



UFPB

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ELLYNES AMANCIO CORREIA NUNES

**ISOLAMENTO DE UMA FRAÇÃO COM ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA DO
VENENO DA SERPENTE *Bothrops erythromelas***

**JOÃO PESSOA, PB
2019**



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



ELLYNES AMANCIO CORREIA NUNES

**ISOLAMENTO DE UMA FRAÇÃO COM ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA DO
VENENO DA SERPENTE *Bothrops erythromelas***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Orientadora: Prof. Dra. Karla Patrícia de Oliveira Luna

Co-orientador: Prof. Dr. Ludovico Migliolo

**JOÃO PESSOA, PB
2019**

Catálogo na publicação
Seção de Catálogo e Classificação

N972i Nunes, Ellynes Amancio Correia.
ISOLAMENTO DE UMA FRAÇÃO COM ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA DO
VENENO DA SERPENTE *Bothrops erythromelas* / Ellynes
Amancio Correia Nunes. - João Pessoa, 2019.
66 f. : il.

Orientação: Karla Patrícia de Oliveira Luna.
Coorientação: Ludovico Migliolo.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Atividade Antibacteriana, Atividade Antibiofilme. I.
Luna, Karla Patrícia de Oliveira. II. Migliolo,
Ludovico. III. Título.

UFPB/BC



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
 Centro de Ciências Exatas e da Natureza I Universidade Federal da Paraíba Cidade Universitária -
 João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900 Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail:
 pgbcm@dbm.ufpb.br



ELLYNES AMACIO CORREIA NUNES

Dissertação de Mestrado avaliada em 27/ 09/ 2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Karla Patrícia de Oliveira Luna
 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
 Universidade Federal da Paraíba
 Orientadora

Profa. Dra. Jeanne Claine de Albuquerque Modesto
 Universidade Federal de Pernambuco
 Examinadora Externa

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal
 da Paraíba
 Examinador Interno

JOÃO PESSOA, PB

2019

DEDICATÓRIA

Dedico a minha mãe Maria do Socorro Correia Nunes Amancio, que me incentivou a seguir os meus objetivos, sempre sendo a pessoa que me estendeu a mão em momentos de dificuldade em minha jornada, não só acadêmica, mas de vida. A ela eu dedico o meu diploma de graduação, e agora ao meu diploma de mestre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus Pai, pelo dom da vida, por me proporcionar capacidade intelectual, espiritual e emocional para alcançar meus objetivos, pela sua infinita misericórdia, na pessoa de Jesus Cristo, sem o qual, meus esforços pessoais não seriam suficientes para chegar até aqui, e ao Espírito Santo, que é quem me acompanha em minha jornada de vida, me fazendo lembrar todos os dias as misericórdias do Senhor e seu Amor incondicional.

A minha mãe, Maria do Socorro Correia Nunes Amancio, que abdicou de sua vida para que eu e meus irmãos pudéssemos ter uma criação com saúde e educação, em sua limitação, porém jamais deixou que nos faltasse nada. Agradeço, pelo apoio em minhas escolhas e pelos conselhos que me ajudaram nessas escolhas e me trouxeram até aqui, obrigada mainha, te amo.

A meu pai, Edberto Amancio da Silva, que mesmo em sua condição atual, sei que é feliz por minha conquista, e que enquanto pode, mesmo com seus muitos erros, nos proporcionou uma vida menos dificultosa.

Aos meus irmãos, Elly, Elly-berto e Ellydberto, que mesmo com tantas diferenças, torceram para que eu chegasse até aqui.

Aos meus avós maternos, Gilvanira Correia Nunes e Josino Nunes da Silva (*in memoriam*), pois sei que sempre desejaram meu sucesso, e minha avó que sempre ficou feliz em ouvir tudo o que eu fiz durante meus anos de pesquisa. As minhas tias e tios, primos e primas, agradeço.

Agradeço a minha sobrinha, Nicolle Sophia, por me proporciona os maiores momentos de alegria e amor, mesmo quando meu coração estava imerso em tristeza, eu te amo muito.

Agradeço as minhas cunhadas, Luany Macedo e Laís da Silva, pela amizade e VII
companheirismo, mesmo diante das adversidades da vida.

Agradeço aos amigos que me apoiaram nesta jornada, estando sempre presente, mesmo na distância ocasionada pela vida, Tatiana Santos, Késia Rakuel de Moraes, Olívia Alves Carneiro, Hércules Melo, Rayane Souza, Raisal Nobrega, Rayane Diniz, Anderson dos Santos Ramos, Otacílio Neto, e aos novos amigos que conquistei nessa etapa, Alisson Emmanuel Franco Alves, Taylla Michelle de Oliveria Flores, Anderson Félix dos Santos, Zhibbelly Mota Nunes, Beatriz Dantas, Fabiano Melquíades Brandão, Gisleyde Bastos, José Roberto Santos, Luccas Pires, Miguel Andrade, Emanuel Cansação, Lincoln Mukoyama,

Thiago Almeida, Maria Eduarda Biembengute, Naine Segawa e Ana Carolina Barbosa e sua família.

Ao Museu Vivo Répteis da Caatinga, na pessoa de Silvaney Medeiros, sua esposa Andreia e Abimael Guedes, agradeço pela colaboração fincada desde a graduação e por tudo que aprendi com vocês.

Agradeço ao meu amigo Alisson Emmanuel, com quem tive o prazer de traçar uma amizade durante esses dois anos de mestrado. Obrigada por ser esse amigo carinhoso e dedicado, por ter sido presente nos momentos de enfermidade e por sempre reservar um lugar para me receber em sua casa. Agradeço a minha amiga e companheira de casa, Taylla Flores, pelos muitos momentos compartilhados, por tudo que pudemos aprender juntas nesse período, foi através de você que pude voar mais longe, conseguindo essa co-orientação maravilhosa, que me rendeu a oportunidade de conhecer outra região do país, oportunidade essa que me serviu de amadurecimento e crescimento profissional.

Agradeço a Breno Emanuel Farias, por sua paciência e dedicação em me acompanhar em meus experimentos, me ensinando quase tudo que hoje sei. De mesmo modo, a Simone Sanchez, Patrícia Souza, Regina Meneses, Elizângela Barros, Kátia Micheli e Dayane Dias.

Agradeço a minha orientadora, Karla Patrícia, por mais uma vez me acompanhar em mais uma etapa científica da minha formação, e por confiar mais uma vez no meu trabalho, durante mais esse tempo.

Agradeço ao meu co-orientador, Ludovico Migliolo, pelas oportunidades a mim fornecidas durante esse período, e por tudo que pude aprender com o senhor, obrigada por incentivar meu crescimento profissional e ter confiado no meu trabalho durante todo este período.

A Alisson Santos, que desde a graduação esteve presente em minha vida com sua amizade, e mais tarde apoiou e torceu por mim em minha escolha para o mestrado, tendo comemorado comigo cada etapa alcançada, mesmo com tantas viagens sempre pude contar com você, muito obrigada meu bem.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante o período de realização deste curso de mestrado.

À Universidade Federal da Paraíba por me acolher como discente durante a realização deste mestrado.

À Universidade Católica Dom Bosco, por me acolher durante o período de realização da minha pesquisa, agradeço.

RESUMO

Resistência bacteriana constitui um problema de saúde pública mundial, necessitando de novas opções terapêuticas. Toxinas animais surgem como alternativa a essa problemática, como fosfolipases isoladas de peçonhas ofídicas que apresentam atividades biológicas importantes. A serpente *Bothrops erythromelas*, tem sua peçonha ainda pouco estudado, sendo uma das espécies que desperta grande interesse médico-científico na região Nordeste do Brasil, tornando-se alvo para diversos estudos. Objetivou-se, portanto, isolar e caracterizar uma fração com atividade fosfolipásica de *B.erythromelas*, testando suas atividades antimicrobianas. Utilizou-se os testes de Bradford, seguido de RP-HPLC, MALDI-TOF e degradação de Edman, para purificação e caracterização do composto. Determinou-se as atividades inerentes a fração isolada utilizando-se testes enzimático e hemolítico, além de testes antibacterianos com linhagens bacterianas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 7133623, e teste de atividade antibiofilme com linhagens de *Acinetobacter baumannii* 00332126 proveniente de isolado clínico. Com 42mg/mL^{-1} de concentração proteica, massa molecular de 13656,4 Da e 31 resíduos de aminoácidos na porção N-terminal, a fração apresentou alta atividade enzimática, baixa atividade hemolítica, atividade considerável contra a linhagem Gram-positiva, e foi eficiente na redução da matriz do biofilme, porém não se mostrou bactericida na linhagem testada. Assim, uma fração fosfolipásica isolada da peçonha de *B.erythromelas* surge como alternativa a estudos voltados para o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos.

Palavras-chaves: Atividade Antibacteriana, Atividade Fosfolipásica, Atividade hemolítica Venenos animais.

ABSTRACT

Bacterial resistance is a worldwide public health problem requiring new therapeutic options. Animal toxins appear as an alternative to this problem, such as phospholipases isolated from snake venoms that present important biological activities. The *Bothrops erythromelas* snake has its venom still little studied, being one of the species that arouses great medical-scientific interest in the Northeast region of Brazil, becoming a target for several studies. Therefore, the objective was to isolate and characterize a fraction with phospholipase activity of *B.erythromelas* by testing its antimicrobial activities. Bradford tests followed by RP-HPLC, MALDI-TOF and Edman degradation were used for compound purification and characterization. The inherent activities of the isolated fraction were determined using enzymatic and hemolytic tests, antibacterial tests with bacterial strains of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 7133623, and antibacterial activity test with strains of *Acinetobacter baumannii* 00332126. With 42mg / mL⁻¹ protein concentration, molecular mass of 13656.4 Da and 31 amino acid residues in the N-terminal portion, the fraction showed high enzymatic activity, low hemolytic activity, considerable activity against Gram-positive lineage, and was efficient in reducing the biofilm matrix, but was not bactericidal in the tested line. Thus, a phospholipase fraction isolated from *B.erythromelas* venom appears as an alternative to studies aimed at the development of new antimicrobial drugs.

Keywords: Antibacterial Activity, Phospholipasic Activity, Hemolytic Activity Animal venom.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Resistência Bacteriana e biofilme	13
1.2	Peçonhas ofídicas	18
1.3	<i>Bothrops erythromelas</i>	20
1.4	Fosfolipase A2	21
2.	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral	23
2.2	Objetivos Específicos	23
3.	RESULTADOS (Artigo)	24
1.	INTRODUÇÃO	27
2.	MATERIAIS E METÓDOS	29
2.1	Local de estudo	29
2.2	Peçonha de <i>Bothrops erythromelas</i>	30
2.3	Purificação de Proteínas da peçonha	30
2.4	Quantificação de Proteínas da peçonha	30
2.5	Atividade Fosfolipásica	31
2.6	Espectrometria de massas	31
2.7	Sequenciamento de aminoácidos	32
2.8	Teste de Hemólise	32
2.9	Ensaio antibacterianos	32
2.10	Ensaio antibiofilme	33
3.	RESULTADOS	34
3.1	Quantificação, purificação, espectro de massa e sequenciamento da PLA₂ 34	
3.2	Atividade fosfolipásica	36
3.3	Atividade Hemolítica	37
3.4	Atividade Antibacteriana e Antibiofilme	38
4.	DISCUSSÃO	40
4.1	Quantificação, purificação, espectro de massa e sequenciamento da PLA₂ 40	

4.2	Atividade fosfolipásica	41
4.3	Atividade Hemolítica	43
4.4	Atividade Antibacteriana	43
4.5	Atividade Antibiofilme	45
5	CONCLUSÃO	46
	AGRADECIMENTOS	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
4.	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
	ANEXOS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Processo de transferência de genes entre bactérias.....	14
Figura 2	Estimativa de óbitos por microrganismos em 2050. Legenda: Mortalidade por 10.000 habitante de 5.000 (em cinza) até mais de 10.000 mortes (em vermelho)	15
Figura 3	A- Representação da bactéria Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i> . B- Representação da bactéria Gram-negativa <i>Escherichia coli</i> . C- Representação da bactéria Gram-negativa <i>Acinetobacter baumannii</i> . D- Diferença entre paredes celulares de bactérias Gram-negativa e Gram-positiva.....	16
Figura 4	Processo de formação de um biofilme.....	18
Figura 5	A- Representante de um espécime adulto da serpente <i>Bothrops erythromelas</i> (AMARAL, 1923). B- Bioma Caatinga, hábitat natural da <i>B. erythromelas</i>	21
Artigo		
Figura 1	Estimativa de óbitos por microrganismos em 2050. Legenda: Mortalidade por 10.000 habitante de 5.000 (em cinza) até mais de 10.000 mortes (em vermelho)	27
Figura 2	A- Representante de um espécime adulto da serpente <i>Bothrops erythromelas</i> (AMARAL, 1923). B- Bioma Caatinga, hábitat natural da <i>B. erythromelas</i>	29
Figura 3	A- Perfil cromatográfico de fase reversa de <i>B.erythromelas</i> , em uma coluna C-18 equilibrada com solvente A (0,1% TFA em água) e eluído com 5-95% de solvente B [acetonitrila / solvente A, 9: 1,v:v] e um caudal de 2 mL / min ⁻¹ . Em destaque, fração selecionada para ser submetida ao espectrômetro de massas. B- Espectro gerado para a fração purificada, em destaque fração selecionada para testes com massa de 13656,4Da.....	35
Figura 4	Atividade fosfolipásica da peçonha bruta, da fração purificada da peçonha de <i>B. erythromelas</i> , de uma fosfolipase comercial e do BSA diante do substrato 4N ₃ OBA. Legenda: Em cinza temos o BSA como controle negativo; em preto temos os valores referente a peçonha bruta da serpente; Laranja representa os dados da fosfolipase comercial como controle positivo e azul faz referência fração purificada.....	37
Figura 5	Atividade Hemolítica, expressa em porcentagem da fração purificada em sangue de camundongo (<i>Mus musculus</i>). Em vermelho temos o padrão positivo, o reagente Triton X, com 100% de lise dos eritrócitos; em azul, temos aos valores referentes a fração e em verde temos o controle negativo, apresentando apenas soro fisiológico.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Alinhamento de sequência da fração purificada com atividade fosfolipásica com BpPLA ₂ -TXI, sPLA ₂ -II e BE-I-PLA ₂ , utilizando-se a ferramenta ClustalW. Em destaque (vermelho) os aminoácidos que se apresentaram diferentes daqueles observados nas outras fosfolipases comparadas.....	36
Tabela 2	Concentração Inibitória Mínima de <i>Escherichia Coli</i> ATCC-25922, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC-7133623 (em meio Müeller-Hinton) e <i>Acinetobacter baumannii</i> 00332126 (em meio BM2) tratados com a fração fosfolipásica isolada e com antibiótico padrão Ciprofloxacino; Crescimento das bactérias em meio Müeller-Hinton sem tratamento; Formação de Biofilme de <i>Acinetobacter baumannii</i> 00332126. Dados expressões em porcentagem.....	39
Tabela 3	Comparação entre PLA ₂ isoladas de diferentes serpentes pertencentes ao gênero <i>Bothrops</i> quanto a sua característica ácida ou básica.....	42

1. INTRODUÇÃO

1.1. Resistência bacteriana e biofilme

Alexander Fleming revolucionou a ciência do século XX com a descoberta da penicilina, fármaco antimicrobiano amplamente utilizado no tratamento das infecções bacterianas, se tornando um marco de grande importância para a medicina, uma vez que óbitos por infecções bacterianas eram comuns e crescentes na população humana. A partir da descoberta de Fleming vários novos fármacos foram desenvolvidos pelas indústrias farmacêuticas até o atual século (TAN; TATSUMURA, 2015). Com tudo, as infecções bacterianas persistem até atualidade, se tornando um dos principais problemas de saúde pública mundial, com o agravante de mecanismos de resistência (OMS, 2019).

Tais mecanismos são naturais às bactérias, sendo processos evolutivos que as tornam resistentes a compostos que comprometem sua sobrevivência e desenvolvimento. O uso irregular dos antibióticos, seja por parte da população ou seja pela introdução desses medicamentos de forma preventiva na pecuária, veio potencializando estes mecanismos, criando bactérias resistente aos fármacos habituais, contribuindo para o aumento da mortalidade, morbidade e gastos com procedimentos diagnósticos e terapêuticos entre os indivíduos acometidos por infecções (LIVERMORE, 2005; LOUREIRO et al., 2016; HAUBERT, et al., 2018).

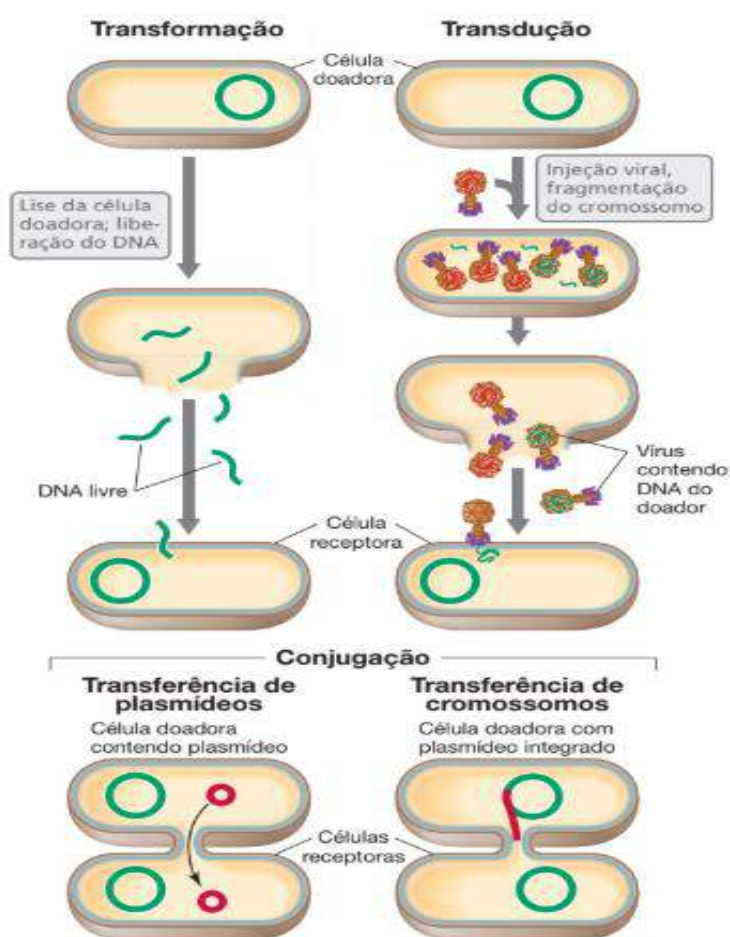
A resistência observada nas bactérias pode ocorrer por duas vias, mutações cromossômicas sofridas por esses organismos, como resposta a estímulos externos, ou pela transferência horizontal de genes de resistência entre eles. O processo mais comum consiste na transferência horizontal, que pode se dar por três vias, transformação, transdução ou conjugação (MADIGAN et al., 2016).

Na transformação, as bactérias conseguem englobar material genético presente no meio externo, de modo a sofrer uma transformação em seu próprio material genético, esse material genético pode ser oriundo de outro microrganismo que sofreu processo de lise ou morte. A transferência por sua vez, depende de um vetor, que leve o material genético de um indivíduo a outro, geralmente esse transporte é feito por bacteriófagos, vírus que infectam bactérias e carregam partes do material genético presente em bactérias que foram lisadas e ao infectar novas bactérias, ele fornece esse material ao novo indivíduo. E por fim, o processo conhecido como conjugação, se dá pelo contato direto entre bactérias de mesma espécie ou de espécies diferentes, que ao se aproximarem conseguem trocar uma pequena parte de seu DNA

cromossômico ou por meio de plasmídeos, um material genético extra cromossômico presente em algumas bactérias que geralmente lhe confere resistência (**Figura 1**) (MADIGAN et al., 2016).

Algumas bactérias produzem enzimas que desencadeiam a resistência bacteriana, sendo a mais comum a produção de enzimas β -lactamases, que degradam o anel β -lactâmico encontrado em alguns antimicrobianos, impedindo a ação do fármaco. Um tipo comum de β -lactamases presentes em bactérias da família Enterobacteriaceae, da qual faz parte o gênero, *Escherichia*; são as carbapenemases, que tornam emergente o mecanismo de resistência (KPC) (NORDMANN, et al., 2012; ALVES; BEHAN, 2013).

Figura 1.: Processo de transferência de genes entre bactérias.



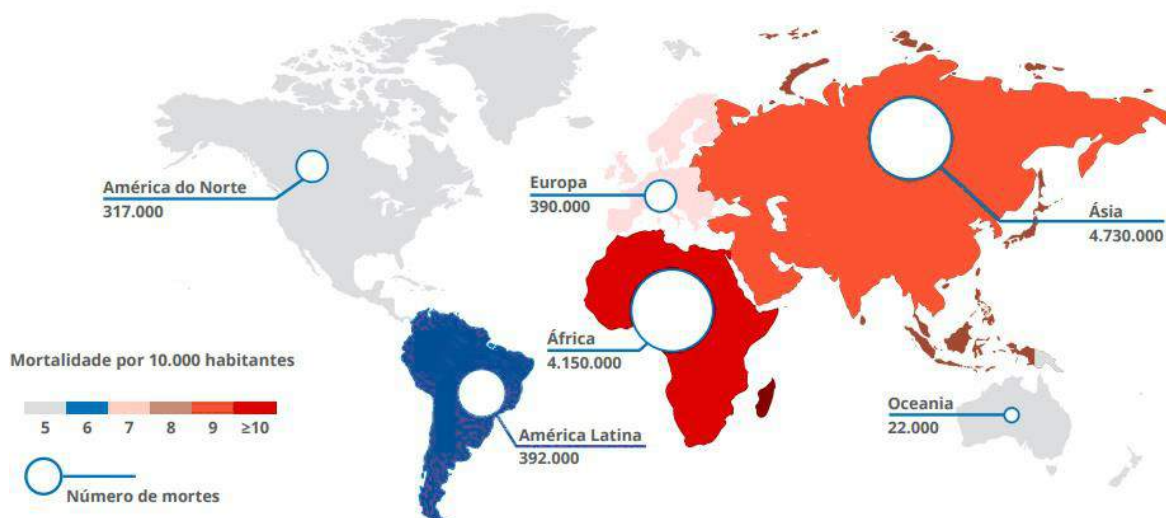
Fonte: (MADIGAN et al. 2016).

Em 2018, foi notificado que meio milhão de pessoas sofriam com infecções bacterianas resistentes mundialmente (OMS, 2019). A **Figura 2**, traz a estimativa de que em 2050, o

número de mortes por infecções bacterianas no mundo ultrapasse a marca de 10 milhões, sendo o continente africano o mais afetado.

Figura 2.: Estimativa de óbitos por microrganismos em 2050.

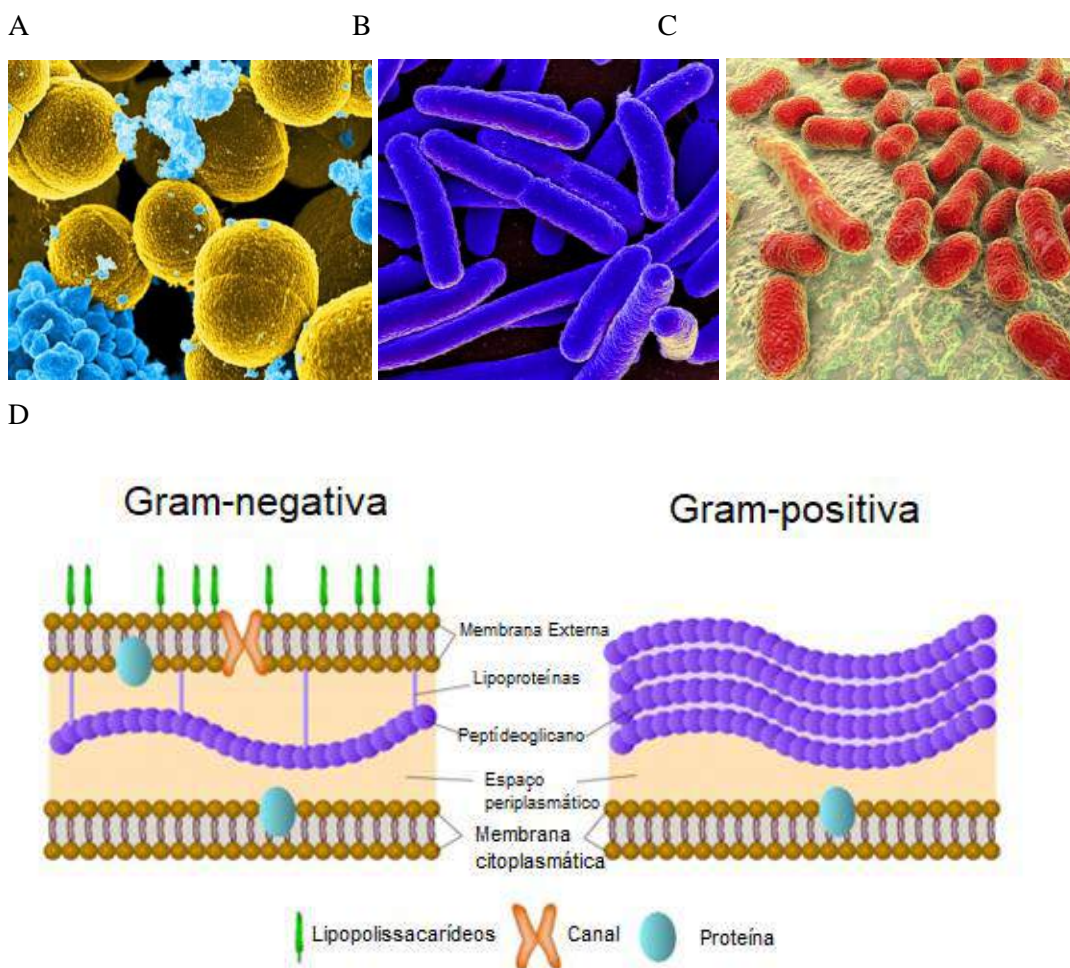
Legenda: Mortalidade por 10.000 habitante de 5.000 (em cinza) até mais de 10.000 mortes (em vermelho).



Fonte: (DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE, 2016)

As bactérias podem ser classificadas de acordo com a composição de sua parede celular, uma vez que esta característica determina o grau de patogenicidade destes organismos. Bactérias Gram-negativas, por exemplo, apresentam composição mais complexa quando comparadas as Gram-positivas, possuindo maior quantidade de aminoácidos e lipídios em sua conformação. Bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana interna que é revestida externamente por uma parede de peptídeoglicanos pouco espessa, além de apresentar uma membrana externa à parede, com a presença de lipopolissacarídeos (LPS), molécula que determina a sua toxicidade. As bactérias Gram-positivas, por sua vez, apresentam uma membrana interna revestida por uma parede de peptídeoglicano bem mais espessa que a observada em bactérias Gram-negativas, tendo em sua composição principal ácidos teicoicos, responsável por conferir de forma geral carga negativa à membrana da bactéria, e a ausência de uma membrana externa à parede sem a presença de LPS. Portanto, a maioria das bactérias consideradas patogênicas são Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*, tendo poucos representantes com parede celular Gram-positiva, como *Staphylococcus aureus* (**Figura 3**) (MADIGAN et al., 2016).

Figura 3: A- Representação da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. B- Representação da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. C- Representação da bactéria Gram-negativa *Acinetobacter baumannii*. D- Diferença entre paredes celulares de bactérias Gram-negativa e Gram-positiva.



Fonte: A- National Institute of Allergy and Infectious Diseases. B- CC BY. C- Kateryna Kon, 71335623. D- Editora Sanar (Adaptado).

As bactérias podem apresentar duas formas de vida, sendo planctônicas, caracterizada pelo crescimento independente, conhecido também como vida livre, forma de vida que facilita sua proliferação, bem como podem ser sésseis, na forma de biofilmes, que consiste na organização de bactérias em uma matriz extracelular composta por diversos biopolímeros, como polissacarídeos extracelulares, proteínas, DNA e lipídios, além da associação de outros microrganismos como fungos. Os estudos envolvendo biofilme datam desde o século XVII, contudo sua primeira publicação foi feita por Costerton, Geesey e Cheng, em 1978, onde se observou que algumas espécies de bactérias não conseguiam se desenvolver de forma isolada, mas apenas em comunidades estruturadas (COSTERTON et al. 1981; COSTERTON; WILSON, 2004; LÓPEZ; et al., 2010).

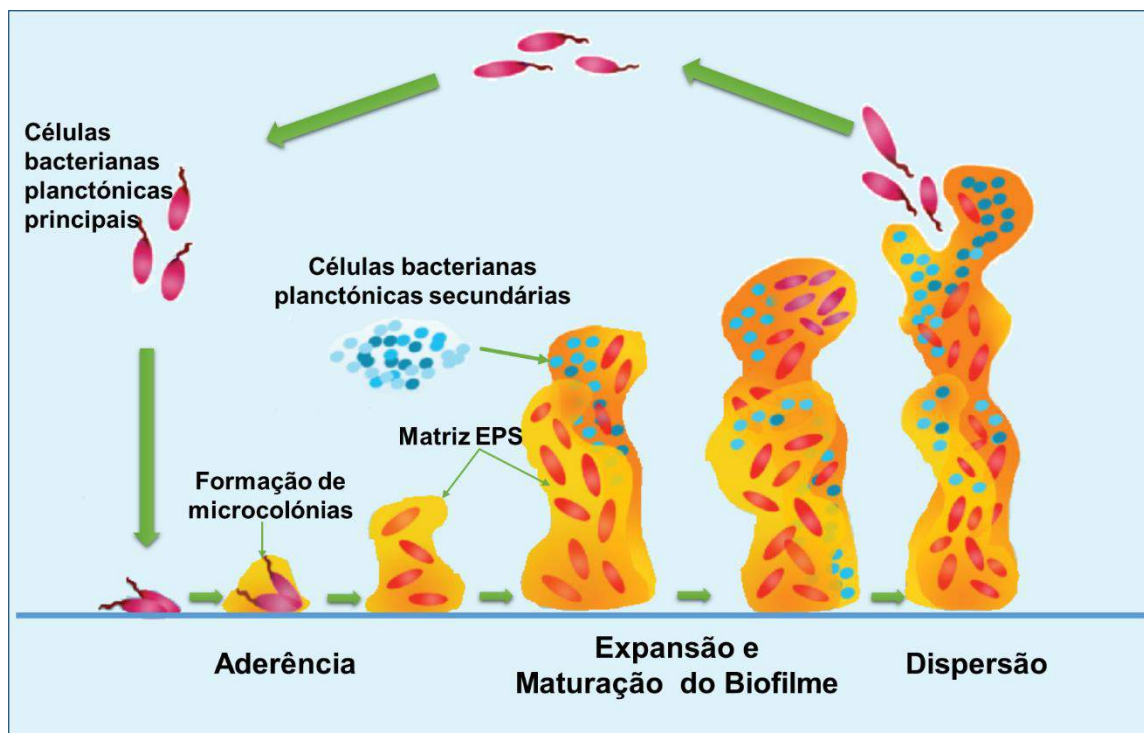
Vários são os benefícios propiciados as bactérias na conformação de biofilmes, entre os mais relevantes, está o aumento da tolerância desses microrganismos em condições extremas do meio, além da proteção conferida as eles contra agentes bactericidas pela matriz de exopolissacarídeos (EPS). Ademais, este mecanismo permite a troca de material genético entre diferentes espécies de bactérias e entre organismos da mesma espécie, facilitando assim, a propagação da resistência bacteriana (COSTERTON et al. 1994; COSTERTON; WILSON, 2004; JEFFERSON, 2004; RASMUSSEN; GIVSKOV, 2006; RABIN, et al., 2015).

A formação de biofilmes consiste em três etapas: fixação, maturação e dispersão. A fixação se dá de forma biótica ou abiótica, podendo, portanto, ocorrer em superfícies de células de animais e vegetais, bem como em superfícies de matérias inanimados. A adesão da bactéria a uma superfície para a formação do biofilme pode ser reversível (adesão primária), estando condicionada a forças físico-químicas presentes no meio, bem como a mecanismos de regulação de densidade celular e comportamento coletivo, chamado de *Quorum sensing*, que permite as bactérias a sincronização de sua expressão gênica, para a formação do biofilme. Ou irreversível (adesão secundária), onde os microrganismos iniciam a produção da matriz de exopolissacarídeo (EPS), para uma fixação mais forte, uma vez que se observa a ligação mais firme entre bactérias de mesma espécie ou de espécies diferentes (DOLAN; COSTERTON, 2002; OLIVEIRA, et al., 2010; RENNER; WEIBEL, 2011; WEST, et al., 2012; TRENTIN, et al, 2013; RABIN, et al., 2015) .

Com a formação do Biofilme maduro é observado uma estrutura semelhante a um cogumelo, à medida que ocorre o crescimento do biofilme, novos compostos vão sendo sintetizados pelos microrganismos aprisionados que vão sendo acrescentados a matriz, tais como proteínas, após a sua maturação, pode ocorrer o processo de dispersão, que consiste na liberação de formas planctônicas, essa dispersão se dá muitas vezes pela diminuição dos nutrientes disponíveis, além da produção de ácidos e gases que podem enfraquecer a estrutura da matriz, bem como por fatores de virulência (**Figura 5**) (OLIVEIRA, et al., 2010; RENNER;WEIBEL, 2011; TRENTIN, et al, 2013; RABIN, et al., 2015).

Os biofilmes tem despertado interesse na comunidade científica, uma vez que a presença dessa formação consiste em um mecanismo de resistência bacteriana, o que agrava as infecções humanas por microrganismos (DOLAN, 2002; CHANDRA, et al., 2015).

Figura 4.: Processo de Formação de um Biofilme



Fonte: (TREMBLAY et al., 2014) (Adaptado por Know net)

Diante deste cenário, novas abordagens terapêuticas vêm sendo desenvolvidas no meio científico, buscando tratamentos alternativos ao controle das infecções causadas pelas bactérias resistentes. Estudos com moléculas bioativas de toxinas animais vem ganhando espaço no meio fármaco-científico, uma vez que a riqueza desses compostos tem fornecido várias alternativas a produção de fármacos para o tratamento de diversas doenças (NEVALAINEN et al., 2008; SAMY et al., 2008).

1.2. Peçonhas ofídicas

As peçonhas ofídicas apresentam uma grande variedade de componentes, cujo papel principal é agir para imobilizar a presa. Cerca de 90% do peso seco das peçonhas das serpentes é composto de proteínas: as enzimáticas (serino-proteases, metaloproteinasas, L-aminoácido oxidase, fosfolipases, hialuronidasas) e proteínas sem atividade enzimática (desintegrinas, lectinas de tipo C e peptídeos natriuréticos) (CARDOSO et al, 2003; JENNINGS et al, 2005; GUTIÉRREZ, 2009a).

Apenas 15% das espécies de serpentes registradas no Brasil são consideradas peçonhentas (BERNARDE, 2011). Costa e Bérnils (2018) afirmam que há 76 espécies de serpentes peçonhentas de importância médica no Brasil, e estas estão distribuídas em duas famílias: Viperidae e Elapidae.

Serpentes peçonhentas são caracterizadas pela presença de um aparato inoculador de peçonha, ausente nas serpentes não peçonhentas, bem como pela presença de uma glândula especializada na produção e estocagem desta peçonha, que faz uma ligação direta ao aparato inoculador (CARNEIRO et al., 2015).

Serpentes não peçonhentas apresentam dentição do tipo áglifa, que indispõem de presas inoculadoras, das quais fazem parte serpentes de grande porte como a jiboia (*Boa constrictor constrictor*) e algumas espécies da família Colubridae e Dipsadidae (CARNEIRO et al., 2015).

As serpentes peçonhentas podem apresentar três tipos de dentição, a dentição opistóglifa, caracterizada pela presença de uma presa localizada na região posterior da maxila, contendo um pequeno sulco para inoculação de peçonha, esse tipo de dentição é observada em algumas serpentes da família Dipsadidae, como a cobra-verde (*Philodryas olfersii*); a dentição proteróglifa, cuja presa é fixa e diminuta na região anterior da maxila, e esta diretamente associada a uma glândula de veneno, possuindo um sulco, quase totalmente fechado para inoculação da peçonha, fazem parte as serpentes da família Elapidae, como as corais verdadeiras (*Micrurus sp. e Lepidomicrurus sp.*); e a dentição solenóglifa, cuja presa é móvel e grande, localizada na região anterior da maxila, tendo um sulco completamente fechado, semelhante a uma agulha de injeção, tornando a inoculação da peçonha extremamente precisa, possuem esse tipo de dentição, as serpentes pertencentes a família Viperidae que apresentam importância médica no Brasil e na América Latina, as jaracacas (*Bothrops sp. e Bothriopsis sp.*), cascavéis (*Crotalus sp.*) e surucucus (*Lachesis sp.*) (CARNEIRO et al., 2015).

As peçonhas das serpentes pertencentes a família Viperidae podem ser caracterizados pela ação enzimática, como observado nos envenenamentos causados pelas serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Bothrocophias* e *Lachesis*, bem como pelas ações cardiotoxícas, miotóxicas e neurotóxicas, observadas nas serpentes pertencentes ao gênero *Crotalus*, sendo essas últimas ações características também dos envenenamentos causados por serpentes da família Elapidae, que no Brasil são representados pelos gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus*, (FURTADO, 2007).

Dentre as serpentes pertencentes a família Viperidae, o gênero *Bothrops* é o que desperta maior interesse do ponto de vista médico científico, uma vez que é o responsável pelo maior

número de acidentes ofídicos notificados na América Latina, bem como apresenta um grande potencial farmacológico (GUTIÉRREZ, 2009).

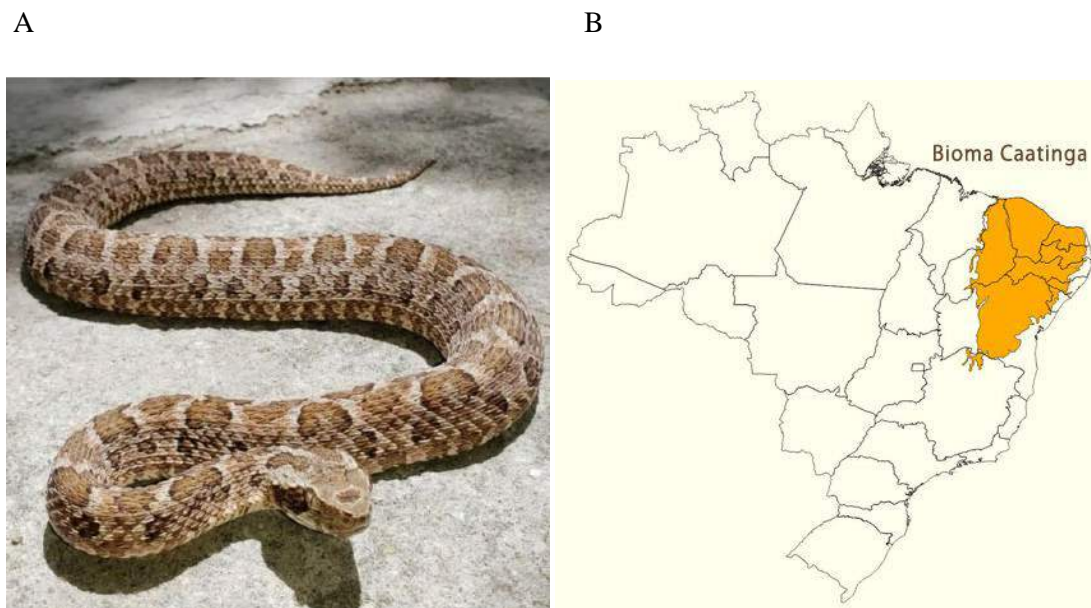
A peçonha botrópica exibe ação proteolítica, coagulante, e hemorrágica decorrente da atuação de proteínas enzimas como hialuronidasas, fosfolipases, serino-proteases, metaloproteinases, que caracterizam o quadro clínico do envenenamento causado por estas serpentes, como danos teciduais locais e sistêmicos, alterações na coagulação sanguínea e quadros hemorrágicos (GUTIÉRREZ, 2009; PEREANEZ, et al. 2014; MENALDO et al. 2015).

1.3. *Bothrops erythromelas* (AMARAL, 1923)

Conhecida como jararaca-da-seca, *Bothrops erythromelas* (**Figura 5**), encontrada na região Nordeste do Brasil, predominantemente no domínio caatinga, é caracterizada por possuir uma das mais potentes atividades hemorrágicas do gênero *Bothrops* (JORGE et al. 2015; NERY et al. 2016).

Os primeiros estudos realizados com a *Bothrops erythromelas* em 1979, por Nahas et al., mostraram que sua peçonha, diferentemente do que ocorre com as demais *Bothrops*, não apresentou atividade trombina símile, uma vez que não fora capaz de coagular diretamente o fibrinogênio. Outra atividade não observada nos envenenamentos causados por *B. erythromelas* foi a atividade miotóxica, presente nos envenenamentos das demais espécies do gênero. Embora tenha sido observado em algumas espécies de *Bothrops*, a atividade amidolítica também não foi observada em *B. erythromelas*, e mesmo sendo comum a peçonha de serpentes jovens serem considerados mais tóxicos do que as serpentes adultas, estudos com a *B.erythromelas*, mostraram que nesta espécie os indivíduos adultos possuem maior toxicidade do que dos filhotes. A peçonha desta serpente mostrou ainda uma maior atividade relacionada ao fator II e X da cascata de coagulação, bem como dos ativadores de protombina, porém sem apresentar atividade relacionado a trombos (NERY et al., 2016).

Figura 5: A- Representante de um espécime adulto da serpente *Bothrops erythromelas* (AMARAL, 1923). B- Bioma Caatinga, hábitat natural da *B.erythromelas*.



Fonte: A- Museu Vivo Répteis da Caatinga (2019).

B- <https://segurancaambiental.wordpress.com/bioma-caatinga-mapa-do-brasil>

1.4. Fosfolipases A₂

As fosfolipases A₂ (PLA₂) são proteínas enzimáticas de diferentes tamanhos, com massa molecular variando entre 13 e 146KDa, que catalisam a hidrólise da ligação 2-acil éster cálcio dependente do 3-sn-fosfoglicerídeo obtendo como produto lisofosfolipídios e ácidos graxos, exercendo um papel importante no metabolismo de moléculas lipídicas. Essas enzimas estão relacionadas a produção e liberação de ácido araquidônico, um precursor de lipídios bioativos, que participam na regulação de muitas funções celulares, devido a liberação de compostos como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, caracterizando a percepção de dor e a inflamação (SCOTT et al., 1990; SCHALOSKE; DENNIS, 2006; DE-MARIA et al., 2007; VINDAS et al., 2018).

As fosfolipases A₂ são classificadas em seis grupos, a saber, PLA₂ citosólicas (cPLA₂), PLA₂ Ca²⁺ independentes (iPLA₂), PLA₂ de fator de agregação plaquetária acetil hidrolases (PAF-AH), PLA₂ lisossômicas; PLA₂ específica do tecido adiposo (adPLA₂) e PLA₂ secretórias (sPLA₂). As sPLA₂ são divididas em 17 subgrupos, tendo como base o número dos aminoácidos e a localização das ligações dissulfeto, os subgrupos I e II abrigam as PLA₂ de peçonha de serpentes. (SCHALOSKE; DENNIS, 2006; QUACH, et al., 2014; VINDAS et al., 2018).

As PLA₂ de peçonha de serpente são responsáveis pela ação miotóxica, pró-inflamatória e atividades hiperalgésicas observadas em algumas peçonhas, como a de *Bothrops asper*, onde se observa que 30% do total de proteínas da peçonha desta serpente é de PLA₂, tendo sido isolados 4 tipos de PLA₂, denominadas de MT-I a MT-IV e que configuram moléculas bem semelhantes entre si. Embora a PLA₂ II e MT-IV não possuam a ação catalítica, como ocorre com MT-I e MT-III, as MT-II e M-III desencadeiam inflamação e dor local, estimulando a produção e liberação de mediadores inflamatórios tais como IL-1 e IL-6, TNF α , LTB₄, TXA₂, PGE₂ e PGD₂ no local da picada (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; TEXEIRA et al., 2003; ZULIANI et al., 2005; MOREIRA et al., 2008; SANTOS et al., 2011; MOREIRA et al., 2013; DIAS et al., 2017).

As PLA₂ de peçonha de serpente têm estruturas tridimensionais semelhantes entre si, contudo apresentam diversos perfis toxicológicos, tais como, miotoxicidade, neurotoxicidade, atividade anticoagulante, hemólise, hiperalgesia, inflamação, edema, citotoxicidade hipotensão e atividade bactericida, esses perfis ampliam os estudos voltados às fosfolipases provenientes de peçonhas de serpentes (KINI, 1989; KINI, 2003; SOARES et al., 2004; MONTECUCCO e al., 2009; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2013; VINDAS et al., 2018).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Isolar e caracterizar uma fração com atividade fosfolipásica da peçonha da serpente *Bothrops erythromelas* testando suas atividades antibacterianas e antibiofilme.

2.2. Objetivos Específicos

- Purificar uma fração com atividade fosfolipásica da peçonha de *Bothrops erythromelas* em apenas um passo cromatográfico;
- Determinar a massa molecular da fração isolada por meio de espectrometria de massas;
- Sequenciar os aminoácidos da fração purificada por meio de degradação de Edman;
- Realizar teste de hemólise da fração em sangue murino;
- Avaliar atividade fosfolipásica da peçonha bruta e da fração purificada;
- Realizar testes de atividade antibacterianas com linhagens de *Staphylococcus aureus* ATCC 7133623, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Acinetobacter baumannii* 00332126, proveniente de isolado clínico, diante da fração isolada;
- Realizar teste de atividade antibiofilme com linhagem de *Acinetobacter baumannii* 00332126, proveniente de isolado clínico, diante da fosfolipase A₂ isolada da peçonha.

3. RESULTADOS

ISOLAMENTO DE UMA FRAÇÃO COM ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops erythromelas*

Ellynes Amancio Correia Nunes¹; Breno Emanuel Farias Frihling²; Taylla Michelle de Oliveira Flores¹; Elizângela de Barros²; Caio Fernando Ramalho de Oliveira³; Octávio Luiz Franco⁴; Ludovico Migliolo⁵; Karla Patrícia de Oliveira Luna⁶

¹Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular- Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa, Paraíba, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil; S-Inova Biotech, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil;

³Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e meio ambiente- Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais; Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁴Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil; S-Inova Biotech, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil; Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil

⁵Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular- Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa, Paraíba, Brasil. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil; S-Inova Biotech, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil;

⁶Docente do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil. Programa de Pós-graduação no Ensino de Ciências e Matemática, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

Resumo do Trabalho:

Tendo em vista o aumento dos casos de resistência bacteriana, o estudo voltado ao desenvolvimento de novos fármacos que visem controlar esse problema tem crescido no meio científico. Compostos moleculares isolados de venenos animais, como os venenos ofídicos, oferecem uma variedade de opções terapêuticas para o tratamento das infecções bacterianas, portanto, objetivou-se isolar e caracterizar uma fosfolipase A₂ do veneno da serpente *Bothrops erythromelas*, testando-a contra linhagens bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas e biofilmes bacterianos. Os resultados mostram uma fração com atividade fosfolipásica com alta atividade enzimática, baixa atividade hemolítica, significativa atividade antibactericida em bactérias Gram-positivas e redução na matriz do biofilme. Configurando uma importante opção ao desenvolvimento de fármacos no tratamento das infecções bacterianas.

ISOLAMENTO DE UMA FRAÇÃO COM ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops erythromelas*

Ellynes Amancio Correia Nunes¹; Breno Emanuel Farias Frihling²; Taylla Michelle de Oliveira Flores¹; Elizângela de Barros²; Caio Fernando Ramalho de Oliveira³; Octávio Luiz Franco⁴; Ludovico Migliolo⁵; Karla Patrícia de Oliveira Luna⁶

RESUMO:

Resistência bacteriana constitui um problema de saúde pública mundial, necessitando de novas opções terapêuticas. Toxinas animais surgem como alternativa a essa problemática, como fosfolipases isoladas de peçonhas ofídicas que apresentam atividades biológicas importantes. A serpente *Bothrops erythromelas*, tem sua peçonha ainda pouco estudado, sendo uma das espécies que desperta grande interesse médico-científico na região Nordeste do Brasil, tornando-se alvo para diversos estudos. Objetivou-se, portanto, isolar e caracterizar uma fração com atividade fosfolipásica de *B.erythromelas*, testando suas atividades antimicrobianas. Utilizou-se os testes de Bradford, seguido de RP-HPLC, MALDI-TOF e degradação de Edman, para purificação e caracterização do composto. Determinou-se as atividades inerentes a fração isolada utilizando-se testes enzimático e hemolítico, além de testes antibacterianos com linhagens bacterianas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 7133623, e teste de atividade antibiofilme com linhagens de *Acinetobacter baumannii* 00332126 proveniente de isolado clínico. Com 42mg/mL⁻¹ de concentração proteica, massa molecular de 13656,4 Da e 31 resíduos de aminoácidos na porção N-terminal, a fração apresentou alta atividade enzimática, baixa atividade hemolítica, atividade considerável contra a linhagem Gram-positiva, e foi eficiente na redução da matriz do biofilme, porém não se mostrou bactericida na linhagem testada. Assim, uma fração fosfolipásica isolada da peçonha de *B.erythromelas* surge como alternativa a estudos voltados para o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos.

Palavras-chaves: Atividade Antibacteriana, Atividade Fosfolipásica, Atividade hemolítica Venenos animais.

ABSTRACT:

Bacterial resistance is a worldwide public health problem requiring new therapeutic options. Animal toxins appear as an alternative to this problem, such as phospholipases isolated from snake venoms that present important biological activities. The *Bothrops erythromelas* snake has its venom still little studied, being one of the species that arouses great medical-scientific interest in the Northeast region of Brazil, becoming a target for several studies. Therefore, the objective was to isolate and characterize a fraction with phospholipase activity of *B.erythromelas* by testing its antimicrobial activities. Bradford tests followed by RP-HPLC, MALDI-TOF and Edman degradation were used for compound purification and characterization. The inherent activities of the isolated fraction were determined using enzymatic and hemolytic tests, antibacterial tests with bacterial strains of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 7133623, and antibacterial activity test with strains of *Acinetobacter baumannii* 00332126. With 42mg / mL⁻¹ protein concentration, molecular mass of 13656.4 Da and 31 amino acid residues in the N-terminal portion, the fraction showed high enzymatic activity, low hemolytic activity, considerable activity against Gram-positive lineage, and was efficient in reducing the biofilm matrix, but was not bactericidal in the tested line. Thus, a phospholipase fraction isolated from *B.erythromelas* venom appears as an alternative to studies aimed at the development of new antimicrobial drugs.

Keywords: Antibacterial Activity, Phospholipasic Activity, Hemolytic Activity Animal venoms.

1. INTRODUÇÃO

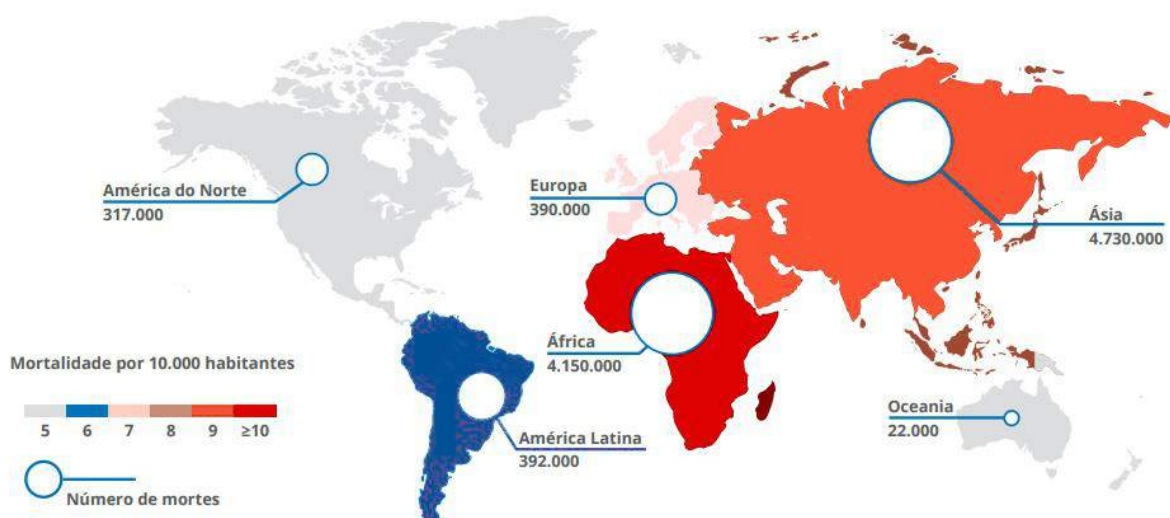
Problemas de saúde pública são crescentes no mundo todo, e têm despertado o interesse no meio científico devido ao aumento da mortalidade, morbidade, bem como a demanda exacerbada dos gastos com procedimentos diagnósticos e terapêuticos entre os indivíduos acometidos por diversas enfermidades. Entre as tais, destaca-se a resistência bacteriana, caracterizada pelos mecanismos naturais e evolutivos observados em microrganismos como resposta a estímulos do ambiente, que tem se intensificado com o uso irregular de antibióticos, propiciando o surgimento de bactérias resistentes aos fármacos habituais. [1; 2]

Além disso, a organização de bactérias em uma matriz extracelular composta por diversos biopolímeros, como polissacarídeos e lipídios, conhecidos como biofilmes, tem igualmente despertado interesse na comunidade científica, uma vez que essa associação consiste em um dos mecanismos de resistência bacteriana. [3;4;5;6;7]

Em 2018, foi notificado meio milhão de casos de infecções causadas por bactérias resistentes no mundo todo. A estimativa para 2050, é que o número de mortes por infecções bacterianas no mundo ultrapasse a marca de 10 milhões, na América Latina, o número de casos pode chegar a 392 mil (**Figura 1**). [8;9]

Figura 1.: Estimativa de óbitos por microrganismos em 2050.

Legenda: Mortalidade por 10.000 habitante de 5.000 (em cinza) até mais de 10.000 mortes (em vermelho).



Fonte: (DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE, 2016)

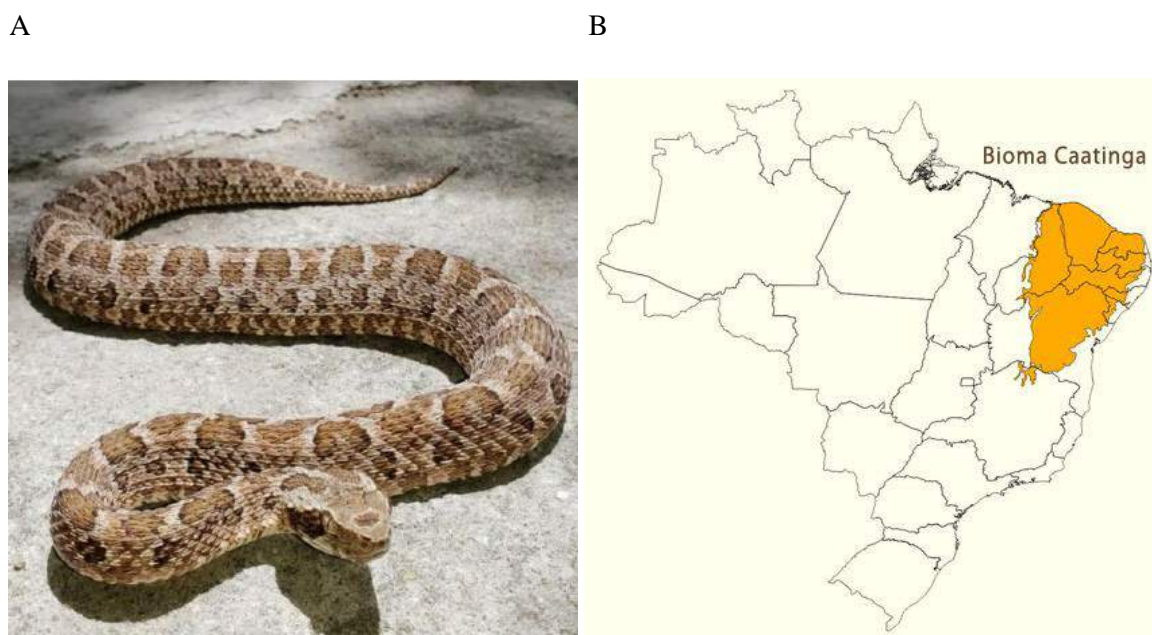
Quanto a sua patogenicidade, as bactérias podem ser classificadas de acordo com a composição de sua parede celular. Bactérias Gram-negativas, por exemplo, possuem maior quantidade de aminoácidos e lipídios em sua conformação, elas apresentam uma parede celular pouco espessa composta por peptidoglicanos intercalada por duas membranas, uma membrana interna que delimita o conteúdo citoplasmático, e uma membrana externa com a presença de lipopolissacarídeos (LPS), molécula que determina a sua toxicidade. Bactérias Gram-positivas, por outro lado, exibem uma conformação mais simples, já que não apresenta uma membrana externa à parede de peptidoglicanos, que neste caso é mais espessa que aquela encontrada em bactérias Gram-negativas. É importante destacar que em bactérias Gram-positivas a porção de LPS está ausente. Portanto, a maioria das bactérias consideradas patogênicas são Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*, tendo alguns poucos representantes com parede celular Gram-positiva, como *Staphylococcus aureus*.^[10]

Estudos com moléculas bioativas de toxinas animais vem ganhando espaço no meio fármaco-científico, uma vez que a riqueza desses compostos tem fornecido várias alternativas a produção de fármacos para o tratamento de diversas doenças.^[11;12]

As peçonhas ofídicas apresentam uma grande variedade de componentes, onde cerca de 90% do seu peso seco é composto por proteínas, dentre as tais estão as fosfolipases A₂ (PLA₂), proteínas enzimáticas que geralmente apresentam baixo peso molecular, responsáveis por catalisar a hidrólise da ligação 2-acil éster cálcio dependente do 3-sn-fosfoglicerídeo.^[13;14;15]

Essas enzimas exercem um papel importante no metabolismo de moléculas lipídicas e estão também relacionadas a produção e liberação de ácido araquidônico (AA), caracterizando envenenamentos observados em serpentes da família Viperidae, a exemplo da serpente *Bothrops erythromelas* (**Figura 2**)^[16;17;18], uma pequena jararaca encontrada na região Nordeste do Brasil, predominantemente no domínio caatinga, que é responsável pelo maior número de envenenamentos notificados na região.^[15;19;20;21;22;23;24]

Figura 2.: A- Representante de um espécime adulto da serpente *Bothrops erythromelas* (AMARAL, 1923). B- Bioma Caatinga, hábitat natural da *B.erythromelas*.



Fonte: A- Cedido por Museu Vivo Répteis da Caatinga (2019). B- <https://segurancaambiental.wordpress.com/bioma-caatinga-mapa-do-brasil>

As PLA₂ de peçonhas de serpente são semelhantes entre si, porém apresentam diferentes perfis toxicológicos, tais como, miotoxicidade, neurotoxicidade, atividade anticoagulante, hemólise, hiperalgesia, inflamação, edema, citotoxicidade, hipotensão e atividade bactericida. [15;25;26;27;28;29]

Diante deste cenário, a atividade antibactericida já observada em fosfolipases chama atenção ao uso dessas toxinas como alternativa à produção de fármacos que auxiliem ao combate dessas doenças. Portanto, este trabalho objetivou, isolar e caracterizar fosfolipases A₂ da peçonha da serpente *Bothrops erythromelas* e testar suas frações diante de atividades antibacterianas e antibiofilme.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1 Local

Os experimentos foram realizados no Laboratório S-Inova da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, que exerceu

parceria com o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Universidade Federal da Paraíba, na cidade de João Pessoa, Brasil.

2.2 Peçonha de *Bothrops erythromelas*

O veneno da serpente *B. erythromelas* foi obtido por meio da ordenha de espécimes em cativeiro. Os espécimes foram provenientes do Zoológico Répteis da Caatinga, localizado no município de Puxinanã, região metropolitana de Campina Grande, estado da Paraíba, a 159,3 Km da capital João Pessoa.

Foram selecionados 5 animais adultos. O veneno, após a liofilização, foi mantido à temperatura de -20°C até o momento de sua utilização. Os espécimes utilizados estão cadastrados no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) sob o registro: A883C5B.

2.3 Purificação de proteínas da peçonha

A peçonha bruta em concentração de 1mg/mL^{-1} , foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência (RP-HPLC) (Waters e 2695 Separations Module) em uma coluna C-18 (Xterra MS $5\ \mu\text{m} - 4.6 \times 250\ \text{mm}$ column). O sistema de solventes foi composto por 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em H_2O (Solvente A) e 0,1% TFA em acetonitrilo (Solvente B) em um fluxo de $2\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e gradiente linear de 5-95% de acetonitrila, durante 60 minutos. Os picos proteicos foram monitorizados a 216 e 280 nm. As frações apresentadas na representação gráfica foram coletadas, reunidas e liofilizadas. Posteriormente, foi selecionada uma fração com atividade fosfolipásica para ser submetida ao espectrômetro de massas.

2.4 Quantificação de Proteínas da peçonha

Após a diluição da amostra liofilizada em água ultrapura em uma concentração de 1mg/mL^{-1} , foi utilizado o método de Bradford (1976),^[30] para quantificação das proteínas presentes na fração purificada. Foram utilizadas diluições seriadas da amostra. Como padrão para estas concentrações foi utilizada a Albumina Sérica Bovina (BSA) na mesma concentração da amostra purificada. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

2.5 Atividade fosfolipásica

Para análise da atividade fosfolipásica da peçonha de *Bothrops erythromelas*, foi utilizado a metodologia descrita por Holzer e Mackessy (1996)^[31], com alterações feitas por Serino-Silva et. al. (2014)^[32].

Foram utilizadas microplacas de 96 poços, com leituras de 425 nm (A425), em leitor de microplacas Spectramax. Como substrato para reação foi utilizado o ácido 4-nitro-3-octanoyloxybenzóico (4N₃OBA, Enzy Life Science, USA).

Para cada poço foram adicionados 200µL de tampão (Tris/HCl 10 mM, e NaCl 100 mM, pH 7,8); 20 µL de substrato 4N₃OBA (1 mg.mL⁻¹ em acetonitrila 100%); 20 µL de água ultrapura e 20 µL de amostra (1mg/mL⁻¹).

Posteriormente a reação foi incubada por 40 minutos, a 37° C, e sua absorbância foi lida em 425 nm, sendo monitorada em intervalos de 10 minutos. Sua atividade enzimática foi calculada após 20 minutos do aumento da absorbância. Para análise do efeito da concentração do substrato na atividade da enzima foi determinado através da medição do aumento da absorbância em 20 minutos de incubação em tampão Tris/ HCl pH 8,0, a 37° C. Como controle positivo utilizou-se uma fosfolipase comercial com concentração de 1mg/mL⁻¹ (Fosfolipase A₂ de pâncreas bovino - P9913 Sigma) e como controle negativo de proteína utilizou-se BSA, também na concentração de 1mg/mL⁻¹.

2.6 Espectrometria de massa

Para mensurar a massa molecular da fração selecionada foi utilizado um espectrômetro de massa de tempo-de-voe de ionização por dessorção assistida por matriz (MALDI-TOF) (AutoFlex III) (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) controlada pelo software Flex Control 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). 1mg/mL⁻¹ da amostra foi solubilizada em água Ultrapura, posteriormente misturada em uma solução saturada de uma matriz versando em ácido siapínico (1:1, v/v), e aplicadas em uma placa alvo (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e secas à temperatura ambiente. O composto teve sua massa molecular obtido no modo linear positivo, pós calibração externa, como o Padrão de Calibração de Proteínas (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os espectros MALDI foram processados com o software Flex Analysis 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

2.7 Sequenciamento de Aminoácidos

Para determinação da sequência de aminoácidos da amostra purificada, foi utilizada a metodologia de degradação de Edman através de uma máquina de sequenciamento automático de fase gasosa (Shimadzu PPSQ-31B/33B), que foi calibrada primeiramente com o padrão de mistura PTH-aminoácidos e uma amostra da fração purificada em uma concentração de 1mg/mL^{-1} liofilizada e ressuspensa em acetonitrila 37% e aplicada a uma membrana de nitrocelulose (PVDF), por fim a membrana foi seca sob fluxo de nitrogênio. Após o procedimento de preparo, a membrana foi submetida a análise. De acordo com as recomendações do fabricante, os aminoácidos da feniltio-hidantoína foram detectados após separação numa coluna RP-HPLC C-18 ($4,6 \times 250$ mm). As sequências resultantes foram aplicadas à pesquisa BLAST de proteína NCBI (BLASTP 2.8.0+) e as sequências significantes foram alinhadas utilizando ClustalW (1.2.4).

2.8 Teste de Hemólise

Para os testes foram utilizados eritrócitos de camundongos (*Mus musculus*), aprovado pelo comitê de ética da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) sob o registro nº 014/2018.

O sangue coletado foi armazenado a 4°C até sua utilização. As células foram lavadas três vezes com tampão fosfato $50\mu\text{M}$, pH 7,4. À suspensão de eritrócitos foi acrescido a fração do veneno de *B. erythromelas* referente a fosfolipase em uma concentração de 1mg/mL^{-1} , em diluição seriada de 16 a $512\mu\text{g/mL}^{-1}$ em um volume final de 100 mL. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 60 minutos. Após centrifugação em 3000 rpm, foi monitorada a liberação de hemoglobina por meio da leitura da absorbância do sobrenadante a 425 nm em leitor de microplacas Spectramax. Para controle de hemólise (branco), foram utilizados eritrócitos suspensos em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4; e como controle positivo (100% de lise de eritrócitos) foi utilizada uma solução de 1% (em volume) de triton X-100 dissolvido em água destilada substituindo a fração do veneno. Os ensaios foram realizados em triplicata.^[33]

2.9 Ensaios Antibacterianos

Linhagens de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 7133623, e *Acinetobacter baumannii* 00332126, sendo esta última proveniente de isolado clínico resistente, foram utilizadas para os testes antibacterianos diante da fração purificada da peçonha da serpente *Bothrops erythromelas* com atividade fosfolipásica. As bactérias foram

inoculadas em meio ágar Müeller-Hinton (MHA) seguida de incubação a 37°C durante 18h. Posteriormente, foram selecionadas três colônias isoladas de cada bactéria e inoculadas em 5 mL de meio Müeller-Hinton caldo (MHB) e incubadas em agitador mecânico sob rotação de 200 rpm a 37 °C, durante 12 horas.

Para a análise do crescimento bacteriano, foram realizadas leituras em leitor de microplacas Spectramax, a 600 nm utilizando 100 µL de cada réplica. Os testes para observar a concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados de acordo com o protocolo descrito pelo *CLSI*.^[34] Utilizando-se o método de diluição em microplacas de 96 poços. Foram organizadas três réplicas técnicas nas microplacas a uma concentração bacteriana final de $2-5 \times 10^5$ ufc.mL⁻¹. As amostras foram testadas em concentrações que variaram de 16 a 512 µg.mL⁻¹. Para controle positivo foi utilizado o antibiótico Ciprofloxacina nas mesmas concentrações das amostras, enquanto que a suspensão bacteriana em MHB foi utilizada como controle negativo.

As microplacas ficaram incubadas a 37 °C durante 18 horas e em seguida as leituras foram realizadas em leitor de microplacas *Multiskan Go (Thermo Scientific)* a 600 nm. O CIM foi estimado como sendo a menor concentração de PLA₂ em que não houve crescimento da bactéria. Todos os experimentos foram desenvolvidos em triplicata e expressos com desvio padrão.

2.10 Ensaio de Atividade Antibiofilme

Para se analisar a formação de Biofilmes foi utilizado Meio Basal 2 (BM2) [fosfato de potássio 62 mM, (NH₄)₂ SO₄ 7 mM, MgSO₄ 2 mM, FeSO₄ 10 M e 0,4% de glicose]. Foram usadas culturas bacterianas de *Acinetobacter baumannii* 00332126, proveniente de isolado clínico resistente, que foram cultivadas durante 16-18h em MHB e diluídas 1: 100 (v:v) em BM2. As suspensões bacterianas foram inoculadas em placas de 96 poços de fundo redondo contendo a fração da amostra em diluições seriadas de 2 a 512 µg.mL⁻¹ (volume final: 100 mL). A incubação das microplacas ocorreu durante 24 horas a 37°C. O controle de crescimento negativo continha apenas bactérias no meio BM2, e para controle positivo foi utilizado o antibiótico Ciprofloxacina nas mesmas concentrações da fração da amostra. Para análise do crescimento das células planctônicas utilizou-se a absorbância de 600 nm.^[35;36]

Para avaliar se houve a formação de biofilme, o meio foi removido das microplacas e os poços foram lavados duas vezes com água deionizada. As células aderentes foram coradas com cristal violeta 0,01% durante 20 min. Os poços foram lavados subsequentemente, duas

vezes com água deionizada, secos ao ar e o cristal violeta aderido às células foi solubilizado com 110 μL de etanol a 60%. Mediu-se a formação de biofilme em uma absorvância de 595 nm. Todas as leituras de absorvância foram realizadas com o leitor de microplacas *Multiskan Go* (*Thermo Scientific*).^[37] Os testes foram realizados em triplicatas.

3 RESULTADOS

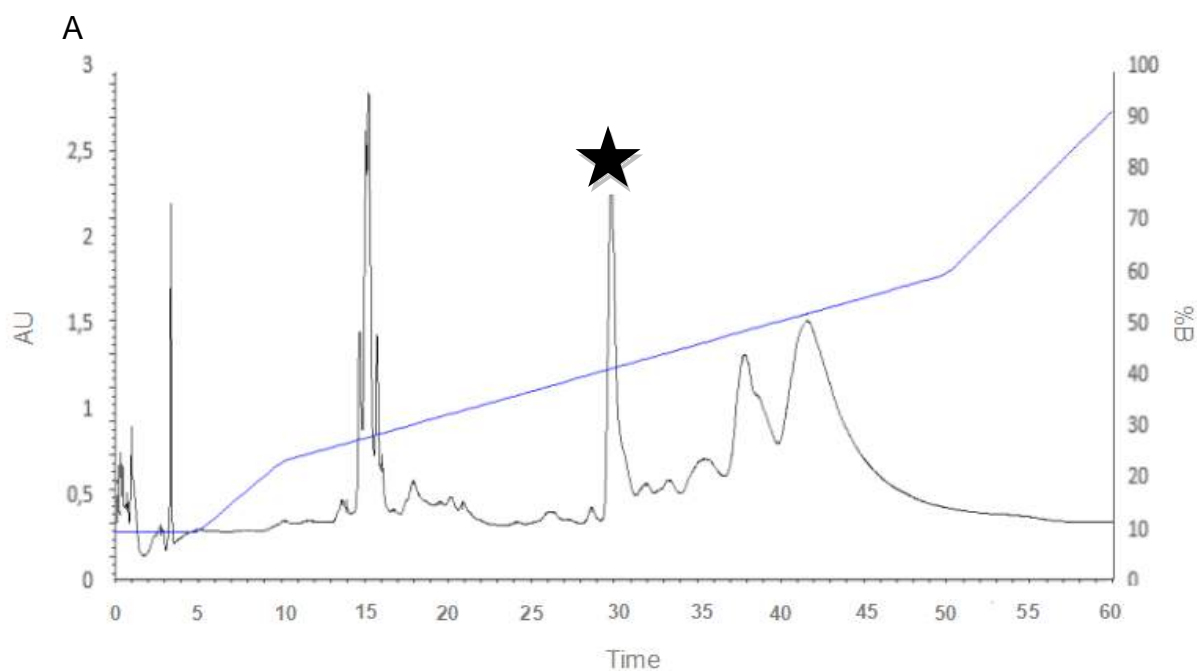
3.1 Quantificação, purificação, espectro de massa e sequenciamento da fração fosfolipásica

A cromatografia em fase reversa (HPLC) em coluna C-18, forneceu o perfil apresentado na **Figura 3**. O pico que apresentou atividade fosfolipásica foi eluído em uma concentração de aproximadamente 40% de acetonitrila (B) no minuto 30 da corrida cromatográfica.

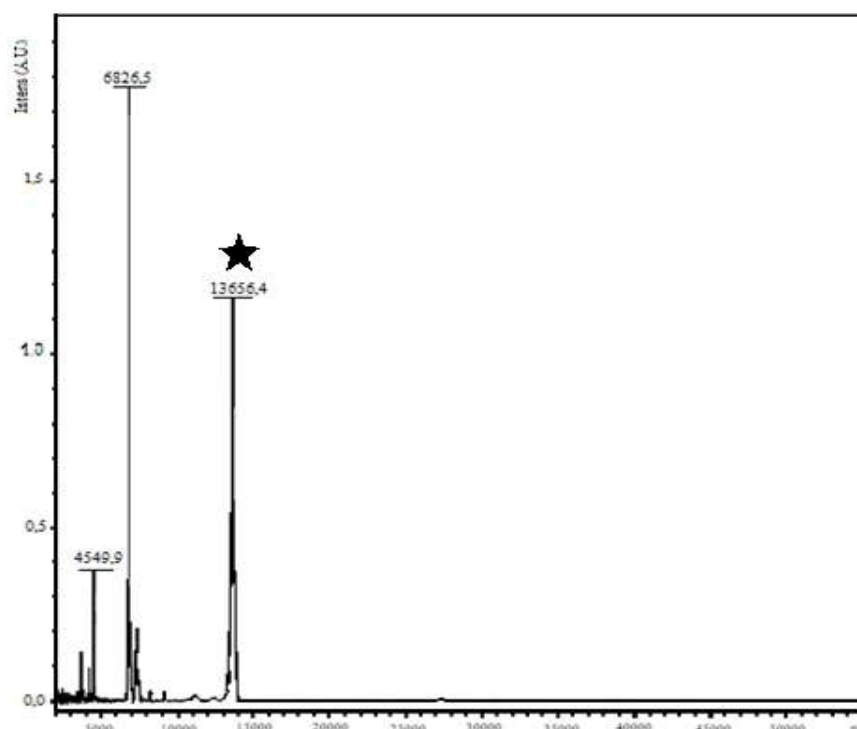
O método fotométrico de *Bradford*, determinou que a fração purificada da peçonha, com atividade fosfolipásica, apresentou uma concentração de 42mg/mL^{-1} de proteínas em 1mg/mL^{-1} da amostra.

Para confirmação da pureza da fração coletada, nossa amostra foi submetida ao espectrômetro de massas, que gerou um espectro com massa de 13656,4 Da (**Figura 3**), confirmando ser uma fração com massa semelhante aquelas observadas em fosfolipases, contudo a presença de picos ionizáveis no gráfico, mostra que provavelmente se trata de mais de uma fosfolipases presente na fração.

Figura 3.: A- Perfil cromatográfico de fase reversa de *B.erythromelas*, em uma coluna C-18 equilibrada com solvente A (0,1% TFA em água) e eluído com 5-95% de solvente B [acetonitrila / solvente A, 9: 1,v:v] e um caudal de 2 mL / min⁻¹. Em destaque, fração selecionada para ser submetida ao espectrômetro de massas. B- Espectro gerado para a fração purificada, em destaque fração selecionada para testes com massa de 13656,4Da.



B



A degradação de Edman forneceu uma sequência de aminoácidos com 31 resíduos da porção N-terminal. Posteriormente foi feito o BLAST da sequência, onde foi observada similaridade de 96% para uma PLA₂ ácida (bpPLA₂-TXI) de *Bothrops pauloensis*,^[38] uma PLA₂ ácida de *B.diporus*^[39] e uma PLA₂ ácida (BE-I-PLA₂) de *B. erythromelas*.^[40] Para comparar as sequências foi feito o alinhamento usando o ClustalW, onde foi possível observar que apenas os aminoácidos Triptofano (posição 1) e Ácido aspártico (posição 25) da sequência de BeryPLA₂ são diferentes dos três organismos analisados (**Tabela 1**).

A similaridade observada na fração purificada com as fosfolipases BpPLA₂-TXI, sPLA₂-II e BE-I-PLA₂, oferece forte indicações de uma característica ácida em nossa amostra.

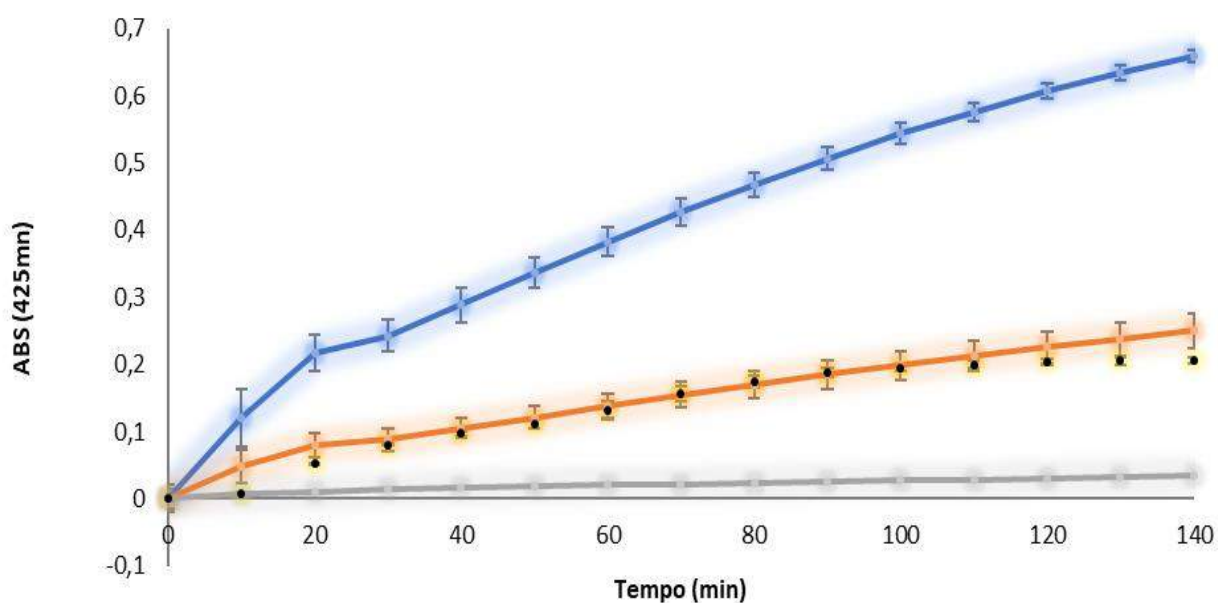
Tabela 1.: Alinhamento de sequência da fração purificada com atividade fosfolipásica com BpPLA₂-TXI, sPLA₂-II e BE-I-PLA₂, utilizando-se a ferramenta ClustalW. Em destaque (vermelho) os aminoácidos que se apresentaram diferentes daqueles observados nas outras fosfolipases comparadas.

Espécies	Nº de acesso	PLA ₂	Alinhamento	%
<i>B.erythromelas</i>	-	Fração PLA	WL V QFETLIMKIAGRSGVWYYGS YD CYCGSG	-
<i>B.pauloensis</i>	D0UGJ0.1	BpPLA ₂ -TXI	NLVQFETLIMKIAGRSGVWYYGSYGCYCGSG	96%
<i>B.diporus</i>	AFJ79208.1	sPLA ₂ -II	NLVQFETLIMKIAGRSGVWYYGSYGCYCGSG	96%
<i>B.erythromelas</i>	Q2HZ28.1	BE-I-PLA ₂	SLVQFETLIMKIAGRSGVWYYGSYGCYCGSG	96%

3.2 Atividade Fosfolipásica

Na **Figura 4** podemos observar que a fração purificada do veneno de *Bothrops erythromelas*, apresentou maior atividade enzimática quando comparada a fosfolipase comercial e a peçonha bruta da serpente, diante do substrato sintético ácido 4-nitro-3(octanoyloxy) benzóico (4N₃OBA).

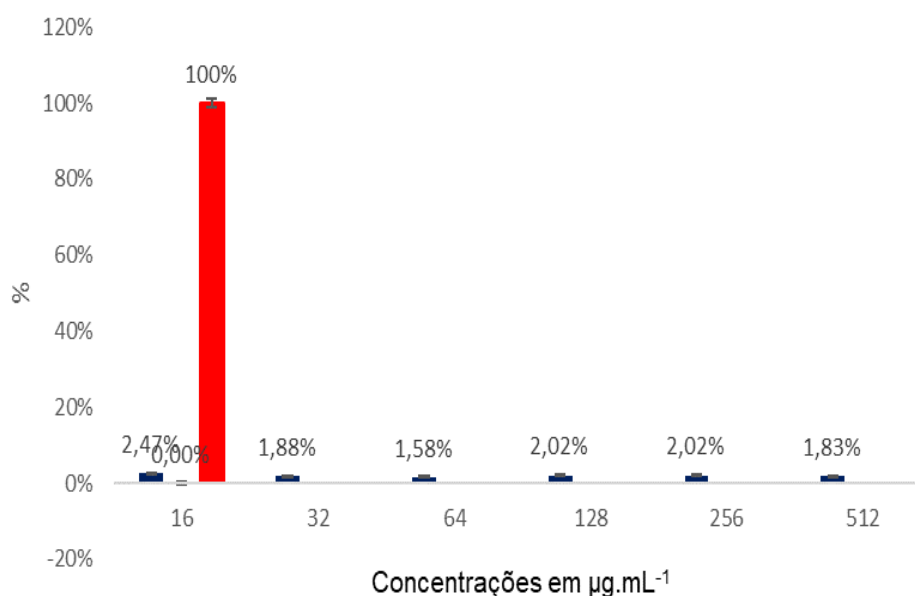
Figura 4.: Atividade fosfolipásica da peçonha bruta, da fração purificada da peçonha de *B. erythromelas*, de uma fosfolipase comercial e do BSA diante do substrato 4N₃OBA. Legenda: Em cinza temos o BSA como controle negativo; em preto temos os valores referente a peçonha bruta da serpente; Laranja representa os dados da fosfolipase comercial como controle positivo e azul faz referência fração purificada.



3.3 Atividade Hemolítica

O teste de hemólise indicou que a fração purificada apresentou baixa atividade hemolítica em sangue de camundongos (**Figura 5**). As várias diluições da fração da peçonha de *Bothrops erythromelas*, ficaram inferiores a 3%, quando comparadas ao reagente Triton X 100, que tem como parâmetro a lise de 100% dos eritrócitos presentes na amostra. Esse resultado mostra a viabilidade para a realização de testes biológicos.

Figura 5.: Atividade Hemolítica, expressa em porcentagem da fração purificada em sangue de camundongo (*Mus musculus*). Em vermelho temos o padrão positivo, o reagente Triton X, com 100% de lise dos eritrócitos; em azul, temos aos valores referentes a fração e em verde temos o controle negativo, apresentando apenas soro fisiológico.



3.4 Atividade Antibacteriana e Antibiofilme

Ao se realizar testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) para linhagens bacterianas de *Escherichia Coli* ATCC-25922 diante da fração purificada foi observado que na menor concentração (16 µg.mL⁻¹) não houve inibição do crescimento bacteriano. Observa-se, porém, que há um crescimento contínuo da bactéria (106%) quando comparado com o crescimento da bactéria apenas no meio de cultura, que foi de 99,87%. Na maior concentração testada (512 µg.mL⁻¹), por outro lado, observou-se um crescimento bacteriano de apenas 87%, mostrando uma inibição de 13% do crescimento diante da fração testada, nesta concentração (**Tabela 2**).

A Ciprofloxacina, por sua vez, inibiu 81% na menor concentração (16 µg.mL⁻¹) e 95% na maior (512 µg.mL⁻¹), visto que na tabela 2, observa-se que diante do antibiótico, o crescimento bacteriano na concentração de 16 µg.mL⁻¹ foi de apenas 9% e na concentração de 512 µg.mL⁻¹ o crescimento foi de apenas 5% (**Tabela 2**).

Testes com a linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC-7133623, mostrou que na menor concentração testada (16 µg.mL⁻¹), a bactéria cresceu 51% do crescimento total da bactéria apenas no meio de cultura sem tratamento, que foi em torno de 99,96%. Portanto, a fração

testada inibiu 49% do crescimento bacteriano. Na maior concentração testada ($512 \mu\text{g.mL}^{-1}$), mostrou que apenas 29% da bactéria continuou crescendo, mostrando portanto uma inibição de 71% do crescimento bacteriano (**Tabela 2**).

Para os testes realizados com *Acinetobacter baumannii* 00332126 diante da fração fosfolipásica, foi observado que na menor concentração ($16 \mu\text{g.mL}^{-1}$) houve inibição do crescimento bacteriano de 14%, uma vez que houve o crescimento de 76% das bactérias mesmo após o tratamento. Para a maior concentração testada ($512 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi observado um crescimento de 56% da bactéria, mostrando uma inibição de 34% no crescimento da linhagem testada. O antibiótico por sua vez, mostrou um comportamento esperado diante da linhagem resistente, uma vez que não fora capaz de inibir o crescimento bacteriano em sua menor concentração, já que foi observado um crescimento superior àquele observado na bactéria sem o tratamento. Na maior concentração, de diferente modo, o antibiótico inibiu 94% do crescimento da bactéria, denotando que apenas 6% de crescimento foi registrado (**Tabela 2**).

No que cerne a formação de Biofilmes, diante da fração fosfolipásica foi observado um crescimento de 47% e 39%, na menor e na maior concentração respectivamente. Indicando assim, uma inibição de 53% na menor concentração e 61% na maior concentração (**Tabela 2**).

Tabela 2.: Concentração Inibitória Mínima de *Escherichia Coli* ATCC-25922, *Staphylococcus aureus* ATCC-7133623 (em meio Müeller-Hinton) e *Acinetobacter baumannii* 00332126 (em meio BM2) tratados com a fração fosfolipásica isolada e com antibiótico padrão Ciprofloxacino; Crescimento das bactérias em meio Müeller-Hinton sem tratamento; Formação de Biofilme de *Acinetobacter baumannii* 00332126. Dados expressões em porcentagem.

Linhagens bacterianas	Crescimento da Bactéria %	CIM %	Concentração $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Biofilme %	Ciprofloxacino CIM	Ciproloxacino Biofilme
<i>E.Coli</i> ATCC-25922	99,87	106	16	-	9	
		87	512		5	
<i>A.baumannii</i> 00332126	99,97	76	16	47	75	101
		56	512	39	97	6
<i>S.aureus</i> ATCC-7133623	99,96	51	16	-	7	
		29	512		8	

4 DISCUSSÃO

4.1 Quantificação, purificação, espectro de massa e sequenciamento da PLA₂

Estimou-se que o pico encontrado próximo ao minuto 30 da cromatografia fosse uma fração com atividade fosfolipásica, com base em estudos anteriores com *B.erythromelas*, uma vez que o gradiente linear aplicado em nossa metodologia foi semelhante ao descrito por eles.^[40]

Em seu estudo com a espécie *Bothrops erythromelas*, foi feita a purificação do veneno bruto da serpente em quatro etapas cromatográficas, obtendo como resultado final uma fosfolipase A₂ ácida com massa molecular de 13649,57 Da. Para ressuspensão da amostra, os autores utilizaram três tampões diferentes em cada etapa (Acetato de Amônia, Tris-HCl e tampão NaCl); na etapa de cromatografia em fase reversa (RP-HPLC), foi utilizada uma coluna C-4. De diferente modo, no presente trabalho a amostra liofilizada foi eluída em água Ultrapura, e submetida a uma coluna C-18 em RP-HPLC. Mesmo com metodologias diferentes aplicadas durante a purificação, a fração purificada apresentou 96% de similaridade com a fosfolipase já descrita para *B.erythromelas*.^[40]

Purificações de PLA₂ de venenos de serpentes com mais de um passo cromatográfico mostrou-se comum durante muito tempo, como em estudos relatados com *B. alternatus* e *B. asper*, onde se utilizou duas etapas cromatográficas, com reagentes diferentes para eluição da amostra (Bicarbonato de amônia; TFA, para *B.alternatus*) (Tris KCl; Acetato de Amônia, para *B.asper*), utilizando-se para ambos, na etapa de RP-HPLC, uma coluna C-18 com gradiente linear de 0-66% de acetonitrila.^[41;42]

Assim como, na purificação de PLA₂ da serpente *B. atrox*, onde se aplicaram três passos cromatográficos, utilizando também, diferentes tampões para eluição da amostra liofilizada. Na cromatografia em fase reversa (RP-HPLC), foi utilizada também uma coluna C-18, com gradiente de concentração linear do reagente B com 70% de acetonitrila para 0,1% de TFA e administração de 0-100% do solvente B.^[43]

Do veneno de *B. jararaca*, foi possível isolar uma fosfolipase A₂ utilizando-se também, três etapas cromatográficas, com a adição de mais uma etapa para a confirmação da fração, utilizando diferentes tampões em suas respectivas etapas (Bicarbonato de Amônia; Tris-HCl; TFA). Em RP-HPLC os pesquisadores utilizaram uma coluna C-18 com gradiente de concentração linear do reagente B com 70% de acetonitrila para 0,1% de TFA.^[44]

Contudo, estudos mais recentes, apontam para a redução das etapas cromatográficas durante a purificação de PLA₂, como o isolamento de uma fosfolipase A₂ da peçonha de *B.*

cotiara, em apenas uma etapa cromatográfica, RP-HPLC, onde para tal, a peçonha foi diluído em água, e a amostra foi submetida a uma coluna C-18; e uma PLA₂ de *B. jararaca*, em RP-HPLC, usando como solvente TFA, e também, uma coluna C-18; do mesmo modo como foi realizado em nossos experimentos.^[32;45]

Estudos envolvendo o isolamento de uma fosfolipase bpPLA₂-TXI da peçonha da serpente *B.pauloensis*, utilizando apenas uma etapa cromatográfica, semelhante ao que fizemos, utilizando uma coluna C-18 em RP-HPLC, com gradiente igual ao aplicado à nossa amostra, obteve-se uma fração correspondente a uma fosfolipase ácida pura (**Tabela 1**), que mostra alta similaridade com a fração purificada por nossos grupo. Ratificando, mais uma vez, a importância do uso de uma metodologia que melhore o tempo aplicado no processo.^[38]

Portanto, o tipo de solvente envolvido na diluição da amostra liofilizada, bem como a metodologia aplicada, no que cerne ao gradiente linear e a coluna de separação, mostraram ter sido fatores importantes para a possível pureza de nossa amostra, em apenas um passo cromatográfico.

Desta forma, a busca pelo melhor método de purificação se torna importante, uma vez que o tempo empregado na pesquisa por novos compostos biológicos é reduzido, otimizando as novas descobertas fármaco-científicas para o tratamento de diversas doenças que causam mortalidade e/ou morbidade da população mundial, facilitando, portanto, a descoberta para as curas e ou tratamentos dessas doenças.

O sequenciamento dos aminoácidos da porção N-terminal da fração fosfolipásica, mostrou a alteração em dois aminoácidos comparados com as três PLA₂ (BpPLA₂-TXI; sPLA₂-II e BE-I-PLA₂) que apresentaram similaridade de 96% com a fração isolada.^[38;39;40] A presença de um Triptofano na posição 1, indica uma característica de maior hidrofobicidade da amostra, uma vez que este aminoácido apresenta características aromáticas com cadeia lateral relativamente apolar, e a presença de um Ácido Aspártico na posição 25, indica um aumento na característica ácida de nossa amostra, uma vez que este aminoácido está entre os dois aminoácidos que apresentam o grupo R carregado negativamente em pH 7,0, conferindo-lhe assim uma propriedade ácida.^[46]

4.2 Atividade Fosfolipásica

As características observadas na fração isolada apontam para o desenvolvimento de um composto mais eficiente do ponto de vista comercial, proveniente da PLA₂ isolada de *B.*

erythromelas, uma vez que o tempo para a ação da enzima mostra-se reduzido, elevando assim sua eficiência.

Testes realizados com a peçonha de *B. pauloensis* e *B. moojeni*, diante do substrato clara de ovo, confirmaram a alta concentração da enzima PLA₂ nas referidas peçonhas. Embora não tenha sido feita uma comparação com uma fosfolipase comercial e o substrato utilizado tenha sido diferente do aplicado nesta pesquisa, seus achados confirmam a atividade fosfolipásica observada no gênero *Bothrops*.^[47]

Estudos utilizando o mesmo substrato que foi utilizado neste trabalho, 4N₃OBA, comparou a atividade catalítica de uma PLA₂ isolada da peçonha da serpente *B. marajoensis* com a peçonha bruta da mesma serpente. Os autores observaram que a fração purificada apresentou também, maior atividade do que a peçonha bruta da serpente.^[48]

Por outro lado, ao comparar a atividade enzimática de duas fosfolipases isoladas de *B. jararacussu* com uma fosfolipase comercial e diante do substrato 4N₃OBA, não se observou atividade fosfolipásica considerável em suas duas frações.^[49] Porém, a comparação da atividade de uma fosfolipase A₂ ácida isolada de *B. moojeni*, com duas fosfolipases isoladas de *B. jararacussu*, uma ácida e uma básica, foi possível observar que a atividade apresentada pela fosfolipase ácida se mostrava mais eficiente que a básica, estando próxima daquela observada na fração de *B. moojeni*.^[50]

Com base nisto, observamos que a fração isolada, se comporta semelhantemente a uma fosfolipase ácida, uma vez que foi observado sua elevada atividade enzimática, de acordo com o que pode ser observado na **Tabela 3**.

Tabela 3.: Comparação entre PLA₂ isoladas de diferentes serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* quanto a sua característica ácida ou básica.

Espécie	PLA ₂	Ionização	Atividade Enzimática	Referências
<i>B. jararacussu</i>	BjVIII	Básica	Nenhuma	Fagundes et al. 2011
<i>B. jararacussu</i>	BthTX-II	Básica	Baixa	Silveira et al. 2013
<i>B. jararacussu</i>	BthA-I-PLA ₂	Ácida	Elevada	Silveira et al. 2013
<i>B. moojeni</i>	BmooPLA ₂	Ácida	Elevada	Silveira et al. 2013
<i>B. erythromelas</i>	Fração fosfolipásica	-	Elevada	-

Portanto, é possível observar que as peçonhas botrópicas geralmente apresentam boa atividade fosfolipásica, contudo, as peçonhas ofídicas tendem a mudar com o tipo de alimentação, o habitat, bem como o clima em que estes animais estão inseridos, o que pode justificar a diferenciação nas características de suas fosfolipases, se ácidas ou básicas.^[23]

A espécie *B. erythromelas* é endêmica da região Nordeste, domínio caatinga, onde há predominância de clima semiárido e altas temperaturas,^[51] a observação de uma atividade fosfolipásica mais acentuada observada neste veneno, pode estar relacionada a característica do clima e também a baixa oferta de alimento e água na região, tendo em vista os períodos prolongados de seca, tornando o veneno desta serpente mais tóxico do ponto de vista da atividade fosfolipásica, quando comparada a outras serpentes do mesmo gênero.

4.3 Atividade Hemolítica

Diferente do que foi observado em nossos achados, estudos com uma PLA₂ (BmooPLA₂) isolada de *B. moojeni*, mostrou a presença de atividade hemolítica mínima em concentrações de 0,8 a 1,0g da toxina, utilizando-se o método radial indireto.^[49] De semelhante modo, estudo realizados com uma PLA₂ (PnPLA₂) isolada da serpente *Porthidium nasutum*, causou hemólise em concentrações de 7,5µg, sendo inclusive superior a peçonha bruta.^[52]

Por outro lado estudos realizados com uma PLA₂ isolada da serpente asiática *Naja naja*, mostrou baixa atividade hemolítica, com 0,9% de hemólise em sangue caprino, semelhante a nossos achados, onde a taxa de hemólise em sangue murino apresentou resultados abaixo de 3% (**Figura 5**), mostrando que embora a peçonha de *B. erythromelas* tenha apresentado maior atividade fosfolipásica quando comparado a PLA₂ de peçonhas ofídicas, a fração isolada não se mostrou hemolítica, como em *B. moojeni* e *P. nasutum*.^[53]

4.4 Atividade Antibacteriana

Testes com uma PLA₂ isolada da espécie *B. alternatus*, mostrou atividade bactericida para *S. aureus* ATCC, e ausência de atividade para *E.coli* ATCC, corroborando com a atividade observada em nossa fração.^[54] Por outro lado, estudos com *B. marajoensis*, mostraram que a fosfolipase A₂ isolada da peçonha desta espécie não apresentou atividade inibitória para *S. aureus* ATCC.^[55]

Em uma pesquisa com *Lachesis muta*, serpente também Viperidae, foi testado uma PLA₂, contra *E.coli* ATCC e *S.aureus* ATCC, e observou-se que para a espécie *E.coli* ATCC a

toxina não apresentou atividade, contudo, conseguiu diminuir o crescimento de *S.aureus* ATCC, mesmo que de forma pouco significativa quando comparado com outras espécies de bactéria, como *Pseudomonas aeruginosa* ATCC e *Klebsiella pneumoniae* ATCC.^[56] De semelhante modo, estudos de uma PLA₂ isolada da víbora asiática da família Viperidae, *Daboia russelii*, mostrou que a atividade bactericida responde melhor em bactérias Gram-positivas do que em bactérias Gram-negativas. Estes dados corroboram com o que foi observado em nossa pesquisa.^[57]

Contudo, testes realizados com PLA₂ isoladas da serpente *Crotalus oreganus abyssus*, também pertencente à família Viperidae, apresentou atividade para linhagens Gram-negativas e Gram-positivas, entre as tais, *E.coli* e *S.aureus*.^[58] É importante salientar que serpentes do gênero *Crotalus*, apresentam composição da peçonha diferenciada daquelas pertencentes ao gênero *Bothrops* e *Lachesis*, apresentando majoritariamente ação neurotóxica, podendo ser observada em algumas espécies a ação proteolítica, ao passo que, os outros dois gêneros apresentam predominantemente ação proteolítica em suas peçonhas, indicando que as PLA₂ isoladas de *Bothrops* e *Lachesis* podem estar mais relacionadas entre si, no que cerne a sua atividade, do que quando comparadas àquelas isoladas do gênero *Crotalus*.^[59]

Conhecendo portanto, que bactérias Gram-negativas apresentam parede celular com uma membrana externa constituída por lipídios assimétricos, seguido de uma camada de peptidoglicanos, uma membrana interna constituída por fosfolipídios, e que essa conformação torna a entrada de alguns fármacos dificultada, da mesma forma, a presença da membrana externa dificulta a entrada da fosfolipase A₂ impedindo assim sua ação em bactérias Gram-negativas, uma vez que a membrana externa é naturalmente resistente a ação de PLA₂. Por outro lado, bactérias Gram-positivas apresentam apenas uma camada de peptidoglicanos seguida por uma membrana celular interna, uma PLA₂ consegue facilmente atravessar a camada de peptidoglicanos, chegando à membrana citoplasmática, agindo assim sobre os fosfolipídios presentes. Desta forma, a baixa atividade bactericida de algumas fosfolipases em bactérias Gram-negativas comparadas com a atividade observada em bactérias Gram-positivas está, portanto, relacionada à estrutura de sua parede celular, que torna as Gram-negativas mais resistentes a ação de compostos tóxicos a esses microrganismos.^[11:60;61]

No entanto, mecanismos de resistência bacteriana podem dificultar a ação do PLA₂, mesmo em bactérias Gram-positivas.^[55] Outro fator relevante, consiste na capacidade da espécie *S.aureus*, conseguir responder a ação de PLA₂ por meio de uma síntese continuada de fosfolipídios, podendo assim, impedir a morte da bactéria. Por outro lado, a ação positiva observada em algumas bactérias Gram-negativas, está relacionada a ação conjunta de outros

fatores sobre a bactéria, como proteínas bactericidas, porém, a carga superficial da PLA₂, bem como a substituição de aminoácidos na estrutura da enzima, também pode influenciar sua ação em bactérias Gram-negativas.^[11]

Com base no mecanismo de ação observado em antibióticos polipeptídicos, como a Polimixina, que atua nas membranas externas e citoplasmáticas de bactérias Gram-negativas, tendo a capacidade de desativar a ação dos LPS, bem como desestabilizar a membrana por meio da movimentação de íons, como Mg e Ca, provocando a ruptura da membrana; e a Bacitramicina, que atua em bactérias Gram-positiva, inibindo a síntese da parede celular bacteriana, impedindo o acréscimo de aminoácidos e nucleotídeos na parede celular, acredita-se que tais proteínas devam atuar semelhantemente a esses antibióticos nas bactérias testadas, sendo portanto, um possível mecanismos de ação das fosfolipases contra as bactérias testadas.^[62;63]

4.5 Atividade Antibiofilme

Pesquisas envolvendo moléculas bioativas provenientes de diversos organismos, tais como, microalgas, plantas e animais, no combate a formação de biofilmes tem se intensificado, uma vez que tais moléculas apresentam diversas ações farmacológicas e toxicológicas que podem servir como alternativa a produção de fármacos que auxiliem no tratamento das infecções causadas por microrganismos, problema emergente na população humana, propiciado também pela conformação de biofilmes.^[64;65]

Estudos realizados com peptídeos derivados da peçonha de *B. diporus* diante da formação de biofilme, mostrou redução significativa de 50% dos biofilmes testados, indicando o potencial farmacológico proveniente de moléculas isoladas das peçonhas ofídicas, corroborando com nossos achados, uma vez que se observou relevante redução na formação de biofilmes de *A. baumannii* 00332126 diante de da fração testada.^[66]

Peptídeos antimicrobianos provenientes da serpente *Bungarus fasciatus* da família Elapidae, mostraram também eficiente redução na formação de biofilme de *A. baumannii*, em baixas concentrações, como 8 µg.mL⁻¹. Na concentração de 64 µg.mL⁻¹ eles conseguiram destruir quase todas as células aderentes ao biofilme.^[67]

Testes antibiofilme com lectinas do tipo C, provenientes da serpente *B. jararacussu*, em *S. aureus* e *S. epidermidis*, mostrou uma redução de 50% na formação dos biofilmes, porém a lectina não foi capaz de intervir no crescimento bacteriano, como foi observado também, em

nossos testes com bactérias planctônicas, indicando que algumas frações das peçonhas de serpentes, tal como a PLA₂, atuam de forma mais eficiente combatendo a formação da matriz dos biofilmes do que as bactérias.^[68] Sabendo que lectinas são proteínas que tem afinidade por carboidratos e que o principal componente da matriz do biofilme são polissacarídeos, pode-se justificar a razão pela qual essa toxina teve melhor atividade na destruição da matriz do que no crescimento do microrganismo. Por outro lado, as PLA₂ são proteínas que interagem com moléculas lipídicas, e os lipídios são, de igual forma, um dos principais componentes da matriz dos biofilmes, sendo fundamentais para sua estrutura. Portanto, a ação da fração isolada de *B. erythromelas* nos biofilmes pode ter relação com a matriz do biofilme testado.^[69]

Desta forma, a fração fosfolipásica, agiu inibindo o crescimento dos biofilmes, ratificando como os componentes oriundos de peçonhas ofídicas podem contribuir para o estudo no combate as infecções bacterianas, sendo uma importante fonte de toxinas com capacidade de inibir o crescimento de biofilmes. A fração purificada por nosso grupo se mostra ainda mais eficiente, uma vez que a toxina não causa danos nas células sanguíneas do hospedeiro, como foi observado no teste hemolítico.

Esses achados chamam atenção para a importância de mais estudos com moléculas isoladas de toxinas animais, especialmente aquelas provenientes das peçonhas de serpentes, para o controle da formação de biofilmes bacterianos, contribuindo para avanços no controle das infecções causadas por estes microrganismos.

5 CONCLUSÃO

O isolamento de uma fração da peçonha da serpente *B. erythromelas*, utilizando-se apenas uma etapa cromatográfica (RP-HPLC), resultou em uma fração com atividade fosfolipásica, com característica ácida, contendo massa molecular de 13656,4 Da. O sequenciamento da porção N-terminal da PLA₂ isolada forneceu 31 aminoácidos, onde os aminoácidos da posição 1 e 25 receberam destaque por ter se diferenciado de outras fosfolipases já descritas, conferindo ao composto uma característica hidrofóbica e ácida. Essa fração apresentou elevada atividade fosfolipásica, e não foi observada atividade hemolítica significativa em sangue murino. A atividade antibacteriana foi mais acentuada em linhagens Gram-positiva do que em Gram-negativas. Em testes com biofilmes bacterianos, a fração mostrou possível relação com a redução da matriz do biofilme testado.

Esses achados confirmam que os componentes isolados de peçonhas de serpente podem apresentar diversas ações biológicas e farmacológicas, sendo necessário portanto o

desenvolvimento de pesquisas em torno desses componentes visando o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças que acometem não só populações humanas, mas também o meio veterinário.

AGRADECIMENTOS

Ao órgão de fomento à Pesquisa- CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante o período de realização deste trabalho. À Universidade Federal da Paraíba e à Universidade Católica Dom Bosco por me acolher como discente durante a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] LIVERMORE DM. Minimising antibiotic resistance. **Lancet Infect Dis.** V.10: 18-22. 2005. DOI: 10.1016/S1473-3099(05)70166-3.

[2] LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A.T.; HERDEIRO, M.T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública.** V. 34: 77-84.2016. DOI: 10.1016/j.rpsp.2015.11.003.

[3] COSTERTON, J.W.; IRVIN, R.T.; CHENG, K.J. “The Bacterial Glycocalix in Nature and Disease”. **Annu Rev. Microbiol.**, v.35, p.299-304, 1981. DOI:10.1146/annurev.mi.35.100181.001503.

[4] COSTERTON, L.W.; LEWANDOWSKI, Z.; DEBEER, D.; CALDWELL, D.; KORBER, D.; JAMES, G. Biofilms, the customized microniche. **J Bacteriol.** V. 176(8): 2137–2142. 1994. DOI: 0021-9193/94/\$04.00+0.

[5] COSTERTON, W.J.; WILSON, M. Introducing biofilms. **Biofilms**, 1(1), 1-4, 2004. DOI: 10.9790/9622-0708022330.

[6] DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis.** V. 8(9). 2002. DOI: 10.3201/eid0809.020063.

- [7] CHANDRA J.; MUKHERJEE, P.K. *Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. **Microbiol Spectr.** V. 3(4): 2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015.
- [8] World Health Organization. Containing antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland: WHO; 2019. Available in: < <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>.> Accessed in: 06.23.2019.
- [9] Direção-Geral da Saúde, 2016. Prevenção e Controle de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos em números – 2015: Programa de Prevenção e Controle de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos 43. Available in:< https://www.sns.gov.pt/wp-content/uploads/2017/12/DGS_PCIRA_V8.pdf > Accessed in: 01.15.2019.
- [10] MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.
- [11] NEVALAINEN, T. J.; GRAHAM, G. G.; SCOTT, K. F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A₂. Review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, Amsterdam. v. 1781 (1-2): 1-9. 2008. DOI: 10.1016/j.bbalip.2007.12.001.
- [12] SAMY, R.P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; CHOW, V.T.K.; HO, B. Viper metalloproteinase (*Agkistrodon halys pallas*) with antimicrobial activity against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of cellular physiology, Philadelphia**, v. 216(1):54-68. 2008. DOI:10.1002/jcp.21373.
- [13] MOREIRA, V.; DE CASTRO SOUTO, P.C.; RAMIREZ VINOLO, M.A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CURI, R.; TEIXEIRA, C. A catalytically-inactive snake venom Lys49 phospholipase A₂ homolog induces expression of cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins through selected signaling pathways in macrophages. **Eur J Pharmacol.** V. 708(1-3):68-79. 2013.DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.01.061.
- [14] DIAS, R. G.; SAMPAIO, S.C.; SANT'ANNA, M.B.; CUNHA, F.Q.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; CURY, Y.; PICOLO, G. Articular inflammation induced by an enzymatically-inactive Lys49 phospholipase A₂: activation of endogenous phospholipases contributes to the pronociceptive effect. **Biomed Central.** V.23(18). 2017. DOI: 10.1186/s40409-017-0104-0.
- [15] VINDAS, J. CARRERA, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; FERNÁNDEZ, J. A novel pentameric phospholipase A₂ myotoxin (PophPLA₂) from the venom of the pit viper *Porthidium ophryomegas*. **Int J Biol Macromol.** V.118, Part A: 1-8. 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.028.

- [16] AMARAL, A. New genera and species of snakes. **Proc. N. Engl. Zool. Club** 8. 1923.
- [17] Bioma-caatinga-mapa-do-Brasil. Available in: <
<https://segurancaambiental.wordpress.com/bioma-caatinga-mapa-do-brasil> > Accessed in:
08.14. 2019.
- [18] Reptéis da Caatinga. Available in: <
https://instagram.com/repteis_da_caatinga?igshid=4bk1q4aptvgn> Accessed in: 08.14.2019.
- [19] SCOTT, D.L., WHITE, S.P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M.H.; SINGLER, P.B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. **Science**. V.250: 1541-1546. 1990. DOI: 10.1126/science.2274785.
- [20] SCHALOSKE, R. H., & DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**. 1761(11):1246-59. 2006. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2006.07.011.
- [21] DE MARIA, L.; VIND, J.; OXENBOLL, K.M.; SVENDSEN, A.; PATKAR, S. Phospholipases and their industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**. V. 74(2):290-300. 2007. DOI: 10.1007/s00253-006-0775-x.
- [22] GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DÍAZ, C. ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**. V. 54(7): 958-975. 2009. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.01.038.
- [23] JORGE R.J.B., MONTEIRO, H.S.; GONÇALVES-MACHADO, L.; GUARNIERI, M.C.; XIMENES, R.M.; BORGES-NOJOSA. D.M.; LUNA, K.P.; ZINGALI, R.B.; CORRÊA-NETTO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; SANZ, L.; CALVETE, J.J.; PLA, D. Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. **J Proteomics**. V. 30(114):93-114. 2015. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.11.011.
- [24] NERY, N.M.; LUNA, K.P.O.; FERNANDES, C.F.C.; ZULIANI, J.P. An overview of *Bothrops erythromelas* venom. **Rev Soc Bras Med Trop**. V. 49(6): 680-686. 2016. DOI:10.1590/0037-8682-0195-2016.
- [25] KINI, R.M.; EVANS, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**. V.27(6):613-635. 1989. DOI: 10.1016/0041-0101(89)90013-5.

[26] KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**. V. 42 (8):827-840. 2003. DOI: 10.1016/j.toxicon.2003.11.002.

[27] SOARES, A.; FONTES, M.; GIGLIO, J. Phospholipase A₂ Myotoxins from *Bothrops* Snake Venoms: Structure- Function Relationship. **Curr. Org. Chem**. V. 8: 1677-1690. 2004. DOI: 10.2174/1385272043369610.

[28] MONTECUCCO, C. O.; ROSSETTO, O.; CACCIN, P.; RIGONI, M.; CARLI, L.; MORBIATO, L.; MURARO, L.; PAOLI, M. Different mechanisms of inhibition of nerve terminals by botulinum and snake presynaptic neurotoxins. **Toxicon**. v. 54 (5): 561-4; 2009. DOI: 10.1016/j.toxicon.2008.12.012.

[29] GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipases A₂: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**. V. 62: 27-39. 2013. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.09.006.

[30] BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem**. V.72. 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

[31] HOLZER M, MACKESSY, S. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon**. V. 34: 1149-1155. 1996. DOI: 10.1016/0041-0101(96)00057-8.

[32] SERINO-SILVA, C.; MORAIS-ZANI, K.; TOYAMA, M.H.; TOYAMA, D.O.; GAETA, H.H.; RODRIGUES, C.F.B.; AGUIAR, W.S.; TASHIMA, A.K.; GREGO, K.F.; TANAKA-AZEVEDO, A.M. Purification and characterization of the first γ - phospholipase inhibitor (γ PLI) from *Bothrops jararaca* snake serum. **PLoS ONE** 13(3): e0193105. 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0193105.

[33] CARDOSO, M.H, RIBEIRO, S.M.; NOLASCO, D.O.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. FELÍCIO, M.R.; GONÇALVES, S. MATTOS, O. C.; LIAO, L.M.; SANTOS, N.C.; HANCOCK, R.E.W.; FRANCO, O.L.; MIGLIOLO, L. A polyalanine peptide derived from polar fish with anti-infectious activities. **Sci. Rep**. V. 6: 1-15. 2016. DOI: 10.1038/srep21385.

[34] HECHT, D.W. CITRON, D.M.; DZINK-FOX, J.; GREGORY, W.W.; JACOBUS, N.V.; JENKINS, S.G.; ROSENBLATT, J.E.; SCHUETZ, A.N.; WEXLER, H. **Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard—** Eighth Edition, V. 32 (5). 2012.

[35] DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; REFFUVEILLE, F.; HANEY, E.F.; STRAUS, S.K.; HANCOCK, R.E.W. Broad-Spectrum Anti-biofilm Peptide That Targets a Cellular Stress Response. **PLoS Pathog.** V. 10(5): 2014. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004152.

[36] DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; REFFUVEILLE, F.; MANSOUR, S.C.; RECKSEIDLER-ZENTENO, S.L.; HERNÁNDEZ, D.; BRACKMAN, G.; COENYE, T.; HANCOCK, R. E. D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multi-drug resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Chem Biol.** V. 19; 22(2): 196–205. 2015. DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.01.002.

[37] NAVES, P., DEL PRADO, G., HUELVES, L., GRACIA, M., RUIZ, V., BLANCO, J., SORIANO, F. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.16 n.29; p. 1879 2019 Escherichia coli strains. Microbial pathogenesis, v. 45, n. 2, p. 86-91, 2008. Disponível em: DOI: 10.1016/j.micp ath.2008.03.003

[38] RODRIGUES, R. S., BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F.P.; DE LA TORRE, P.; HENRIQUE-SILVA, F.; SANZ, L.; CALVETE, J.J.; RODRIGUES, V.M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**, 75(9), 2707–2720. 2012. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.03.028.

[39] YUNES QUARTINO, P. J., BARRA, J. L., & FIDELIO, G. D. Cloning and functional expression of secreted phospholipases A₂ from *Bothrops diporus* (Yarará Chica). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 427(2):321–325.2012. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.09.051.

[40] MODESTO, J.C.A.; SPENCER, P. J.; FRITZEN, M.; VALENÇA, R.C.; OLIVA, M.L.V.; SILVA, M.B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; GUARNIERI, M.C. BE-I-PLA₂, a novel acidic phospholipase A₂ from *Bothrops erythromelas* venom: Isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I₂ release by endothelial cells. **Biochemical pharmacology**. V. 72(3):377-84. 2006. DOI: 10.1016/j.bcp.2006.04.032.

[41] GARCIA DENEGRI, M.E.; ACOSTA, O.C.; HUANCAHUIRE-VEJA, S.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S.; MARUÑAK, S.L.; TEIBLER, G.P.; LEIVA, L.C.; PONCE-SOTO, L.A. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. **Toxicon**. V. 56(1):64-74. 2010. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.02.031.

[42] PEREANEZ, J.A.; QUINTANA, J.C.; ALARCÓN, J.C.; NÚÑEZ, V. Isolation and functional characterization of a basic phospholipase A₂ from colombian *Bothrops asper* venom. **Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**. V. 21 (1): 38-48. 2014.

[43] MENALDO, D.L.; JACOB-FERREIRA, A.L.; BERNARDES, C.P.; CINTRA, A.C.O.; SAMPAIO, S.V. Purification procedure for the isolation of a P-I metalloprotease and an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops atrox* snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. V. 21 (28). 2015. DOI: 10.1186/s40409-015-0027-6.

[44] CEDRO, R.C.A.; MENALDO, D.L.; COSTA, T.R.; ZOCCAL, K.F.; SARTIM, M.A.; SANTOS-FILHO, N.A.; FACCIOLI, S.H.; SAMPAIO, S.V. Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A₂ from *Bothrops jararaca* snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. V.24(33): 2018. DOI: 10.1186/s40409-018-0170-y.

[45] DE ROODT, A. FERNÁNDEZ, J.; SOLANO, D.; LOMONTE, B. A myotoxic Lys49 phospholipase A₂ -homologue is the major component of the venom of *Bothrops cotiara* from Misiones, Argentine. **Toxicon**. v.148: 1430148. 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.04.026.

[46] NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Artmed. 6^a edição. Porto Alegre, 2014.

[47] MELO, L. L.; MENDES, M.M.; ALVES, L.M.; ISABEL, T.F.; VIEIRA, S.A.P.B.; GIMENES, S.N.C.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; IZIDORO, L.F.M. Cross-reactivity and inhibition myotoxic effects induced by *Bothrops* snake venoms using specific polyclonal anti-BnSP7 antibodies. **Biologicals** xxx. 1-8. 2017. DOI: 10.1016/j.biologicals.2017.08.002.

[48] GALBIATTI, C.; ROCHA, T.; RANDAZZO-MOURA, P.; PONCE-SOTO, L.A.; MARANGONI, S.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Pharmacological and partial biochemical characterization of Bmaj-9 isolated from *Bothrops marajoensis* snake venom. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. V. 18. 2012. DOI: 10.1590/S1678-91992012000100008.

[49] FAGUNDES, F.H.R.; APARICIO, R.; DOS SANTOS, M.L.; DIZ, E.B.S.; OLIVEIRA, S.C.B.; TOYAMA, D.O.; TOYAMA, M.H. A Catalytically Inactive Lys49 PLA₂ Isoform from *Bothrops jararacussu* venom that Stimulates Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cells. **Protein & Peptide Letters**. V. 18(11):1133-9. 2011. DOI: 10.2174/092986611797200940.

[50] SILVEIRA, L.B. MARCHI-SALVADOR, D.P.; SANTOS-FILHO, N.A.; SILVA, F.P. JR.; MARCUSSI, S.; FULY, A.L.; NOMIZO, A.; DA SILVA, S.L.; STÁBELI, R.G.; ARANTES, E.C.; SOARES, A.M. 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: 35-43. 2013. DOI: 10.1016/j.jpba.2012.04.008.

[51] IBGE- Semiárido Brasileiro. Available in: < <https://www.ibge.gov.br/geociencias/cartas-e-mapas/mapas-regionais/15974-semiarido-brasileiro.html?edicao=24416&t=sobre.>>
Accessed in: 23 de julho de 2019.

[52] VARGAS, L.J. LONDOÑO, M.; QUINTANA, J.C.; RUA, C.; SEGURA, C.; LOMONTE, B.; NÚÑEZ, V. An acidic phospholipase A₂ with antibacterial activity from *Porthidium nasutum* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B** 161 341–347.2012. DOI: 10.1016/j.cbpb.2011.12.010.

[53] DUTTA, S., GOGOI, D., & MUKHERJEE, A. K. Anticoagulant mechanism and platelet deaggregation property of a non-cytotoxic, acidic phospholipase A₂ purified from Indian cobra (*Naja naja*) venom: Inhibition of anticoagulant activity by low molecular weight heparin. **Biochimie**, V. 110, 93–106. 2015. DOI:10.1016/j.biochi.2014.12.020.

[54] BUSTILLO, S. LEIVA, L.C.; MERINO, L.; ACOSTA, O.; BAL, E de K. J.; GORODNER, J.O. Antimicrobial activity of *Bothrops alternatus* venom from the Northeast of Argentine. **Rev Latinoam Microbiol**. 2008; 50 (3-4): 79-82.

[55] COSTA-TORRES, A.F.; DANTAS, R.T.; TOYAMA, M.H.; DIZ FILHO, E.; ZARA, F.J.; RODRIGUES DE QUEIROZ, M.G.; PINTO NOGUEIRA, N.A.; ROSA DE OLIVEIRA, M.; DE OLIVEIRA TOYAMA, D.; MONTEIRO, H.S.; MARTINS, A.M. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. **Toxicon**. V. 55: 795–804. 2010. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.11.013.

[56] DINIZ-SOUSA, R.; CALDEIRA, C.A.S.; KAYANO, A.M.; PALOSCHI, M.V.; PIMENTA, D.C.; SIMÕES-SILVA, R.; FERREIRA, A.S.; ZANCHI, F.B.; MATOS, N.B.; GRABNER, F.P.; CALDERON, L.A.; ZULIANI, J.P.; SOARES, A.M. Identification of the Molecular Determinants of the Antibacterial Activity of LmutTX, a Lys49 Phospholipase A₂ Homologue Isolated from *Lachesis muta muta* Snake Venom (Linnaeus, 1766). **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. V.122(4): 413-423. 2018. DOI: 10.1111/bcpt.12921.

[57] SUDHARSHAN. S; DHANANJAYA, B.L. Antibacterial potential of a basic phospholipase A₂ (VRV-PL-VIIIa) from *Daboia russelii pulchella* (Russell's viper) venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. V. 21:1-8. 2015. DOI 10.1186/s40409-015-0014-y

[58] ALMEIDA, J.R.; LANCELLOTTI M.; SOARES A.M.; CALDERON L.A.; RAMÍREZ D.; GONZÁLEZ W.; MARANGONI S.; DA SILVA S.L. CoaTx-II, a new dimeric Lys49 phospholipase A₂ from *Crotalus oreganus abyssus* snake venom with bactericidal potential: Insights into its structure and biological roles. **Toxicon**. v.120. 2016. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.08.007.

- [59] FURTADO, M.F.D. Biological and immunological properties of the venom of *Bothrops alcatraz*, and endemic species of pitviper from Brazil. **Comparative Biochemistry and Physiology**. V. 141(2):117-123. 2005. DOI: 10.1016/j.cca.2004.09.016.
- [60] RAETZ, C.R.H; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. **Annu. Rev. Biochem.** V.71:635–700. 2002. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
- [61] DELCOUR, A.H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochim Biophys Acta**. V. 1794(5):808-16. 2009. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005.
- [62] MENDES, A.C.; BURDMANN, E.A. 2009. Polimixinas - revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. *Rev Assoc Med Bras*. p. 752-9.
- [63] BULA DE NEMACETIN- ANVISA. Disponível em: <
http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=21331052016&pIdAnexo=3776379> Acessado em: 09.10.2019.
- [64] VILLA, F.; CAPPITELLI, F. Plant-derived bioactive compounds at sub-lethal concentrations towards smart biocide-free antibiofilm strategies. **Phytochemistry Reviews**. V.12: Issue 1, p. 245-254. 2013. DOI:10,1007/s1101-013-9286-4.
- [65] LAURITANO, C.; ANDERSEN, J.H.; HANSEN, E.; ALBRIGSTEN, M.; ESCALERA, L.; ESPOSITO, F.; HELLAND, K.; HANSSEN, K.; ROMANO, G.; IANORA, A. Bioactivity Screening of Microalgae for Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anticancer, Anti-Diabetes, and Antibacterial Activities. **Front. Mar. Sci.**, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00068>.
- [66] PRIMON-BARROS, M.; JOSÉ MACEDO, A. Animal Venom Peptides: Potential for New Antimicrobial Agents. **Curr. Trop. Med. Chem.** V. 17 (10):1119-1156. 2017. DOI: 10.2174/1568026616666160930151242.
- [67] TAJBAKHS. M.; AKHAVAN, M.M; FALLAH, F.; KARIMI, A. A Recombinant Snake Cathelicidin Derivative Peptide: Antibiofilm Properties and Expression in *Escherichia coli*. **Biomolecules**. V. 8, 118. 2018. DOI:10.3390/biom8040118.
- [68] KLEIN R.C.; FABRES-KLEIN, M.H.; DE OLIVEIRA, L.L.; FEIO, R.N.; MALOUIN, F.; RIBON A.D.O.B. A C-Type Lectin from *Bothrops jararacussu* Venom Disrupts

Staphylococcal Biofilms. **PLoS ONE**. V. 10(3): e0120514. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0120514.

[69] FLEMMING, H-C; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews/ Microbiology**. V. 8: 623–633. 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2415.

4. CONCLUSÃO

O isolamento de uma fração da peçonha da serpente *B. erythromelas*, utilizando-se apenas uma etapa cromatográfica (RP-HPLC), resultou em uma fração com atividade fosfolipásica, com característica ácida, contendo massa molecular de 13656,4 Da. O sequenciamento da porção N-terminal da PLA₂ isolada forneceu 31 aminoácidos, onde os aminoácidos da posição 1 e 25 receberam destaque por ter se diferenciado de outras fosfolipases já descritas, conferindo ao composto uma característica hidrofóbica e ácida. Essa fração apresentou elevada atividade fosfolipásica, e não foi observada atividade hemolítica significativa em sangue murino. A atividade antibacteriana foi mais acentuada em linhagens Gram-positiva do que em Gram-negativas. Em testes com biofilmes bacterianos, a fração mostrou possível relação com a redução da matriz do biofilme testado.

Esses achados confirmam que os componentes isolados de peçonhas de serpente podem apresentar diversas ações biológicas e farmacológicas, sendo necessário portanto o desenvolvimento de pesquisas em torno desses componentes visando o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças que acometem não só populações humanas, mas também o meio veterinário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A.P.; BEHAR, P.R. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. **Rev AMRIGS**. V. 12(3):282-6. 2013. DOI: 10.1590/S1679-45082014AO3131.

AMARAL, A. New genera and species of snakes. **Proc. N. Engl. Zool. Club** 8. 1923.

BERNARDE, P.S. Mudanças na Classificação de Serpentes Peçonhentas Brasileiras e suas implicações na Literatura Médica. **Gazeta Médica da Bahia**. v. 81, n. 1, 2011.

Biofilme Bacteriano. Disponível em: <
<https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol27num2/articulos/que-sabemos-de-los-biofilms.html>> Acessado em: 14 de agosto de 2019.

Bioma-caatinga-mapa-do-Brasil. Disponível em: <
<https://segurancaambiental.wordpress.com/bioma-caatinga-mapa-do-brasil>> Acessado em: 14 de agosto de 2019.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD Jr., V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: **Sarvier**. V. 45(6): 2003. DOI: 10.1590/S0036-46652003000600009.

CARNEIRO, D. de A.; BASTOS, E. M. A.F. RESENDE, F.C.; COTTA, G.A.; SOUZA, M.N.A.; CALANÇA, P. de S.S.T.; SANTANA, R.M. Guia de bolso de Animais Peçonhentos. Fundação Ezequiel Dias. Belo Horizonte, Março de 2015 – Edição comemorativa do sesquicentenário de Vital Brazil Mineiro da Campanha.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K. *Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. **Microbiol Spectr**. V. 3(4): 2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015.

COSTERTON, J.W.; IRVIN, R.T.; CHENG, K.J. “The Bacterial Glycocalix in Nature and Disease”. **Annu Rev. Microbiol.**, v.35, p.299-304, 1981.
DOI:10.1146/annurev.mi.35.100181.001503.

COSTERTON, L.W.; LEWANDOWSKI, Z.; DEBEER, D.; CALDWELL, D.; KORBER, D.; JAMES, G. Biofilms, the customized microniche. **J Bacteriol.** V. 176(8): 2137–2142. 1994. DOI: 0021-9193/94/\$04.00+0.

COSTERTON, W.J.; WILSON, M. Introducing biofilms. **Biofilms**, 1(1), 1-4, 2004. DOI: 10.9790/9622-0708022330.

COSTA, H.C.; BÉRNILS, R.S. **Répteis brasileiros: Lista de espécies.** 2018. Disponível em: < <http://www.sbherpetologia.org.br/index.php/repteis>.> Acessado em: 01.15.2019.

DE MARIA, L.; VIND, J.; OXENBOLL, K.M.; SVENDSEN, A.; PATKAR, S. Phospholipases and their industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol.** V. 74(2):290-300. 2007. DOI: 10.1007/s00253-006-0775-x.

DIAS, R. G.; SAMPAIO, S.C.; SANT'ANNA, M.B.; CUNHA, F.Q.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; CURY, Y.; PICOLO, G. Articular inflammation induced by an enzymatically-inactive Lys49 phospholipase A₂: activation of endogenous phospholipases contributes to the pronociceptive effect. **Biomed Central.** V.23(18). 2017. DOI: 10.1186/s40409-017-0104-0.

Direção-Geral da Saúde, 2016. Prevenção e Controle de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos em números – 2015: Programa de Prevenção e Controle de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos 43.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis.** V. 8(9). 2002. DOI: 10.3201/eid0809.020063.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p.167- 193, 2002.

Escherichia coli. Disponível em: < <https://saigoneer.com/saigon-health/16263-new-strain-of-antibiotic-resistant-e-coli-discovered-in-vietnam> > Acessado em: 14 de agosto de 2019.

FURTADO. M.F.D. 2007. Aspectos sistemáticos e biológicos que atuam na diversidade da composição de venenos em serpentes peçonhentas brasileiras. In: Nascimento, L.B. & Oliveira, M.E. (Eds). Herpetologia no Brasil II. Sociedade Brasileira de Herpetologia, Belo Horizonte. p. 183-200.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon.** V.33(11): 1405-1424.1995. DOI: 10.1016/0041-0101(95)00085-Z.

GUTIÉRREZ, J.M., ESCALANTE, T., RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic, alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**. V. 54 (7):976-87. 2009a. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.01.039.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipases A₂: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**. V. 62: 27-39. 2013. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.09.006.

HAUBERT, L.; CUNHA, C.E.P.D.; LOPES, G.V.; SILVA, W.P.D. Food isolate *Listeria monocytogenes* harboring tetM gene plasmid-mediated exchangeable to *Enterococcus faecalis* on the surface of processed cheese. **Food Research International**. Frin. V. 107: 503-508. 2018. DOI:10.1016/j.foodres.2018.02.062.

JEFFERSON, K.K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiol. Lett.** 236(2), 2004. 163–173. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.06.005.

JENNINGS, B.; SPEARMAN, W.; SHERPHHARD. E. A novel 25 KDa protein form the venom of *Bitis arietans* with similarity to C-type lectins causes fibrinogen- dependent platelet agglutination. **Toxicon**, V. 46(6):687-98. 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.07.011.

JORGE R.J.B., MONTEIRO, H.S., GONÇALVES-MACHADO, L.; GUARNIERI, M.C.; XIMENES, R.M.; BORGES-NOJOSA. D.M.; LUNA, K.P.; ZINGALI, R.B.; CORRÊA-NETTO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; SANZ, L.; CALVETE, J.J.; PLA, D. Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. **J Proteomics**. V. 30(114):93-114. 2015. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.11.011.

KATERYNA KON. Bactéria *Acinetobacter baumannii*. Disponível em: <https://br.123rf.com/photo_71335623_bact%C3%A9ria-acinetobacter-baumannii-multirresistente-bact%C3%A9ria-hospitalar-ilustra%C3%A7%C3%A3o-3d-mostra-a-morfolo.html> Acessado em: 14 de agosto de 2019.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**. V.27(6):613-635. 1989. DOI: 10.1016/0041-0101(89)90013-5.

KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**. V. 42 (8):827-840. 2003. DOI: 10.1016/j.toxicon.2003.11.002.

LIVERMORE, D.M. Minimising antibiotic resistance. **Lancet Infect Dis.** V.10: 18-22. 2005. DOI: 10.1016/S1473-3099(05)70166-3.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. **Biofilms. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 2, p. 1-11, fev. 2010.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A.T.; HERDEIRO, M.T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública.** V. 34: 77-84.2016. DOI: 10.1016/j.rpsp.2015.11.003.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock.** 14. ed., Porto Alegre: Artmed, 2016.

MENALDO, D.L.; JACOB-FERREIRA, A.L.; BERNARDES, C.P.; CINTRA, A.C.O.; SAMPAIO, S.V. Purification procedure for the isolation of a P-I metalloprotease and an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops atrox* snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.** V. 21 (28). 2015. DOI: 10.1186/s40409-015-0027-6.

MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J.M.; SOARES, A.M.; ZAMUNÉR, R.; PURGATTO, E.; TEIXEIRA, C.F.P. Secretory phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* and from *Crotalus durissus terrificus* snake venoms induce distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins E₂ and D₂ and expression of cyclooxygenases. **Toxicon.** v, 52: 428-439. 2008. DOI: 10.1016/j.toxicon.2008.06.012.

MOREIRA, V.; DE CASTRO SOUTO, P.C.; RAMIREZ VINOLO, M.A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CURI, R.; TEIXEIRA, C. A catalytically-inactive snake venom Lys49 phospholipase A₂ homolog induces expression of cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins through selected signaling pathways in macrophages. **Eur J Pharmacol.** V. 708(1-3):68-79. 2013.DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.01.061.

MONTECUCCO, C. O.; ROSSETTO, O.; CACCIN, P.; RIGONI, M.; CARLI, L.; MORBIATO, L.; MURARO, L.; PAOLI, M. Different mechanisms of inhibition of nerve terminals by botulinum and snake presynaptic neurotoxins. **Toxicon.** v. 54 (5): 561-4; 2009.DOI: 10.1016/j.toxicon.2008.12.012.

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. R. Thrombin-like and Factor X- Activator componets of *Bothrops* snake venoms. **Thrombosis and Haemostasis**, Vol. 41. 1979.

National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) emergiu muito antes da introdução da meticilina nas práticas clínicas.

Disponível em: < <https://socientifica.com.br/2017/07/27/staphylococcus-aureus-resistente-meticilina-mrsa-emergiu-muito-antes-da-introducao-da-meticilina-nas-praticas-clinicas/>>. Acessado em: 14 de agosto de 2019.

NERY, N.M.; LUNA, K.P.O.; FERNANDES, C.F.C.; ZULIANI, J.P. An overview of *Bothrops erythromelas* venom. **Rev Soc Bras Med Trop**. V. 49(6): 680-686. 2016. DOI:10.1590/0037-8682-0195-2016.

NEVALAINEN, T. J.; GRAHAM, G. G.; SCOTT, K. F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A₂. Review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, Amsterdam. v. 1781 (1-2): 1-9. 2008. DOI: 10.1016/j.bbalip.2007.12.001.

NORDMANN P, GIRLICH D, POIREL L. Detection of carbapenemase producers in Enterobacteriaceae by use of a novel screening medium. **J Clin Microbiol**. V.50(8): 2761–2766. 2012. DOI: 10.1128/JCM.06477-11.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA D.F.; PICCOLI, R.H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 69(3):277-84. 2010.

OPAS- Organização Pan-americana de saúde. Novos dados revelam níveis elevados de Resistência aos antibióticos em todo o mundo. Disponível em: < https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5592:novos-dados-revelam-niveis-elevados-de-resistencia-aos-antibioticos-em-todo-o-mundo&Itemid=812>. Acessado em 11 de junho de 2019.

Parede Celular bacteriana. Disponível em:< <https://www.editorasanar.com.br/blog/penicilinas-artigo-farmacia-tudo-que-voce-precisa-saber>> Acessado em: 14 de agosto de 2019.

PEREANEZ, J.A.; QUINTANA, J.C.; ALARCÓN, J.C.; NÚÑEZ, V. Isolation and functional characterization of a basic phospholipase A₂ from colombian *Bothrops asper* venom. **Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**. V. 21 (1): 38-48. 2014.

QUACH, N.D.; ARNOLD, R.D.; CUMMINGS, B.S. Secretory Phospholipase A₂ Enzymes as Pharmacological Targets for Treatment of Disease. **Biochem Pharmacol**. V. 90(4): 338–348. 2014. DOI:10.1016/j.bcp.2014.05.022.

RABIN, N.; ZHENG, Y.; OPOKU-TEMENG, C.; DU, Y.; BONSU, E.; SINTIM, H.O. Biofilm formation mechanisms and targests for developing antibiofim agents. **Future Med Chem**. v.4. 2015, 493-512. DOI: 10.4155/fmc.15.6.

RASMUSSEN, T.B.; GIVSKOV, M. *Quorum-sensing* inhibitors as anti-pathogenic drugs. **Int. J. Med. Microbiol.** 296(23), 2006, 149–161. DOI: 10.1016/j.ijmm.2006.02.005.

RENNER, L.D.; WEIBEL, D.B. Physicochemical regulation of biofilm formation. **MRS Bull.** 36(5), 347–355, 2011. DOI: 10.1557/mrs.2011.65.

Reptéis da Caatinga. Available in: <
https://instagram.com/repteis_da_caatinga?igshid=4bk1q4aptvgn> Accessed in: 08.14.2019.

SAMY, R.P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; CHOW, V.T.K.; HO, B. Viper metalloproteinase (*Agkistrodon halys pallas*) with antimicrobial activity against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of cellular physiology, Philadelphia**, v. 216(1):54-68. 2008. DOI:10.1002/jcp.21373.

SANTOS, L.D.; PIERONI, M.; MENEGASSO, A.R.S.; PINTO, J.R.A.S.; PALMA, M.S. A new scenario of bioprospecting of *Hymenoptera* venoms through proteomic approach. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.** V. 17 (3): 249-63. 2011. DOI: 10.1590/S1678-91992011000300004.

SCHALOSKE, R. H., & DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**. 1761(11):1246-59. 2006. DOI: 10.1016/j.bbalip.2006.07.011.

SCOTT, D.L., WHITE, S.P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M.H.; SINGLER, P.B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. **Science**. V.250: 1541-1546. 1990. DOI: 10.1126/science.2274785.

SOARES, A.; FONTES, M.; GIGLIO, J. Phospholipase A₂ Myotoxins from *Bothrops* Snake Venoms: Structure- Function Relationship. **Curr. Org. Chem.** V. 8: 1677-1690. 2004. DOI: 10.2174/1385272043369610.

TAN, S. Y.; TATSUMURA, Y. Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. **Singapore Med J**, V. 56(7):366-7.2015. DOI: 10.11622/smedj.2015105.

TEIXEIRA, C.F.; LANDUCCI, E.C.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**. v. 42(8):947-962. 2003. DOI: 10.1016/j.toxicon.2003.11.006.

TREMBLAY, D.N.; HATHROUBI, S.; JACQUES, M. Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 78:110-116. 2014. Disponível em: < <https://know.net/ciencterravida/biologia/biofilme/> >. Acessado em: 14 de agosto de 2019.

TRENTIN, D.; GIORDANI, R.; MACEDO, ALEXANDRE. (2013). Biofilmes bacterianos patogênicos: Aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**. DOI: 14. 213. 10.31514/rliberato.2013v14n22.p213.

VINDAS, J. CARRERA, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; FERNÁNDEZ, J. A novel pentameric phospholipase A₂ myotoxin (PophPLA₂) from the venom of the pit viper *Porthidium ophryomegas*. **Int J Biol Macromol**. V.118, Part A: 1-8. 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.028.

WEST, S.A.; WINZER, K.; GARDNER, A.; DIGGLE, S.P. *Quorum sensing* and the confusion about diffusion. **Trends Microbiol**. 20(12): 586–594. 2012. DOI: 10.1016/j.tim.2012.09.004.

World Health Organization. Containing antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland: WHO; 2019. Disponível em: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>. Acessado em: 23 de junho de 2019.

ZULIANI JP, FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, S.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**. V. 45(3):335-346. 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.11.004.

ANEXOS



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A883C5B

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A883C5B**
Usuário: **karla patricia de oliveira luna**
CPF/CNPJ: **832.834.394-00**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso:
 Pesquisa Científica **Bioprospecção** **Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Bothrops erythromelas

Título da Atividade: **pesquisa com venenos animais**

Equipe

karla patricia de oliveira luna	Universidade Estadual da Paraíba
betsy dantas medeiros	universidade estadual da paraíba
renner de souza leite	universidade federal de campina grande

Parceiras Nacionais

30.432.505/0001-96 / Museu Vivo Répteis da Caatinga

Data do Cadastro: **13/11/2018 11:21:00**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **16:20** de **10/09/2019**.



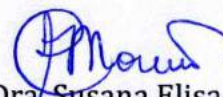
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Bioprospecção nos biomas Pantanal e Cerrado de peptídeos sintéticos de toxinas inibidoras de bactérias formadoras de biofilme**”, registrada com o nº **014/2018**, sob a responsabilidade de Ludovico Migliolo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Católica Dom Bosco em reunião de 14/12/2018.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	14/12/2018 - 14/12/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico/ Swiss
Nº de animais	48
Peso/Idade	Até 22g/4 a 6 semanas
Sexo	Machos/Fêmeas
Origem	Biotério Central - UCDB

Campo Grande, 18 de dezembro de 2018.



Prof. Dra. Susana Elisa Moreno
Coordenadora da CEUA /UCDB

Prof. Dra. Susana E. Moreno
Presidente do CEUA - UCDB