



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE SAÚDE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Cleópatra Alves da Silva Caldeira

**Inibidores de quimotripsina do veneno de *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae):
Caracterização, atividade antimicrobiana e anti-*Trypanosoma cruzi***

Porto Velho – RO

2015

Cleópatra Alves da Silva Caldeira

**Inibidores de quimotripsina do veneno de *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae):
Caracterização, atividade antimicrobiana e anti-*Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Rondônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Andreimar Martins Soares

Porto Velho – RO

2015

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

C146i

Caldeira, Cleópatra Alves da Silva

Inibidores de quimotripsina do veneno de *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae): caracterização, atividade antimicrobiana e anti-*Trypanossoma cruzi*/Cleópatra Alves da Silva Caldeira. Porto Velho, Rondônia, 2015.
66 f. il.

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) Fundação Universidade Federal de Rondônia / UNIR.

Orientador: Prof. Dr. Andreimar Martins Soares

1. Veneno de *Bothrops atrox*. 2. Inibidores de quimotripsina. 3. Antimicrobianos. 4. Anti-*Trypanossoma cruzi*. 5. Cromatografia. 6. Espectrometria de massa. I. Martins Soares, Andreimar. II. Título.

CDU: 543.544.16

Bibliotecária Responsável: Cristiane Marina T. Girard CRB11/897

**Inibidores de quimotripsina do veneno de *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae):
Caracterização, atividade antimicrobiana e anti-*Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia para obtenção do título de Mestre.

Defesa Pública realizada em **10 de julho de 2015**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. ANDREIMAR MARTINS SOARES

(Presidente - Orientador - FIOCRUZ-RO)

Prof. Dr. JORGE LUIS LÓPEZ LOZANO

(Membro Titular - Fundação de Medicina Tropical do Amazonas)

Prof. Dr. CHRISTIAN COLLINS KUEHN

(Membro Titular - UNIR / DEPEMED)

“A ciência não é só compatível com a espiritualidade; é uma profunda fonte de espiritualidade.”

Carl Sagan

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, em especial a minha avó Leonilda Maria, ao meu irmão Mateus Caldeira, a minha tia Branca (Maria Aparecida), ao meu tio Nivaldo Silva e ao meu pai Clóvis Caldeira.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Andreimar M. Soares, pela orientação, confiança e apoio durante esta caminhada.

Ao Dr. Leonardo A. Calderon, pela orientação, parceria e amizade nos momentos difíceis.

Ao amigo Tiago Bispo pelo constante auxílio nos experimentos e nas brincadeiras cotidianas de laboratório.

A amiga Rafaela Diniz pela disposição em ajudar nos experimentos e pelas conversas esclarecedoras e construtivas.

Agradeço a minha amiga Jeane Moraes por estar sempre presente nas alegrias e tristezas corriqueiras, e também pela constante ajuda nas etapas deste trabalho.

Ao amigo Antonio Coutinho Neto pelas conversas e auxílio durante este trabalho.

Ao Dr. Rodrigo G. Stábeli, pela oportunidade concedida na iniciação científica, que me proporcionou seguir na ciência.

A Dra. Najla de Matos Benevides pela colaboração e auxílio nos testes antimicrobianos. Ao colega Rosimar Pires Esquerdo pela pronta ajuda durante os experimentos, com a ajuda também da colega Pricianny Souza.

*A pesquisadora Maria Celeste Vega Gomez e ao colega Jorge Alfonso que contribuíram com a realização dos testes *in vitro* com *T. cruzi*.*

Aos colegas do CEBio, Jéssica Amaral, Marjore Jéssica, Cláudia Siqueira, Anderson Makoto, Diana Butzke, Mauro Paloschi, Charles Boeno, Roniele Monteiro, George Azevedo, Rodrigo Simões, Leandro Dill, Kayena Delaix, Amy Grabner, Rudson Holanda.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para conclusão deste trabalho.

A CAPES, CNPq, e FINEP pela bolsa e apoio financeiro do projeto.

RESUMO

CALDEIRA, CLEÓPATRA ALVES DA SILVA. Inibidores de quimotripsina do veneno de *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae): Caracterização, atividade antimicrobiana e anti-*Trypanosoma cruzi*.

Os venenos de serpentes são compostos por uma complexa mistura de toxinas e outras substâncias bioativas abrangendo um amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas. Cerca de 90% do peso seco desses venenos é constituído de proteínas e peptídeos, englobando uma grande variedade de enzimas como proteases (metalo e serino), fosfolipases A₂, L-aminoácido oxidases, esterases e inibidores de serinoproteases. Os inibidores de serinoproteases do tipo quimotripsina presentes no veneno de serpentes têm demonstrado potencial aplicação na regulação de enzimas proteolíticas e por atuar como possíveis agentes antimicrobianos. O principal objetivo deste trabalho é identificar inibidores de quimotripsina presentes no veneno da serpente *Bothrops atrox*, com ação antimicrobiana e anti-*Trypanosoma cruzi*. Inicialmente, 10 mg do veneno de *B. atrox* foram solubilizados e aquecidos em uma solução ácida a 80°C por 30 min, e o sobrenadante aplicado na coluna C18 acoplada ao sistema HPLC, obtendo-se a eluição de cinco frações. Estas frações foram desidratadas e testadas em ensaios de inibição da quimotripsina, sendo que todas inibiram a ação desta enzima. As cinco frações foram analisadas por espectrometria MALDI-TOF MS onde observou-se a presença de peptídeos e proteínas entre as faixas de 733,63 a 48.443,3 Da, constatando-se que todas as frações apresentam proteínas com massa molecular semelhante a inibidores de serinoprotease do tipo quimotripsina. Na fração 1 foram detectadas um grupo de proteínas na faixa de 7.000 Da e outra de 9.107,70 Da com atividade inibitória de crescimento de *Staphylococcus aureus* e formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. A fração 2 apresentou proteínas na faixa de 13 a 14 kDa, que demonstrou a maior atividade contra o crescimento de *S. aureus* e *T. cruzi*, comparada as demais frações. Na fração 3, também foi observado a presença de duas proteínas: 8.528,68 e 23.555,52 Da, com atividade inibitória de *S. aureus* e *T. cruzi*. E a recromatografia da fração 3 apresentou por espectrometria de massa uma molécula com a massa de 8.527,88 Da e inibição de quimotripsina de 78%. As demais frações demonstraram uma maior variedade de peptídeos e proteínas, necessitando de etapas adicionais de purificação para o isolamento dos inibidores de quimotripsina. Neste estudo, relatou-se a primeira descrição de inibidores de quimotripsina presentes no veneno da serpente *B. atrox* com ação antimicrobiana contra *S. aureus* e anti-*Trypanosoma cruzi*, e estes achados abrem expectativas de utilização destes inibidores como agentes potencialmente terapêuticos.

Palavras Chave: Veneno de *Bothrops atrox*, Inibidores de quimotripsina, Antimicrobianos, anti-*Trypanosoma cruzi*, Cromatografia, Espectrometria de massa

ABSTRACT

CALDEIRA, CLEÓPATRA ALVES DA SILVA. Chymotrypsin inhibitors from *Bothrops atrox* snake venom (Serpentes: Viperidae): Characterization, antimicrobial and anti-*Trypanosoma cruzi* activity, 2015.

Snake venoms are composed of a complex mixture of toxins and other bioactive substances comprising a broad range of biological and pharmacological activities. About 90% of the dry weight of these snake venoms consists of proteins and peptides, encompassing a wide variety of enzymes such as proteases (metallo and serine), phospholipases A₂, L-amino acid oxidases, esterases and serine protease inhibitors. Chymotrypsin-type serine protease inhibitors present in snake venoms have demonstrated potential applications in the regulation of proteolytic enzymes and as potential antimicrobial agents. The main purpose of this study is to identify chymotrypsin inhibitors present in *Bothrops atrox* snake venom. In addition to evaluating the antimicrobial and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of these fractions. Initially, 10 mg of *B. atrox* snake venom was solubilized and heated in an acid solution at 80 °C for 30 minutes, centrifuged, and the supernatant was applied in a C18 column coupled to an HPLC system and five fractions were eluted. These fractions were dehydrated and tested in chymotrypsin inhibition assays and all fractions inhibited the action of this enzyme. The five fractions were analyzed by MALDI-TOF MS mass spectrometry, which showed the presence of peptides and proteins in the range from 733.63 to 48,443.3 Da, evidencing that all fractions have proteins with molecular masses similar to chymotrypsin-like serine protease inhibitors. In fraction 1 a group of proteins was detected in the range of 7,000 Da and another around 9,107.70 Da with inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* and *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Fraction 2 showed proteins at 13 and 14 kDa, which demonstrated higher activity against the growth of *S. aureus* and *T. cruzi*, compared to the other fractions. In fraction 3 the presence of two proteins was also observed at 8,528.68 and 23,555.52 Da, with inhibitory activity against *S. aureus* and *T. cruzi*. And rechromatography of fraction 3 showed by mass spectrometry a molecule with a mass of 8,527.88 Da and a chymotrypsin inhibition of 78%. The other fractions showed a wider variety of peptides and proteins, requiring additional purification to isolate chymotrypsin inhibitors. In this study, we report the first description of chymotrypsin inhibitors present in *B. atrox* snake venom with antimicrobial and anti-*Trypanosoma cruzi* action and these findings open the expectation to use these inhibitors as potential therapeutic agents.

Keywords: *Bothrops atrox* snake venom, Chymotrypsin inhibitors, Antimicrobials, Anti-*Trypanosoma cruzi*, Chromatography, Mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Serpente <i>Bothrops atrox</i> e sua distribuição geográfica na América do Sul.....	15
Figura 2	Perfil cromatográfico do veneno aquecido de <i>B. atrox</i> na coluna de fase reversa C18 Aeris.....	26
Figura 3	Perfil cromatográfico da fração 2 de <i>B. atrox</i> (R2) na coluna de fase reversa C12 Jupiter.....	27
Figura 4	Perfil cromatográfico da fração 3 de <i>B. atrox</i> (K1) na coluna de fase reversa C12 Jupiter.....	27
Figura 5	Atividade inibitória de quimotripsina para as cinco frações obtidas na cromatografia de fase reversa.....	28
Figura 6	Atividade inibitória de quimotripsina para a fração R2.....	28
Figura 7	Atividade inibitória de quimotripsina para a fração K1.....	29
Figura 8	Espectro de massa por MALDI-TOF da fração 1.....	30
Figura 9	Espectro de massa por MALDI-TOF da fração 2.....	30
Figura 10	Espectro de massa por MALDI-TOF da fração 3.....	31
Figura 11	Espectro de massa por MALDI-TOF da fração 4.....	31
Figura 12	Espectro de massa por MALDI-TOF da fração 5.....	32
Figura 13	Espectro de massa por MALDI-TOF da fração R2.....	33
Figura 14	Espectro de massa por MALDI-TOF da fração K1.....	33

Figura 15	Inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> testadas para as cinco frações de <i>B. atrox</i>	35
Figura 16	Inibição do crescimento de <i>E. coli</i> testadas para as cinco frações de <i>B. atrox</i>	36
Figura 17	Inibição do crescimento de <i>P. aeruginosa</i> testadas para as cinco frações de <i>B. atrox</i>	37
Figura 18	Perfis de inibição da atividade epimastigotas de <i>T. cruzi</i> testadas com as cinco frações do veneno de <i>B. atrox</i>	39

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Proteínas e peptídeos identificados nas frações de <i>B. atrox</i> com intensidade relativa superior a 10% obtidos por MALDI- TOF.....	34
Tabela 2	Inibidores de serinoproteases do tipo Kunitz encontrados em venenos de serpentes.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

BAPNA - Benzoil-D, L-Arginine-p-NitroAnilide

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CGEN - Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

TFA - Ácido Trifluoroacético

ACN - Acetonitrila

DMSO - Dimetil Sulfóxido

DP - Desvio Padrão.

GPNa - N-glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*, Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

LIT - *Liver Infusion Triptose*

MALDI-TOF - Matriz Assistida por Dessorção Ionização a Laser e Tempo de Voo de Massa em Espectrometria

MS - Espectrometria de Massa (*Mass Spectrometry*).

M/Z - Massa por Carga

PBS - *Phosphate Buffer Saline*, tampão fosfato salino

PM - Peso Molecular

PMSF - Fenilmetilsulfonilo

RP – *Reverse fase*, Fase Reversa.

RPM - Rotações por Minuto.

SA - Ácido Sinapínico.

SDS-PAGE - *Sodium DodecylSulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*, Eletroforese em Gel de Poliacrilamida- SDS

VB - Veneno Bruto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Venenos de Serpentes	14
1.2 Inibidores de proteases.....	16
1.2.1 Inibidores de Serinoproteases	17
1.2.2 Inibidores do tipo BTI Kunitz.....	19
2 OBJETIVO	21
2.1 Geral.....	21
2.2 Específicos	21
3 METODOLOGIA	22
3.1 Obtenção do veneno de <i>Bothrops atrox</i>	22
3.2 Quantificação das proteínas totais das frações de <i>B. atrox</i>	22
3.3 Fracionamento do veneno de <i>B. atrox</i>	22
3.4 Espectrometria de massa.....	23
3.5 Ensaio de inibição enzimática.....	23
3.6 Ensaios antimicrobianos	24
3.7 Ensaio anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
3.8 Análise estatística	25
4 RESULTADOS	26
4.1 Fracionamento e caracterização bioquímica.....	26
4.2 Caracterização biológica.....	34
4.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	34
4.2.2 <i>Escherichia coli</i>	36
4.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
4.2.4. Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
5 DISCUSSÃO	40
5.1 Fracionamento do veneno de <i>B. atrox</i> e caracterização bioquímica.....	40
5.2 Caracterização biológica.....	42
6 CONCLUSÕES	45
7 PERSPECTIVAS	46
8 REFERÊNCIAS.....	47
APÊNDICE A.....	57
APÊNDICE B	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Venenos de Serpentes

O surgimento de glândulas produtoras de veneno associado ao sistema de mordedura com inoculação representa uma importante inovação evolutiva, em comparação à captura e subjugação da presa por constrição, que adicionalmente contribuiu com a facilitação da digestão (FRY et al., 2003).

De acordo com Fry (2005), a evolução do veneno de serpentes ocorreu a partir de um processo pelo qual um gene que codifica uma proteína que participa de processos reguladores-chave, foi duplicada, sendo a cópia seletivamente expressa na glândula de veneno. A toxina recém-criada evolui por meio de vários eventos de duplicação, seguida pela supressão de algumas cópias e conversão de outras para cópias não-funcionais ou pseudogenes (FRY et al., 2003). Além da duplicação, ocorreram mutações que foram importantes na geração da diversidade de toxinas no veneno (FRY et al., 2008).

Em geral, o veneno das serpentes é composto de uma gama de proteínas com atividade enzimática, e outras não enzimáticas, que permitem a imobilização e digestão da presa. Os principais constituintes do veneno incluem: neurotoxinas, citotoxinas, cardiotoxinas, lectinas, fatores de crescimento de nervos (NGF), desintegrinas, peptídeos potenciadores de bradicinina, fosfolipases, metaloproteases, serinoproteases, fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, L-aminoácido oxidases (LAAO), catalases, ATPases, hialuronidasas e b-glucosaminidasas (TU, 1988; TU, 1996; MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000), incluindo inibidores de serinoproteases (CHANG et al., 1991; GUO et al., 2013a).

Os efeitos biológicos dos venenos de serpentes são complexos, devido a ação dos seus diversos componentes que podem agir em sinergismos propiciando maior eficiência, além de contribuir para aumento da toxicidade. De acordo com os seus efeitos tóxicos, os venenos de serpentes podem ser classificados como neurotóxicos e hemotóxicos. As serpentes da família Viperidae, composta por 329 espécies, sendo destas 44 do gênero *Bothrops* (REPTILE DATABASE, 2014), apresentam veneno hemotóxico composto por várias proteínas que desestruturam a função da cascata de coagulação, o sistema hemostático e a integridade do tecido, que se manifesta como hemorragia, sangue incoagulável e necrose local do tecido em vítimas por envenenamento (MARKLAND, 1998; FOX, SERRANO, 2005; CALVETE, 2009)

Os acidentes ofídicos representam 67,5 a 95% dos casos na Amazônia brasileira, sendo a maioria dos casos de envenenamentos registrados atribuída às serpentes da espécie *Bothrops atrox*, que possui alta adaptabilidade a ambientes de floresta modificados pela atividade humana, coloração críptica, comportamento agressivo (CAMPBELL; LAMAR, 2004; PARDAL et al, 2004; BERNARDE; GOMES, 2012). Sendo encontrada em florestas tropicais da América do Sul, compreendendo o Norte do Brasil e Bolívia, Leste dos Andes, Equador, Peru, Venezuela, Ilhas Trinidad, Sudeste da Colômbia e em toda a Guiana, Suriname e Guiana Francesa. (WÜSTER et al., 1996; CAMPBELL; LAMAR, 2004; NÚÑEZ et al., 2009; BERNARDE et al., 2012). Recentemente, Lira-da-Silva e colaboradores (2009) descreveram a distribuição de *B. atrox* na região Nordeste (Fig. 1).

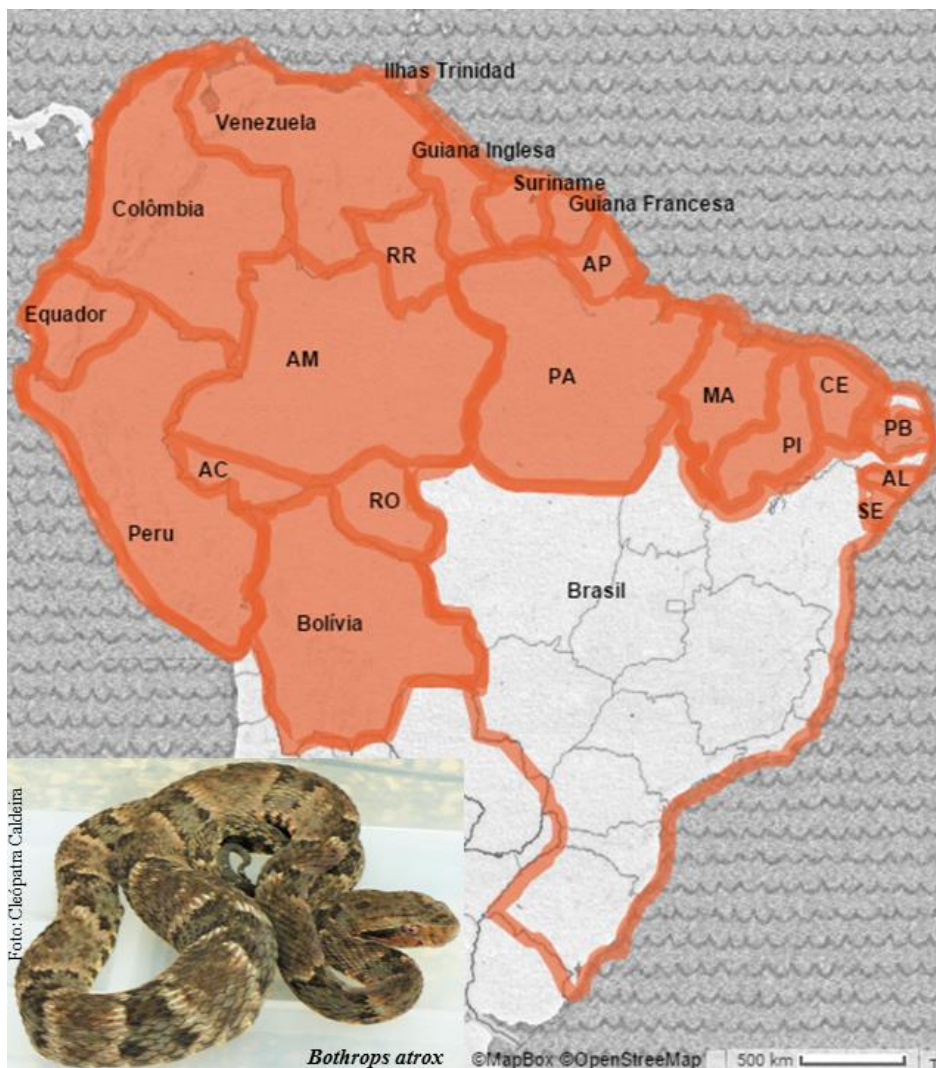


Figura 1. Serpente *Bothrops atrox* e sua distribuição geográfica na América do Sul. Espécie distribuída na Amazônia brasileira (marcação em laranja) e em partes da região nordeste nos estados: Rondônia, Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Sergipe, Alagoas, Paraíba, Ceará, Piauí e Maranhão e nos países Bolívia, Peru, Colômbia, Venezuela, Ilhas Trinidad, Guiana Inglesa, Suriname e Guiana Francesa (marcações em laranja) (LIRA-DA-SILVA et al., 2009; REPTILE DATABASE, 2014)

O envenenamento causado pela *B. atrox* provoca efeitos no local da picada, tais como edema e necrose local, além de efeitos sistêmicos, que incluem alterações na coagulação sanguínea e sangramento distante do local da picada (SILVA et al., 2003; GUERCIO et al., 2006). Sintomas como trombose e alteração da hemostasia são em grande parte causadas por proteínases, principalmente metalo e serinoproteases presentes nos venenos das serpentes do gênero *Bothrops* (MATSUI et al., 2000).

Na abordagem proteômica do veneno de *B. atrox* (adulto, jovem e filhote) Guercio e colaboradores (2006) identificaram várias proteínas: metaloproteases, lectinas, serinoproteases, fosfolipases A₂ (PLA₂), L-aminoácido oxidases, fatores de crescimento de nervos e vascular endotelial e proteínas secretoras ricas em cisteína.

No trabalho de Coutinho-Neto e colaboradores (2013) determinou-se a variação ontogenética dos venenos de *B. atrox* (adultos, jovens e de filhotes na localidade de Porto Velho-RO), por análises proteômicas e atividades biológicas. Sendo evidenciado que os venenos de serpentes jovens e filhotes neste estudo, apresentaram maior atividade fosfolipásica (hemolítica), hemorrágica, miotóxica, coagulante e atividade pró-coagulante sobre substrato cromogênico, em relação às serpentes adultas.

No estudo do transcriptoma de *B. atrox*, Neiva e colaboradores (2009) encontraram na glândula de veneno, 61,6% de metaloproteases, 14,6% de PLA₂, 8,2% de serinoproteases, 7,1% de BPPs, 4,8% lectinas tipo C, 1,4% de L-aminoácido oxidases, 1,0% de fatores de crescimento endotelial vascular, 0,5% de proteínas secretórias ricas em cisteínas e 0,5% de inibidores de PLA₂.

Outros trabalhos relatam a presença majoritária de proteases: metaloproteases e serinoproteases em serpentes do gênero *Bothrops* (KAMIGUTI et al., 1996; MATSUI et al., 2000; LÓPEZ-LOZANO et al., 2002; MORITA, 2004).

1.2 Inibidores de proteases

Os inibidores de proteases (IPs) são moléculas que diminuem ou bloqueiam a atividade de enzimas proteolíticas (BODE; HUBER, 1992), e podem ser encontrados em todo o reino animal e vegetal, atuando como reguladores endógenos de proteases, e na defesa de vegetais contra a infestação por insetos, ataques de predadores e infecção por microrganismos (HAQ et al., 2004; SANO et al., 2005). Os IPs estão presentes nas diferentes fases da vida vegetal, desde a germinação (SHEWRY; LUCAS, 1997), até o controle e desenvolvimento do

embrião (TANG et al., 1993). Em animais, os IPs participam da regulação da homeostase, digestão, na cascata de coagulação sanguínea, embriogênese e sistema nervoso (SANO et al., 2005).

Sendo subdivididos de acordo com a posição do sítio reativo, a especificidade inibitória, a similaridade da sequência primária, o número e a posição de pontes dissulfeto e a massa molecular (LASKOWSKI; KATO, 1980; KOIWA et al., 1997). Geralmente os IPs possuem massa molecular entre 6 e 50 kDa e podem ser constituídos de uma ou mais cadeias polipeptídicas. Além de apresentar grande estabilidade sob condições desnaturantes químicas e físicas (RICHARDSON, 1991).

Os inibidores de proteases estão sendo utilizados com fins terapêuticos no tratamento de doenças parasitárias como a malária (SILVA et al., 1996) e esquistossomose (BECKER et al., 1995), em doenças fúngicas causadas por *Candida albicans* (ABAD-ZAPATERO et al., 1996), infecções virais ocasionadas pelo HIV (WLODAWER et al., 1993), hepatite (LOVE et al., 1996) e herpes (GIBSON et al., 1997), e desordens inflamatória, imunológica, respiratória (BERNSTEIN et al., 1994; TANAKA et al., 1995), cardiovascular (STUBBS et al., 1993), doença de Alzheimer (VASSAR et al., 1999) e câncer (YAN et al., 1988).

O primeiro relato de inibidores de proteases em venenos de serpentes ocorreu em 1972 por Takahashi e colaboradores, que descreveram um novo polipeptídeo com atividade inibitória de calicreína, plasmina e tripsina, a partir do veneno da víbora *Russell*, ressaltando a presença desses inibidores em serpentes da família Viperidae e Elapidae. Em 1976, Iwagana e colaboradores relataram a presença de inibidores de proteases (calicreína, plasmina, tripsina e quimotripsina) nos venenos das serpentes da família Viperidae: *B. arietans*, *V. russelli* e *V. ammodytes* e Elapidae: *D. angusticeps*, *D. polylepis*, *H. haemachatus*, *N. haje*, *N. hannah* e *N. nivea*. Outros estudos abordam sobre o isolamento, caracterização e clonagem de inibidores de serinoproteases em serpentes (HE et al., 2008, LU et al., 2008), enfatizando sua importância em processos fisiológicos como na digestão e coagulação.

1.2.1 Inibidores de Serinoproteases

As serinoproteases são enzimas proteolíticas que exercem atividades no sistema biológico atuando como exopeptidases, endopeptidases e oligopeptidases (RAWLINGS; BARRETT, 1993). E estão presentes em diversos processos fisiológicos e biológicos, sendo relatadas na digestão, coagulação (DAVIE et al., 1991), fertilização (BABA et al., 1989),

ativação do sistema complemento durante a resposta imune (REID et al., 1986). Estas enzimas, já foram observadas em níveis desregulados, fora dos padrões normais biológicos (LESK; FORDHAM, 1996), como no caso do enfisema (WATOREK et al., 1989), em células tumorais em fase de metástase (HENDERSON et al., 1992) e na artrite (FROELICH et al., 1993).

Estudos com serinoproteases têm demonstrado que essas moléculas desempenham funções importantes no ciclo de vida de algumas classes de vírus, herpes, hepatite C e picornavírus (PATICK; POTTS, 1998). Testes clínicos realizados com inibidores demonstram grande eficácia como potentes antirretrovirais quimioterapêuticos, o que estimula a busca por inibidores de serinoprotease como alternativa para o tratamento dessas doenças. (PATICK; POTTS, 1998; AHMAD et al., 2008).

Em bactérias gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) e gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) encontra-se a serinoprotease denominada HtrA que está envolvida na virulência e resistência destas bactérias (BOUCHER et. al., 1996; RIGOULAY et. al., 2005). A HtrA foi descrita pela primeira vez em *Escherichia coli*, como responsável pela degradação anormal periplasmática das células hospedeiras (STRAUCH et al., 1989). Em alguns casos, a HtrA é exportada para fora da célula e auxilia na invasão do patógeno, o que torna a virulência exacerbada (SKORKO et al., 2013). Devido a ação na célula hospedeira, as serinoproteases HtrA de patógenos bacterianos são alvos de inibidores que visam bloquear a sua atividade proteolítica.

Silva-López e colaboradores (2007) demonstram a participação de serinoproteases em importantes fases do ciclo de vida de parasitos de importância médica, bem como a ação de inibidores que possam bloquear uma destas fases e impedir sua proliferação. Estudos com inibidores de serinoproteases de *Leishmania amazonensis* foram realizados em culturas de promastigotas, sendo demonstrado que a inibição destas serinoproteases leva à morte do parasito, pela deformação da bolsa flagelar e a formação de vesículas intracelulares, reforçando que essas moléculas são essenciais para a manutenção da sobrevivência do parasito.

Estudos com as serinoproteases presentes em *T. cruzi* relatam a sua ação em importantes etapas da sua proliferação, tais como, transdução de sinal disparados pelas enzimas secretadas pelo parasito por meio do reconhecimento de receptores na superfície da célula hospedeira, na atividade catalítica sobre componentes da matriz extracelular do tecido do hospedeiro vertebrado e na invasão do parasito pelo mecanismo dependente de lisossomos (BURLEIGH et al., 1997; CALER et al., 1998; 2000). Além disso, Oliveira (2012) descreve o

isolamento de serinoproteases de *T. cruzi* com massas moleculares de 70, 65,8 e 59 kDa, que evidenciaram sensibilidade a inibidores de serinoprotease (PMSF e aprotina), sugerindo possíveis alvos de inibidores.

A classe de inibidores de serinoproteases é a mais estudada e caracterizada, por apresentar ampla distribuição na natureza. Estão agrupados em 11 famílias, de acordo com a similaridade de sua sequência e no mecanismo de ligação à proteína (BODE; HUBER, 1992).

As principais famílias de inibidores de serinoproteases: Kunitz, Bowman-Birk, Taumatina, Superfamília de cereais, Batata I, Batata II e Ragi I-2 milho (BIRK, 1985; RITONJA et al., 1990; KELLOFF et al., 2000). Dentre estas famílias de inibidores de serinoproteases, somente os inibidores do tipo Kunitz foram encontrados em venenos de serpentes.

1.2.2 Inibidores do tipo BTI Kunitz

Em 1936, Kunitz e Nortrop iniciaram os estudos com o inibidor de tripsina bovina extraído do pâncreas bovino, que recebeu o nome de BPTI – *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*, com isso impulsionou o interesse em inibidores de proteases (KUNITZ; NORTHROP, 1936).

Os membros da família BPTI Kunitz apresentam o mesmo arranjo global característico altamente adaptável, pois compartilham um alto grau de similaridade sequencial e estrutural, o que faz com que todos exibam uma faixa enorme de funcionalidades e especificidades (BODE; HUBER, 1992).

A família BPTI Kunitz apresenta maior atividade inibitória dentre a classe de serinoproteases: tripsina, quimotripsina e subtilisina (PARK et al., 2005). Além de inibir outras proteases como a catepsina D da classe aspártico-proteases, e a papaína da classe cisteíno-protease (RITONJA et al., 1990).

Os inibidores Kunitz/BPTI presentes no veneno de serpente foram divididos em dois grupos neurotóxicos e não neurotóxicos, de acordo com as suas funções (CARDLE; DUFTON, 1997; GUO et al., 2013 a, b). Os inibidores Kunitz/BPTI de serpentes não neurotóxicos, incluem inibidores de tripsina e quimotripsina. Outro grupo de inibidores Kunitz/BPTI neurotóxicos de serpentes agem como bloqueadores dos canais K^+ e Ca^{2+} . Este grupo inclui α -dentrotoxina, K toxina, toxina I, calcicludine, e a subunidade β -bungarotoxina (HARVEY; ANDERSON, 1991).

Em serpentes, os inibidores BPTI Kunitz são compostos por polipeptídios com cerca de 60-66 aminoácidos, com massa molecular em torno de 6 a 8 kDa apresentando 3 pontes dissulfetos conservadas (CHEN, 2001). Porém, o levantamento bibliográfico realizado para este estudo, demonstra que os inibidores do tipo Kunitz de serpentes, podem apresentar de 11 a 252 aminoácidos, com massas moleculares que podem variar de 1.228 a 27.571 Da (Tabela 2, apêndices).

Vários trabalhos relatam a presença desses inibidores em venenos de serpentes da família Viperidae e Elapidae (TAKAHASHI et al., 1974; IWANAGA, et al., 1976; STRYDOM, 1976; JOUBERT, STRYDOM, 1978; LIU et al., 1983; RITONJA et al., 1983 a,b; SHAFQAT et al., 1990 a,b; SIDDIGI et al., 1991; WU et al., 1998; CHANG et al., 2008; HE et al., 2008; LU et al., 2008; INAGAKI et al., 2012). Recentemente, McGivern e colaboradores (2014) realizaram análises de transcriptoma das glândulas de veneno das serpentes *Hypsiglena* e *Boiga irregularis*, ambas da família Colubridae, e encontraram inibidores do tipo Kunitz, além de outras proteínas e neurotoxinas.

Alguns estudos relatam a purificação, caracterização e clonagem de inibidores BPTI Kunitz a partir do veneno de serpente. Em 2001, Chang e colaboradores isolaram um inibidor de quimotripsina tipo BPTI Kunitz presente no veneno de *Ophiophagus hannah*. Posteriormente, Guo e colaboradores (2013a) descreveram a purificação e clonagem de um inibidor de quimotripsina da serpente *Daboia russelii siamensis*. Além disso, autores publicaram outro estudo semelhante onde descrevem a caracterização de um inibidor de tripsina e quimotripsina tipo Kunitz desta mesma serpente (GUO et al., 2013b).

Os inibidores de serinoproteases do tipo quimotripsina da família Kunitz estão cada vez mais em evidência, pelo fato de atuarem em processos de coagulação, fibrinólise e inflamação, e o seu mecanismo de ação ainda é desconhecido. Em serpentes das famílias Viperidae, Elapidae e Colubridae, vários inibidores de serinoproteases foram isolados e caracterizados. Porém, ainda não foi relatado a presença de inibidores de serinoproteases do tipo quimotripsina no veneno da serpente *B. atrox*, sendo este trabalho, a primeira descrição de inibidores de quimotripsina presentes no veneno desta serpente, com ação antimicrobiana e anti-*Trypanosoma cruzi*.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

O presente estudo propõe a identificação de inibidores de quimotripsina presentes no veneno de *Bothrops atrox* e avaliação da atividade antimicrobiana e anti-*Trypanosoma cruzi* das frações do veneno que inibiram a quimotripsina.

2.2 Específicos

Fracionar o veneno de *B. atrox* por cromatografia de fase reversa;

Obter a massa molecular exata dos inibidores de quimotripsina presentes nas frações;

Caracterizar a atividade inibitória de quimotripsina nas frações do veneno;

Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações de *B. atrox* sobre as cepas bacterianas de referência depositadas na ATCC;

Avaliar o possível efeito citotóxico das frações de *B. atrox* sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção do veneno de *Bothrops atrox*

O veneno da serpente *Bothrops atrox* foi obtido no Banco de Venenos do Centro de Estudos em Biomoléculas Aplicadas a Saúde - CEBio, a partir de uma mistura de venenos de vários exemplares adultos coletados na localidade de Porto Velho-RO, com a licença número 27131-1 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e 010627/2011-1 do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN).

3.2 Quantificação das proteínas totais das frações de *B. atrox*

Os reagentes utilizados para quantificação de proteínas foram o *DC Protein Assay Kit da Bio-Rad*, composto dos Reagentes A e B, que segue o princípio de Lowry (1951), com modificações. Nos ensaios utilizou-se 10 µL da amostra a ser analisada juntamente com 100 µL do Reagente A e por fim adicionou-se 800 µL do Reagente B, incubou-se por 15 minutos em ambiente escuro e procedeu-se a leitura no espectrofotômetro *Biomate 3*, seguindo como base o manual de instruções *DC protein assay da Bio-rad*, 2014.

Uma curva padrão foi preparada utilizando BSA (2mg/mL), com concentrações variando de 0,125 a 1,5 mg/mL. A solução proteica (1 mL) foi incubada por 10 minutos, em temperatura ambiente. A leitura foi realizada no espectrofotômetro *Biomate 3* configurado para o comprimento de onda de 750 nm.

3.3 Fracionamento do veneno de *B. atrox*

Para o fracionamento do veneno de *B. atrox* utilizou-se 7 mg que foram solubilizados em uma solução 0,4% de TFA e submetido ao aquecimento durante 30 minutos a 80°C. Centrifugou-se esta solução a 13.000 *xg* por 15 minutos, e posteriormente, foi coletado o sobrenadante correspondente as proteínas termo resistentes, enquanto que o precipitado com as demais proteínas desnaturadas foi descartado. O sobrenadante foi aplicado na coluna C18 acoplada ao HPLC. A solução de equilíbrio utilizada foi TFA 0,1% solução (A) e a solução (B) acetonitrila 99,9%/TFA 0,1%, fluxo 0,75 mL/min., gradiente segmentado em 4 passos: 30, 50, 70 e 100% da solução B.

3.4 Espectrometria de massa

Para as análises de massa/carga dos peptídeos e proteínas presentes nas cinco frações oriundas da cromatografia em coluna C18 utilizou-se o equipamento de espectrometria de massa por dessorção assistida por ionização a laser da matriz (MALDI), com dois analisadores TOF (tempo de voo) (AXIMA TOF-TOF Shimadzu). As amostras foram preparadas utilizando-se 0,5 μL de solução de matriz o ácido- α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) para a análise de peptídeos e o ácido sinapínico (SA) para a análise proteínas, seguida da aplicação de 0,5 μL da amostra e novamente a adição da matriz diretamente na placa do aparelho. Os padrões utilizados para a calibração do aparelho para análise em baixa massa constaram de uma mistura de quatro peptídeos com massas moleculares conhecidas: Bradicinina 756,3919 Da; Angiotensina I 1295,6775 Da; Insulina bovina 3493,6435 Da e ACTH 2092,0789 Da. Para a calibração em alta massa foram utilizados a mistura dos padrões: Citocromo 12.361,96 Da; Apomioglobina 16.952,27 Da; Aldolase 39.211,28 Da e Albumina bovina 66.429,09 Da. Após a secagem das amostras na placa, esta foi elevada à câmara de vácuo do aparelho AXIMA TOF-TOF e analisadas.

3.5 Ensaio de inibição enzimática

Para determinação da atividade inibitória das cinco frações do veneno aquecido de *B. atrox* sobre a quimotripsina utilizou-se a metodologia proposta por Calderon (2004) com modificações. Foram realizados ensaios de reação em triplicata onde 100 μL de cada amostra na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ em tampão Tris-HCl 0,05 M; CaCl_2 20 mM pH 7,6 foi adicionado a 100 μL de solução de α -quimotripsina pancreática bovina (630 $\mu\text{g/mL}$), seguido de incubação por 10 minutos a 37°C. Posteriormente, adicionou-se 500 μL de solução de substrato GPNa (400 $\mu\text{g/mL}$) diluído em tampão Tris-HCl 0,05 M; CaCl_2 20 mM pH 7,6. A reação ocorreu em temperatura ambiente por 15 minutos e foi interrompida com a adição de 100 μL de ácido acético 30% (v/v). Controle negativo: 100 μL de tampão Tris-HCl 0,05 M; CaCl_2 20 mM pH 7,6 juntamente com 100 μL da solução de enzima α -quimotripsina pancreática bovina, incubou-se por 10 minutos a 28°C e em seguida adicionou-se 500 μL de solução de substrato GPNa (400 $\mu\text{g/mL}$), e como controle positivo utilizou-se um inibidor irreversível de serinoprotease, o PMSF, no volume de 100 μL na mesma concentração das amostras de 50 $\mu\text{g/mL}$, seguida da adição de 100 μL da enzima α -quimotripsina pancreática

bovina (630 µg/mL). Após 10 minutos de incubação foi adicionado 500 µL de solução de substrato GPNa (400 µg/mL). Duração total de reação foi de 30 minutos.

3.6 Ensaios antimicrobianos

Os ensaios foram realizados em colaboração com a pesquisadora Dr^a Najla Benevides Matos no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM/Fiocruz Rondônia).

A atividade antimicrobiana foi definida pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) conforme o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2009), com adaptações, e refere-se a menor concentração das frações que podem inibir a proliferação bacteriana. A CIM foi determinada por teste de suscetibilidade de micro diluição, as bactérias utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Todas as cepas bacterianas foram cultivadas em caldo *Luria Bertani* (LB) durante 24 horas (fase exponencial) e ajustado a uma absorbância de turvação correspondente a 0,5 da escala de *McFarland*, que corresponde a $1,5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Cerca de 100 µL de cada uma das cinco frações do veneno de *B. atrox* nas diferentes concentrações (100 - 12,5 µg/mL) foram inoculadas juntamente com 100 µL ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL) de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* por vez, em microplacas de 96 poços por 24 horas a 37°C. Somente a fração 3 na concentração de 3,125 – 25 µg/mL foi diferente das demais frações, devido à baixa quantidade de proteínas. Para o controle negativo foi utilizado 100 µL de suspensão bacteriana + 100 µL do caldo LB, enquanto que o controle positivo foi composto de 100 µL da cultura de bactérias + 100 µL do antibiótico cloranfenicol (100 µg/mL) e o branco utilizado no experimento foi somente o caldo LB (200 µL). A inibição do crescimento bacteriano foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 630 nm na leitora de placas (TC 96 Elisa Microplate Reader).

3.7 Ensaio anti-*Trypanosoma cruzi*

Os testes contra cepas CL-B5 de *T. cruzi* foram realizados em colaboração com a pesquisadora Maria Celeste Vega Gomez, juntamente com o aluno Jorge Alfonso do *Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica* (CEDIC/Paraguay).

Para o estudo *in vitro* com as amostras de venenos, foi utilizado a cepa CL-B5 de *T. cruzi* transfectada com o gene β -galactosidase (*lacZ*) de *Escherichia coli*. As epimastigotas foram cultivadas a 28 °C em caldo LIT durante 72 horas com 10% de soro fetal bovino, e coletadas durante a fase de crescimento exponencial. O ensaio epimastigota de susceptibilidade foi realizado em microplacas de 96 poços com culturas que não atingiram a fase estacionária como descrito por Vega e colaboradores (2005). As epimastigotas foram aplicadas em $2,5 \times 10^5$ mL⁻¹ em 200 μ L de meio LIT. As placas foram incubadas com diferentes concentrações das cinco frações do veneno de *B. atrox* (100 – 3,12 μ g/mL), e incubadas a 37°C durante 6 horas e, em seguida, foram lidas a 595 nm. Cada fração foi testada em triplicata e como controle positivo o benznidazol (100 μ g/mL) e controle negativo utilizou-se o meio de cultura com os parasitas. A eficácia de cada composto foi calculada estimando-se a percentagem de atividade antiepimastigota (%AE). Reagentes utilizados para o experimento clorofenol vermelho β -D galactopiranoside (CPRG) dissolvido em 0,9% de Triton X-100 (pH 7,4).

3.8 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm SEM, em triplicata, para cada ensaio. A significância estatística dos resultados foi avaliada por meio do teste Anova, seguido do teste de Bonferroni, usando o programa *GraphPad Prism 5.0*. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Fracionamento e caracterização bioquímica

Após o aquecimento do veneno *B. atrox* (10 mg/mL em TFA 0,4%) a 80°C por 30 minutos, seguido de 15.000 *xg*, o sobrenadante foi submetido a cromatografia de fase reversa em coluna C18 em sistema HPLC, resultando em cinco frações majoritárias eluídas em gradiente descontínuo de ACN: Fração 1, 30%; fração 2, 3 e 4, 50% e fração 5, 70% de ACN (Fig. 2).

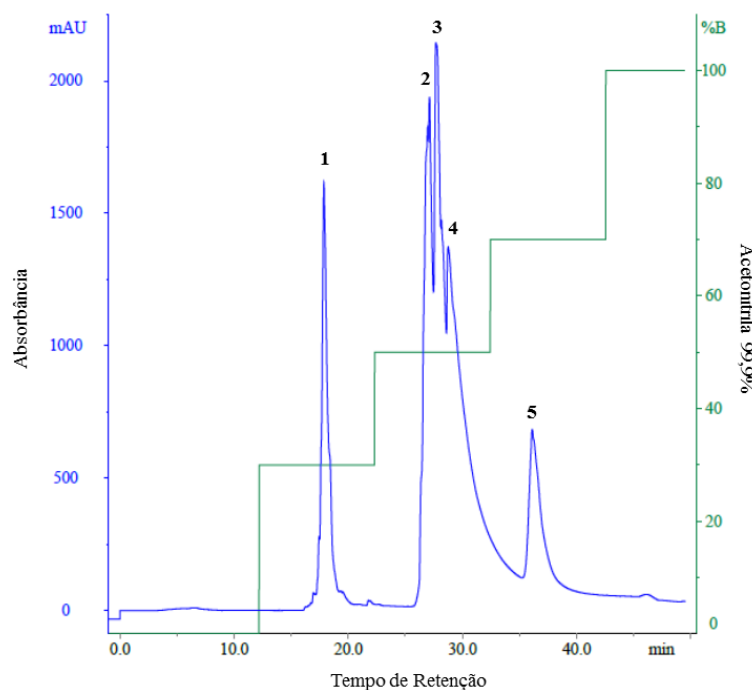


Figura 2. Perfil cromatográfico do veneno aquecido de *B. atrox* na coluna de fase reversa C18 Aeris. Cerca de 7mg do veneno foram solubilizados em TFA 0,4% e aquecido a 80°C por 30 minutos. As soluções utilizadas durante a cromatografia: TFA 0,1% (Solução: A) e ACN 99,9%/TFA 0,1% (Solução B). Foram obtidas cinco frações. Absorbância analisada em 280 nm, fluxo de 0,75 mL/min, gradiente segmentado em 4 passos: 30, 50, 70 e 100% da solução B.

A frações 2 e 3 foram submetidas a recromatografia em coluna C12 Jupiter com gradiente linear de ACN, afim de separar as proteínas com maior eficiência (Fig. 3 e 4). Em ambas, obteve-se picos majoritários, que foram desidratados e quantificados. Posteriormente, analisados no espectrômetro de massa e testados em ensaios de inibição enzimática de quimotripsina.

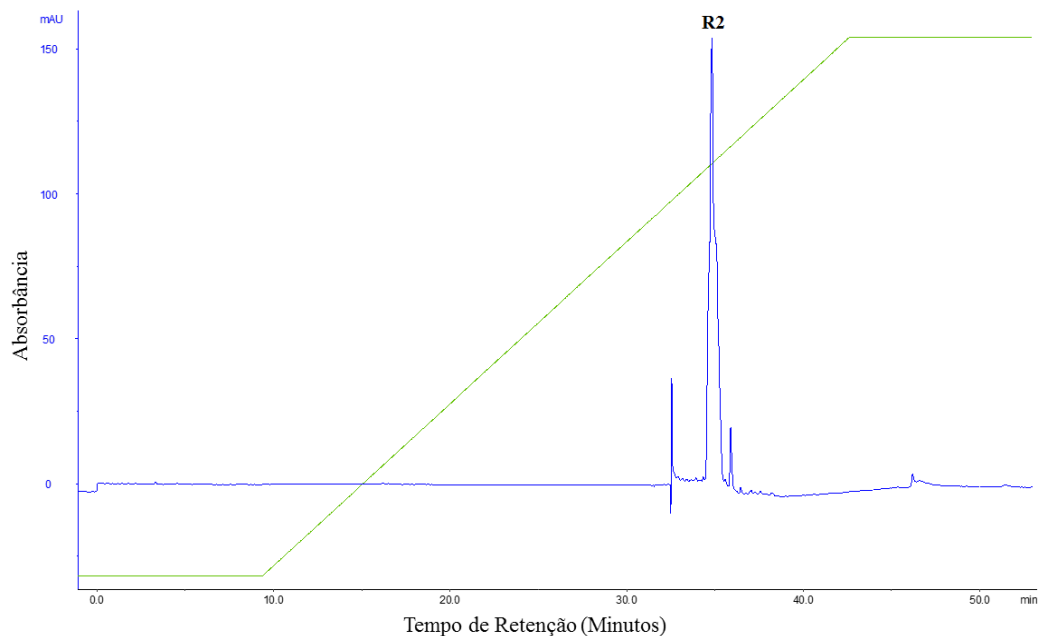


Figura 3. Perfil cromatográfico da fração 2 de *B. atrox* (R2) na coluna de fase reversa C12 Jupiter. As soluções utilizadas durante a recromatografia: TFA 0,1% (Solução: A) e ACN 99,9%/TFA 0,1% (Solução B). Foi obtida a fração principal R2. Absorbância analisada em 280 nm, fluxo de 1mL/min, gradiente linear de ACN.

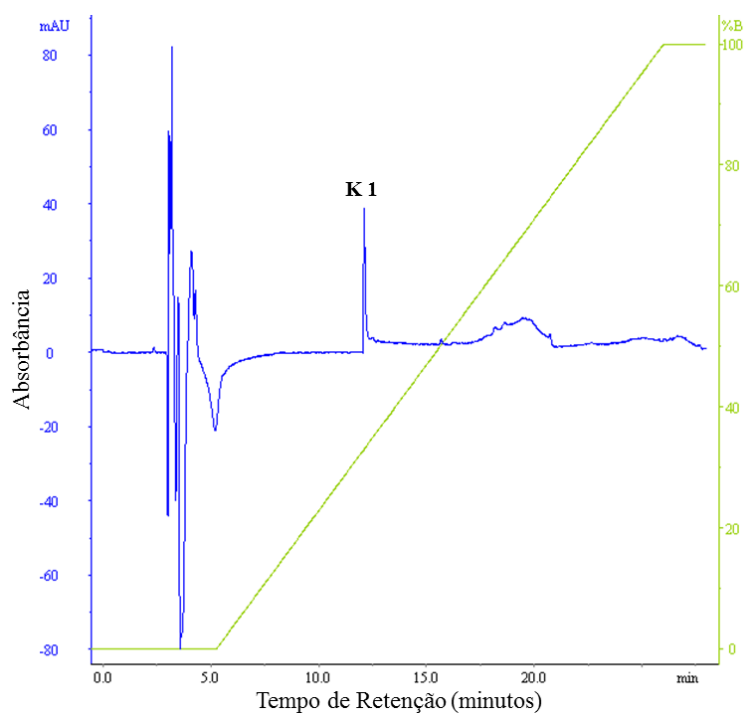


Figura 4. Perfil cromatográfico do veneno da fração 3 de *B. atrox* (K1) na coluna de fase reversa C12 Jupiter. As soluções utilizadas durante a cromatografia: TFA 0,1% (Solução: A) e ACN 99,9%/TFA 0,1% (Solução B). Foi obtida a fração principal denominada K1. Absorbância analisada em 280 nm, fluxo de 1 mL/min, gradiente linear.

As cinco frações foram desidratadas em evaporador centrífugo e submetidas a ensaio de inibição da hidrólise de GPNa por quimotripsina bovina (Sigma–Aldrich), revelando a presença de atividade inibitória em todas as frações: 59; 51; 37; 38 e 37%, para as frações de 1 a 5, respectivamente. PMSF foi utilizado como controle positivo apresentando 92% de inibição, e para o controle negativo utilizou-se a quimotripsina com o substrato (GPNa) (Fig. 5, apêndices A)

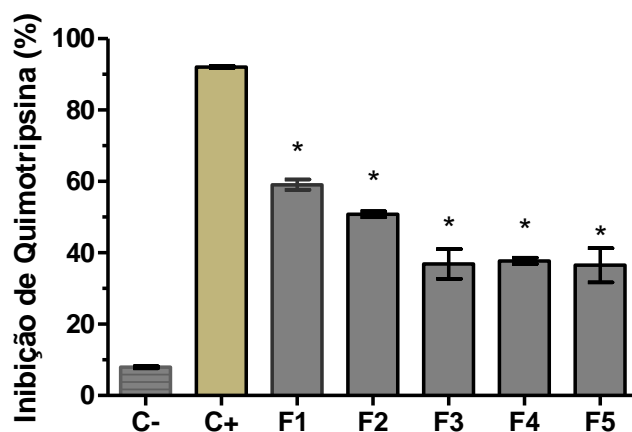


Figura 5. Atividade inibitória de quimotripsina para as cinco frações obtidas na cromatografia de fase reserva. Controle negativo (C-): Quimotripsina (630 $\mu\text{g/mL}$) + GPNa (400 $\mu\text{g/mL}$) + Tampão Tris-HCl; Controle positivo (C+): Quimotripsina + PMSF (50 $\mu\text{g/mL}$) + GPNa. As frações (F1 a F5) foram testadas na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. A reação foi encerrada com adição de ácido acético 30%. O gráfico apresenta a média \pm SEM (n=3). *p < 0,05 comparado com o controle positivo.

As frações 2 e 3 foram recromatografadas na coluna C12, denominadas de R2 e K1, foram testadas em ensaios de inibição de quimotripsina, em concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$ e promoveram a inibição de 78% e 64%, respectivamente (Fig. 6 e 7).

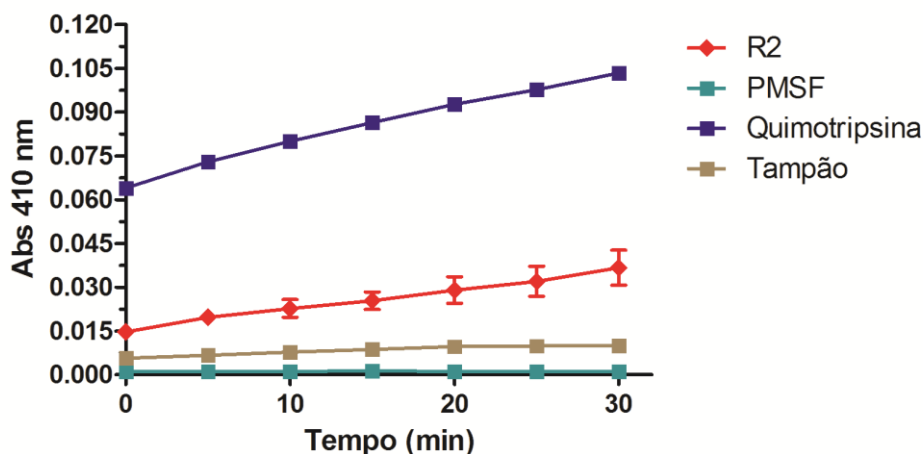


Figura 6. Atividade inibitória de quimotripsina para a fração R2. Controle negativo (C-): Quimotripsina (100 $\mu\text{g/mL}$) + GPNa (25 $\mu\text{g/mL}$) + Tampão Tris-HCl; Controle positivo (C+): Quimotripsina + PMSF (25 $\mu\text{g/mL}$) + GPNa. A fração K1 foi testada na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$.

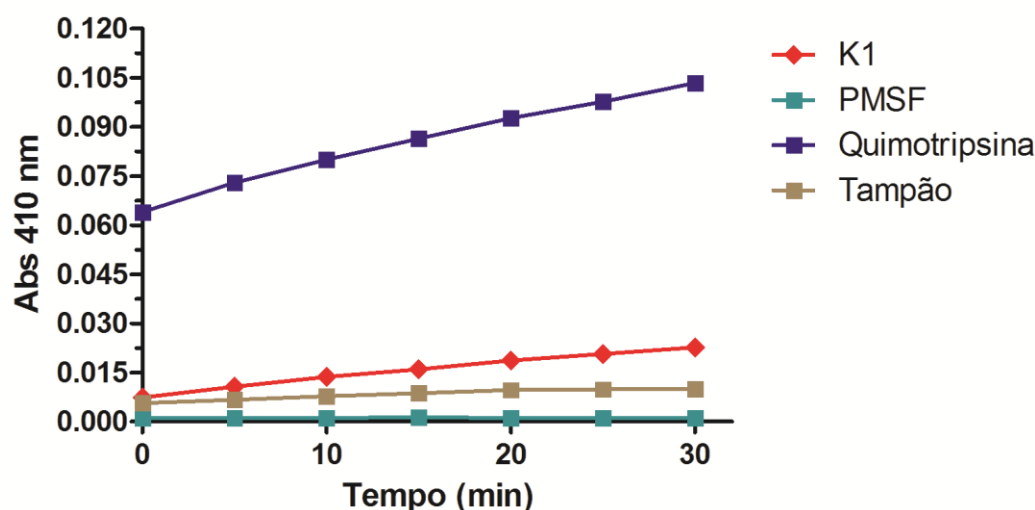


Figura 7. Atividade inibitória de quimotripsina para a fração K1. Controle negativo (C-): Quimotripsina (100 µg/mL) + GPNa (25 µg/mL) + Tampão Tris-HCl; Controle positivo (C+): Quimotripsina + PMSF (25 µg/mL) + GPNa. A fração K1 foi testada na concentração de 25 µg/mL.

Visando avaliar o conteúdo de peptídeos e proteínas de cada fração, estas foram submetidas a análise em espectrometria de massa MALDI-TOF, utilizando α -ciano como matriz de ionização para peptídeos e ácido sinapínico para proteínas. As amostras apresentaram conteúdo distinto de peptídeos e proteínas (Tabela 1). A fração 1 apresentou isoformas com 7.137,47; 7.419,52; 7.622,14 Da e outra proteína com 9.107,70 Da, (Fig. 8). A fração 2 apresentou uma família de proteínas na faixa de massa de 13 a 14 kDa (Fig. 9). A fração 3 apresentou duas proteínas: 8.528,68 e 23.555,52 Da (Fig. 10). A fração 4 apresentou proteínas de 5.171,55 a 48.443,29 Da (Fig. 11A) e 22.785,54 a 48.443,29 Da (Fig. 11B). A fração 5 apresentou peptídeos de 733,63 a 5.196,93 Da (Fig. 12A), e proteínas de 7.337,67 a 29.467,37 Da (Fig. 12B). Os valores demonstrados nos espectros representam a relação massa/carga (m/z), e foram convertidos para a notação em Dalton (Da), na tabela 1.

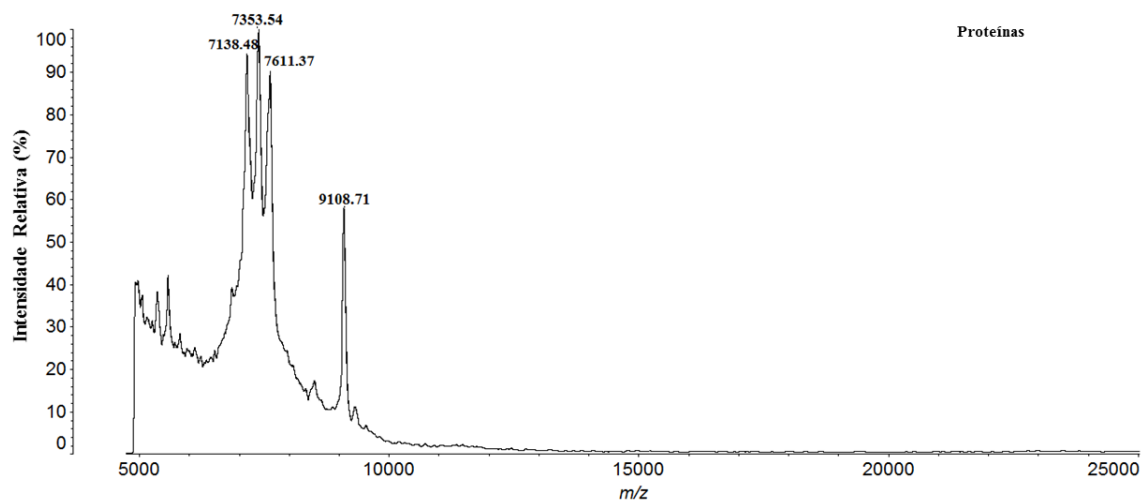


Figura 8. Espectro de massa MALDI-TOF da fração 1. Análise em modo linear abrangendo na faixa entre 5.000 a 25.000 m/z , apresentando proteínas: 7.137,47; 7.419,52; 7.622,14 e 9.107,70 Da. Não foi observada a presença de peptídeos e proteínas entre 700 a 5.000 e acima de 25.000 m/z .

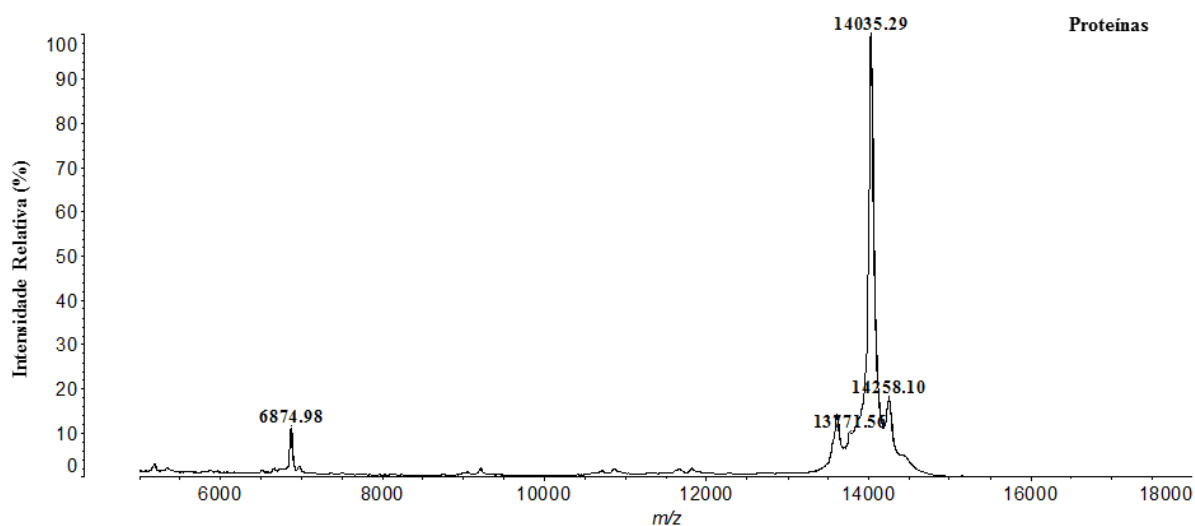


Figura 9. Espectro de massa MALDI-TOF da fração 2. Análise em modo linear abrangendo na faixa entre 6.000 a 18.000 m/z , apresentando proteínas entre 6.873,97 a 14.257,09 Da. Não foi observada a presença de peptídeos e proteínas entre 700 a 5.000 e acima de 18.000 m/z .

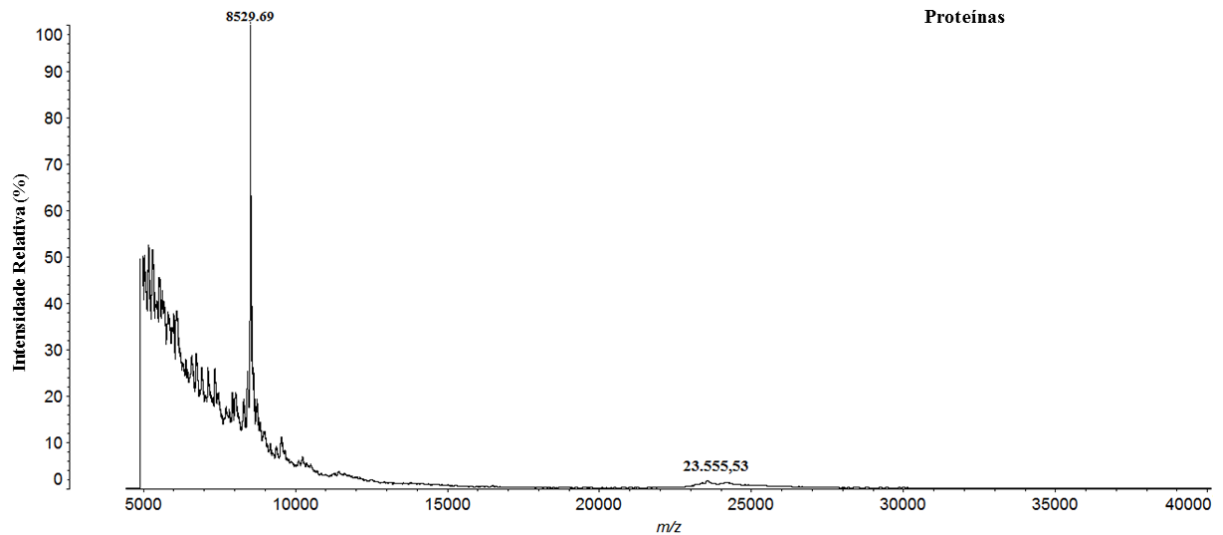


Figura 10. Espectro de massa MALDI-TOF da fração 3. Análise em modo linear abrangendo na faixa entre 5.000 a 40.000 m/z , apresentando duas proteínas: 8.528,68 e 23.555,52 Da. Não foi observada a presença de peptídeos e proteínas entre 700 a 5.000 e acima de 40.000 m/z .

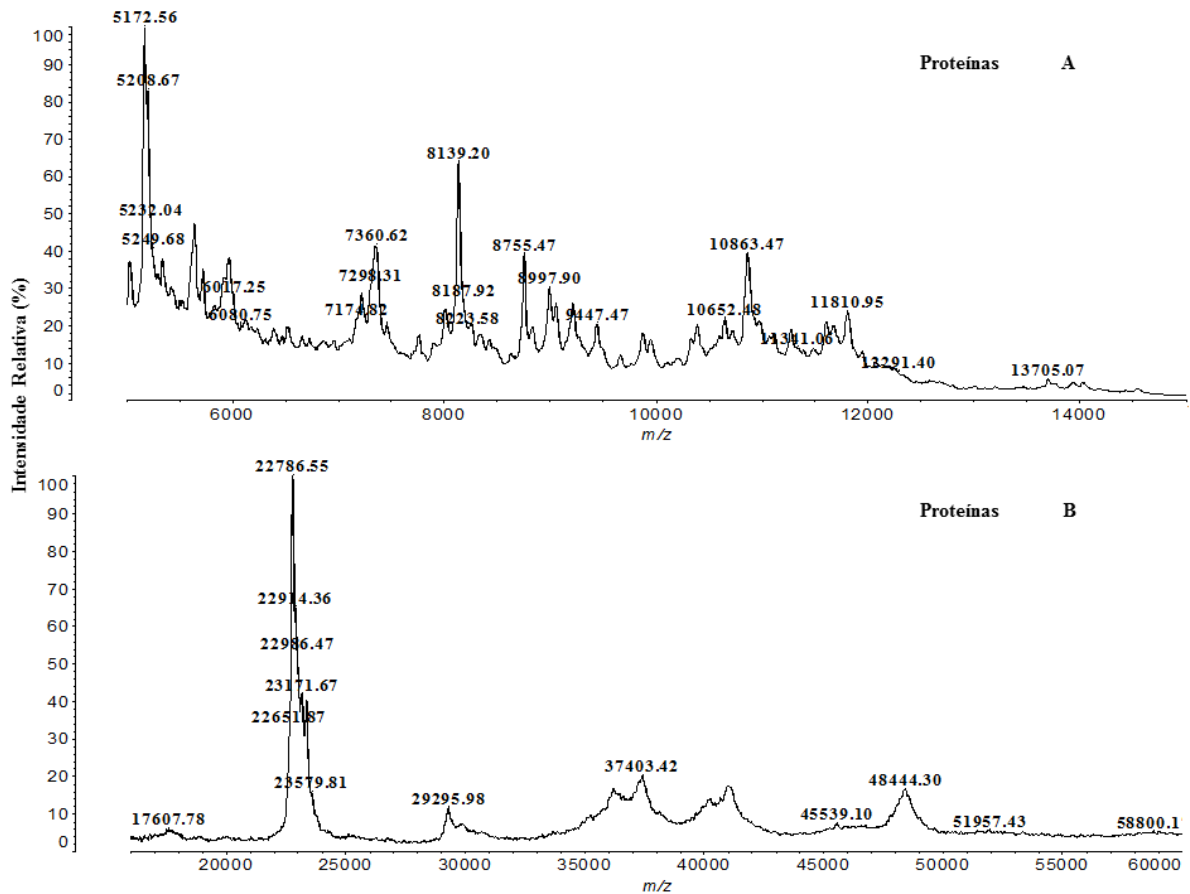


Figura 11. Espectro de massa MALDI-TOF da fração 4. Análise em modo linear abrangendo na faixa entre 5.000 a 16.000 m/z (A) e 16.000 a 60.000 m/z (B), apresentando grande diversidade de proteínas. Não foi observada a presença de peptídeos e proteínas entre 700 a 5.000 m/z .

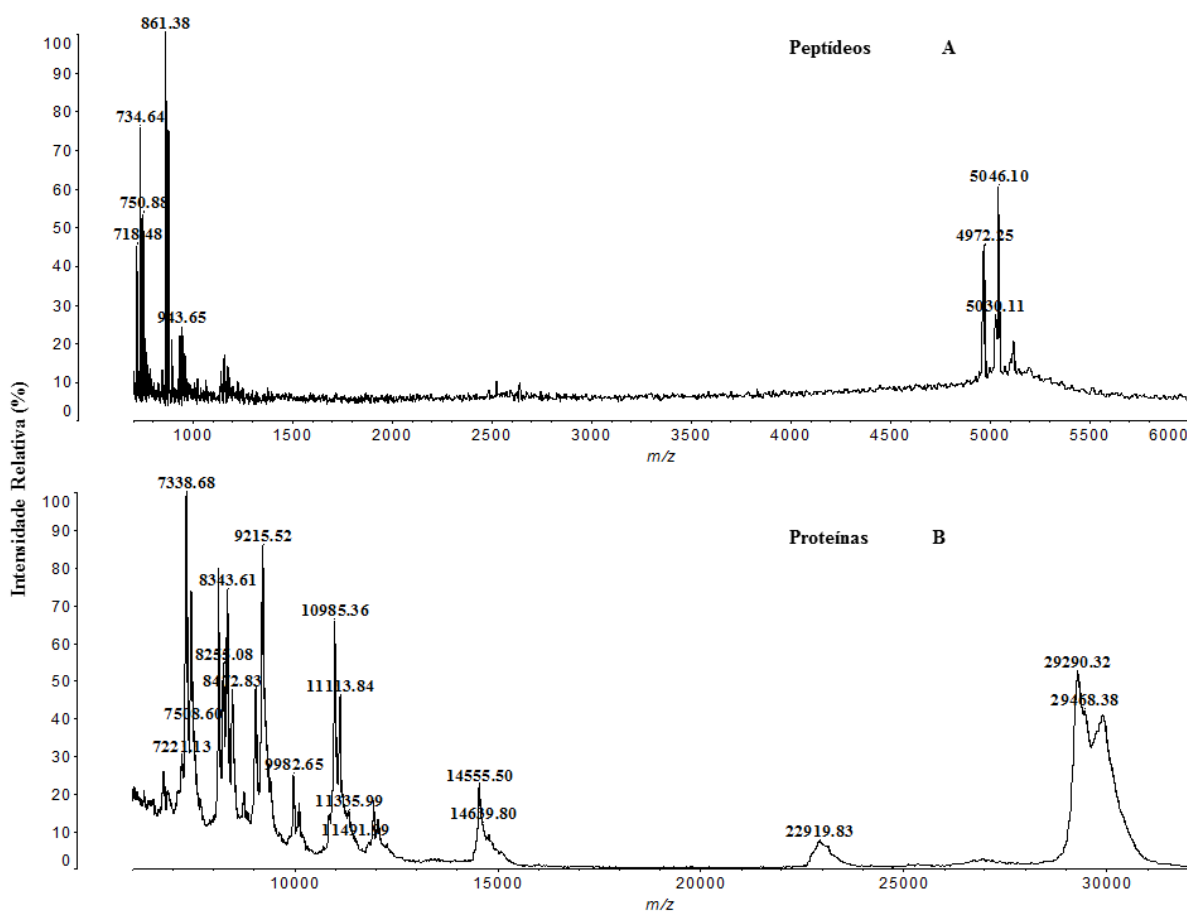


Figura 12. (A) Espectro de massa MALDI-TOF da fração 5. Análise em modo reflectron na faixa de massa entre 700 a 6.000 m/z , apresentando peptídeos entre 733,63 a 5.196,93 Da. **(B) Espectro de massa MALDI-TOF da fração 5 em modo linear** abrangendo na faixa entre 7.000 a 30.000 m/z , apresentando proteínas entre 7.337,53 a 29.467,37 Da. Não foi observada a presença de peptídeos e proteínas entre 6.000 a 7.000 m/z e acima de 30.000 m/z .

A fração 2 submetida a recromatografia na coluna C12, a R2 apresentou um conjunto de proteínas na faixa de 13 a 14 kDa, além de um íon dupla carga de 6874 Da, referente a proteína de 13.750,64 Da (Fig.13).

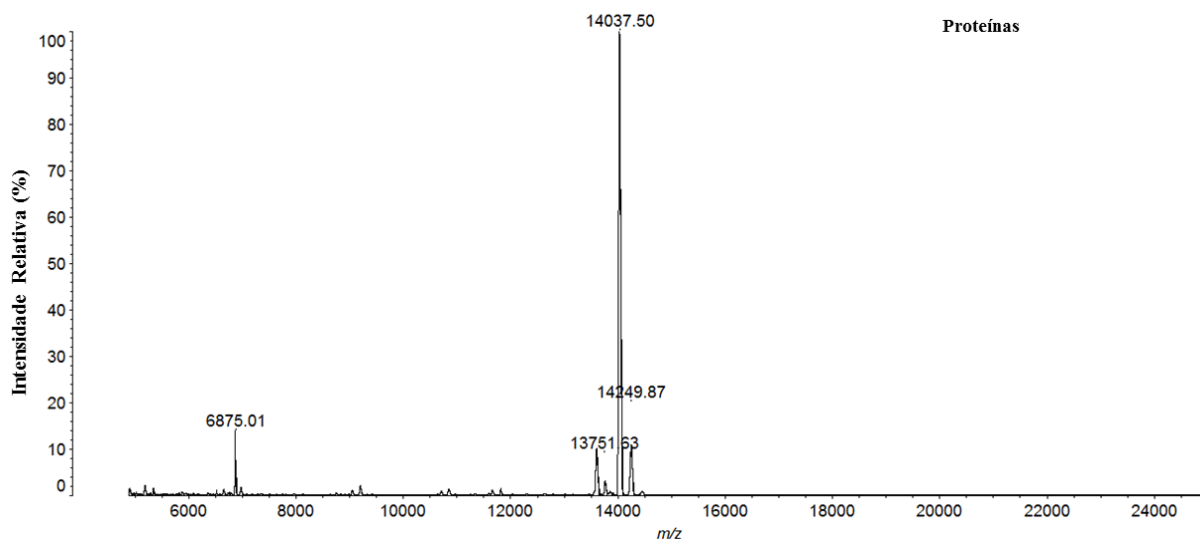


Figura 13. Espectro de massa MALDI-TOF da fração R2. Análise em modo linear abrangendo na faixa entre 6.000 a 25.000 m/z, apresentando proteínas: 13.750,62 e seu íon dupla carga de 6.974 Da; 14.036,49; 14.249,86 Da. Não foi observada a presença de peptídeos e proteínas entre 700 a 5.000 m/z e acima de 24.000 m/z.

A fração 3, também submetida a recromatografia na coluna C12, denominada K1 demonstrou na análise por espectrometria de massa, uma proteína de 8.527,88 Da.

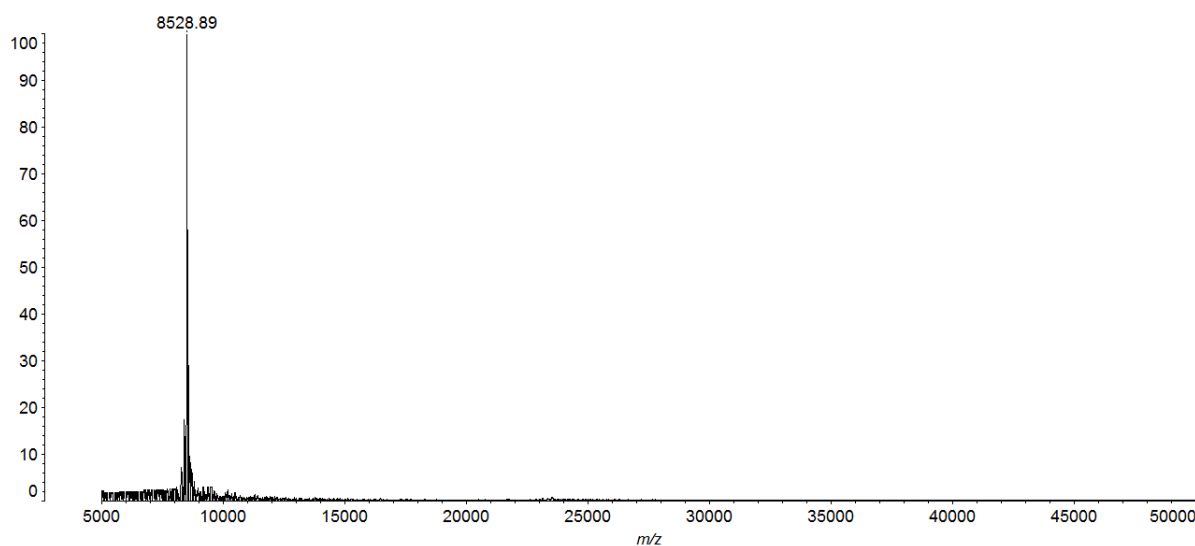


Figura 14. Espectro de massa MALDI-TOF da fração K1. Análise em modo linear abrangendo na faixa entre 5.000 a 50.000 m/z, apresentando uma proteína de 8.527,88 Da. Não foi observada a presença de peptídeos e proteínas entre 700 a 5.000 m/z e acima de 60.000 m/z.

Tabela 1. Proteínas e peptídeos identificados nas frações de *B. atrox* com intensidade relativa superior a 10% obtidos por MALDI- TOF

Frações de <i>B. atrox</i> (Da)*							
Frações	1	2	3	4	5	R2	K1
Peptídeos	-	-	-	-	733,63 860,37 1.157,53 4.971,24 5.045,09 5.196,93	-	-
Proteínas	7.137,47 7.419,52 7.622,14 9.107,70	6.873,97 13.770,55 14.034,28 14.257,09	8.528,68 23.554,54	5.171,55 7.359,61 8.138,19 8.754,46 8.996,89 10.862,46 11.809,94 22.785,54 29.294,97 37.402,41 48.443,29	7.337,67 7.460,38 8.124,70 8.253,93 8.342,60 8.470,97 9.055,63 9.214,51 9.981,64 10.984,35 11.112,83 11.334,98 14.554,49 22.918,82 29.289,31 29.467,37	6.974 13.750,62 14.036,49 14.249,86	8.527,88

*Os resultados obtidos por espectrometria de massa mostram a relação massa/carga (m/z). Nesta tabela os valores de m/z foram convertidos em Dalton (Da). Para a conversão subtrai-se a massa molar do íon hidrogênio, que equivale a 1,007825 de todos os valores m/z referentes aos peptídeos e proteínas obtidos, sendo obtido os valores em Dalton.

4.2 Caracterização biológica

4.2.1 *Staphylococcus aureus*

As cinco frações promoveram a inibição do crescimento de *S. aureus*, sendo que a fração 2 foi a que apresentou os melhores resultados de inibição em todas as concentrações testadas (100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$), 50,59; 41,69; 39,90 e 30,13 %, respectivamente. Porém, a fração 3 testada em concentrações menores (25, 12,5, 6,25 e 3,125 $\mu\text{g/mL}$) demonstrou uma atividade inibitória relevante, com inibição de 30,67; 22,74; 27,90 e 22,36%, respectivamente (Fig. 15).

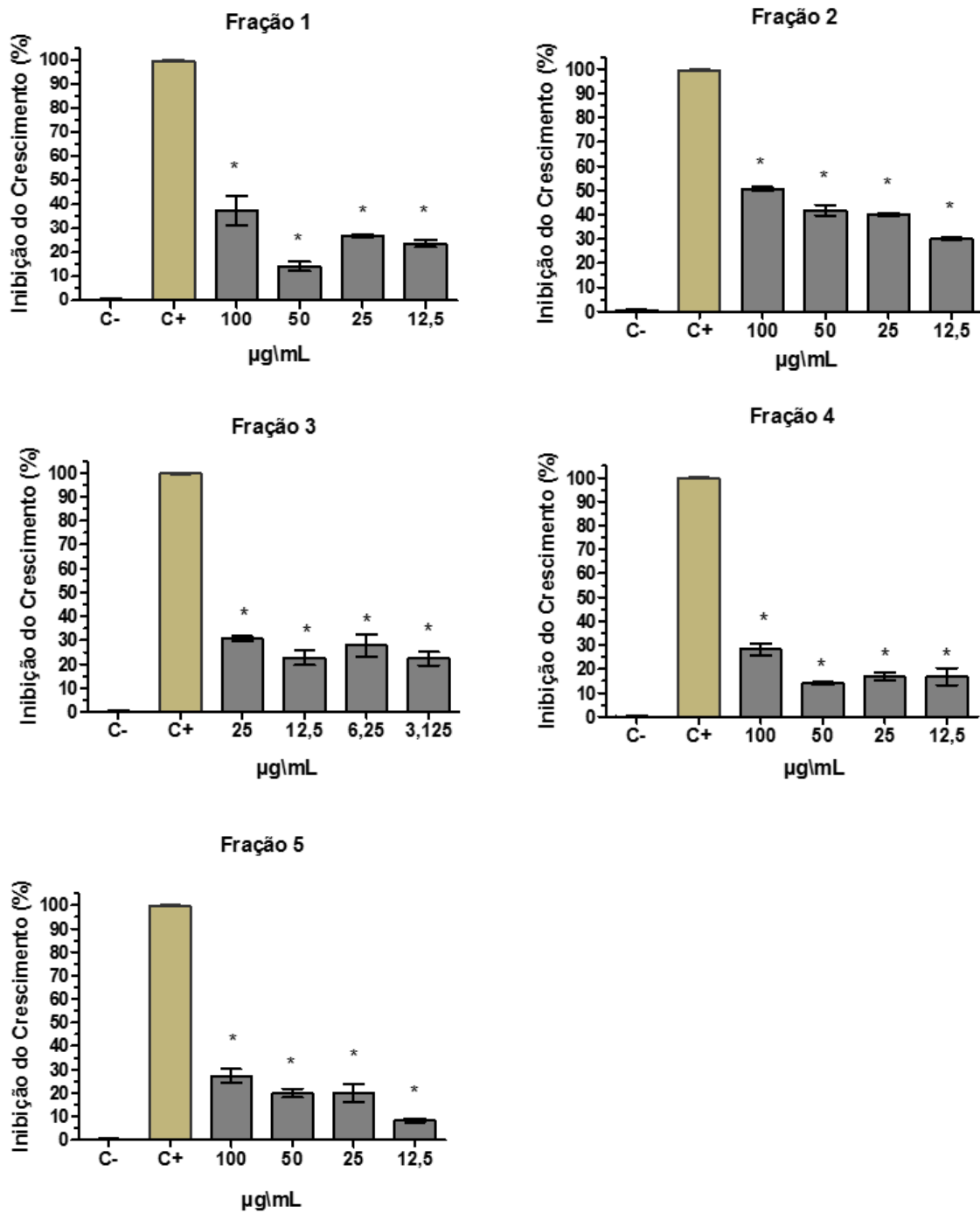


Figura 15. Inibição do crescimento de *S. aureus* para as cinco frações de *B. atrox*. Controle negativo (C-): Suspensão bacteriana, e controle positivo (C+): Cloranfenicol (100 µg/mL). Os gráficos apresentam a média ± SEM (n=3). *p < 0,05 comparado entre as amostras com o controle positivo.

4.2.2 *Escherichia coli*

As frações apresentaram resultados similares de inibição do crescimento de *E. coli* abaixo de 40%, não sendo observado relação dose resposta (Fig. 16)

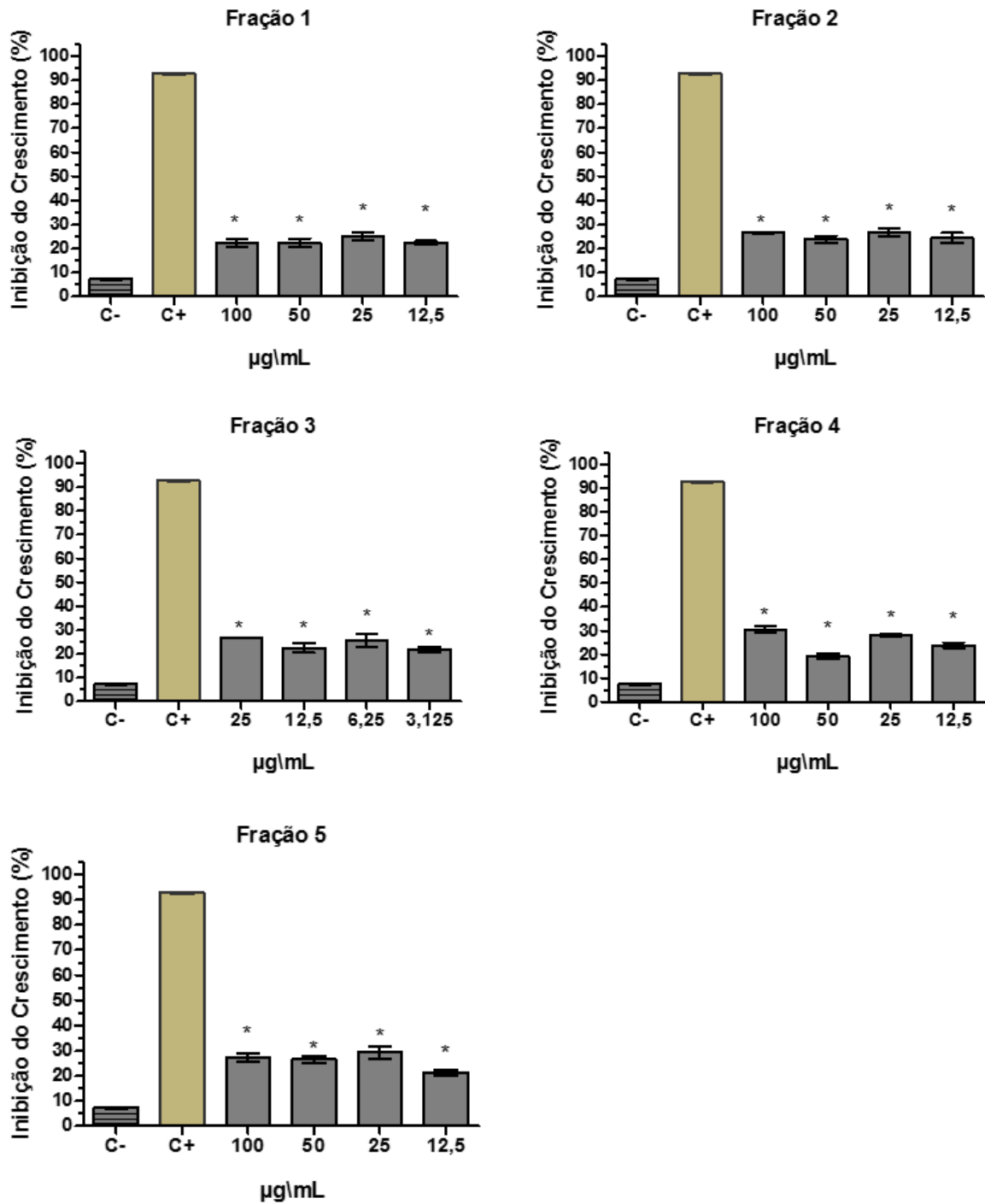
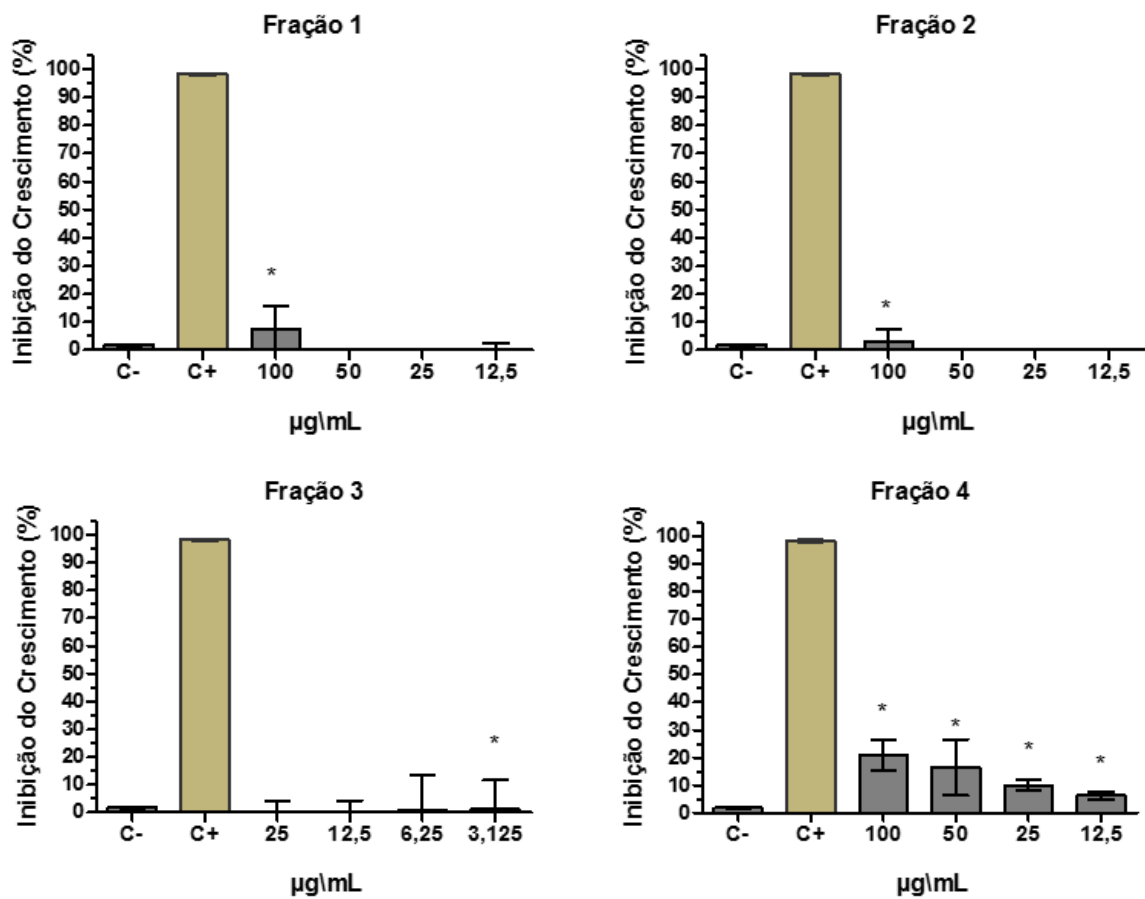


Figura 16. Inibição do crescimento de *E. coli* para as cinco frações de *B. atrox*. Controle negativo (C-): Suspensão bacteriana, e controle positivo (C+): Cloranfenicol (100 µg/mL). Os gráficos apresentam a média \pm SEM (n=3). *p < 0,05 comparado entre as amostras com o controle positivo.

4.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Apenas a fração 4 apresentou atividade inibitória contra o crescimento de *P. aeruginosa*, em todas as concentrações testadas (100, 50, 25 e 12,5 µg/mL), 20,71; 16,72; 9,90 e 6,34%, respectivamente (Fig. 17). A fração 5 demonstrou maior efeito inibitório em concentrações menores. As demais frações não apresentaram inibição na concentração máxima testada.



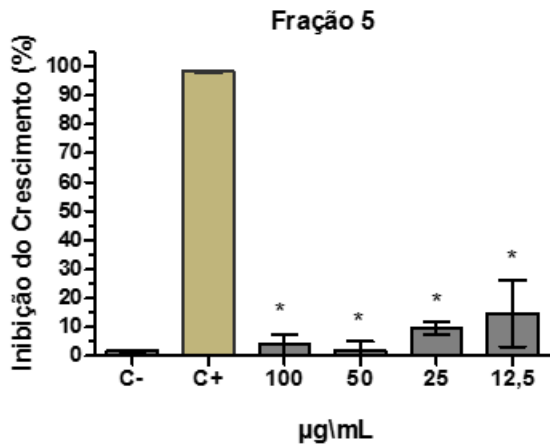
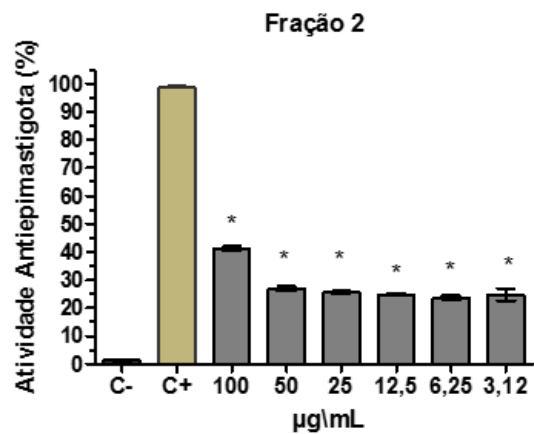
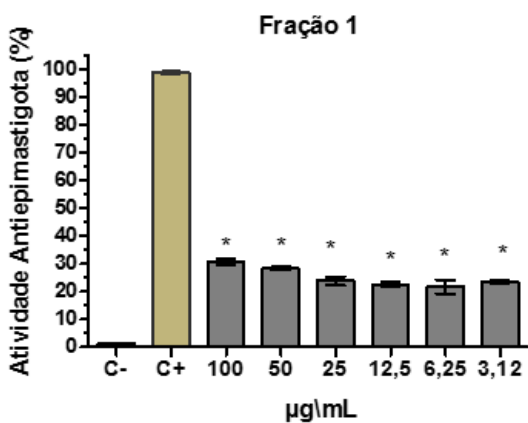


Figura 17. Inibição do crescimento de *P. aeruginosa* para as cinco frações de *B. atrox*. Controle negativo (C-): Suspensão bacteriana, e controle positivo (C+): Cloranfenicol (100 µg/mL). Os gráficos apresentam a média \pm SEM (n=3). *p < 0,05 comparado entre as amostras com o controle positivo.

4.2.4. Atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

As frações de 1 a 4 apresentaram inibição do crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi*, sendo que a fração 2 foi a que apresentou os melhores resultados de inibição em todas as concentrações testadas (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 µg/mL), 41,18; 26,81; 25,58, 24,77, 23,67, 24,74 %, respectivamente (Fig. 18).



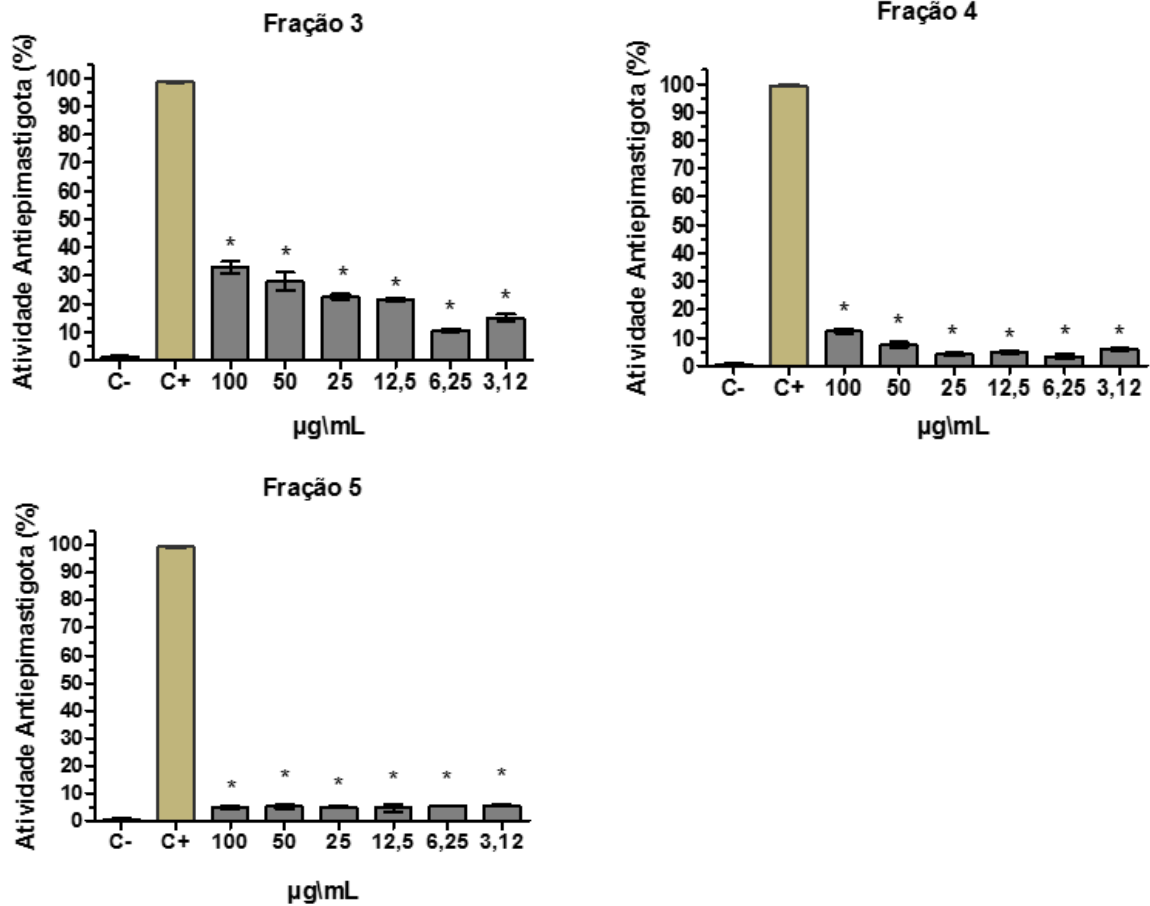


Figura 18. Perfis de inibição da atividade epimastigotas de *T. cruzi* testadas com as cinco frações do veneno de *B. atrox*. Controle negativo (C-) utilizou-se o meio de cultura com os parasitas e o Controle positivo (C+) o benznidazol (100 µg/mL). Os gráficos apresentam a média \pm SEM (n=3). *p < 0,05 comparado entre as amostras com o controle positivo.

5 DISCUSSÃO

5.1 Fracionamento do veneno de *B. atrox* e caracterização bioquímica

Inicialmente para o fracionamento dos inibidores de quimotripsina, preparou-se o veneno de *B. atrox*, solubilizando-se em 0,4% de TFA e exposto ao aquecimento a 80°C e, quantidades significativas de proteínas foram precipitadas e removidas por centrifugação. Este procedimento resultou na separação dos inibidores de quimotripsina para o posterior fracionamento, adicionalmente confirmou-se que os inibidores de quimotripsina são estáveis ao calor. Devido a presença de 3 ou mais pontes dissulfetos que são responsáveis pela rigidez estrutural capaz de manter a atividade específica dos inibidores de quimotripsina, tornando-os resistentes a mudança de pH e temperatura (GUO et al., 2013).

O procedimento de preparação do veneno foi replicado dos trabalhos de Guo e colaboradores (2013 a, b), que descreveram a purificação, caracterização e clonagem de 2 inibidores de tripsina e 2 inibidores de quimotripsina do tipo Kunitz BPTI da serpente *Daboia russelii siamensis*.

No fracionamento do veneno de *B. atrox* utilizou-se a cromatografia de fase reversa em coluna C18 e as proteínas do veneno foram separadas por hidrofobicidade em 5 frações, utilizando-se o gradiente descontínuo de ACN (30, 50, 70 e 100%), afim de obter melhor separação das proteínas, o que demonstrou ser mais eficiente comparado ao gradiente linear de ACN, realizado nas etapas iniciais das cromatografias (dados não mostrados neste trabalho).

A atividade de inibição enzimática da quimotripsina foi determinada acompanhando-se a hidrólise do substrato cromogênico N-glutaryl-L-phenylalanyl-p-nitroamilide (GPNa) (ERLANGER, 1961). Nesta reação de hidrólise do substrato ocorre a geração do produto p-nitroanilina (de cor amarela) que absorve a energia da radiação eletromagnética no comprimento de onda de 410 nm. Alguns estudos demonstram a inibição competitiva de estequiometria 1:1 na formação do complexo enzima-inibidor (CHANG et al., 2001; GUO et al., 2013). Com a inativação ocorre a formação de um intermediário acil-enzima estável no sítio ativo (NELSON; COX, 2011), sendo um inibidor padrão hidrolisado cerca de 10^7 vezes mais lentamente que um substrato (RADISKY; KOSHLAND, 2002).

A quimotripsina possui ampla distribuição em animais, bactérias e vírus (LESK; FORDHAM, 1996). Esta enzima hidrolisa ligações peptídicas adjacentes em aminoácidos aromáticos como triptofano, fenilalanina e tirosina, além de catalisar a hidrólise de pequenos

ésteres e amida, formando um intermediário acil-enzima covalente e transitório em duas fases distintas: a fase de acilação, a ligação peptídica é rompida formando uma ligação éster entre o carbono do carbonil e a enzima; a fase de desacilação, a ligação éster é hidrolisada e a enzima regenerada (NELSON; COX, 2011).

Todas as frações do veneno de *B. atrox* inibiram a quimotripsina, o que indica a presença de inibidores de quimotripsina no veneno, ainda não descritos entre os componentes protéicos do veneno desta serpente.

Para a detecção de m/z dos peptídeos e proteínas presentes nas frações foi utilizada a espectrometria de massa, que é uma técnica analítica utilizada para mensurar a razão massa/carga de partículas, em fase gasosa carregadas eletricamente (CALVETE, 2014). As frações foram analisadas em baixa massa para peptídeos e alta massa para proteínas, com isso foi possível observar a diversidade destas moléculas que resistiram ao aquecimento durante 30 minutos em solução ácida.

Comparando os valores de massas de inibidores de serinoprotease do tipo Kunitz descritos, com as proteínas presentes nas 5 frações de *B. atrox*, observa-se valores semelhantes. Na fração 1 de *B. atrox*, foi constatado a presença de um grupo de proteínas: 7.137,47; 7.419,52 e 7.622,14 Da, essa faixa de massa é semelhante a de inibidores tipo Kunitz, encontrado em serpentes (Tabela 2, apêndices). Nesta mesma fração, um polipeptídeo com a massa de 9.107,70 Da, similar a massa do inibidor de serinoprotease do tipo kunitz β -bungarotoxina, encontrado na serpente *Bungarus multicinctus*, com a massa de 9.108 Da (Tabela 2, apêndices)

A fração 2 foi recromatografada em coluna C12 e obteve-se um pico majoritário (R2), sendo identificada um grupo de proteínas, 13.750,62 e seu íon dupla carga de 6.974 Da; 14.036,49 e 14.249,86 Da, que apresentam massas semelhantes às PLA₂s, caracterizadas de venenos botrópicos (STÁBELI et al., 2012), e também por Nunez e colaboradores (2004) que caracterizaram uma Lys49 PLA₂, a partir do veneno de *B. atrox*, com a massa molecular de 13.826 Da.

Alguns inibidores Kunitz podem ocorrer em complexo com outra molécula, e podem estar associados a PLA₂ ou protease. Kwong e colaboradores (1995) caracterizaram uma molécula dimérica denominada β -bungarotoxina da serpente *Bungarus multicinctus*, que apresenta uma subunidade constituída de uma PLA₂ acoplada covalentemente por uma ligação dissulfeto a uma subunidade menor relacionada com inibidores de serinoproteases de tipo Kunitz. Em outro estudo, um complexo protéico contendo PLA₂, protease e um inibidor de tripsina, foi isolado a partir do veneno de *Daboia russelii*, com as respectivas massas, 13

kDa (PLA₂), 29,1 kDa (protease) e 6,5 kDa (inibidor da tripsina BPTI Kunitz) (KUMAR et al., 2008).

A fração 3 de *B. atrox* apresentou duas proteínas: A primeira com a massa de 8.528,68 Da, próxima a massa de inibidores de serinoprotease do tipo Kunitz, encontrados nas serpentes: *Walterinnesia aegyptia* e *Oxyuranus microlepidotus*, 8.777 e 8.788 Da, respectivamente (Tabela 2, apêndices). E a segunda proteína, detectada em menor abundância, com a massa de 23.554,54 Da, que demonstra massa similar a atroxlysina-I, uma metaloprotease de 23.000 Da, caracterizada do veneno de *B. atrox* peruana (SANCHEZ et al., 2010). Foi realizada a recromatografia desta fração na coluna C12, e obteve-se o inibidor purificado (K1) e apresentou a massa de 8.527,88 Da, e atividade inibitória da quimotripsina de 78%.

As demais frações 4 e 5 apresentaram uma diversidade de peptídeos e proteínas, e alguns com similaridade de massa molecular com os inibidores: 7.359,61; 8.754,46; 10.862,46; 9.214,51 e 9.981,64 Da. Comparando-se com a massa dos inibidores descritos: 7.370; 8.777; 9.054; 9.060; 9.213; 9.218 Da, presentes nas serpentes, *Vipera renardi*, *Walterinnesia aegyptia*, *Hoplocephalus stephensii*, *Pseudonaja textilis textilis*, *Pseudechis australis*, respectivamente (Tabela 2, apêndices).

5.2 Caracterização biológica

Os venenos de serpentes são compostos por uma complexa mistura de toxinas e outras substâncias bioativas que abrangem um amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas, que estão sendo utilizadas como agentes antimicrobianos. E devido a resistência aos antibióticos atuais (HIRAMATSU, 2001), busca-se novas estratégias para prevenir ou tratar infecções causadas por microrganismos (LEE, 1996).

No estudo de Blaylock (2000) avaliou-se a atividade bactericida dos venenos de várias serpentes: *Causus rhombeatus*, *Bitis gabonic*, *Bitis arietans*, *Dendroaspis augusticeps*, *Naja melanoleuca*, *Naja annulifera* e *Naja mossambica* contra bactérias Gram positivas e Gram negativas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteriodes fragilis*, *Bacteriodes intermedius* e *Clostridium sordellii*. Evidenciando que os venenos de serpentes apresentam moléculas que agem contra microrganismos.

Cedron e colaboradores (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana do veneno de *Bothrops jararaca* contra amostras clínicas: *Eubacterium lentum*, *Peptoestreptococcus*

anaerobius, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. O veneno foi eficaz contra todas as estirpes testadas, mesmo aquelas que expressam mecanismos de resistência. No entanto, não foi eficiente contra *Bacteroides fragilis*, *Corrondes eikenella*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans*. No trabalho de Ferreira e colaboradores (2011) foi analisado a atividade antimicrobiana do veneno de *B. atrox* sobre cepas de *S. aureus* (MIC), e não houve inibição. Enquanto que, neste estudo os testes antimicrobianos foram realizados com as frações de *B. atrox*, e demonstraram atividade inibitória contra *S. aureus* de 50,59%, *E. coli* 30% e *P. aeruginosa* 20%.

Outros trabalhos com proteínas isoladas dos venenos de serpentes, como é o caso de PLA₂ que em alguns casos podem exercer potentes efeitos bactericidas (GUTIRREZ; LOMONTE, 1997), contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus enterica*, *Brucella abortus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei* e *Vibrio cholerae* (SANTAMARIA *et al.*, 2005). Soares e colaboradores (2000) isolaram uma PLA₂ denominada BnpTx-I do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* com atividade bactericida contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Vargas e colaboradores (2012) demonstraram o efeito bactericida de uma PLA₂ ácida isolada do veneno de *Porthidium nasutum* (PnPLA₂) contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*), mas não mostrou efeito contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*). É importante salientar que a fração 2 apresentou também proteínas com massas moleculares de aproximadamente 14.000 Da semelhante a de PLA₂s, que podem possivelmente contribuir para a atividade inibitória contra as bactérias que foram testadas.

O estudo de Oliveira e colaboradores (2012a) relata o isolamento de duas proteínas que se ligam a heparina (59-65,8 kDa) (PLHs) presentes no *T. cruzi*, e em ensaios de interação molecular, utilizando o Biacore, foi observado que essas PLHs estão presentes na superfície de epimastigotas. Posteriormente, Oliveira e colaboradores (2012b), confirmaram que as PLHs são serinoproteases, por estas serem sensíveis aos inibidores PMSF e aprotina. Além, de ser descrito, em estudos anteriores o envolvimento de serinoproteases no processo de invasão do *T. cruzi* (BURLEIGH *et al.*, 1997; GRELLIER *et al.*, 2001).

Os ensaios foram realizados em culturas epimastigotas de *T. cruzi*, afim de obter um *screening* inicial, para identificar e adquirir informações sobre quais frações inibem as formas epimastigotas. As 5 frações foram testadas e somente a fração 2 na concentração de 100 µg/mL inibiu 41,18%. As frações 1 e 3 promoveram 30% de inibição na mesma concentração. Nessas frações encontram-se proteínas com massas similares de inibidores de serinoprotease

do tipo Kunitz, principalmente na fração 1, onde todas as proteínas coincidem com os inibidores, como relatado anteriormente. Porém, nas demais frações não se pode afirmar qual grupo de proteínas esteja interagindo com as serinoproteases presentes na superfície epimastigotas de *T. cruzi*.

No estudo de Rosa (2013) avaliou-se os efeitos *in vitro* dos venenos totais das serpentes *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* em formas tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, apresentando IC₅₀ em tripomastigotas de 81,5 à 213 µg/mL e 77,9 à 293,8 µg/mL em amastigotas de *T. cruzi* obtidos pelo veneno de *C. d. terrificus*. Em promastigotas, o veneno da *C. d. terrificus* provocou 71.1% de mortalidade na concentração de 250 µg/mL e a IC₅₀ entre 63.5 a 155.0 µg/mL.

6 CONCLUSÕES

Todas as frações obtidas em cromatografia de fase reversa em coluna C18 a partir da fase solúvel, após o aquecimento do veneno total de *B. atrox*, apresentaram atividade inibitória de quimotripsina. A fração 3, foi recromatografada e o pico majoritário K1 apresentou a massa de 8.527,88 Da, e atividade inibitória da quimotripsina de 78%. No entanto, as frações 1 e 2 apresentaram uma menor diversidade de proteínas, e com massas semelhantes a inibidores de quimotripsina tipo Kunitz, à qual podem ser atribuídas a atividade, sendo que as outras frações apresentaram conteúdo distinto de peptídeos e proteínas em grande variabilidade.

A caracterização biológica revelou que estas frações inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) e formas epimastigotas de *T. cruzi*, sendo a fração 2 com a maior inibição de 50,6% para *S. aureus* e 41% para *T. cruzi*. As Gram-negativas: *E. coli* e *P. aeruginosa* com inibição de 30% e 20%, respectivamente para a fração 4, e vale ressaltar que a fração 5 apresentou atividade inibitória em concentrações menores contra *P. aeruginosa* e também contra o crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar ensaios de cinética enzimática com os inibidores de quimotripsina;
- Sequenciar total ou parcialmente os inibidores por Degradação de Edman;
- Comparar por similaridade as sequências dos inibidores;
- Avaliação das frações e dos inibidores em cepas antimicrobianas resistentes

8 REFERÊNCIAS

- ABAD-ZAPATERO, C.; GOLDMAN, R.; MUCHMORE, S. W.; HUTCHINS, C.; STEWART, K.; NAVAZA, J.; PAYNE, C. D.; RAY, T. L. Structure of a secreted aspartic protease from *C. albicans* complexed with a potent inhibitor: implications for the design of antifungal agents. **Protein Sci.**, v. 5, p. 640-52, 1996.
- AHMAD, V. U.; LODHI, M. A.; ABBASI, M. A.; CHOUDHARY, M. I. Kinetics study on a novel natural inhibitor of a-chymotrypsin. **Fitoterapia**, v. 79, p. 505–508, 2008.
- BABA, T.; WATANABE, K.; KASHIWABARA, S.; ARAI, Y. Primary structure of human proacrosin deduced from its cDNA sequence. **FEBS Letters**, v. 27, p. 296–300, 1989.
- BECKER, M. M.; HARROP, S. A.; DALTON, J. P.; KALINNA, B. H.; MCMANUS, D. P.; BRINDLEY, P. J. Cloning and characterization of the *Schistosoma japonicum* aspartic proteinase involved in hemoglobin degradation. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 24496-50, 1995.
- BERNARDE, P.S. et al. Serpentes do estado de Rondônia, Brasil. **Biota Neotrop.**, v. 12, p. 1-28, 2012.
- BERNARDE, P.S.; GOMES, J.G. Serpentes peçonhentas e ofidismo em Cruzeiro do Sul, Alto Juruá, Estado do Acre, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 42, p. 65 - 72, 2012.
- BÉRNILS, R.S.; COSTA, H.C. Répteis brasileiros: Lista de espécies. Versão 2012.1. Sociedade Brasileira de Herpetologia, <http://www.sbherpetologia.org.br/> (último acesso em 17/08/2014).
- BERNSTEIN, P. R.; EDWARDS, P. D.; WILLIAMS, J. C. Inhibitors of human leukocyte elastase. **Prog. Med. Chem.**, v. 31, p. 59-120, 1994.
- BIRK, Y. The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. **Int. J. Pept. Protein Res.** v. 25, p. 113-131, 1985.
- BLAYLOCK, R. S.M. Antibacterial properties of KwaZulu Natal snake venoms. **Toxicon**, v. 38, p.1529–1534, 2000.
- BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **Eur. J. Biochem.**, v. 204, p. 433-451, 1992.
- BOUCHER, J.C.; MARTINEZ-SALAZAR, J.; SCHURR, M.J.; MUDD, M.H.; YU, H.; DERETIC, V. Two Distinct Loci Affecting Conversion to Mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Encode Homologs of the Serine Protease HtrA. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 511-523, 1996.
- BURLEIGH, B.A.; CALER, E.V.; WEBSTER, P.; ANDREWS, N.W. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. **J Cell Biol.**, v. 136, p. 609-20, 1997.

CALER, E.V.; VAENA DE AVALOS S., HAYNES P.A.; ANDREWS, N.W.; BURLEIGH, B.A. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **EMBO J.**, v. 17, p. 4975-8, 1998.

CALER, E.V.; MORTY, R.E.; BURLEIGH, B.A.; ANDREWS, N.W. Dual role of signaling pathways leading to Ca²⁺ and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6602-10, 2000.

CALDERON, L. A. **Leguminosas Amazônicas: Caracterização de Inibidores de Proteinases Serínicas**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Brasília, 2004.

CALVETE, J. J. Next-generation snake venomomics: protein-locus resolution through venom proteome decomplexation. **Expert Rev. Proteomics**, 2014.

CALVETE, J. J.; SANZ, L., PÉREZ, A.; BORGES, A.; VARGAS, A. M. LOMONTE, B. et al. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 510–527, 2011.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Venoms, venomomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v. 583, p. 1736-1743, 2009.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. The venomous reptiles of the western hemisphere. **Comstock Publishing Associates**, Ithaca (NY), 2004.

CARDLE, L.; DUFTON, M.J. Foci of amino acid residue conservation in the 3D structures of the Kunitz BPTI proteinase inhibitors: how do variants from snake venom differ? **Protein Eng.**, v. 10, p. 131–136, 1997.

CASTRO, H.C.; SILVA, D.M.; CRAIK, C.; ZINGALI, R.B. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1547, p. 183-195, 2001.

CENDRON, L. H.; BERTOL, C. D.; FUENTEFRIA, D. B.; et al. Broad Antibacterial Activity of *Bothrops jararaca* Venom against Bacterial Clinical Isolates. **Advances in Microbiology**, v. 4, p. 1174–1187, 2014.

CHANG, C.; CHUNG, H.B.; HUANG, S. LIN. Purification and characterization of a chymotrypsin inhibitor from the venom of *Ophiophagus hannah* (King Cobra) **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 283, p. 862–867, 2001.

CHANG, L.S.; WANG, J.J.; CHENG, Y.C.; CHOU, W.M. Genetic organization of *Bungarus multicinctus* protease inhibitor-like proteins. **Toxicon**, v. 51, p. 1490–1495, 2008.

CHEN, C.; HSU, C.H.; SU, N.Y. et al. Solution Structure of a Kunitz-type Chymotrypsin Inhibitor Isolated from the Elapid Snake *Bungarus fasciatus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 45079-45087, 2001.

COUTINHO-NETO. **Estudo da variação ontogenética do veneno de *Bothrops atrox* por análise proteômica e peptidômica: Identificação de peptídeos potencializadores de bradicinina.** Tese de doutorado, 2013.

DAVIE, E. W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. **Biochemistry**, v. 20, p. 10363–10370, 1991.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p. 271–278, 1961.

FERREIRA, B.L.; SANTOS, D.O.S.; SANTOS, A.L.; RODRIGUES, C.R.; FREITAS, C.C.; CABRAL, L. M.; CASTRO, H.C. Comparative Analysis of Viperidae Venoms Antibacterial Profile: a Short Communication for Proteomics. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, 2011.

FOX, J.W.; SERRANO S.M.T. Snake toxins and hemostasis. **Toxicon**, v. 45 p. 951–1181, 2005.

FRY, B. G.; WÜSTER, W.; KINI, R. M.; BRUSIC, V., KHAN, A.; VENKATARAMAN, D.; ROONEY, A. P. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three finger toxins. **J. Mol. Evol.**, v. 57, p. 110– 129, 2003.

FRY, B. G. From genome to ‘venome’: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Genome Res.**, v.15, p.403– 420, 2005

FRY, B.G.; SCHEIB, H.; VAN DER WEERD, L., B; MCNAUGHTAN, YOUNG, J.; RAMJAN, S.F.; VIDAL, N.; POELMANN, R.E.; NORMAN, J.A. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). **Mol. Cell Proteomics**, v. 7, p. 215–246, 2008.

FROELICH, C. J.; ZHANG X.; TURBOV, J.; HUDIG, D.; WINKLER, U.; HANNA, W. L. Human granzyme B degrades aggrecan proteoglycan in matrix synthesized by chondrocytes. **J. Immunol.**, v. 151, p. 7161–7171, 1993.

GIBSON, W.; HALL, M. R. Assemblin, an essential herpesvirus proteinase. **Drug Des. Discov.**, v. 15, p. 39-47, 1997.

GRELLIER, P.; VENDEVILLE, S.; JOYEAU, R.; BASTOS, I.M.; DROBECQ, H.; FRAPPIER, F.; TEIXEIRA, A.R.; SCHRÉVEL, J.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SERGHERAERT, C.; SANTANA, J.M. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **J. Biol Chem.**, v. 276, p. 47078-86, 2001.

GUÉRCIO, R.A.P.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A.; LÓPEZ-LOZANO, J.L.; PABA, J.; SOUSA, M.V.; RICART. C.A.O. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome Sci.**, v.4, p. 11, 2006.

GUO, C. T.; MCCLEANA, S.; SHAWC, C.; RAOB, P.; YEB, M. ANTHONY; BJORSONA, J. Purification, characterization and molecular cloning of chymotrypsin inhibitor peptides from the venom of Burmese *Daboia russelii siamensis*. **Peptides**, v.43, p. 126–132, 2013a.

GUO, C. T.; MCCLEANA, S.; SHAWC, C.; RAOB, P.; YEB, M. ANTHONY; BJORSONA, J. Trypsin and chymotrypsin inhibitor peptides from the venom of Chinese *Daboia russelii siamensis*. **Toxicon**, v. 63, p.154–164, 2013b.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Structure, Function and Mechanism. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In *Venom Phospholipase A₂ Enzymes*. **Chichester: Wiley**, p. 321–352, 1997.

HAQ, S.K.; ATIF S.M.; KHAN, R.H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 43, p. 145-159, 2004.

HARVEY, A.L.; ANDERSON, A.J. Dendrotoxins: snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release. **Pergamon Press Inc, Tarrytown, New York**, p. 131–164, 1991.

HE, Y.Y.; LIU, S.B.; LEE, W.H.; QIAN, J.Q.; ZHANG. Y. Isolation expression and characterization of a novel dual serine protease inhibitor, OH-TCI, from king cobra venom. **Peptides**, v.29, p. 1692–1699, 2008.

HENDERSON, B. R.; TANSEY, W. P.; PHILLIPS, S. M.; RAMSHAW, I. A.; KEFFORD, R. F. Transcriptional and posttranscriptional activation of urokinase plasminogen activator gene expression in metastatic tumor cells. **Cancer Res.**, v. 52, p. 2489–2496, 1992.

HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. **Lancet Infect. Dis.**, v.1, p.147-155, 2001.

INAGAKI, H.; KIMOTO, H.; YAMAUCHI, Y.; M. TORIBA, T. KUBO. Functional characterisation of Kunitz-type protease inhibitor Pr-mulgins identified from New Guinean *Pseudechis australis*. **Toxicon**, v. 59, p. 74–80, 2012.

IWANAGA, S.; TAKAHASHI, H.; SUZUKI T. Proteinase inhibitors from the venom of *Russell's viper*. **Methods in enzymology**, v. 45, p. 874–881, 1976.

KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.M.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of $\alpha 2\beta 1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase Jararhagin. **Biochem. J.**, v. 320, p. 635-641, 1996.

KELLOFF, G. J.; CROWELL, J. A.; STEELE, V. E.; LUBET, R. A.; MALONE, W. A.; BOONE, C. W.; KOPELOVICH, L.; HAWK, E. T.; LIEBERMAN, R.; LAWRENCE, J. A.; ALI, I.; VINER, J. L.; SIGMAN, C. C. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. **J. Nutr.**, v. 130, p. 467-471, 2000.

KOIWA, H.; SUBRAMANIAN, L.; SHADE, R. E.; ZHU, K. Y.; NIELSEN, S. S.; MURDOCK, L. L.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Insecticidal activities of soybean

cysteine protease inhibitors are correlated with their papain-binding affinities as phage-displayed proteins. **Plant Physiology**, v. 114, p. 1115-1120, 1997.

KWONG, P.D.; MCDONALD, N.Q.; SIGLER, P.B.; HENDRICKSON, W.A. Structure of beta 2-bungarotoxin: potassium channel binding by Kunitz modules and targeted phospholipase action. **Structure**, v. 3, p. 1109–1119, 1995.

KUMAR, J.R.; BASAVARAJAPPA, B.S.; ARANCIO, O.; ARANHA, I. et al. Isolation and characterization of “Reprotoxin”, a novel protein complex from *Daboia russelii* snake venom. **Biochimie**, v. 90, p. 1545–1559, 2008.

JOUBERT, F.J.; STRYDOM, D.J. Snake venoms, the amino-acid sequence of trypsin inhibitor of *Dendroaspis polylepis polylepis* (black mamba) venom. **Eur J Biochem**, v. 87, p. 191–198, 1978.

LASKOWSKI JR., M.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 49, p. 593-626, 1980.

LEE, C.Y.; TSENG, L.F. Distribution of *Bungarus multicinctus* venom following envenomation. **Toxicon**, v. 3, p. 281–290, 1966.

LEE, J. C. The prospects for developing a vaccine against *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol.**, v. 4, p.162-166, 1996.

LESK, A.M.; FORDHAM, W.D. Conservation and Variability in the Structures of Serine Proteinases of the Chymotrypsin Family. **J. Mol. Biol.**, v. 258, p. 501–537, 1996.

LIRA-DA-SILVA, R.M.; MISE, Y.F.; CASAIS-E-SILVA, L.L.; ULLOA, J.; HAMDAN, B.; BRAZIL, T.K. Serpentes de Importância Médica do Nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v.79 (1), p.7-20, 2009.

LIU, C.S.; WU, T.C.; LO, T.B. Complete amino acid sequences of two protease inhibitors in the venom of *Bungarus fasciatus*. **Int. J. Peptide Protein Res.**, v. 21, p. 209–215, 1983.

LÓPEZ-LOZANO, J.L.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.O.; CHÁVES-OLORTEGUI, C.; SANCHEZ, E.F.; MUNIZ, E.G.; BÜHRNHEIM, P.F.; MORHY, L. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon**, v. 40, p. 997-1006, 2002.

LOVE, R. A.; PARGE, H. E.; WICKERSHAM, J. A.; HOSTOMSKY, Z.; HABUKA, N.; MOOMAW, E. W.; ADACHI, T.; HOSTOMSKA, Z. The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. **Cell**, v. 87, p. 331-42, 1996.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, J.; YANG, H.L.; YU, H.N. et al. A novel serine protease inhibitor from *Bungarus fasciatus* venom. **Peptides**, v. 29, p. 369–374, 2008.

MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749–1800, 1998.

MATSUI, T., FUJIMURA, Y. AND TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochemical Biophys. Acta**, v.1477, p. 146-156, 2000.

MCGIVERN, J. J.; WRAY, K. P.; MARGRES, M. J.; et al. RNA-seq and high-definition mass spectrometry reveal the complex and divergent venoms of two rear-fanged colubrid snakes. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 1061, 2014.

MORITA, T. Use of snake venom inhibitors in studies of the function and tertiary structure of coagulation factors. **Int. J. Hematol.**, v. 79, p. 123-129, 2004

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard–sixth edition. NCCLS document M7–A6. Wayne (PA): The Committee; 2009.

NEIVA, M.; ARRAES, F.B.M.; SOUZA, J. V.; RÁDIS-BAPTISTA,G.; SILVA, A. R.B.; WALTER, M.E.M.T.; BRIGIDO, M.M.; YAMANE, T.; LÓPEZ-LOZANO, J. L.; ASTOLFI-FILHO, S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon**, v.53, p. 427-436, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: **Artmed**, 5ª edição, 2011.

NÚÑEZ, V.; ARCE, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. **Toxicon**, v. 44, n. 1, p. 91–101, 2004.

NÚÑEZ, V.; CID, P.; SANZ, L.; DE LA TORRE, P.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, M.; CALVETE, J.J. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 57-78, 2009.

OLIVEIRA, F.O.; ALVES, C.R.; SOUZA-SILVA, F.; CALVET, C.M.; CÔRTEZ, L.M.; GONZALEZ, M.S.; TOMA, L.; BOUÇAS. R.I.; NADER, H.B., PEREIRA, M.C. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins mediate the adherence of epimastigotes to the midgut epithelial cells of *Rhodnius prolixus*. **Parasitology**, v. 139, p. 735-743, 2012a.

OLIVEIRA, F. O.; ALVES, C.R.; SOUZA-SILVA, F.; CÔRTEZ, L.M.C.; TOMA, L.; BOUÇAS, R.I.; AGUILAR, T.; NADER, H.B.; PEREIRA, M.C.S. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins present a flagellar membrane localization and serine proteinase activity, **Parasitology**, v. 140, p. 171–180, 2012b.

PATICK, A.K.; POTTS, K.E. Protease Inhibitors as Antiviral Agents. **Clin Microbiol Rev. Oct.**, v.11, p. 614–627, 1998.

PARDAL, P.P.O.; SOUZA A.M.; MONTEIRO, M.R.C.C.; FAN, H.W.; CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S. et al. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and

Lachesis bites in the northeastern Amazon region of Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, p. 28-42, 2004.

PARK Y.; CHOI B.H.; KWAK, J. S.; KANG, C.W.; LIM, H.T.; CHEONG, H.S.; HAHM, K.S. Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung). **J. Agric. Food. Chem.**, v. 53, p. 6491-6496, 2005.

RADISKY, E.S.; KOSHLAND, DE JR. A clogged gutter mechanism for protease inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, p. 10316-21, 2002.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J. Evolutionary families of peptidases. **Bioche. J.**, v. 290, p. 205-218, 1993.

REID, K. B. M.; BENTLEY, D. R.; CAMPBELL, R. D.; CHUNG, L. D.; SIM, R. B.; KRISTENSEN, T.; TACK, B. F. Complement system proteins which interact with C3B or C4B. **Immunol. Today**, v. 7, p. 230-234, 1986.

REPTILE DATABASE. <http://www.reptile-database.org/>. Acesso em setembro de 2014.

RICHARDSON, M., Seed storage proteins: The enzyme inhibitor. In: Methods in plants Biochemistry. **Academic Press: New York**, p. 259-305, 1991.

RIGOULAY, C.; ENTENZA, J.M.; HALPERN, D.; WIDMER, MOREILLON, P.E.; ISABELLE POQUET, I.; GRUSS, A. Comparative Analysis of the Roles of HtrA-Like Surface Proteases in Two Virulent *Staphylococcus aureus* Strains. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 563-572, 2005.

RITONJA, A.; MELOUN, B.; AND GUBENSEK, F. The primary structure of *Vipera ammodytes* venom chymotrypsin inhibitor. **Biochim. Biophys. Acta**, v.746, p. 138-145, 1983.

RITONJA, A.; TURK, V., GUBENSEK, F. Serine proteinase inhibitors from *Viper ammodytes* venom. Isolation and kinetic studies. **Eur. J. Biochem.**, v. 133, p. 427-432, 1983.

RITONJA, A.; KRIZAJ, I.; MESKO, P.; KOPITAR, M.; LUCOVNIK, P.; STRUKELJ, B.; PUNGERCAR, J.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J.; TURK, V. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. **FEBS Lett.**, v. 267, p. 13-15, 1990.

ROSAS, N. S. C. **Efeitos de venenos totais de serpentes brasileiras sobre *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi***. Dissertação (Universidade Estadual do Ceará), 2013.

SANCHEZ, E. F.; SCHNEIDER, F. S.; YARLEQUE, A.; et al. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 496, n. 1, p. 9-20, 2010.

SANO, J.; OHKI, K.; HIGUCHI, T.; AIHARA, K.; MIZUNO, S.; KAJIMOTO, O.; NAKAGAWA, S.; KAJIMOTO, Y.; NAKAMURA, Y. Effect of casein hydrolysate, prepared with protease derived from *Aspergillus oryzae*, on subjects with high normal blood pressure or mild hypertension. **J. Med. Food**, v. 8, p. 423-430, 2005.

SANTAMARÍA, C.; LARIOS, S.; QUIRÓS, S.; et al. Bactericidal and antiendotoxic properties of short cationic peptides derived from a snake venom Lys49 phospholipase A₂. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1340–5, 2005.

SANTOS, M. M. D. V.; SANTANA, C.D.; GIGLIO, Jr.; DA SILVA, R.J.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; et al. Antitumoural effect of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v.102, p. 533-542, 2008.

SCARAFONI, A.; CONSONNI, A.; GALBUSERA, V.; NEGRI, A.; TEDESCHI, G.; RASMUSSEN, P.; MAGNI, C.; DURANTI, M. Identification and characterization of a Bowman-Birk inhibitor active towards trypsin but not chymotrypsin in *Lupinus albus* seeds. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1820-1825, 2008.

SHAFQAT, J.; BEG, O.U.; YIN, S.J.; ZAIDI, Z.H.; JORNVALL, H. Primary structure and functional properties of cobra (*Naja naja naja*) venom Kunitz-type trypsin inhibitor. **Eur. J. Biochem.**, v. 194, p. 337–341, 1990a.

SHAFQAT, J., ZAIDI, Z. H.; JORNVALL, H. Purification and characterization of a chymotrypsin Kunitz inhibitor type of polypeptide from the venom of cobra (*Naja naja naja*). **FEBS Lett.**, v. 275, p.6–8, 1990b.

SHEWRY, P., R.; LUCAS, J., A. Plant Proteins that Confer Resistance to Pests and Pathogens. In: Callow, J. (ed.), **Advances in Botanical Research**. London, Academic Press, v. 26, p.136-192, 1997.

SIDDIGI, A.R.; ZAIDI, Z.H.; JORNVALL, H. Purification and characterization of a Kunitz-type trypsin inhibitor from leaf-nosed viper venom. **FEBS Lett.**, v. 294, p. 141–143, 1991.

SILVA, A. M.; LEE, A. Y.; GULNIK, S. V.; MAIER, P.; COLLINS, J.; BHAT, T. N.; COLLINS, P. J.; CACHAU, R. E.; LUKER, K. E.; GLUZMAN, I. Y.; FRANCIS, S. E.; OKSMAN, A.; GOLDBERG, D. E.; ERICKSON, J. W. Structure and inhibition of plasmepsin II, a hemoglobin-degrading enzyme from *Plasmodium falciparum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, p.10034-9, 1996.

SILVA, M.B.; SCHATNER, M.; RAMOS, C.R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; GUARNIERI, M.C.; LAZZARI, M.A.; SAMPAIO, C.A.; POZNER, R.G.; VENTURA, J.S.; HO, P.L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca da seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochem J.**, v. 369, p. 129-139, 2003.

SILVA-LÓPEZ, R. E.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; CHÁVEZ, M. A.; DE SIMONE, S.G. Effects of serine protease inhibitors on viability and morphology of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. **Parasitol. Res.**, v.101, p. 1627, 2007.

SKORKO-GLONEK J.; ZURAWA-JANICKA D.; KOPER T.; JARZAB M., FIGAJ D.; GLAZA P., et al. HtrA protease family as therapeutic targets. **Curr. Pharm. Des.**, v. 19, p. 977–1009, 2013.

STÁBELI, R. G.; SIMÕES-SILVA, R.; KAYANO, A. M.; GIMENEZ, S. G.; MOURA, CALDEIRA, C. A. S.; COUTINHO-NETO, A.; ZAQUEO, K. D.; ZULIANI J. P.;

CALDERON, L. A.; SOARES, A. M. Purification of Phospholipases A₂ from American Snake Venoms. In: Leonardo de Azevedo Calderon (Ed.); **Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis**, p. 1–34, 2012.

STRAUCH, K. L.; JOHNSON, K.; BECKWITH, J. Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. **J. Bacteriol.**, v.171, p. 2689-2696, 1989.

STRYDOM, D.J. Snake venom toxins. Purification and properties of low-molecular-weight polypeptides of *Dendroaspis polylepis polylepis* (black mamba) venom. **Eur. J. Biochem.**, v. 69, p. 169–176, 1976.

STUBBS, M. T.; BODE, W. A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure. **Thromb. Res.**, v. 69, p.1-58, 1993.

TANG, W.; DIAZ, P.; WILSON, K. A.; TANWILSON, A. L. Spatial- distribution of protein accumulation in soybean seed. **Phytochemistry**, v. 33, p. 1289-1295, 1993.

TANAKA, R. D.; CLARK, J. M.; WARNE, R. L.; ABRAHAM, W. M.; MOORE, W. R. Mast cell tryptase: a new target for therapeutic intervention in asthma. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v.107, p. 408-9, 1995.

TAKAHASHI, H.; IWANAGA, S.; SUZKI, T. Isolation of a novel inhibitor of kallikrein, plasmin and trypsin from the venom of Russell's Viper (*Vipera russelli*). **Fedn Europ. biochem. Soc. Lett.**, v. 27, p. 207, 1972.

TAKAHASHI, H.; IWANAGA, S.; KITAGAWA, T.; HOKAMA, Y.; SUZKI, T. Snake venom proteinase inhibitors. Chemical structure of inhibitor II isolated from the venom of *Russell's viper* (*Viper russelli*). **J. Biochem.**, v.76, p. 721–733, 1974.

TU, A.T. Overview of snake venom chemistry. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 391, p. 37–62, 1996.

TU, A. T. Snake venoms: General background and composition. In *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*, p. 1–19, 1988.

UNIPROT DATABASE. <http://www.uniprot.org/>. Acesso em junho de 2015.

VARGAS, L. J.; LONDOÑO, M.; QUINTANA, J. C.; et al. An acidic phospholipase A₂ with antibacterial activity from *Porthidium nasutum* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 161, n. 4, p. 341–7, 2012.

VASSAR, R.; BENNETT, B. D.; BABU-KAHN, S.; KAHN, S.; MENDIAZ, E. A.; et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. **Science**, v. 286, p. 735-41, 1999.

VEGA, C.; ROLÓN, M.; MARTINEZ-FERNANDEZ, A.R. et al. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing beta-galactosidase. **Parasitol. Res.**, v. 95, p. 296–8, 2005.

VITAL-BRAZIL, O. Peçonhas. In: **Farmacodinâmica**. (Corbett, C.E.). Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 679-697, 1982.

WATOREK, W.; FARLEY, D.; SALVESEN, G.; TRAVIS, J. In Second International Symposium on Neutrophil Proteinases and their Inhibitors, **Plenum Press, New York**, p. 23-31, 1989.

WLODAWER, A.; ERICKSON, J. W. Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 62, p. 543-85, 1993.

WU, P.F.; WU, S.N.; CHANG, C.C.; CHANG, L.S. Cloning and functional expression of B chains of β -bungarotoxins from *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait). **Biochem. J.**, v. 334, p. 87-92, 1998.

WÜSTER W., THORPE, R. S.; PUORTO, G. Systematics of the *Bothrops atrox* complex (reptilia : serpentes : viperidae) In brazil : a multivariate analysis, v. 52, n. 2, p. 263-271, 1996.

YAN, S.; SAMENI, M.; SLOANE, B. F. Cathepsin B and human tumor progression. **Biol. Chem.**, v. 379, p. 113-23, 1998.

APÊNDICE A

Ensaio de inibição enzimática com a quimotripsina

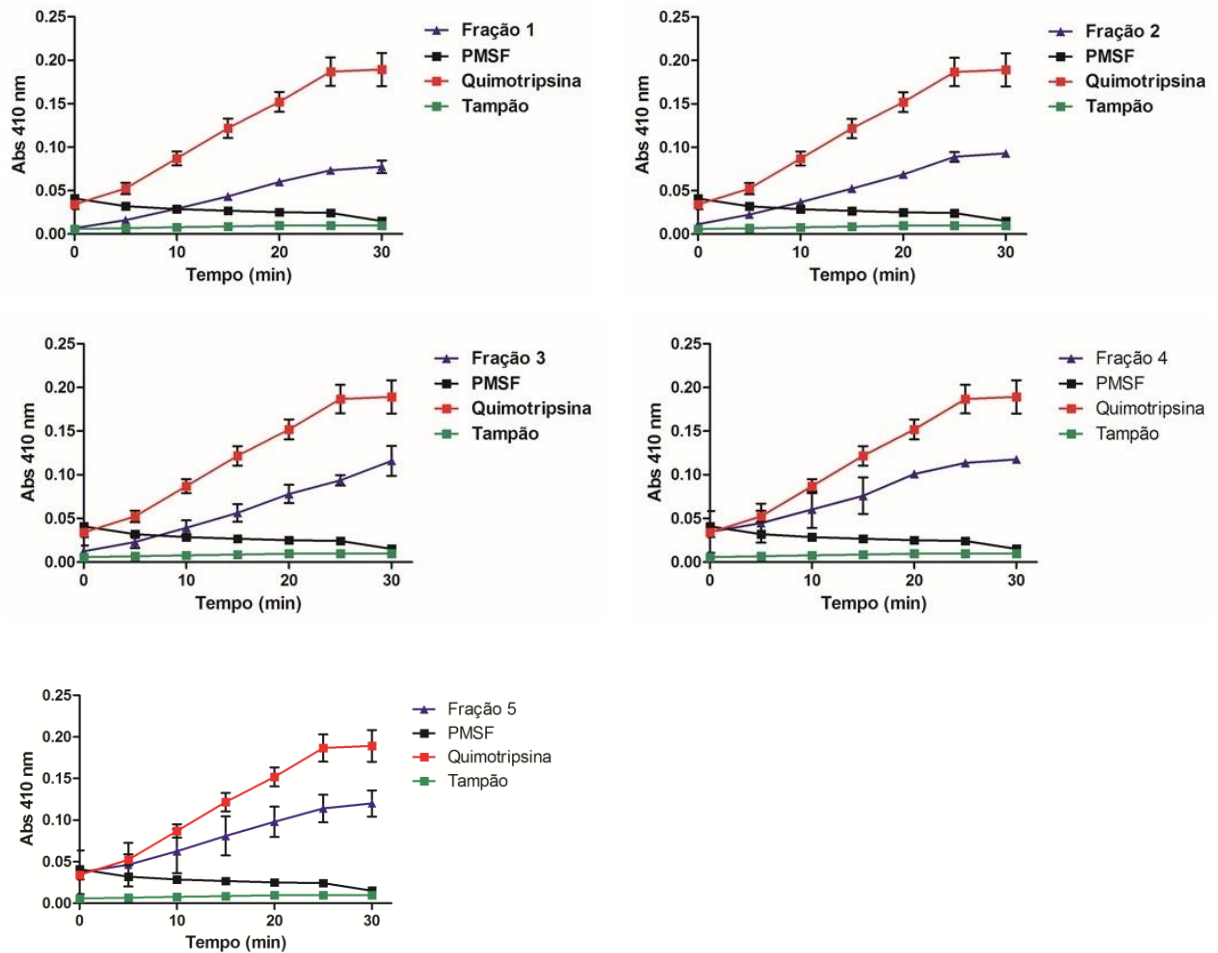


Figura 13. Gráficos de inibição da atividade enzimática de quimotripsina para as cinco frações de *B. atrox*. Os ensaios de reação foram realizados em triplicata, durante 30 minutos de reação e analisados espectrofotometricamente em 410 nm. Todas as frações e o PMSF foram testados na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Controle positivo: Quimotripsina (630 $\mu\text{g/mL}$) + PMSF + GPNa (400 $\mu\text{g/mL}$); Controle negativo: Quimotripsina + GPNa + Tampão, e para o branco da reação utilizou-se somente o tampão Tris-HCl 0,05 M; CaCl_2 20 mM pH 7,6, média \pm SEM (n=3). *p < 0,05.

APÊNDICE B

Tabela 2. Inibidores de serinoproteases do tipo Kunitz encontrados em venenos de serpentes.

Espécie	Nome	Sequência	Massa (Da)	Uniprot Database
<i>Daboia siamensis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor C10	YNPASNQCGGF	1.228	P85041
<i>Micrurus altirostris</i>	Serine protease inhibitor BPTI/Kunitz inhibitor	GSPKYCHLPADPGPC	1.542	P0DM47
<i>Bungarus candidus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog T1-2 B chain	RQRHPDCDKPPDTGN	1.736	P84473
	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog T1-1 B chain	RKRHPDCDKAADTRI	1.782	P84471
<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor OMI	KDFCHLPPKPGPCRAAI	1.850	P0DJ63
<i>Bungarus candidus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog T2 B chain	RQRHRDCDKPPDKTN	1.866	P84470
<i>Daboia russelii siamensis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor C9	HDRPKFCYLPADPGECMA	2.050	P85040
	Kunitz-type serine protease inhibitor C8	HDRPKFCYLPADPGECCLAHMRSF	2.691	P85039
<i>Micrurus pyrrhocryptus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor G1	KVPAYCKLPPDSGPKGHFPAFYYPVSSYC QKFI	3.955	P0CAR0
<i>Naja naja</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor	RPGFCELPAAKGLCKAHKPAFYFNKDSHRCQ KFIYGGCGGNANRFRTIDECNRTCVG	6.371	P20229
<i>Hemachatus haemachatus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor 2	RPDFCELPAETGLCKAYIRSFHYNLAAQQCL QFIYGGCGGNANRFRTIDECRRTCVG	6.407	P00985
<i>Naja nivea</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor 2	RPRFCELPAETGLCKARIRSFHYNRAAQQCL EFIYGGCGGNANRFRTIDECNRTCVG	6.466	P00986
<i>Dendroaspis polylepis polylepis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog dendrotoxin B	RPYACELIVAAGPCFFISAFYYSKGANKCY PFTYSGCRGNANRFRTIEECRRTCVV	6.476	P00983
<i>Naja naja</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor	RPRFCELAPSAGSCFGVSSYYNRYNRSNTCH SFTYSGCGKGNANRFRTIDECNRTCVV	6.508	P19859
<i>Dendroaspis angusticeps</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog delta-dendrotoxin	AAKYCKLPVRYGPKKKI PSFYKWKAKQCL PFDYSGCGGNANRFRTIEECRRTCVG	6.574	P00982
<i>Dendroaspis polylepis polylepis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor dendrotoxin E	LQHRTFCKLPAEPGPKASIPAFYFNWAAKK CQLFHYGGCKGNANRFSTIEKCRHACVG	6.620	P00984

<i>Dendroaspis angusticeps</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor long epsilon-dendrotoxin His55	LQHRTFCKLPAEPGPKASIPAFYYNWAACK CQLFHYGGCKGNANRFSTIEKCRHACVG	6.620	Q7LZE3
	Kunitz-type serine protease inhibitor dendrotoxin DaE1	LQHRTFCKLPAEPGPKASIPAFYYNWAACK CQLFHYGGCKGNANRFSTIEKCRACVG	6.639	P0DMJ6
	Kunitz-type serine protease inhibitor long epsilon-dendrotoxin Arg55	LQHRTFCKLPAEPGPKASIPAFYYNWAACK CQLFHYGGCKGNANRFSTIEKCRACVG	6.639	Q7LZS8
<i>Daboia siamensis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor 2	HDRPTFCNLPESGRCRGLRRIYYNLESNK CKVFFYGGCGGNANRFETRDECRETGGK	6.850*	P00990
<i>Dendroaspis angusticeps</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog calcicludine	WQPPWYCKEPVRIGSCKQFSSFYFKWTAKK CLPFLFSGCGGNANRFQTIGECRKKCLGK	6.986	P81658
	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog alpha-dendrotoxin	QPRKLCILHRNPGRYDKIPAFYYNQKKKQ CERFDWGGCGGNSNRFKTIIECRRTCIG	7.071	P00980
<i>Bungarus multicinctus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B5-B chain	RQRHPDCDKPPDTRCTGHNPAFYYNPRRKN CERFSYGGCGGNGNHFKTKQLCHCHCHEND	7.134*	Q0PL65
<i>Dendroaspis polylepis polylepis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog dendrotoxin I	QPLRKLKILHRNPGRYQKIPAFYYNQKKKQ CEGFTWGGCGGNSNRFKTIIECRRTCIRK	7.155	P00979
<i>Bungarus fasciatus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor IX	KNRPTFCNLLPETGRCNALIPAFYYNSHLHK CQKFNYGGCGGNANRFKTIDECQRTCAAKYGRSS	7.294	P25660
<i>Vipera renardi</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor Vur-KIn	QDHPVFCYLPADPGICKAHKPRFYYPASNK CKEFFYGGCGGNANRFKTRDECHHTCVASAMGRPT	7.370*	P0DKL8
<i>Walterinnesia aegyptia</i>	Protease inhibitor 1 BPTI/Kunitz inhibitor	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPVSGRPG LCEL PAETGPCKARIRAFYYNPHSHKCLEFTYGGC KGNANNFKTIDECNRTCVG	8.777*	C1IC50
<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor microlepidin-5	MSSGGLLLLLLGLLTLWEV LTPVSSKDRPKFY ELPADIGPCEDFTGAFHYSPREHECIEFTIYG GCEGNANNFNTLEECET	8.788	B5L5Q6
<i>Naja atra</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor NACI	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPVSGRPRFCEL APSAGSCFAFVPSYYNQYSNTCHSFTYSGC GGNANRFRTIDECNRTCVG	8.815	Q5ZPJ7
<i>Dendroaspis polylepis polylepis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog dendrotoxin K	SGHLLLLLGLLTLWAE LTPVSGAAKYCKLPL RIGPCKRKIPSFYKWAQCLPFDYSGCGN ANRFKTIIECRRTCVG	8.852	P00981
<i>Walterinnesia aegyptia</i>	Protease inhibitor 3 BPTI/Kunitz inhibitor	MSSGCLLLLLLGLLTLWAE LTPVSGRPR LCEL PAESGLCNAYIPSFYYPHSHKCKQKFMYGCC GGNANNFKTIVECHRTCVG	8.854	C1IC51
	Protease inhibitor 2 BPTI/Kunitz inhibitor	MSSGCLLLLLLGLLTLWAE LTPVSGRPR LCEL PAESGLCNAYIPSFYYPHSHKCKQKFMYGCC GGNANNFK TIDECHRTCVG	8.870	C1IC52

<i>Bungarus candidus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor B	MSSGGLLLLGLLTLCAELTPVSSKDRPKFC NVPPEPGRCNANVRAFYYNPRLRKCI EFTY G GCGGNANNFKSGGECKRACGE	8.919	Q8AY42
<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor microlepidin-4	MSSGGLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPKFC ELPADIGPCEDFTGAFHYSPREHECIEFTY G GCEGNANNFNTLEGCE SACAA	8.958	B5KL28
<i>Pseudonaja textilis textilis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor textilinin-4	MSSGGLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDHPKFC ELPADTGSCCKGNVPRFYNNADHHQCLKFI YG GCGGNANNFKTIEECKSTCAA	8.983	Q90W98
<i>Ophiophagus hannah</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor TCI	MSSGRLLLLLGLLTLWAELTPVSGLGRPKFC ELPAVSGFCKAYI PSFYNP DASACQKFI YGG CGGNANKFKTIEECHRTCVG	8.983	B6RLX2
<i>Oxyuranus scutellatus scutellatus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor scutellin-3	MSSGGLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPKFC ELPADIGPCEDFTGAFHYSPREHECIEFTY G GCKGNANNFNTLEECESACAA	9.029	B5KL29
<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor microlepidin-3	MSSGGLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPKFC ELPADIGPCEDFTGAFHYSPREHECIEFTY G GCEGNANNFNTLEECESACAA	9.030	B5KL27
<i>Pseudonaja textilis textilis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor textilinin-5	MSSGGLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPKFC ELLPDTGSCEDFTGAHYSTRDRECIEFTY GG CGGNANNFITKEECESTCAA	9.031	Q90W97
	Kunitz-type serine protease inhibitor textilinin-7	MSSGGLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPKFC ELLPDTGSCEDFTGAFHYSTRDRECIEFTY G GCGGNANNFKTLEECESTCAA	9.031	B5L5Q1
<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor microlepidin-1	MSSGGLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPDLC ELPADTGPCRVGFP SFYYPNDEKKCLEFI YG GCEGNANN FITKEECESTCAA	9.040	Q6ITB5
<i>Oxyuranus scutellatus scutellatus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor scutellin-1	MSSGGLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPDFC ELPADTGPCRVGFP SFYYPNDEKKCLEFI YG GCEGSANNFITKEECESTCAA	9.047	Q6ITB7
<i>Hoplocephalus stephensii</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor stephenin-2	MSSGGLLLLGLLTLLEILTPVSSKDRPKFC ELPADSGSCKGNFQAFYYPNDQHQCLEFI YG GCDGNANNFKTIDECKRTCAA	9.054*	B5L5R7
<i>Pseudonaja textilis textilis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor textilinin-6	MSSGGLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPKFC ELPADIGPCDDFTGAFHYSPREHECIEFTY G GCKGNANNFNTQEEC ESTCAA	9.060	Q90W96
<i>Oxyuranus scutellatus scutellatus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor scutellin-4	MSSGGLLLLGLLTLWAELTPVSSKDHPEFC ELPADSGPCRGI LHAFYYHPVHRTCLGFI YG GCYGNANNFKTIDECKRTCAA	9.063	B5KL30
<i>Notechis scutatus scutatus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor tigerin-2	MSSGGLLLLGLLTLWAELTPVSSKDHPEFC ELPADSGPCRGI LHAFYYHPVHRTCLGFI YG GCYGNANNFKTIDECEPPCAA	9.073	Q6ITB2
<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor microlepidin-2	MSSGGLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPDFC ELPADTGPCRVGFP SFYYPNDEKKCLEFI YG GCEGNANNFITKEECESTCAA	9.074	Q6ITB4
<i>Oxyuranus scutellatus scutellatus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor scutellin-2	MSSGGLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPDFC ELPADTGPCRVGFP SFYYPNDEKKCLEFI YG GCEGNANNFITKEECESTCAA	9.074	Q6ITB6

<i>Bungarus candidus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor A	MSSGGLLLLLLGLLTLCAELTPVSSKDRPKFC NVPPEPGRCNANVRAFYYNPRLRKCIeftyG GCGGNANNFKSRGECKRTCAE	9.077	Q8AY43
<i>Rhinoplocephalus nigrescens</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor nigrescinin-6	MSSGGLLLLLLGLLTLWEVLTTPVSSDRPDFC ELPEDSGSCKGNFEAFYYNSDQHQCLEFIYG GCDGNANN FKTIEECKLTCAA	9.093	B5KL37
<i>Austrelaps superbus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor superbin-3	MSSGGLLLLLLGLLTLWEVLTTPVSSKDRPEFC ELPADSGSCKGNFQAFYYNPVQHQCLEFIYG GCDGNANNFKTIDECKRTCAA	9.098	B5KL40
<i>Pseudechis australis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor mulgin-3	MSSGGLLLLLLGLLTLWEELTPVSSKDRPDFC ELPADTGPCRVGFPsfYYNPDEKKCLEFIYG GCQGNANNFITKEECESTCAA	9.103	Q6ITB9
<i>Bungarus multicinctus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta bungarotoxin B5 chain	MSSGGLLLLLLGLLTFCAELTPVSSRKRHPYC NLPDPGPGCHDNKFAFYHHPASNKCKEFVYG GCGGNDNRFKTRNKQCQCTCSG	9.108*	Q1RPS9
	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B6 chain	MSSGGLLLLLLGLLTVCAELTPVSSKDPYCNL PPDPGPGCHDNKFAFYHHPASNKCKEFVYGGC GGNDNRFKTRNKQCQCTCSEYP	9.113	Q1RPS8
<i>Drysdalia coronoides</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor 161	MSSGGLLLLLLGLLTLWAELTPVSSKDRPDFC HLPADSGSCKGNFQAFYYHPVHRTCLEFIYG GCEGNANNFKTMDECKRTCAA	9.120	F8J2F4
<i>Demansia vestigiata</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor vestiginin-5	MSSGGLLLLLLGLLTLWAELTPVSSKDRPEFC ELPPDRGTCMGFLQAFYYNPSQKGLPFMFG GCKANPNNFKTLEECKRTCAA	9.127	A6MGX9
<i>Bungarus candidus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor C	MSSGGLLLLLLGLLTLWTELTPVSSKNRPPFC NLLPEPGRCNAIVRAFYYNSRLRKCLEFPYG GCGGNANNFKTIDECQRTCAG	9.130	Q8AY41
<i>Notechis scutatus scutatus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor tigerin-1	MSSGGLLLLLLGLLTLWAELTPVSSKDHPEFC ELPADSGPCRGIHAFYYHPVHRTCLEFIYG GCYGNANNFKTIDECKRTCAA	9.136	Q6ITB3
<i>Ophiophagus hannah</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor	MSSGRLLLLLGLLTLWAELTPVSGLGRPKFC ELPPEPGLCNARKTFYYSLSHSHACQKFIYG GCGGNANKFKTIDECHRTC VG	9.136	P82966
<i>Pseudechis australis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor mulgin-4	MSSGGLLLLLLGLLTLWEGLTPVSSKDHPRFC ELPADPGPCNGLFQAFYYNPVQRTCLKFRYG GCKGNPNTFKTIEECKRTCAA	9.144	Q6ITB8
<i>Daboia russelii</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor 4	MSSGGLLLLLLGLLTLWAELTPISGQDRPKFC HLPVDSGICRAH IPRFYYNPASNQCQGF IYG GCGGNANFETRDQCRHTCGGK	9.145	Q2ES47
<i>Bungarus multicinctus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor PILP-2	MSSGGLLLLLLGLLTLWMELTTPVSSKNRPPFC NLLPEPGRCNAIVRAFYYNSRPRKCLEFPYG GCGGNANNFKTIEECQRTCAG	9.158	B4ESA3
<i>Pseudonaja textilis textilis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor textilinin-3	MSSGGLLLLLLGLLTLWEVLTTPVSSKDRPNFC KLPAETGRCAKI PRFYYNPVQHCKLKFRIYG GCGGNANNFKTIKECESTCAA	9.158	Q90W99
<i>Hoplocephalus stephensii</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor stephenin-1	MSSGGLLLLLLGLLTLWEVLTTPVSSKDRPEFC ELPADPGPCNALSQAYYYNPVQHCKLKFRIYG GCKANPNTFKTIEECKRTCAA	9.170	B5KF94

<i>Pseudonaja textilis textilis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor textilinin-1	MSSGGLLLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPDFC ELPADTGPCRVRFPSPFYYPNDEKKCLEFIYG GCEGNANNFITKKEECSTCAA	9.173	Q90WA1
<i>Demansia vestigiata</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor vestiginin-2	MSSGGLLLLLLGLLTLWAEALTPVSSKDRPEFC ELPPDRGTCMGYSQAFYYPNPSQNKCLPFMFG GCKANPNNFKTLEECKRTCAA	9.174	A6MFL2
<i>Rhinoplocephalus nigrescens</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor nigrescinin-2	MSSGGLLLLLLGLLTLWEALTPVSSTDRPEFC ELPEDSGPCKGLFHVFFYYPNPDQSQCLEFIYG GCYGNANNFKTIEECKRTCAA	9.175	B5KF96
	Kunitz-type serine protease inhibitor nigrescinin-4	MSSGGLLLLLLGLLTLWEVLTPVSSTDRPEFC ELPEDSGPCKGLFHVFFYYPNSDQNCLEFIYG GCYGNANNFKTIEECKLTCAA	9.177	B5KL35
<i>Tropidechis carinatus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor carinatin-2	MSSGGLLLLLLGLLTLWEILTPVSSKDHPEFC ELPADSGPCRGIHLHAFYYPVHRTCLEFIYG GCYGNANNFKTIDECKRTCAA	9.178	B5KL33
<i>Pseudonaja textilis textilis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor textilinin-2	MSSGGLLLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPELC ELPPDTGPCRVRFPSPFYYPNDEQKCLEFIYG GCEGNANNFITKKEECSTCAA	9.179	Q90WA0
<i>Demansia vestigiata</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor vestiginin-1	MSSGGLLLLLLGLLTLWAEALTPVSSKDRPEFC ELPPDRGTCMGFLQAFYYPNPSQNKCLPFMFG GCKANPNNFKTLEECKRTCAA	9.184	A6MFL1
<i>Austrelaps superbus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor superbin-2	MSSGGLLLLLLGLLTLWEVLTPISSKDRPKFC ELPADTGPKAIFQAFYYPVHRTCLKFIYG GCEGNANNFKTIDECKRTCAA	9.186	B5KL39
<i>Demansia vestigiata</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor vestiginin-4	MSSGGLLLLLLGLLTLWEVLTPVSSTDRPEFC ELPEDSGPCKGLFHVFFYYPNSDQNCLEFIYG GCYGNANN FKAIEECKRTCAA	9.190	A6MFL4
<i>Rhinoplocephalus nigrescens</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor nigrescinin-1	MSSGGLLLLLLGLLTLWEALTPVSSTDRPEFC ELPEDSGPCKGLFHVFFYYPNSDQNCLEFIYG GCYGNANNFKTIEECKRTCAA	9.192	B5KF95
	Kunitz-type serine protease inhibitor nigrescinin-5	MSSGGLLLLLLGLLTLWEVLTPVSSTDRPEFC ELPEDSGPCKGLFHVFFYYPNSDQNCLEFIYG GCYGNANNFKTIEECKRTCAA	9.204	B5KL36
<i>Pseudechis australis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog mulgin-1	MSSGGLLLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPRFC ELPADPGPCNGLFQAFYYPVQRTCLKFRGG CKGNPNT FKTIEECKRTCAA	9.205	Q6ITC1
<i>Drysdalia coronoides</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor 18	MSSGGLLLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPHFC HLPADPGRCNALSEAFYYPVQRKCLKFRYG GCKANANTFKTIDECKRTCAA	9.209	F8J2F6
<i>Pseudechis australis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor mulgin-2	MSSGGLFLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPKFC ELPPDSGSKGSFQAFYYPVHRTCLEFIYG GCEGNDNNFKTIDECKRTCAA	9.213*	Q6ITC0
<i>Pseudechis australis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor mulgin-5	MSSGGLLLLLLGLLTLWEGLTPVSSKDRPNFC HLPDHPGPKGNFQAFYYPVRRRTCLEFIYG GCQGNPNNFKTIDECKRTCAA	9.218	B5L5Q8
<i>Bungarus multicinctus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor PILP-3	MSSGGLLLLLLGLLTLWAEALTPVSSRKRHQFC NVPEPGRCNANVRAFYYPNRLRKCIEFSYG GCGGNANNFKSRGECKRTCAE	9.227	B4ESA4
<i>Austrelaps superbus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor superbin-1	MSSGGLLLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPEFC KLPADTGRCKGKFPAFYYPVHRTCLEFIYG	9.228	B5KL38

GCKGNPNNFKTIDECERTCAA				
<i>Pseudechis porphyriacus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor blackelin-3	MSSGGLLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPKFC ELPADPGPCNGLFQAFYYNPNVQRKCLKFRYG GCKANPNTFKTIEECKRICAA	9.230	B5KL31
<i>Pseudechis rosignolii</i>	Kunitz serine protease inhibitor Pr-mulgin 1	MSSGGLLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPRFC ELPADPGPCNGLFQAFYYNPNVQRKCLKFRYG GCKGNPNTFKTIEECKRTCAA	9.232	E7FL11
<i>Drysdalia coronoides</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor 28	MSSGGLLLLLGLLTLWAEALTPVSSKDRPHFC HLPADTGPCCKARFQAFYYHPVHRKCLEFIYG GCEGNANNFKTIDECKRTCAA	9.232	F8J2F3
<i>Pseudechis rosignolii</i>	Kunitz serine protease inhibitor Pr-mulgin 2	MSSGGLLLLLGLLTLWEGLTPVSSKDRPHFC HLPDHPGPKGNFQAFYYHPVRRCTCLEFIYG GCQGNPNNFKTIDECKRTCAA	9.241	E7FL12
	Kunitz serine protease inhibitor Pr-mulgin 3	MSSGGFLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPKFC ELPADSGSCKGNFQAFYYHPVHRCTCLEFIYG GCEGNDNNFKTIDECKRTCAT	9.244	E7FL13
<i>Rhinoplocephalus nigrescens</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor nigrescinin-3	MSSGGLLLLLGLLTLWEALTPVSSTDRPEFC ELPEDSGPCKGLFHVFFYYNSDQNRLEFIYG GCYGNANNFKTIEECKRTCAA	9.245	B5KL34
<i>Drysdalia coronoides</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor 87	MSSGGLLLLLGLLTLWAEALTPVSSKDRPDFC HLPHETGPKAKIQAFYYNPIYDTCLKFIYG GCEGNANNFKTMDECKRTCAE	9.252	F8J2F5
<i>Bungarus multicinctus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor PILP-1	MSSGSLLLLGLLTLWAEALTPISKDRPSCD KAPDTERCKRNVYAFYYNPSARDCLQFVYGG CDGNGKHFRSKALCLFHCHR	9.259	B4ESA2
<i>Walterinnesia aegyptia</i>	Kunitz inhibitor IV	MSSGCLLLLGLLTLWAEALTPISGLGGPKYC HLPADPGPCSNYRPAYYNPNASRKCEEFMYG GCKGNKNNFKTRHECHRVCVR	9.270	C1IC53
<i>Pseudechis porphyriacus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor blackelin-2	MSSGGLLLLLGLLTLWEGLTPVSSKDRPDFC ELPDDRGPCRGIFHAFYYNPDQRQCLEFIYG GCYGNANNFKTIDECKRTCAA	9.285	B5G6G6
<i>Tropidechis carinatus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor carinatin-1	MSSGGLLLLLGLLTLWEGLTPVSSKDRPDFC ELPDDRGPCRGIFHAFYYNPDQRQCLEFIYG GCYGNANNFKTIDECERTCAA	9.286	Q6ITB0
<i>Pseudechis porphyriacus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor blackelin	MSSGGLLLLLGLLTLWEGLTPVSSKDRPDFC ELPDDRGPCRGIFHAFYYNPDQRQCLEFIYG GCYGNANNFKTIDECERTCAA	9.286	Q6ITB1
<i>Daboia russelii siamensis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor 1	MSSGGLLLLLGLLTLWAEALTPISGHRPTFC NLAPESGRCRGLRRIYYNLESNKCKVFFYG GCGGNANNFETRDECRQTCGGK	9.287	Q2ES50
	Kunitz-type serine protease inhibitor 7	MSSGGLLLLLGLLTLWAEALTPISGHRPTFC NLAPESGRCRGLRRIYYNLESNKCKVFFYG GCGGNANNFETRDECRQTCGGK	9.287	A8Y7P0
<i>Notechis scutatus scutatus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor tigerin-3	MSSGGLLLLLGLLTLWEILTPVSSKDRPHFC HLPDHTGPCNRNTQAFYYNPNVYHTCLKFIYG GCQGNSNNFKTIDECKRTCAA	9.294	B5KL32
<i>Austrelaps superbus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor superbin-4	MSSGGLLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPNFC HLPDHTGPCNRNTQAFYYNPNVYHTCLKFIYS GCEGNANNFKTIDECKRTCAT	9.316	B5KL41

<i>Bungarus fasciatus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor bungaruskunin	MSSGGLLLLLLGLLTLWTELTPVSSLGGPAYC KLPPEPGPCHEYKHAFFYYPDARECEEFIYG GCKGNKNNFKTRHECHRVCVR	9.316	B2KTG1
<i>Daboia russelii siamensis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor B2	MSSGGLLLLLLGLLTLWAEELTPISGHDRPTFC NLAPESGRCRGLRRIYYNLESNKCNVFFYG GCGGNDNMFETRDECRQTCGGK	9.317	A8Y7P2
	Kunitz-type serine protease inhibitor B1	MSSGGLLLLLLGLLTLWAEELTPISGHDRPKFC YLPADPGECCLAHMRSFYDSESKKCKEFIYG GCHGNANKFPSRDKCRQTCGGK	9.318	A8Y7P1
<i>Bungarus flaviceps flaviceps</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B chain	MSSGSLLLLLLGLLTLAELTPVSSRKRHPDC DKPPNKKRCTGHI PAFYYPNQKTCERFSYG GCKGNNGNHFKTPQLCMCHCHE	9.334	Q7T2Q6
<i>Daboia russelii siamensis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor B3	MSSGGLLLLLLGLLTLWAEELTPISGHDRPTFC NLAPESGRCRGLRRIYYNLESNKCEVFFYG GCGGNDNFSTRDECRHTCVGK	9.341	A8Y7P3
	Kunitz-type serine protease inhibitor B6	MSSGGLLLLLLGLLTLWAEELTPISSHDRPKFC NLAPESGRCRGLRRIYYNLESNKCKVFFYG GCGGNANNFETRDECRQTCGGK	9.344	A8Y7P6
<i>Demansia vestigiata</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor vestiginin-7	MSSGGLLLLLLGLLTLWAEELTPVSSKDRPEIC KLPKEPGPCRSYLLYFYNSVEHKCQTFHYG GCEGNENRFHTIEECKSTCAA	9.347	A6MGY1
<i>Demansia vestigiata</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor vestiginin-3	MSSGGLLLLLLGLLTLWAEELTPVSSKDLPEIC KLPKEPGPCRSYLLYFYNSVEHKCQTFHYG GCEGNENRFHTIEECKSTCAE	9.362	A6MFL3
<i>Daboia russelii siamensis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor B4	MSSGGLLLLLLGLLTLWAEELTPISGHDRPTFC NLAPESGRCRGLRRIYYNLESNKCEVFFYG GCGGNDNFSTWDECRHTCVGK	9.371	A8Y7P4
	Kunitz-type serine protease inhibitor C2	MSSGGLLLLLLALLTLWAEELTPISGHDRPTFC NLAPESGRCRAHLRRIYYNLESNKCEVFFYG GCGGNDNFFSSWDECRHTCVGK	9.385	A8Y7N5
	Kunitz-type serine protease inhibitor DrKIn-II	MSSGGLLLLLLGLLTLWAEELTPISGHDRPTFC NLAPESGRCRAHLRRIYYNLESNKCEVFFYG GGGNDNFFSTWDECRHTCVGK	9.385	H6VC06
<i>Bungarus candidus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B4 chain	SSGGLLLLLLGLLTLCAELIPVSSRQRHRDCD KPPDKGNCGSVRRAFYDTRLKTKCAFYPYRG CNGNGNHFKTETLRCRCECLVYP	9.399	Q75S49
<i>Daboia russelii siamensis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor 3	MSSGGLLLLLLGLLTLWAEELTPISGHDRPKFC YLPADPGECMAYIRSFDYDSESKKCKEFIYG GCHGNANNFPTRDKCRQTCRGK	9.417	Q2ES48
	Kunitz-type serine protease inhibitor C3	MSSGGLLLLLLGLLTLWAEELTPISGHDRPKFC YLPADPGECMAYIRSFYDSESKKCKEFIYG GCHGNANNFPTRDKCRQTCRGK	9.443	A8Y7N6
<i>Micrurus tener tener</i>	Kunitz-type neurotoxin MitTx-alpha	MSSGGLLLLLLGLLTLCAELTPVSSQIRPAFC YEDPPFFQKCGAFVDSYFNRSRITCVHFFY GQCDVQNHFHTMSECNRVCHG	9.498	G9I929
<i>Bungarus multicinctus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B4 chain	MSSGGLLLLLLGLLTLCAELTPVSSRKRHPDC DKPPDTKICQTVVRAFYYKPSAKRCVQFRYG GCNGNGNHFKSDHLRCRCECLEYS	9.499	Q1RPT0

<i>Bungarus fasciatus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin BF B2 chain	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPISSRERHPDC DKPPDTGRCGNNVRAFYYPKSTNKCVQFIYG GCNANGNHFKSDHLRCRCQCREND	9.506	B2KTG3
<i>Bungarus candidus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B1 chain	MSSGGLLLLLLGLLTLCAELTPVSSRQRHRDC DKPPDKGNCGSVRRAFYYDTRLKTCKAFQYR GCNGNGNHFKTETLRCCECLVYP	9.518	Q8AY46
<i>Bungarus multicinctus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B2 chain	MSSGGLLLLLLGLLTLCAELTPVSSRKRHPDC DKPPDTKICQTVVRAFYYPKPSAKRCVQFRYG GCNGNGNHFKSDHLRCCECLEYR	9.568	P00989
	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B1 chain, major component	MSSGGLLLLLLGLLTLCAELIPVSSRQRHRDC DKPPDKGNCGPVRRAFYYDTRLKTCKAFQYR GCNGNGNHFKTETLRCCECLVYP	9.571	P00987
<i>Bungarus candidus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B2a chain	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPVSSRKRHPDC DKPPDTKICQTVVRAFYYPKPSAKRCVQFRYG GCNGNGNHFKSDHLRCCECLEYR	9.592	Q8AY45
<i>Bungarus multicinctus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B3 chain	MSSGGLLLLLLGLLTLCAELIPVSSRQRHRDC DKPPDKGNCGPVRRAFYYDTRLKTCKAFQYR GCNGNGNHFKSDHLRCCECLEYS	9.599	Q9W728
<i>Bungarus fasciatus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin BF B1 chain	MSSGGLLLLLLGLLTLWTE LTPVSSRERHPDC DKPPDTGRCRKNVRAFYYPKPSAKRCVQFIYG GCNANGNHFKSDHLRCCECLEYR	9.636	B2KTG2
<i>Daboia russelii</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor 2	MSSGGLLLLLLGLLTLWAEPTPI SGQDRPKFC FLRPDFGRYGHPRPRFYYPNPNATNQCQGF LAQ RSRENTNMFDRDKCRQTCGRK	9.683	Q2ES49
<i>Bungarus candidus</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B2b chain	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPVSSRKRHPDC DKPPDTRICQTVVRAFYYPKSEKRCVQFRYG GCKGNGNHFKSDHLRCCE CLE YR	9.751	Q8AY44
	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B3 chain	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPVSSRKRHPDC DKPPDTRICQTVVRAFYYPKSEKRCVQFRYG GCKGNGNHFKSDHLRCCECLEYR	9.751	Q75S50
<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor 1	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPVSGQDHPKFC YLPADPGRCKAHI PRFYYSASNKCNKFIYG GCPGNANNFKTWDECRQTCGASAMGRPT	9.831	P00991
<i>Daboia russelii siamensis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor B5	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPISGHDRPKFC YLPADPGECLAHMRSFYYSSESKKCKEFTIYG GCHGNANKFPSRDKCRQTCGASAKGRPT	9.901	A8Y7P5
<i>Bitis gabonica</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor bitisilin-1	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPVSGKNRPEFC NLPADTGPC KAYEPRFYYSVSKECQKFTIYG GCKGNSNNFESMDECRKTCVASATRRPT	9.923	Q6T6T5
<i>Daboia russelii siamensis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor C5	MSSGGLLLLLLALLTLWAE LTPISGHDRPTFC NLAPESGRCRGHLRRI YYPNDSNKCEVFFY YG GCGGNDNNFETRKKCRQTCGAPRKRPT	10.006	A8Y7N8
<i>Bitis gabonica</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor bitisilin-2	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPVSGKKRPDFC YLPADTGPCMANFRFYYSASKKCKKFTIYG GCHGNANNFETRECRKKCFASAARRPT	10.007	Q6T6S5
	Kunitz-type serine protease inhibitor C1	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPISGQDRPKFC NLAPESGRCRGHLRRI YYPNDSNKCEVFFY YG GCGGNDNNFETRKKCRQTCGAPRKRPT	10.010	A8Y7N4

<i>Daboia russelii siamensis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor DrKIn-I	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPISGQDRPKFC NLAPESGRRCRGLRRIYYNPDSNKCEVFFY G GCGNDNNFETRKKCRQTCGAPRKG RPT	10.010	H6VC05
	Kunitz-type serine protease inhibitor C4	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPISGHDRPKFC YLPADPGECMAYIRSFYYDSSEKCKE FFIYG GCHGNANNFPTRDKCRQTCRAPRKG RHT	10.162	A8Y7N7
<i>Telescopus dhara</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor kunitoxin-Tell	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPVSGQDRPKYC DLPADSGPCRARKRHFYYNSRSNQCEEFTY G GCRGNENNFE TKDKCHYTCVAPRRRPL	10.229	A7X3V4
<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor 3	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPVSTRDRPKFC YLPADPGRCLAYMPSFYYSASNKCKKFIYG GRGNANNFKTWDECRHTCVASGIQPRIASN	10.330	P0092
<i>Daboia russelii siamensis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor C6	MSSGGLLLLLLGF LTLWAE LTPISGQNRPMFC HLPADSGRCKAHI PRFYYPASNQCGFTY G GCGGNANNFETR DQCRHTCGASGNVGP RPRI ASN	10.349	A8Y7N9
<i>Vipera nikolskii</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor ki-VN	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPVSSRDRPKFC YLP AEPGECNAYMPSFYYSASNKCKKFIYG GRGNANNFKTRDECHHTCVASGKGIQPRIGS N	10.426	E5AJX3
<i>Daboia russelii siamensis</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor 5	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPISGQDRPKFC HLPVDSGICRAHI PRFYYPASNQCGFIYG GCEGNANNFETR DQCRHTCGASGKEGPRPRI ASN	10.454	Q2ES46
<i>Macrovipera lebetina transmediterranea</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor PIVL	MSSGGLLLLLLGLLTLWAE LTPVSSQDRPKFC YLPADPAECNAYM PRFYYSASNKCKE FFIYG GCRGNANNFKNRAECRHTCVASRKG IQPRIAS SN	10.569*	I2G9B4
<i>Philodryas olfersii</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor kunitoxin-Phi1	MWARVLLLGLVLLSL LADLHAASGGDAGGQKT WNPRISDCEL PPEKGPCNNLELRWFYNL KSK RCERFFYGGCYGNANNFKEINECDRRCVSPD INKPG	11.021	A7X3V7
<i>Sistrurus catenatus edwardsii</i>	Fused toxin protein- Kunitz inhibitor	MSSGGLLLLLLGF LTLWAE LTPVSGQDPPRFC SLPAETGECRGRIPRFYYSASKQCEQFFYS GCGGNANNFETKDQCHYTCVEKPGVCP RPQP QQQEGKNCENDWKCPGQQKCCRYRGKTECK DAVFEKFASTTRTP T SIGSTPVGSSVPT	16.710	A5X2X1
<i>Bitis gabonica</i>	Kunitz-type serine protease inhibitor bitisilin-3	PLRPGTEKHTFPFPAEFCNL PADLGPCKNYT GRFYYSASNKCEVFIYGGCPGNANNFKTRE E CRKTCVEICILPAELGPCDEYTG RFYYSAS SNKCEVFIYGGCQGNANNFKTRDECRKTCVE ICILPAELGPCDEYTG RLLLRLLGIKQ	16.976	Q6T269
<i>Austrelaps labialis</i>	Putative Kunitz-type serine protease inhibitor	MTREKSLALLITLAAALAAAESPPGRCHSPK TVGPCRASFHRWRYNATSQMCQEFIFGGCKG NANNFVSKQDCFQTCIRGGAAEATVVP SGPA TEVATPRAGHLPEAYENRPGFRE FCAAPRVV GPCRASFLRWYFDLESRMCKMFIYGGCRGNK NNYLFEEHCWSQCTGDGEITEEPGDAGA QPP LPSEPF SFSTRAVVLAVLPAILVTILLGSMG VFFVKICRKNPELSVGT VWSTLDDKEYLMSN AYTL	27.571	B2BS84

*Inibidores de serinoproteases com massas moleculares semelhantes às massas identificadas nas frações de *B. atrox*.