolvimento for aumentando a sua produção agrícola para satisfazer as necessidades nacionais.

O prejuízo causado por essas pragas diretas e indiretamente é de bilhões por ano em perdas na produção e produtividade (EMPRAPA, 2016) As perdas do agronegócio brasileiro podem chegar a R\$ 55 bilhões ao ano. (SAGAYAMA, et al. 2015.) Para reduzir esses problemas, deve-se buscar o uso de outros métodos de controle mais modernos e menos tóxicos. Além disso, é necessária a adoção de práticas que visem diminuir a resistência genética causada pelo uso repetido dos mesmos mecanismos de ação.

Para melhor entendimento de como funcionam alguns métodos alternativos exemplo dos peptídeos, novas tecnologias como o uso da bioinformática que segundo ARAÚJO et al (2008) permite reconhecer sequências de genes através do alinhamento global e local; prediz a configuração tridimensional de proteínas; identifica inibidores de enzimas; organiza e relaciona informação biológica; agrupa proteínas homólogas; estabelece árvores filogenéticas; analisa experimentos de expressão gênica, entre outros. Essa nova tecnologia através da biologia molecular tem sido de grande importância para o conhecimento científico, contribuindo assim para melhores resultados encontrados.

Visando a grande colaboração e potencial de aplicação química e biológica que os peptídeos possuem para os estudos científicos a atividade que eles exercem nos

defensivos químicos, é de suma importância identificarmos quais peptídeos são mais atuantes, qual grupo pertencem, seu mecanismo de ação sobre determinadas pragas que possuem estudos referenciados na literatura.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Fazer levantamento dos peptídeos que apresentam atividades contra pragas agrícolas já descritos na literatura.

2.2 Objetivos Específicos

Identificar os mecanismos de ação desses peptídeos;

Comparar as sequências primárias desses peptídeos;

Avaliar as estrutura tridimensionais desses peptídeos depositadas em bancos de dados.

3. METODOLOGIA

3.1 Levantamento bibliográfico dos peptídeos.

Inicialmente foi realizado um levantamento bibliográfico dos peptídeos com aplicações em práticas agrícolas descrito nos principais bancos de dados de periódicos nacionais e internacionais (PubMed, Scielo e LILACS). A partir desse levantamento, foi construído um arquivo contendo a identificação dos peptídeos, origem e tipo de aplicação agrícola para posteriores análises.

3.2 Análise da sequência de aminoácidos

A partir do levantamento bibliográfico, foram realizadas buscas no banco de dados (Uniprot) dos peptídeos que possuíam sequência primária depositada. Os peptídeos que apresentaram sequências depositadas foram submetidos ao alinhamento global usando o software Multalin (CORPET, 1988.) e alinhamento local usando o software Blast (ATSCHUL et al, 1990).

3.3 Análise da estrutura tridimensional dos peptídeos

Os peptídeos que apresentaram estrutura tridimensional depositada no banco de dados Protein Data Bank (PDB) foram analisados usando o software Pymol (DELANO, 2003).

4. RESULTADOS

4.1 Levantamento bibliográfico

Após o levantamento bibliográfico foram identificados 17 peptídeos que apresentam efeitos contra pragas agrícolas publicados entre os anos de (2003 a 2016) disponíveis nas principais plataformas de trabalhos científicos da web. Conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Identificação, espécie representativa, e atividade biológica dos peptídeos encontrados no levantamento bibliográfico.

Identificação do peptídeo	Espécie que apresenta o peptídeo	Organismo que o peptídeo apresenta atividade
Esculentin-1	<i>Pelophylax esculentus</i>	Bactérias e fungos
Esculentin-2	<i>Pelophylax saharicus</i>	Bactérias e fungos
Jaburetox e Jbure-I	<i>Canavalia ensiformis</i>	Insetos (insetos que apresentam catepsina como enzimas digestivas)
Kalata B1	<i>Oldelandia affinis</i>	Insetos (especialmente larvas de lepidópteros) Molusco (<i>Pomacea caniculata</i>)
Lycotoxin-1	<i>Lycosa carolinensis</i>	Bactérias e fungos
Lycotoxin-2	<i>Lycosa carolinensis</i>	Bactérias e fungos
MG-CRP-1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Fungos
Mu-agatoxin-AA1D	<i>Agelenopsis Aperta</i>	Mariposa
Mu-agatoxin-AA1E	<i>Agelenopsis Aperta</i>	Mariposa
Mu-ctenitoxin-PN1A	<i>Phoneutria Nigriventer</i>	Insetos
Mu-agatoxin-AA1A	<i>Agelenopsis aperta</i>	Insetos
Mu-agatoxin-AA1C	<i>Agelenopsis aperta</i>	Insetos
Mu-agatoxin-AA1B	<i>Agelenopsis aperta</i>	Insetos
OAP-1	<i>Selenotypus plumipes</i>	Insetos
PA1b (PEA ALBUMIN 1)	<i>Pisum sativum</i>	Insetos
Parigidin-br1	<i>Palicourea rígida</i>	Insetos (lepdopteras)
Parigidin-br2	<i>Palicourea rígida</i>	Insetos (lepdopteras)

4.2 Análise da sequência de aminoácidos

Para verificar se os peptídeos identificados na tabela 1 apresentavam sequências primária depositada em banco de dados, foram realizadas buscas no banco de dados on-

line Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), onde dos 17 peptídeos, 14 apresentaram sequência primária depositada no Uniprot conforme descrito na tabela 2. Dentre os peptídeos identificados, 10 são peptídeos de animais e 04 de vegetais, conforme descritos da tabela 1.

Tabela 2. Sequência primária dos organismos encontrados.

Identificação do peptídeo	Sequência Primária
MG-CRP-1	<i>GFGCPNNYQCHRHCKSIPGRCCGGYCGGWHRLRCTCYRCGG RREDVEDIFDIFDNEAADRF</i>
ESCULENTIN-1	<i>GIFSKLGRKKIKNLLISGLKNVGKEVGMDVRTGIDIAGCKIK EC</i>
ESCULENTIN-2	<i>GIFSKFGRKKIKNLLISGLKNVGKEVGMDVVRTGIDIAGCKIK GEC</i>
JABURETOX e JBURE-I	<i>KIRLGDTDLIAEIE</i>
LYCOTOXIN-2	<i>IWLTALKFLGKHAACKHLAKQQLSKL</i>
LYCOTOXIN-2	<i>KIKWFKTMKSIKFIKAKEQMCKHLGGE</i>
OAP-1	<i>MIFLLPSIISVMLLAEPVLMGDTEDADLMEMVQLSRPFFNPII RAVELVELREERQRDC GHLHDPCPNDRPGHRTCCIGLQCRYGKCLVRVGR</i>
MU-AGATOXIN- AA1A	<i>ECVPENGHCRDWDYDECCEGFYCSCRQPPKCICRNNN</i>
MU-AGATOXIN- AA1B	<i>ECATKNKRCADWAGPWCCDGLYCSCRSYPGCMCRPSS</i>
MU-AGATOXIN- AA1C	<i>ADCVGDGQRCADWAGPYCCSGYYCSCRSMPCRCRSDS</i>
MU-AGATOXIN- AA1D	<i>ACVGENQQCADWAGPHCCDGYYCTCRYFPKCICRNNN</i>
MU-AGATOXIN- AA1E	<i>ACVGENKQCADWAGPHCCDGYYCTCRYFPKCICRNNN</i>
PARIGIDIN-br1	<i>GGSVPCGESCVFIPCITSLAGCCKNKVCYYD</i>

PARIGIDIN-br2	GGSVPCGESCVFIPCLTSLAGCCKNKVCYYN
---------------	---------------------------------

De todos os organismos identificados da tabela 1, a espécie *Agelopsis aperta*, *Lycosa Carolinensis* e *Palicourea rígida* apresentaram mais de um peptídeo depositado no banco de dados, caracterizando assim, isoformas que podem ter sido identificados por técnicas de biologia molecular.

Os peptídeos identificados no banco de dados foram submetidos a um alinhamento global (figura 1) para tentar identificar possíveis sequências específicas conservadas na sequência primária, que seriam responsáveis pela atividade biológica de cada peptídeo.

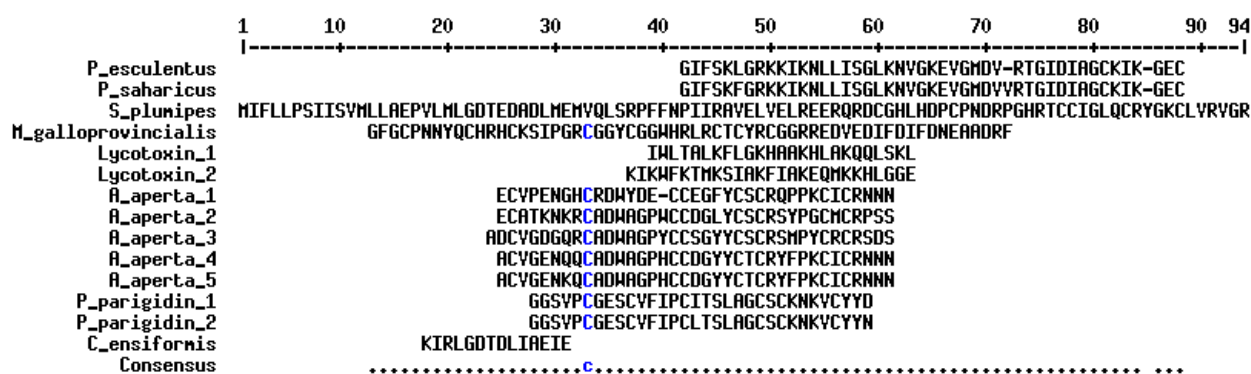


Figura 1. Alinhamento global das sequências dos peptídeos identificados.

Como observado na figura 1, não foi possível identificar regiões conservadas no alinhamento global entre os peptídeos dos organismos descritos na tabela 2, se identificou apenas um aminoácido (cisteína) em comum com algum dos peptídeos alinhados indicando que a atividade contra pragas agrícolas pode ser devido a diferentes tipos de mecanismos de ação.

Visto que, no alinhamento primário foram identificadas algumas regiões conservadas, o alinhamento foi dividido em grupos, com os peptídeos dos organismos filogeneticamente mais próximos no intuito de entender como o mecanismo de ação de cada classe de peptídeo.

4.2.1 Esculetinas

O primeiro grupo encontrado foi o Esculetina que é um peptídeo antimicrobiano que contém 46 aminoácidos atuante em micróbios e fungos de plantas no qual é extraído da pele de um anfíbio *Rana esculentus* onde sua principal atuação é contra o vírus do mosaico do couve-flor. Nesse grupo encontramos duas espécies distintas a *Phelophylax esculentus* e *Phelophylax saharicus* ambas com 46 aminoácidos porém com diferença em apenas um aminoácido

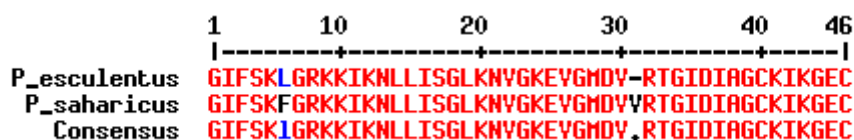


Figura 2. Alinhamento local das sequências dos peptídeos esculetina.

O alinhamento desses peptídeos apresentou uma similaridade de 97,78% entre os dois peptídeos, com uma substituição não conservativa da esculetina de *P. esculentus* que apresenta um resíduo de Leu₆ por Phe₆ na espécie de *P. saharicus*. Além disso, foi possível observar a adição de um resíduo de Val na posição 31 na espécie de *P. saharicus*.

4.2.2 Lycotoxina-1

O segundo grupo alinhado foi o das Lycotoxin-1 que são péptidos anfipáticos α -helicoidais que produzem efeitos antimicrobianos que abrange 27 aminoácidos no qual a principal fonte é o veneno da aranha *Lycosa carolinensis* que engloba compostos tóxicos para insetos e também atua como agentes biológicos para o controle de pragas agrícolas resistentes a inseticidas.

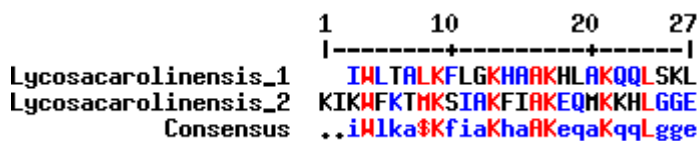


Figura 3. Alinhamento local das sequências dos peptídeos licotoxina.

O alinhamento desses dois peptídeos apresentou uma similaridade de 28%, sendo conservado apenas 7 resíduos de aminoácidos na sequência primária desses peptídeos.

4.2.3 Mu-Agatoxina

O terceiro grupo de peptídeos é chamado de Mu-Agatoxina que é um peptídeo inseticida ativo de 38 aminoácidos que contem resíduos do veneno da tarântula *Agelopsis aperta*. Esse peptídeo é agronomicamente importante principalmente contra a lagarta do algodão *Helicoverpa armigera*, é equipotente devido aos piretrodos sintéticos que atua sinergicamente com inseticidas neonicotinóides.

	1	10	20	30	38																																
	-----+-----+-----+-----+-----																																				
A_aperta_1	E	C	V	P	E	N	G	H	C	R	D	W	Y	D	E	-	C	C	E	G	F	Y	C	S	C	R	Q	P	P	K	C	I	C	R	N	N	N
A_aperta_2	E	C	A	T	K	N	K	R	C	A	D	W	A	G	P	H	C	D	G	L	Y	C	S	C	R	S	Y	P	G	M	C	R	P	S	S		
A_aperta_3	A	D	C	V	G	D	G	Q	R	C	A	D	W	A	G	P	Y	C	S	G	Y	C	S	C	R	S	M	P	Y	C	R	C	R	S	D	S	
A_aperta_4	A	C	V	G	E	N	Q	Q	C	A	D	W	A	G	P	H	C	D	G	Y	Y	C	T	C	R	Y	F	P	K	C	I	C	R	N	N	N	
A_aperta_5	A	C	V	G	E	N	K	Q	C	A	D	W	A	G	P	H	C	D	G	Y	Y	C	T	C	R	Y	F	P	K	C	I	C	R	N	N	N	
Consensus	.e	C	v	.	e	n	.	.	C	a	D	W	a	g	p	.	C	C	.	G	.	Y	C	s	C	R	.	.	P	k	C	i	C	R	n	n	n

Figura 4. Alinhamento local das sequências dos peptídeos Mu agatoxina.

O alinhamento desses cinco peptídeos apresentou uma similaridade de 60%, sendo conservado apenas 7 resíduos de aminoácidos na sequencia primária desses peptídeos.

4.2.4 Parigidina-br

O último alinhamento realizado foi o grupo das parigidinas que são peptídeos que contem 32 aminoácidos extraídos da espécie *Agelopsis aperta*, o seu veneno provou ser uma fonte rica de mini-proteínas inseticidas potentes que causam paralisia ou letalidade de insetos através da modulação de canais iônicos, receptores e enzimas atuando assim como bioinseticidas principalmente contra lepidópteras.

	1	10	20	30	32																											
	-----+-----+-----+-----																															
P_parigidin_1	G	G	S	V	P	C	G	E	S	C	V	F	I	P	C	I	T	S	L	A	G	C	S	C	K	N	K	V	C	Y	Y	D
P_parigidin_2	G	G	S	V	P	C	G	E	S	C	V	F	I	P	C	L	T	S	L	A	G	C	S	C	K	N	K	V	C	Y	Y	N
Consensus	G	G	S	V	P	C	G	E	S	C	V	F	I	P	C	i	T	S	L	A	G	C	S	C	K	N	K	V	C	Y	Y	#

Figura 5. Alinhamento local das sequências dos peptídeos parigidina br.

O alinhamento desses peptídeos apresentou uma similaridade de 93,75% entre os dois peptídeos, com duas substituições conservativas da Ileu₁₆ por Leu₁₆ e Asp₃₂ por Asn₃₂.

4.3. Análise da estrutura tridimensional dos peptídeos

De todas as estruturas que apresentaram sequência primária no banco de dados, apenas os peptídeos esculetina (Código PDB: 5XDJ) e Mu-Agatoxina (Código PDB: 1IET) apresentaram estrutura tridimensional depositado no banco de dados Protein Data Bank (PDB).

A estrutura tridimensional da esculetina (Código PDB: 5XDJ) figura 6, apresenta-se como um peptídeo formado por uma α -hélice de 46 resíduos de aminoácidos.



Figure 6. Estrutura tridimensional do peptídeo Esculetina (Código PDB: 5XDJ).

A estrutura tridimensional da Mu-agatoxina (Código PDB: 1IET) figura 7, apresenta-se como um peptídeo formado por duas fitas betas antiparalelas e estruturas de conexão entre as fitas betas. Esse tipo de estrutura tridimensional forma um motivo chamado de β -hair pin (beta-broche de cabelo).

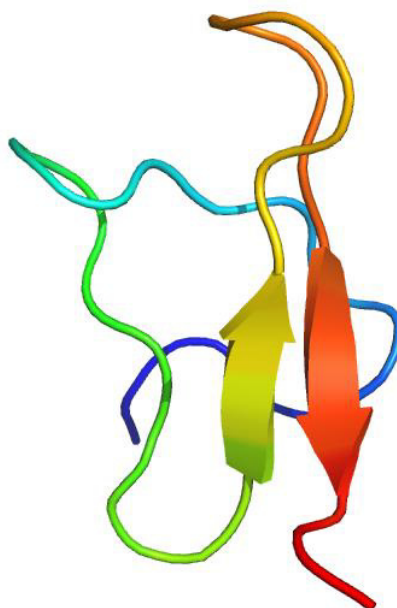


Figure 7. Estrutura tridimensional do peptídeo Mu-Agatoxina (Código PDB: 1IET).

5. DISCUSSÃO.

Devido aos riscos que os defensivos químicos provocam ao homem e a natureza, o uso de peptídeos como bioinseticidas tem sido uma alternativa viável para combater pragas e doenças. Os peptídeos têm sido utilizados por ser um método alternativo e sustentável para o combate de patógenos, seja através da síntese natural ou da síntese artificial, no qual vem apresentando resultados satisfatórios na indústria agrícola e alimentar indicando um futuro promissor para a aplicação extensiva dessas moléculas (KEYMANESH, K. 2009). A urease e canatoxina os principais exemplos de proteínas extraídas da planta *Canavalia ensiformis* que tem função peptídica atuante contra alguns insetos, exemplo besouros, lagartas e percevejos, pois quando a proteína entra em contato com as enzimas do trato intestinal do inseto ela degrada e forma fragmentos de peptídeos entomotóxico. A urease ao ser fragmentada forma o peptídeo chamado jaburetox que ira combater diretamente no inseto-alvo.

De acordo com Plan et al (2008) os peptídeos Kalatas tabela 1 extraídos das plantas *Oldenlandia affinis* e *Viola Odorata* atuam no molusco aruá ou caracol da maçã dourada (*Pomacea canaliculata*) que é uma praga que atinge geralmente as plantações de arroz inundado. A aplicação desses peptídeos como moluscicidas tiveram um efeito

mais eficiente que o inibidor da cadeia transportadora de elétrons rotenona, utilizado comumente como praguicida comercial.

A aplicação desses pesticidas sintéticos vem aumentando a resistência das pragas, o que faz com que os produtores tenham que aumentar as doses das substâncias ou adquirir outros insumos que apresente um maior efeito a praga e conseqüentemente elevando a toxicidade do produto (ALTIERI; MASERA, 1997). Para isso, o uso dos peptídeos seria uma saída, seu uso se daria como uma alternativa para combater pragas resistentes a insumos sintéticos, sem aumentar a toxicidade do produto final da agricultura.

Conforme Viegas (2001) os inseticidas sintéticos mais utilizados inclui ésteres organofosforados, carbamatos, piretróides sintéticos e hidrocarbonetos clorados. Porém além das resistências adquiridas pelas espécies tais inseticidas geram resíduos que ficam no ambiente e ocasionam intoxicação em alguns animais, além de aumentar o custo do produtor, resultando assim em prejuízo no plantio.

Além de ser uma alternativa no uso exacerbado de inseticidas sintéticos, os peptídeos apresentam importância por ter uma ação específica para um grupo de pragas. Prova disso é o alinhamento (figura 1) de todas as sequências de peptídeos depositado no uniprot, do qual não foi possível identificar uma sequência de aminoácido comum no alinhamento global, indicando que os peptídeos apresentam diferentes formas de ação contra diferentes patógenos.

Alguns peptídeos atuam diretamente no sistema nervoso ou no sistema digestivo do inseto-alvo sendo eficazes e apresentando rápida ação. Um dos primeiros peptídeos estudados foi o da espécie *Bacillus thuringiensis* (Bt) extraído de uma bactéria, que atua contra insetos (lepidópteros e dípteros) e contra o fungo *Eauvaria bassiana*. O peptídeo da pele do anfíbio *Rana esculentus* denominado esculentina-1 atuante em micróbios e fungos de plantas no qual sua principal atuação é contra o vírus do mosaico do couve-flor. Todos esses métodos naturais visam combater os insetos, e também reforça o uso potencial de cada um como biopesticidas.

As plantas produzem um alto número de moléculas tóxicas como parte da resposta à defesa (NAWROT et al 2014), incluindo péptidos antimicrobianos (AMP), e peptídeos de penetração de células (CPPs) que possuem a capacidade de

translocar através das membranas celulares matando os agentes patogênicos por interação e permeabilização com as células do alvo. Um mesmo organismo pode produzir mais de um peptídeo para combater diferentes pragas agrícolas, um dos exemplos de peptídeo derivado de plantas é a Jaburetox que é extraída das sementes de *Canavalia ensiformis*, onde esse peptídeo mostrou potente atividade inseticida contra a lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*, a barata *Blatella germânica*, estudos também comprovaram sua atuação no barbeiro (*Rhodinus prolixus*), percevejo verde da soja (*Nezara viridula*), percevejo marchador da maçã do algodão (*Dydsdercus peruvianus*).

Outro peptídeo que mostrou potencial inseticida é o PA1b isolado da ervilha (*Pisum sativum*) que atua contra certos insetos, como o gorgojo de cereais (gênero *Sitophilus*), os mosquitos *Culex pipiens*, *Aedes aegyptii*, e certas espécies de pulgões da ordem Homoptéros. Conforme GRESSENT (2011) PA1b é um péptido que tem muitos atributos para uso em escala industrial: é extraído de uma leguminosa, é um péptideo (adequado para uso em plantas transgênicas) e pode suportar muitas etapas de extração e purificação sem perder sua atividade.

A parigidina é um ciclotídeo que atua na interrupção da membrana do inseto-alvo, é um peptídeo isolado a partir da *Palicourea rígida* conhecida popularmente como chapéu-de-couro, gritadeira, ou bate caixa, é da família das Rubiaceae onde mostrou atividade inseticida potente contra larvas de neonatos da broca da cana (*Diatraea saccharalis*) e lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*). O grupo dos ciclotídeos Kalatas (peptídeos que possuem um nó de cisteína incorporado) são isolados das plantas Rubiaceae e Violaceae (*Oldenlandia affinis* e *Viola Odorata*) que apresenta potencial inseticida contra as larvas da *Helicoverpa armigera* (retardando o seu crescimento agindo no rompimento das células do epitélio intestinal) do caracol da maçã dourada (*Pomacea canaliculata*), (PLAN et al 2008).

Os peptídeos antimicrobianos de ação de membrana (MAMPs) são exemplos de peptídeos que tem efeitos antimicrobianos que vem sendo bastante utilizados como bioinseticidas. De acordo com WINDLEY (2012) os peptídeos de veneno de aranha estão agora sendo investigados como fontes potenciais de bioinseticidas, o seu veneno provou ser uma fonte rica de mini-proteínas inseticidas hiperserváveis que causam paralisia ou letalidade de insetos através da modulação de canais iônicos, receptores e

enzimas. Um exemplo de peptídeo isolado a partir do veneno da aranha (*Lycosa carolinensis*) no qual se produz um peptídeo α -helicoidal, onde um lado da α -hélice tem principio hidrofílico e os outros resíduos de aminoácido têm principio hidrofóbicos, indicando que essa adição de um aminoácido hidrofóbico, pode está relacionado com o mecanismo do peptídeo contra os vírus do couver-flor.

“A carga positiva do lado hidrofílico interage com membranas procarióticas carregadas negativamente e o lado hidrófobo se associa com a bicamada lipídica de membrana para permeabilizá-la.” (HUGHES et al 2012). O exoesqueleto ou cutícula dos insetos é altamente hidrofóbica devido a suas nanofibras de quitina onde sua principal função é expelir água e sujeira, o objetivo da lycotoxina é penetrar camadas hidrófobas e hidrofílicas cutícula permeabiliza-la induzindo assim a lise celular e a biossíntese do feromônio, esse peptídeo teve êxito ao ser aplicado na *Helicoverpa armigera* e *Spodoptera littoralis* eliminando os insetos em cerca de dois dias.

Outro peptídeo isolado a partir do veneno de uma tarântula (*Agelenopsis aperta*) é o Mu-Agatoxina que são neurotoxinas potententes que causam paralisia convulsiva em insetos principalmente os da ordem Díptera, essa paralisia ocorre devido a liberação instantânea de neurotransmissores que atuam diretamente no sistema nervoso do inseto-alvo, A sua forma estrutural também pode formar poros nas membranas biológicas e desencadear uma ação contra pragas agrícolas, indicando assim um possível mecanismo de ação desse peptídeo no qual é um peptídeo agronomicamente importante principalmente contra a lagarta do algodão *Helicoverpa armigera*.

Para serem comercialmente bem-sucedidos, os peptídeos de veneno devem atingir amplamente espécies de pragas, apresentar baixa toxicidade em relação a organismos não alvos, não induzir resistência nas espécies de pragas e ser barato para produzir em grandes quantidades.

Com milhões de possíveis peptídeos bioativos encontrados em muitas espécies, aplicação de técnicas moleculares para otimizar a eficácia e seletividade além de propender sustentabilidade, baixo custo, fácil manuseio, e segurança os peptídeos tem desempenhado grande papel estratégico na ação contra patógenos. Então podemos afirmar que os peptídeos são uma alternativa, disponível e eficaz para o combate de patógenos que afetam as culturas agrícolas.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho identificou 17 peptídeos com atividade contra pragas agrícolas descrito na literatura. O alinhamento local apresentou algumas regiões conservadas nas sequências primárias analisadas, porém ao ser realizado o alinhamento global das sequências primárias não foi identificado regiões conservadas nas diferentes sequências alinhadas, apenas um aminoácido em comum com algumas das sequências primárias indicando assim, que esses peptídeos apresentam diferentes mecanismos de ação para diferentes patógenos, o que pode garantir uma menor resistência desses organismos. Apesar de alguns estudos mostrarem aplicações desses peptídeos na prática agrônômica, ainda se faz necessário mais estudos para se compreender melhor os efeitos dessas macromoléculas na agricultura e também para que se possa descobrir novos peptídeos através dos inúmeros organismos disponíveis para que venham a ser utilizados de maneira eficiente no meio agrícola.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGEITEC. Árvore do Conhecimento - Cana de Açúcar. Disponível em > https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/contag01_53_711200516718.html < Acesso em: 08 de abril. 2017.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. v. 215, 403-410, 1990.

ALTIERI, M. A.; MASSERA. O desenvolvimento rural sustentável na América Latina: construindo de baixo para cima. In: ALMEIDA, J.; NAVARRO, Z. (Org.). *Reconstruindo a agricultura: ideias na perspectiva desenvolvimento sustentável*. Porto Alegre: UFRGS, 72 – 105, 1997.

ARAÚJO, N.D.; FARIAS, R.P.; PEREIRA, P.B.; FIGUEIRÊDO, F.M.; MORAES, A.M.; SALDANHA, L.C.; GABRIEL, J.E. A era da bioinformática: seu potencial e suas implicações para a ciência da saúde. *Estudos de Biologia*. 143-148, 2008.

BORGES, F. E. L. Impactos ambientais ocasionados pelo uso de defensivos agrícolas: a escassez de pesquisas no programa nacional de pesquisa agropecuária brasileira. Disponível em: > <http://sober.org.br/palestra/12/08O389.pdf>< Acesso em: 08 de abril de 2017.

CARLINI, C. R. R.; MORAES, C. S. T.; MULINARI, G. M.; SILVA, F.; GROSSI-DE-SÁ, M. A. F.; KURTENBACH, M. F. Toxina praguicida, construção gênica, processo de produção de praguicida, método de controle de pragas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2-12, 2004.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*. v. 16, 10881-10890, 1988.

CROPLIFE. Facts and figures – The status of global agriculture, 2010. Disponível em: >www.improveagriculture.com/<. Acesso em: 30 de novembro 2017.

DELANO SCIENTIFIC LLC. The PyMOL, San Carlos, California,U.S.A. 2003.

EMBRAPA. Inteligência territorial identifica áreas suscetíveis. Disponível em:> <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/11266477/inteligencia-territorial-identifica-areas-suscetiveis?link=agencia>> Acesso em: 08 de abril de 2017.

FAN, Y.; PEREIRA, R. M.; ENGIN, K.; CASELLA, G.; NEMAT, O. K. Pyrokininb-Neuropeptide Affects Necrophoretic Behavior in Fire Ants (*S. invicta*), and Expression of b-NP in a Mycoinsecticide Increases Its Virulence. *Plos one*. United States of America, v. 7, 1-6, 2012.

GAO, A.; HAKIMI, S. M.; MITTANCK, C. A.; WU, Y. W. B. M.; STARK, D. M.; SHAH, D. M.; LIANG, J.; ROMMENS, C. M. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology*. v.18, 1307-1310, 2000.

GERDOL, M.; PULLANDRE, N.; MORO, G.; GUARNACCIA, C.; LUCAFÒ, M.; BENINCASA, M.; ZLATEV, V., MANFRIN, C.; TORBOLI, V.; GIULIANINI, P. G.;

SAVA, G.; VENIER, P.; PALLAVICINI, A. Identification and characterization of a novel family of cysteine-rich peptides (MgCRP-I) from *Mytilus galloprovincialis*, Genome Biology Evolution. Italy, 2203-2219, 2015.

GRESSENT, F.; SILVA, P.; EYRAUD, V. K. L.; ROYER, C. Pea Albumin 1 Subunit b (PA1b), a Promising bioinsecticide of plant origin. Toxins. France, v. 3, 1503-1514, 2011.

HARDY, M.; NORELLE L, D.; MEHDI, MOBLI.; MORALES, A. V. R.; KING, F.G. Isolation of an orally active insecticidal toxin from the venom of an australian tarantula. Plos one. Australia, v. 8, 1-10, 2013.

HENRIQUES, S. T.; MELO, M. N.; CASTANHO, M. A. R. B. Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they. Biochemical Journal. v. 399, 1-7, 2006.

HUGHES, S.; DOWD, P. F.; JOHNSON, E. T. Cell-penetrating recombinant peptides for potential use in agricultural pest control applications. Pharmaceuticals. United States of America, v. 5, 1054-1063, 2012.

KARAKI, L.; SILVA, P.; F, RIZK.; CHOUABE, C.; CHANTRET, N.; EYRAUD, V.; GRESSENT, F.; SIVIGNON, C.; IRAHIOUI, I.; KAHN, D.; ARMANET, C.; RAHBÉ, Y.; ROYER, C. Genome-wide analysis identifies gain and loss/change of function within the small multigenic insecticidal Albumin 1 family of *Medicago truncatula*. BMC Plant Biology. France, 1-19, 2016.

KEYMANESH, K.; SOLTANI, S.; SARDARI, S. Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry. World Journal of Microbiology Biotechnology. v. 25, 933-944, 2009.

LI, Q.; ZHOU, Y.; DONG, K.; GUO, X. Potential therapeutic efficacy of a bactericidal-immunomodulatory fusion peptide against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infection. Applied Microbiology Biotechnology. v. 86, 305-309, 2010.

MACHADO, A.; LIRIA, C.W.; PROTI, P.B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, T. M. Síntese química e enzimática dos peptídeos: princípios básicos e aplicações. *Química Nova*. v. 27, 781-789, 2004.

MELNYKOV, A.V. New mechanisms that regulate *Saccharomyces cerevisiae* short peptide transporter achieve balanced intracellular amino acid concentrations. *Yeast*. v. 33, 21-31, 2016.

MISPELON, M.; THAKUR, K.; CHINN, L.; OWEN R.; NICHOLS, R. A nonpeptide provides insight into mechanisms that regulate *Drosophila melanogaster* heart contractions. *Elsevier*. v. 10, 1599-1605, 2003.

NAROWT, R.; BARYLSKI, J.; BRONIARCZYK, J.; BUCHWALD, W.; GÓDZICKA - JÓSEFIK, A. Plant and microbial peptidies. *Folia Microbial*. v. 59, 182-196, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. L – Princípios de Bioquímica. Sarvier. São Paulo. 3ed. 2002.

PLAN, M.; SASKA, I.; CAGAUAN, A. G.; CRAIK D. J. Backbone Cyclised Peptides from Plants Show Molluscicidal Activity against the rice pest *Pomacea canaliculata* (golden apple snail). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. n. 56, 5237-5241, 2008.

PINTO, M.; FENSTERSEIFER, I. C.; MIGLIOLO, L.; SOUSA, D.; CAPDVILLE, G.; ARBOLEDA, V. J. W.; COLGRAVE, M.; CRAIK, D. J.; MAGALHÃES, B. S.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Identification and structural characterization of novel cyclotide with activity against an insect pest of sugar cane. *The Journal of Biological Chemistry*. Brazil, v. 287, n. 1, 134–147, 2012.

PONTI, D.; MANGONI, M, L.; MIGNOGNA, G.; SIMMACO, M.; BARRA, D. An amphibian antimicrobial peptide variant expressed in *Nicotiana tabacum* confers resistance to phytopathogens. *Biochemical Society, Italy*, n. 370, 121-127, 2003.

SHAAYA, E.; KOSTJUKOVSKI, M.; EILBERG, J.; SUKPRAKARN, C. Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, v. 33, 7-15, 1997.

SAGAYAMA, R.; SILVA, M. R. L.; RANGEL, L. Fundamentos, ferramentas, políticas e perspectivas. *Defesa Vegetal*, Editora SBDA, 2015.

SANTIN, J. Peptídeos e proteínas do leite com propriedades funcionais. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/leite-saude/peptideos-e-proteinas-do-leite-com-propriedades-funcionais-24101n.aspx>> Acesso em: 08 de abril de 2017.

SANTOS, V. Disponível em: <<http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/peptideos.htm/>> Acesso em: 05 de abril de 2017.

SHPAKOV, A. O. Signal protein-derived peptides as functional probes and regulators of intracellular signaling. *Journal of Amino Acids*. 25, 2011.

SHPAKOV, A. O. Using peptide strategy for study functions and structure of signal proteins with enzymatic activity. *Tsitologia*. v. 53, 633-44, 2011.

SILVA, M.; COSTA, L. A indústria de defensivos agrícolas. *BNDES*, v. 35, 233-266, 2014.

TANG, J.; WANG, C. K.; PAN, X.; YAN, H.; ZENG, G.; XU, W.; HE, W.; DALY, N.; CRAIK, D. J.; TAN, N. Isolation and characterization of bioactive cyclotides from *Viola tricolor*. *Helvetica Chemical Acta*, v. 93, n. 11, 2287-2295, 2010.

VIEGAS, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, v. 26, n. 3, 390-400, 2003.

WARKEN, A. Bioquímica dos peptídeos. Disponível em: <<http://parasempreestudante.blogspot.com.br/2012/04/bioquimica-peptideos.html>> Acesso em: 05 de abril de 2017.

WHESTONE, P.; HAMMOCK, B. D. Delivery methods for peptide and protein toxins in insect control, *Toxicon*, Editora Elsevier, v.46, 576-596, 2006.

WINDLEY, M.; VOLKER, H.; SLAWIMIRA, M. C. H.; GLENN F.K.; GRAHAM, M. N. Spider-venom peptides as bioinsecticides. *Toxins. Australia*, v. 4, 191-215, 2012.