

Estudo da Herpetofauna Brasileira

Daiane Patricia Oldiges
(Organizadora)



 **Atena**
Editora

Ano 2018

Daiane Patricia Oldiges
(Organizadora)

Estudo da Herpetofauna Brasileira

Atena Editora
2018

2018 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Geraldo Alves e Natália Sandrini

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
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
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall'Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie di Maria Ausiliatrice
Profª Drª Juliane Sant'Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
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
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

E82 Estudo da herpetofauna brasileira [recurso eletrônico] / Organizadora Daiane Patricia Oldiges. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
ISBN 978-85-85107-61-1
DOI 10.22533/at.ed.611182310

1. Anfíbios – Ecologia – Brasil. 2. Répteis – Ecologia – Brasil.
3. Zoologia. I. Oldiges, Daiane Patricia.

CDD 591.5

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo do livro e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2018

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.

www.atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A herpetologia trata do ramo da zoologia responsável pelo estudo de répteis e anfíbios, abordando temas como classificação, fisiologia e comportamento, entre outros. Atuando tanto como presa quanto como predador na complexa rede de interações ecológicas, os répteis e anfíbios são fundamentais para o funcionamento adequado dos ecossistemas - aquático e terrestre.

Dentro da herpetologia, o estudo ecológico de répteis e anfíbios é um campo bastante amplo, no qual são analisadas características como interações sociais, comportamento no ambiente, distribuição e conservação das espécies. Tais animais são capazes de povoar uma ampla gama de ambientes, com grande variedade de concentração de solutos, temperatura e fontes de alimentos. Por serem bastante sensíveis a alterações nos mesmos, em sua grande maioria decorrentes da intervenção humana, e dada a grande área de povoamento se tornam importantes bioindicadores ambientais.

Estudar esses organismos é fundamental para promover sua conservação, e, conseqüentemente, a manutenção do equilíbrio do ecossistema como um todo. Não devemos, no entanto, esquecer do impacto direto que a pesquisa de répteis e anfíbios exerce sobre o desenvolvimento do estudo científico. Estes animais apresentam um grande potencial biotecnológico, tendo em vista que as secreções por eles produzidas são uma inestimável fonte de novas moléculas, ou mesmo de análogos de moléculas já existentes, que podem auxiliar o desenvolvimento de novos fármacos.

A presente obra se trata de uma coletânea de textos, e apresenta em seus 6 capítulos novas informações na área de herpetologia, tendo como foco a ecologia destes animais e o potencial biotecnológico do estudo dos mesmos. Por fim, esperamos que este livro possa colaborar e instigar mais estudantes e pesquisadores na constante busca de novas tecnologias para esta interessante área de conhecimento.

Daiane Patricia Oldiges

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE <i>Dermatonotus muelleri</i> UTILIZANDO OS MÉTODOS DE ELETROFORESE (SDS-PAGE) E ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF)	
Luiz Humberto Guimarães Riquelme Junior	
Marcos Antonio Ferreira	
Breno Emanuel Farias Frihling	
Fernanda de Cássia Gonçalves Alves	
Paula Helena Santa Rita	
Newton Valério Verbisck	
Ludovico Migliolo	
CAPÍTULO 2	12
EFEITO DA FOSFOLIPASE PRESENTE NA TOXINA DE <i>Bothrops moojeni</i> FRENTE A BIOFILME DE <i>Staphylococcus aureus</i>	
Breno Emanuel Farias Frihling	
Patrícia Souza e Silva	
Guilherme Augusto Abrantes	
Odaias Pereira Almeida Filho	
Elizangela de Barros	
Paula Helena Santa Rita	
Luiz Humberto Guimarães Riquelme Junior	
Ludovico Migliolo	
CAPÍTULO 3	27
EVALUATION OF THE OXIDATIVE STRESS USING BIOMARKER MALONDIALDEHYDE IN ATRETIC EGGS OF BRAZILIAN SNAKES FROM <i>Bothrops</i> genus.	
Poliana Garcia Corrêa	
Giuseppe Puerto	
Daniel da Conceição Rabelo	
Rosely Cabette Barbosa Alves	
Durvanei Augusto Maria	
CAPÍTULO 4	42
NOVOS REGISTROS DE OCORRÊNCIA DE <i>Trachemys dorbigni</i> (Emydidae, Testudines) NO BRASIL	
Juliana Rosa Matias Ciccheto	
Carlos Eduardo Vargas Grou	
Sabine Borges da Rocha	
CAPÍTULO 5	51
HISTÓRIA NATURAL DE <i>HEMIDACTYLUS AGRIUS</i> VANZOLINI, 1978 (SQUAMATA: GEKKONIDAE) EM UMA ÁREA DE CARNAUBAL NO MUNICÍPIO DE ACARAÚ, CE	
Francisco Ageu Ribeiro do Nascimento	
Osmalene Mayara de Souza	
Graziella Macêdo Batista	
Raíla Brena Araújo	
Francisco Robson Carvalho de Oliveira	
Maria Juliana Miranda Silva	
Robério Mires de Freitas	
Amaurício Lopes Rocha Brandão	

CAPÍTULO 6 69

EDUCAÇÃO AMBIENTAL COM OS TURISTAS DO PARNA DE UBAJARA SOBRE A HERPETOFAUNA

Raíla Brena Araújo

Graziella Macêdo Batista

Ingrid Andrade Pereira

Amaurício Lopes Rocha Brandão

SOBRE A ORGANIZADORA..... 77

EFEITO DA FOSFOLIPASE PRESENTE NA TOXINA DE *Bothrops moojeni* FRENTE A BIOFILME DE *Staphylococcus aureus*

Breno Emanuel Farias Frihling

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Patrícia Souza e Silva

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Guilherme Augusto Abrantes

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Odaias Pereira Almeida Filho

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Elizangela de Barros

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Paula Helena Santa Rita

Universidade Católica Dom Bosco, Biotério UCDB
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Luiz Humberto Guimarães Riquelme Junior

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Ludovico Migliolo

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

RESUMO: A capacidade das bactérias de adquirirem multirresistências a antibióticos e de formarem colônias sésseis, denominadas de biofilme, aumentam a morbidade e mortalidade de pacientes internados. Para combater esse problema, uma linha importante de pesquisas ocorre utilizando moléculas naturais, como por exemplo, proteínas presentes na peçonha de serpentes, onde podemos destacar as fosfolipases A2, enzimas capazes de hidrolisar fosfolipídios de membranas. Estas moléculas apresentam atividades como: antiviral, antifúngica, antibacteriana e antitumoral. O objetivo deste trabalho foi purificar uma fosfolipase A2 (PLA2) da toxina de *Bothrops moojeni*, avaliando pela primeira vez o seu potencial contra biofilme de *S. aureus* metilicina resistente. A purificação da PLA2 foi realizado por meio de etapas cromatográficas, envolvendo exclusão molecular (Sephacryl S-100) seguida de fase reversa (C-18). A massa molecular, sugerida por SDS-PAGE para a enzima foi de 14 kDa. Todos os passos de purificação foram monitorados por atividade enzimática específica, com o substrato 4N3OBA. De posse da PLA2 purificada, esta foi avaliada contra a bactéria resistente *S. aureus* formadora de biofilme. Com o resultado do bioensaio foi possível detectar uma redução no crescimento bacteriano na concentração de 512 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (36,6 μM). De acordo com resultados obtidos

fica demonstrado pela primeira vez a atividade de uma fosfolipase frente a bactéria formadora de biofilme.

PALAVRAS-CHAVE: *Bothrops*, fosfolipase, atividade antibiofilme.

ABSTRACT: The morbidity and mortality of inpatients are caused due to bacteria skills to acquire antibiotics multidrug resistance to form sessile colonies, called biofilms. To combat this problem, an important line of research is the use of natural molecules, such as proteins present in the snake venom, highlighting to phospholipases A2 (PLA2), enzymes capable of hydrolyzing phospholipid membranes. In the literature PLA2 from snake venom demonstrated activities against antiviral, antifungal, antibacterial and antitumor. Therefore the objective of this work was to purify a PLA2 from *Bothrops moojeni* toxin, evaluating for the first time its potential against methicillin resistant *S. aureus* biofilm. Purification of PLA2 was performed by chromatographic steps, involving molecular exclusion (Sephacryl S-100) followed by reverse phase (C-18). The molecular mass suggested by SDS-PAGE for the enzyme was 14 kDa. All purification steps were monitored by enzymatic activity, with the specific substrate 4N3OBA. Lastly, the purified PLA2, was evaluated against the biofilm *S. aureus* bacteria. The bioassay results showed clear reduction in biofilm development in the concentration 512 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (36.6 μM). In conclusion, the activity of PLA2 purified was effectiveness against the biofilm forming bacteria being demonstrated for the first time.

KEY-WORDS: *Bothrops*, phospholipase, activity antibiofilm.

1 | INTRODUÇÃO

Atualmente, a crescente emergência de cepas bacterianas multirresistentes a fármacos, bem como a capacidade de formarem biofilme (também denominadas de bactérias sésseis, que formam comunidades multicelulares aderentes a superfícies), tornaram-se uma preocupação de saúde em nível global (PERUMALSAMY et al., 2014). Além disso, as bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre os principais agentes etiológicos associados a infecções adquiridas no ambiente hospitalar, em superfícies abióticas e bióticas, podendo estar associadas a dispositivos médicos (BOLES; HORSWILL, 2011).

Enfatizando, *S. aureus*, uma bactéria patogena oportunista, Gram-positiva, anaeróbio facultativo, responsável por causar um amplo espectro de infecções agudas e crônicas, incluindo infecções de pele, bacteremias, pneumonias, meningites, abscessos, entre outros (QU et al., 2010).

Os mecanismos envolvidos no processo de formação de biofilme podem ser agrupados como resistência adaptativa (SCHROEDER et al., 2017), resistência inata ou, de maior preocupação para a prática clínica e agrícola moderna; e resistência adquirida com a transferência horizontal de genes (ANDERSSON; HUGHES, 2011; FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). Muitas teorias têm sido propostas com relação

à dinâmica de formação de um biofilme, mas algumas etapas fundamentais são concordantes em todas elas, sendo as principais: contato, adesão, formação de micro colônias, maturação e desprendimento (O'TOOLE et al., 2000). Essas etapas são dependentes da influência do meio ambiente e das características genéticas das bactérias (O'TOOLE et al., 2000).

Com frequência, bactérias de uma mesma comunidade de biofilme bacteriano possuem diferentes doses inibitórias mínimas a antibióticos oferecendo capacidade aos patógenos oportunistas permanecerem como agentes infectantes por longo tempo (ITO et al., 2009). Dados relacionados a ensaios *in vitro* têm indicado que células bacterianas em biofilmes (sésseis) podem se tornar substancialmente mais resistentes à ação de antibióticos do que aquelas cultivadas de forma planctônica (SMITH et al., 2011). Isso é preocupante porque a formação de biofilmes microbianos podem ocorrer tanto em superfícies naturais como artificiais, como dentes, lentes de contato, válvulas cardíacas (causando endocardite), pulmões de pacientes com fibrose cística (causando broncopneumonia crônica), ouvido médio em pacientes com otite média crônica, próteses articulares, cateteres intravenosos e em feridas crônicas (HØIBY et al., 2010).

Até o presente momento, a saúde pública e privada vem sofrendo com patógenos oportunistas e, as consequências da resistência são facilmente mensuradas em termos financeiros e quantidade de óbitos (ACAR, 1997), apresentando dados alarmantes e estima-se que até 2050 a mortalidade causada por bactérias supere o câncer (WHO, 2012). Em contrapartida, vários laboratórios estão pesquisando alternativas para o combate e controle de patógenos. A partir disso, os animais apresentam-se como fontes de moléculas bioativas, principalmente os que possuem toxinas.

A biodiversidade, particularmente disponível no Brasil, expõe a valiosa oportunidade de pesquisar moléculas farmacologicamente ativas e pode permitir o acesso a soluções para patologias (RODRIGUES et al., 2007). Nos últimos anos, novas classes de antibióticos, incluindo proteínas de animais e peptídeos antimicrobianos, têm sido investigados como uma alternativa para vários problemas, como a resistência microbiana (MATSUZAKI et al., 1997). Como exemplo de possíveis aplicações, o veneno das serpentes apresenta atividades como: antibacteriano (RODRIGUES et al., 2009; SILVEIRA et al., 2013; PERUMALSAMMY et al., 2014); antitumoral (RODRIGUES et al., 2007; BURIN et al., 2013; AZEVEDO et al., 2016); antiviral (MULLER et al., 2014); antiparasitário (DEOLINDO et al., 2012; ADADE et al., 2011).

O veneno das serpentes peçonhentas, é composto majoritariamente por proteínas, representando 90% do peso seco, aproximadamente, e, a fração não proteica é representada por carboidratos, lipídeos, metais, aminas biogênicas e nucleotídeos (CARDOSO et al., 2003). Segundo Fry e colaboradores, é possível observar uma alta especialização da glândula de veneno nas serpentes do gênero *Bothrops*, onde encontra-se uma grande variedade de famílias protéicas, por exemplo: Metaloproteases, seriono peptidases, L-aminoácido oxidases, desintegrinas, lectinas

tipo-C, e fosfolipases A2 (PLA2) (FRY et al., 2003).

Para as serpentes do gênero *Bothrops*, é possível encontrar PLA2 com abundância e, além da hidrólise de fosfolídeos, é observado efeitos antiplaquetários, anticoagulantes, inflamatórios, hemolíticos, cardiotoxíco, neurotóxico, convulsivo e formador de edema (KINI, 2003). *Bothrops moojeni*, popularmente conhecida como caíçaca, é uma das principais serpentes que acomete acidente nas áreas em que ocorre (CAMPBELL; LAMAR, 2004). Sua distribuição geográfica compreende áreas de cerrado das regiões Sudeste e Centro-Oeste e pode ser encontrada também no Nordeste e Sul do Brasil (LIRA-Da-SILVA et al., 2009).

Devido as mais diversas atividades farmacológicas, o presente trabalho tem como objetivo purificar e caracterizar uma fosfolipase presente no veneno da serpente *Bothrops moojeni*, verificando sua atividade contra *Staphylococcus aureus* formador de biofilme.

2 | METODOLOGIA

Material biológico

Amostras de veneno foram extraídas de exemplares adultos de *B. moojeni*, cedidos pelo Biotério da Universidade Católica Dom Bosco e denominado de extrato bruto (EB). O armazenameto do EB foi realizado em freezer (-20 °C) para as análises posteriores.

Quantificação

As proteínas presentes na peçonha foram quantificadas a partir do método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Nesta técnica, a interferência das proteínas com absorbância 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.

Eletofórese 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 eletrofórese 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 foi realizada com 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 μ g de proteína. Para a comparação de peso molecular, foi utilizado o padrão de peso molecular PROMEGA®

(*The Broad Range Protein Molecular Weight Markers*). Após o término das corridas, os géis foram corados com a solução corante de *Comassie Brilliant Blue R-250*, água, metanol e ácido acético, durante 30 min e, logo em seguida, descorados com água destilada, sendo mantidos sobre leve agitação (50 rpm).

Purificação da PLA2

O veneno bruto de *B. moojenii* foi parcialmente purificado, por meio de cromatografia de exclusão molecular. Após a quantificação, foi aplicado 10 mg 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 constante de 0,625 mL.min⁻¹ foi utilizado. A detecção foi realizada por meio da leitura da absorbância em 280 nm. Além da exclusão molecular, foi utilizado dois passos de cromatografia de fase reversa em sistema HPLC (coluna analítica - Waters XTerra MS C18, 4.6x250 mm column), usando gradiente linear de 5-95% de acetonitrila em ácido trifluoracético 0,1% (v:v). O fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ foi utilizado. As frações eluídas foram monitoradas a 216 e 280 nm. As frações coletadas foram identificadas e liofilizadas para as análises posteriores.

Atividade fosfolipásica

O protocolo utilizado para a dosagem de PLA2 foi descrito por Holzer e Mackessy (1996), com algumas modificações. A atividade fosfolipásica foi mensurada em uma placa de 96 poços, utilizando o substrato específico ácido 4-nitro-3-octanoyloxybenzóico (4N3OBA, Enzy Life Science, USA). Em cada poço, 200 µL do tampão (10 mM Tris / HCl, 10 mM CaCl₂ e 100 mM NaCl mM, pH 7.8), 20 µL de substrato (1 mg.mL⁻¹ em 100% acetonitrila), 20 µL de água e 20 µL de fosfolipase comercial como controle (SIGMA-ALDRICH, Fosfolipase A2 de pâncreas bovino - P8913). A reação foi incubada por 40 min a 37 °C, e sua absorbância monitorada em 425 nm, durante 150 min em intervalos de leituras de 10 min. Todos os passos de purificação foram monitorados pela atividade enzimática, utilizando uma PLA2. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e representados com desvio padrão.

Atividade antibiofilme

A formação de biofilmes foi obtida utilizando o meio líquido BM2 [fosfato de potássio 62 mM, (NH₄)₂SO₄ 7 mM, MgSO₄ 2 mM, FeSO₄ 10 µM e glicose 0,4%]. Culturas bacterianas de *S. aureus* crescidas durante 18 h em caldo *Mueller-Hinton* (MHB) foi diluída (1:100, v:v) em BM2. Em placas de fundo redondo de 96 poços a cultura foi adicionada com a amostra em diluição em serie de 4 a 1024 µg.mL⁻¹, finalizando o experimento em 100 µL e foi incubado por 24 horas a 37 °C. O controle de crescimento negativo continha apenas bactérias e, como controle positivo foi utilizado ciprofloxacino nas mesmas concentrações da amostra. O crescimento de células planctônicas foi avaliado utilizando a absorbância a 600 nm. O meio foi

removido, e os poços da microplaca foram lavados duas vezes com água deionizada. Células aderentes foram coradas com cristal violeta a 0,01% por 20 min. Os poços da microplaca foram lavados duas vezes com água deionizada, secadas ao ar e o cristal violeta aderido a células, foi solubilizado com 110 µL de etanol a 60%. A formação de biofilmes foi obtida utilizando absorbância a 595 nm. Todas as leituras de absorbância foram realizadas com o leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, Inc., United States). Para cada experimento foram realizadas repetições técnicas.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os componentes isolados dos venenos de serpentes em geral podem servir de base para o entendimento das funções desses constituintes ao relacionar a processos fisiopatológicos em um envenenamento, assim como aplicações biotecnológicas. A escolha da metodologia apropriada para a purificação de uma determinada molécula deve ser direcionada de acordo com suas características. Conhecendo essa informação, o processo de cromatografia tende a facilitar a purificação desejada (STÁBELI et al., 2012).

No presente trabalho, três etapas cromatográficas foram utilizadas para isolar a fosfolipase de interesse: cromatografia de exclusão molecular (tampão de bicarbonato de amônia pH 7,8) e cromatografia de hidrofobicidade em sistema *HPLC*. Na primeira etapa cromatográfica, foi possível observar 5 frações principais, sendo a fração 3 alvo do estudo, pois além de apresentar atividade específica, apresentou em SDS-PAGE massa molecular relativo a outras fosfolipases descritas na literatura.

Após este primeiro passo cromatográfico, a fração escolhida foi submetida a um passo de purificação por *HPLC*, onde as novas frações foram coletadas e monitoradas *in vitro* pela atividade. Nesta segunda etapa cromatográfica, foi possível observar a presença de 4 frações, denominadas 3.1, 3.2, 3.3 e 9. Os passos cromatográficos adotados para o presente estudo foram similares aos observados nos trabalhos de Kanashiro e colaboradores (2002) e Ponce-Soto e colaboradores (2007).

A análise eletroforética do extrato bruto em gel de poliacrilamida foi realizada, obtendo-se 8 bandas de aproximadamente 15; 20; 25; 30; 35; 50; 70 e 110 kDa. A fim de realizar 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 a 30 kDa) (NOLTE et al., 2012); L aminoácidos oxidases (subunidades de aproximadamente 50 kDa) (STÁBELI et al, 2007); Metaloproteases de todas as classes (KAYANO et al, 2015), entre outros grupos de proteínas.

Purificação da PLA2

Após a quantificação proteica (pelo método de Bradford), 10 mg da amostra, diluídos em 1 mL do tampão de eluição (50 mM de bicarbonato de amônio, pH 7,8)

foram aplicados. Foram coletados 2,5 mL por tubo, totalizando 120 tubos em cada cromatografia realizada (Figura 01). O extrato bruto do veneno apresentou um perfil de exclusão molecular com 5 frações diferentes, conforme indicado na figura 01.

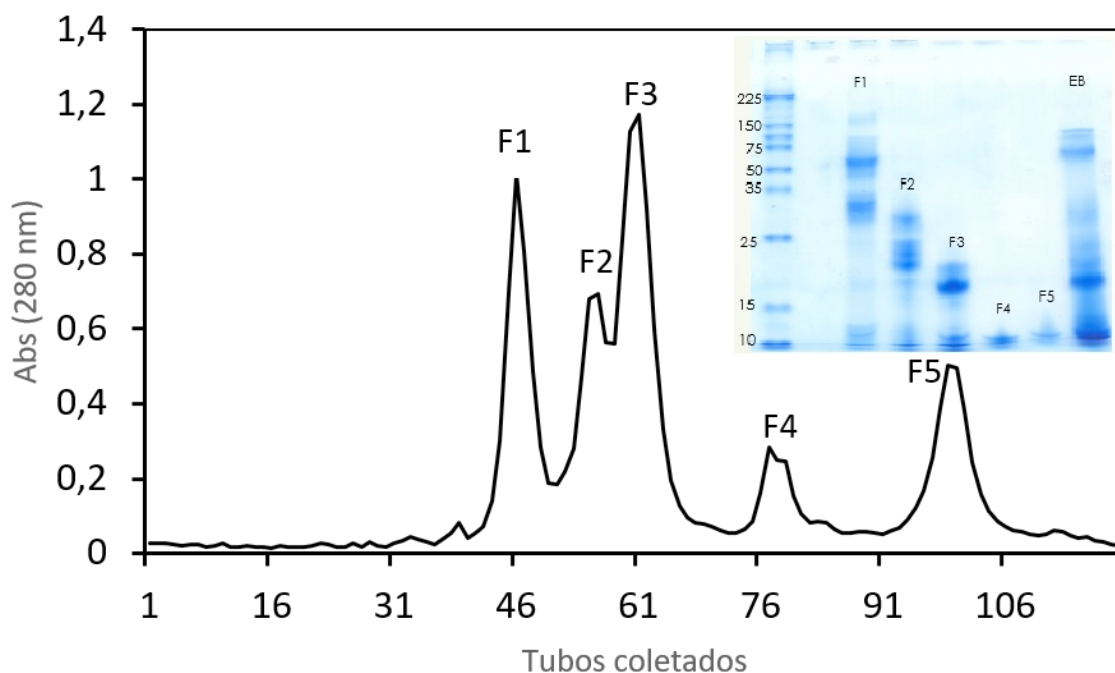


Figura 01. Perfil cromatográfico do EB de *B. moojeni* após a eluição em uma coluna de Sephacryl S-100 (3 x 45 cm). Coluna previamente equilibrada com a solução tampão de eluição (50 mM AMBIC) com um fluxo de 0,625 mL.min⁻¹, obtendo 5 frações (F1, F2, F3, F4 e F5). Todas as frações foram aplicadas em gel de poliácridamida para validar a metodologia de exclusão molecular.

As 5 frações obtidas por exclusão molecular foram denominadas de F1, F2, F3, F4 e F5 com tempos de eluição de 110, 140, 150, 190 e 237 minutos. Esses resultados são semelhantes quando comparados ao trabalho de Ponce-Soto et al. (2007), onde uma cromatografia de exclusão molecular em sistema fechado, foi realizada com a finalidade de purificar uma fosfolipase da toxina de *B. alternatus*, utilizando a resina Superdex 75, obtendo 4 frações onde os tempos de eluição das frações foram 70, 95, 130 e 140 minutos, e a fração utilizada pela maior atividade de fosfolipase foi a terceira, de 130 minutos de eluição (PONCE-SOTO et al., 2007).

No presente trabalho, a presença de fosfolipase foi observada na fração 3 da cromatografia de exclusão molecular, inicialmente indicada apenas pela massa aproximada, por SDS PAGE (Figura 01) (massa molecular um pouco abaixo de 15 kDa) e posteriormente comprovada por atividade enzimática com substrato específico (Figura 04). Por conta disso, a fração 3 foi a escolhida para ser aplicada em cromatografia de fase reversa.

A cromatografia de fase reversa pode separar as moléculas de acordo com as diferenças na hidrofobicidade, a partir dos passos de eluição. Com isso, F3, uma das frações resultantes do primeiro passo cromatográfico, foi escolhida para ser aplicada no sistema de HPLC (Figura 02). A presença de quatro frações, com diferentes tempos de eluição, variou de acordo com a concentração de acetonitrila (3.1: 42; 3.2: 45,4; 3.3:

49,7 e 3.4: 52,2% de acetonitrila). Após as cromatografias, as frações obtidas foram liofilizadas e armazenadas.

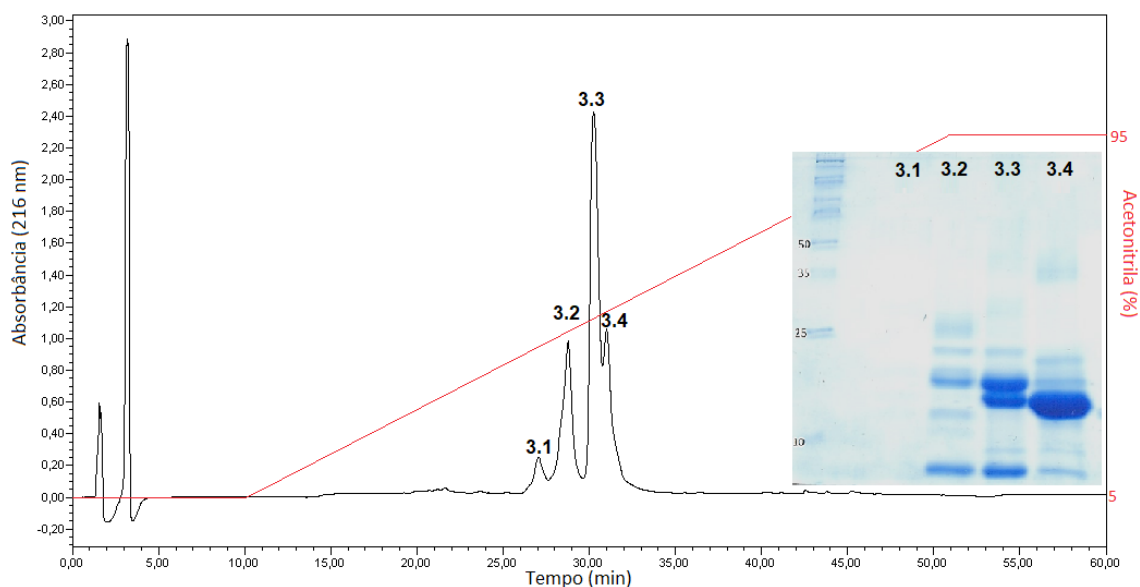


Figura 02. Perfil cromatográfico da fração 3 após a exclusão molecular da toxina de *B. moojeni*, em uma coluna C-18 (HPLC) equilibrada com água e 0,1% de ácido tricloroacético, eluído sobre um gradiente de 5 a 95% de acetonitrila e 0,1% de ácido tricloroacético. As frações obtidas após esse processo, foram denominadas de 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4. Todas as frações obtidas foram aplicadas em SDS-PAGE a fim de verificar o grau de pureza das mesmas.

Para verificar a pureza das frações após a primeira passagem na coluna C-18, foi realizada uma aplicação das frações coletadas em SDS-PAGE (figura 03), onde foi possível observar a presença de bandas abaixo de 25 kDa e, mais especificamente, a presença de uma banda majoritária na fração 3.4, com aproximadamente 14 kDa, quando comparado ao marcador, indicando a presença de uma fosfolipase.

Como mencionado anteriormente, a porcentagem de acetonitrila necessária para a eluição da fração 3.4 foi de 52,2%. A fosfolipase BaTX foi obtida com 49% de acetonitrila após um processo de cromatografia de fase reversa (PONCE-SOTO et al., 2007). Após um único passo cromatográfico (fase reversa), Ponce-Soto et al. (2007) obtiveram uma fosfolipase, denominada BaTXII, do veneno de *B. alternatus*, apresentando 52% de acetonitrila para sua eluição (PONCE-SOTO et al., 2007). Para purificar duas fosfolipases do veneno de *B. atrox*, Kanashiro et al. (2002) observaram a eluição das moléculas com 50% (BaPLA2I) e 54% (BaPLA2III) de acetonitrila (KANASHIRO et al., 2002).

Toyama e colaboradores (2014) obtiveram uma fosfolipase do veneno de *C. durissus*, em aproximadamente 14 kDa, onde mostrou uma eluição com aproximadamente 54% de acetonitrila (TOYAMA et al., 2014). Após dois processos cromatográficos, ambos de fase reversa, foi obtida uma fosfolipase, apresentando 55% de acetonitrila para eluição. Esta molécula foi purificada do veneno de *B. asper* (CASTILLO et al., 2012).

Uma fosfolipase, denominada crotoxina B, presente no veneno de *C. durissus*, foi purificada a partir de uma cromatografia de exclusão seguida por cromatografia de

fase reversa, apresentando 54% de acetonitrila para eluição (QUINTANA et al., 2012). Para purificar Lys-49, uma fosfolipase presente no veneno de *B. pauloensis*, foram utilizados dois passos cromatográficos onde a molécula alvo tinha aproximadamente 14 kDa, necessitando 47% de acetonitrila para a sua eluição (AZEVEDO et al., 2016). Segundo Moura e colaboradores (2014), foi possível eluir uma fosfolipase com 47% de acetonitrila, a Asp49, que foi purificada da toxina de *B. mattogrossensis*. Aproximadamente 80% de acetonitrila foi utilizada para eluir uma fosfolipase do veneno de *B. jararacussu*, uma porcentagem maior se comparada com as outras citadas (MOURA et al., 2014).

Após o segundo passo cromatográfico, a fração 3.4 foi recromatografada para obtenção de uma fração pura (Figura 03). A cromatografia consistiu no mesmo processo previamente adotado, com concentração de acetonitrila variando de 5-95%, a única diferença foi no tempo adotado para a eluição. Após este terceiro passo cromatográfico, as frações foram recolhidas e liofilizadas.

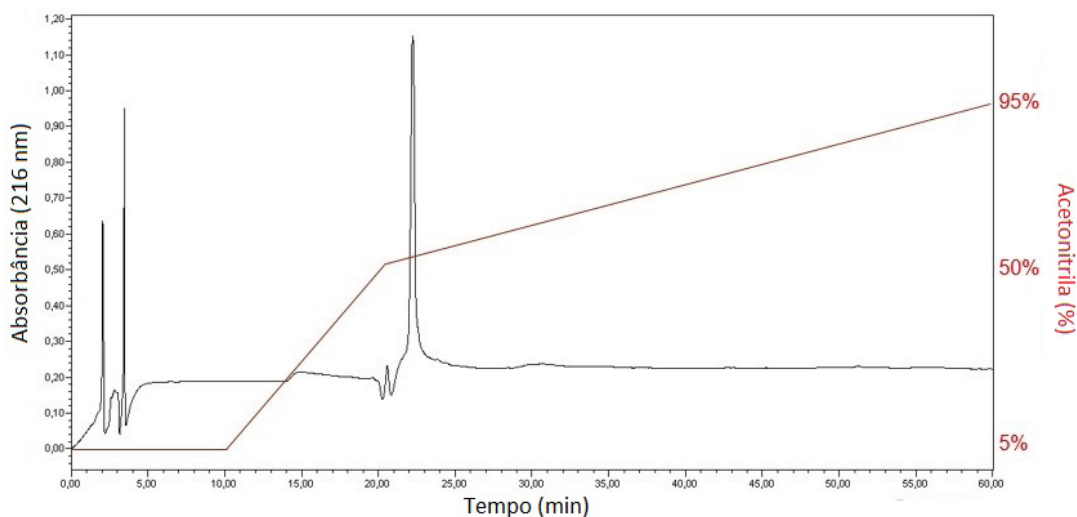


Figura 03. Cromatograma da fração 3.4, definido como recromatografia, a fim de obter uma fração pura. A porcentagem de acetonitrila observada no tempo retenção foi de 52%.

Todos os passos cromatográficos realizados foram monitorados com sua atividade enzimática específica para fosfolipase (Figura 04). As frações avaliadas foram: extrato bruto, F3 (exclusão molecular), PLA purificada (recromatografia da fração D do primeiro passo em *HPLC*), Fosfolipase comercial (controle positivo) e BSA (controle negativo proteico). Todos os testes enzimáticos realizados foram monitorados a 425 nm, com leituras feitas a partir do tempo 0 a 150 minutos, em intervalos de 10 minutos, incubados a 37 °C.

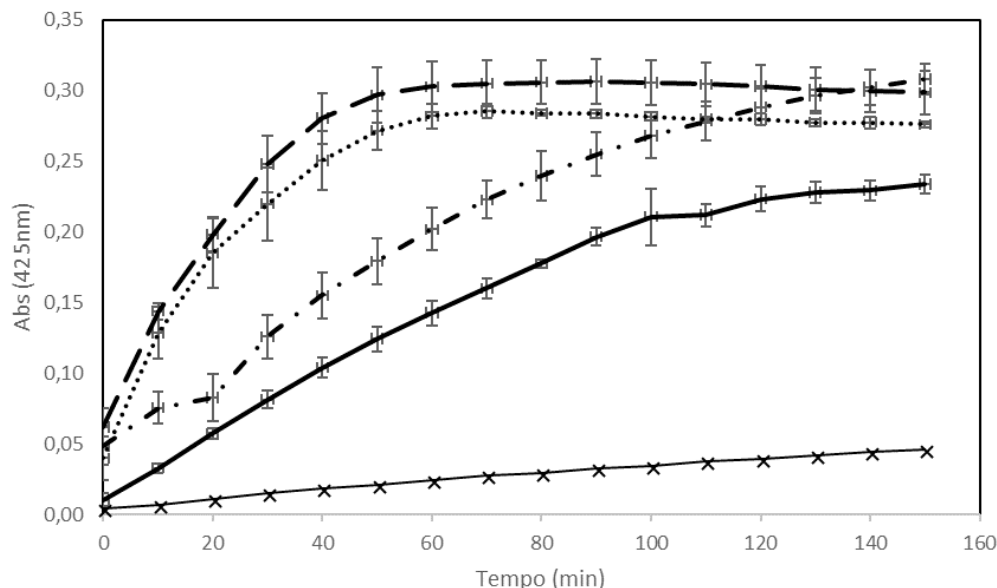


Figura 04. Atividade enzimática dos passos cromatográficos utilizados para a purificação de uma fosfolipase A2 presente na toxina de *B. moojeni*. A atividade acima descrita, foi realizada utilizando o substrato específico para atividade fosfolipásica (4N3OBA) EB: Extrato bruto (linha tracejada); PLA purificada: Fração correspondente ao passo de recromatografia (traço e ponto); BSA: Controle negativo proteico (linha contínua com a marcação de X); PLA comercial: controle positivo (linha contínua); F3 exclusão: Fração obtida após o primeiro passo cromatográfico (linha pontilhada).

Um dos objetivos do isolamento e caracterização dos componentes do veneno de serpentes é entender melhor a participação de cada componente em diferentes procesos fisiopatológicos decorrentes do envenenamento e em possíveis aplicações médicas. Com isso, foi possível observar uma elevada atividade fosfolipásica nas frações avaliadas, quando comparado à enzima comercial.

Se relacionarmos os géis de SDS-PAGE com o gráfico de atividade enzimática, podemos observar a presença de fosfolipase em todas os passos cromatográficos. Na atividade enzimática da fração purificada, é possível observar nos tempos avaliados, uma maior atividade quando comparado a atividade da enzima comercial. Resultado esse que indica uma elevada atividade específica da enzima purificada. Outros trabalhos disponíveis na literatura mostram essa atividade enzimática, utilizando o mesmo substrato (MOURA et al., 2014; SUCASACA-MONZÓN et al., 2015).

Após a incubação da fração purificada com a *S. aureus* formadora de biofilme, foi possível observar que nas duas maiores concentrações da fração, a bactéria apresentou um crescimento inferior quando comparado ao crescimento bacteriano incubado com o antibiótico testado ($512 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou $36,3 \mu\text{M}$). Isso sugere uma importante aplicação médica de fosfolipases oriundas de serpentes do gênero *Bothrops*.

Para a atividade antibiofilme, avaliou-se a formação de crescimento de biofilme após a incubação da fração purificada da toxina de *B. moojeni* com a bactéria *S. aureus*. O tempo para avaliação do crescimento foi de 24 horas e os resultados foram expressos em percentual de crescimento bacteriano comparados com o controle positivo (100%) (Figura 05).

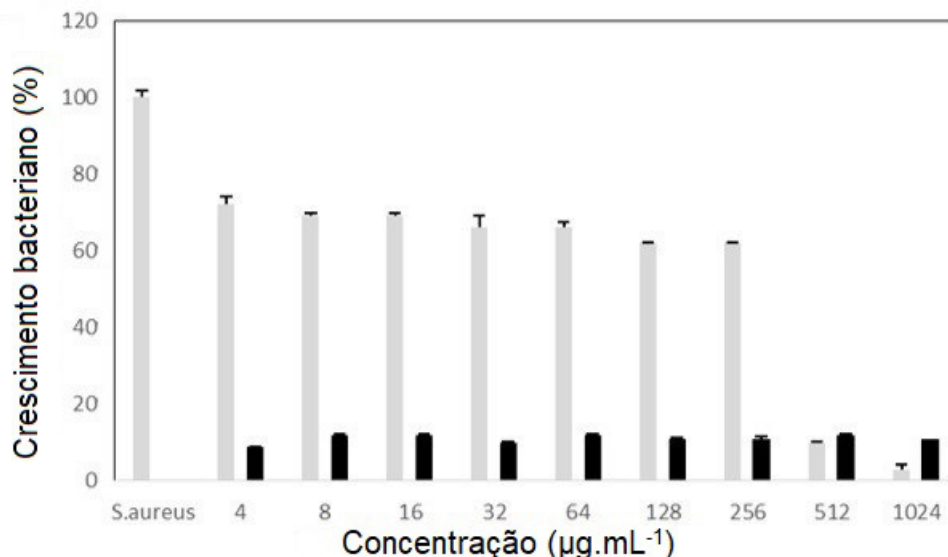


Figura 05. Avaliação do crescimento bacteriano na formação de biofilme *S. aureus* incubado com diferentes concentrações de antibiótico (barras pretas) e fração purificada da toxina de *B. moojeni* (barras cinzas). O crescimento de *S. aureus* sem nenhuma interferência, foi adotado como o controle positivo, indicado para comparar o crescimento da bactéria com o controle e com a fração purificada.

É importante ressaltar que nenhum dos trabalhos citados na discussão desse tópico utilizou bactérias formadoras de biofilme, apenas bactérias planctônicas, sugerindo um leque maior de aplicações para essas enzimas.

Foi observado, no trabalho de Perumalsamy e colaboradores (2014) a atividade de CaTx-II, uma fosfolipase proveniente do veneno de *C. adamanteus*. Nesse estudo, os autores relataram uma 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.mL⁻¹ da fosfolipase e 30 µg.mL⁻¹ do antibiótico (PERUMALSAMY et al., 2014).

Uma fosfolipase (presente no veneno de *C. durissus terrificus* foi isolada, apresentando 14 kDa. Sua atividade antibacteriana foi testada contra *Clavibacter michiganensis* e apresentou uma atividade inibitória no crescimento bacteriano. Após uma análise de microscopia eletrônica, a bactéria testada apresentou uma extensa formação de vesículas e poros na membrana bacteriana, mostrando somente 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 kDa, 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 kDa. Para verificar a atividade dessa molécula, 80 e 160 µg.mL⁻¹ foi incubada com *S. aureus*, verificando sua atividade antibacteriana. Após 60 min, foi verificado um crescimento de apenas 20% bacteriano (SILVEIRA et al., 2013).

Segundo Stábeli e colaboradores (2006), 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* (STÁBELI et al., 2006). Essa atividade das fosfolipases podem estar relacionadas ao fato das mesmas serem responsáveis pela hidrólise de fosfolídeos de membrana (SAJEVIC et al., 2011).

4 | CONCLUSÃO

O presente estudo mostra o isolamento de uma fosfolipase presente na toxina de uma serpente presente no cerrado brasileiro, a *Bothrops moojeni*. Essa enzima purificada, mesmo não sendo descrita sua massa molecular exata, apresentou atividade enzimática em um substrato específico para fosfolipases, além de ter sua massa aproximada por SDS-PAGE, demonstrando uma alta similaridade com outras fosfolipases presentes na toxina de outras serpentes do mesmo gênero. Além disso, foi possível observar uma atividade antimicrobiana significativa a estirpe formadora de biofilme testada, fato ainda não relatado para fosfolipases presente na toxina de serpentes.

REFERÊNCIAS

- ACAR, J. F. **Consequences of bacterial resistance to antibiotics in medical practice.** Clinical infectious diseases, v. 24, n.1, p. 17-18, 1997.
- ADADE, C. M. et al. **Effect of Crotalus viridis viridis snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of Trypanosoma cruzi.** Parasitology, v. 138, n. 1, p. 46-58, 2011.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. **Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations.** FEMS microbiology reviews, v. 35, n. 5, p. 901-911, 2011.
- AZEVEDO, F. V. P. V. et al. **Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA2 homologue from Bothrops pauloensis venom.** International journal of biological macromolecules, v. 82, p. 671-677, 2016.
- BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. **Staphylococcal biofilm disassembly.** Trends in microbiology, v. 19, n. 9, p. 449-455, 2011.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical biochemistry, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BURIN, S. M. et al. **L-Amino Acid Oxidase Isolated from Bothrops pirajai Induces Apoptosis in BCR-ABL-Positive Cells and Potentiates Imatinib Mesylate Effect.** Basic & clinical pharmacology & toxicology, v. 113, n. 2, p. 103-112, 2013.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere.** Comstock Publishing Associates: Ithaca, NY, and London, 2004.
- CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Sarvier, v. 468, 2003.

- CASTILLO, J. C. Q. et al. **In vitro antiplasmodial activity of phospholipases A2 and a phospholipase homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops asper***. *Toxins*, v. 4, n. 12, p. 1500-1516, 2012.
- DEOLINDO, P. et al. **I-Amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi***. *Toxicon*, v. 56, n. 6, p. 944-955, 2010.
- FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. **Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance**. *Clinical microbiology reviews*, v. 25, n. 4, p. 661-681, 2012.
- FRY, B. G. et al. **Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins**. *Journal of molecular evolution*, v. 57, n. 1, p. 110-129, 2003.
- HØIBY, N. et al. **Antibiotic resistance of bacterial biofilms**. *International journal of antimicrobial agents*, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010.
- HOLZER, M.; MACKESSY, S. P. **An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2**. *Toxicon*, v. 34, n. 10, p. 1149-1155, 1996.
- ITO, A. et al. **Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms**. *Applied and environmental microbiology*, v. 75, n. 12, p. 4093-4100, 2009.
- KANASHIRO, M. M. et al. **Biochemical and biological properties of phospholipases A2 from *Bothrops atrox* snake venom**. *Biochemical pharmacology*, v. 64, n. 7, p. 1179-1186, 2002.
- KAYANO, A. M. et al. **BbMP-1, a new metalloproteinase isolated from *Bothrops brazili* snake venom with in vitro antiplasmodial properties**. *Toxicon*, v. 106, p. 30-41, 2015.
- KINI, R. M. **Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes**. *Toxicon*, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.
- LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.
- LIRA-DA-SILVA, R. M. et al. **Serpentes de importância médica do nordeste do Brasil**. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 79, n. 1, 2009.
- MATSUZAKI, K. et al. **Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1327, n. 1, p. 119-130, 1997.
- MOURA, A. A. D. et al. **Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops mattogrossensis* snake venom with toxicity against *Leishmania* and tumor cells**. *BioMed research international*, v. 2014, 2014.
- MULLER, V. D. et al. **Phospholipase A2 isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope**. *PLoS One*, v. 9, n. 11, p. e112351, 2014.
- NOLTE, S. et al. **BJcuL, a lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly**. *Toxicon*, v. 59, n. 1, p. 81-85, 2012.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. **Biofilm formation as microbial development**. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.

- PERUMALSAMY, R. et al. **Snake venom proteins: development into antimicrobial and wound healing agents**. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*,v. 11, n. 1, p. 4-14, 2014.
- PONCE-SOTO, L. A. et al. **Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake Bothrops alternatus**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*,v. 1770, n. 4, p. 585-593, 2007.
- QU, Y. et al. **Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation**. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*,v. 9, n. 1, p. 16, 2010.
- QUINTANA, J. C. et al. **Antiplasmodial effect of the venom of Crotalus durissus cumanensis, crotoxin complex and Crotoxin B**. *Acta tropica*,v. 124, n. 2, p. 126-132, 2012.
- ROBERTO, P. G. et al. **Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A 2 from Bothrops jararacussu venom**. *The Protein Journal*,v. 23, n. 4, p. 273-285, 2004.
- RODRIGUES, R. S. et al. **Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from Bothrops pauloensis snake venom**. *Biochimie*,v. 91, n. 4, p. 490-501, 2009.
- RODRIGUES, R. S. et al. **Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A2 from Bothrops pauloensis snake venom**. *Toxicon*,v. 50, n. 1, p. 153-165, 2007.
- SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. **Haemostatically active proteins in snake venoms**. *Toxicon*, v. 57, n. 5, p. 627-645, 2011.
- SCHROEDER, M.; BROOKS, B. D.; BROOKS, A. E. **The complex relationship between virulence and antibiotic resistance**. *Genes*,v. 8, n. 1, p. 39, 2017.
- SILVEIRA, L. B. et al. **Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A2 from Bothrops moojeni snake venom**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 73, p. 35-43, 2013.
- SMITH, A. B.; DALY, N. L.; CRAIK, D. J. **Cyclotides: a patent review**. *Expert opinion on therapeutic patents*,v. 21, n. 11, p. 1657-1672, 2011.
- STÁBELI, R. G. et al. **Bothrops moojeni myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*,v. 142, n. 3-4, p. 371-381, 2006.
- STÁBELI, R. G. et al. **Cytotoxic L-amino acid oxidase from Bothrops moojeni: biochemical and functional characterization**. *International journal of biological macromolecules*,v. 41, n. 2, p. 132-140, 2007.
- STÁBELI, R. G. et al. **Purification of phospholipases A2 from American snake venoms**. In: (Ed.). *Chromatography-the Most Versatile Method of Chemical Analysis: InTech*, 2012.
- SUCASACA-MONZÓN, G. et al. **Bp-13 PLA2: Purification and neuromuscular activity of a new Asp49 toxin isolated from Bothrops pauloensis snake venom**. *Biochemistry research international*,v. 2015, 2015.
- TOYAMA, D. D. O. et al. **An evaluation of 3-Rhamnosylquercetin, a glycosylated form of quercetin, against the myotoxic and edematogenic effects of sPLA2 from crotalus durissus terrificus**. *BioMed research international*,v. 2014, 2014.

TOYAMA, D. O. et al. **Effect of chlorogenic acid (5-Caffeoylquinic acid) isolated from Baccharis oxydonta on the structure and pharmacological activities of secretory phospholipase A2 from Crotalus durissus terrificus.** BioMed research international, v. 2014, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance.** World Health Organization, 2014

SOBRE A ORGANIZADORA

DAIANE PATRICIA OLDIGES Possui graduação em Biomedicina pela Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (2010), com habilitação em Análises Clínicas e Bioquímica. Mestre (2011) e doutora (2016) pelo programa de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com período de estágio sanduíche na Washington State University (Pullman - WA). Seu foco de pesquisa é a caracterização de proteínas com potencial uso no desenvolvimento de vacinas contra o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*, bem como na manipulação gênica do protozoário *Babesia bovis* no intuito de utilizá-lo como plataforma vacinal.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-85107-61-1

