

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Purificação e Caracterização Biquímica De Moléculas Bioativas de
Potamotrygon falkneri e *Bothrops moojeni* Frente a *Staphylococcus*
aureus

Autor: Breno Emanuel Farias Frihling

Orientador: Ludovico Migliolo

Co-orientador: Octávio Luiz Franco

“Dissertação apresentada, como parte das
Exigências para obtenção do título de
MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Católica Dom
Bosco – Área de concentração: Biotecnologia
Aplicada à saúde”

Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Março - 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

F897p Frihling, Breno Emanuel Farias
Purificação e caracterização bioquímica de moléculas bioativas de
Potamotrygon falkneri e *Bothrops moojeni* frente a *Staphylococcus*
Aureus / Breno Emanuel Farias Frihling; orientador Ludovico Migliolo;
coorientador Octávio Luiz Franco -- 2017
84 f.

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica
Dom Bosco, Campo Grande, 2017.
Inclui bibliografias.

1. Bothrops 2. Bioquímica 3. Cromatográfica 4. Fosfolipase 5. Arraia
(Peixe) I. Migliolo, Ludovico II. Franco, Octávio Luiz III. Título.

CDD: 572.6



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Inspira o futuro

**Purificação e Caracterização Bioquímica de Moléculas Bioativas de
Potamotrygon falkneri e *Bothrops moojeni* frente a Bactérias Formadoras
de Biofilmes**

Autor: Breno Emanuel Farias Frihling

Orientador: Prof. Dr. Ludovico Migliolo

Coorientador: Prof. Dr. Octavio Luiz Franco

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADO em 15 de março de 2017.

Prof. Dr. Ludovico Migliolo - UCDB
(orientador)

Profa. Dra. Alinne Pereira de Castro - UCDB

Profa. Dra. Elizabete de Souza Cândido - UCB

Qual é a droga que salva?
Qual é a dose letal?
Quem quer saber tudo isso?
Será que aguenta a pressão?

Humberto Gessinger - Gunatánamo

Dedico esta obra

A todos aqueles que contribuíram na construção deste trabalho;

Ao Professor Ludovico Migliolo, por todo tempo gasto em prol do
meu aprendizado;

A Professora Paula Helena Santa Rita e toda equipe do
Biotério/UCDB, por todo apoio fornecido;

A todos os colegas do laboratório S-Inova, principalmente ao
Guilherme Augusto, por todo auxílio;

Aos meus pais, Luiz Jânio e Maristela, por todo carinho que
sempre demonstraram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todas as pessoas do laboratório S-Inova, principalmente ao professor Ludovico Migliolo e meu colega e amigo Guilherme Augusto, que mais contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Agradeço os IC's que contribuíram diretamente na construção deste trabalho, Odaias Pereira e Elizângela Barros.

Agradeço os meus amigos do laboratório de BioInformática e agregados, Marlon Henrique, Elizabete Cândido e Esther Vilas Boas de Carvalho, pelos conselhos e auxílios.

Agradeço a Professora Paula Helena, pelo auxílio em todas as situações, e ao corpo funcional do Biotério que sempre me apoiaram.

Agradeço à “Elite do rolê Pokémon”, Gabriela Melo, Leonardo Nascimento e Willian Assis, pelos momentos de descontrações nos intervalos das atividades.

Agradeço a todos os meus professores da graduação, que sempre me incentivaram no decorrer deste projeto, principalmente a Professora Cida Perreli, Professora Danielle Decanine e Professor Ricardo Martins Santos.

Agradeço imensamente a Letícia Koutchin dos Reis (Namorada) pelo total apoio, incentivo e paciência que ela sempre demonstrou.

Agradeço meus amigos “das antigas”, Paulo Renato, Jean Michel e Adriano Fonseca, que sempre permaneceram comigo.

Agradeço imensamente as três pessoas que mais me incentivaram, colaboraram e nunca mediram esforços para me auxiliarem, meus pais, Luiz e Maristela e, ao meu irmão, Samir.

BIOGRAFIA

O autor deste trabalho, Breno Emanuel Farias Frihling, nasceu no dia 28 de Dezembro de 1993, Filho de Luiz Jânio Frihling e Maristela Farias. É formado em Ciências Biológicas, pela Universidade Católica Dom Bosco e atua nas seguintes áreas profissionais: manutenção e manejo de animais de laboratório para experimentação; Manejo de animais silvestres da fauna das fisionomias Cerrado e Pantanal; Processos de purificação de toxinas de animais peçonhentos.

Sumário

	Página
Lista de ilustrações	01
1 Resumo	04
2 Abstract	06
Capítulo I: <i>Bohtrops moojeni</i>	07
1. Introdução	07
1.1 Distribuição das serpentes	07
1.2 Acidentes ofídicos no Brasil e no estado de Mato Grosso do Sul	08
1.3 A glândula de veneno dos ofídios	09
1.4 Veneno das serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	12
1.4.1 Metallo Proteases	12
1.4.2 Serino proteases	13
1.4.3 Lectinas tipo-C	15
1.4.4 L-aminoácido oxidases	15
1.4.5 Desintegrinas	16
1.4.6 Fosfolipases	17
1.5 <i>Bothrops moojeni</i>	20
1.6 Utilização do veneno como ferramenta biotecnológica	21
2 Objetivos	26
Material e métodos	27
Material Biológico	27
Quantificação	28
Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes	28
Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S100	29
Cromatografia líquida de alta performance	29
Espectrometria de massas	29
Atividade proteolítica sobre azocaseína	30
Atividade antibacteriana	30
Ensaio de inibição de biofilme em microplaca	31

Resultados e discussão	32
Estimativa da massa molecular da peçonha bruta	32
Cromatografia de exclusão molecular	34
Espectrometria de massas	36
Atividade proteolítica sobre azocaseína	38
Cromatografia líquida de alta performance	38
Atividade proteolítica sobre azocaseína - Fração F	42
Atividade antibacteriana	42
 Capítulo II: <i>Potamotrigon falkneri</i>	46
1 Introdução	46
1.1 Distribuição das arraias	46
1.2 Ictismo	47
1.3 Acidentes com arraias	49
1.4 Potencial biotecnológico para o veneno de arraias	49
2. Objetivos	51
2.1 Geral	51
2.2 Específicos	51
3. Material e métodos	52
3.1 Material Biológico	52
3.2 Quantificação proteica	52
3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	52
3.4 Cromatografia líquida de alta performance	53
4. Resultados e discussão	54
4.1 Estimativa de massa molecular do extrato bruto	54
4.2 Cromatografia líquida de alta performance	56
Conclusão	57
Referências bibliográficas	58

Lista de Ilustrações

Figura 01. Imagem ilustrativa do mecanismo de envenenamento de uma serpente solenodonte.

Figura 02. Posicionamento da glândula de veneno (esquerda), movimentação da presa inoculadora de veneno (direita).

Figura 03. Composição do veneno de *Bothrops alternatus*.

Figura 04. Estrutura tridimensional da BmooMPalpha-I (acesso ao PDB: 3GBO), uma metaloprotease de classe-I provinda do veneno de *B. moojeni* (AKAO *et al*, 2009).

Figura 05. Estrutura tridimensional da Jararacussin-I (acesso ao PDB: 4GSO), uma serino protease provinda do veneno de *B. jararaca*.

Figura 06. Estrutura tridimensional da Botrocetin (acesso pelo PDB: 1FVU), uma lectina tipo C provinda do veneno de *B. jararaca*.

Figura 07. Estrutura de uma L-amino ácido oxidase (acesso pelo PDB: 4E0V), provinda do veneno de *B. jararacussu*.

Figura 08. Estrutura tridimensional da Bothropasin (acesso pelo PDB: 3DSL), uma desintegrina provinda do veneno de *B. jararaca*

Figura 09. Local de hidrólise de diferentes fosfolipases

Figura 10. Estrutura tridimensional da Myotoxin-II (acesso pelo PDB: 4YV5), uma fosfolipase provinda do veneno de *B. moojeni*

Figura 11. Exemplar de uma serpente da espécie *Bothrops moojeni*, capturada no perímetro urbano de Campo Grande – MS, medindo 120 cm.

Figura 12. Distribuição geográfica da espécie *B. moojeni*.

Figura 13. Cativeiro intensivo onde todas as serpentes peçonhentas do Biotério/UCDB são mantidas.

Figura 14. Processo de imobilização da serpente para extração; (D) Extração do veneno, em um Becker vedado com parafilme.

Figura 15. Perfil eletroforético do extrato bruto do veneno de *Bothrops moojeni*. MW: Marcador; EB: Extrato Bruto.

Figura 16. Perfil cromatográfico do veneno bruto de *B. moojeni* obtido por cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100). O extrato bruto foi eluído no tampão bicarbonato de amônia em fluxo constante de $0,625 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. A detecção dos tubos foram feitas pela leitura de absorbância.

Figura 17. Perfil eletroforético das frações obtidas a partir da cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S100). As frações foram agrupadas em tubos do tipo falcon e, $15 \mu\text{g}$ de proteínas de cada fração foi aplicado no gel SDS-PAGE 12%.

Figura 18. Determinação de massa por espectrometria. A massa das frações foram obtidas em sistema MALDI-ToF, operado em modo linear usando os íons de insulina para calibração externa. Os espectros de massa obtidos foram submetidos a uma subtração automática de linha de base.

Figura 19. Atividade proteolítica sobre azocaseína (substrato) utilizando diferentes concentrações da amostra.

Figura 20. Perfil cromatográfico da fração III do veneno de *B. moojeni* após a aplicação da fração em cromatografia de fase reversa (C 18). As frações obtidas após esse processo, foram denominadas de A, B, C e D.

Figura 21. Perfil proteico por SDS-PAGE da FIII (exclusão molecular) do veneno de *B. moojeni* após a aplicação da fração em cromatografia de fase reversa (C 18).

Figura 22. Perfil cromatográfico da fração D após a aplicação da fração em cromatografia de fase reversa (C 18). As frações obtidas após esse processo, foram denominadas de e, f e g.

Figura 23. Avaliação da atividade proteolítica da fração f do veneno de *B. moojeni*.

Figura 24. Avaliação do crescimento bacteriano de células planctônicas de *S. aureus* incubados com diferentes concentrações de antibiótico (barras vermelhas) e a fração F do veneno de *B. moojeni* (barras azuis).

Figura 25. Avaliação do crescimento bacteriano em formação de biofilme *S. aureus* incubados com diferentes concentrações de antibiótico (barras vermelhas) e a fração F do veneno de *B. moojeni* (barras azuis).

Figura 26. Exemplar (direita) e área de distribuição geográfica (esquerda) da espécie *Potamotrygon falkneri*, segundo Góes de Araújo, 2009.

Figura 27. Porção final da cauda da arraia *P. falkneri*. Detalhe para o ferrão exposto na porção mediana (LAMEIRAS *et al*, 2014).

Figura 28. Mecanismo de defesa utilizado pelas arraias evidenciando o aparelho inoculador (espinho serrilhado) (FENNER *et al*, 1988).

Figura 29. Perfil eletroforético do extrato bruto do veneno de *Potamotrygon falkneri*. MW: Marcador; EB: Extrato Bruto.

Figura 30. Perfil cromatográfico do extrato bruto do veneno de *P. falkneri* após a aplicação em cromatografia de fase reversa (C 18) – RP-HPLC C18. As frações obtidas foram denominadas F1, F2, F3 e F4. O gradiente linear de acetonitrila foi monitorado de 5 à 95%.

RESUMO

Os animais peçonhentos apresentam toxinas com alta concentração de proteínas e peptídeos biologicamente ativos. São misturas que apresentam uma alta concentração de proteínas, representando aproximadamente 90% do peso seco do veneno, sendo responsáveis pelos efeitos em 25% dos acidentes ofídicos. Dentre os compostos presentes no veneno das araias e serpentes, podemos destacar as fosfolipases A2, que são um grupo importante de proteínas com capacidade de hidrolisar fosfolípidios de membranas. Devido a isso vários efeitos são atribuídos à esse grupo de moléculas como atividade antiviral, antifúngica, antibacteriana, antitumoral. O objetivo desse trabalho foi caracterizar a partir de métodos bioquímicos clássicos, moléculas bioativas presente no ferrão de *Potamotrygon falkneri* e da peçonha de *Bothrops moojeni*. As araias foram coletadas no rio Canindé, município de Nioaque; já a toxina das serpentes foram obtidas pelo Biotério da UCDB. O perfil proteico e cromatográfico da toxina de *P. falkneri* foram obtidos por SDS-PAGE e cromatografia líquida de fase reversa. Após essa análise inicial, foi possível observar a presença de 7 bandas proteicas, via SDS-PAGE e, 4 frações obtidas por cromatografia líquida de alta performance. O isolamento da fosfolipase do veneno de *B. moojeni* foi realizado por meio de três passos cromatográficos, envolvendo cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100) seguido de cromatografias de fase reversa (C-18). Após o primeiro passo cromatográfico, as frações coletadas foram avaliadas por espectrometria de massas e, foi realizado atividades enzimáticas e antibacterianas. Com o primeiro passo cromatográfico, foi coletado 5 frações (FI, FII, FIII, FIV e FV), na FIII foi encontrado um íon, via MALDI-ToF, que corresponde às massas moleculares de fosfolipases. Por esse motivo, essa foi a fração aplicada na cromatografia de fase reversa, onde foi obtido 4 frações. A massa molecular, sugerida por SDS-PAGE, mostrou bandas de aproximadamente 15 kDa, posteriormente confirmada por MALDI-ToF. Todas as etapas foram monitoradas por atividades enzimáticas e, após a obtenção da fração desejada, as atividades antibacteriana e antibiofilme foram verificadas contra *S. aureus*. As atividades enzimáticas foram de 100%, quando comparado à atividade do controle. Além disso, após as análises realizadas com *S. aureus*, foi possível observar uma atividade inibitória de crescimento planctônico nas duas maiores concentrações testadas (1024 e 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Em decorrência dessa atividade, a

possível fosfolipase encontrada no veneno de *B. moojeni* pode tornar-se um potencial modelo para elaboração de novos fármacos.

Palavras chave: *Bothrops moojeni*, *Potamotrygon falkneri*, Fosfolipase, purificação, perfil cromatográfico.

ABSTRACT

The toxins of venomous animals are mixtures that present a large amount of proteins and peptides, representing approximately 90% of the dry weight of the venom, being responsible for the effects in 25% of ophidian accidents. Among the compounds present in the venom of stingrays and snakes, we can highlight the phospholipases A2, which are an important group of proteins capable of hydrolyzing membrane phospholipids. Several pharmacological activities are attributed to this group of molecules as antiviral, antifungal, antibacterial, antitumor activity. The objective of this work was to characterize, from classical biochemical methods, the toxin present in the sting of *Potamotrygon falkneri* and the venom of *Bothrops moojeni*. The stingrays were collected, in the Canindé river, Nioaque; on the other side the snake toxin was obtained by the UCDB vivarium. The protein and chromatographic profile of the *P. falkneri* toxin were obtained by SDS-PAGE and reverse phase liquid chromatography. After this initial analysis, it was possible to observe the presence of 7 protein bands, by SDS-PAGE and, 4 fractions obtained by high performance liquid chromatography. Isolation of phospholipase from *B. moojeni* venom was performed by three chromatographic steps involving molecular exclusion chromatography (Sephacryl S-100) followed by reverse phase (C-18) chromatography. After the first chromatographic step, the collected fractions were evaluated by mass spectrometry, enzymatic and antibacterial activities. With the first chromatographic step, 5 fractions were collected (FI, FII, FIII, FIV and FV), where in FIII an ion was found, via MALDI-ToF, corresponding to the molecular masses of phospholipases. For this reason, this was the fraction applied in reverse phase chromatography, where more 4 fractions were obtained. The molecular weight, suggested by SDS-PAGE, showed bands of approximately 15 kDa, later confirmed by MALDI-ToF. All steps were monitored by enzymatic activities and, after obtaining the desired fraction, the antibacterial and antibiofilm activities were checked against *S. aureus*. The enzymatic activities were 100% when compared to the control activity. In addition, after the analyzes performed with *S. aureus*, it was possible to observe an inhibitory activity of planktonic growth in the two highest concentrations tested (1024 and 512 µg.mL⁻¹).

CAPÍTULO I: *Bothrops moojeni*

1 Introdução

1.1 Distribuição das serpentes

As serpentes (classe Reptilia: Subordem Serpentes) são animais que apresentam corpo alongado, não apresentam patas e possuem maxilas ligadas fracamente, permitindo uma grande abertura da boca que possa auxiliar na ingestão de presas de grande diâmetro (BERNARDE, 2012). Apresentam também o corpo recoberto por escamas e uma camada superficial desse revestimento que é trocada periodicamente (muda). São animais vertebrados, ectodérmicos, apresentando os órgãos internos alongados e ossos móveis na região cranial (MARQUES *et al*, 2001).

Os viperídeos do continente americano são classificados na subfamília *Crotalinae*, apresentando, como principal característica anatômica, a presença de fossetas loreais (dois orifícios localizados entre a narina e os olhos) que são responsáveis por localizar as presas, detectando pequenas variações de temperatura no ambiente (ZUG *et al*, 2000).

Segundo o último levantamento oficial a respeito dos ofídios, há 3.567 espécies de serpentes catalogadas (UETZ, 2015). No Brasil, ocorre 392 espécies de serpentes, divididas em 27 famílias, onde 75 espécies são classificadas como peçonhentas (BÉRNILS & COSTA, 2014) por possuírem glândulas de peçonha desenvolvidas e associadas a um aparelho inoculador (BERNARDE, 2014).

As serpentes peçonhentas estão agrupadas na superfamília *Colubroidea* e são classificadas em 10 famílias: família Colubridae (851 espécies), família Dipsadidae (754 espécies), família Lamprofiidae (308 espécies), família Natricidae (226 espécies), família Pseudoxenodontidae (10 espécies), família Elapidae (360 espécies), família Homalopsidae (53 espécies), família Pareatidae (20 espécies), família Viperidae (331 espécies), família Xenodermatidae (18 espécies) (UETZ, 2015).

Destes indivíduos peçonhentos, o estado do Mato Grosso do Sul abrange, principalmente, as serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*, ocorrendo com uma maior frequência, as seguintes espécies: *C. durissus*, *B. moojeni*, *B. alternatus*, *B. matogrossensis*, *B. jararaca* e *B. jararacussu*.

1.2 Acidentes ofídicos no Brasil e no estado de Mato Grosso do Sul

Inúmeros casos de acidentes ofídicos são registrados anualmente no país, onde se encontram quatro gêneros de serpentes peçonhentas de importância médica: *Bothrops* (abrangendo 28 espécies), *Crotalus* (abrangendo apenas uma espécie, dividida em 5 subespécies) e *Lachesis* (uma espécie), pertencentes à família Viperidae, e *Micrurus* (abrangendo 39 espécies), pertencente à família Elapidae (BJARNASON E FOX, 1989).

Os acidentes ofídicos envolvendo estes animais têm importância médica em virtude de sua grande frequência e gravidade, sendo o ofidismo o maior causador de intoxicações causadas por animais na América Latina (CAMPBELL & LAMAR, 1989).

No primeiro estudo relacionando número de mortes com o número de acidentes, foram descritos uma média anual de 19.200 prováveis acidentes, com um índice de letalidade de 25%; porém, esses dados foram estimados a partir de estatísticas do estado de São Paulo (BRAZIL, 1911). Nos dias atuais, são registrados anualmente, cerca de 28 mil casos de acidentes ofídicos (onde 90% dos casos envolvem serpentes do gênero *Bothrops*), com uma média de 129 mortes (índice de 0,44% de letalidade – Tabela 01).

Tabela 01. Distribuição dos casos, incidências, óbitos e letalidade dos acidentes ofídicos por região no Brasil – média do período de 2007 a 2012 (Fonte: SINAN, 2013, adaptado por BERNARDE, 2014).

Região	Nº de casos	Incidência (100.000 hab)	Óbitos	Letalidade (%)
Norte	8.827	56	41	0,46
Nordeste	7.587	14	46	0,6
Centro-oeste	2.944	21	14	0,47
Sudeste	6.847	8,5	19	0,27
Sul	2.771	10	5,6	0,2
Brasil	28.977	15	129	0,44

Tabela 02. Quantidade e porcentagem de casos, óbitos e letalidade por tipo de acidente – média do período de 2007 a 2012 (Fonte: SINAN, 2013, adaptado por BERNARDE, 2014).

Acidente	Nº de casos	% de casos	Óbitos	Letalidade (%)
Botrópico	20.836	86,23	83	0,39
Crotálico	2.218	9,17	24	1,08
Laquético	900	3,72	5,5	0,61
Elapídico	208	0,86	0,66	0,31

Segundo o SINAN (2013), no estado de Mato Grosso do Sul, foi verificado uma média de 1249 casos de acidentes ofídicos entre os anos de 2007 e 2012, com 1,5 óbito em média (0,28% de letalidade), com a seguinte distribuição entre os gêneros de serpentes: Bothrops – 412 acidentes; Crotalus – 49,5 acidentes, Micrurus – 2,5 acidentes.

1.3 A glândula de veneno dos ofídios

O aparelho de produção de veneno das serpentes é composto por glândulas exócrinas modificadas que produzem veneno (Figura 01) (MARKLAND, 1998). Uma função inicial do veneno consiste em paralisar e matar a presa (promovendo uma digestão inicial) (HABERMEHL, 1981); também são descritas funções lubrificantes e antidegradantes nas peçonhas, auxiliando no processo de deglutição e digestão do alimento (RENNER, 1990).

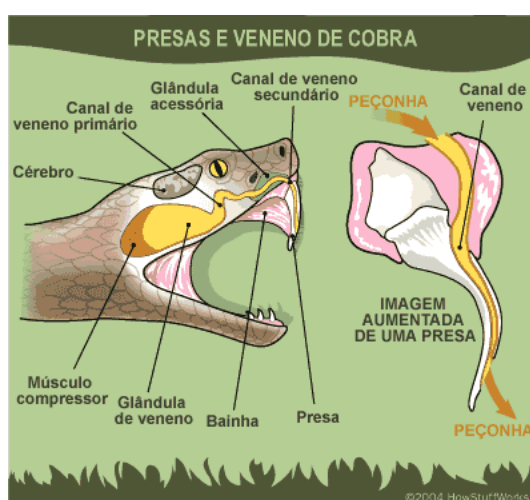


Figura 01. Imagem ilustrativa do mecanismo de envenenamento de uma serpente solenodonte. Os componentes primários que auxiliam o processo de inoculação estão em destaque: Músculo compressor, glândula de veneno, canal de veneno primário, glândula acessória, canal de veneno secundário e canal de veneno.

As glândulas de veneno de serpentes da família Viperidae (Figura 02) são relacionadas com as glândulas salivares e provavelmente evoluíram de glândulas salivares de ancestrais não venenosos (KOCHVA & GANS, 1970).

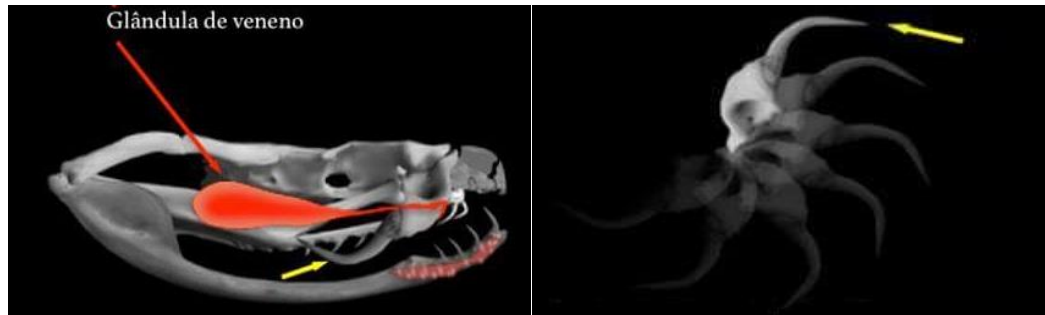


Figura 02. Posicionamento da glândula de veneno (esquerda), movimentação da presa inoculadora de veneno (direita). Fonte: Marcos Buonato, 2015.

A peçonha é constituída por proteínas representando aproximadamente 90% do peso seco; as frações não-proteicas são representadas por carboidratos, lipídeos, metais, aminas biogênicas (aminas derivadas da descarboxilação enzimática de aminoácidos naturais), nucleotídeos e aminoácidos livres (CARDOSO *et al.*, 2003). De todos os componentes do veneno, as frações inorgânicas (Ca^{2+} , Cu^+ , Fe^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , P^{3-} , Co^{2+} e Zn^{2+}) podem exercer uma função de mantedoras de estabilidade estrutural de certas proteínas, como os fatores hemorrágicos (BJARNSON & FOX, 1989).

A peçonha de serpente é o fluido mais concentrado, produzido, armazenado e secretado entre os vertebrados, apresentando entre 18 a 52% de massa seca e, se compararmos com o suco gástrico, por exemplo, apresenta de 0,5 a 1,0% (VOGT *et al.*, 1989). Acredita-se que durante o processo evolutivo das serpentes peçonhentas, parte do aparelho gastrointestinal (glândulas salivares e pancreática, principalmente) tenha sofrido uma diferenciação em um tecido especializado (BOISBOUVIER *et al.*, 1998).

Segundo Fry e colaboradores (2003), é possível observar uma alta especialização da glândula de veneno nas serpentes do gênero *Bothrops*, onde encontra-se uma variada gama de famílias de proteínas (Figura 03), como por exemplo: SVMP (*Snake Venom Metallo Proteases*), Serinoproteases, Fosfolipases A2, L-amino ácido oxidases, Desintegrinas, Lectinas tipo-C.

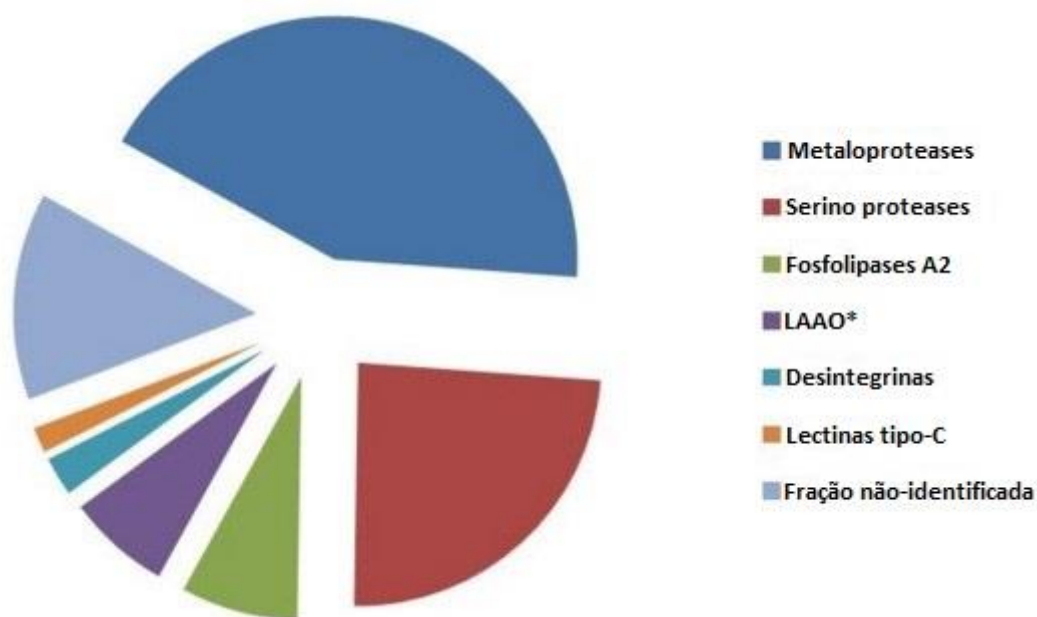


Figura 03. Composição do veneno de *Bothrops alternatus*, segundo Ohler e colaboradores, 2012.
*LAAO – L-amino ácido oxidases.

Além da composição acima descrita, podemos encontrar nos venenos das serpentes do gênero *Bothrops*, uma diversidade de toxinas com uma menor expressão em quantidade, como, por exemplo, RNases, fatores de crescimento nervosos, entre outros (FRY *et al*, 2003). As moléculas proteicas citadas podem variar entre as serpentes do mesmo gênero, ou podem variar entre indivíduos da mesma espécie (CHIPPAUX *et al.*, 1991). Ao caracterizarmos as particularidades de cada peçonha, a partir de métodos bioquímicos e moleculares, seria possível entender melhor a diferenciação e a evolução das espécies, principalmente do gênero *Bothrops*. Vale ressaltar que nem todas as moléculas citadas acima estão presentes qualitativamente no veneno das serpentes, pois, isso pode variar diretamente, devido aos fatores externos: dieta, idade, sazonalidade e habitat (CHIPPAUX *et al.*, 1991).

Segundo Bdolah (1979), a produção do veneno das serpentes está intimamente relacionada com o estado de atividade da serpente, onde a síntese do veneno é regida pela inoculação com os esvaziamento da glândula. A diversidade de proteínas encontradas nos venenos das serpentes está relacionada a genes que sofreram um processo acelerado de evolução (NAKASHIMA *et al*, 1995). Isso está relacionado com o modelo de nascimento de “multigenes” dentro das famílias proteicas, incluindo três etapas: nascimento (quando há a duplicação de genes ou

domínios), morte (eliminação desses genes ou domínios) e quando algumas sequências não codificadas geram novos genes, processo denominado por inovação (FRY & WUSTER, 2004).

1.4 Veneno das serpentes do gênero *Bothrops*: principais componentes

As frações proteicas dos venenos das serpentes podem ser farmacologicamente ativas, acarretando uma variedade de efeitos sobre as vítimas (FRANCISCHETTI, 1998). Se observarmos os envenenamentos causados por serpentes do gênero *Bothrops*, podemos descrever distúrbios hemostáticos, reação inflamatória, edema, hemorragia, dor e, se não tratado com cautela, pode haver necrose, por consequência, amputação de membros afetados (BERNARDE, 2014).

Por conta dos sintomas citados, é descrito que o veneno das serpentes desse gênero possui ação proteolítica, coagulante, hemorrágica, neurotóxica (FRY *et al*, 2003). As ações do envenenamento são descritas desde o trabalho de Vital Brazil, em sua publicação “A defesa contra o ophidismo”, de 1911.

1.4.1 Metaloproteases (SVMP – Snake Venom Metallo Proteases)

Dentre as proteínas encontradas em venenos de serpentes, podemos destacar as metaloproteases (Figura 04), que são descritas em um intervalo de massa molecular entre 20 e 100 kDa. As metaloproteases são componentes abundantes em venenos de viperídeos e tem como principal característica a presença de um íon metálico (geralmente zinco) associado a um motivo estrutural altamente conservado (HITE *et al*. 1994; SERRANO & FOX, 2005). Estas enzimas são também chamadas de hemorraginas e estão envolvidas em diversos processos decorrentes do envenenamento como: dermonecrose, degradação de fatores de coagulação, inibição de agregação plaquetária, edema, degradação de componentes da matriz extração celular e hemorragia.

As metaloproteases podem ser divididas em quatro classes: Classe I: enzimas encontradas entre 20 e 30 kDa, apresentam um domínio catalítico (protease); classe II: enzimas que apresentam um domínio catalítico e um domínio desintegrina (30-50 kDa); classe III: enzimas que apresentam intensa atividade hemorrágica, com massa molecular variando entre 50 a 80 kDa, apresentando um domínio catalítico, um desintegrina e um terceiro domínio rico em cisteínas; classe IV: proteases de alta massa molecular (entre 80 e 100 kDa) que apresentam os três domínios anteriores e

mais dois domínios tipo-lectina ligados por ligações de dissulfeto (HITE *et al*, 1994; BJARNSON & FOX, 1995; SERRANO & FOX, 2005).

Segundo Birkedal-Hansen (1995), as metaloproteases encontradas nos venenos de serpentes são enzimas que estão agrupadas na super-família de proteínas, conhecida por metzincinas, onde são caracterizadas por apresentarem uma metionina em uma alça da estrutura terciária, na porção C-terminal, do motivo metálico.

A hemorragia, no local da picada, é atribuída às ações de todas as classes das SVMP (FOX & SERRANO, 2009) por decorrência do rompimento do endotélio dos vasos da corrente sanguínea e ação proteolítica dos componentes da matriz celular (GAY *et al*, 2005). Segundo Gutiérrez e Rucavado(2000), as SVMP causam mionecrose, danos no tecido epitelial, podendo interferir nos componentes da agregação plaquetária e cascata de coagulação.

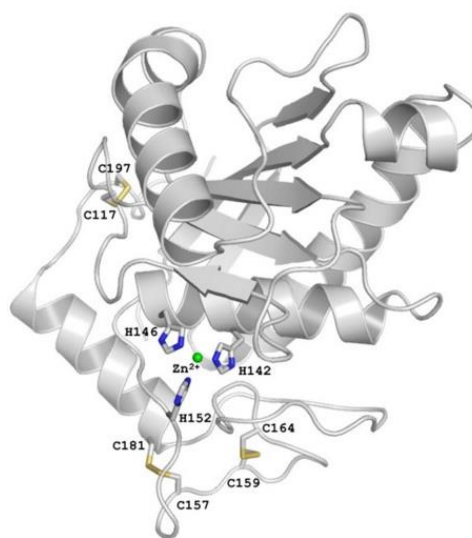


Figura 04. Estrutura tridimensional da BmooMPalpha-I (acesso ao PDB: 3GBO), uma metaloprotease de classe-I provinda do veneno de *B. moojeni* (AKAO *et al*, 2010).

1.4.2 Serinoproteases (SVSP – Snake Venom Serine Preoteases)

Depois das SVMT, as SVSP são as proteínas mais abundantes das serpentes da família Viperidae, podendo representar até 20% da composição total do veneno (BRAUD *et al*, 2000). Ainda pelo mesmo autor, as SVSP (Figura 05) individuais não apresentam letalidade, mas podem contribuir para o efeito tóxico no envenenamento, se associada com outras proteínas do veneno. Segundo Kini & Evans (1990), essa família de proteínas afetam os processos de coagulação

sanguínea, por degradação proteolítica, ou seletivamente, ativando ou inibindo fatores sanguíneos específicos envolvidos na agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise.

Várias SVSP convertem fibrinogênio em fibrina, clivando fibrinopeptídeos, onde, essa atividade é bem descrita para as trombinas, denominando-se assim, serinoproteases “trombina-like” (“tipo trombina”) (PIRKLE, 1998). Porém, os monômeros de fibrinas gerados pelas enzimas trombina-like, sofrem uma polimerização limitada, por consequência, o coágulo não é formado (PIRKLE, 1998). Essa família de proteínas encontrada nos venenos das serpentes compartilham uma ou várias atividades da trombina humana, mas não todas as atividade e, por conta disso, são ferramentas interessantes para verificar atividades específicas dessas enzimas multifuncionais (ZHANG *et al*, 1998).

Segundo Sajevic *et al* (2011), as serinoproteases podem hidrolisar ligações peptídicas utilizando mecanismos covalentes de catálise, por meio de resíduos formados por histidina, ácido aspártico e serina. O mesmo autor ainda descreve que, as serinoproteases, similar à tripsina, cliva cadeias polipeptídicas na porção C-terminal de resíduos de aminoácidos carregados positivamente.

As serinoproteases possuem 12 resíduos de cisteína, com 5 ligações dissulfeto (Savejic *et al*, 2011). As SVSP encontradas nos venenos das serpentes do gênero Bothrops, são descritas por serem enzimas com atividade do tipo trombina (trombina-like), afetando a cascata de coagulação, agregação plaquetária e fibrinólise, desencadeando uma homeostase na presa (MURAYAMA *et al*, 2003).



Figura 05. Estrutura tridimensional da Jararacussin-I (PDB: 4GSO), uma serino protease provinda do veneno de *B. jararaca* (ULLAH *et al*, 2012).

1.4.3 Lectinas tipo-C

As lectinas tipo-C (Figura 06) são proteínas não enzimáticas que se ligam em mono e oligossacarídeos de uma forma Ca^{2+} -dependente, onde podemos classificá-las em: a) lectinas tipo-C verdadeiras, que possuem um domínio de reconhecimento de hidratos de carbono, ligando-se em açúcares e; b) proteínas semelhantes a lectinas tipo-C, com domínios que não possuem o domínio de ligação ao açúcar (DRICKAMER, 1997).

Apresentando uma massa molecular de 30 kDa, as lectinas tipo-C podem apresentar conteúdos de glicosilação, possuindo aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos por cada subunidade (ZINGALI *et al*, 1993). Os papéis fisiológicos são relacionados na aglutinação de eritrócitos e estimulação da agregação plaquetária (OZEKI *et al*, 1994). Possivelmente, as lectinas tipo-C ligam-se em vários receptores de plaqueta, evidenciando-se assim a presença de vários sítios de interações (SAVEJIC *et al*, 2011).



Figura 06. Estrutura tridimensional da Botrocetina (PDB: 1FVU), uma lectina tipo C provinda do veneno de *B. jararaca* (SEM *et al*, 2001).

1.4.4 L-aminoácido oxidases (LAAOs)

Os LAAOs (Figura 07) estão amplamente distribuídos nos venenos dos Viperidae e Elapidae (DU & CLEMENTSON, 2002). São flavoenzimas que catalisam a desaminação oxidativa de L-aminoácidos (ZULIANI *et al*, 2009). Apresentando uma massa molecular de 110-150 kDa (forma homodimérica) e 55-68 kDa (forma monomérica) (ZULIANI *et al*, 2009), as LAAOs possuem, duas moléculas de co-

enzima flavina, sendo as responsáveis pela coloração amarelada do veneno das serpentes do gênero *Bothrops* (ALVES *et al*, 2008).

Segundo Du e Clemetson (2002), o papel das LAAOs não é totalmente compreendido em um quadro de envenenamento, onde, ao influenciar a agregação plaquetária e apoptose, elas podem ser consideradas como toxinas. Porém, elas apresentam efeitos controversos: existe efeitos relacionado a ativação (IZIDORO *et al*, 2006) e inibição da agregação plaquetária.

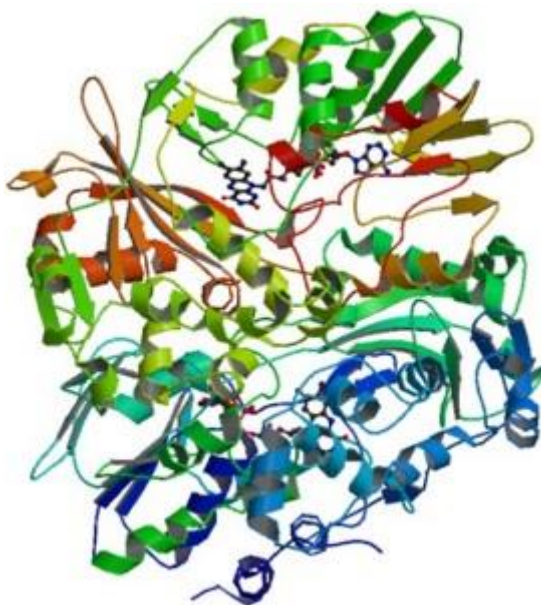


Figura 07. Estrutura de uma L-amino ácido oxidase (acesso pelo PDB: 4E0V), provinda do veneno de *B. jararacussu* (ULAH *et al*, 2012).

1.4.5 Desintegrinas

As desintegrinas são uma família de pequenas proteínas (Figura 08) (apresentando de 41 a 83 resíduos de aminoácidos) ricas em cisteína (podendo conter até 12 moléculas de cisteína) (CALVETE *et al*, 2005). Podem afetar, em um quadro de envenenamento, os processos células onde as integrinas estão envolvidas, como, por exemplo, agregação plaquetária, migração celular, resposta imune, tempo de cura, angiogenese, inflamação e remodelação óssea (SWENSON *et al*, 2007).

O grande número de ligações dissulfeto em sua estrutura promove uma orientação espacial específica, sendo composta por uma sequência Arg-Gly-Asp, ligando-se à integrinas (receptores de superfície da célula) (SAVEJIC *et al*, 2011). A atividade das desintegrinas varia de acordo com a porção C-terminal, pois os

resíduos de aminoácidos dessas regiões não são altamente conservados, podendo ter uma alteração na especificidade e intensidade na ligação às integrinas.

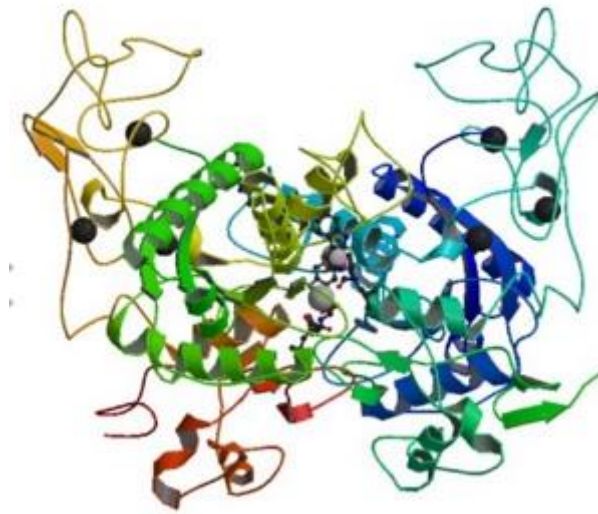


Figura 08. Estrutura tridimensional da Bothropasin (acesso pelo PDB: 3DSL), uma desintegrina provinda do veneno de *B. jararaca* (MUNIZ *et al*, 2008).

1.4.6 Fosfolipases A2 (PLA2)

As Fosfolipases são proteínas importantes em diversas atividades celulares, onde hidrolisam fosfolipídeos de membranas. A super família das PLA2 contém enzimas classificadas em 16 grupos, de acordo com sua estrutura. Nos venenos das serpentes, encontra-se fosfolipases pesando entre 14-18 kDa, apresentando de 5 a 8 ligações dissulfeto (SAJEVIC *et al*, 2011).

Nas serpentes do gênero *Bothrops*, podemos encontrar as PLA2 com abundância e, além da hidrólise de fosfolipídeos (figura 09), podemos observar efeitos antiplaquetários, anticoagulante, inflamatório, hemolítico, cardiotoxico, neurotóxico, convulsivo e indutor de edema (Tabela 03) (MOURA-da-SILVA *et al*, 1991; KINI, 2003). Graças a uma díade catalítica das PLA2 (formada por His/Asp) Savejic e colaboradores (2011) relatam que, após a hidrólise de fosfolipídeos, as PLA2 geram mediadores inflamatórios (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, entre outros).

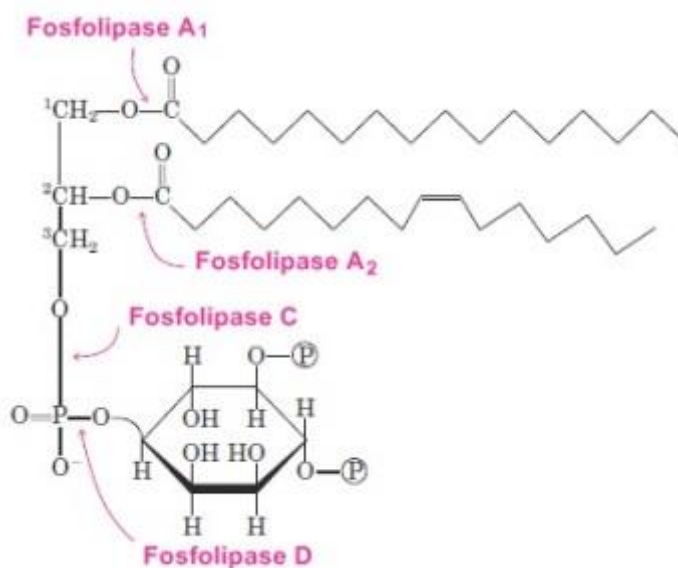


Figura 09. Local de hidrólise de diferentes fosfolipases (LEHNINGER, 2002).

As atividades acima descritas estão correlacionadas ao fato das PLA2 danificarem a integridade da membrana plasmática celular (Lu *et al*, 2002).

As PLA2 apresentam esse amplo aspecto farmacológico pois é possível observar uma capacidade única para ligar-se a órgãos ou tecidos específicos, em decorrência de sua elevada afinidade de ligação específica com glicoproteínas ou receptores de lipídeos (KINI, 2003).

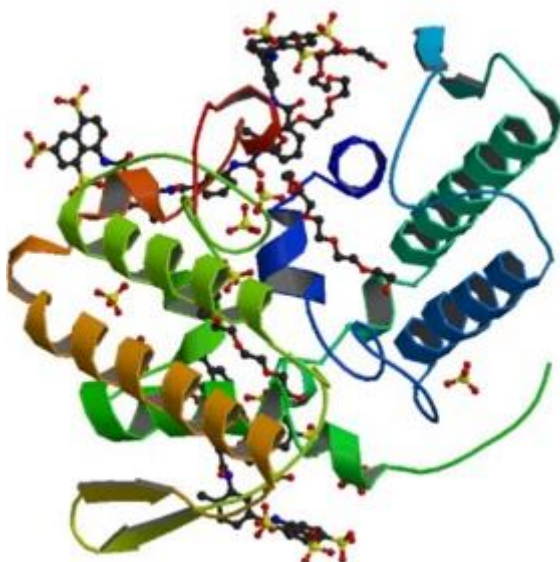


Figura 10. Estrutura tridimensional da Myotoxin-II (acesso pelo PDB: 4YV5), uma fosfolipase encontrada no veneno de *B. moojeni* (SALVADOR & FONTES, 2015).

Tabela 03: Lista de Fosfolipases A2 isoladas de serpentes do gênero *Bothrops*. Adaptado de: TEIXEIRA, 2009.

PLA2	<i>Bothrops</i>	Massa molecular	Referência
PLA2	<i>alternatus</i>	15.000	Nisenbon <i>et al</i> , 1986
BaTX-PLA2	<i>alternatus</i>	13.898	Ponce-Soto <i>et al</i> , 2007
Miotoxina-I	<i>asper</i>	13.981	Gutiérrez <i>et al</i> , 1984
Miotoxina-II	<i>asper</i>	13.739	Lomonte, Gutiérrez, 1989
Miotoxina-III	<i>asper</i>	13.789	Kaiser <i>et al</i> , 1990
Miotoxina-IV	<i>asper</i>	13.886	Díaz <i>et al</i> , 1995
BaPLA2-I	<i>atrox</i>	15.000	Kanashiro <i>et al</i> , 2002
BaPLA2-III	<i>atrox</i>	15.000	Kanashiro <i>et al</i> , 2002
Miotoxina-I	<i>atrox</i>	13.826	Núñez <i>et al</i> , 2004
Mtx-I	<i>brazili</i>	13.870	Costa <i>et al</i> , 2008
Mtx-II	<i>brazili</i>	13.975	Costa <i>et al</i> , 1999
BE-I-PLA2	<i>erythromelas</i>	13.649	Modesto <i>et al</i> , 2006
godMT-I	<i>godmani</i>	14.300	Díaz <i>et al</i> , 1992
godMT-II	<i>godmani</i>	13.713	Díaz <i>et al</i> , 1993
BinTX-I	<i>insularis</i>	13.975	Cogo <i>et al</i> , 2006
BinTX-II	<i>insularis</i>	13.788	Cogo <i>et al</i> , 2006
PLA2	<i>jararaca</i>	14.303	Machado <i>et al</i> , 1993
BthA-I-PLA2	<i>jararacussu</i>	13.700	Andrião-Escarso <i>et al</i> , 2002
SIISPIIA	<i>jararacussu</i>	15.000	Ketelhut <i>et al</i> , 2003
SIISPIIB	<i>jararacussu</i>	15.000	Ketelhut <i>et al</i> , 2004
SIISPIIIA	<i>jararacussu</i>	15.000	Ketelhut <i>et al</i> , 2005
SIISPIIIB	<i>jararacussu</i>	15.000	Ketelhut <i>et al</i> , 2006
BthTX-I	<i>jararacussu</i>	13.800	Brandeburgo <i>et al</i> , 1988
BthTX-II	<i>jararacussu</i>	15.700	Brandeburgo <i>et al</i> , 1989
Bj-IV	<i>jararacussu</i>	15.000	Ponce-Soto <i>et al</i> , 2006
Bj-V	<i>jararacussu</i>	14.039	Ponce-Soto <i>et al</i> , 2007
PLA2	<i>lanceolatus</i>	14.500	Araújo <i>et al</i> , 1994
bIK-PLA2	<i>leucurus</i>	14.000	Higuchi <i>et al</i> , 2007
bID-PLA2	<i>leucurus</i>	14.000	Higuchi <i>et al</i> , 2008
MjTX-I	<i>moojeni</i>	13.737	Soares <i>et al</i> , 2000
MjTX-II	<i>moojeni</i>	13.887	Soares <i>et al</i> , 1998
P1	<i>neuwiedi</i>	15.000	Daniele <i>et al</i> , 1995
P2	<i>neuwiedi</i>	16.200	Daniele <i>et al</i> , 1996
P3	<i>neuwiedi</i>	15.000	Daniele <i>et al</i> , 1997
BnSP-6	<i>neuwiedi</i>	13.500	Rodrigues <i>et al</i> , 1998
BnSP-7	<i>neuwiedi</i>	13.726	Rodrigues <i>et al</i> , 1999
Miotoxina-I	<i>nummifer</i>	16.000	Gutiérrez <i>et al</i> , 1989
Miotoxina-II	<i>nummifer</i>	16.000	Angulo <i>et al</i> , 2000
Bp-PLA2	<i>pauloensis</i>	15.800	Rodrigues <i>et al</i> , 2007
PrTX-I	<i>pirajai</i>	13.729	Mancuso <i>et al</i> , 1995
PrTX-II	<i>pirajai</i>	13.744	Toyama <i>et al</i> , 1995
PrTX-III	<i>pirajai</i>	13.867	Toyama <i>et al</i> , 1999
Miotoxina-I	<i>schelegelli</i>	16.000	Angulo <i>et al</i> , 1999

1.5 *Bothrops moojeni* (Hoge, 1966)

A *Bothrops moojeni* (popularmente conhecida como caíçaca) (Figura 11) é uma das principais serpentes que acomete acidente ofídico, nas áreas por onde ocorre (CAMPBELL & LAMAR, 2004). Sua distribuição geográfica (Figura 12) compreende áreas de cerrado das regiões Sudeste e Centro-Oeste, podendo ser encontrada também no Nordeste e no Sul (LIRA-DA-SILVA, 2009).



Figura 11. Exemplar de uma serpente da espécie *Bothrops moojeni*, capturada no perímetro urbano de Campo Grande – MS, medindo 120 cm. Foto: Breno Emanuel.



Figura 12. Distribuição geográfica da espécie *B. moojeni*. Fonte: UETZ, 2015.

Ocorre em áreas ripárias, brejos, matas de galeria, cerrado, podendo estar presente em áreas alteradas, alimentando-se de roedores, preferencialmente (SAWAYA *et al*, 2008). A *B. moojeni* apresenta uma dentição do tipo solenóglifa, com veneno de ação proteolítica, coagulante e hemorrágica (acidente botrópico) (BERNARDE, 2014).

1.6 Utilização do veneno como ferramenta biotecnológica

Os estudos com os produtos naturais demonstram um papel singular no desenvolvimento e descoberta de novos fármacos. Apesar de os efeitos das toxinas dos venenos de serpentes causarem emergências médicas, em decorrência dos acidentes ofídicos, essas mesmas toxinas, caracterizadas e individualizadas podem apresentar valor biotecnológico, sendo utilizadas para o desenvolvimento de novas drogas (CALVETE *et al*, 2009; KOH *et al*, 2006).

Nos últimos anos, novas classes de antibióticos, incluindo proteínas ou peptídeos antimicrobianos (PAM) de origem animal, tem sido investigado como alternativa à vários problemas, como por exemplo, a resistência microbiana (MATSUZAKI *et al*, 1997). Atualmente, 1009 PAM foram caracterizados a partir dos mais diversos grupos de animais e microrganismos.

Para demonstrar as possíveis aplicações biotecnológicas, a tabela 04 listada abaixo, contém informações a respeito das atividades do veneno de diversas serpentes brasileiras avaliadas contra vários agentes patogênicos.

Tabela 04. Potencial farmacológico e biotecnológico dos componentes dos venenos de serpentes nacionais.

Animal	Componente do veneno	Atividade	Autor/ano
<i>Crotalus durissus</i>	Fosfolipase A 2	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Samy et al./2014
<i>C. adamanteus</i>	FLA A2	<i>B. pseudomalle</i> , <i>E. aerogenes</i>	Samy et al./2014
<i>C. durissus</i>	FLA A2	<i>C. michiganensis</i>	Toyama et al./2014
<i>C. adamanteus</i>	FLA A2	<i>S. aureus</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i>	Samy et al./2005
<i>Bothrops jararacussu</i>	FLA A2	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Roberto et al./2004
<i>B. moojeni</i>	FLA A2	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	Silveira et al./2013
<i>B. pauloensis</i>	FLA A2	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Rodrigues et al./2009
<i>B. moojeni</i>	FLA A2	<i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i>	Stábeli et al./2006
<i>B. pauloensis</i>	FLA A2	Câncer de mama	Azevedo et al./2016
<i>B. pauloensis</i>	FLA A2	Câncer de mama, Leucemia	Rodrigues et al./2009
<i>B. moojeni</i>	FLA A2	Câncer de mama, Leucemia	Stábeli et al./2006
<i>B. asper</i>	FLA A2	Câncer de mama	Araya, Lomonte/2007
<i>B. maogrossensis</i>	FLA A2	Leucemia	Moura et al./2014
<i>B. marajoensis</i>	FLA A2	<i>L. amazonensis</i> e <i>L. chagasi</i>	Costa et al./2010
<i>B. asper</i>	FLA A2	<i>P. falciparum</i>	Castillo et al./2012
<i>B. jararaca</i>	FLA A2	<i>Trypanossoma cruzi</i>	Deolindo et al./2005
<i>C. durissus cumanensis</i>	FLA A2	<i>P. falciparum</i>	Quintana et al./2012
<i>B. pauloensis</i>	FLA A2	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. donovani</i>	Rodrigues et al./2009
<i>B. moojeni</i>	FLA A2	<i>Leishmania spp.</i>	Stábeli et al./2006
<i>B. maogrossensis</i>	FLA A2	<i>L. amazonenses</i>	Moura et al./2014
<i>C. durissus</i>	FLA A2	<i>L. infantum chagasi</i>	Barros et al./2015
<i>C. durissus cumanensis</i>	FLA A2	<i>P. falciparum</i>	Quintana et al./2012
<i>C. durissus</i>	FLA A2	<i>L. amazonensis</i>	Passero et al./2008
<i>C. durissus terrificus</i>	FLA A2	HIV	Villarrubia et al./2004

<i>C. durissus terrificus</i>	FLA A2	<i>Flavivírus sp.</i> (Dengue)	Muller et al./2014
<i>B. leucurus</i>	FLA A2	<i>Flavivírus sp.</i> (Dengue)	Cecilio et al./2013
<i>C. durissus</i>	FLA A2	Antiviral	Muller et al./2012
<i>B. moojeni</i>	FLA A2	Atividade de agregação plaquetária	Silveira et al./2013
<i>C. durissus</i>	Crotoxina e Fosfolipases A2	<i>Flavivírus sp.</i> (Dengue e febre amarela)	Muller et al./2011
<i>B. asper</i>	Miotoxina-II	<i>S. enterica</i> e <i>S. aureus</i>	Santamaría et al./2005
<i>C. durissus</i>	Crotamina	<i>E. coli</i>	Oguiura et al./2011
<i>C. durissus</i>	Crotamina	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. neoformans</i>	Yamane et al./2013
<i>C. durissus</i>	Crotoxina	Analgésico	Neto et al./2008
<i>C. durissus</i>	Crotoxina	Analgésico	Zhang et al./2006
<i>B. colombiensis</i>	Disintegrina	Câncer de pele	Sánchez et al./2009
<i>B. alternatus</i>	Extrato bruto	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i>	Bustillo et al./2008
<i>B. jararaca</i>	EB	Câncer de mama	da Silva et al./2002
<i>B. jararaca</i>	EB	Ehrlich	Silva et al./2002
<i>C. viridis</i>	EB	<i>T. cruzi</i>	Adade et al./2010
<i>B. leucurus</i>	L-Amino ácido oxidase	<i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	Torres et al./2010
<i>B. moojeni</i>	LAO	<i>E. coli</i> e <i>S. typhimurium</i>	Stábeli et al./2007
<i>B. pirajai</i>	LAO	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Izidoro et al./2006)
<i>C. durissus</i>	LAO	<i>S. aureus</i> , <i>A. baumannii</i>	Vargas et al./2013
<i>C. durissus cascavela</i>	LAO	<i>X. axonopodis</i> , <i>S. mutans</i>	Toyama et al./2006
<i>B. moojeni</i>	LAO	<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i>	Stábeli et al./2007
<i>B. matogrossensis</i>	LAO	<i>B. subtilis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i>	Okubo et al./2012
<i>B. jararaca</i>	LAO	<i>S. aureus</i>	Ciscotto et al./2009
<i>B. jararaca</i>	LAO	Câncer de mama	Santos et al./2008
<i>B. moojeni</i>	LAO	Câncer de mama	Stábeli et al./2007
<i>B. pirajai</i>	LAO	Leucemia	Izidoro et al./2006)
<i>B. moojeni</i>	LAO	Ehrlich	Stábeli et al./2007
<i>B. leucurus</i>	LAO	Câncer de estômago	Nauman et al./2011
<i>B. pirajai</i>	LAO	Câncer de ovário	Burin et al./2013

<i>B. jararaca</i>	LAO	<i>T. cruzi</i>	Deolindo et al./2009
<i>B. atrox</i>	LAO	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. donovani</i> e <i>L. major</i>	Paiva et al./2011
<i>B. jararaca</i>	LAO	Dengue; <i>T. cruzi</i> e <i>L. chagasi</i>	Sant'ana et al./2008
<i>B. moojeni</i>	LAO	<i>T. cruzi</i>	Stábeli et al./2007
<i>B. jararaca</i>	LAO	<i>L. amazonenses</i>	Ciscotto et al./2009
<i>B. jararaca</i>	LAO	<i>T. cruzi</i>	Deolindo et al./2010
<i>B. pirajai</i>	LAO	<i>T. gondii</i>	Izidoro et al./2011
<i>B. jararaca</i>	LAO	<i>T. cruzi</i>	Deolindo et al./2012
<i>C. durissus</i>	LAO	<i>L. amazonensis</i>	Toyama et al./2006
<i>B. jararaca</i>	LAO	<i>Flavivírus sp.</i> (Dengue)	Sant'ana et al./2008
<i>B. leucurus</i>	Lectina tipo-C	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i>	Nunes et al./2011
<i>C. durissus</i>	Lectina tipo-C	<i>X. axonopodis</i> e <i>C. michiganensis</i>	Rádis-Baptista et al./2014
<i>B. atrox</i>	Lectina tipo-C	<i>E. coli</i>	Sartim, Sampaio/2015
<i>B. atrox</i>	Lectina tipo-C	Leucemia	Sartim, Sampaio/2015
<i>B. leucurus</i>	Lectina tipo-C	Leucemia, carcinoma	Nunes et al./2012
<i>B. jararacussu</i>	Lectina tipo-C	Câncer de estômago	Nolte et al./2012
<i>B. jararaca</i>	Metaloprotease	Câncer de pele	Corrêa Jr et al./2002
<i>B. brazili</i>	Metaloprotease	<i>P. falciparum</i>	Kayano et al./2015
<i>B. jararaca</i>	Pep5Bj	Antifúngico	Gomes et al./2005
<i>B. moojeni</i>	Serinoprotease	Coagulante	You et al./2004

A biodiversidade, particularmente a disponível no Brasil, expões a valiosa oportunidade de pesquisa de moléculas farmacologicamente ativas e possibilita o acesso a soluções para patologias que a natureza foi capaz de gerar (Selistre-de-Araújo *et al*, 2007) e, conforme apresentado nos tópicos anteriores, podemos perceber que os componentes dos venenos de serpentes podem fornecer importantes informações biológicas e aplicações biotecnológicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Isolamento e caracterização bioquímica de uma fosfolipase proveniente do veneno de *Bothrops moojeni*.

2.2. Específicos

- Extração da peçonha da espécie *Bothrops moojeni*.
- Purificação de fosfolipase proveniente da peçonha de *B. moojeni*;
- Caracterizar bioquimicamente o extrato bruto e as frações provenientes de cromatografia por eletroforese unidimensional e espectrometria de massa;
- Caracterizar bioquimicamente a atividade proteolítica da fração rica em fosfolipase A2;
- Avaliar o efeito das frações contra cepas bacterianas.

Material e métodos

Material Biológico

O Biotério da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), localizado no município de Campo Grande - MS recebe animais silvestres, provindos de doações da população do estado de Mato Grosso do Sul, da Polícia Militar Ambiental, Corpo de Bombeiros e afins. Todas as serpentes peçonhentas que chegam ao setor são mantidas em caixas de polietileno incolor (30 x 50 x 30cm). Cada serpente permanece em uma caixa individual (cativeiro intensivo – Figura 13), com água *ad libitum* e com papelão ondulado, que possa auxiliar nas trocas de pele dos indivíduos. A criação, o manejo e a alimentação das serpentes, são realizados de acordo com Melgarejo-Giménez (2002).



Figura 13: Cativeiro intensivo onde todas as serpentes peçonhentas do Biotério/UCDB são mantidas. Foto: Breno Frihling.

A metodologia utilizada para captura da serpente e extração do veneno, foi descrita por Santa-Rita (2011). Na extração, as serpentes foram manuseadas com auxílio de um gancho herpetológico e introduzidas em um tubo de PVC transparente (Figuras 14A, B e C), de onde foram retiradas e contidas na região posterior da caixa craniana, utilizando o dedo indicador e médio para a contenção direta do animal. Para proceder a extração, uma leve pressão foi feita, provocando a abertura da boca do animal e a exposição das presas, que foram introduzidas na membrana do coletor (becker vedado com parafilme - Figura 14D). Logo após a extração, o veneno foi acondicionado em tubo tipo eppendorf de 2 mL devidamente identificado, a uma temperatura de -20° C, no laboratório de Biologia molecular e Proteômica, Bloco BioSaúde, S-Inova, da UCDB.

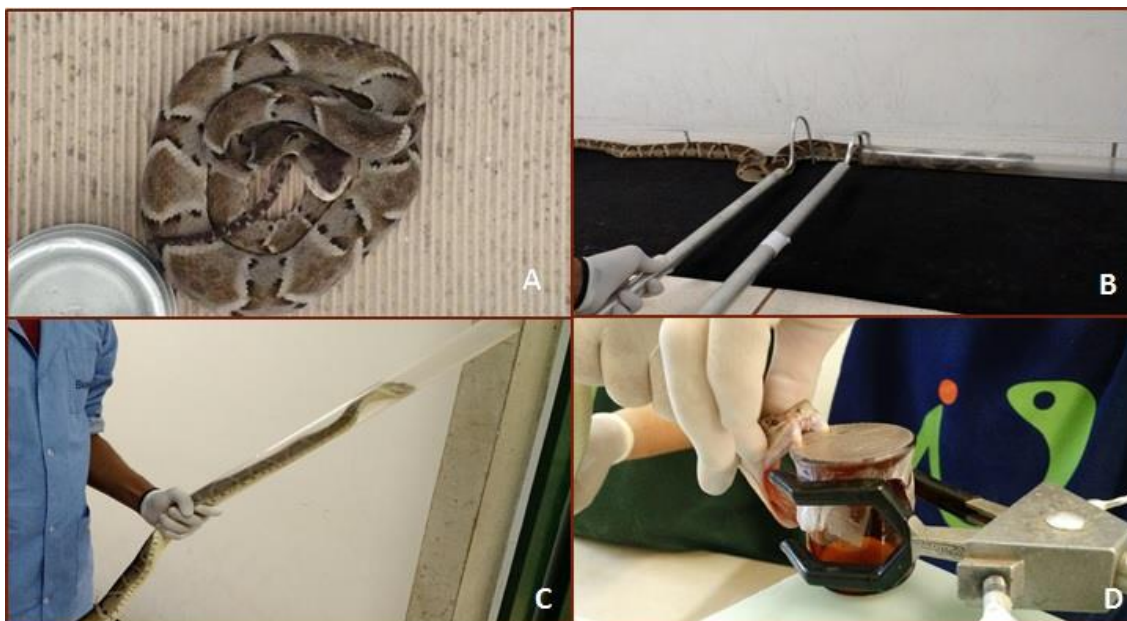


Figura 14: (A, B e C) Processo de imobilização da serpente para extração; (D) Extração do veneno, em um Becker vedado com parafilme. Fotos: Breno Frihling.

Quantificação proteica

As proteínas presentes na peçonha foram quantificadas a partir do método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão, nas concentrações de 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 e 1,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nesta técnica, a interferência das proteínas com absorvância do corante Comassie Brilliant Blue G-250 em meio altamente ácido resulta em modificação proporcional da cor detectável em um comprimento de onda 595 nm.

Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A massa molecular da peçonha e das frações em adição com o grau de pureza da proteína purificada, foram estimadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, nas concentrações de 12% para o gel separador e 5% para o gel empilhador, na presença de SDS, a partir da metodologia descrita por Laemmli (1970). Para essa finalidade, as amostras foram diluídas em tampão da amostra (reduzidor) 2x (Tris-HCl 1 M pH 6,8; glicerol 30%, SDS 9%; azul de bromofenol 1%, β -mercaptoetanol 20%), sem processo de incubação. A corrida ocorreu com uma voltagem constante (75 V), por aproximadamente 2 horas, conduzidas com tampão de corrida (Tris 25 mM; glicina 0,1 M, SDS 1%; pH 7,6). Em cada poço do gel, foi aplicado 15 mg de

proteína. Para a comparação de peso molecular, foi utilizado o padrão de peso molecular PROMEGA® (The Broad Range Protein Molecular Weight Markers - possuindo os seguintes massas moleculares: 225, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 15 e 10 kDa). Após o término das corridas, os géis foram corados com a solução corante de *Comassie Brilliant Blue* (água, metanol, ácido acético e *Coomassie Brilliant Blue*), durante 30 min e, logo em seguida, descorados com água destilada, sendo mantidos sobre leve agitação.

Purificação da peçonha

Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S100

O veneno bruto de *B. moojeni* foi parcialmente purificado, através de cromatografia de exclusão molecular. Após a quantificação, foi aplicado 10 µg do veneno bruto, diluído em 1 mL de tampão AMBIC (Tampão bicarbonato de amônia, 50 mM, pH 7,6), em um sistema aberto de cromatografia, contendo 300 mL de resina Sephacryl S100, equilibrada com o mesmo tampão. O fluxo manteve-se constante (0,625 mL.min⁻¹). A detecção foi realizada por meio da leitura da absorbância em 280 nm.

Cromatografia líquida de alta performance

Após a etapa da cromatografia de exclusão molecular, a fração III do veneno de *B. moojeni* e o extrato bruto do muco do ferrão de *P. falkneri* foram aplicados em cromatografia de fase reversa HPLC (NST C-18) coluna analítica, usando gradiente linear de 5-95% de acetonitrila em ácido trifluoracético 0,1% (v:v). O fluxo de 2,5 mL.min⁻¹ foi utilizada para a obtenção de novas frações. As eluições protéicas serão monitoradas a 216 e 280 nm. As frações coletadas foram identificadas e liofilizadas.

Espectrometria de massas

As frações liofilizadas serão solubilizadas em água Milli-Q, misturadas em uma solução saturada de uma matriz constituída por ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (DHB) e ácido sinapínico (SA), depositada em uma placa do tipo *MTP 384 massive* e secas a temperatura ambiente. Os compostos terão suas massas moleculares exatas determinadas, utilizando um espectrômetro de massa do tipo MALDI ToF/ToF Ultraflex III (Bruker Daltonics). Os espectros foram

calibrados externamente com insulina e os valores obtidos serão comparados com outros resultados para a comprovação da massa das frações.

Atividade proteolítica sobre azocaseína

O veneno fracionado de *B. moojeni* foi diluído em soluções de trabalho à uma concentração de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, diluídos em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2 + 20 mM de CaCl_2 . Os ensaios foram realizados com variação de sete concentrações do veneno (como fonte enzimática), partindo de uma quantidade inicial de 1,5 μg , com aumento crescente, até a quantidade final de 30 μg . Alíquotas da enzima contendo a quantidade desejada de proteínas foram distribuídas em tubos de polipropileno de 2 mL e o volume foi completado para 500 mL com adição do tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2 + 20 mM de CaCl_2 . Todos os tubos foram incubados em banho-maria à 37°C por 10 minutos, e, após esse tempo, foi adicionado 200 μL de azocaseína 1% em todos os tubos de teste. O tempo de incubação das amostras variou em 15, 30, 45 e 60 minutos, respectivamente, para todas as sete concentrações diferentes da enzima. Decorrido o tempo, as amostras foram retiradas do banho-maria, sendo a reação interrompida com a adição de 300 μL de ácido tricloroacético 20% em todos os tubos, e então adicionado 200 μL de azocaseína 1% nos tubos de teste em branco. As amostras foram centrifugadas à 10000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Alíquotas de 500 μL foram transferidas para novos tubos com adição de mesmo volume de NaOH 2N. Os fragmentos solúveis resultantes da hidrólise foram monitorados à 440 nm em espectrofotômetro.

Atividade antibacteriana

Para avaliar a atividade antibacteriana a concentração inibitória mínima (CIM) das amostras obtidas a partir da bioprospecção das toxinas, o método de microdiluição em caldo de acordo M7-A6 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (CLSI, 2012) em microplaca de 96 poços foi utilizado. A bactéria obtida por meio de isolado clínico *Staphylococcus aureus* foi utilizada para todos os experimentos. A bactéria foi inoculada isoladamente em caldo Mueller-Hinton até atingir uma densidade 10^8 UFC.mL^{-1} . Após isso, foram semeadas sobre a superfície de placas de Petri de 150 mm de diâmetro contendo Ágar Mueller-Hinton. Alíquotas dos compostos a serem testados foram diluídas em solventes apropriados para obtenção de diferentes concentrações. A suspensão bacteriana ajustada

(1×10^6 UFC.mL⁻¹) foram aplicadas em cada poço da microplaca contendo as amostras. As microplacas foram incubadas a 37°C sem agitação e a leitura da densidade óptica (DO 600 nm) foi realizada após 24 horas no leitor de microplacas BioTek. A título de comparação serão utilizados como tentativa de controle para de crescimento bacteriano os antibióticos comerciais tetraciclina. Cada experimento foi realizado com réplicas técnica e biológica. Todos os dados serão expressos em porcentagem de crescimento.

Ensaio de inibição de biofilme em microplaca

Diluições na proporção 1:100 da cultura bacteriana crescida durante 18h em meio Luria Bertani, serão incubadas em meio BM2 [62 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7), 7 mM de (NH₄)₂SO₄, 2 mM de MgSO₄, 10 mM de FeSO₄ e 0,4% de glucose (m:v)] em microplacas de 96 poços por 24 h a 37°C. CIM dos peptídeos contra as células planctônicas serão acessadas por densidade óptica a 600 nm em um leitor de placas de microplacas. Em seguida, as células planctônicas foram removidas e os poços da microplaca serão lavados duas vezes com água desionizada. As bactérias aderidas aos poços da microplaca serão coradas com 100 mL de violeta de cristal a 0,1% durante 20 minutos. As microplacas serão lavadas duas vezes com água desionizada, secas ao ar e ressolubilizadas com 110 mL de etanol a 70%. O conteúdo da microplaca será transferido para uma nova microplaca e a concentração mínima inibitória (CIM) das amostras contra os biofilmes foram monitoradas a 595 nm em um leitor de microplacas.

Resultados e discussão

Os componentes isolados de venenos de serpentes em geral, podem servir como base no entendimento das funções desses constituintes ao relacionarmos o processo fisiopatológico em um envenenamento, além de aplicações biotecnológicas. A escolha da metodologia adequada para purificação de uma determinada molécula deve ser direcionada de acordo com suas características. Sabendo dessas informações, o processo de cromatografia tende a facilitar na purificação desejada (STÁBELI et al., 2012). Após a extração dos extratos, os mesmos foram identificados e mantidos sobre refrigeração constante (-20 °C) até o momento das análises.

No presente trabalho, foi utilizado três passos cromatográficos para isolar a fosfolipase de interesse: cromatografia de exclusão molecular (tampão bicarbonato de amônia pH. 7,8) e interação hidrofóbica. No primeiro passo cromatográfico, foi possível observar 5 frações principais, sendo a fração 3 alvo do estudo, pois apresentou, em SDS-PAGE e MALDI ToF, massa molecular relativa à outras fosfolipases descritas na literatura.

Após esse primeiro passo cromatográfico, a fração escolhida passou por uma etapa de purificação por HPLC, onde, as novas frações foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE. Nesse segundo passo cromatográfico, foi possível observar a presença de 4 frações, nomeadas de A, B, C e D. Os passos cromatográficos adotados para o presente estudo, foram observados nos trabalhos de Denegri e colaboradores (2010), Ponce-Soto e colaboradores (2007), Kanashiro e colaboradores (2002) e Perchuc e colaboradores (2010).

Estimativa da massa molecular do veneno bruto por SDS-PAGE

Foi realizado a análise eletroforética do extrato bruto em gel de poliacrilamida, obtendo o perfil proteico indicado na figura 15.

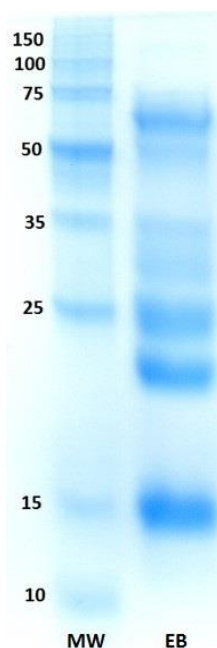


Figura 15. Perfil eletroforético do extrato bruto do veneno de *Bothrops moojeni*. MW: Marcador; EB: Extrato Bruto.

O perfil eletroforético de *B. moojeni* apresentou 8 bandas: 1 – 15 kDa; 2 – 20 kDa; 3 – 25 kDa; 4 – 30 kDa; 5 – 35 kDa; 6 – 50 kDa; 7 – 70 kDa; 8 – 110 kDa. Como a metodologia utilizada não é uma metodologia de grau analítico, as bandas apresentam massas aproximadas, quando comparadas ao padrão utilizado.

Para termos uma breve caracterização do perfil proteico do extrato bruto do veneno de *B. moojeni*, podemos observar bandas que indicam a presença de: Fosfolipases (15 kDa) (MOURA *et al*, 2014); Serinoproteases e lectinas tipo C (de 20 à 30 kDa) (NOLTE *et al*, 2012); L amino ácido oxidases (subunidades de aproximadamente 50 kDa) (STÁBELI *et al*, 2007); Metaloproteases de todas as classes (KAYANO *et al*, 2015), entre outros grupos proteicos.

Em condições não redutoras, as fosfolipases podem apresentar formas diméricas, com aproximadamente 28 kDa, porém, quando está reduzida com a presença de β -mercaptoetanol, apresenta massas relativas de aproximadamente 14 kDa, o que corrobora com as bandas analisadas. Esses tratamentos redutores (β -mercaptoetanol e SDS), podem ser eficientes na dissociação de possíveis agregados unidos por interações hidrofóbicas, eletrostáticas ou ligações dissulfeto.

Cromatografia de exclusão molecular

Os passos para a purificação de uma fosfolipase presente no veneno de *B. moojeni*, foram feitos conforme Perchuce colaboradores (2010), onde foi utilizado um passo cromatográfico por gel filtração seguido de cromatografia de fase reversa.

Após a realização da quantificação proteica (a partir do método de Bradford) foi aplicado 10 mg da amostra, diluída para 1 mL do tampão de eluição (bicarbonato de amônia, 50 mM, pH7,8). Foram coletados 2,5 mL por tubo, totalizando 120 tubos em cada cromatografia realizada (Figura 21).

O extrato bruto da peçonha apresentou um perfil de exclusão molecular com 5 frações distintas conforme indicado na figura 16.

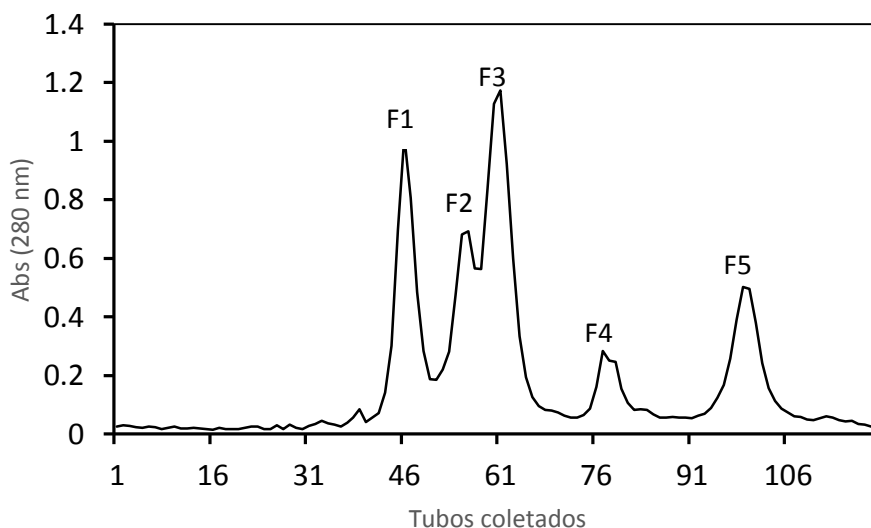


Figura 16. Perfil cromatográfico do veneno bruto de *B. moojeni* obtido por cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100). O extrato bruto foi eluído no tampão bicarbonato de amônia em fluxo constante de 0,625 mL.min⁻¹. A detecção dos tubos foram feitas pela leitura de absorbância.

A cromatografia de exclusão molecular separa as moléculas de um determinado extrato de acordo com suas massas, onde apresentam diferentes graus de interação com a resina cromatográfica.

As frações obtidas, foram nomeadas de F1 (110 minutos de retenção), F2 (140 minutos de retenção), F3 (150 minutos de retenção), F4 (190 minutos de retenção) e F5 (237 minutos de retenção). Esses resultados são similares quando comparados ao trabalho de Ponce-Soto e colaboradores (2007), onde foi realizado uma cromatografia de exclusão molecular, utilizando a resina Superdex 75, obtendo 4 frações onde os tempos de retenção das frações foram de 70, 95, 130 e 140 minutos

e, a fração utilizada pela maior atividade fosfolipática foi a terceira, de 130 minutos de retenção.

Passero e colaboradores (2008) purificaram uma fosfolipase proveniente do veneno de *Crotalus durissus* adotando o procedimento de cromatografia de exclusão molecular e fase reversa, ambas em HPLC. No primeiro passo foi observado uma alta atividade fosfolipática em uma fração que apresentou 85 minutos de retenção. Kanashiro e colaboradores (2002) adotaram um processo para purificação de fosfolipase similar, utilizando exclusão molecular seguido de fase reversa. Nesse trabalho, eles observaram 9 frações na cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100) onde, a cromatografia com maior atividade foi obtida a partir do tubo 41, porém, adotou-se o fluxo de $1,25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e, além disso, o sistema cromatográfico também foi fechado (HPLC).

Mancuso e colaboradores (1994) obtiveram uma fosfolipase, nomeada de Piratoxin-I, obtida a partir do veneno de *B. pirajai*. Eles utilizaram cromatografia de exclusão molecular e troca iônica. No primeiro passo cromatográfico, foi observada a presença de 5 frações, onde a terceira fração, apresentando um tempo de retenção de aproximadamente 140 minutos, mostrou uma elevada atividade fosfolipática.

Após cada uma das cromatografias, os tubos que apresentaram uma fração, foram agrupado em um tubo falcon e, posterior liofilização e armazenagem em -20°C . Para verificar a eficácia da cromatografia, aplicou-se as frações obtidas em gel de poliacrilamida (SPS-PAGE 12%) (figura 17), nas mesmas condições citadas anteriormente.

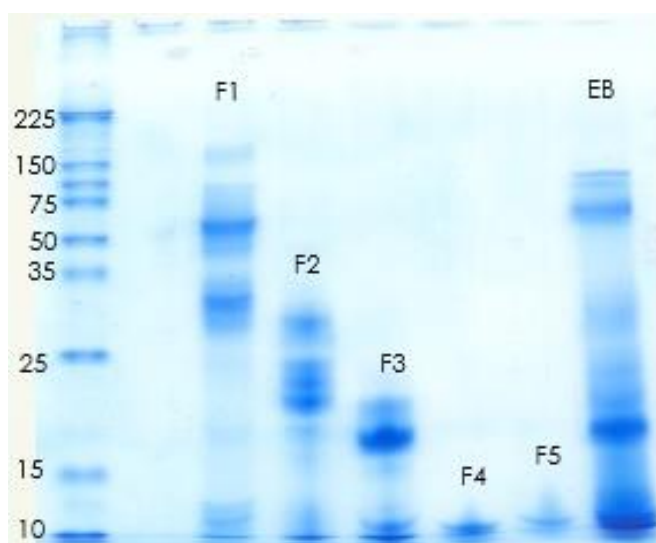


Figura 17. Perfil eletroforético das frações obtidas a partir da cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S100). As frações foram agrupadas em tubos do tipo falcon e, 15 µg de proteínas de cada fração foi aplicado no gel SDS-PAGE 12%.

Com o perfil proteico das frações coletadas após a cromatografia de exclusão molecular, podemos observar uma separação parcial do extrato bruto. Como foi mostrado na figura 15, a eletroforese identificou 8 bandas, aproximadamente e, como citado na revisão de literatura, as fosfolipases A2 apresentam entre 14 e 18 kDa. Com isso, podemos observar, na fração 3, uma massa molecular similar à literatura.

Após a coleta das 5 frações, os materiais foram agrupados em tubos do tipo falcon e liofilizados para concentrar as amostras. Segunindo, todas as frações foram re-suspendidas e quantificadas, pela metodologia de Bradford, constatando-se uma média de 20 mg.mL⁻¹ de proteína em cada uma das frações.

Espectrometria de massas

As proteínas previamente purificadas foram observadas como bandas parcialmente isoladas em gel SDS-PAGE (para uma análise primária, não analítica) e, em seguida, confirmado a massa das frações obtidas por MS (Figura 18), apresentando, em geral, nas frações III e IV, massas similares às massas de fosfolipases descritas na literatura e, na fração III, foi encontrado uma massa com peso idêntico à PrTCIII, uma fosfolipase isolada do veneno de *Bothrops pirajai*, apresentando 13.867 Da e ponto isoelétrico 8,5.

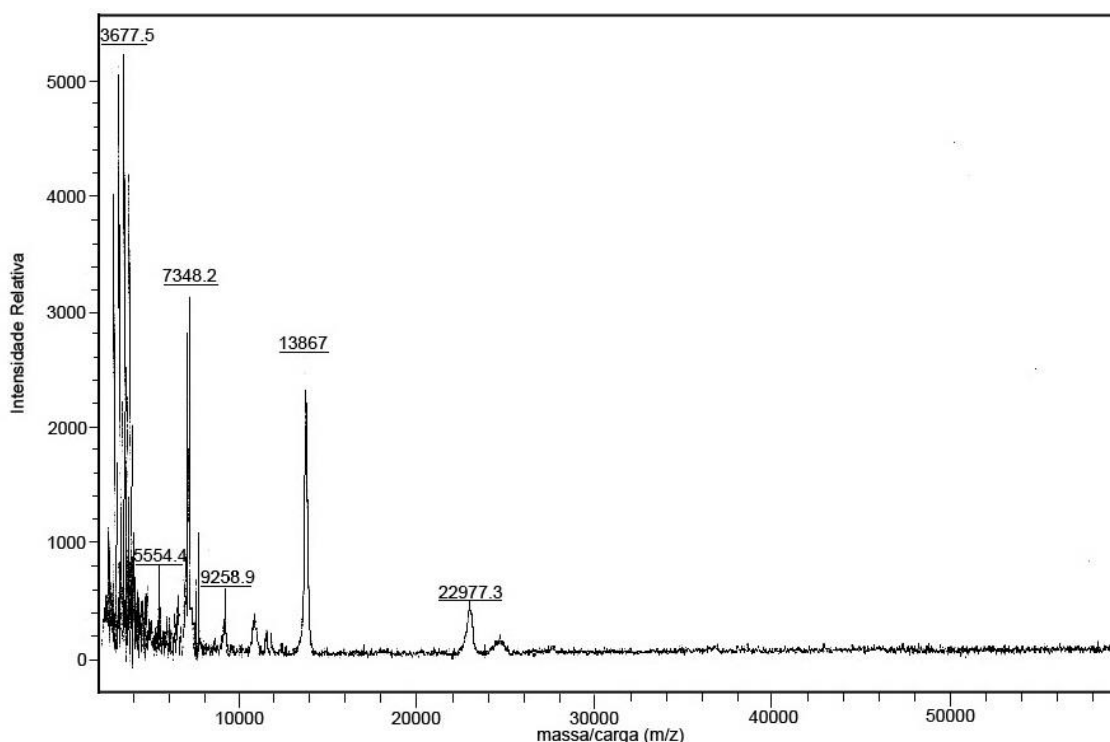


Figura 18. Determinação de massa por espectrometria. A massa das frações foram obtidas em sistema MALDI-ToF, operado em modo linear usando os íons de insulina para calibração externa. Os espectros de massa obtidos foram submetidos a uma subtração automática de linha de base.

Além da PrTCIII, podemos citar outras fosfolipases que apresentaram massas moleculares similares: BthTX-I, apresentando 13.800 Da (BRANDEBURGO *et al*, 1988), BaTX-PLA2, com 13.898 Da (PONCE-SOTO *et al*, 2007), BE-I-PLA2, com 13.649 Da (MODESTO *et al*, 2006), BthA-I-PLA2 com 13.758 Da (ROBERTO, *et al*, 2004), BmooPla₂ com 13.601 Da (SILVEIRA *et al*, 2013), BnSp-7 com 13.726 Da (RODRIGUES *et al*, 1999), MjTX-II com 13.887 (SOARES *et al*, 1998), BnSP-6 com 13.500 Da (RODRIGUES *et al*, 1998), CaTxII com 13.675 Da (SAMY *et al*, 2014).

Os valores de massa molecular observados pela espectrometria de massas confirmam os valores relativos observados no gel de poliacrilamida. A massa molecular de aproximadamente 14kDa das PLA2 isoladas são similares as do veneno de outros membros da família Viperidae, sendo para esta família, descritas PLA2 com massa molecular entre 13 e 17kDa (SIX e DENNIS, 2011).

Atividade proteolítica sobre azocaseína - FIII

Para verificar a atividade proteolítica da fração III, foram realizados testes enzimáticos com azocaseína (Figura 19) e, para o comparativo, foi utilizado a atividade de tripsina ($15\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Como indicado na figura 24, a atividade da fração III, com a menor concentração testada, foi similar à atividade da tripsina avaliada (100% relativo).

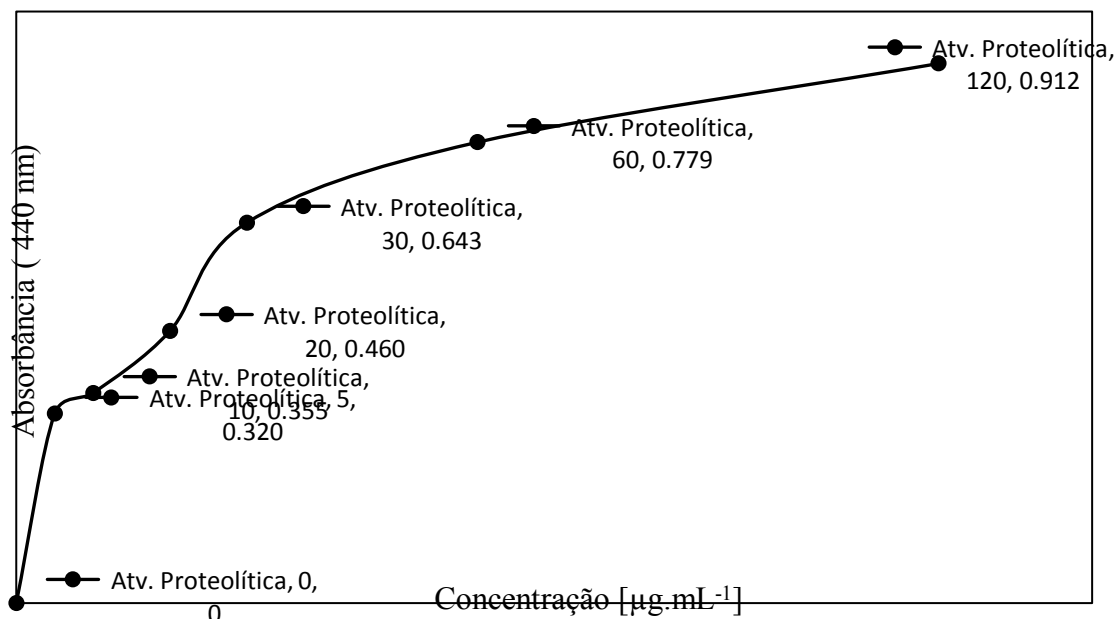


Figura 19. Atividade proteolítica sobre azocaseína (substrato) utilizando diferentes concentrações da amostra. As concentrações avaliadas foram: 5, 10, 20, 40, 60 e $120\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Cromatografia líquida de alta performance

A cromatografia de fase reversa pode separar as moléculas de acordo com diferenças de hidrofobicidade, a partir de passos de eluição. Com isso, foi escolhido a F3, uma das frações resultantes do primeiro passo cromatográfico, para ser aplicada no sistema de HPLC (Figura 20). Por meio desta técnica, foi possível observar a presença de quatro frações, com diferentes tempos de eluição, variando de acordo com a concentração de acetonitrila (A: 42%; B: 45.4%; C: 49.7%; D: 52.2% de acetonitrila). Após as cromatografias, as frações obtidas foram liofilizadas e armazenadas.

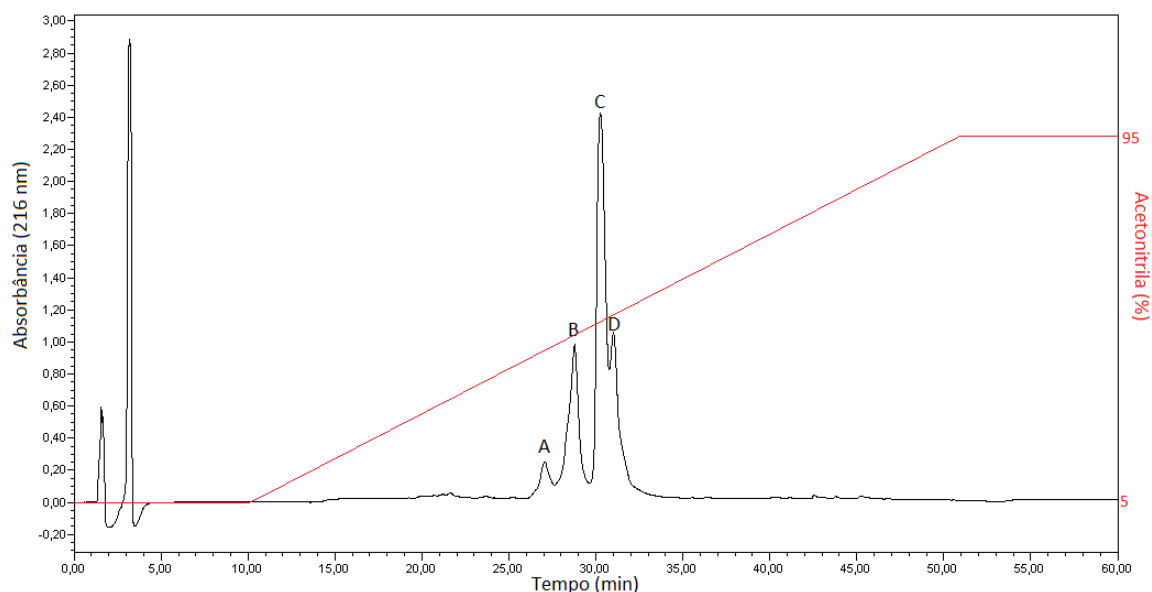


Figura 20. Perfil cromatográfico da fração III do veneno de *B. moojeni* após a aplicação da fração em cromatografia de fase reversa (C 18). As frações obtidas após esse processo, foram denominadas de A, B, C e D.

Para verificar a pureza das frações após a primeira passagem na coluna C-18, foi realizado uma segunda aplicação em SDS-PAGE (figura 21), onde foi possível observar a presença de bandas abaixo de 25 kDa e, mais especificamente, a presença de uma banda majoritária, na fração D, com aproximadamente 13 kDa, se comparado ao marcador, indicando a presença de uma fosfolipase.

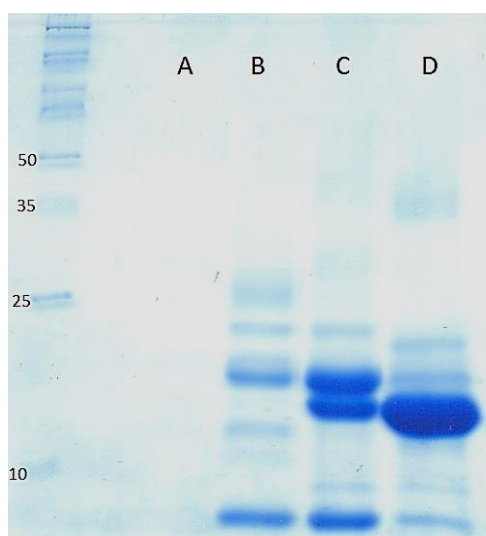


Figura 21. Perfil proteico por SDS-PAGE da FIII (exclusão molecular) do veneno de *B. moojeni* após a aplicação da fração em cromatografia de fase reversa (C 18).

Como mencionado anteriormente, a porcentagem de acetonitrila necessária para a eluição da fração D foi de 52.2%. A fosfolipase BaTX, foi obtida com aproximadamente 49% de acetonitrila, após um processo de cromatografia de fase reversa (PONCE-SOTO *et al*, 2007). Segundo Oliveira e colaboradores (2011), foi possível obter uma fosfolipase, a BthTX-II, a partir de dois passos cromatográficos (troca iônica e fase reversa), apresentando 50% de acetonitrila para sua eluição.

Após um único passo cromatográfico (fase reversa), Ponce-Soto e colaboradores (2009) obtiveram uma fosfolipase, nomeada de BaTXII, da peçonha de *B. alternatus*, apresentando 52% de acetonitrila para sua eluição. Para purificar duas fosfolipases da peçonha de *B. atrox*, Kanashiro e colaboradores (2002) observaram a eluição das moléculas com 50% (BaPLA₂I) e 54% (BaPLA₂III) de acetonitrila.

Toyama e colaboradores (2014) obtiveram uma fosfolipase da peçonha de *C. durissus*, com aproximadamente 14 kDa, onde apresentou uma eluição com aproximadamente 54% de acetonitrila. Após dois processos cromatográficos, ambos de fase reversa, foi possível obter uma fosfolipase, apresentando aproximadamente 55% de acetonitrila para eluição. Essa molécula foi purificada a partir da peçonha de *B. asper* (CASTILLO, *et al*, 2012).

Uma fosfolipase, nomeada de Crotoxin B, presente no veneno de *C. durissus* foi purificada, a partir de uma cromatografia de exclusão molecular seguido de cromatografia de fase reversa, apresentando aproximadamente 54% de acetonitrila para sua eluição (QUINTANA, *et al*, 2012). Para purificar a Lys-49, uma fosfolipase presente no veneno de *B. pauloensis*, foi utilizado dois passos cromatográficos onde a molécula alvo apresentou aproximadamente 14 Da, sendo necessário 47% de acetonitrila para sua eluição (AZEVEDO *et al*, 2015).

Segundo de Moura e colaboradores (2014), foi possível eluir uma fosfolipase com 47% de acetonitrila, a Asp49, presente na toxina da *B. matogrossensis*. Foi observado aproximadamente 80% de acetonitrila para eluir uma fosfolipase do veneno de *B. jararacussu*, uma porcentagem superior se comparar com as demais citadas.

Após o segundo passo cromatográfico, a fração “D” foi re-cromatografada, a fim de obter uma fração mais pura, tendo em vista que no gel, observou-se uma banda, sugerindo a presença concentrada de fosfolipase, porém, contaminada com outras frações, menos concentradas.

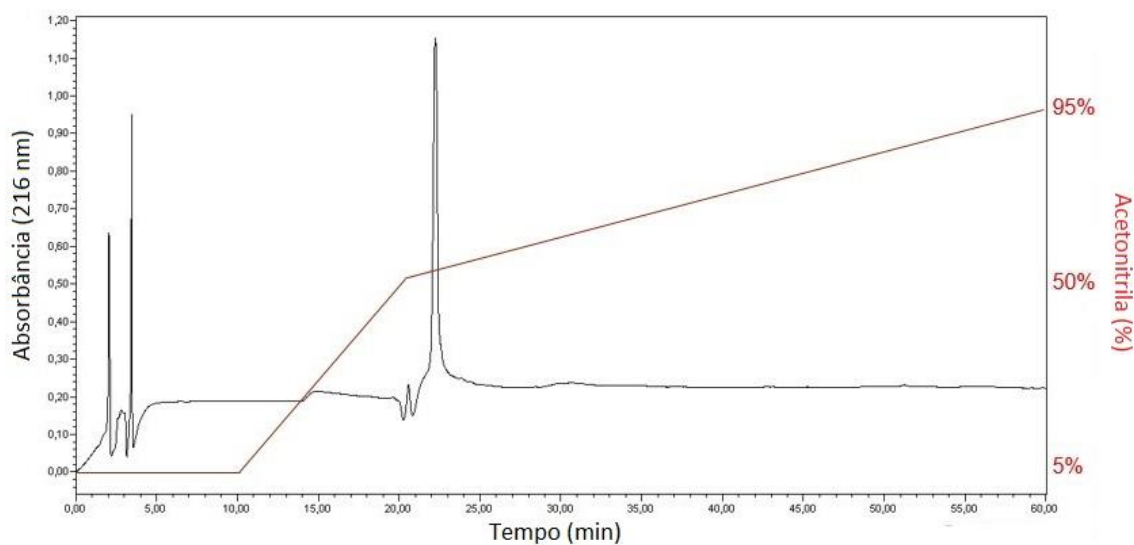


Figura 22. Perfil cromatográfico da fração D após a aplicação da fração em cromatografia de fase reversa (C 18). As frações obtidas após esse processo, foram denominadas de E e F. O gradiente do solvente orgânico apresentou

A recromatografia consistiu no mesmo processo adotado anteriormente, com a concentração de acetonitrila variando de 5-95%. Após esse terceiro passo cromatográfico, as frações foram coletadas, liofilizadas.

Após a terceira etapa cromatográfica, foi realizado uma nova avaliação de atividade proteolítica sobre caseína (Figura 23).

Atividade proteolítica sobre azocaseína – Fração F

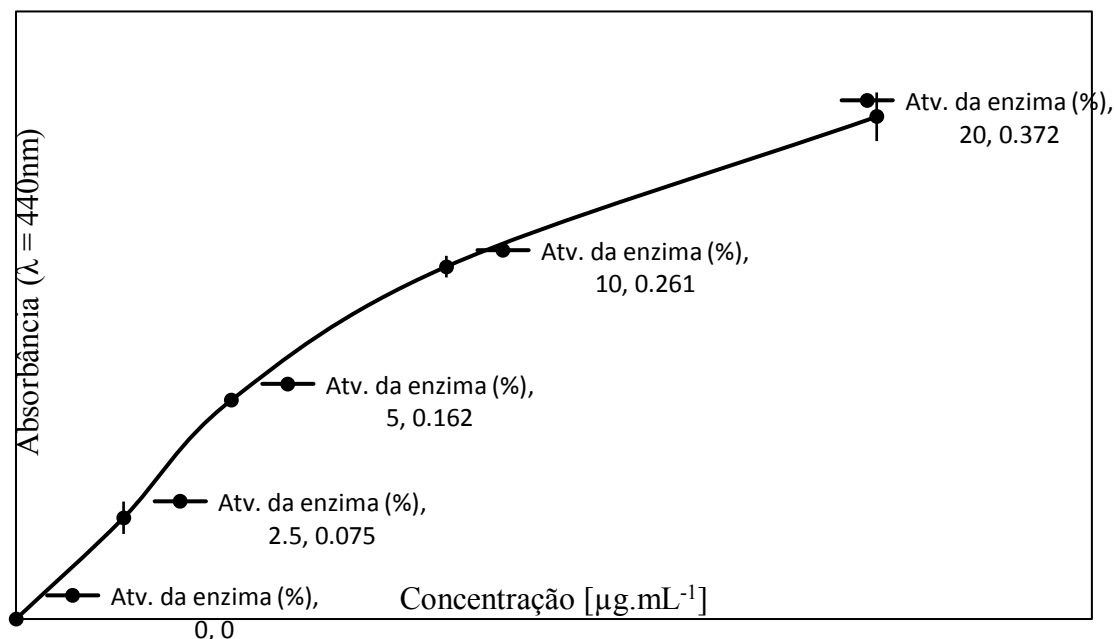


Figura 23. Avaliação da atividade proteolítica da fração F do veneno de *B. moojeni*, verificada com diferentes concentrações da fração testada.

Após a terceira etapa cromatográfica, foi realizado uma nova avaliação de atividade proteolítica sobre caseína (Figura 23). O gráfico representa a curva de atividade da fração f do veneno de *B. moojeni* com avaliação de 4 concentrações testadas no ensaio frente ao substrato azocaseína 1% com monitoramento da absorvância dos produtos formados através do ensaio à 440 nm. Na primeira concentração testada para o ensaio, foi possível observar atividade relativa das enzimas contidas na fração com absorvância média de 0,075 nm e margem de desvio padrão de aproximadamente 4% para essa primeira concentração. As posteriores concentrações utilizadas no ensaio (5; 10; 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentaram valores de absorvância de aproximadamente 0,162; 0,261 e 0,372 nm conforme verificadas pelo ensaio, todas com porcentagem de desvio padrão menor que 5%.

Atividade antibacteriana

Como foi descrito na tabela 04, os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* apresentam uma ampla variedade de aplicações. E se avaliarmos os trabalhos que descrevem as atividades antibacterianas, podemos destacar as atividades das fosfolipases.

Já foram descritas atividades de fosfolipases incubadas com cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (SILVEIRA *et al*, 2013), *E. coli* e *Candida albicans* (STÁBELI *et al*, 2006), *E. coli* e *S. aureus* (RODRIGUES *et al*, 2009), entre outros.

Para os ensaios antimicrobiológicos, foram avaliados o crescimento de células planctônicas (Figura 24) e formação de biofilme (Figura 25) após a incubação da fração “F” com a bactéria *Staphylococcus aureus* (G+). O tempo para a avaliação do crescimento foi de 24 horas.

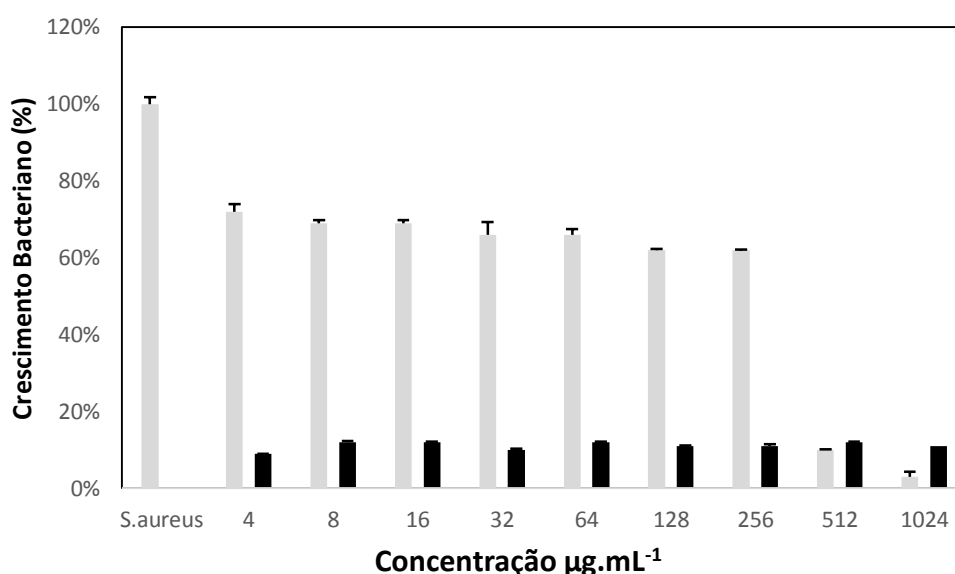


Figura 24. Avaliação do crescimento bacteriano de células planctônicas de *S. aureus* incubados com diferentes concentrações de antibiótico (barras escuras) e a fração F do veneno de *B. moojeni* (barras claras).

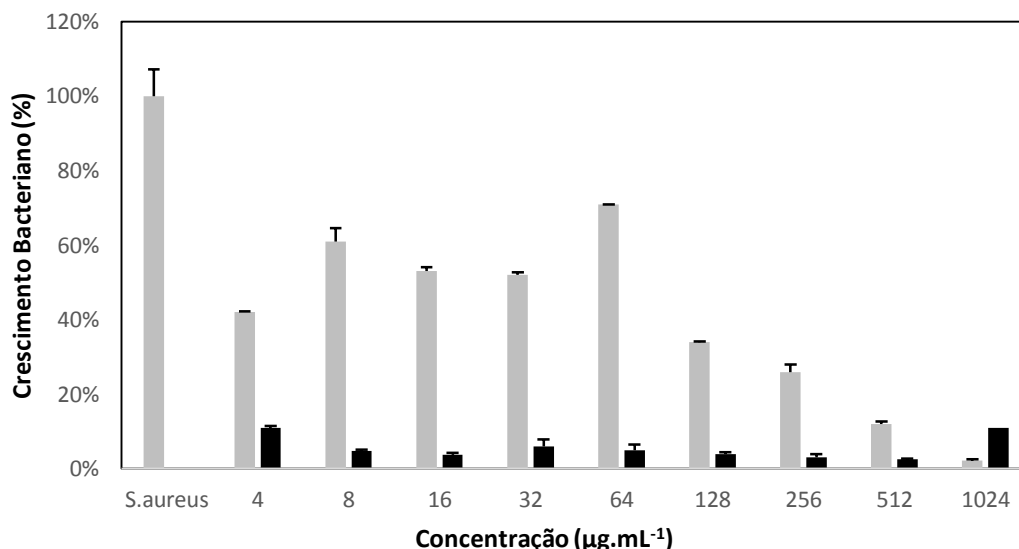


Figura 25. Avaliação do crescimento bacteriano em formação de biofilme *S. aureus* incubados com diferentes concentrações de antibiótico (barras escuras) e a fração F do veneno de *B. moojeni* (barras claras).

Como indicado na introdução desse trabalho, as PLA2 apresentam uma atividade bactericida. Essa atividade foi avaliada sobre a linhagem de *S. aureus* tanto em células planctônicas, como em formadores de biofilme. Essas atividades de crescimento foram comparadas com o crescimento das unidades avaliadas sem a presença da amostra. No crescimento de células planctônicas, foi possível observar uma inibição da atividade bacteriana nas duas maiores concentrações testadas (1024 e 512 µg.mL⁻¹), onde a atividade da fração testada foi similar à atividade do antibiótico.

Foi observado, no trabalho de Samy e colaboradores (2014) a atividade de CaTx-II, uma fosfolipase proveniente do veneno de *C. adamanteus*. Nesse estudo, os autores relataram uma alta atividade fosfolipática e, quando incubado com *S. aureus*, a molécula apresentou uma atividade antimicrobiana similar ao antibiótico testado (clorofenicol). A atividade inibitória mínima do crescimento bacteriano foi com 20 µg da fosfolipase e 30 µg do antibiótico.

Uma fosfolipase (presente no veneno de *C. durissus terrificus*) foi isolada, apresentando 14.425 Da. Sua atividade antibacteriana foi testada contra *Clavibacter michiganensis* (Gram+) e apresentou um alto potencial inibitório no crescimento bacteriano. Após uma análise de microscopia eletrônica, a bactéria testada

apresentou uma extensa vesiculação e formação de poros na membrana bacteriana, mostrando um crescimento de aproximadamente 12%, quando comparado ao grupo controle (TOYAMA *et al*, 2014).

A BthA-I-PLA₂, uma fosfolipase purificada da peçonha de *Bothrops jararaca*, contendo 13.758 Da, foi incubada com *S. aureus* e, após 60 minutos de avaliação, 160 µg da molécula avaliada foi capaz de reduzir o crescimento da bactéria para aproximadamente 20%, ao comparar com o crescimento controle (ROBERTO *et al*, 2004). A partir do veneno de *B. moojeni* foi obtido a BmooPLA₂, uma fosfolipase que apresentou 13,601 Da. Para verificar a atividade dessa molécula, 80 e 160 µg.mL⁻¹ foi incubada com *S. aureus*, verificando sua atividade antibacteriana. Após 60 minutos, foi verificado um crescimento de apenas 20% da bactéria (SILVEIRA *et al*, 2013).

Segundo Stábeli e colaboradores (2009), a MjTX-II, uma fosfolipase provinda da peçonha de *B. moojeni*, apresentou uma atividade que inibiu em 80% o crescimento das unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli*. Essa atividade das fosfolipases podem estar relacionadas ao fato das mesmas serem responsáveis pela hidrólise de fosfolipídeos de membrana (SAJEVIC *et al*, 2011).

As fosfolipases purificadas da peçonha das mais diversas serpentes são proteínas multifuncionais, com promissoras aplicações biotecnológicas. O isolamento e caracterizações de suas funcionalidades podem proporcionar um maior entendimento de seu mecanismo de ação, ampliando as possibilidades de utilização dessas moléculas como modelos para tratamentos das mais diversas doenças.

CAPÍTULO II: *Potamotrygon falkneri*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Distribuição das arraias

Os peixes que são agrupados por apresentarem esqueleto cartilaginoso estão na classe dos chondrichthyes e, atualmente estão divididos em duas subclasses: os Elasmobranchii (tubarões e arraias) e Holocephali (quimeras) (STORER, *et al* 1991). As arraias são peixes que apresentam uma maior quantidade de espécies marinhas, possuem o corpo comprimido dorso-ventralmente e aberturas branquiais na face ventral e apresentam olhos e espiráculos localizados no topo da cabeça (COMPAGNO, 1999; ROSA, 1985).

As arraias estão distribuídas em 22 famílias, apresentando 535 espécies descritas (NELSON, 2006), onde podemos observar uma particularidade em uma família na classe dos chondrichthyes, os Potamotrygonidae. Os representantes desse grupo são os únicos componentes totalmente restritos ao ambiente de água doce, representando uma importante parte da ictiofauna neotropical (COMPAGNON e COOK, 1995).

Segundo Nelson e colaboradores (2006), podemos encontrar cinco gêneros dentro da família Potamotrygonidae: *Heliotrygon*, *Paratrygon*, *Plesiotrygon*, *Teaniura* e *Potamotrygon*, onde as espécies desses gêneros podem ser encontradas em todo o litoral brasileiro e nos rios das regiões norte e centro-oeste (NELSON *et al*, 2006)

Os exemplares do gênero *Potamotrygon*, são restritos às ramificações dos rios da América do Sul onde o Brasil é o país que mais abrange espécies desse gênero (13 espécies). A espécie *P. falkneri* pode ser encontrada nos rios da Argentina, Paraguai e Brasil (Figura 26) (CARVALHO *et al*, 2003).



Figura 26. Exemplar (esquerda) e área de distribuição geográfica (direita) da espécie *Potamotrygon falkneri*, segundo Góes de Araújo, 2009.

1.2 Ictismo

Os acidentes e intoxicações causadas por peixes (marinhos e pluviais) são denominados de ictismo. Quando ocorre uma mordedura ou ferroadada por um peixe, esse tipo de acidente é denominado de acidente acantotóxico; quando ocorre a ingestão de toxinas que podem estar presentes em órgãos e tecidos, esse tipo de acidente é denominado de acidente sarcotóxico (LIMA e FERREIRA, 2000). No acidente acantotóxico ocorre a introdução do ferrão do peixe na presa/predador, onde os ferrões apresentam a característica de serem pontiagudos e serrilhados (Figura 02). Os ferrões são envolvidos por uma bainha onde as glândulas de veneno encontram-se nas nadadeiras dorsais, peitorais ou caudais (dependendo do local de inserção do ferrão) (HADDAD, 2003).

O aparato inoculatório de toxina das arraias é denominado de ferrão ou espinho (CARAS, 1974) e, segundo Thorson e colaboradores (1988), geralmente é localizado após a porção mediana da cauda, na linha dorsal (Figura 27), podendo haver variações na localização do ferrão entre as espécies.



Figura 27. Porção final da cauda da arraia da espécie *P. falkneri*. Detalhe para o ferrão exposto na porção mediana (LAMEIRAS *et al*, 2014).

Os ferrões das arraias passam por uma substituição periódica, consistindo em uma estrutura acuminada, tendo em sua composição principal uma camada de esmalte que reveste uma estrutura de vaso-dentina e encontra-se alicerçada em por colágeno, na região dorsal da cauda (CARAS, 1974).

No Brasil, do ponto de vista médico, as famílias de arraias mais importantes são: Dasyatidae, Gymnuridae, Myliobatidae, Rhinopteridae, Urolophidae (marinhas) e Potamotrygonidae (dulcícolas) (NUNES *et al*, 2005).

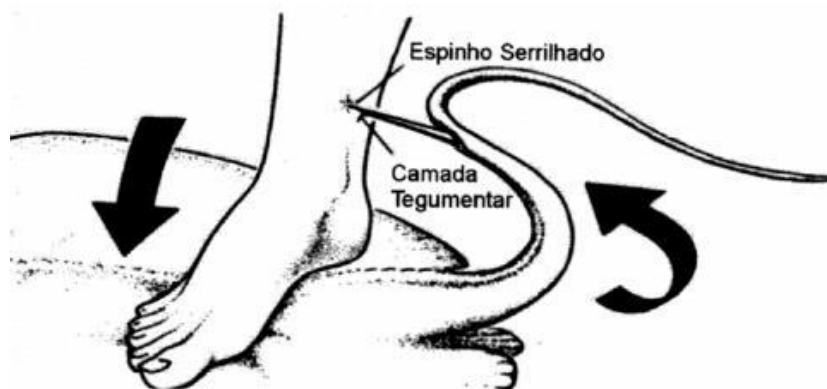


Figura 28. Mecanismo de defesa utilizado pelas arraias evidenciando o aparelho inoculador (espinho serrilhado) (FENNER *et al*, 1988).

As células especializadas na produção da peçonha das arraias de água doce, recobrem a periferia do ferrão, sendo caracterizadas por possuírem grânulos de secreção no citoplasma dessas células (DEHGHANI *et al*, 2010).

1.3 Acidentes com arraias

Não se tem registro ou descrições de acidentes que levaram alguma pessoa a óbito em decorrência do envenenamento com arraias. Esse tipo de fatalidade pode ocorrer em casos raros onde as espécimes possuem ferrões grandes, onde podem atingir e perfurar órgãos vitais (ARAÚJO *et al*, 2004).

Como os acidentes normalmente ocorrem em regiões com difícil acesso, as notificações não ocorrem, dificultando as informações epidemiológicas nesse aspecto. Por isso, o mais comum de ser observado, são relatos isolados desses acidentes (HADDAD, 2010).

Esses acidentes podem ser caracterizados por uma reação inflamatória e hiperalgesia local (MONTEIRO-dos-SANTOS *et al*, 2011). Ainda pelo mesmo autor, o acidente pode apresentar manifestações precoces, evidenciando a aparição de eritemas e edema próximo ao local do contato, formação de uma necrose central podendo acarretar uma ulceração.

A lesão causada pelo ferrão, pode apresentar infecções secundárias (DOMINGOS *et al*, 2011). Além disso, é possível observar alterações sistêmicas, evidenciando as náuseas, vômitos, febre, sudorese e taquicardia (GARRONE NETO; HADDAD, 2010).

1.4 Potencial biotecnológico para a toxina de arraias

Poucos estudos utilizando o potencial farmacológico das arraias foram realizados até o momento, se compararmos com o potencial farmacológico de outros animais venenosos. Isso pode ser relacionado pela dificuldade na obtenção de quantidade relevantes do material (CHURCH, HODGSON, 2002).

As atividades evidenciadas com a toxina das arraias foram: efeitos cardiovasculares (RUSSEL; VAN HARREVELD, 1954), atividade hipotensiva da espécie *P. motoro* (RODRIGUES, 1972), indução de rabdomiólise sistêmica e atividade miotóxica para as espécies *P. motoro* e *P. iwanae*

(LAMEIRAS *et al*, 2014), atividades dermonecrótica, miotóxica e hialuronidásica para a espécie *P. falkneri* (BARBARO *et al*, 2007), atividade proteolítica, inflamatória e antimicrobiana para a espécie *P. henlei* (MONTEIRO-dos-SANTOS *et al*, 2011), atividade necrótica para as espécies *P. scobina* e *P. orbigny* (MAGALHAES *et al*, 2006), frações com atividade antibacteriana no muco de *P. henlei* (CONCEIÇÃO *et al*, 2012) e atividades antibacteriana do muco da epiderme de *P. motoro* (CHURCH *et al*, 2003). Além das atividades apresentadas, poucos são os trabalhos que mostraram a purificação de uma proteína ou peptídeo de arraia do gênero *Potamotrygon*, descrevendo sua atividade.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterização do perfil proteico por meio de eletrofores em gel de poliacrilamida e técnicas cromatográficas do muco presente no ferrão de *Potamotrygon falkneri*.

2.2 Específicos

- Coleta dos indivíduos da espécie *P. falkneri* no rio Canindé, situado no município de Nioaque-MS, área de mata de galeria;
- Extração do muco presente no ferrão dos animais coletados;
- Caracterização do perfil proteico do muco retirado do ferrão dos indivíduos coletados;
- Caracterização do perfil cromatográfico do muco do ferrão dos indivíduos coletados.

3. Material e métodos

3.1 Material biológico

Os ferrões foram extraídos de arraias da espécie *P. falkneri*, coletadas no Rio Canindé, município de Nioaque, no estado de Mato Grosso do Sul (coordenadas: 21°14'57' sul 55°51'34" oeste), apresentando metodologias de busca ativa (pesca) e coleta por terceiros. Para a obtenção do muco, os ferrões das espécimes foram extraídos com auxílio de alicate de bico e mantidos em um pote coletor universal, sob refrigeração constante, até o momento das análises. Após o procedimento de obtenção dos ferrões, os mesmos foram lavados com tampão bicarbonato de amônia (pH 7,8, 50 mM) e raspados, com auxílio de uma espátula, para retirada total do muco que reveste os ferrões.

3.2 Quantificação proteica

As proteínas presentes no muco dos ferrões foram quantificadas a partir do método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão, nas concentrações de 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 e 1,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nesta técnica, a interferência das proteínas com absorbância do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em meio altamente ácido resulta em modificação proporcional da cor detectável em um comprimento de onda 595 nm.

3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A massa molecular do muco, foram estimadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, nas concentrações de 12% para o gel separador e 5% para o gel empilhador, na presença de SDS, a partir da metodologia descrita por Laemmli (1970). Para essa finalidade, a amostra foi diluída em tampão da amostra (redutor) 2x (Tris-HCl 1 M pH 6,8; glicerol 30%, SDS 9%; azul de bromofenol 1%, β -mercaptoetanol 20%), sem processo de incubação. A corrida ocorreu com uma voltagem constante (75 V), por aproximadamente 2 horas, conduzidas com tampão de corrida (Tris 25 mM; glicina 0,1 M, SDS 1%; pH 7,6). Em cada poço do gel, foi aplicado 15 mg de proteína. Para a comparação de peso molecular, foi utilizado o padrão de peso molecular PROMEGA® (The Broad Range Protein Molecular Weight Markers - possuindo os seguintes

massas moleculares: 225, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 15 e 10 kDa). Após o término das corridas, os géis foram corados com a solução corante de *Comassie Brilliant Blue* (água, metanol, ácido acético e *Comassie Brilliant Blue*), durante 30 min e, logo em seguida, descorados com água destilada, sendo mantidos sobre leve agitação.

3.4 Cromatografia líquida de alta performance

O extrato bruto do muco do ferrão de *P. falkneri* foi aplicado em cromatografia de fase reversa HPLC (NST C-18) coluna analítica, usando gradiente linear de 5-95% de acetonitrila em ácido trifluoracético 0,1% (v:v). O fluxo de 2,5 mL.min⁻¹ foi utilizada para a obtenção de frações do extrato bruto. As eluições protéicas serão monitoradas a 216 e 280 nm. As frações coletadas foram identificadas e liofilizadas.

4 Resultados e discussão

Como foi citado na introdução do trabalho, poucos estudos utilizando o potencial farmacológico das arraias foram realizados até o momento, se compararmos com o potencial farmacológico de outros animais venenosos. Isso pode ser relacionado pela dificuldade na obtenção de quantidade relevantes do material (CHURCH, HODGSON, 2012).

As espécimes coletadas (n=2) foram providas apenas por doações de terceiros, moradores das regiões próximas ao rio Canindé, no município de Nioaque.

O ferrão foi extraído da cauda dos indivíduos por meio de extração mecânica, com o auxílio de um alicate. Após a remoção do ferrão, o mesmo foi mantido em um tubo tipo Falcon (50 mL), alocados em freezer (-20 °C) para posterior análises.

O material de trabalho (muco) foi retirado com a lavagem do ferrão utilizando tampão bicarbonato de amônia (50 mM, pH 7.8) com auxílio de uma espátula de alumínio, a fim de retirar a maior quantidade do material. Após essa etapa, a amostra foi congelada e liofilizada, para concentração e armazenamento.

4.1 Estimativa de massa molecular do extrato bruto por SDS-PAGE

Foi realizado a análise eletroforética por SDS-PAGE do extrato bruto obtido após a lavagem dos ferrões coletados. O muco foi facilmente ressuspendido em água milli-Q para aplicação no gel de poliacrilamida (Figura 29), aplicando-se uma quantidade de 15 µg em cada poço.

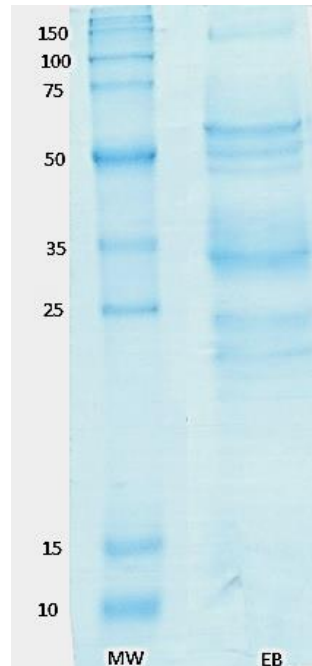


Figura 29. Perfil eletroforético do extrato bruto do veneno de *Potamotrygon falkneri*. MW: Marcador; EB: Extrato Bruto.

O perfil eletroforético de *P. falkneri* apresentou 7 bandas: 20, 25, 35, 45, 50, 60 e 150 kDa. Ao analisar o perfil proteico de *P. falkneri*, podemos comparar as massas aproximadas com proteínas encontradas em outros peixes, uma vez que a composição proteica detalhada dos indivíduos desse gênero não é bem descrita. Balasubashini e colaboradores (2006) já descreveram uma protease de 45 kDa na peçonha do peixe-leão (*Pterios volitans*). Magalhães e colaboradores (2008) descreveram uma hyaluronidase presente na arraia *P. motoro*, apresentando 79 kDa. O veneno das arraias *P. scobina* e *P. orbignyi*, apresentaram atividade edematogênica, nociceptiva e resposta inflamatória (MAGALHÃES *et al*, 2006), sendo descrita a família proteica Natterin, com aproximadamente 38 kDa.

4.2 Cromatografia líquida de alta performance

O perfil cromatográfico do muco de *P. falkneri* apresentou 4 frações (nomeadas de 1 à 4). Após essa análise, as frações foram coletadas, identificadas, liofilizadas e mantidas em refrigeração.

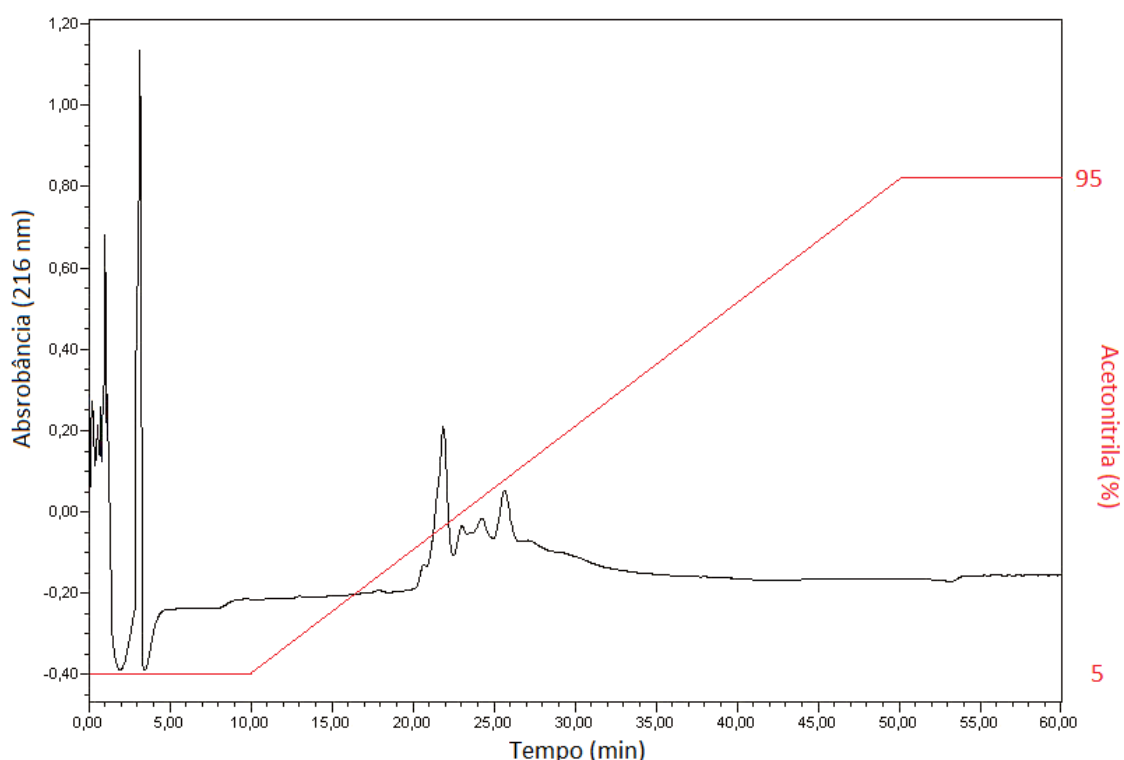


Figura 30. Perfil cromatográfico do extrato bruto do veneno de *P. falkneri* após a aplicação em cromatografia de fase reversa (C 18) – RP-HPLC C18. As frações obtidas foram denominadas F1, F2, F3 e F4. O gradiente linear de acetonitrila foi monitorado de 5 à 95%.

Esse perfil cromatográfico obtido, não apresenta similaridade com outros perfis cromatográficos do muco do ferrão de arraias do gênero *Potamotrygon*, descritos nos trabalhos de Conceição e colaboradores (2006), Magalhães e colaboradores (2008), Conceição e colaboradores (2009) e Conceição e colaboradores (2012). Em todos os trabalhos citados acima, os perfis cromatográfico apresentaram aproximadamente 10 frações.

Conclusão

O presente estudo contou com três passos cromatográficos para purificar uma possível fosfolipase da toxina de *Bothrops moojeni*. Esses processos de purificação já foram previamente descritos, e, em alguns casos, apresentando apenas dois passos cromatográficos. A fração isolada e avaliada, apresentou uma alta atividade enzimática, quando comparada à atividade da enzima controle. Além disso, apresentou uma alta atividade inibitória de crescimento bacteriano ao ser incubado com cepas isoladas de *S. aureus*.

Por diversos problemas experimentais, os resultados obtidos com arraia *P. falkneri* não apresentaram uma avaliação concreta. O baixo número de espécimes coletados juntamente com as coletas realizadas por terceiros, pode ter corroborado com a obtenção dos baixos resultados. Seria necessário mais repetições com outras amostras das mesmas espécies para avaliarmos a representabilidade dos dados.

A diversidade biológica, especialmente a encontrada no Brasil, estimulam estudos visando a descoberta de novos fármacos. Pesquisas com muco de arraia, principalmente as do gênero *Potamotrygon*, são escassas, devido à dificuldade e quantidade de coleta dos materiais. Porém, as poucas descrições para aplicações biotecnológicas do muco apresentam uma boa perspectiva. O grande interesse na compreensão da estrutura e função dos diversos grupos proteicos dos venenos de serpentes (em destaque as fosfolipases), podem mostrar uma contribuição no entendimento dos mecanismos de ações das atividades enzimáticas. Além disso, facilita a compreensão no conhecimento da fisiopatologia da intoxicação e amplia a busca de novos produtos de interesse biotecnológico. Apresentando uma alta atividade enzimática e uma atividade inibitória de crescimento bacteriano, a possível fosfolipase avaliada nesse trabalho demonstrou ser uma molécula com aplicações biotecnológicas. Os estudos das proteínas de veneno, principalmente as fosfolipases, constituem em valiosas ferramentas biológicas, além de apresentar um elevado potencial biotecnológico.

Referências bibliográficas

ADADE, C. A. M.; CONS, B. L.; MELO, P. A.; PADRÓN, T. S. Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, 138, p. 46-58. 2011.

AKAO, P.K., TONOLI, C.C., NAVARRO, M.S., CINTRA, A.C., NETO, J.R., ARNI, R.K., MURAKAMI, M.T. Structural studies of BmooMPalpha-I, a non-hemorrhagic metalloproteinase from Bothrops moojeni venom. **Toxicon** 55: 361-368. 2010.

ALVES, R. M., ANTONUCCI, G.A., PAIVA, H. H., CINTRA, A. C. O., FRANCO, J. J., MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. P., DORIA, D. J., GIGLIO, J. R., ROSA, J. C., FULY, A. L., DIAS-BARUFFI, M., SOARES, A. M., SAMPAIO, S. V. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from Bothrops atrox snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 151 (4), 542-550, 2008.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; FULY, A.L.; CORRÊA, F.M.A.; ROSA, J.A.; GREENE, L.J.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochem Pharmacol**, v.64, p.723-32, 2002.

ANGULO, Y.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; POSSANI, L.D.; LOMONTE, B. Isolation and characterization of myotoxin-II from *Atropoides (Bothrops) nummifer* snake venom, a new Lys49 phospholipase A2 homologue. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 32, p. 63-71, 2000.

ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária), 2007. Higienização da mão em serviços de saúde. Dirceu Raposo de Mello (Diretor). Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/higienizacao_maos/manual_integra.pdf. Acesso em 19 junho de 2016.

BARBARO, K.C.; LIRA, M.S.; MALTA, M.B.; SOARES, S.L.; GARRONE NETO, D.; CARDOSO, J.L.; SANTORO, M.L.; HADDAD JUNIOR, V. Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. **Toxicon**, p. 676–87. 2007.

BERNARDE, P. S. 2012. Anfíbios e répteis – Introdução ao estudo da herpetofauna brasileira, **Anolis Books Editora**, Curitiba, 112p.

BERNARDE, P. S. 2014. Serpentes Peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil. **Anolis Books**, Editora Curitiba PR, 223p.

BÉRNILS, R.S., COSTA, H.C. (Org.). 2014. Brazilian reptiles – List of species. Version 2014.1. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acessado em 20 de fevereiro de 2016. www.sbherpetologia.org.br.

BDOLAH, A. The venom glands of snakes and venom secretion. Snake Venoms. Lee, C.Y. **Spring-Verlag**, New York, 41-57. 1979.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Current Opinion in Cell Biology**, 7, 728-735. 1995.

BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **J. Toxicol-Toxin**. Rev. 7(2): 121-209. 1989.

BOISBOUVIER, J., ALBRAND, J.P., BLACKLEDGE, M., JAQUINOD, M., SCHWEITZ, H., LAZDUNSKI, M., MARION, D. A structural homologue of colipase in black mamba venom revealed by NMR floating disulphide bridge analysis. **Journal of Molecular Biology**, 283, 205-219. 1998.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v.82, p.851-859, 2000.

BRAZIL, V., 1911. A defesa contra o ophidismo. Pocai & Weiss Editora, São

Paulo, 152p.

BUSTILLO, S.; LEIVA, L. C.; MERINO, L.; ACOSTA, O.; JOFFÉ, E. B. K.; GORODNER, J. O. Antimicrobial activity of *Bothrops alternatus* venom from the Northeast of Argentina. **Revista latinoamericana de microbiologia**, 50, p. 79-82. 2008.

CALVETE, J.J. Venomics: Digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. **Journal of proteomics**, v.72, p.121-126, 2009.

CAMPBELL, J. A., Lamar, W. W. Lanceheads, Genus *Bothrops* Wagler, 1824. In: Campbell, J. A. & Lamar, W. W. (eds.), The venomous reptiles of the western hemisphere, New York, **Cornell University Press**. p. 334-409. 2004.

CAMPBELL, J.A., Lamar, W. The venomous reptiles of Latin America. **Cornell Univ. Press, Ithaca**: 425p. 1989.

CARDOSO, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad Jr, V. Animais peçonhentos no Brasil. **Sarvies**, São Paulo. 2003.

CARVALHO, M. R. Family Potamotrygonidae (river stingrays). **Checklist of the freshwater fishes of south and central América**. Editora: Edipucrs, Porto Alegre, p. 22-28. 2003.

CHIPPAUX, J.P., Williams, V., White, J. Snake venoms variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon** 29 (11), 1279-1303. 1991.

COMPAGNO, L. **Checklist of living elasmobranchs**: Sharks, skates, and rays: the biology of elasmobranch fishes. The John Hopkins University Press. 1999

COMPAGNO, L.; COOK, S. The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. 1995.

FRANCISCHETTI, I.M.B.; CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B.; CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A. *Bothrops* sp. Snake Venoms: Comparison of Some Biochemical and Physicochemical Properties and Interference in Platelet Functions. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.119C, p.21-29, 1998.

FRY, B.G., Wuster, W., Kini, R.M., Brusic, V., Khan, A., Venkataraman, D., Rooney, A.P. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. **Journal of Molecular Evolution**, 57, 110-129. 2003.

FRY, B.G., Wuster, W. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. **Molecular Biology and Evolution**, 21, 870-883. 2004.

GAY, C.C.; LEIVA, L.C.; MARUÑAK, S.; TEIBLER, P.; PÉREZ, O.A. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**, v.46, p.546-554, 2005.

GOMES, V. M.; CARVALHO, A. O.; CUNHA, M. D.; KELLER, M. N.; BLOCH-JUNIOR, C; DEOLINDO, P.; ALVES, E. W. Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, 45, p. 817-827. 2005.

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v.82, p.841-850, 2000.

HABERMEHL, G.G. Venomous animals and their toxins. New York: Springer-Verlag. 1981.

MOURA-DA-SILVA, A.M., CARDOSO, D.F., TANIZAKI, M.M. Differences in distribution on myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. **Toxicon**, London, 28 (11): 1293-1301. 1990.

KOCHVA, E., GANS, C. Salivary glands on snakes. **Clin Toxicol**, 3, p. 363-387. 1970.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, p. 680-685, 1970.

LIMA, L. A. F. D.; FERREIRA, M. L. Estudo clínico e experimental sobre o envenenamento causado pelo peixe *Thalassophryne nattereri* (niquim); Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *Thalassophryne nattereri* (niquim). **An. bras. dermatol.** v. 75, n. 4, p. 435-443. 2000.

LIRA-DA-SILVA, R. M. *Botrops leucurus* Wagler, 1824 (Serpentes; Viperidae): natural history, venom and envenomation. **Gazeta Médica da Bahia**, 79 (supl; 1):56-65. 2009.

LU, Q.M.; JIN, Y.; WEI, J.F.; WANG, W.Y.; XIONG, Y.L. Biochemical and biological properties of *Trimeresurus jerdonii* venom and characterization of a platelet aggregation-inhibiting acidic phospholipase A2. **J Nat Toxins**, v. 11, p.25-33, 2002.

MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, 36 (12), p.1749-1800. 1998.

MARQUES, O. A. V., ETEROVIC, A., SAZIMA, I. Serpentes da Mata Atlântica: Guia Ilustrativo para Serra do Mar. Holos. Ribeirão Preto, 184p. 2001.

MELGAREJO-GIMÉNEZ, A.R. Criação e Manejo de Serpentes, in: Andrade, A., Pinto, S.C., de Oliveira, R.S., 2002. Animais de Laboratório: criação e experimentação. Fiocruz, Rio de Janeiro. p 175-200. 2002.

Ministério da saúde do Brasil. Brasília: Secretaria Nacional das Ações Básicas de Saúde. Acidentes ofídicos. 2009.

MOURA-DA-SILVA, A.M., CARDOSO, D.F., TANIZAKI, M.M. Differences in distribution on myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. **Toxicon**, London, 28 (11): 1293-1301. 1990.

MURAYAMA, N., SAGUCHI, K., MENTELE, R., ASSAKURA, M.T., OHI, H., FUJITA, Y., CAMARGO, A.C., HIGUCHI, S., SERRANO, S.M. The unusual high molecular mass of *Bothrops* protease A, a trypsin-like serine peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1652, 1-6, 2003.

NAKASHIMA, K., NOBUHISA, I., DESHIMARU, M., NAKAI, M., OGAWA, T., SHIMOHIGASHI, Y., FUKUMAKI, Y., HATTORI, M., SAKAKI, Y., HATTORI, S. Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in crotalinae snake venom gland phospholipase A2 isozyme genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A**, 92, 5605-5609, 1995.

NETO, F.S. N.; AMORIM, R. L.; BRIGATTE, P.; PICOLO, G.; FERREIRA-JUNIOR, W. A.; GUTIERREZ, V. P.; CONCEIÇÃO, I. M.; CASA, M. S. D.; TAKAHIRA, R. K.; NICOLETTE, J. L. M.; CURY, Y. The analgesic effect of crotoxin on neuropathic pain is mediated by central muscarinic receptors and 5-lipoxygenase-derived mediators. **Pharmacology, Biochemistry and behavior**, 91, p. 252-260. 2008.

ÖLHER, M., GEORGIEVA, D., SEIFERT, J., VON BERGEN, M., ARNI, R.K., GENOV, N., BETZEL, C., 2010. The Venomics of *Bothrops alternatus*, is a Pool of Acid Proteins with Predominant Hemorrhagic and Coagulopathic Activities. **Journal of Proteome Research**. 9: 2422-2437.

RENNER, M. F. Caracterização enzimática do veneno e estudo histológico da glândula de Duvernoy de *Clelia plumbea* (Wied,1820) (Serpentes: Colubridae: Xenodontine.). Dissertação (Mestrado em Zoologia). Instituto de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1999.

Rosa, R.D. A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae), The College of William and Mary in Virginia. 1985.

SAVEJIC, T., LEONARDI, A., KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins snake venoms. **Toxicon**, 57, 627-645. 2011.

SAWAYA, R. J., MARQUES, O. A. V., MARTINS, M. Composição e história natural das serpentes de Cerrado de Itirapina, São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotrópica** 8(2):153-175. 2008.

UETZ, PETER. 2015. The Reptile Database. Disponível em <http://www.reptile-database.org>. Acesso em 20/02/2016.

VOGT, G., STOCKER, W., STORCH, V., ZWILLING, R., 1989. Biosynthesis of *Astacus* protease, a digestive enzyme from crayfish. **Histochemistry**, 91, 373-381.

ZUG, G. R., VIN, L. J., CALDWELL, J. P. Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. New York, **Academic Press**. 2000.

BRAUD, S., BOM, C., WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, V. 82, p. 851-859. 2000.

CALVETE, J. J. Snake venom desintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1063-1074. 2005.

CARAS, R. The Venomous Fish. Venomous animals of the world. USA, **Prentice-Hall**. p.103-116. 1974.

CHURCH, J. E.; HODGSON, W. C. The pharmacological activity of fish venoms. **Toxicon**, p. 1083-1093. 2002.

COGO J.C.; LILLA, S.; SOUZA, G.H.M.F.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A2 from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Biochimie**, v. 88, p. 1947-59, 2006.

COMPAGNO, L. **Checklist of living elasmobranchs**: Sharks, skates, and rays: the biology of elasmobranch fishes. The John Hopkins University Press. 1999.

COSTA, P.D.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; CRUZ-HÖFLING, M.A. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. **Toxicon**, v. 37, p. 1143- 53, 1999.

COSTA, T.R.; MENALDO, D.L.; OLIVEIRA, C.Z.; SANTOS-FILHO, N.A.; TEIXEIRA, S.S.; NOMIZO, A.; FULY, A.L.; MONTEIRO, M.C.; SOUZA, B.M.; PALMA, M.S.; STÁBELI, R.G.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. Myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29, p. 1645-56, 2008.

CUNHA JUNIOR, G. S. Prevalência da contaminação bacteriana em concentrados de plaquetas do serviço de hemoterapia de um hospital universitário em Goiânia-GO. **Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 4, Dec. 2007.

DANIELE, J. J.; BIANCO, I.D.; FIDELIO, G.D. Kinetic and pharmacological characterization of phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedii* venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 318, p. 65-70, 1995.

DANIELE, J. J.; BIANCO, L.D.; DELGADO, C.; BRIONES CARRILLO, D.; FIDELIO, G.D. A new phospholipase A2 isoform isolated from *Bothrops neuwiedii* (yará chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. **Toxicon**, v. 35, p. 1205-15, 1997.

DE ALBUQUERQUE MODESTO, J.C.; SPENCER, P.J.; FRITZEN, M.; VALENÇA, R.C.; OLIVA, M.L.V.; DA SILVA, M.B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; GUARNIERI,

M.C. BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A2 from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potente anti-platelet and inductor of prostaglandin I2 release by endothelial cells. **Biochem Pharmacol**, v. 72, p. 377-84, 2006.

DEHGHANI, H.; SAJJADI, M. M.; PARTO, P.; RAJAIAN, H.; MOKHLESI, A. Histological characterization of the special venom secretory cells in the stinger of rays in the northern waters of Persian Gulf and Oman Sea. **Toxicon**. v. 55, n. 6, p. 1188-1194. 2010.

DEL FIOLE FS, LOPES LC, TOLEDO MI, BARBERATO-FILHO S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Rev Soc Bras Med Trop**;43(1):68-72. 2010.

DEOLINDO, P.; FERREIRA, A. S. T.; MATTA, R. A.; ALVES, E. W. L-Amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. **Toxicon**, 56, p. 944-955. 2010.

DEOLINDO, P.; TEIXEIRA-FERREIRA, A.S.; DaMATTA, R.; ALVES, .W.L-Amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. **Toxicon**, 56, p. 944-955. 2010.

DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Isolation and characterization of basic myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 298, n. 1, p. 135-42, 1992.

DÍAZ, C.; LOMONTE-VIGLIOTTI, B.; ZAMUDIO, F.; GUTIÉRREZ, J.M. Purification and characterization of myotoxin-IV, a phospholipase A2 variant, from *Bothrops asper* snake venom. **Nat Toxins**, v. 3, p. 26-31, 1995.

DRICKMANER, K. Making a fitting choice: common aspects of sugar-binding sites in plant and animal lectins structure. **Structure**5, (4): 465-468, 1997.

DOMINGOS, M. O.; FRANZOLIN, M. R.; DOS ANJOS, M. T.; FRANZOLIN, T. M.; BARBOSA ALBES, R. C.; DE ANDRADE, G. R.; LOPES, R. J.; BARBARO, K. C. The influence of environmental bacteria in freshwater stingray wound-healing. **Toxicon**. v. 58, n. 2, p. 147-153. 2011.

DU, X.Y. & CLEMETSON, K.J. Snake venom L-amino acid oxidases-Review. **Toxicon**. 695-665, 2002.

EKLAISE FO, IGHOSEWE OU, AJAKPOVI OD. Hospital indoor airborne microflora in private and government owned hospitals in Benin City, Nigeria. **World J Med Sci**, 3(1), 19-23. 2008.

FENNER, P. J.; WILLIAMSON, J. A.; SKINNER, R. A. Fatal and non-fatal stingray envenomation. **The Medical journal of Australia**. v. 151, n. 11-12, p. 621-625. 1988.

GARRONE NETO, D.; HADDAD JR, V. Arraias em rios da região Sudeste do Brasil: locais de ocorrência e impactos sobre a população. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 1, p. 82-88. 2010.

GUTIÉRREZ, J. M.; CERDAS, L. Mechanism of action of myotoxins isolated from snake venoms. **Rev Biol Trop**, v. 32, p. 213-22, 1984.

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; GENE, J.A.; LOMONTE, B.; CAMACHO, Z.; SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon**, v.27, p. 735-45, 1989.

HADDAD, JR. V. Animais aquáticos de importância médica no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 591-597. 2003.

HIGUCHI, D.A.; BARBOSA, C.M.V. ; BINCOLETTTO, C. ; CHAGAS, J.R.; MAGALHÃES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F.; PESQUERO, J.B.; ARAUJO,

R.C.; PESQUERO, J.L. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* snake venom. **Biochimie**, v. 89, p. 319-28, 2007.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, p. 613-27, 1988.

IZIDORO, L. F. M., RIBEIRO, M. C., SOUZA, G. R. L., SANT'ANA, C. D., Hamaguchi, A., Homsí-Brandeburgo, M. I., Goulart, L. R., Belebóni, R. O., Nomizo, A., Sampaio, S. V., Soares, A. M., Rodrigues, V. M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 14, 7034-7043. 2006.

IZIDORO, L. F. M.; ALVES, L. M.; RODRIGUES, V. M.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R. *Bothrops pirajai* snake venom L-amino acid oxidase: *in vitro* effects on infection of *Toxoplasma gondii* in human foreskin fibroblasts. 21(3), p. 477-485. 2011.

KAISER, I.I.; GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, J.M.; PLUMMER, D.; AIRD, S.D.; ODELL, G.V. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch Biochem Biophys**, v.278, p. 319-25, 1990.

KANASHIRO, M.M.; ESCOCARD, R.C.M.; PETRETSKI, J.H.; PRATES, M.V.; ALVES, E.W.; MACHADO, O.L.T.; SILVA, W.D.; KIPNIS, T.L. Biochemical and biological properties of phospholipase A2 from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochem Pharmacol**, v. 64, p. 1179-86, 2002.

KETELHUT, D.F.J.; HOMEM DE MELLO, M.; VERONESE, E.L.G.; ESMERALDINO, L.E.; MURAKAMI, M.T.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R.; CINTRA, A.C.O.; SAMPAIO, S.V. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A2 isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v.85, p. 983–91, 2003.

KINI, R. M. & EVANS, H. J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**. 30 (3): 265-293, 1992.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.

LACERDA, R. A. Produção científica nacional sobre infecção hospitalar e a contribuição da enfermagem: ontem, hoje e perspectivas. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 1, 2002.

LAMEIRAS, J. L. V.; COSTA, O. T. F. D.; MORONI, F. T.; ARAÚJO, J. D. R.; CARANHAS, S. M. E.; MARQUES, C. M. A.; DOS-SANTOS, M. C.; DUNCAN, W. L. P. Systemic rhabdomyolysis induced by venom of freshwater stingrays *Plesiotrygon iwamae* and *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes–Potamotrygonidae) from the Amazon Basin. **Toxicon**. v. 77, p. 105-113. 2014.

LAMEU, C., HAYASHI, M.A.F.; Juliano R. GUERREIRO, J.R.; OLIVEIRA, E.F.; LEBRUN, I.; PONTIERI, V.; MORAIS, K.L.P.; CAMARGO, A.C.M.; ULRICH, H. The Central Nervous System as Target for Antihypertensive Actions of a Proline-Rich Peptide from *Bothrops jararaca* Venom. **Cytometry**, 77, p. 220-230. 2010.

LOBO DE ARAÚJO, A.; RADVANYI, F.; BON, C. Purification of an acidic phospholipase A2 from *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom: molecular and enzymatic properties. **Toxicon**, v. 32, p. 1069-81, 1994.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. A new muscle damaging toxin, myotoxin-II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Toxicon**, v. 27, p. 725-33, 1989.

MACHADO, O.L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; ZINGALI, R.B.; CARLINI, C.R. Purification, physicochemical characterization and N-terminal-amino acid sequence of a phospholipase A2 from *Bothrops jararaca* venom. **Braz J Med Biol Res**, v. 26, p. 163-6, 1993.

MADANI, N.B.; GREENLAND, T.; RICHARD, Y. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphulococci isolated from goat's milk. **Veterinary Microbiology**. Amsterdã, v. 59, p. 139-145, 1998.

MANCUSO, L. C., CORREA, M.M.; VIEIRA C.A.; CUNHA, O.A.B.; LACHAT, J.-J.; SELISTRE DE ARAUJO, H.S.; OWNBY, C.L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon**, v.33, p.615-26, 1995.

MONTEIRO-DOS-SANTOS, J.; CONCEIÇÃO, K.; SEIBERT, C. S.; MARQUES, E. E. Studies on pharmacological properties of mucus and sting venom of *Potamotrygon cf. henlei*. **International immunopharmacology**. v. 11, n. 9, p. 1368-1377. 2011.

MULLER, V.D.M.; RUSSO, R.R.; CINTRA, A.C.O.; SARTIM, M.A.; ALVES-PAIVA, FIGUEIREDO, L.T.M.; SAMPAIO, S.V.; AQUINO, V.H. Crotoxin and phospholipases A2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viroses. **Toxicon**, 59, p. 507-515. 2012.

[MUNIZ, J.R.](#), [AMBROSIO, A.L.](#), [SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.](#), [COMINETTI, M.R.](#), [MOURA-DA-SILVA, A.M.](#), [OLIVA, G.](#), [GARRATT, R.C.](#), [SOUZA, D.H.](#) The three-dimensional structure of bothropasin, the main hemorrhagic factor from *Bothrops jararaca* venom: Insights for a new classification of snake venom metalloprotease subgroups. **Toxicon**, 52, p. 807-816. 2008.

NASCIMENTO, M.R.; STAMFORD, T.L.M. Incidência de *Escherichia coli* 0157:H7. **Revista de Higiene Alimentar**. V.14, p.32-5, 2000.

NISENBOM, H. E., SEKI, C.; VIDAL, J. C. Phospholipase A2 from *Bothrops alternatus* (víbora de La Cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **Toxicon**, v. 24, p. 259-72, 1986.

NUNES, J.; ALMEIDA, Z.; PIORSKI, N. Raias capturadas pela pesca artesanal em águas rasas do Maranhão-Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar, Fortaleza**. v. 38, p. 49-54. 2005.

NUNES, E.S.; SOUZA, M.A.A.; VAZ, A.F.M.; SANTANA, G.M.S; GOMES, F.S. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 159, p. 57-63. 2011.

NÚÑEZ, V.; ARCE, V.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Structural and functional characterization of myotoxin-I, a Lys49 phospholipase A2 homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. **Toxicon**, v.44, p. 91–101, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). WHO Guidelines and Hand Hygiene in Health Care. First Global Patient Safety Challenge Clean Care is Safer Care. 2009. Disponível em <http://proqualis.net/higienizacao/?id=000000669>. Acesso em: 16 março. 2016

OZEKI Y, MATSUI T, HAMAKO J, SUZUKI M, FUJIMURA Y, YOSHIDA E, NISHIDA S, TITANI K. C-type galactoside-binding lectin from *Bothrops jararaca* venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. **Arch Biochem Biophys**. 308 (1): 306-10, 1994.

PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; TOMOKANE, T. Y.; COBERTT, C. E. P.; TOYAMA, M. H. The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Parasitol**, 102, p. 1025-1033. 2008.

PIRKLE, H. Thrombin-like enzyme from snake venoms: an updated inventory, Thromb. **Haemost**. 79: 675-683, 1998.

PONCE-SOTO, L. A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; RODRIGUESSIMIONI, L.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1770, p. 585–93, 2007.

PONCE-SOTO, L. A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; RODRIGUESSIMIONI, L.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1770, p. 585–93, 2007.

QUINTANA, J. C.; CHACÓN, A. M.; VARGAS, L.; SEGURA, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; ALARCÓN, J. C. Antiplasmodial effect of the venom of *Crotalus durissus cumanensis*, crotoxin complex and Crotoxin B. **Acta Tropica**, 124, p. 126-132. 2012.

RODRIGUES, R. J. Pharmacology of South American freshwater stingray venom (*Potamotrygon motoro*). **Transactions of the New York Academy of Sciences**. v. 34, n. 8, p. 677-686. 1972.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L.F.; TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; GIGLIO, J.R.; FULY, A.L.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, p. 153–65, 2007.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A.M.; MANCIN, A.C.; FONTES, M.R.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comp Biochem Physiol**, v.121, p. 215-22, 1998.

ROSSI, F., ANDREAZZI, D. Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma. Ed. Atheneu. São Paulo, 2005.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, p.627-645, 2011.

[SALVADOR, G.H.M.](#), [FONTES, M.R.M.](#) Structural and functional evidence for membrane docking and disruption sites on phospholipase A2-like proteins revealed

by complexation with the inhibitor suramin. **Acta Crystallogr. Sect. D** 71: 2066-2078. 2015.

SANTAMARIA, C.; LARIOS, S.; QUIRÓS, S.; PIZARRO-CERDA, J.; GORVEL, J.P.; LOMONTE, B.; MORENO, E. Bactericidal and Antiendotoxic Properties of Short Cationic Peptides Derived from a Snake Venom Lys49 Phospholipase A2. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 1340-1345. 2005.

[SEN, U.](#), [VASUDEVAN, S.](#), [SUBBARAO, G.](#), [MCCLINTOCK, R.A.](#), [CELIKEL, R.](#), [RUGGERI, Z.M.](#), [VARUGHESE, K.I.](#) Crystal structure of the von Willebrand factor modulator botrocetin. **Biochemistry** 40, p. 345-352. 2001.

SHON A. S., BAJWA R. P., RUSSO T. A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. **Virulence** 4, 107–118.

SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; ARNI, R.K.; GIGLIO J.R. Structural and functional characterization of myotoxin-I, a Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 373, p. 7–15, 2000.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; TOYAMA, M.H.; LOMBARDI, F.R.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. A rapid procedure for the isolation of the Lys49 myotoxin-II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v. 36, p. 503-14, 1998.

SOTO, S.M.; SMITHSON, A.; MARTINEZ, L.A.; HORCAJADA, J.P.; MENSA, J.; VILA, J. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. **Journal of Urology**, Baltimore, V. 177, n.1, p.365-368, 2007.

SOUZA, C. S. Uma guerra quase perdida. **Revista Ciência Hoje**, v. 23, n. 138, p. 27-35, 1998.

STROHL, W. A., ROUSE, H. & FISHER, B. D., Microbiologia Ilustrada. São Paulo, Artmed, 2004.

SWENSON, S. Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression. **Mol. Cancer Ther.**, v.3, p. 499-511, 2004.

TOYAMA, M. H., MANCUSO, L.C.; GIGLIO, J.R.; NOVELLO, J.C.; OLIVEIRA, B.; MARAGONI, S. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins-I and II, two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom. N-terminal sequencing. **Biochem Mol Biol Int**, v.37, p.1047-55. 1995.

TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; TOMOKANE, T. Y.; FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; MARTINS, M. A. C.; MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, 47, p. 47-57. 2006.

TOYAMA, M. H.; COSTA, P.D.; NOVELLO, J.C.; DE OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A.; MARANGONI, S. Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A2 from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA2 and anticoagulant activities and high myotoxic activity. **J Protein Chem**, v.18, n.3, p.371-8. 1999.

TURRINI R.N.T.; SANTO A.H. Infecção Hospitalar e causas múltiplas de morte. **Jornal de Pediatria**, v.78, n. 06, p. 485-490, 2002.

[ULLAH, A.](#), [SOUZA, T.A.](#), [ABREGO, J.R.](#), [BETZEL, C.](#), [MURAKAMI, M.T.](#), [ARNI, R.K.](#). Structural insights into selectivity and cofactor binding in snake venom L-amino acid oxidases. **Biochem.Biophys.Res.Comm.** 421: 124-128. 2012.

[ULLAH, A.](#), [SOUZA, T.A.](#), [ZANPHORLIN, L.M.](#), [MARIUTTI, R.B.](#), [SANTANA, V.S.](#), [MURAKAMI, M.T.](#), [ARNI, R.K.](#) Crystal structure of Jararacussin-I: The highly negatively charged catalytic interface contributes to macromolecular selectivity in snake venom thrombin-like enzymes. **Protein Sci.** 22: 128-132. 2013.

YOU, W.K.; CHOI, W.S.; KOH, Y.S.; SHIN, H.C.; JANG, Y., CHUNG, K.H. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. **FEBS Letters** v. 571, p. 67-73. 2004.

YAMANE, E. S.; BIZERRA, F. C.; OLIVEIRA, E. B.; MOREIRA, J. T.; RAJABI, M.; NUNES, G. L. C.; SOUZA, A. O.; SILVA, I. D. C. G.; YAMANE, T.; KARPEL, R. L.; SILVA-JUNIOR, P. I.; HAYASHI, M. A. F. Unraveling the antifungal activity of a South American rattlesnake toxin crotoamine. **Biochimie**, 96, p. 231-240. 2013.

ZHANG, Y; GAO, R; LEE, W.H; ZHU, S.W; XIONG, Y.L. & WANG, W.Y. Characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from *Trimerurus stejnegeri* venom and comparative study with other venom proteases. **Toxicon**. 36 (1): 131-142, 1998.

ZHANG, H. L.; HAN, R.; CHEN, Z. X.; CHEN, B. W.; GU, Z. L.; REID, P. F.; RAYMOND, L. N.; QIN, Z. H. Opiate and acetylcholine-independent analgesic actions of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, 48, p. 175-182. 2006.