

Prospecção de Moléculas Bioativas em Animais e Plantas: Uma Visão Biotecnológica

Regina Meneses Gonçalves
Breno Emanuel Farias Frihling
Ludovico Migliolo
(Organizadores)



Atena
Editora
Ano 2019

Regina Meneses Gonçalves
Breno Emanuel Farias Frihling
Ludovico Migliolo
(Organizadores)

Prospecção de Moléculas Bioativas em Animais e Plantas: Uma Visão Biotecnológica

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Executiva: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Lorena Prestes
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof.ª Dr.ª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof.ª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof.ª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof.ª Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

| Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG) | |
|---|---|
| P966 | Prospecção de moléculas bioativas em animais e plantas [recurso eletrônico] : uma visão biotecnológica / Organizadores Regina Meneses Gonçalves, Breno Emanuel Farias Frihling, Ludovico Migliolo. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-575-4 DOI 10.22533/at.ed.754190209 1. Bioquímica. 2. Biotecnologia. 3. Microbiologia. I. Gonçalves, Regina Menesas. II. Frihling, Emanuel Farias. III. Migliolo, Ludovico. CDD 660.6 |
| Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422 | |

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A obra intitulada “*Prospecção de moléculas bioativas em animais e plantas: uma visão biotecnológica*” consiste em uma coletânea de artigos científicos apresentados em 9 capítulos, com enfoque em biotecnologia. Na mesma, foram expostos conhecimentos sobre bioquímica, microbiologia e bioinformática, com estudos em diferentes espécies, abrangendo a biodiversidade brasileira.

Na biotecnologia, os campos de estudos são muito amplos e englobam pesquisas complexas envolvendo microrganismos, plantas e animais. Desta forma, a obra apresenta pesquisas sobre moléculas bioativas derivadas de aracnídeos, insetos, répteis, anfíbios e plantas. Essas moléculas bioativas apresentam uma gama de atividades biológicas, e algumas dessas, com potencial antimicrobiano, inibidores de peptidases, entre outras, foram apresentadas no decorrer da obra.

Ademais, moléculas protéicas bioativas provenientes de fontes naturais, podem ter sua sequencias primárias caracterizadas e modificada por meio da bioinformática (metodologia de desenho racional), que busca melhorar seu potencial terapêutico *in vitro* partindo de estudos *in silico*.

As informações geradas nesta obra são de extrema relevância em nível acadêmico, pois mostra pesquisas básicas avançando para pesquisas aplicadas, o que proporciona o enriquecimento da comunidade científica e formação profissional de alunos de graduação e pós graduação.

Regina Meneses Gonçalves
Breno Emanuel Farias Frihling
Ludovico Migliolo

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| ANÁLISE DE PERFIL PROTEICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DA HEMOLINFA DA ARANHA <i>Nhandu carapoensis</i> | |
| Luiz Filipe Ramalho Nunes de Moraes Patrícia Souza e Silva Alexya Sandim Guindo Ludovico Migliolo | |
| DOI 10.22533/at.ed.7541902091 | |
| CAPÍTULO 2 | 17 |
| CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME E ANTITUMORAL DA PEÇONHA DE <i>Tityus confluens</i> | |
| Regina Meneses Gonçalves Danieli Fernanda Buccini Luiz Filipe Ramalho Nunes de Moraes Ludovico Migliolo | |
| DOI 10.22533/at.ed.7541902092 | |
| CAPÍTULO 3 | 30 |
| AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE LARVAS NECRÓFAGAS <i>Chrysomya albiceps</i> (DIPTERA, CALLIPHORIDAE) INIBIDORAS DE BIOFILME DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC | |
| Patrícia Souza e Silva Regina Meneses Gonçalves Daniela Lopes Da Cunha Lucas Rodrigues de Lima Carina Elisei De Oliveira Ludovico Migliolo | |
| DOI 10.22533/at.ed.7541902093 | |
| CAPÍTULO 4 | 41 |
| EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS TOXINAS PRESENTE EM LAGARTA <i>Lonomia obliqua</i> (LEPIDOPTERA, SATURNIIDAE) COM ATIVIDADE ANTIBIOFILME | |
| Patrícia Souza e Silva Luiz Filipe Ramalho Nunes de Moraes Elizangela de Barros Ana Paula de Araújo Boleti Ludovico Migliolo | |
| DOI 10.22533/at.ed.7541902094 | |
| CAPÍTULO 5 | 51 |
| DESENHO RACIONAL DE PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS ANÁLOGOS A TOXINA DO ESCORPIÃO <i>Tityus sp.</i> | |
| Lucas Bianchi Nunes Taylla Michelle de Oliveira Flores Patricia Souza e Silva Elizangela de Barros Marlon Henrique Cardoso Octávio Luiz Franco Ludovico Migliolo | |
| DOI 10.22533/at.ed.7541902095 | |

| | |
|---|------------|
| CAPÍTULO 6 | 71 |
| AVALIAÇÃO E SELEÇÃO <i>IN SILICO</i> DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS BIOINSPIRADOS NA L-AMINOÁCIDO OXIDASE DA SERPENTE <i>Bothrops jararacussu</i> | |
| Odaias Pereira de Almeida Filho | |
| Breno Emanuel Farias Frihling | |
| Michel Ângelo Constantino de Oliveira | |
| Gilberto Astolfi | |
| Hemerson Pistori | |
| Ludovico Migliolo | |
| DOI 10.22533/at.ed.7541902096 | |
| CAPÍTULO 7 | 81 |
| ESTUDO DA NEUTRALIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO VENENO DA SERPENTE <i>Bothrops erythromelas</i> | |
| Ellynes Amancio Correia Nunes | |
| Renner de Souza Leite | |
| Álisson Emannuel Franco Alves | |
| Ludovico Migliolo | |
| Karla Patrícia de Oliveira Luna | |
| DOI 10.22533/at.ed.7541902097 | |
| CAPÍTULO 8 | 96 |
| ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO POR SDS-PAGE DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE <i>Rhinella schneideri</i> , <i>Dermatonotus muelleri</i> , <i>Physalaemus nattereri</i> e <i>Trachycephalus typhonius</i> | |
| Alexya Sandim Guindo | |
| Luiz Humberto Guimarães Riquelme Junior | |
| Luiz Felipe Ramalho Nunes de Moraes | |
| Ludovico Migliolo | |
| DOI 10.22533/at.ed.7541902098 | |
| CAPÍTULO 9 | 110 |
| POTENCIAL DE INIBIDORES SERINICOS EM FOLHAS DE <i>Croton urucurana</i> (MALPIGHIALES, EUPHORBIACEAE) PARA O CONTROLE DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE) | |
| Taylla Michelle de Oliveira Flores | |
| Liliam Silvia Cândido | |
| Ludovico Migliolo | |
| Jannaina Velasques da Costa Pinto | |
| DOI 10.22533/at.ed.7541902099 | |
| SOBRE OS ORGANIZADORES..... | 118 |

ESTUDO DA NEUTRALIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO VENENO DA SERPENTE

Bothrops erythromelas

Ellynes Amancio Correia Nunes

Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biologia Molecular João Pessoa, Paraíba

Renner de Souza Leite

Universidade Federal de Campina Grande, Unidade Acadêmica de Saúde do Centro de Educação e Saúde Cuité, Paraíba

Álison Emmanuel Franco Alves

Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biologia Molecular João Pessoa, Paraíba

Ludovico Migliolo

Universidade Católica Dom Bosco Campo Grande, Mato Grosso do Sul

Karla Patrícia de Oliveira Luna

Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde Campina Grande, Paraíba

RESUMO: Ofidismo é um problema de saúde pública negligenciada mundialmente, que vitima aproximadamente 2,5 milhões de pessoas por ano, envolvendo 125 mil mortes. O gênero *Bothrops* é responsável por 87% dos envenenamentos registrados no Brasil. Sendo a espécie endêmica do Nordeste brasileiro a *Bothrops erythromelas*, responsável pelo maior número de acidentes registrados na Paraíba. O veneno botrópico induz hemorragias, coagulopatia, edema, necrose podendo levar à morte e/ou incapacidade permanente. Uma

vez que pouco se sabe a respeito de isotipos e especificidade de anticorpos produzidos por pacientes envenenados por serpentes da espécie *B. erythromelas*, objetivou-se avaliar o veneno desta serpente, frente ao reconhecimento entre moléculas e anticorpos presentes no soro de indivíduos envenenados, e frente aos soros comerciais brasileiros. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 12,5%, para avaliação da neutralização do veneno em vítimas tratadas com soro antiofídico, posteriormente utilizou-se o método de *Western blotting* para observar se haveria reatividade cruzada entre venenos de diferentes gêneros, e por fim, se analisou a neutralização *in vitro* do veneno frente ao soro antiofídico comercial brasileiro gênero específico. Observou-se que bandas de 29 a 31 KDa não são bem neutralizadas mesmo após a soroterapia em pacientes envenenados por *B. erythromelas*. Não ocorreu reação cruzada entre o veneno da referida serpente e o veneno de espécies pertencentes aos gêneros *Crotalus* e *Philodryas*. Ademais, o soro comercial não foi capaz de neutralizar algumas bandas presentes no veneno, entre elas as de 29 a 31 KDa, como foi confirmado no ensaio de neutralização *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: Envenenamento; Ofidismo; Soro comercial.

ABSTRACT: Snakebites is a neglected public health problem worldwide, it victims approximately 2.5 millions of people by year which gives 125 thousands death. Bothrops genus is responsible for 87% of the envenoming in Brazil. The endemic specie in the Northeast Brazil is the *Bothrops erythromelas*. The venom induces local hemorrhage, coagulopathy, edema, necrosis and can lead to permanent disability or death. There are limited studies about isotypes and specificity of antibodies produced by envenomed patients by *B. erythromelas*. The aim of this study is to evaluate this snake venom against the recognition between molecules and antibodies presents in the serum of envenomed individuals by other snake genus compared to Brazilian commercial serum. The proteins were separated in polyacrylamide gel for rating the neutralization of the venom in treated patients with the antivenom serum. Following was used the Western Blotting method to observe if there was cross reactivity between venoms of different genus. Lastly, the “*in vitro*” neutralization of the venom against the Brazilian commercial serum was analyzed. It has been observed that the fragments of 29 and 31 KDa are not well neutralized even after the treatment in patients envenomed by *B. erythromelas*. There was no cross-reaction between the venom of this snake and the venom of species belonging to the genus *Crotalus* and *Philodryas*. In addition, the commercial serum was not able to neutralize some of the fragments present in the venom, among them those fragments of 29 and 31 KDa, as confirmed at the *in vitro* neutralization test.

KEYWORDS: Envenom; Snakebites; Commercial Serum.

1 | INTRODUÇÃO

Acidentes com serpentes são um problema de saúde pública negligenciado que vitimam cerca de 2.500.000 pessoas com 125 mil mortes anualmente, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (ALBUQUERQUE, 2013). No Brasil ocorrem aproximadamente 26.112 casos notificados por ano com uma letalidade de cerca de 6,95% (BRASIL, 2017).

Os venenos ofídicos contêm uma grande variedade de componente, cujo papel preliminar é agir para imobilizar a presa. Cerca de 90% do peso seco das peçonhas das serpentes são compostas por proteínas, principalmente as enzimáticas (serino proteinases, metaloproteases, L-aminoácido oxidase, fosfolipases) e proteínas sem atividade enzimática (desintegrinas, lectinas de tipo C, peptídeos natriuréticos). A parte não proteica compreende ânions e cátions inorgânicos, lipídeos, carboidratos, pequenos peptídeos e aminoácidos (CARDOSO, 2003; JENNINGS et al, 2005; GUTIÉRREZ, 2009a).

O gênero *Bothrops* e *Bothriopsis* são responsáveis por 87% dos envenenamentos notificados no Brasil (BRASIL, 2016). No domínio caatinga, a espécie endêmica é *Bothrops erythromelas* (AMARAL, 1923), conhecida localmente como jararaca-da-seca, jararaca malha de cascavel ou jararaca vermelha. Seu veneno apresenta

ação proteolítica, caracterizando o envenenamento pela presença de bolhas, edema e necrose, que provavelmente decorre da ação de enzimas como proteases, hialuronidasas e fosfolipases, da liberação de mediadores da resposta inflamatória; ação coagulante, ativando isoladamente ou simultaneamente o fator X e a protrombina, podendo agir como a trombina, convertendo o fibrinogênio em fibrina. Este tipo de ação causa distúrbios na coagulação sanguínea, uma vez que ao atingir a cascata de coagulação de forma direta, promove a destruição do fibrinogênio e da fibrina, podendo, por conseguinte, causar incoagulabilidade sanguínea; e ação hemorrágica, que são decorrentes da ação das hemorraginas provocando lesões na membrana basal dos capilares, associadas à trombocitopenia e alterações da coagulação (GUTIÉRREZ, 2009).

O tratamento indicado pelo Ministério da Saúde para envenenamentos com serpentes é a utilização de soros antiofídicos, que no Brasil são produzidos pelo Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos (CPPI), Instituto Butantan – IB (SP), Instituto Vital Brasil – IVB (RJ) e Fundação Ezequiel Dias – FUNED (MG), por meio da imunização de equinos, onde o soro antiofídico, é produzido com venenos provenientes de cinco espécies do gênero *Bothrops* mais prevalentes no Brasil: *B. jararaca* – 50%, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. matogrossensis* – 12,5% cada, e são distribuídos pelo Ministério da Saúde, por meio da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), (BRASIL, 2010).

Poucos estudos imunológicos são realizados com humanos, sobretudo, no que diz respeito a resposta imune humoral de pacientes envenenados por serpentes. Esse dado é preocupante porque a resposta imune humoral é a primeira frente de defesa do organismo, importante para delinear a evolução da doença (LICHTMANN; PILLAI, 2008). Para a serpente *B. erythromelas* (Figura 1), a importância de se realizar estudos imunológicos referente à espécie, se dá porque a mesma é endêmica da região Nordeste do Brasil (ROMANO-HOGE, 1990; GUTIÉRREZ, 2009), e é responsável pelo maior número de atendimentos na Paraíba (SINAN, 2012), porém, seu veneno não consta no pool de venenos utilizados na formulação do antiveneno comercial no Brasil.



Figura 1. *Bothrops erythromelas* (Jararaca da seca)

Fonte: Répteis da caatinga

Diante disto, objetivou-se avaliar a neutralização do veneno da serpente *B. erythromelas*, diante do reconhecimento entre anticorpos presentes no soro de indivíduos envenenados por outros gêneros de serpente, e frente aos soros comerciais brasileiros.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Pacientes

Fizeram parte da pesquisa pacientes de ambos os sexos e diferentes idades, envenenados por serpentes dos gêneros *Crotalus*, *Philodryas* e *Bothrops* e atendidos no Centro de Assistência Toxicológica do Hospital de Trauma de Campina Grande, no ano de 2012.

Os indivíduos foram entrevistados e, em seguida, foram submetidos aos exames clínico-laboratoriais, além da coleta de informações a partir das fichas de atendimento. Os critérios de inclusão na seleção dos pacientes contemplaram aqueles que receberam tratamento soroterápico e sinais/sintomas clínicos mais frequentes de envenenamento, como o edema local e alterações no tempo de coagulação sanguínea

do paciente.

Foram coletados um total de 30 mililitros (mL) de sangue de cinco (n= 5) pacientes que foram submetidos à pesquisa. Esta coleta foi feita em três intervalos de tempo: 0 horas antes da soroterapia, 12 horas após a soroterapia e 24 horas após a soroterapia, para cada coleta foi obtido 10 mL de sangue por paciente. Os pacientes que fizeram parte da pesquisa foram catalogados como Indivíduos: A, B, C, D e E. Onde o indivíduo A, foi vítima de um acidente causado pela serpente *Bothrops erythromelas*; os indivíduos B e D, foram vítimas de acidentes causados por serpentes do gênero *Crotalus*; e os indivíduos C e E, foram vítimas de acidentes causados por serpentes do gênero *Philodryas*.

2.2 Considerações Éticas

Esta pesquisa foi avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Estadual da Paraíba (CEP-UEPB), protocolo número 0007.0.133.000-12 de acordo com a Resolução nº 196 do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisas realizadas com seres humanos.

2.3 Obtenção do Veneno

O veneno da serpente *B. erythromelas* foi obtido por meio da ordenha de espécimes em cativeiro. Os espécimes foram provenientes do Zoológico Museu Vivo Répteis da Caatinga, localizado no município de Puxinanã, Paraíba. Foram selecionados apenas animais adultos. O veneno, após liofilização, foi mantido à temperatura de -20°C até o momento de sua utilização.

2.4 Perfil Eletroforético de Proteínas do Veneno de *B. erythromelas* Diante do Soro de Indivíduos Envenenados

Géis de poliacrilamida 12,5% em presença de SDS (Dodecil sulfato de sódio) foram feitos e acoplados a um sistema de eletroforese da Hoeffer. Ao sistema foi adicionado Solução Tampão (TRIS 0,125 M; GLICINA 0,95 M; SDS 5g). As amostras correram a 60 mA e 90 V por cerca de 1 a 2 horas. Os géis de empilhamento (*stacking gel*) e de separação (*running gel*) foram preparados a uma concentração de acrilamida de 4,5% (p:v) e 10% (p:v), respectivamente. Aos géis foram aplicados padrão de peso molecular (PM) (Sigma-Aldrich) com um espectro de 8 a 220 KDa); venenos de serpentes da espécie *B. erythromelas*, com soro de indivíduos previamente envenenados pela mesma serpente. Todas as amostras foram eluídas em tampão da amostra de Laemmli (1970) (Tris-HCl 1M pH 6,8; SDS 10%; β-mercaptoetanol 14,7 M; Glicerina; Azul de Bromofenol), e incubadas por 5 min em banho-maria antes de

sua aplicação no gel. Posteriormente foi feita a coloração dos géis com o corante *Coomassie brilliant blue* R-250; Metanol; Ácido Acético; H₂O), durante 30 minutos, seguido do tratamento com descorante (metanol 30%, ácido acético 10% e H₂O 60%) com intervalos de 10 min.

2.5 Avaliação do Cruzamento Entre Soro de Indivíduos Envenenados Por Serpentes dos Gêneros *Crotalus* e *Philodryas* Com Veneno da Serpente *B. erythromelas* Por Meio de *Western Blotting*

Para a realização da técnica de Western blotting (Towbin et. al., 1979) é necessário que as proteínas sejam anteriormente separadas pelo processo de Eletroforese em gel. Uma vez separadas as proteínas são transferidas para uma membrana absorvente, onde serão analisadas (KURIEN; SCOLFIELD, 2006).

Após o processo de eletroforese, onde se utilizou um padrão de massa molecular (Sigma-Color Burst; com espectro entre 8 a 220KDa); os géis foram submetidos a um processo de transferência das bandas de proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Whatman). Ao sistema foi adicionado 3 papéis de filtro umedecidos com Tampão Anodo I (Tris Base 36,3 g; Metanol; H₂O), seguido de mais três papéis de filtro umedecidos com Tampão Anodo II (Tris 3g; Metanol; H₂O), posteriormente foi colocada a membrana de nitrocelulose, seguida do Gel, e posteriormente se umidificou mais seis papéis de filtro com Tampão Catodo (Tris 3 g; Ácido capróico 5,2 g; Metanol; H₂O) acrescentando-se ao sistema que foi submetido a transferência por cerca de uma hora no bloqueador em sistema Semi Dry (Semi-Dry Blotting Systems, C.B.S. Scientific, modelo EBU-4000) com a voltagem de 45 V e amperagem máxima em 300 mA.

Após a transferência a membrana de nitrocelulose (NTC), foi corada com o corante Ponceau a 0,2% e 1% de TCA por 5 min. Em seguida procederam-se incubações de bloqueio com leite desnatado (Molico) 5% e lavagem em PBS com pH entre 7.2 e 7.4. Após a última lavagem com PBS-Tween 20 0,05%, procedeu-se incubação da folha de NTC com os primeiros anticorpos (soro dos pacientes envenenados por *Crotalus* e *Philodryas*), overnight, sob refrigeração.

No dia seguinte, lavagens com PBS-Tween20 0,05% foram realizadas e o segundo anticorpo (IgM-conjugada a peroxidase), foi adicionado à membrana de NTC, sendo a mesma incubada por duas horas a temperatura ambiente. A revelação da membrana foi realizada com 4-Cloronaftol (Sigma-Aldrich), feito na hora, e a reação parada com água destilada.

Os imunocomplexos formados (componentes antigênicos do veneno mais anticorpos presentes no soro do paciente) foram detectados através de uma sonda enzimática. No presente trabalho, a sonda enzimática utilizada foi a anti-IgM humana (Sigma-Aldrich) conjugada a peroxidase (Sigma-Aldrich).

2.6 Ensaio de Neutralização do Veneno da Serpente *B. erythromelas* Diante dos Antivenenos Comerciais

Para se analisar a neutralização do veneno da serpente *Bothrops erythromelas* frente aos antivenenos comerciais utilizou-se a metodologia descrita por Gené et al. (1989).

Foram incubadas doses fixas de veneno de serpente com diferentes concentrações de antivenenos comerciais em banho-maria por 30 min a uma temperatura de 37°C.

Incubou-se 5 µL (microlitros) do veneno da serpente com 10; 50; 100 e 200 µL, respectivamente do soro antitoxico comercial. Foi adicionado aos pools tampão de amostra q.s.p. 1X (loading buffer- 2X).

Depois de incubadas a 37°C, as amostras foram aplicadas ao gel de poliacrilamida 12,5%, onde foram submetidas ao processo de eletroforese.

No processo de SDS-PAGE foram utilizados três padrões de peso molecular, a saber, PM (Sigma-Color Burst) com espectro entre 8 a 220 KDa.

Posteriormente este gel foi corado com o corante *Coomassie Brilliant Blue* por 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de tratamento com o descorante (metanol 30%, ácido acético 10% e H₂O 60%) com intervalos de 10 min.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Perfil Eletroforético de Proteínas do Veneno de *B. erythromelas* Diante do Soro de Indivíduos Envenenados

Ao se realizar a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS observou-se bandas proteicas que reafirmaram o que foi observado nos experimentos realizados por Luna et al. (2010), com os quais observou-se um padrão de bandas com peso molecular entre 29 e 31 KDa que não sofrem neutralização mesmo após o tratamento soroterápico dos pacientes envenenados.

No gel 1 (Figura 2) é possível verificar a interação entre o veneno da serpente *B. erythromelas* e o soro de indivíduos envenenados pela mesma serpente. Como pode-se observar nas Colunas 3, 4, 5, 6, 7 e 8 mostram a formação de um complexo imune que sugere uma grande interação entre o veneno da serpente e os anticorpos presentes nos soros dos pacientes, o que pode ser visualizado pela forte coloração da formação no início do gel. É importante observar, também, que algumas bandas presentes no gel como a banda de cerca de 29 KDa não é neutralizada mesmo após a soroterapia dos pacientes envenenados. É importante verificar que nos poços 3, 4 e 5 foi utilizado o pool de soro acrescido de veneno da espécie *B. erythromelas*, este pool refere-se a primeira coleta que caracteriza o tempo zero do tratamento,

sendo respectivamente, leve, moderado e grave. Os poços seguintes, a saber, 6, 7 e 8 receberam pools de terceira coleta, o que indica o tempo de 24 horas após o tratamento, este também foi acrescido com o veneno da serpente e assim como os poços anteriores constituem envenenamentos do tipo, leve, moderado e grave, nesta ordem. No gel 2, foi utilizada a mesma sequência do gel 1. Pode-se visualizar que não há formação de imunocomplexos como foi observado no primeiro gel.

A formação de complexo imune observada no primeiro gel, está relacionada a presença do veneno no sistema, uma vez que os anticorpos do soro dos pacientes reagiram e interagiram com as proteínas do veneno. E o mesmo não se observa no segundo gel, onde não houve a adição do veneno da *B. erythromelas*.

As bandas que se encontram destacadas no esquema (Figura 2), a saber, aproximadamente 29 e 31 KDa, bem como a de cerca de 100 KDa, podem constituir um grupo de proteínas que não são neutralizadas pelo tratamento soroterápico, corroborando com os resultados de Luna et. al (2010), uma vez que o veneno da espécie causadora do envenenamento não está contido no *pool* de venenos selecionados para a produção do soro antiofídico poliespecífico, produzido no Brasil.

Jorge et al. (2014), observaram que serpentes da espécie *B. erythromelas* possuíam variações na composição química do seu veneno de acordo com a sua localização geográfica. O que sugere que dentro da mesma espécie podem ocorrer tipos de envenenamentos diferentes, quanto a sua gravidade, mostrando que o soro poliespecífico não configura a melhor opção no tratamento para reverter o quadro de envenenamento de vítimas de acidentes ofídicos, mas que um soro produzido em nível de espécie seria mais eficiente na neutralização de todos os componentes do veneno.

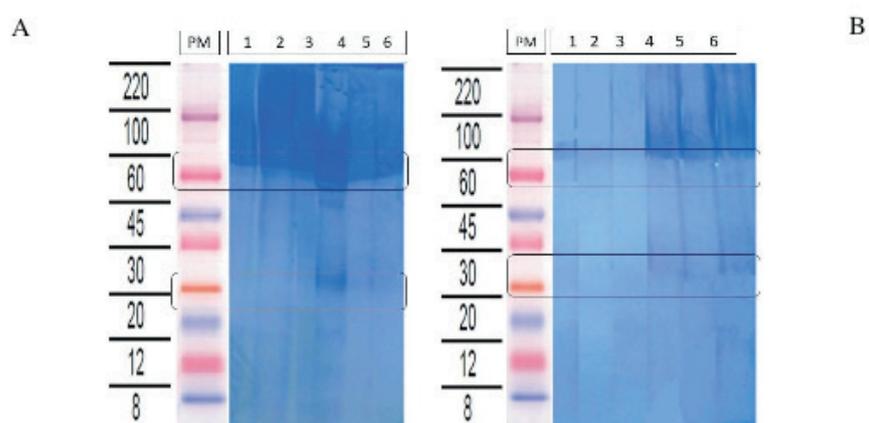


Figura 2: A- Coluna 1,2 e 3 coletas I de soro de pacientes em zero hora (antes do tratamento soroterápico) + veneno, Colunas 4,5 e 6: coletas III de soro de pacientes (24 horas após tratamento soroterápico) + veneno. B- Coluna 1,2 e 3 coletas I de soro de pacientes em zero hora (antes do tratamento soroterápico), Colunas 4,5 e 6: coletas III de soro de pacientes (24 horas após tratamento soroterápico) sem veneno.

3.2 Avaliação do Cruzamento Entre Soro de Indivíduos Envenenados Por

Serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Philodryas* com veneno da serpente *B. erythromelas* por meio de *Western blotting*

Os resultados indicam que os antígenos do veneno da serpente *B. erythromelas* não apresentaram reação cruzada com o soro de indivíduos envenenados por outros gêneros de serpente (Figura 3), uma vez que não se observou bandas presentes na membrana de nitrocelulose, principalmente na nossa banda de interesse, localizada na região de 29-31 KDa, como destacado na Figura 3. Este resultado é promissor, uma vez que o marcador que estudamos, banda de 29-31 KDa, pode vir a ser um diferenciador importante para o diagnóstico de envenenamento pela serpente *B. erythromelas* no Nordeste.

A necessidade de se observar a ocorrência de uma reação cruzada entre os venenos de *Bothrops erythromelas* e *Philodryas. sp.* dá-se devido às semelhanças dos quadros fisiopatológicos, entre estes envenenamentos (FAN; CARDOSO 1995, FRANÇA; MÁLAQUE 2003). De acordo com estudos realizados por Tanjoni et al. (2003) onde foi utilizando o anticorpo monoclonal anti-jararagina que reconhece um epítipo presente na região Cterminal do domínio desintegrina-like, uma metaloproteínase do veneno de *Bothrops jararaca*, demonstraram pela técnica de *Dot Blot* que estes anticorpos reagiram com os venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis*, sugerindo que as metaloproteínases destes venenos apresentam epítipos comuns aos de *B. jararaca*. Corroborando tais achados, Rocha et al. (2006) demonstraram que o soro antibotrópico comercial apresentou reatividade cruzada com o veneno das serpentes *P. olfersii* e *P. patagoniensis* sendo capaz de neutralizar a ação hemorrágica, e eficientemente a atividade tóxica destes venenos (*P. olfersii* e *P. patagoniensis*), com eficiências similares aos obtidos com o veneno de *B. jararaca*.

No que concerne aos venenos das serpentes pertencentes aos gêneros *Crotalus* e *Bothrops*, possuem bioquímica diferenciada. De acordo com Breithaupt (1976) os principais componentes do veneno crotálico são: fosfolipases A₂, Crotapotina, Crotoxina, Crotamina e Girotoxina. O veneno botrópico por sua vez possui em sua composição química, Botropsina I e II, Trombocitina, Jararacina, metaloproteínases, Jararacafribase, e outras enzimas pro-coagulantes. (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988). Contudo Spencer (1998) indica que umas das principais frações da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*, a Bothropstoxin-1 é uma fosfolipase A₂. Assim, as fosfolipases são constituintes tanto do veneno botrópico como do crotálico. Daí se dá a necessidade de se observar uma possível reação cruzada entre estas duas peçonhas.



Figura 3: Resultado do Western Blo realizado com (1) Padrão de Massa molecular (Sigma-ColorBurst) com espectro de 6.5 a 200 KDa. (2): veneno da serpente *B. erythromelas*; (3): soro de indivíduo envenenado por *C. durissus*; (4): soro de indivíduo envenenado por *Philodryas* sp.; (5) soro de indivíduo envenenado por *C. durissus*; (6) soro de indivíduo envenenado por *Philodryas* sp.

3.3 Ensaio de Neutralização do Veneno Da Serpente *B. Erythromelas* Diante dos Antivenenos Comerciais

A Figura 4 mostra o perfil de neutralização apresentado quando 5 μ L de veneno é incubado com 10, 50, 100 e 200 μ L de soro antiveneno comercial.

Como é possível observar, na coluna 4, a concentração de SAB (10 μ L) não foi suficiente para neutralizar o veneno, uma vez que as bandas referentes aos componentes do mesmo ainda são bem visíveis. Nas colunas 5 (50 μ L SAB), 6 (100 μ L SAB), 7 (200 μ L SAB) é possível observar que várias bandas do veneno aparecem não neutralizadas, assim como a banda observada apenas no veneno (Coluna 3), entre elas a banda de cerca de 29 a 31 kDa, como indicado pela seta.

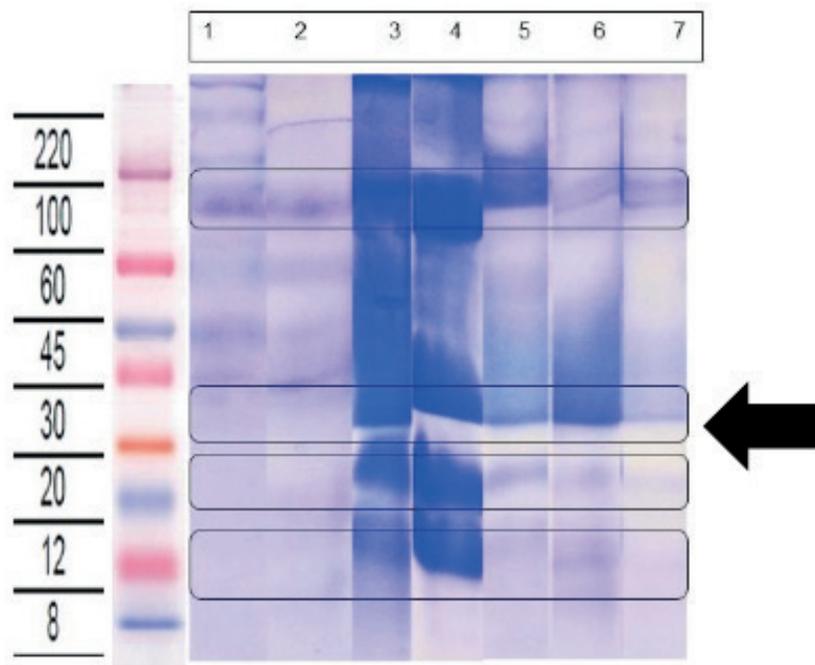


Figura 4: Eletroforese unidimensional destacando (1) e (2) Padrão de Massa Molecular; (3) veneno mais Tampão de Amostra; Coluna (4) Veneno + SAB 10 μL ; (5) veneno + SAB 50 μL ; (6): veneno + SAB 100 μL ; (7) veneno + SAB 200 μL .

À medida que se aumenta a concentração do soro, observa-se que mais bandas vão sendo neutralizadas e que algumas, especialmente aquela localizada na região de 31 kDa permanece inalterada.

Em estudos realizados por Boechat et al. (2001), foi observado que o soro antibotrópico possuía uma eficácia de apenas 58% na letalidade da ação do veneno da *Bothrops erythromelas* quando comparado ao de *Bothrops jararaca*, que possui uma eficiência de 100%. Essa diferença na ação de neutralização dos venenos botrópicos colocam em questão a qualidade do soro comercial antibotrópico fornecido pelo Ministério da Saúde, uma vez que a *B. erythromelas* é a principal responsável pelos acidentes ofídicos registrados na região nordeste do Brasil.

Deve-se considerar que a técnica de incubação do veneno com o SAB (soro antibotrópico) mimetiza o que ocorre no organismo vivo. Porém, também devemos salientar que em um envenenamento não é possível saber a quantidade de veneno inoculada e, certamente, o tempo decorrido entre a ligação dos antígenos presentes no veneno com os anticorpos do soro, é bem maior, ou seja, de acordo com os resultados descritos na Figura 4, uma quantidade maior de soro pode sim ajudar na neutralização de toxinas em período de tempo menor.

De acordo com Jorge e Ribeiro (1997), a tendência atual deve ser a utilização de doses menores de soro, pelo menos quando se trata de envenenamentos leves e moderados, principalmente em locais de alta prevalência de *B. jararaca*. Nossos resultados não corroboram essa afirmação, pois o raciocínio não se aplica a áreas onde ocorre a espécie *B. erythromelas*, já que a mesma não está presente no pool de venenos que compõem o SAB. Eles afirmam ainda que em envenenamentos graves

permanecem as recomendações de doses altas (12 ou mais ampolas), conforme orientações oficiais (Ministério da Saúde, 2003; Manual de vigilância epidemiológica, São Paulo, 2015). Esses casos, entretanto, são menos frequentes. Dada a diversidade de espécies encontradas nas várias regiões do país, é importante que estudos semelhantes sejam realizados também em outros locais, para se avaliar a eficácia dessas doses de antiveneno em relação a outras espécies peçonhentas.

O tempo decorrido entre o envenenamento e o tratamento deve ser levado em consideração, pois, de acordo com nossa experiência clínica no Estado da Paraíba, observamos que pacientes que levam mais de 6 horas para chegar ao socorro hospitalar e realizar o tratamento apresentam, com frequência, hemorragias disseminadas. Essas hemorragias, entretanto, podem ser revertidas após correto tratamento soroterápico (SANO-MARTINS; SANTORO, 2004). Porém, deve-se considerar que, se a banda mais importante encontrada neste estudo, 29 - 31 kDa, pode ser a responsável por causar hemorragias, estamos diante de potentes toxinas específica desse veneno, e que não são neutralizadas com o tratamento soroterápico em uso.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dessa forma, pode-se concluir, que ao se analisar o perfil de neutralização das toxinas presentes no veneno da serpente *B. erythromelas* frente ao soro de indivíduos envenenados antes e após a soroterapia, observou-se que as bandas de 29 a 31 kDa apresentaram padrão de neutralização diferenciado, uma vez que mesmo 24 horas após a submissão do paciente ao soro antibotrópico, estas bandas permaneceram não neutralizadas.

O mesmo se observou quando se analisou o perfil de neutralização do veneno da serpente *B. erythromelas*, frente ao soro antibotrópico comercial, mesmo sendo submetido a diferentes concentrações de soro antibotrópico. As mesmas proteínas encontradas nas bandas de 29 a 31 kDa permaneceram inalteradas, ou seja, não houve neutralização.

Esta implicação indica que o soro antibotrópico gênero específico produzido no Brasil não age com total eficiência no processo de reverter completamente os danos causados pela ação do veneno da *Bothrops erythromelas*.

Além disso, identificamos outras bandas proteicas com aproximadamente 24, 36 e 55 kDa no veneno da serpente *B. erythromelas*, representando toxinas que não foram neutralizadas pelo soro antiveneno comercial, o que aumenta em muito a preocupação de que mais de uma classe de toxinas possa estar agravando os envenenamentos deflagrados por essa espécie. Estudos de venômica são necessários para que essas bandas sejam identificadas quanto a sua estrutura, composição química, sequência de aminoácidos e atividade biológica.

Avaliando-se o possível cruzamento entre o soro de pacientes envenenados por serpentes pertencentes aos gêneros *Crotalus* e *Philodryas* frente ao veneno de *B.*

erythromelas, a metodologia de *Western blotting* mostrou que os antígenos do veneno de *B. erythromelas* não apresentaram reação cruzada com os soros dos indivíduos envenenados pelas serpentes dos outros dois referidos gêneros. Dado importante uma vez que pretendemos no futuro identificar marcadores específicos do envenenamento pela serpente *B. erythromelas*.

Estes resultados ajudam a direcionar novas pesquisas para o melhoramento de futuros tratamentos através da inclusão de soros mais específicos no tratamento de indivíduos envenenados por serpentes, um problema de saúde pública negligenciado. Essa estratégia pode levar a diminuição da letalidade, morbidade e de danos irreversíveis que possam ser causados pelos envenenamentos causados por esta espécie de serpente.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, P.L.M.M.; JACINTO, C.N.; JUNIOR, G.B.S.; LIMA, J.B.; VERAS, M.S.B.; DAHER, E.F. 2013. **Epidemiological profile of snakebite accidents in a metropolitan area of northeast Brazil**. Rev. Inst. Med.Trop. São Paulo. V.55, 295-301.
- AMARAL, A. **New genera and species of snakes**. Proc. N. Engl. Zool. Club 8. 1923. p. 85 e 105.
- BOECHAT, A.L.; PAIVA, C.S.; FRANCA, F.O.; DOS SANTOS, M. C.2001. **Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in *Bothropsatrox* and *Bothropserythromelas* envenoming**. Revista do Instituto de Medicina Tropical. V. 43, 10, 2001.
- BRASIL. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**, eighth ed. Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília. 2010.
- BRASIL. **Acidente por animais peçonhentos** - notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN) - SINAN NET, DATASUS (Tecnologia da Informação a Serviço do SUS. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária). 2016.
- BRASIL. **Acidente por animais peçonhentos** - notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN) - SINAN NET, DATASUS (Tecnologia da Informação a Serviço do SUS. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária). 2017.
- BREITHAUPT H. "**Neurotoxic and myotoxic effects of *Crotalu sphospholipase A* and its complex with crotapotin**. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol." Vol.292 (3): 271-278.
- CARDOSO JLC, WEN FH. **Introdução ao ofidismo**. In: ARAÚJO FAA, SANTALÚCIA M.; CABRAL R.F. editores. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes**. Editora Sarvier, São Paulo, 2003.
- FAN, H.W. & J.L. CARDOSO. **Clinical toxicology of snake bites in South America**, 1995. In: J. MEIER & J. WHITE (Eds). **Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons**. Boca Raton, CRC Press, 667-688.
- FRANÇA FOS & MÁLAQUE CMS. **Acidente Botrópico**. In: CARDOSO JLC,FRANÇA FOS, FAN HW, MÁLAQUE CMS, HADDAD JR.2003.**Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1 ed. Sarvier, São Paulo; v.1, 468.
- GENÉ, J.A.;ROY,A.; ROJAS, G.;GUTIÉRREZ, J.M.; E CERDAS,L. **Comparative study on coagulant,**

defibrinating, fibrinolytic, and fibrinolytic activities of Costa Rica crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 27, 841-848.

GUTIÉRREZ, J.M., RUCAVADO, A. **Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage.** *Biochimie* Vol. 82. 2009. p. 841-850.

GUTIÉRREZ, J.M., ESCALANTE, T., RUCAVADO, A. **Experimental pathophysiology of systemic, alterations induced by *Bothrops asper* snake venom.** *Toxicon* Vol. 54. 2009a. p. 976-987.

HOMSI-BRANDEBURGO M.I.; QUEIROZ L.S.; SANTO-NETO H; RODRIGUES-SIMIONI L; GIGLIO J.R. 1988. **Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin.** *Toxicon*, Vol.26, 615-627.

JENNINGS, B.; SPEARMAN, W.; SHERPHARD. E. 2005. **A novel 25KDa protein form the venom of *Bitis arietans* with similarity to C-type lectins causes fibrinogen- dependent platelet agglutination.** *Toxicon*, Vol. 46, 687-98.

JORGE, M. T. & RIBEIRO, L. A. 1997. **Dose de soro (antiveneno) no tratamento do envenenamento por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*.** *Rev. Ass. Med. Brasil*. Vol.43, 74-76.

JORGE, R.J.B.; MONTEIRO, H.S.A.; GONÇALVES-MACHADO, L.; GUARNIERI, M.C.; XIMENES, R.M.; BORGES-NOJOSA, D.M.; LUNA, K.P.de O.; ZIGALI, R.B.; CORRÊA-NETTO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; SANZ, L.; CALVETE, J.J.; PLA, D.2014. **Venomomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from Five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil.** *Rev. Journal of Proteomics XX*. Published by: Elsevier B.V.93-114.
DOI: 10.1016/j.jprot.2014.11.011

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. 2006. **Western blotting. Methods.** San Diego. Vol. 38, 283-293.
DOI: 10.1016/j.ymeth.2005.11.007

LAEMMLI, U.K. 1970. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*. Vol.227, 680-685. DOI: 10.1038/227680a0

LICHTMANN, A.; PILLAI, S. 2008. **Imunologia Celular e Molecular.** Editora: Elsevier. Ed. 6.

LUNA, K.P.; XAVIER, E.M.; PASCOAL, V.P.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; PEREIRA, V.R.A. 2010. **Humoral immune response of patients bitten by the snake *Bothrops erythromelas*.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Vol. 43 (6),731-732.

Ministério da Saúde. 2003. **Manual de diagnóstico e tratamento dos acidentes por animais peçonhentos.** Brasília: Fundação Nacional de Saúde (FUNASA).

Ministério da Saúde.2015. **Manual de Vigilância Epidemiológica.** São Paulo.

ROCHA, M.M.T.; D. PAIXÃO-CAVALCANTE; D.V. TAMBOURGI & M.F.D. FURTADO.2006. **Duvernoy's gland secretion of *Philodryasolfersii* and *Philodryaspatagoniensis*(Colubridae): Neutralization of local and systemic effects by commercial bothropicantivenom (*Bothrops* genus).** *Toxicon* 47, 95-103.

ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. 1990. **Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento. Distribuição geográfica no continente americano.** In: SOERENSEN, B., **Animais Peçonhentos.** Livraria Atheneu, Rio de Janeiro. Vol.1, 1-41.

SANO-MARTINS I.S. & SANTORO M.L. 2004. **Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos do Brasil.** 289-303.

SINAN-Sistema Nacional de Agravos de Notificação. Estatística 2012. Ministério da Saúde. <http://sinan.saude.gov.br/>. (Accessed: 10.08.2015).

SPENCER PJ, AIRD SD, BONI-MITAKE M, NASCIMENTO N, ROGERO JR. 1998. **A single-step purification of bothropstoxin-1**. Braz J Med Biol Res. Vol. 31(9), 1125-1127. PMID: 9876278

TANJONI, I.; D. BUTERA; P.J. SPENCER; A.H. TAKEHARA; I. FERNANDES & A.M. MOURA-DA-SILVA. 2003. **Phylogenetic conservation of a snake venom metalloproteinase epitope recognized by monoclonal antibody that neutralizes hemorrhagic activity**. Toxicon 42 (7), 809-816. PMID: 14757213

TOWBIN H, STAEGELIN T, GORDON J. 1979. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications**. Proc Natl Acad Sci U S A. Vol. 76(9), 4350-4354.

SOBRE OS ORGANIZADORES

REGINA MENESES GONÇALVES é graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Católica Dom Bosco (2017) e mestranda em Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco. Atualmente, seu foco de pesquisa é avaliação de peptídeos antimicrobianos frente a bactérias patogênicas humanas e animais, com intuito do desenvolvimento de novas terapias.

BRENO EMANUEL FARIAS FRIHLING - Graduado em Ciências Biológicas, Mestre em Biotecnologia e Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Católica Dom Bosco, tem experiência na área de manejo de animais de laboratório convencionais (ratos e camundongos) e não-convencionais (serpentes), manejo de animais silvestres, captura e manejo de pequenos mamíferos, educação ambiental e técnicas clássicas de purificação. Atualmente trabalha com caracterização bioquímica e bioprospecção de moléculas bioativas presentes nas toxinas de serpentes da região do estado de Mato Grosso do Sul. Além disso, participa de projetos com ênfase na análise de águas com a identificação de fármacos presentes em amostras naturais, rurais e urbanas.

LUDOVICO MIGLIOLO é graduado em Ciências Biológicas (Bacharelado E Licenciatura) pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2005 e 2006). Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2008) e Doutor em Ciências Genômicas e Biotecnologia pela Universidade Católica de Brasília (2012), com período sanduíche em *The University of Queensland* (Austrália). Atuou como pós doutor bolsista PNPD CAPES na área de Biotecnologia durante 2 anos na Universidade Católica de Brasília, na bioprospecção e síntese de peptídeos bioativos para o desenvolvimento de novas terapias. Atualmente é professor de graduação e pós graduação além de ser pesquisador nível 2 na área de Biotecnologia pela Universidade Católica Dom Bosco, Mato Grosso do Sul. Tem experiência na área de Bioquímica, Biofísica e Bioinformática com ênfase em Purificação de Proteínas e Peptídeos Naturais e Sintéticos, Modelagem Molecular de Estruturas Proteicas e Peptídeos, Estudos de Interação Proteína-Proteína, Peptídeo-Proteína, Peptídeo-DNA, Peptídeo-Membranas Biológicas, Estudos com Dicroísmo Circular e Espectrometria de Massa. Além disso, atua na área de desenho racional de peptídeos bioativos análogos de toxinas de serpente, escorpião, anuros, aranhas e insetos. Aplicação destas metodologias nos seguintes temas: defesa de plantas, peptídeos antimicrobianos, imunomoduladores, anticongelantes e análises proteômicas animais, vegetais e de microrganismos.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-575-4

