

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDO COMPARATIVO DAS TOXINAS TERMOESTÁVEIS
PRESENTES NAS PEÇONHAS DE ALGUMAS SERPENTES
BRASILEIRAS E ABELHAS AFRICANIZADAS.

LUIZ FERNANDO MOREIRA IZIDORO

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Dezembro / 1997.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDO COMPARATIVO DAS TOXINAS TERMOESTÁVEIS
PRESENTES
NAS PEÇONHAS DE ALGUMAS SERPENTES BRASILEIRAS E
ABELHAS AFRICANIZADAS

LUIZ FERNANDO MOREIRA IZIDORO

PROF(a) Dr (a) MARIA INÊS HOMSI BRANDEBURGO

Monografia apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas do Curso de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Uberlândia.

Uberlândia – MG
Dezembro / 1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDO COMPARATIVO DAS TOXINAS TERMESTÁVEIS
PRESENTES NAS PEÇONHAS DE ALGUMAS SERPENTES
BRASILEIRAS E ABELHAS AFRICANIZADAS

LUIZ FERNANDO MOREIRA IZIDORO

Aprovado pela Comissão Examinadora em 09/12/97, média 6,00.

Prof(a) Dr(a) Maria Inês Homsí Brandeburgo
Orientadora

Prof(a) Dr(a) Amélia Hamaguchi
1ª Conselheira

Prof(a) Ms(a) Veridiana de Melo Rodrigues
2ª Conselheira

Amélia E. Hamaguchi
Coordenação do curso

Uberlândia, 09 de dezembro de 1997.

Dedico este trabalho à memória de meu irmão PAULO e para minha mãe JANDIRA que sempre me estendeu a mãos nos momentos mais difíceis que enfrentei, e foram muitos.

Agradeço a todas aquelas pessoas que contribuíram de uma forma ou de outra para que eu cumprisse mais esta etapa da minha vida.

Agradeço também a todos os companheiros de repúblicas por onde morei, pela compreensão nos momentos de falta de paciência.

Agradeço à Maria Inês por me orientar de uma maneira sabia e paciente, muitas vezes inconscientemente fez com que eu voltasse a enxergar algum horizonte.

Agradeço aos amigos pela boa convivência e favores prestados, a MARCINHA e a VERI poucas palavras não são suficientes para agradecer-las. Foram pessoas que me passaram o melhor dos seus conhecimentos, dando sempre ótimos conselhos; infelizmente o nosso ciclo de permanência juntos está chegando ao fim, pois cada uma está tomando seu rumo. EU, já sinto saudades.

Não posso esquecer da professora Amélia sempre disposta a me ajudar, sem falar das piadinhas em relação ao meu novo nariz.

Dizem que de algumas pessoas a gente gosta mais, não sei se isso é verdade, mas comigo isso aconteceu. Você é meu amigo sem visar lucros, muito pelo contrário. Eu não poderia deixar de te agradecer por tantos favores, tantas caronas e tantas mais. Agradeço à DEUS por ser teu amigo e gosto de sê-lo.

OBRIGADO RANIÉRE

Agradeço ao pessoal da minha turma, a Alê, a Ioná, a Didi,

Agradeço aos demais familiares pela ajuda incansável.

À DEUS eu digo APENAS obrigado meu senhor.

SUMÁRIO

1.0 – INTRODUÇÃO	01
2.0 – OBJETIVO	06
3.0 – MATERIAIS	07
4.0 – MÉTODOS	08
4.1 – OBTENÇÃO DO VENENO	08
4.2 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	08
4.3 – DOSAGEM QUANTITATIVA DE PROTEÍNAS	09
4.4 – ATIVIDADES ENZIMÁTICAS “IN VITRO”	09
4.4.1 – ATIVIDADE COAGULANTE	09
4.4.2 – ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA (PLA2)	10
4.5 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	10
4.5.1 – EM CONDIÇÕES DESNATURANTES	10
4.6 – REVELAÇÃO E SECAGEM DOS GEIS	11

5.0 – RESULTADOS	12
5.1 – ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA	12
5.2 – ATIVIDADE COAGULANTE	19
5.3 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	24
6.0 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	30
7.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

RESUMO

Serpentes constituem um grupo de répteis que se divide em peçonhentos e não peçonhentos a partir da capacidade de inocular sua secreção tóxica de maneira ativa. As serpentes estão compreendidas em quatro famílias principais, sendo que as de principais interesses para este trabalho estão compreendidas nos gêneros *Bothrops*, *Lachesis*. Como os venenos são constituídos de uma complexa mistura de proteínas, que podem atuar sozinhas ou simultaneamente com outras, apresentam efeitos diversos onde se destacam a hemorragia, necrose, e coagulação sanguínea. Também os acidentes botrópicos são similares a acidentes laquéticos quanto a efeitos locais ou sistêmicos. Por outro lado acidentes com abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) causam no local da picada apenas um discreto inchaço, vermelhidão e uma desconfortável dor, caso a vítima não seja sensível ao veneno. O quadro clínico de pessoas sensíveis evoluirá para edema de glote, choque anafilático e morte.

A estabilidade das toxinas em relação a duas atividades enzimáticas relevantes das peçonhas, foi analisada em três diferentes pHs (ácido, neutro e alcalino) e em duas temperaturas (ambiente de aproximadamente 28 graus celsius e após aquecimento a 100 graus celsius)

Um dos principais efeitos das peçonhas de serpentes botrópicas e laquéticas é a sua ação coagulante. Estes venenos apresentam várias toxinas que atuam em locais diferentes sobre a cascata de coagulação sanguínea, sendo as enzimas com ação "thrombin-like", isto é, com capacidade de atuar diretamente sobre o fibrinogênio, transformando-o em fibrina, as mais expressivas.

A análise da ação coagulante sobre o plasma bovino nas cinco peçonhas estudadas, mostrou que esta atividade foi sempre maior para a peçonha de *Lachesis* em qualquer condição de temperatura e pH estudados, e não estava presente na peçonha de abelhas africanizadas. Das 3 peçonhas botrópicas estudadas (*jararaca*, *alternatus newwiedi*) a de *B. alternatus* mostrou menor atividade coagulante, que foi significativa somente em pH 7.0 sem aquecimento e representou cerca de 48% da atividade coagulante de *Lachesis muta* nas mesmas condições. A peçonha de *B. jararaca* interessantemente mostrou melhor atividade em pH 3.5 sem aquecimento, enquanto *B. newwiedi* foi mais ativa quando tratada em pH neutro e temperatura ambiente.

Por outro lado muitos dos efeitos lesivos causados por peçonhas animais, tais como miotoxicidade, formação de edema, neurotoxicidade e citotoxicidade, estão diretamente relacionados com a enzima fosfolipase A2 (PLA2), que geralmente é expressa em diversas isoformas num mesmo veneno. Esta atividade enzimática foi determinada por titulação potenciométrica em pH 8.0 inicial, usando-se como substrato a gema do

ovo que é rica em fosfolipídeo. Das cinco peçonhas estudadas, a de *Apis mellifera* foi a mais ativa em todas as condições analisadas, tendo apresentado a maior atividade em pH 9.0 sem aquecimento. Dentre os venenos de serpentes o mais ativo foi o de *Lachesis muta*, cuja atividade foi bastante significativa e próxima nos três pHs analisados sem aquecimento, após aquecimento a 100 graus celsius perdeu 40% da atividade em pH 7.0 e foi totalmente inativado em pH 9.0. Das três peçonhas botrópicas, a de *neuwiedi* foi a mais ativa quando tratada em pH 7.0 e temperatura ambiente. Já a de *alternatus* foi menos ativa, apresentando os melhores resultados nas mesmas condições que a de *neuwiedi*. Enquanto a de *jararaca* mostrou melhor atividade em pH 3.5 sem aquecimento.

Embora tenham sido observadas variações significativas nestas duas atividades para uma mesma peçonha quanto ao pH e temperatura estabelecidos, em geral pH 7.0 e temperatura ambiente representam as melhores condições para ambas atividades analisadas. Foram exceções a peçonha de *B. jararaca* que foi sempre mais ativa em pH 3.5 sem aquecimento e a de abelhas quanto à atividade PLA2, que foi mais elevada em pH 9.0 também sem aquecimento.

ABREVIATÓES USADAS

HCl – Ácido clorídrico

NaOH – Hidróxido de sódio

TRIS – Tris (hidroximetil) aminometano

EDTA – Ácido etilnodiaminotetracético

SDS – Dodecil sulfato de sódio

NaCl – Cloreto de sódio

TEMED – N, N, N', N' tetrametiletilenodiamina

FoNH₄ – Formato de amônio

Bis-acril N, N' – Metileno – bis acrilamida

PM – Peso molecular

USP – Universidade de São Paulo

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

STOP – Tampão da amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

BSA – Soroalbumina bovina

PLA₂ – Fosfolipase A₂ (EC 3.1.1.4)

V.B. – Veneno bruto

PSA – Persulfato de amônio

Dedico este trabalho à memória de meu irmão PAULO e para minha mãe JANDIRA que sempre me estendeu a mãos nos momentos mais difíceis que enfrentei, e foram muitos.

Agradeço a todas aquelas pessoas que contribuíram de uma forma ou de outra para que eu cumprisse mais esta etapa da minha vida.

Agradeço também a todos os companheiros de repúblicas por onde morei, pela compreensão nos momentos de falta de paciência.

Agradeço à Maria Inês por me orientar de uma maneira sabia e paciente, muitas vezes inconscientemente fez com que eu voltasse a enxergar algum horizonte.

Agradeço aos amigos pela boa convivência e favores prestados, a MARCINHA e a VERI poucas palavras não são suficientes para agradecer-las. Foram pessoas que me passaram o melhor dos seus conhecimentos, dando sempre ótimos conselhos; infelizmente o nosso ciclo de permanência juntos está chegando ao fim, pois cada uma está tomando seu rumo. EU, já sinto saudades.

Não posso esquecer da professora Amélia sempre disposta a me ajudar, sem falar das piadinhas em relação ao meu novo nariz.

Dizem que de algumas pessoas a gente gosta mais, não sei se isso é verdade, mas comigo isso aconteceu. Você é meu amigo sem visar lucros, muito pelo contrário. Eu não poderia deixar de te agradecer por tantos favores, tantas caronas e tantas mais. Agradeço à DEUS por ser teu amigo e gosto de sê-lo.

OBRIGADO RANIÉRE

Agradeço ao pessoal da minha turma, a Alê, a Ioná, a Didi,

Agradeço aos demais familiares pela ajuda incansável.

À DEUS eu digo APENAS obrigado meu senhor.

1.0 - INTRODUÇÃO

As serpentes constituem um grupo de répteis caracterizados por apresentarem um corpo longo e flexível, sem patas e com musculatura favorável à deglutição de grandes presas, em relação ao seu tamanho. São ainda desprovidas de cintura escapular, pálpebras móveis, tímpano e abertura externa do ouvido (BARRAVIERA, 1994).

Evolutivamente os fósseis mais antigos reconhecidos não revelam a origem das mesmas; sabe-se que foram encontradas no cretáceo superior, sendo a maioria proveniente do continente Gondwânico, incluindo Madagascar, África e América do Sul.

São consideradas serpentes peçonhentas aquelas que produzem e inoculam toxina de maneira ativa. Apresentam dentes ocos, parecidos com agulha de injeção, por onde passa o veneno no momento da picada (FEDERSONI et al, 1991).

Segundo BARRAVIERA (1994), as principais serpentes peçonhentas estão compreendidas em quatro famílias: Viperidae (sem representantes nas Américas) Hydrophidae (serpentes marinhas), Elapidae (corais) e Crotalidae (onde estão enquadrados os gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus* que ocorrem no Brasil). Todas estas serpentes apresentam um par de dentes especializados nos dois ossos maxilares, os quais conduzem o veneno que é usado para matar a sua presa, iniciar a digestão da mesma e também como defesa contra predadores. É válido lembrar que serpentes não peçonhentas são desprovidas de dente especializada para inocular o veneno, valendo-se deste para digerir as suas presas.

Estas serpentes estão distribuídas em nosso país de acordo com cada gênero: o gênero *Bothrops* ocorre em ampla distribuição nacional, já o gênero *Crotalus* está restrito a áreas do norte e centro-oeste do país, o gênero *Lachesis*

está praticamente reduzido ao norte do país, enquanto o gênero *Micrurus* aparece em todo território.

Dentre os acidentes causados por animais peçonhentos no Brasil destacam-se os provenientes de serpentes do gênero *Bothrops* e abelhas do gênero *Apis mellifera*. O gênero botrópico é responsável por 80% a 90% dos acidentes ofídicos, sendo que seus representantes habitam preferencialmente ambientes úmidos, onde há proliferação de roedores. Existe uma estreita relação entre o número de óbitos e o tempo decorrido desde a hora do acidente e o atendimento médico. Os acidentes tornam-se fatais na maioria das vezes quando são decorridos 6 horas após o acidente. A sucção no local da picada pode retirar parte do veneno inoculado sendo que este procedimento é eficaz até 30 minutos após o acidente, passado este tempo o veneno já se difundiu por entre os tecidos (BARRAVIERA, 1994).

Não é indicado fazer sangrias locais, estas podem acelerar o processo necrosante local, devido às enzimas proteolíticas presentes no veneno. É aconselhável que a vítima mantenha-se em repouso absoluto, e se possível submeter o local atingido a banhos com soluções antissépticas, como permanganato de potássio (BARRAVIERA, 1994).

Acidentes botrópicos são caracterizados por apresentar alterações locais como formação de edema, necrose tecidual local e hemorragia devido ao rompimento de capilares. As alterações sistêmicas mais comuns envolvem ações sobre o sistema sangüíneo, sendo que as hemorragias em nível de pulmões cérebro e rins são provocadas por hemorraginas que agem sobre as paredes dos capilares comprometendo a integridade física das mesmas que, posteriormente, irão se romper e liberar um grande número de células sangüíneas.

O edema instalado minutos após a picada está relacionado com a lesão do endotélio celular que evoluirá para o extravasamento do conteúdo intracelular.

Todas as hemorraginas já isoladas dos venenos botrópicos são metaloenzimas de ação proteolítica altamente específica em relação ao substrato. Existem também nas peçonhas de serpentes da família crotalidae muitas metaloproteases com ampla especificidade ao substrato, mas que não induzem hemorragia.

Dentre os acidentes botrópicos o de jararacuçu atua diferentemente de outros venenos, pois as lesões são precocemente observadas, sendo mais ativa a mionecrose, estando relacionada com o desaparecimento da estrutura do sarcômero e das miofibrilas e também dilatação do retículo sarcoplasmático. As principais toxinas deste veneno são duas miotoxinas designadas por BthTx - I e BthTx - II, que apresentam estrutura de fosfolipase A₂ e representam 24% do total de proteínas do veneno (HOMSI - BRANDEBURGO, 1987).

Sintomaticamente, acidentes laquéticos são muito parecidos com os botrópicos, chegando a causar confusão em regiões onde ocorrem os 2 gêneros, mas acidentes laquéticos são pouco freqüentes, provavelmente devido ao

pequeno número de representantes deste gênero restrito a uma única espécie e duas subespécies; *Lachesis muta muta* e *Lachesis muta noctivaga*.

Estas serpentes recebem nomes populares de surucutinga, surucucu de fogo e surucucu pico de jaca, apresentam grande tamanho e chegam a secretar 4 ml de veneno líquido, equivalente a quase 1 grama de veneno seco. A fim de se evitar confusões relacionadas com o reconhecimento do acidente, usa-se como tratamento o soro anti-laquétrico / botrópico (BARRAVIERA, 1994).

Segundo ARAGON et al (1989) foi isolada uma proteína do veneno de *Lachesis muta*, denominada "Lectin Like" com capacidade de aglutinar eritrócitos humanos. Proteínas semelhantes às lectinas são encontradas em larga escala em plantas, particularmente na família das leguminosas. No feijão encontramos a concanavalina A (Con A) uma das principais lectinas com especificidade obrigatória em se ligar e aglutinar células do sistema sangüíneo, reconhecendo resíduos de D-manose e D-glicose terminais (STUMPF et al, 1993).

Como os venenos são constituídos de uma complexa mistura de proteínas em proporções variadas de acordo com cada espécie, sua toxicidade depende da natureza e de como estão interagindo biologicamente os componentes, por isso alguns venenos são neurotóxicos, outros vasculotóxicos ou miotóxicos (BARRAVIERA, 1994).

Enzimas fosfolipases A2 (PLA2) podem ser encontradas sob as formas intracelular e extracelular, sendo responsáveis por catalisar a hidrólise da ligação 2 acil-éster dos fosfolipídeos, liberando ácidos graxos e lisofosfoglicerídeos. Atualmente têm sido isoladas em diversos tecidos, pâncreas, plaquetas, fluidos sinoviais e principalmente dos venenos de abelhas e serpentes (SELISTRE ARAÚJO et al, 1996)

Em geral a forma intracelular não apresenta toxicidade e é responsável por uma grande variedade de funções celulares vitais. Já a forma extracelular geralmente exerce funções tóxicas envolvendo agregação plaquetária, formação de edema, miotoxicidade, neurotoxicidade, atividade hemolítica, hemorrágica, citotóxica e inflamatória (ARNI et al, 1996).

DANIELLE et al (1997), caracterizaram duas fosfolipases A2 ácidas do veneno de *Bothrops neuwiedi* relacionadas com atividades farmacológicas como citotoxicidade.

A principal ação coagulante que as peçonhas das serpentes brasileiras dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* apresentam é devida à capacidade de transformar diretamente o fibrinogênio em fibrina, sendo conhecida como ação coagulante do tipo trombina. Este efeito resulta no consumo de todo o fibrinogênio presente no sangue da vítima que por esse motivo se torna incoagulável (SELISTRE ARAÚJO, 1995).

O veneno de *Apis mellifera* causa no local da picada um inchaço, vermelhidão e uma desconfortável dor, com aumento da temperatura local, considerando que a vítima seja acometida por uma ou poucas abelhas. Em

pessoas previamente sensibilizadas, a reação de hipersensibilidade é imediata, sendo que esta consequência está relacionada com a hialuronidase, uma enzima que atua severamente sobre o ácido hialurônico, um polímero viscoso com capacidade de manter a união entre as células teciduais. Ao sofrer a ação desta enzima, ele se desfaz em pequenos fragmentos não viscosos facilitando a penetração dos demais constituintes do veneno pelo organismo, devido ao surgimento de espaços intercelulares (OLIVEIRA, 1994)

Os dois principais componentes do veneno de abelha são a melitina que representa 40% a 50% e uma fosfolipase A2 compreendendo 10% a 12% do peso seco do veneno.

A melitina é composta por uma sequência de 26 resíduos de aminoácidos, sendo alguns altamente básicos e uma grande parte hidrofóbicos, embora exista também uma sequência hidrofílica próxima à região C-terminal. A melitina faz interações com lipídeos das membranas diminuindo a tensão superficial da água e facilitando a lise de células como eritrócitos, leucócitos e trombócitos. Causa ainda despolarização e contração dos músculos esqueléticos cardíacos, liberação de íons potássio e fosfatos orgânico e inorgânico dos músculos estriados (OWNBY et al, 1997).

Segundo BARNARD (1973), a reação alérgica também está relacionada com a fosfolipase A2 do veneno de abelhas que é muito mais ativa que as outras fosfolipases A2, encontradas em venenos de serpentes ou pâncreas de mamíferos (SHIPOLINI et al, 1971).

Segundo OWNBY et al (1997), a melitina e a fosfolipase A2 agem simultaneamente potencializando a ação fosfolipásica.

A fim de manter a conformação nativa e atividade biológica das proteínas é desejável que estas sejam trabalhadas em pHs constantes e temperatura abaixo de 25 °C. A estabilidade em relação ao pH e a temperatura é variável de proteína para proteína.

Enzimas apresentando alta atividade proteolítica foram isoladas do veneno de *Lachesis muta*, estas quando aquecidas a 45 °C por 10 minutos não perdem atividade, mas se o aquecimento for a 70 °C, esta enzima exercerá apenas 4% da atividade original (RODRIGUEZ - YARLENQUE, 1991).

HEREDIA et al (1982), afirmam que o veneno da serpente *Bothrops atrox* exerce uma excelente atividade de quebra de nucleotídeos na posição 5' quando dissolvidos em tampão Tris - HCl, com o pH variando entre 6,2 a 8,2; mas quando está em tampão Glicina - NaOH com pH \geq 8,6, esta torna-se muito mais ativa que nas condições anteriores, isto é atribuído à presença de íons magnésio que são ativadores enzimáticos.

Serpentes da família crotalidae e viperidae possuem enzimas fibrinogenolíticas, afetando diretamente a coagulação sanguínea; são nomeadas como TM1, TM2 e TM3 e clivam primeiramente as cadeias alfa e beta do fibrinogênio e fracamente a cadeia gama. A atividade fibrinogenolítica dessas enzimas não sofre mudanças significativas em pHs extremos, mas em

temperaturas acima de 65 °C ocorre desnaturação das enzimas (HUANG et al, 1993).

Segundo OUYANG et al (1978), a atividade PLA2 da peçonha de *Trimerisurus mucrosquamatus* é termolábil em pH 7,4 , mas em pH 5,6 torna-se termoestável.

Para se trabalhar corretamente com proteínas, é necessário portanto, investigar quais são as condições não desnaturantes, para preservar totalmente sua estrutura nativa e conseqüentemente suas funções biológicas.

2.0 – OBJETIVO

Comparar a estabilidade de algumas proteínas tóxicas encontradas nos venenos de serpentes brasileiras e abelhas africanizadas, em relação ao pH e temperatura.

3.0 – MATERIAIS

Os venenos foram cedidos pelo professor Dr José Roberto Giglio da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, já o veneno de abelhas foi coletado no apiário da própria UFU.

Foram usados: Acrilamida, Bis -acrilamida (N,N-metilenobisacrilamida), TEMED, (N,N,N,N tetrametiletilenodiamino), SDS, (dodecil sulfato de sódio), Coomassie Brilliant Blue R 250, EDTA, Soroalbumina bovina, Azul de bromo - fenol, beta mercaptoetanol, Persulfato de amônio.

Para a atividade coagulante o plasma citratado utilizado foi obtido de um animal saudável do hospital veterinário da UFU.

Os padrões para determinação dos pesos moleculares foram: fosforilase b (PM 97000), soroalbumina bovina (PM 67000), ovoalbumina (PM 43000), anidrase carbônica (PM 30000), inibidor de tripsina (PM 20100), alfa lactoalbumina (PM 14400) (Pharmacia)

Todos os demais reagentes usados eram de grau analítico.

4.0 – MÉTODOS

4.1 – OBTENÇÃO DO VENENO

Foram usados os venenos das seguintes serpentes: *Bothrops newviedi pauloensis*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops alternatus* e *Lachesis muta*.

O veneno de abelhas utilizado foi coletado seguindo uma metodologia inicialmente desenvolvida por BENTON e MORSE (1966), e posteriormente aprimorada por BRANDEBURGO (1992). O sistema consiste na instalação dentro da colméia, de uma armação de madeira sobre a qual fios de aço estão esticados em intervalos de 6mm; um controlador de tempo dispara uma descarga elétrica de 8 volts em intervalos intermitentes de 10 a 15 segundos.

As abelhas estimuladas por choque elétrico ferream uma película plástica ficando então depositado na superfície inferior da mesma o líquido, que cristaliza-se logo em seguida. Esta superfície plástica é raspada e o veneno armazenado em recipiente escuro a uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

4.2 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Cada peçonha foi trabalhada em 3 condições determinadas, em relação ao pH e 2 condições em relação à temperatura. Deste modo, no final da preparação

obtinha-se uma amostra aquecida e outra não aquecida, podendo estar dissolvida em tampão formato de amônio pH 3,5 ou em solução salina 0,9%, pH 7,0 ou em tampão bicarbonato de amônio pH 9,0.

Em temperatura ambiente foram pesados 2 mg de cada veneno dessecado e dissolvido em 0,1 ml do tampão desejado. Esta solução foi centrifugada a 480 g por 10 minutos, e o sobrenadante retirado e mantido em um recipiente fechado, sendo designado como veneno bruto (VB).

Ao precipitado foi adicionado novamente 0,1 ml do mesmo tampão, sendo centrifugado nas mesmas condições anteriores por mais 2 vezes de modo que o volume final era 0,3 ml de VB.

Feito este procedimento para todos os venenos nos 3 pHs, foram separadas alíquotas e metade delas submetidas a um aquecimento a 100 °C por 5 minutos, seguido de centrifugação e retirada do sobrenadante.

Afim de evitar perdas de atividade enzimática, a ação coagulante e a fosfolipásica dos 5 venenos foram analisadas no mesmo dia em que as amostras foram preparadas. A partir daí amostras aquecidas e não aquecidas foram mantidas a - 20 °C para posteriores ensaios eletroforéticos.

4.3 – DOSAGEM QUANTITATIVA DE PROTEINAS

Para os venenos de serpentes com amostras contendo 0,1 a 2,0 mg de proteína, o método utilizado foi o do microbiureto (ITZHAKI e GILL, 1964) e a absorbância foi lida a um comprimento de onda de 310 nm. Já para o veneno de abelhas com amostras contendo de 1 a 10 ug de proteína, o método utilizado foi o descrito por BRADFORD (1976), e a absorbância lida a um comprimento de onda de 595 nm. A reta padrão para cada ensaio foi construída com a soroalbumina bovina (BSA).

4.4 – ATIVIDADES ENZIMÁTICAS “IN VITRO”

4.4.1 – ATIVIDADE COAGULANTE

Foi realizada em presença de plasma bovino citratado conforme descrito por HOMSI BRANDEBURGO (1987), com as modificações seguintes. Para cada ensaio foram utilizados 100 μ l de plasma mantido em banho-maria a 37 °C. A este plasma foram adicionados 100 μ l de uma solução contendo 20 μ g de proteínas em salina (NaCl 0,9%).

A atividade coagulante foi determinada medindo-se o tempo de coagulação pelo imediato sinal de formação da rede de fibrina, após adicionar as amostras ou controle contendo somente solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) a 0,25 M.

4.4.2 – ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA (PLA₂)

Foi determinada por titulação potenciométrica segundo o método descrito por de HAAS et al (1968). Inicialmente foi preparada uma emulsão estoque contendo 1 gema de ovo em água desionizada, com volume final de 100 ml. Para cada 15 ml desta emulsão (substrato), foram adicionados 10 ml de deoxicolato de sódio a 0,03M e 1,0 ml de solução de cloreto de cálcio a 0,6M e o volume final foi completado para 100 ml com água desionizada.

Para cada ensaio foram utilizados 10 ml desta solução de trabalho e 10 μ g de proteína dosadas. A liberação enzimática de ácidos graxos foi titulada com NaOH a 0,1208 N. O resultado final da atividade foi calculado em U PLA₂/min/mg de base consumida.

4.5 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

4.5.1 – EM CONDIÇÕES DESNATURANTES

Realizada segundo descrito por LAEMMLI e LAVRE, (1973) com modificações para permitir a separação de proteínas de acordo com o peso molecular. Foi utilizado o padrão da Pharmacia com as respectivas proteínas: Fosforilase b PM 94000, Albumina PM 67000, Ovoalbumina PM 43000, Anidrase carbônica PM 30000, Inibidor de tripsina PM 20100, Alfa lactalbumina PM 14400.

O gel foi preparado a 15% conforme descrito abaixo:

SOLUÇÕES	GEL DE EMPILHAMENTO (ul)	GEL DE SEPARAÇÃO (ul)
Tris – HCl 2 M pH 6,8	250	-
Tris – HCl 2 M pH 8,8	-	2.350
Água desionizada	40	125
EDTA 200 mM	40	125
Acril –Bis (30 : 0,8)	650	6.250
Água desionizada	2.960	3.500
TEMED	5	15
PSA (10%)	35	75

Os tampões dos eletrodos superior e inferior foram preparados da seguinte maneira: uma solução contendo TRIS – HCl 0,1 M, EDTA 7,8 mM, SDS 0,3% e Glicina 0,77 M (só para o tampão do eletrodo superior).

Cada 5 ul de amostra contendo 20 ug de proteína foram adicionadas 2,5 ul de STOP (Solução de TRIS - HCl 0,1 M pH 8,8, Glicerol a 10,0 %, SDS a 6% e azul de bromofenol 0,1 %). A seguir adicionou-se β - mercaptoetanol a 10,0 % (v/v) e 5 ul de água desionizada. As amostras preparadas foram aquecidas em banho-maria a 100 °C por 2 minutos.

A corrida foi feita a uma corrente de 18 mA por aproximadamente 1h 30 min., sendo que o indicador foi o azul de bromofenol presente no STOP.

4.6 – REVELAÇÃO E SECAGEM DOS GÉIS

Após a corrida os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue – R 250 a 0,1% (p/v), dissolvido em metanol, água e ácido acético(3 : 6 : 1 v/v).

A seguir foram descorados em uma solução de água, etanol e ácido acético (6 : 3 : 1 v/v) e fixados em uma solução de ácido acético 7%. Posteriormente os géis foram prensados entre dois papéis celofane ligeiramente umedecidos em água e postos para secar à temperatura ambiente.

5.0 – RESULTADOS

5.1 – ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

Esta atividade foi realizada por titulação potenciométrica como descrito no item 3.4.2 e as amostras foram preparadas segundo o item 4.2 para as peçonhas das seguintes serpentes: *Lachesis muta*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops neuwiedi*, e *Apis mellifera*.

A Fig.1 mostra os resultados obtidos para a peçonha de *Lachesis muta*, onde se pode observar que esta enzima é bastante estável em todas as faixas de pH quando não aquecida, exceto em pH alcalino após aquecimento onde a inativação foi 100%.

A melhor condição de trabalho para a PLA2 de *Lachesis* foi obtida em pH 7,0 sem aquecimento. Pode-se observar no entanto que em pH ácido, embora a atividade seja ligeiramente menor que em pH neutro a enzima é preservada em relação ao aquecimento.

Os resultados da atividade fosfolipásica para o veneno de *Bothrops jararaca* apresentados na Fig.2 mostraram uma atividade razoavelmente preservada em todos os pHs sem aquecimento, mas é maior em pH ácido.

Após aquecimento, a enzima foi totalmente inativada nos pHs neutro e alcalino.

A Fig.3 por sua vez, mostra que as melhores condições para se trabalhar com o veneno de *Bothrops alternatus* é em pH 7,0 sem aquecimento. Por outro lado, o aquecimento em pH neutro ou alcalino inativou a enzima, como para o veneno de *Bothrops jararaca*.

As melhores condições para se trabalhar com o veneno de *Apis mellifera* estão indicadas na Fig.5, sendo que este veneno é mais ativo em pH 7,0 antes de

ser aquecido, apesar de que em nenhuma condição a enzima foi inativada. Apenas em pH 9.0 após aquecimento é que houve perda parcial da atividade. A atividade em pH ácido e neutro antes e após aquecimento foi bastante equivalente.

A Fig. 4 indica que o veneno de *Bothrops neuwiedi* apresenta as mesmas características que os demais venenos para todos os pHs , com exceção para *Lachesis* e *Apis mellifera*.

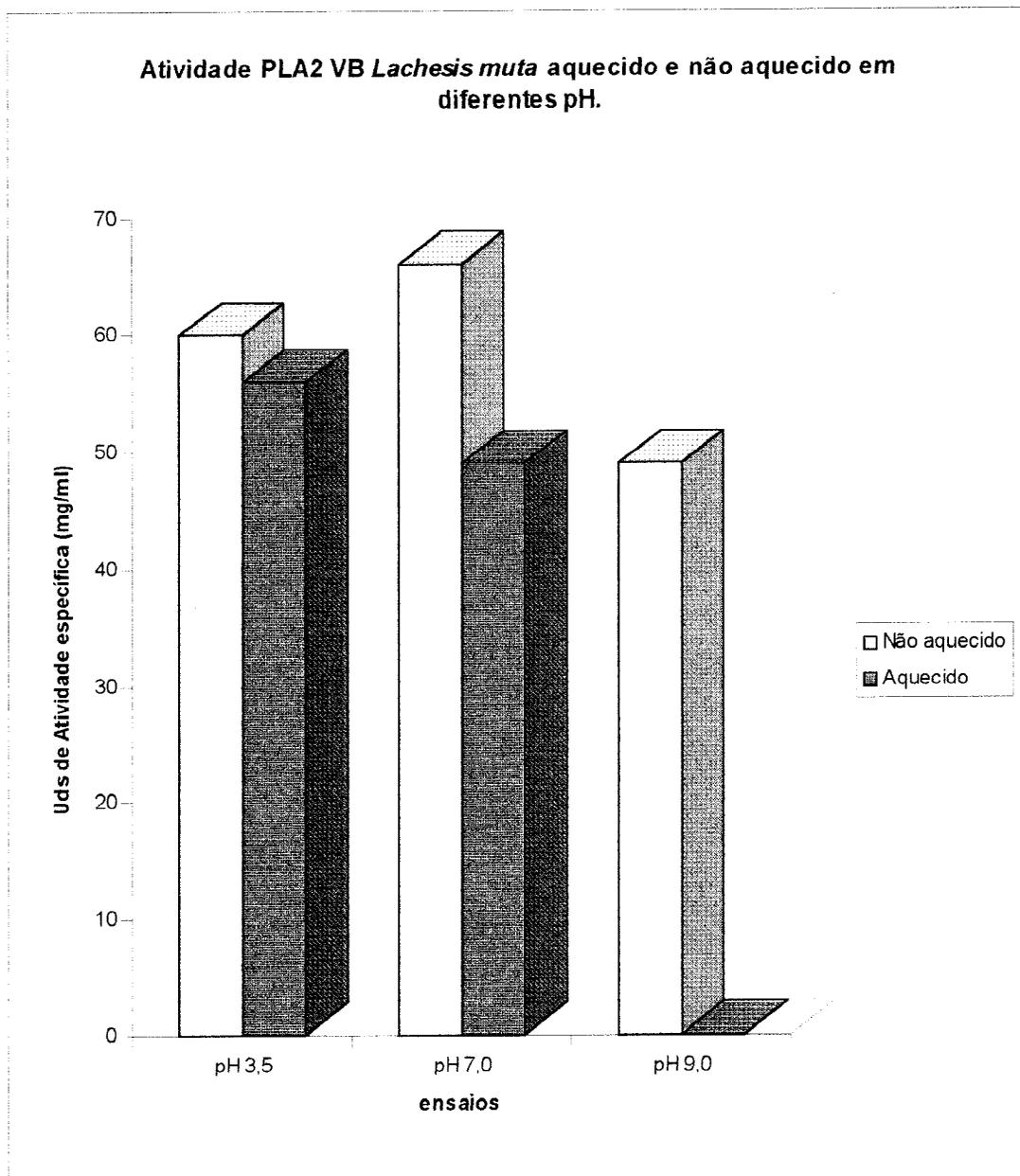


Fig. 1: Atividade fosfolipásica (PLA₂) específica do VB *Lachesis muta*, realizada sobre a gema de ovo com 10 μ g de proteína aquecidas ou não a 100°C e em diferentes pH. As amostras foram aplicadas no substrato de reação pH 8,0 e tituladas com NaOH durante 3,0 min. à temperatura ambiente. Estes resultados se referem à média de 3 ensaios.

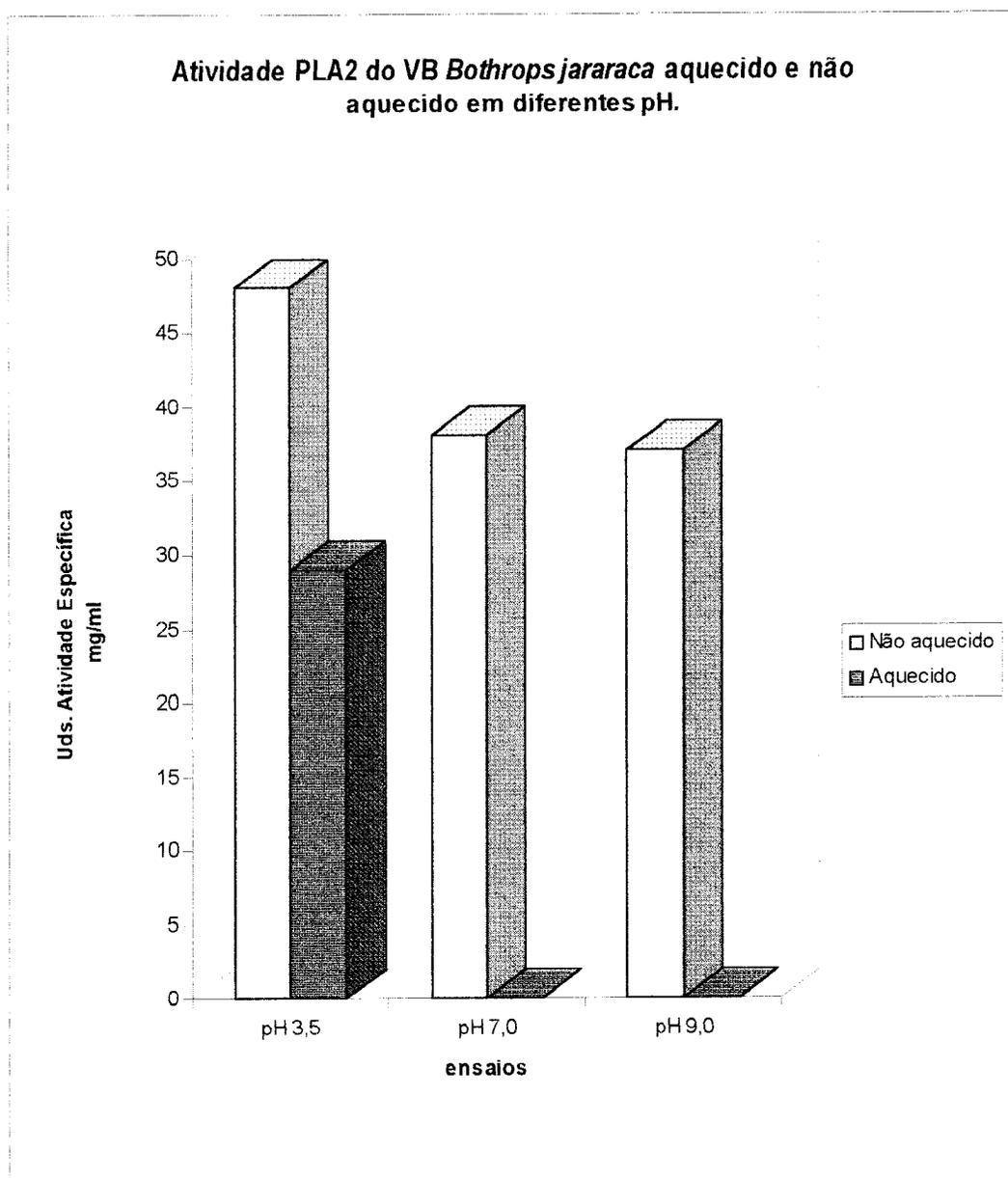


Fig. 2: Atividade fosfolipásica (PLA₂) específica do VB *Bothrops jararaca*, realizada sobre a gema de ovo com 10 μ g de proteína aquecidas ou não a 100°C e em diferentes pH. As amostras foram aplicadas no substrato de reação pH 8,0 e tituladas com NaOH durante 3,0 min. à temperatura ambiente. Estes resultados se referem à média de 3 ensaios.

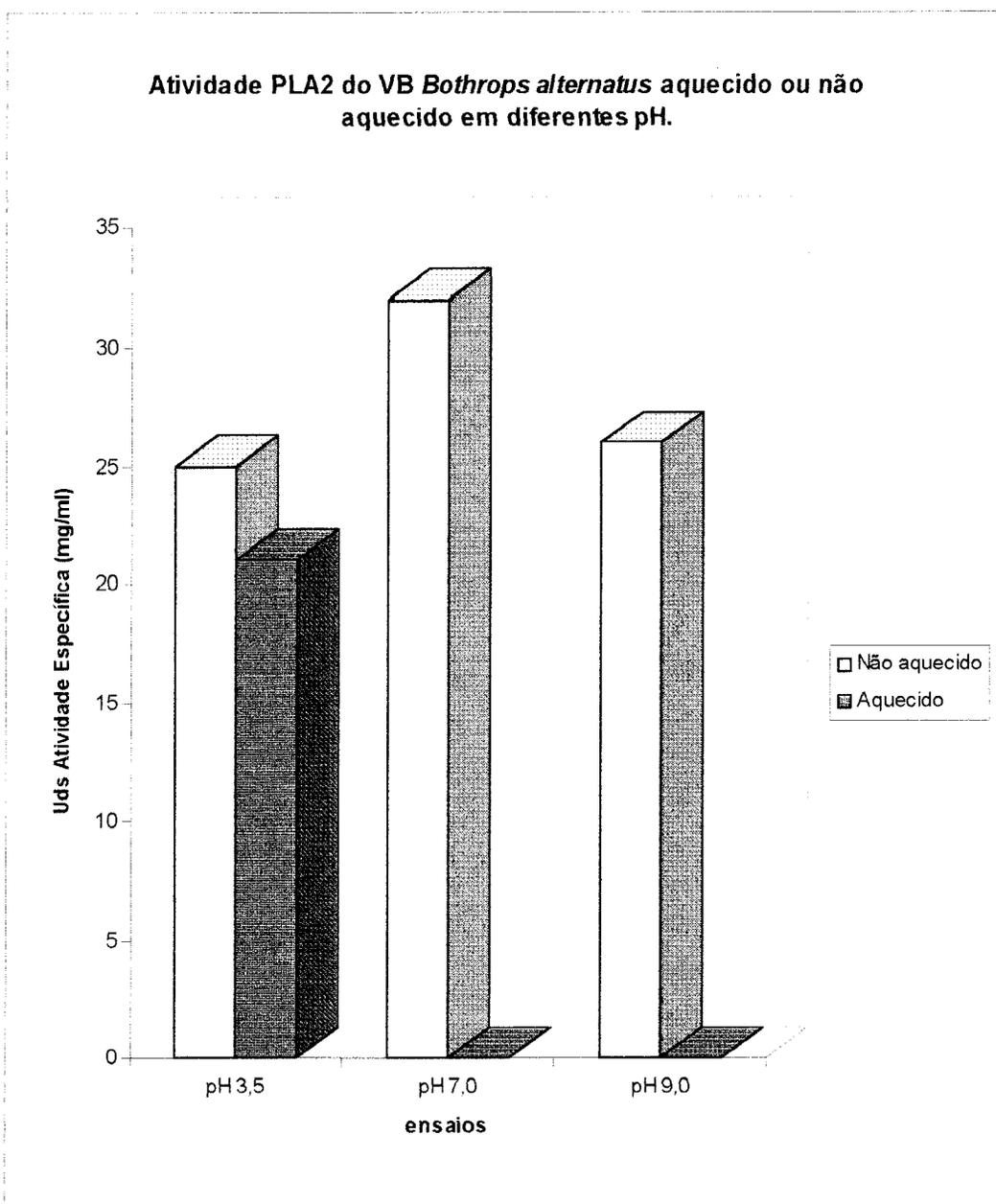


Fig. 3: Atividade fosfolipásica (PLA₂) específica do VB *Bothrops alternatus*, realizada sobre a gema de ovo com 10 μ g de proteína aquecidas ou não a 100°C e em diferentes pH. As amostras foram aplicadas no substrato de reação pH 8,0 e tituladas com NaOH durante 3,0 min. à temperatura ambiente. Estes resultados se referem à média de 3 ensaios.

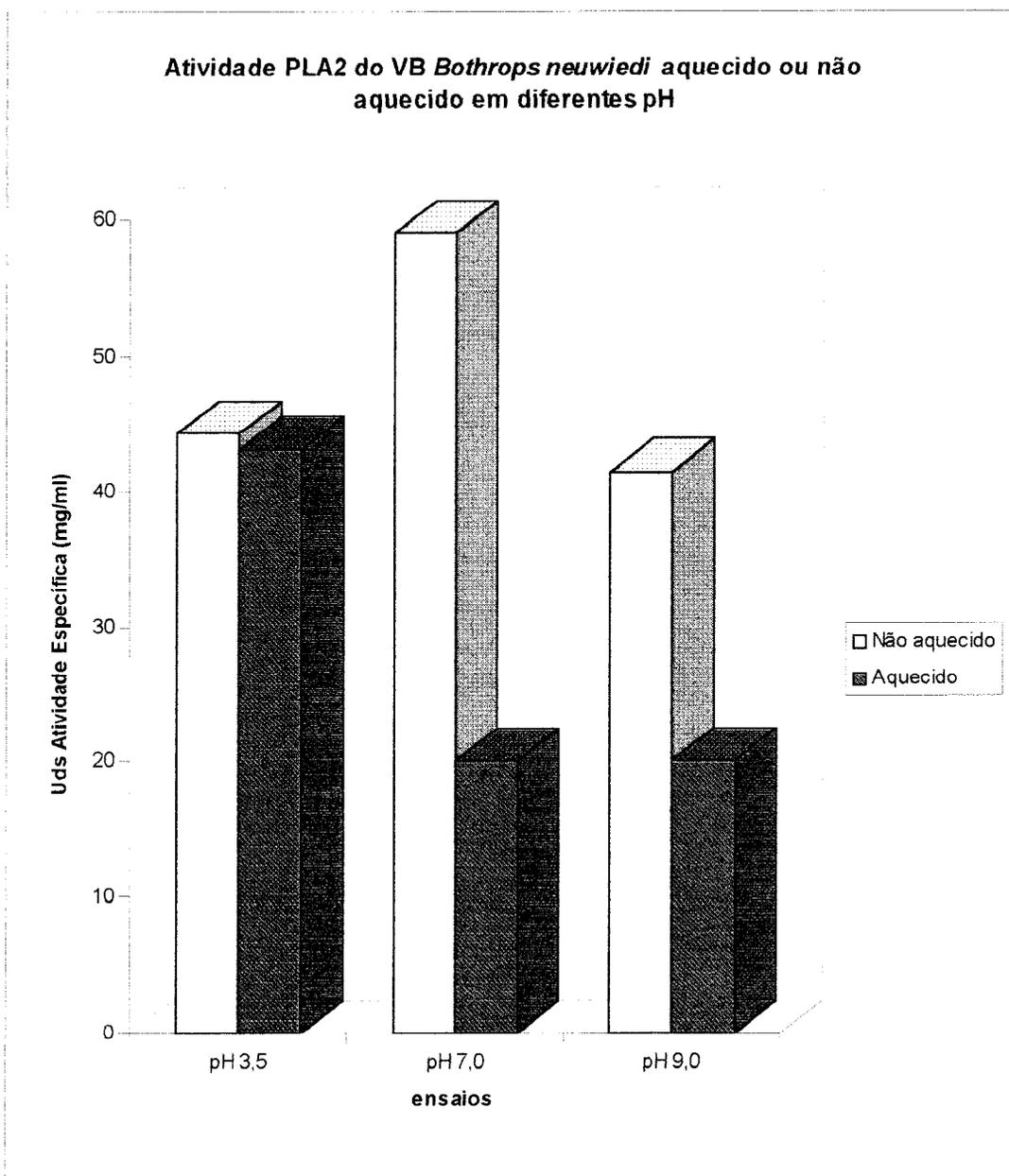


Fig. 4: Atividade fosfolipásica (PLA₂) específica do VB *Bothrops neuwiedi*, realizada sobre a gema de ovo com 10 μ g de proteína aquecidas ou não a 100°C e em diferentes pH. As amostras foram aplicadas no substrato de reação pH 8,0 e tituladas com NaOH durante 3,0 min. à temperatura ambiente. Estes resultados se referem à média de 3 ensaios.

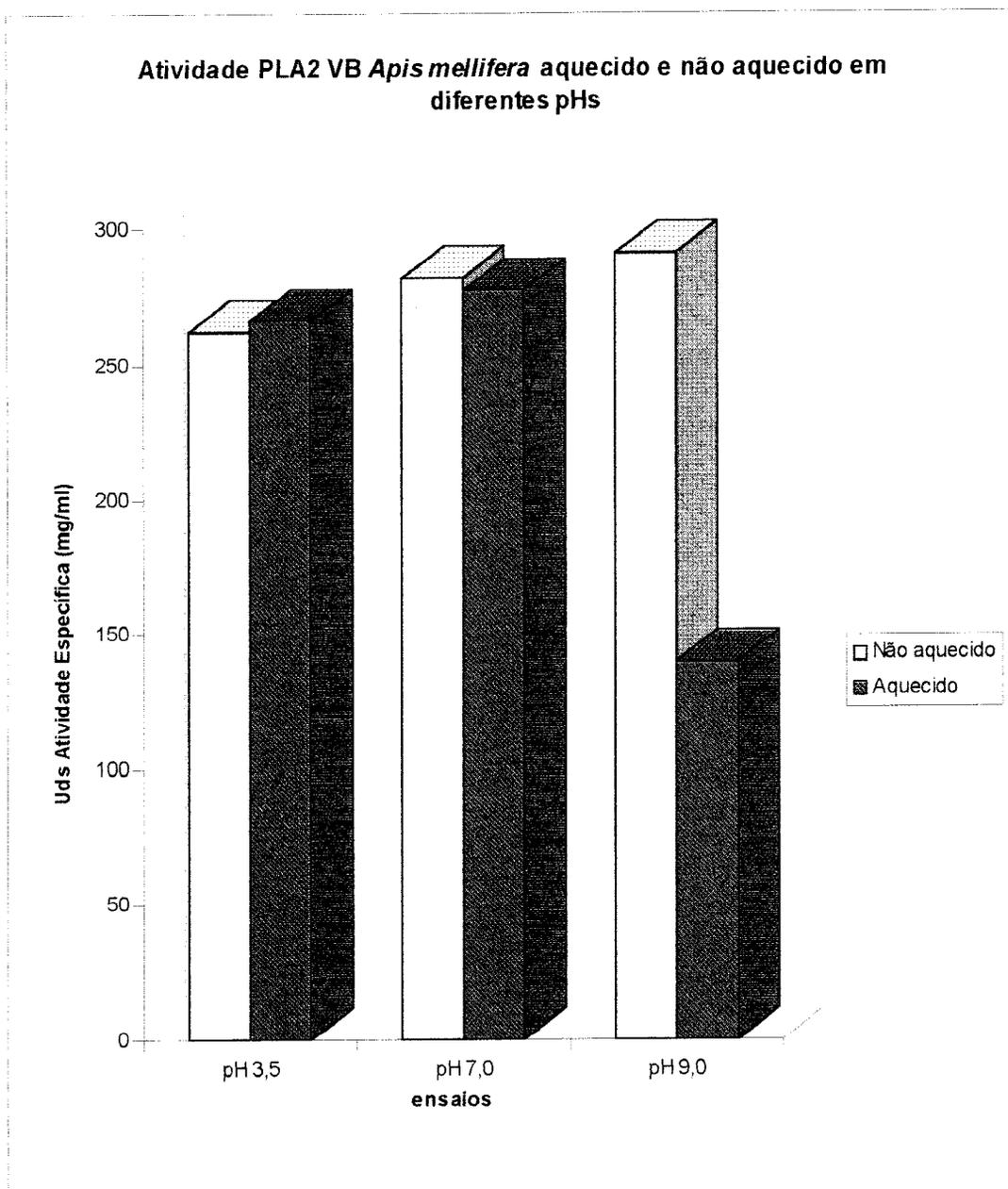


Fig. 5: Atividade fosfolipásica (PLA₂) específica do VB *Apis mellifera*, realizada sobre a gema de ovo com 10 μ g de proteína aquecidas ou não a 100°C e em diferentes pH. As amostras foram aplicadas no substrato de reação pH 8,0 e tituladas com NaOH durante 3,0 min. à temperatura ambiente. Estes resultados se referem à média de 3 ensaios.

5.2- ATIVIDADE COAGULANTE

A atividade coagulante foi realizada usando-se plasma bovino citratado como substrato conforme descrito no item 4.4.1 e a preparação das amostras de veneno foi feita como descrito em materiais e métodos.

Para o veneno de *Lachesis muta* os resultados obtidos estão mostrados na Fig.6 , onde se pode observar que esta atividade é mais elevada em pH ácido e ainda bastante expressiva em pH neutro, mesmo após o aquecimento.

Já em pH alcalino após aquecimento a enzima foi quase totalmente inativada.

A Fig.7 expressa os resultados de atividade coagulante para o veneno de *Bothrops jararaca*. Neste caso a maior atividade foi obtida em pH 3,5, enquanto em pH 7,0 a enzima manteve mais de 80% da sua atividade original e em pH 9,0 aproximadamente 30%. O aquecimento sempre inativa as enzimas.

A atividade coagulante para o veneno de *Bothrops alternatus* está representada na Fig. 8 . Os resultados obtidos mostram que esta peçonha só apresenta atividade significativa em pH 7,0 sem aquecimento.

Para o veneno de *Bothrops neuwiedi* a atividade está expressa na Fig. 9, tendo como melhor pH o neutro antes de ser aquecido. Após o aquecimento a atividade foi totalmente inativada em pH 7,0 e pH 9,0 , apenas em pH 3,5 a atividade foi preservada parcialmente.

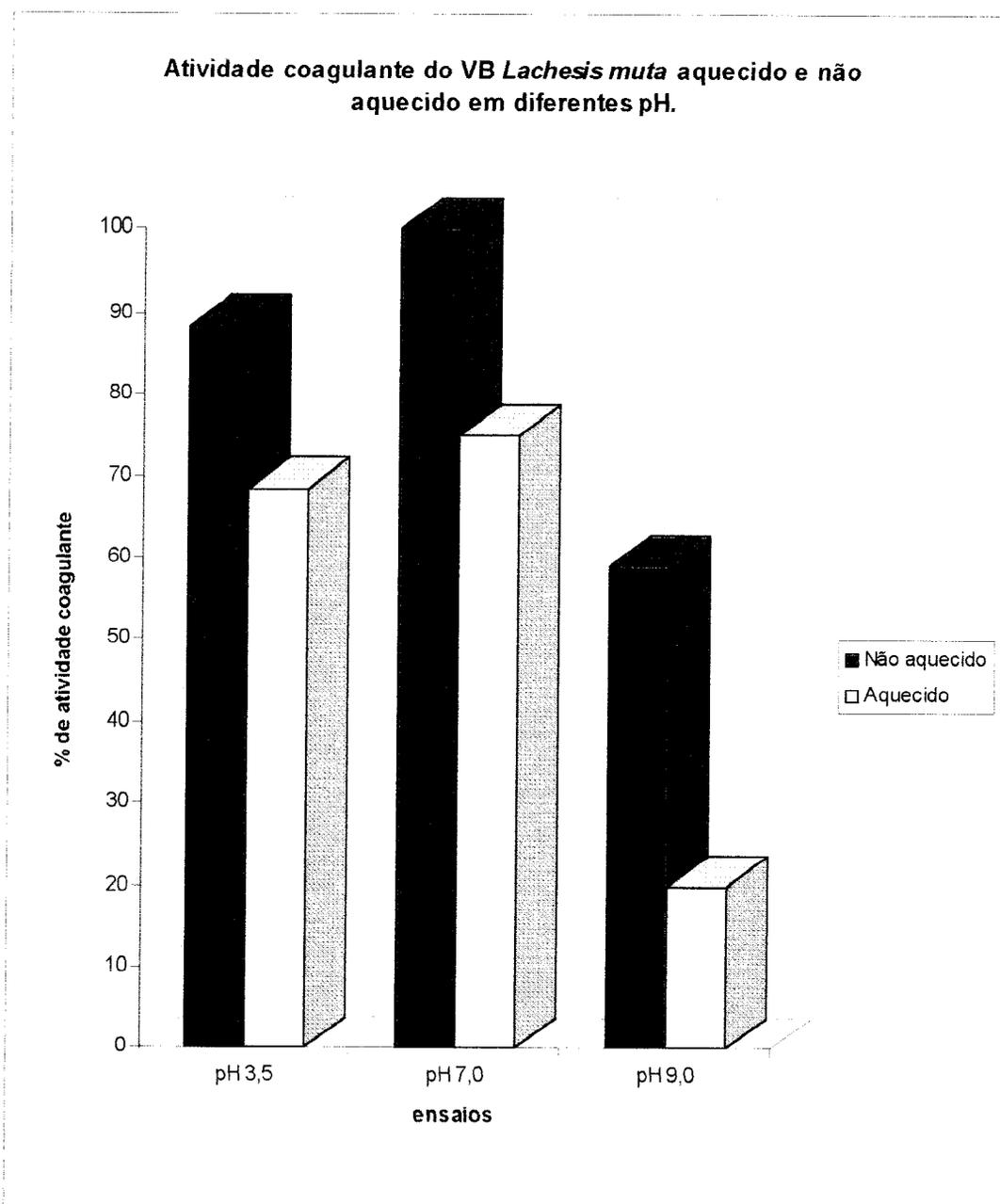


Fig. 6: Atividade Coagulante do VB *Lachesis muta* sobre o plasma bovino. Foram utilizados 20 μ g de proteína aquecidas ou não a 100 $^{\circ}$ C para cada 100 μ l de plasma. O plasma foi incubado a 37 $^{\circ}$ C e o tempo de coagulação foi cronometrado.

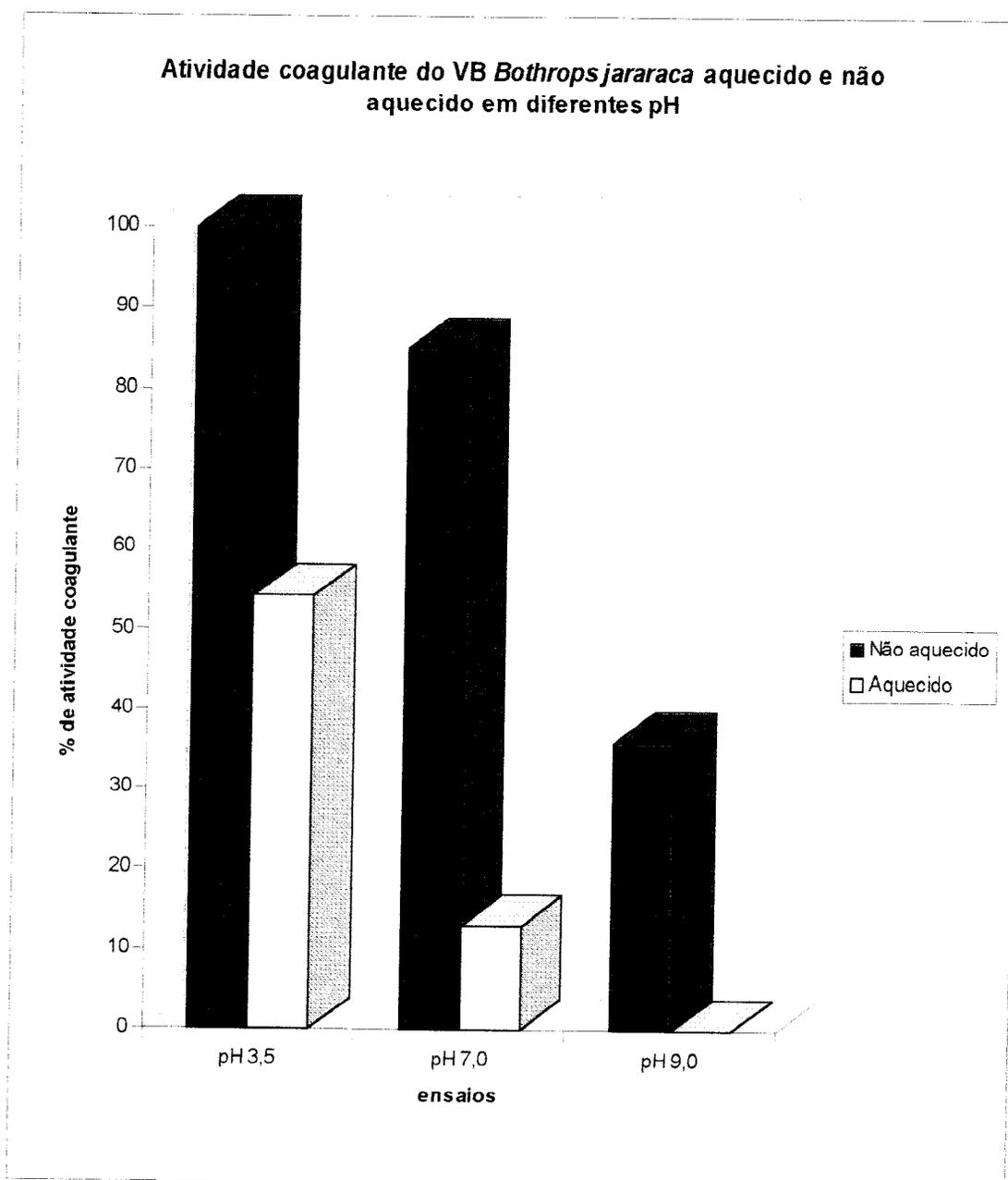


Fig. 7: Atividade Coagulante do VB *Bothrops jararaca* sobre o plasma bovino. Foram utilizados 20 μ g de proteína aquecidas ou não a 100 $^{\circ}$ C para cada 100 μ l de plasma. O plasma foi incubado a 37 $^{\circ}$ C e o tempo de coagulação foi cronometrado.

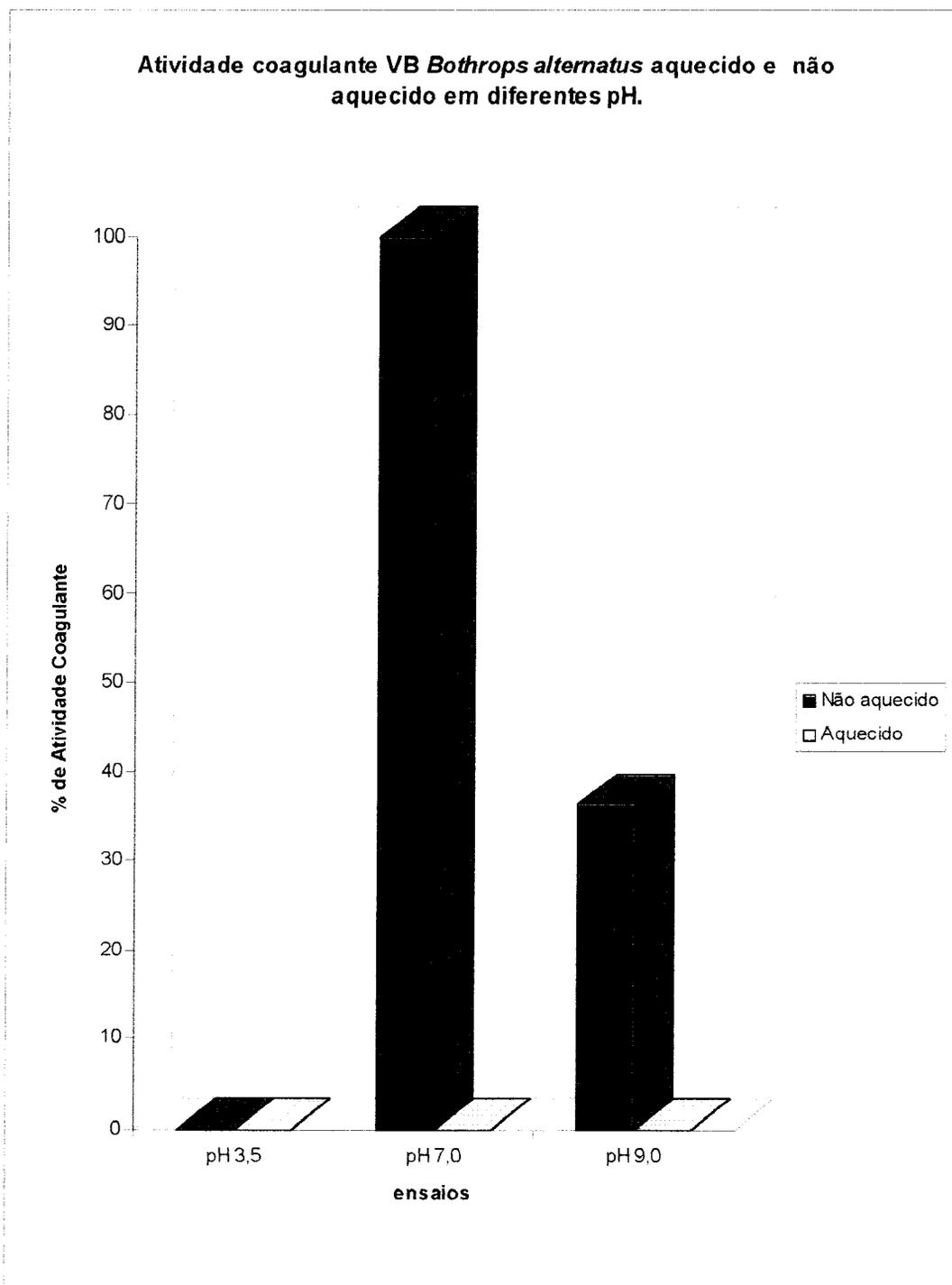


Fig. 8: Atividade Coagulante do VB *Bothrops alternatus* sobre o plasma bovino. Foram utilizados 20 μ g de proteína aquecidas ou não a 100°C para cada 100 μ l de plasma. O plasma foi incubado a 37°C e o tempo de coagulação foi cronometrado.

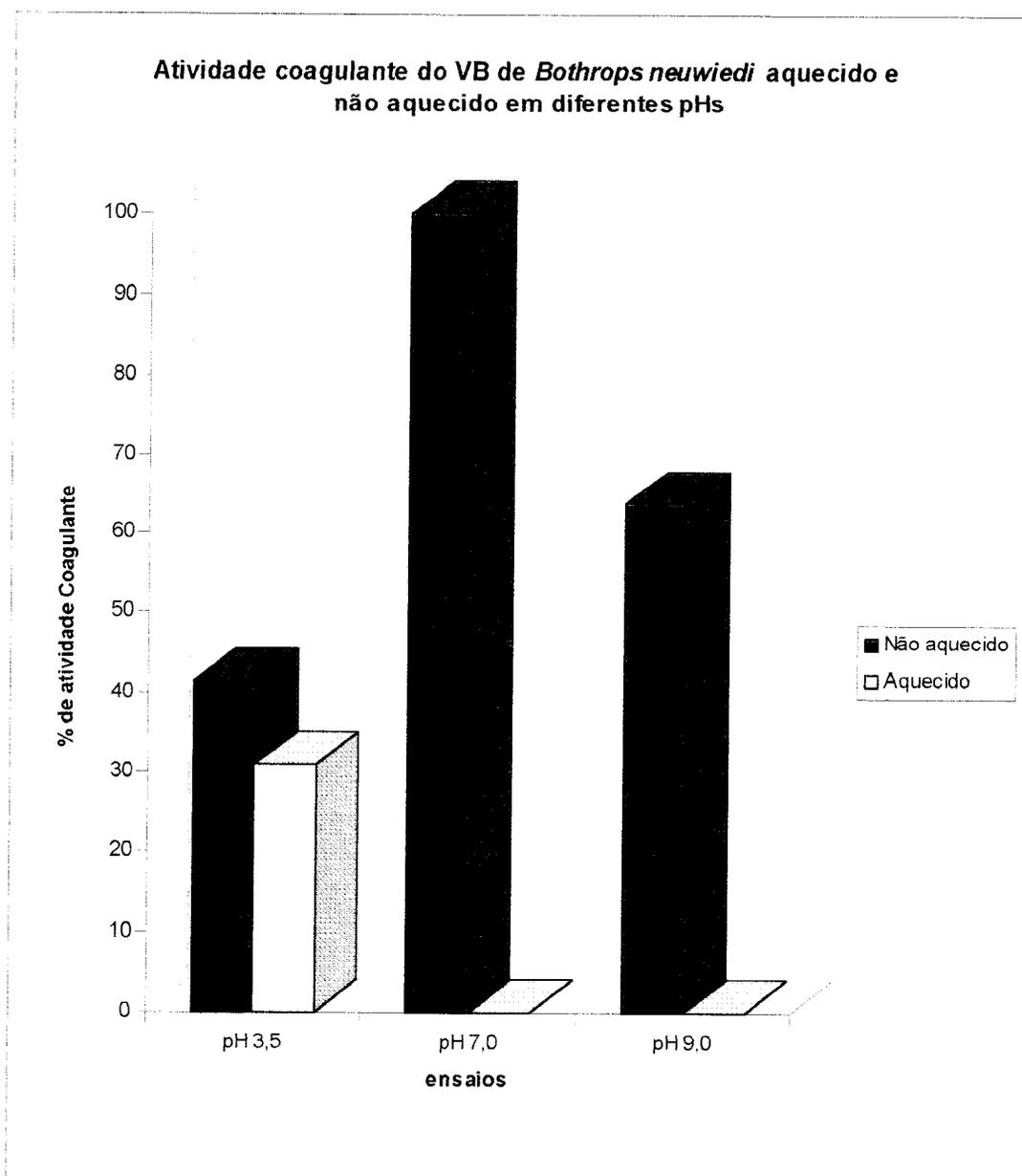


Fig. 9: Atividade Coagulante do VB *Bothrops neuwiedi* sobre o plasma bovino. Foram utilizados 20 μ g de proteína aquecidas ou não a 100°C para cada 100 μ l de plasma. O plasma foi incubado a 37°C e o tempo de coagulação foi cronometrado.

5.3- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A estabilidade das proteínas em relação ao pH e temperatura foi acompanhada por eletroforese em condições desnaturantes conforme descrito no item 4.5.

O aquecimento dos referidos venenos mencionados no item 4.1 levou ao surgimento de grandes quantidades de precipitados principalmente em pH 7,0 e pH 9,0. Estes precipitados foram eliminados por centrifugação e somente a fração solúvel foi aplicada.

As Fig. de 10 a 14 mostram os resultados obtidos nesta etapa.

Conforme se pode observar, o perfil eletroforético apresentam alterações quanto à intensidade de determinadas bandas em relação aos tratamentos efetuados e em alguns casos a banda até mesmo desaparece. No entanto, correlacionar estes resultados, onde cada banda se refere à presença de uma ou mais proteínas com a mesma massa molecular, com uma determinada atividade enzimática da peçonha pode se tornar algo muito duvidoso; considerando-se que o veneno é formado por uma mistura complexa de proteínas que pode apresentar várias isoformas para uma mesma atividade enzimática.

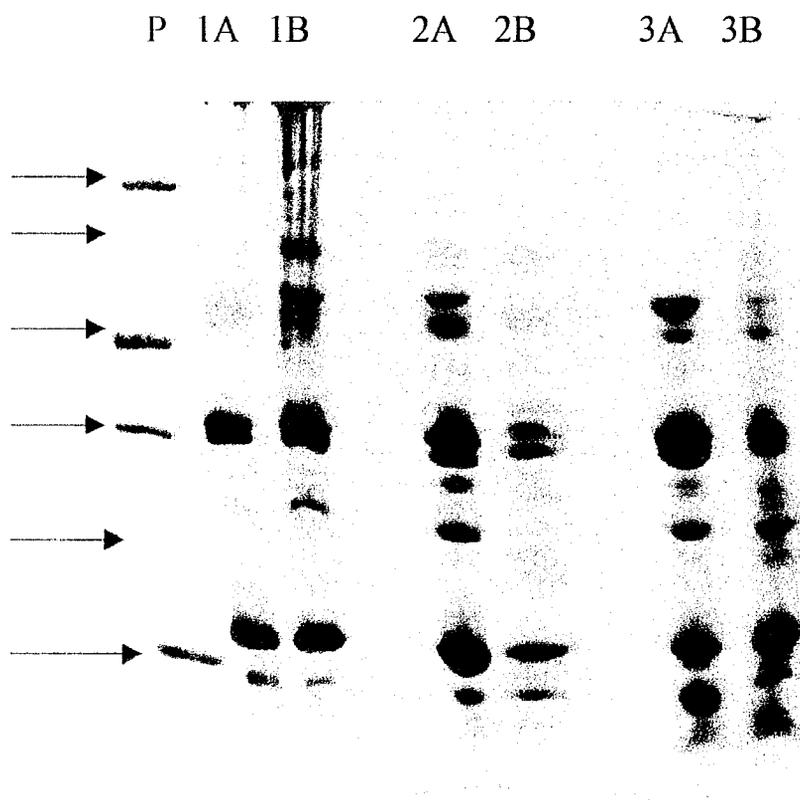


Fig. 10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% em condições desnaturantes.

V.B. veneno bruto de *Lachesis muta*.

P= padrões de P.M.

1= 5 ug de amostra dissolvida em pH 3,5

2= 5 ug de amostra dissolvida em pH 7,0

3= 5 ug de amostra dissolvida em pH 9,0

A= amostras não aquecidas

B= amostras aquecidas a 100 °C por 5 minutos

Fig. 11 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% em condições desnaturantes.

V.B. *Bothrops jararaca*

As demais condições são idênticas às da fig. 10

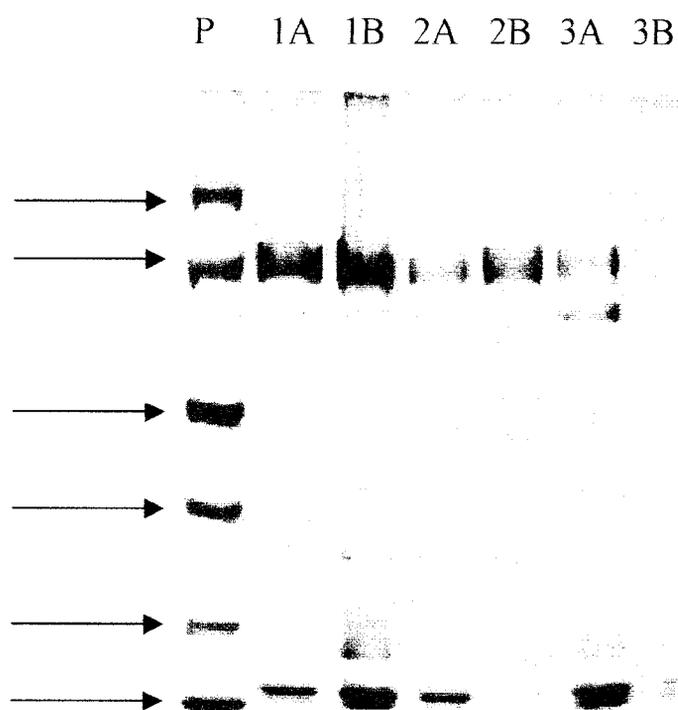


Fig. 12 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% em condições desnaturantes.

V.B. *Bothrops alternatus*

As demais condições são idênticas às da fig. 10

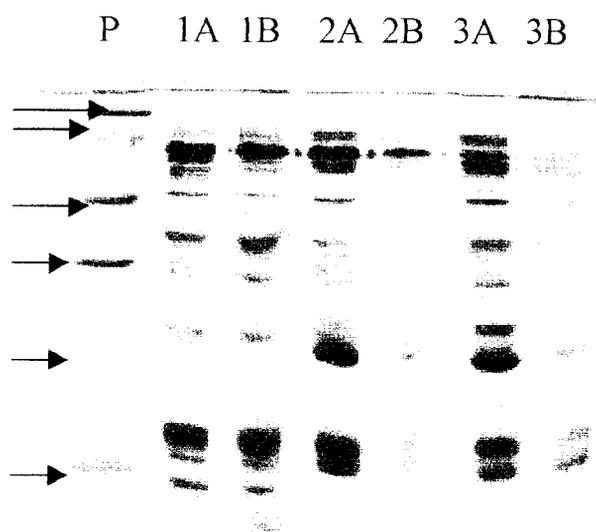


Fig. 13 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% em condições desnaturantes.

V.B. *Bothrops neuwiedi*

As demais condições são idênticas às da fig. 10

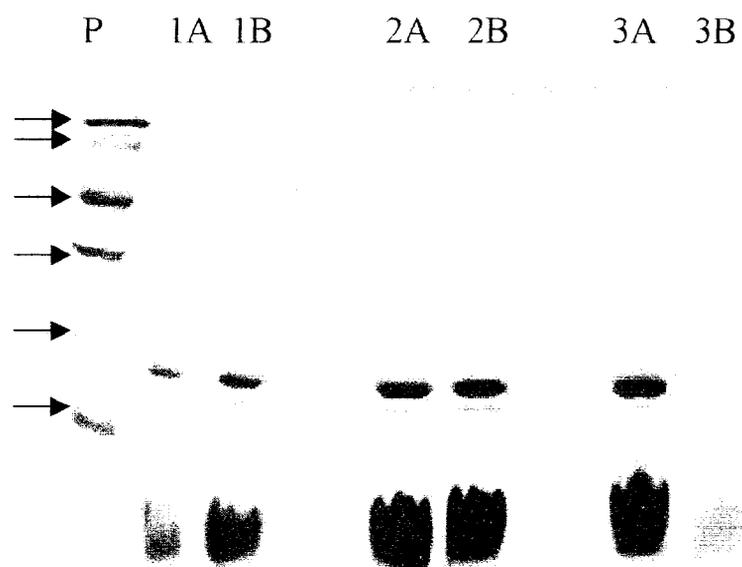


Fig. 14 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% em condições desnaturantes.

V.B. *Apis mellifera*

As demais condições são idênticas às da fig. 10

6.0 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Dentre os animais peçonhentos capazes de provocar acidentes graves, destacamos principalmente as serpentes que encontram-se representadas por uma grande variedade de gêneros distribuídos em nosso país. A peçonha das serpentes botrópicas pode produzir efeitos locais e ou disseminados e dependendo do tempo de atendimento médico, o efeito local como necrose e hemorragia evolui tão intensamente que pode causar a morte da vítima (BORGES, 1995).

No Triângulo Mineiro destacam-se as espécies *Bothrops moojeni* (caissaca) e *Bothrops neuwiedi* (Jararaca pintada) (NISHIOKA e SILVEIRA, 1992). O envenenamento provocado por estas serpentes caracteriza-se por dor, hemorragia e edema, podendo ainda progredir para desordens na coagulação sangüínea (GUTIERREZ et al, 1989) e liberação de substâncias vasoativas como a histamina e bradicinina (SELISTRE ARAÚJO et al, 1990).

Os venenos ofídicos de uma maneira geral são constituídos de proteínas que se combinam resultando um grande poder tóxico. Segundo OWNBY et al (1997) muitas proteínas individualmente não apresentam ou apresentam pouca atividade tóxica, como a melitina e a fosfolipase A2 que atuam sinergicamente no veneno de *Apis mellifera*.

Dependendo da maneira como as proteínas são tratadas elas podem manter ou perder sua atividade sendo que aquecimento ou pHs extremos produzidos por ácidos ou bases fortes desnaturam as proteínas, em geral irreversivelmente.

Com o intuito de averiguar a estabilidade das proteínas tóxicas contidas em alguns venenos, duas atividades enzimáticas relevantes foram testadas. A tabela I reúne os resultados de atividade PLA2 específica obtidos para as 5 peçonhas estudadas. A atividade fosfolipásica (PLA2) específica em pH ácido (pH 3.5), pH neutro (pH 7.0) ou pH alcalino (pH 9.0) para o veneno de *Apis mellifera* foi sempre maior que a dos venenos de serpentes. Com o aquecimento a 100°C por 5 minutos em todos os pHs o veneno de *Apis* se mostrou estável, exceto em pH alcalino quando sua atividade obteve queda de aproximadamente 45%, ficando evidente a grande estabilidade desta enzima numa ampla faixa de pHs.

Dentre os quatro venenos de serpentes estudados, o de *Lachesis* apresentou a

maior atividade fosfolipásica em qualquer condição (Tabela I). Quando analisado após aquecimento, verifica-se que manteve a estabilidade em pH ácido, sofreu inativação em cerca de 40% em pH neutro e foi totalmente inativado em pH alcalino. Por este motivo, conclui-se que a fosfolipase A2 deste veneno preserva melhor sua estrutura em pH ácido. Nos demais pHs a inativação ocorre pelo aquecimento. LEHNINGER (1991) afirma que cada enzima têm seu pH ótimo de ação enquanto DE HAAS (1968) trabalhando com PLA2 verificou que o pH ótimo de ação destas enzimas está em torno de 8,0. Nos nossos experimentos esta atividade foi analisada sempre em pH 8,0, embora a enzima inicialmente tenha sido tratada num pH diferente. Para os venenos de *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops alternatus* a atividade PLA2 não variou muito em relação ao aquecimento em pH ácido. Ao mesmo tempo, após aquecimento houve inativação total das enzimas em pH 7,0 e pH 9,0. Portanto, as referidas peçonhas não apresentaram estabilidade quanto ao aquecimento, em pHs neutro ou alcalino. Por outro lado o veneno de *Bothrops jararaca* mostrou-se diferente dos demais somente em pH ácido, quando apresentou perda de cerca 40% da atividade PLA2 após aquecimento.

Segundo IWANAGA e SUSUKI, (1979) algumas fosfolipases A2 mantêm-se totalmente ativas quando aquecidas à 90° C por 15 minutos em tampão pH 3,0. Também HOMSI BRANDEBURGO (1987), confirmou estes resultados, trabalhando com fosfolipases do veneno de *Bothrops jararacussu*. Nossos resultados estão em concordância com os destes autores.

A tabela II por sua vez, reúne os resultados obtidos para as 5 peçonhas quanto à atividade coagulante sobre o plasma bovino. Conforme se pode observar, a peçonha de *Apis mellifera* não apresentou atividade coagulante.

Tab. 1: Atividade Fosfolipásica de 10 μ g dos Venenos Brutos aquecidos ou não a 100°C em diferentes pH. O substrato utilizado foi a gema de ovo pH 8,0. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com NaOH, durante 3 minutos de reação:

Amostras	Unidades/mg/min					
	pH 3,5		pH 7,0		PH 9,0	
	*NA	**A	*NA	**A	*NA	**A
<i>Bothrops jararaca</i>	48,2	29,3	35,5	*	37,2	*
<i>Bothrops neuwiedi</i>	44,2	43,1	59,0	*	41,4	*
<i>Bothrops alternatus</i>	24,8	21,0	32,8	*	26,2	*
<i>Lachesis muta</i>	71,7	67,1	73,5	44,2	70,6	*
<i>Apis mellifera</i>	262,3	266,3	282,0	277,0	291,0	140,0

*NA= não aquecido

* A= aquecido

* = não apresentou atividade Coagulante

Estes resultados se referem à média de 3 ensaios.

Tab. 2: Atividade Coagulante dos venenos brutos aquecidos ou não a 100°C, sobre o plasma bovino. Foram utilizados 20 μ g de proteína em cada ensaio. O plasma foi incubado a 37°C e o tempo de coagulação foi cronometrado.

Amostras	Tempo de Coagulação (segundos)					
	pH 3,5		pH 7,0		pH 9,0	
	*NA	**A	*NA	**A	*NA	**A
<i>B. jararaca</i>	26,6	49,0	31,0	204,3	74,0	*
<i>B. neuwiedi</i>	66,6	89,0	27,6		43,3	
<i>B. alternatus</i>	*	*	36	*	98,6	*
<i>Lachesis muta</i>	19,6	25,3	17,3	23	29,3	*
<i>Apis mellifera</i>	*	*	*	*	*	*

*NA= não aquecido

* A= aquecido

* = não apresentou atividade Coagulante

Estes resultados se referem à média de 3 ensaios.

Estes resultados são corroborados por OLIVEIRA (1994) que trabalhou com a mesma peçonha.

Dentre todas as peçonhas testadas, a de *Lachesis muta* apresentou a maior atividade coagulante em qualquer condição estabelecida, enquanto a de *Bothrops alternatus* foi a de menor atividade, e esta foi totalmente inativada em pH ácido antes do aquecimento ou em qualquer pH após o aquecimento. Em pH 9,0 sem aquecimento, podemos observar que esta atividade é quase 3 vezes menor que em pH 7,0.

O aquecimento sempre diminui parcial ou totalmente a atividade coagulante das peçonhas de *Bothrops jararaca* e *Bothrops neuwiedi*. Quando não aquecidas apresentam atividade enzimática semelhante em pH 3,5 para *Bothrops jararaca* e pH 7,0 para *Bothrops neuwiedi*. Uma das espécies mais estudadas do gênero botrópico é a *Bothrops jararaca* (DENSON, 1970; MANDELBAUM et al, 1974), cuja purificação parcial da enzima coagulante foi elucidada por HENRIQUES et al, (1959) e posteriormente por FICHMAN e HENRIQUES (1962).

Segundo LEITE (1991), o veneno de *Bothrops jararaca* é mais coagulante que o veneno *Bothrops alternatus*, e os nossos resultados estão em concordância.

Quanto ao perfil eletroforético obtido para cada peçonha submetida aos tratamentos especificados, podemos verificar que tanto em condições nativas como desnaturantes o número de bandas obtidas estava relacionado com a desnaturação e precipitação das proteínas do veneno. Sempre que as proteínas se desnaturam em condições extremas de pH e temperatura, aumenta a quantidade de precipitado e diminui o número de bandas da fração solúvel.

Pode-se concluir portanto que, dependendo dos objetivos propostos, é necessário que se faça antes um estudo das melhores condições de trabalho.

No caso das peçonhas estudadas, com relação às atividades coagulante e fosfolipásica, podemos afirmar que as estruturas destas proteínas são melhores preservadas sempre que trabalhadas em pH ácido, e submetidas à temperaturas elevadas ou em pH neutro e temperatura ambiente. Exceções feitas para as peçonhas de *Bothrops alternatus* quanto à atividade coagulante, que é nula em pH ácido e para a peçonha de *Bothrops jararaca* quanto à atividade PLA₂, que é ligeiramente maior em pH ácido não aquecido.

Pode se concluir portanto, que o aquecimento das peçonhas sempre sempre causou inativação parcial ou total das enzimas, em qualquer pH estudado, mas o pH ácido, em geral, foi mais efetivo na proteção contra a desnaturação causada pelo calor.

Finalmente, nossos estudos abrem caminhos para futuros passos de purificação de uma destas proteínas, quando pretendemos utilizar estes

conhecimentos adquiridos para desnaturar e precipitar uma proteína indesejável, preservando a que nos interessa solúvel e ativa.

7.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGON, O. F., BRENES BRENES, J. R., GUBENSEK, F.. Characterization of a lectin like protein isolated from *Lachesis muta* snake venoms. **Rev. Biol. Trop.** , v.37, n.1, p.70, 1989.
- ARNI, R. K., WARD, R. J.. Phospholipase A2- A Structural Review. **Toxicon.**, v.34, n.8, p.827, 1996.
- BARRAVIERA, B.. **Venenos Animais: Uma Visão Integrada**. 1.ed. Rio de Janeiro. Publicações Científicas, 411p., 1994.
- BARNARD, J. H. . Allergic and pathologic finding in fifty insect sting fatalities. **J. Allergy. Clin. Immunid.**, v.52, p.259, 1973.
- BRANDEBURGO, M. A. M. . A safe devide for extrating from venom honeybees. (*Apis mellifera*). **Bee World**, v. 73 , n. 3 , p. 128 , 1992.
- BENTON, A. W. , MORSE, A. A. . Collection of the liquid fraction of the venom. **Nature**. v. 210 , p. 652, 1966.
- BORGES, M. H.. **Isolamento e Produção de Anticorpos Policlonais das Miotoxinas da Peçonha de *Bothrops jararacussu***. (monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas) 52p., 1995.
- DE HAAS, G. H., POSTEMA, N. M.. Purification and properties of phospholipase from porcine pancreas. **Biochem. Biophys. Acta.**, v.159,

- p.103,1968.
- DANIELLE, J. J. et al . A new phospholipase A2 isoform isolated from *Bothrops neuwiedi* (Iarará chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. **Toxicon**, v. 35, n. 8, p. 1205, 1997.
- DENSON, K. W. E. , ROUSSEAU, W. E. . Separation of the coagulant components of *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon** , v. 8, p. 15, 1970.
- DAVIS, B. J. . Disc electrophoresis II method and properties of phospholipase A2 from porcine pancreas. **Biochem. Biophys. Acta**. v. 159, p.103, 1964.
- FEDERSONI, P. A. J. et al. **Cartilha de Ofidismo (cobra)**. 3.ed. Fundação Nacional da Saúde, 32p. 1991.
- FICHMAN, M. , HENRIQUES, O. B. . Further studies on the purification of the blood clotting enzyme from the venom of *Bothrops jararaca*. **Arch. Biochem. Biophys.** , v. 98, p. 95, 1962.
- GUTIERREZ, J. M. , LOMONTE, B.. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms, a review. **Mem. Inst. Butantã.**, v.51, n.4, p.211, 1989.
- HENRIQUES, O. B. , MANDELBAUM, F. R. , HENRIQUES, S. B. . Blood clotting activity of the venom of *Bothrops jararaca*. **Nature**, v.183, p. 114, 1959.
- HEREDIA, V. , CAMPOS, S., YARLENQUE, A. C.. Actividad de una 5' nucleotidase en el veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (L.) "Jergon". **Acta Cient. Venez.**, v.33, n.4, p.333, 1982.
- HOMSI BRANDEBURGO, M. I. . **Fracionamento do veneno de *Bothrops jararacussu* : Caracterização química parcial dos componentes ativos e estudos dos efeitos farmacológicos e anatomopatológicos da Bothropstoxina.** (Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo). 132p. , 1987.
- HUANG, K. F. , HUNG, C. C. , CHIOU, S. H. . Characterization of three fibrinogenolytic proteases isolated from the venom of Taiwan habu (

- Trimeresurus mucrosquamatus*). **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v.31, n.6, p.1041, 1993.
- ITZHAKI, R. F. , GILL, D. M. . A microbiuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.**, v.9, p.401. 1964.
- IWANAGA, S. , SUZUKI, T. . Enzimas in snake venoms. In: **Handbook of Experimental Pharmacology Snake Venoms.**, v.52 , p.61, 1979.
- LAEMMLI, V. K.. Cleavagem of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** ., v.227, p.680, 1970
- LAEMMLI, V. K., FAVRE, M. . Maturation of the head of bacteriophage T4. **J. Mol. Biol.**, v.80, p.575, 1973.
- LEITE, C. C. et al . Characterization of the snake venoms from seven brazilian species of *Bothrops* by FPLC anion exchange chromatography. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 102, p. 515, 1992.
- LEHNIGER, A. L.. **Princípios de Bioquímica** . São Paulo: Sarvier, 1991. 725p. Cap. 9: Enzimas, p.161.
- NISHIOKA, S. A., SILVEIRA, P. V. P.. Clinical and Epidemiological study of 292 cases of lance headed vipers. **Ann. Trop. Med. Parasit.**, v. 86, p. 89, 1992.
- OLIVEIRA, F. **Caracterização Bioquímica Parcial dos Componentes Ativos Presentes no Veneno de Abelhas** . (Monografia apresentada à coordenação do Curso de Ciências Biológicas).71p. 1994.
- OUYANG, C. et al. Purification and chacterization of the anticoaglant principle of *Trimeresurus mucroquamatus* venom. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 541, p. 3941978.
- OWNBY, C. L. et al. Melitin and phospholipase A2 from bee(*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. **Toxicon** , v.35,

n.1, p.67, 1997.

RODRIGUEZ, E., YARLENQUE, A. . Isolation and various properties proteinase I from the venom of the peruvian snake *Lachesis muta*. **Acta Cient. Venez.**, v.42, n.4, p.219, 1991.

SELISTRE ARAÚJO, H. S. et al. Isolation and characterization of hemorrhagic, mionecrotic and edema inducing toxins from *Bothrops insularis* (Jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v.28, n.3, p.261, 1990.

SELISTRE ARAÚJO, H. S. ; White, C. L. ; Ownby, C. L. . C DNA cloning and sequence analysis of lisyne - 49 phospholipase A2 myotoxin from *Agkistrodon Contortrix Laticinctus* snake venoms. **Arc. Biochem. Biophys.**, v.326, p.21, 1996.

SELITRE, H. S. . **Isolamento e Caracterização Química Parcial de um Fator Coagu- Lante do Veneno de *Bothrops insularis***. (Tese de mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo). 133p. 1985.

STUMPF, P. K. , Conn, E. E. . **The Biochemitry of Plants**. San Diego: Academic Press. Inc. , 1993. 595p. Cap.11: Recent Progress in alfa amilase Biosynthesis, p. 479.

SHIPOLINI, R. A. et al . The amino acid sequence and carbohydrate content of fosfolipase A2 from bee venom. **Europe Journal Biochem.** , v. 48, p.465, 1979.