

Introdução

Os venenos de serpentes são misturas complexas de substâncias bioquímicas e farmacologicamente ativas, sendo aproximadamente 90% do peso seco formado por compostos protéicos e o restante compreende carboidratos, cátions metálicos, nucleosídeos, aminas biogênicas (bradicinina, histamina, 4-hidroxitriptamina) e níveis menores de aminoácidos livres e lipídios (Kini, 2003). Dentre todos estes compostos, as Fosfolipases A₂ (PLA₂) são proteínas largamente estudadas e descritas na literatura.

PLA₂ são enzimas amplamente espalhadas na natureza, podendo ser encontradas em bactérias, plantas, tecidos de mamíferos (pulmão, fígado, baço e coração). No entanto, as mais conhecidas são aquelas encontradas nos tecidos pancreáticos de mamíferos e nos venenos de insetos e répteis, sendo estes último uma das fontes mais ricas dessa protease.

Uma das características mais marcantes das é a ampla gama de efeitos farmacológicos, tais como neurotoxicidade pré e pós-sináptica, miotoxicidade local e sistêmica, cardiotoxicidade, efeitos anticoagulantes, atividade hemolítica, atividade edematizante, mionecrose, convulsionante, hipotensiva e inibição da agregação plaquetária (Kini 2003; Gutiérrez e Lomonte, 1997).

Este trabalho descreve a purificação e caracterização bioquímica de PLA₂ obtida do veneno de *Bothrops barnetti*.

Metodologia

- Veneno bruto de *Bothrops barnetti*;
- Sephadex G-75;
- Eletroforese em PAGE-SDS
- HPLC de fase Reversa com coluna μ -Bondapack-C18 (0.78 x 30 cm) Water;
- Atividade catalítica PLA₂ em substrato substrato ácido 4-nitro-(3-octanoiloxi) benzóico (NOAB);
- Atividade catalítica em diferentes parâmetros de pH, temperatura, concentração de substrato e ions;
- Espectrometria de Massa MALDI-TOF;

Resultados

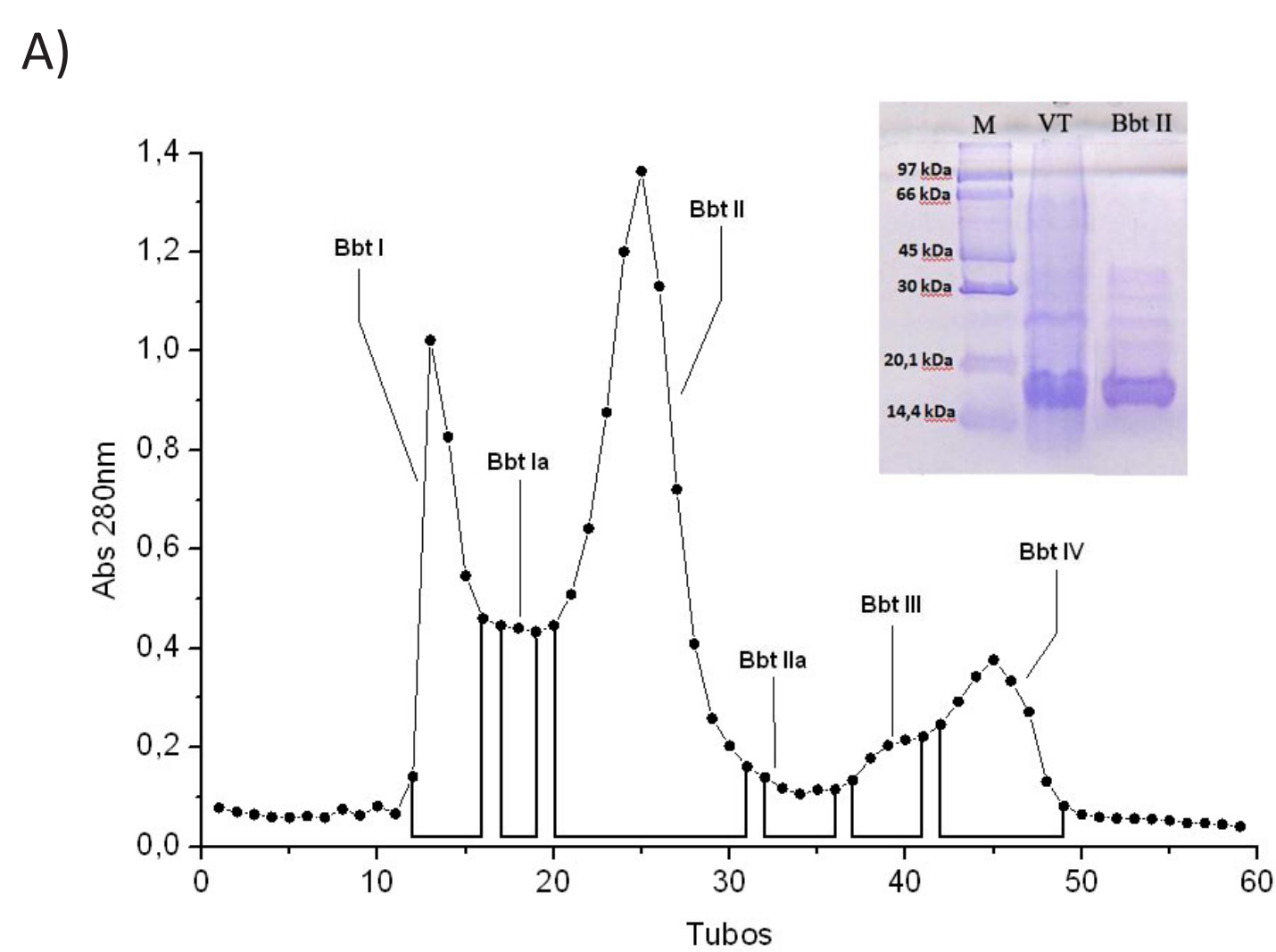


Figura 1 – Perfil cromatográfico monitorado em 280nm da cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G75 (2,83 x 91,5 cm) do veneno total de *B. barnetti*. Obteve-se 5 frações principais.

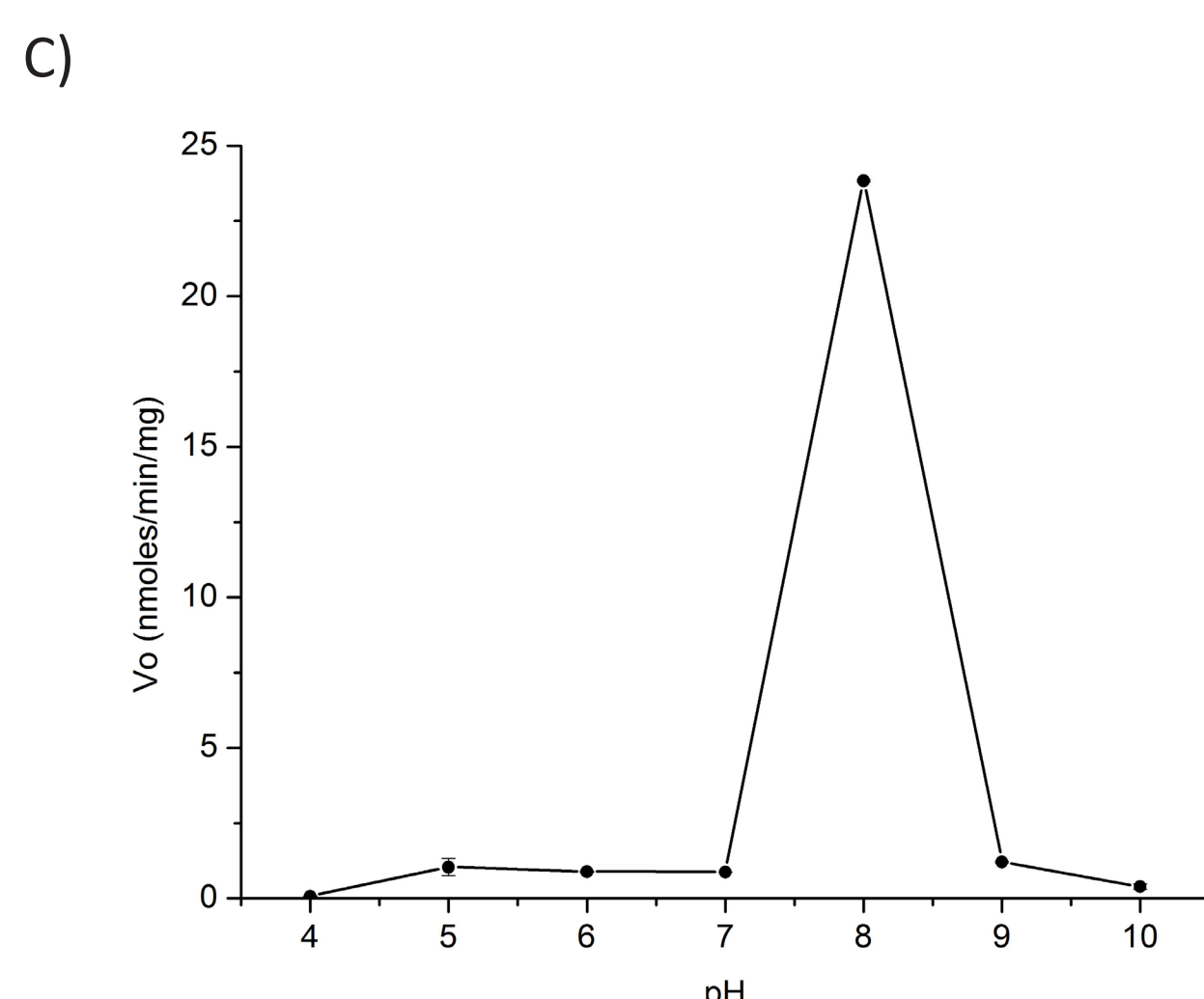


Figura 3 – Efeito da variação do pH na atividade enzimática da PLA₂ (fração BbtII-5) isolada de *Bothrops barnetti*.

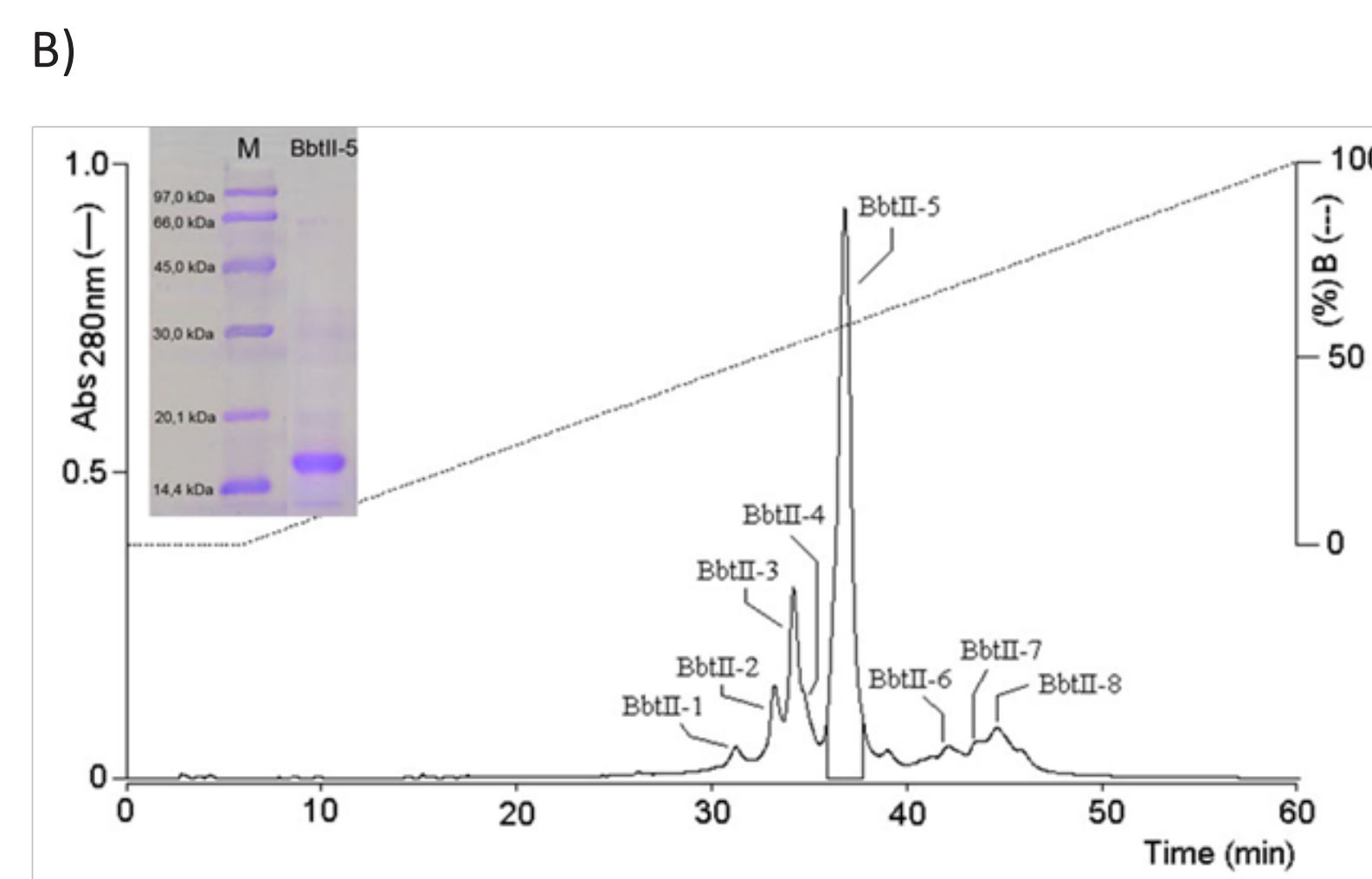


Figura 2 – Perfil cromatográfico em HPLC de fase reversa da fração BbtII. O perfil de eluição foi monitorado a 280nm e foram identificados 8 picos protéicos principais. O único pico com atividade PLA₂ foi o BbtII-5.

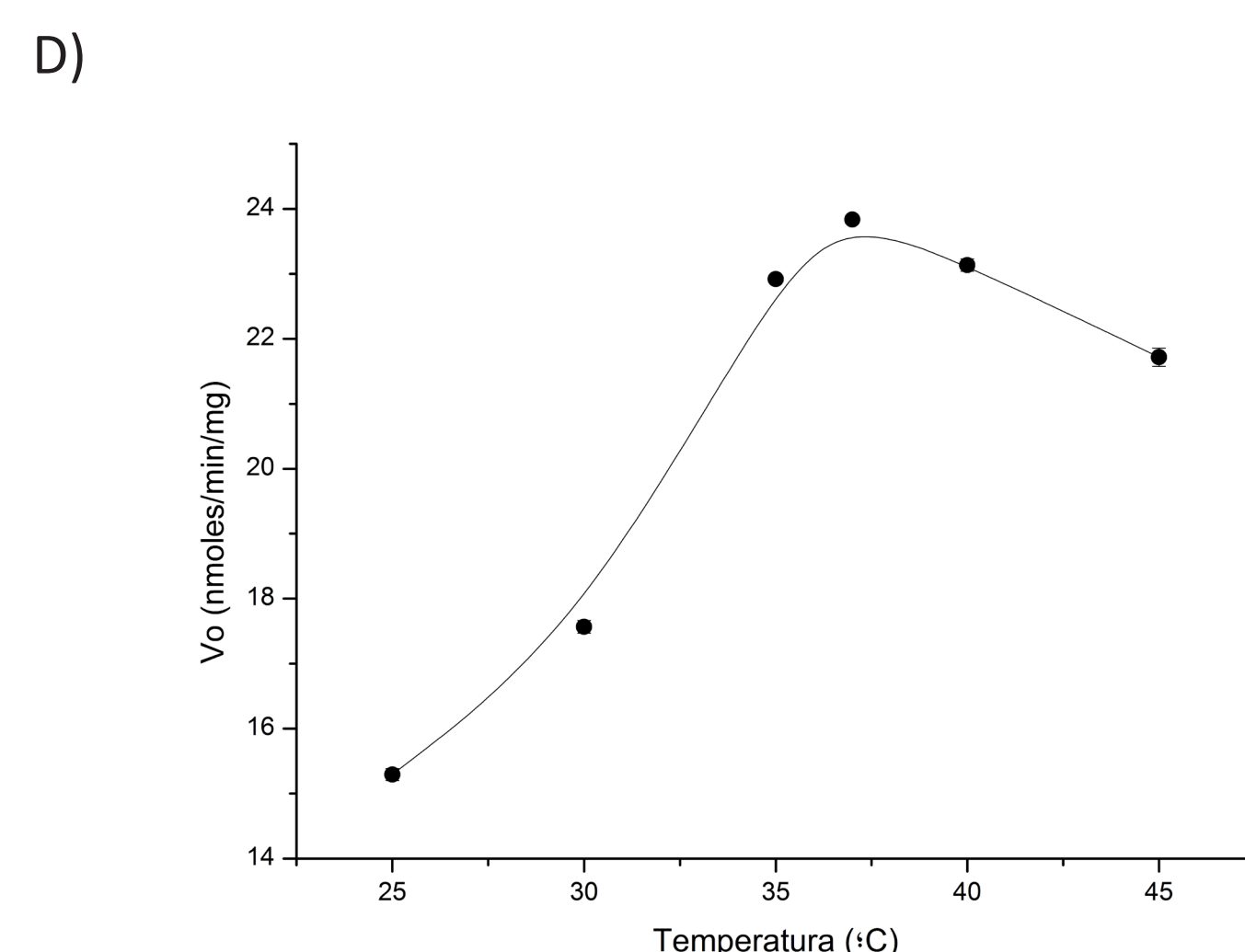


Figura 4 – Efeito da temperatura na atividade enzimática da PLA₂ da fração BbtII-5 isolada do veneno de *Bothrops barnetti*.

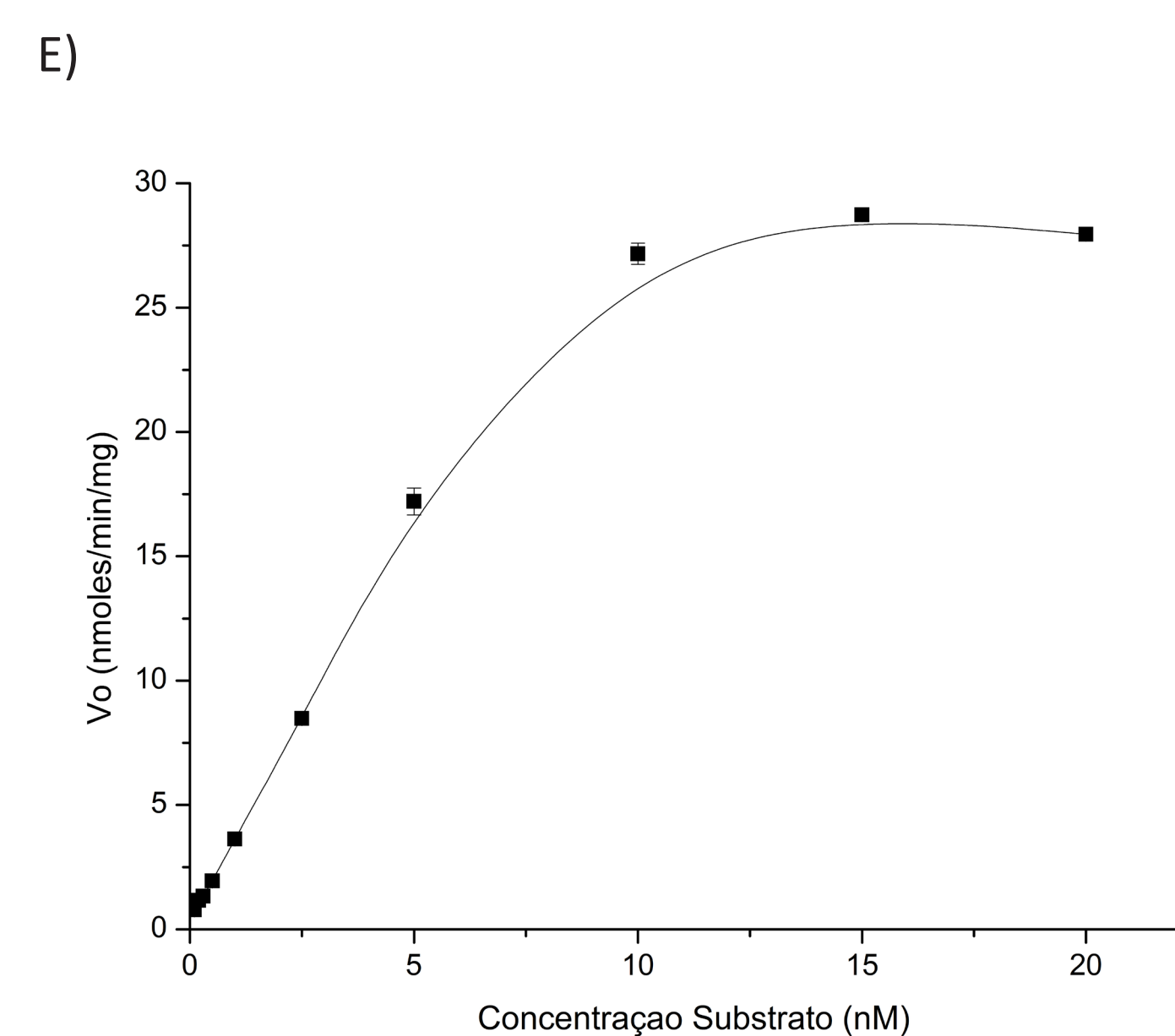


Figura 5 – Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática da PLA₂ da fração BbtII-5. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão.

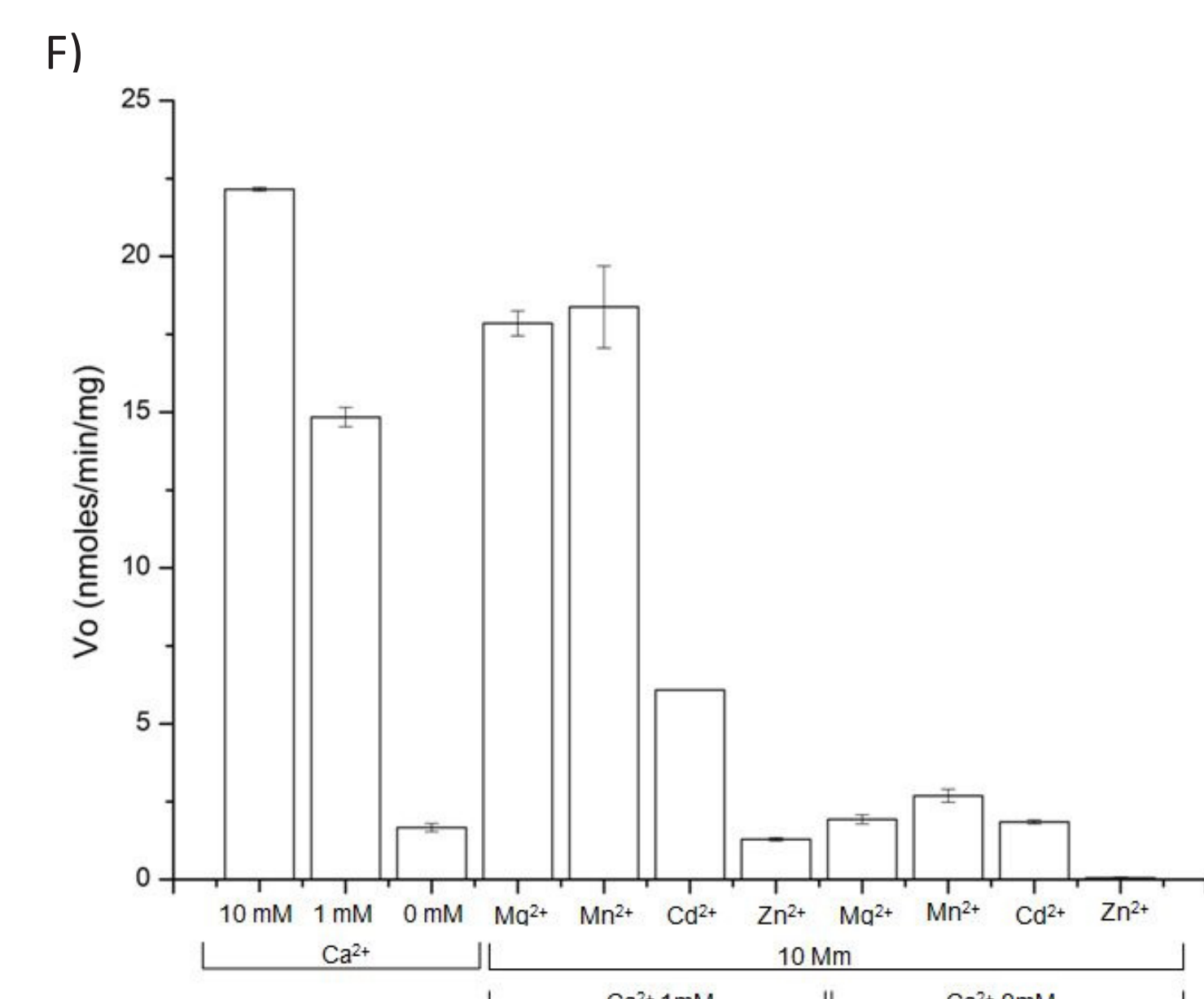


Figura 6 – Efeito dos íons divalentes Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Cd²⁺ e Zn²⁺ sobre a atividade enzimática da PLA₂ da fração BbtII-5.

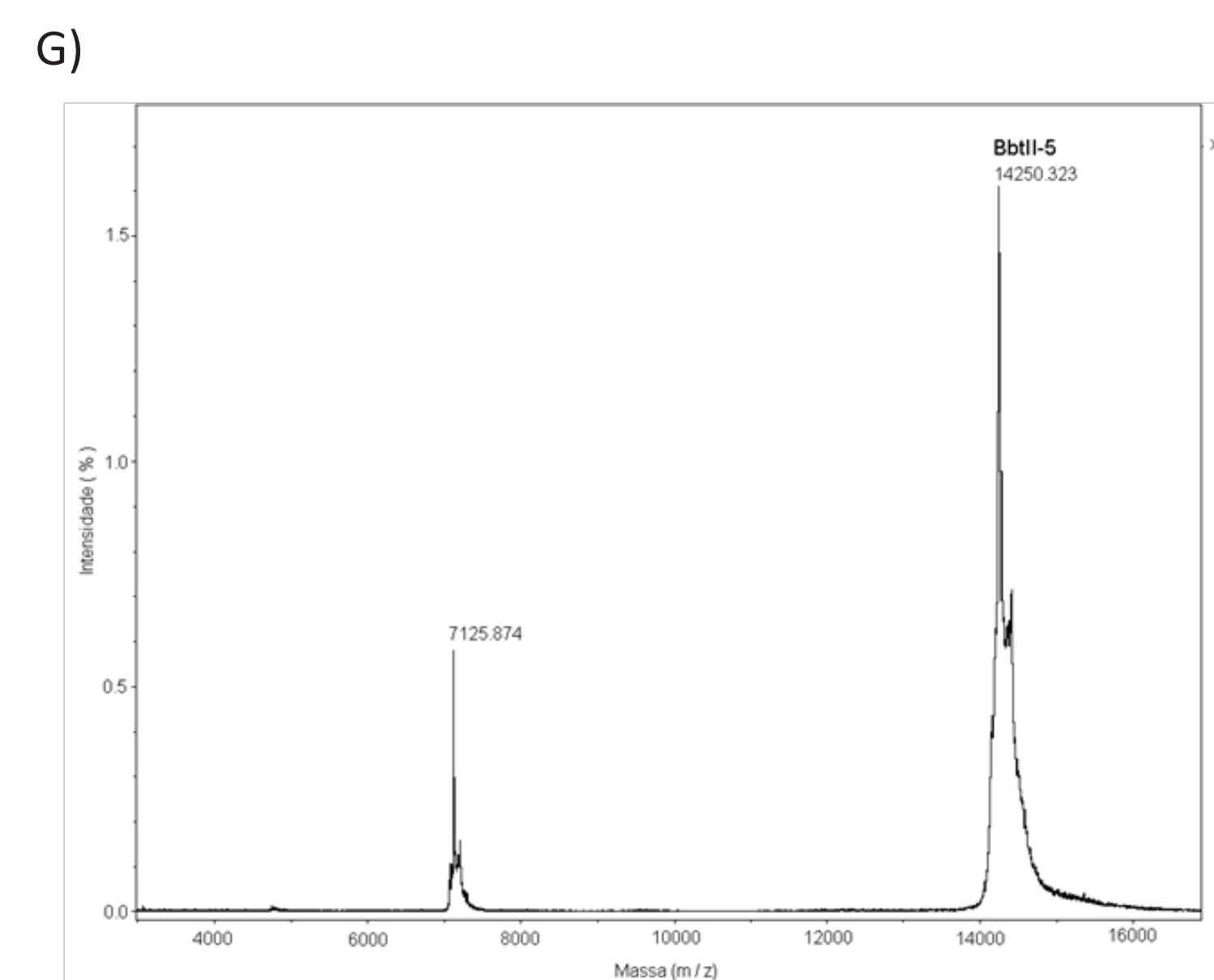


Figura 7 – A massa molecular da fração BbtII-5 de *B. barnetti* foi analisada por Espectrometria de Massa, utilizando-se um Voyager DE PRO MALDI-TOF espectrômetro de massas.

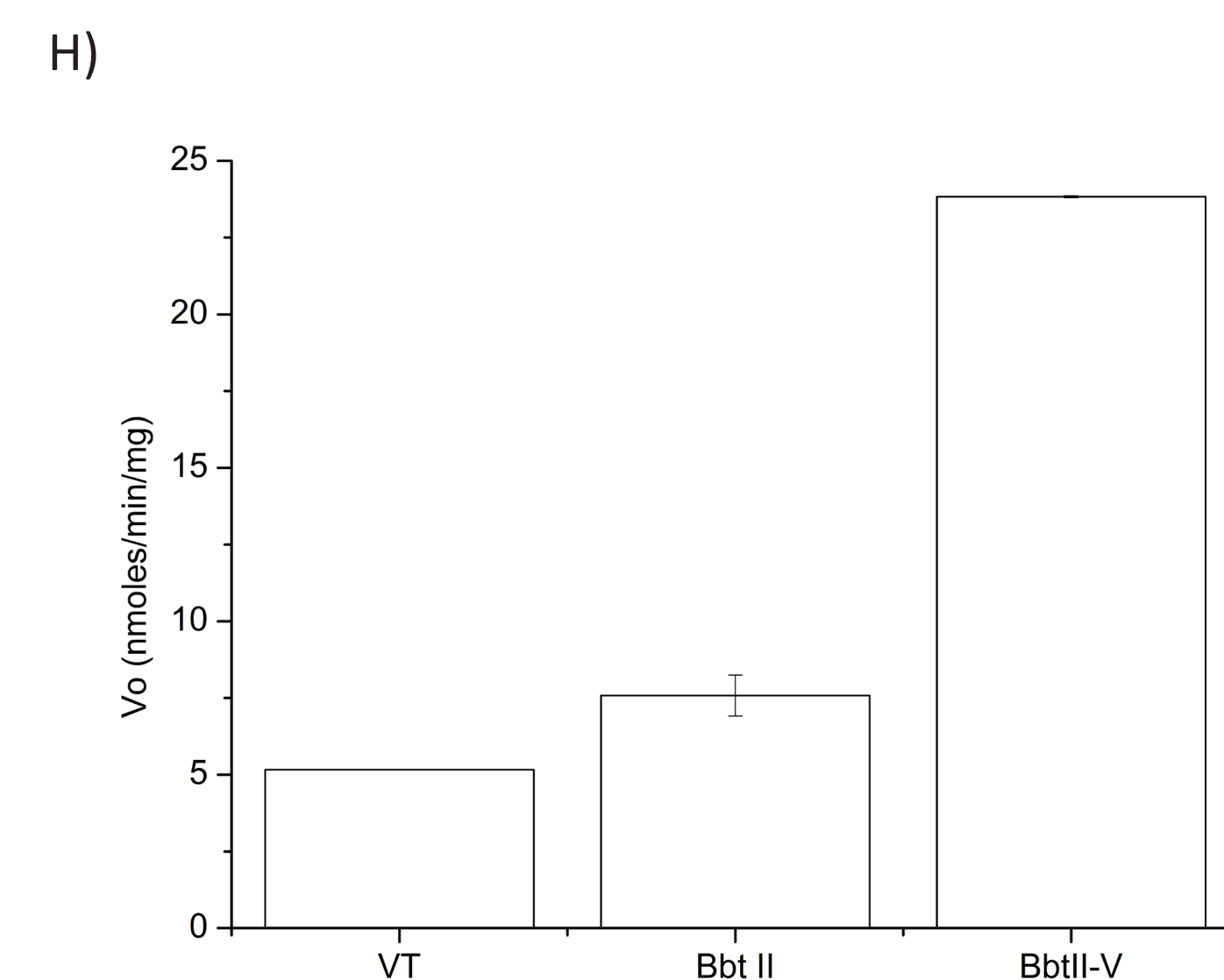


Figura 8 – Atividade de PLA₂ do veneno total de *B. barnetti* e frações BbtII-1, BbtII-2, BbtII-3, BbtII-4 e BbtII-5 obtidas através da purificação por HPLC de fase reversa da fração BbtII.

Discussão e Conclusão

A fim de se isolar a PLA₂, fez necessário a aplicação de duas metodologias de purificação: a cromatografia de exclusão molecular com Sephadex G75 (2,83 x 91,5 cm) e HPLC de fase reversa em coluna μ -Bondapack-C18 (0.78 x 30 cm) Water. Como resultado do primeiro método, o veneno total de *Bothrops barnetti* pôde ser inicialmente decomposto em 4 frações protéicas principais (A), dentre as quais aquela nomeada de BbtII foi a única a apresentar significativa atividade catalítica (H). Dessa forma, aplicou-se a técnica de HPLC na fração BbtII, o que resultou no isolamento de 8 novas frações (B), das quais a BbtII-5 foi a única a apresentar atividade PLA₂ (H).

Os ensaios enzimáticos revelaram que a enzima BbtII-5 apresenta seu ótimo de atividade catalítica no pH equivalente a 8,0 (C). A temperatura ótima para atividade da BbtII-5 se deu em uma faixa de 35°C a 40°C, e mesmo no intervalo de 40 a 45°C, esta ainda não havia sofrido uma queda brusca sua atividade (D).

A capacidade da PLA₂ em manter atividade catalítica em diferentes condições de temperatura e pH são condizentes com as características fisiológicas das serpentes, que por serem animais peçonhentos adéquam sua temperatura corpórea segundo as condições do ambiente e hábitos comportamentais. Dessa forma, os resultados permitem afirmar que as características físico-químicas da PLA₂ de *Bothrops barnetti* conferem ao veneno a capacidade de manter sua função biológica nas mais variadas condições fisiológicas da serpente.

Tratando-se de uma enzima monomérica, o esperado para atividade PLA₂ de BbtII-5 em diferentes concentrações de substrato é um comportamento predominantemente hiperbólico, fato este que só foi constatado em altas concentrações de substrato (E), pois em baixas concentrações observou-se uma curva sigmóide. A análise da atividade catalítica na presença de diferentes íons (F) revelou que a PLA₂ BbtII-5 é dependente de Ca²⁺. A análise por Espectrometria de Massas por Maldi-Tof (G) obteve-se que a fração BbtII-5 possui massa molecular de 14,250kDa.

Por fim, os dados desse trabalho são de vital importância para futuros trabalhos acerca das aplicações farmacológicas e bioquímicas dessa nova PLA₂ até então não descrita na literatura.