

Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Análise peptidômica comparativa das peçonhas de duas espécies de
aranha marrom:**

Loxosceles laeta* e *Loxosceles intermedia

Aline Barbosa Guimarães

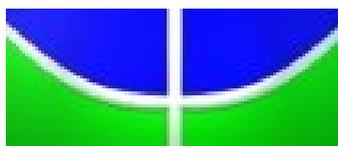
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bastos Cunha

Brasília – DF
Dezembro, 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Análise peptidômica comparativa das peçonhas de duas espécies de
aranha marrom:**

Loxosceles laeta e Loxosceles intermedia

Aline Barbosa Guimarães

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação do
Instituto de Química da
Universidade de Brasília, como
requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bastos Cunha

Brasília – DF
Dezembro, 2009

**A Deus,
pois tudo posso, Naquele que me fortalece.**

**Aos meus pais, Marco Aurélio e Olivia, os
Anjos que o Senhor colocou em minha vida.**

**A única coisa
que devemos temer é o
próprio medo.**

...e aranhas. 

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Ricardo Bastos Cunha, meu orientador e amigo. Foram sete anos de caminhada, que proporcionaram meu amadurecimento como pesquisadora e como pessoa.

Aos professores membros da banca, Prof. Osmino e Prof^a. Mariana, pois além de terem aceitado o convite, muito me ensinaram sobre venenos de aranhas, ops, peçonhas!

Aos professores do LBQP, Carlos André, Pedro, Wagner, Sébastien e Consuelo por todos os conselhos, apoio e direcionamentos. Aprendi e me diverti muito com todos!

Ao professor Marcello Valle, que me recebeu de portas abertas em seu laboratório e permitiu que essa pesquisa fosse realizada.

Ao Dr. Peter Roepstorff, que em nossa primeira conversa, me disse algumas coisas que mudaram o rumo do meu mestrado e ainda virou o meu lema:

“Science must be fun. If you’re not having fun, go and find something else. And then, have some fun!”

A Prof^a. Kátia C. Bárbaro, pelo envio das peçonhas, o início de todo o trabalho!

As xuxuletes, xuxis e xuxus do LBQP: Diana, Dri, Anne, Elaine (Lan Lan), Michaela, Fabi, Gisele e Jéssica. Sem esquecer quem já passou pelo grupo: Mi, Camila, Carlinha, Elaine, Aline, Carol e Liudy.

Aos meninos do LBQP também: Rayner, Biel, Rafael, Chael, Alan, Jax e Alê. E ao Antônio, pelo café de gaúcho e os churrascos!!

Ao Nuno, “meu co-orientador”, que tanto me aturou! Principalmente quando eu gritava: “Nuuuunoo!!!” . Obrigada também pelas músicas “que só o Nuno tem” e pelos sorvetes!!

Ao pessoal do Laboratório de Toxinologia: Polly, Carla, Sol e Jimmy por todas as conversas e risadas que sempre tinham como plano de fundo a corrida cromatográfica de alguém!

Aos meus amigos do Cambada, que tanto me ensinaram nos sábados à tarde.

Aos amigos de graduação Lucas e Joicy, que hoje estão fazendo doutorado fora, mas que de uma forma ou de outra, continuam presentes... amo ocêis tudo !

Aos meus colegas do NUPITEC/CDT– UnB, principalmente Rosângela e Márcia, minhas chefes, que foram muito compreensivas com a minha necessidade de sair mais cedo do expediente para finalizar o projeto.

Em especial, agradeço novamente aos meus pais, eles tiveram um papel fundamental nisso tudo, com o apoio, amor, colo, conversas e broncas...

Mamys, obrigada também pelo apoio como “banca” nos meus ensaios para seminários e para a defesa (sempre interpretando um suposto membro malvado! hahaha) e Papys,

se não fosse por toda a tua ajuda no *Word*, minha dissertação nem número de página teria! Obrigada por tudo! Eu os amo muito!!

As minhas irmãs Dani, Taty e Cacá, minhas grandes amigas e companheiras de tantas bagunças, que estiveram presentes desde os momentos de descontração até a finalização do projeto. Obrigada pelos lanchinhos e até por terem feito o papel de platéia nos meus ensaios!!! Hoje todo mundo sabe um pouco sobre peptidômica, não? hehe

Ao meu namorado Ricardo, companheiro até na bancada! Foi o único estagiário que tive em toda minha vida acadêmica! Obrigada pelo “Apoio Moral em domicílio” nos momentos em que surtei!!!

Ao atual secretário da PPG-IQ, Rogério (suuper brother!) e aos ex-secretários, Thiago e Rafael, que tanto que perturbei ao longo destes dois anos e meio!

A Universidade de Brasília, que vem sendo uma extensão lá de casa desde 2001. Nela conheci muitas pessoas que mudaram a minha vida e foi onde comecei a traçar um caminho acadêmico e profissional.

E a todas as outras pessoas não citadas aqui, mas pelas quais eu tenho um carinho enorme.... Valeu!

RESUMO

O loxoscelismo (picadas provocadas por aranhas do gênero *Loxosceles*) é a única causa comprovada de dermonecrose provocada por aranhas. Na região sul do Brasil, onde os acidentes provocados por estas aranhas representam um problema de saúde pública, pode-se citar pelo menos duas espécies que são encontradas: *Loxosceles laeta* e *Loxosceles intermedia*. A gravidade dessas lesões indica que existe a necessidade de ser desenvolvida uma terapia antiveneno específica e uma maneira de alcançar esse objetivo é estudando as composições das peçonhas de diferentes espécies de aranhas. A fim de se determinar a distribuição dos diferentes peptídeos existentes nos venenos entre estas duas espécies de *Loxosceles*, utilizamos uma abordagem peptidômica *offline*, combinando RP-HPLC e espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. Cada peçonha foi injetada em uma coluna de RP-HPLC Shimadzu Shim-pack C₁₈ e eluída com um gradiente linear de 0.1% TFA água e 0.1% TFA em ACN. Cada fração cromatográfica foi liofilizada, ressuspensa, transferida à placa de MALDI e misturada com 1 µL de solução de matrix (sendo uma combinação de DHB e HCCA, ou somente SA). Os experimentos de MALDI-TOF foram realizados com o instrumento Autoflex II (Bruker Daltonics, Germany). Detectamos 1216 componentes para uma faixa de 500 Da a 10.000 Da, 613 indicaram serem exclusivos para *L. laeta* e 531 para *L. intermedia*. Em comum, as duas espécies compartilham 29 peptídeos. Foram detectados diversos picos na região de baixa massa (abaixo de 1.000 Da), os quais suspeitamos que sejam acilpoliaminas, compostos encontrados na peçonha de aranhas e possuem uma atividade inseticida e também são responsáveis pela paralisação da presa. As perspectivas futuras incluem a identificação de alguns desses peptídeos detectados em cada peçonha, a confirmação da expressão dos mesmos e elucidar a estrutura das possíveis poliaminas detectadas.

ABSTRACT

Loxoscelism (bites by spiders of the *Loxosceles* genus) is the only proven arachnological cause of dermonecrosis. In the south region of Brazil, where accidents caused by this type of attack represent a public health issue, at least 2 species have been found: *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta*. The gravity of the injuries indicates the need of a specific antivenom therapy, and a way to accomplish that is studying the differences between the venom compositions of the different species. To determine the distribution of different polypeptide toxins between the two *Loxosceles* venoms, we used an offline peptidomic approach combining RP-HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry. Each venom was injected into a Shimadzu Shim-pack C₁₈ reversed-phase HPLC column and eluted under a gradient of 0.1% TFA in water and 0.1% TFA in acetonitrile. Each HPLC fraction was dried, resuspended, transferred to a MALDI plate and mixed with 1 µL of a matrix solution (either a combination of DHB and HCCA or SA alone). MALDI-TOF experiments were performed with an Autoflex II instrument (Bruker Daltonics, Germany). We detected 1216 components in the range of 500 Da-10000 Da; 613 of these components were indicated to be exclusive for *L. laeta* and 531 for *L. intermedia*. The two species share 29 peptides. There are many MS peaks at the low mass region (below 1.000 Da), which leaves the suspicion that they may be polyamines, compounds present in spider venoms which present insecticidal activity and are also responsible for the insect paralysis during predation. Future perspectives include the identification of some peptides found in each venom, the confirmation of the up and down-regulated ones, and the search for the elucidation of the structure of the polyamines detected.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	14
1.1. ANATOMIA E FILOGENIA DAS ARANHAS	15
1.2. COMPOSIÇÃO DAS PEÇONHAS DE ARANHAS.....	16
1.2.1. COMPONENTES DE MASSA MOLECULAR ABAIXO DE 1.000 DA.....	16
1.2.2. COMPONENTES DE MASSA MOLECULAR ENTRE 3.000 DA E 10.000 DA	17
1.2.3. COMPONENTES DE MASSA MOLECULAR ACIMA DE 10.000 DA.....	18
1.3. ARANHAS DO GÊNERO LOXOSCELES	19
1.4. LOXOSCELISMO	22
1.5. REVISÃO DE TOXINAS PRESENTES NO GÊNERO LOXOSCELES ENCONTRADAS NO BRASIL ..	27
1.6. ALGUNS ESTUDOS COMPARATIVOS DENTRO DO GÊNERO LOXOSCELES.....	32
1.7. ABORDAGENS ANALÍTICAS PARA O ESTUDO DA COMPOSIÇÃO PEPTIDÔMICA DE PEÇONHAS	34
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS	37
2.1. OBJETIVOS GERAIS	38
2.2. JUSTIFICATIVA.....	38
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	39
3. 1. OBTENÇÃO DA PEÇONHA.....	40
3.2. DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD.....	40
3.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – FASE REVERSA (RP-HPLC).....	40
3.4. ESPECTROMETRIA DE MASSAS	41
3.5. REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO DE FRAÇÕES DE <i>L. LAETA</i> E <i>L. INTERMEDIA</i>	42
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. ANÁLISE DA PEÇONHA BRUTA DE <i>L. LAETA</i> E <i>L. INTERMEDIA</i>	44

4.2. FRACIONAMENTO DAS PEÇONHAS DE <i>L. LAETA</i> E <i>L. INTERMEDIA</i>	45
4.3. ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS - COMPARAÇÃO PEPTIDÔMICA GERAL	48
4.3.1. MOLÉCULAS COM M/Z ABAIXO DE 1000 DA	63
4.3.2. COMPONENTES COM M/Z ACIMA DE 1000 DA	64
CAPÍTULO 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	72
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIAS	74

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CLASSIFICAÇÃO DA CLASSE ARACHNIDA.	16
FIGURA 2. ESTRUTURA GERAL DE UMA ACILPOLIAMINA.	17
FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO DO NÓ DE CISTEÍNA.	17
FIGURA 4. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>LOXOSCELES</i>	19
FIGURA 5. SILHUETA DE VIOLINO NO CEFALOTÓRAX E DISPOSIÇÃO DOS OLHOS EM TRÊS DÍADES: ESPÉCIE <i>LOXOSCELES RECLUSA</i>	21
FIGURA 6. MACHO DE <i>L. INTERMEDIA</i> E FÊMEA DE <i>L. LAETA</i> E OOTECA	22
FIGURA 7. DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES <i>L. LAETA</i> E <i>L. INTERMEDIA</i> NO ESTADO DO PARANÁ	23
FIGURA 8. POSSÍVEIS LOXOSCELISMO	25
FIGURA 9. MECANISMO PROPOSTO DE ATUAÇÃO DA PEÇONHA DE <i>LOXOSCELES SP.</i>	26
FIGURA 10. ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NA ABORDAGEM PEPTIDÔMICA DE PEÇONHAS PARA A PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS	36
FIGURA 11. ESPECTROS DE MASSA DO TIPO MALDI-TOF DA PEÇONHA BRUTA DE <i>L. LAETA</i> E <i>L.</i> <i>INTERMEDIA</i>	44
FIGURA 12. ESPECTROS DE MASSA DO TIPO MALDI-TOF PARA <i>L. LAETA</i> E <i>L. INTERMEDIA</i>	45
FIGURA 13. PERFIS CROMATOGRÁFICOS OBTIDOS PARA AS PEÇONHAS DAS ESPÉCIES <i>L. LAETA</i> E <i>L. INTERMEDIA</i>	46
FIGURA 14. SOBREPOSIÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS OBTIDOS PARA <i>L. LAETA</i> E <i>L.</i> <i>INTERMEDIA</i>	46
FIGURA 15. HISTOGRAMA DAS MASSAS MOLECULARES ENCONTRADAS NA PEÇONHA DE <i>L. LAETA</i> E <i>L. INTERMEDIA</i>	49
FIGURA 16. DISTRIBUIÇÃO DOS COMPONENTES DE MASSAS MOLECULARES EM RELAÇÃO À HIDROFOBICIDADE.	53
FIGURA 17. SOBREPOSIÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS COMPONENTES DE MASSAS MOLECULARES EM RELAÇÃO À HIDROFOBICIDADE PARA AS ESPÉCIES <i>L. LAETA</i> E <i>L. INTERMEDIA</i>	54
FIGURA 18. ESPECTRO DE MS/MS OBTIDO PARA O COMPOSTO DE M/Z 656	64
FIGURA 19. COMPLEXIDADE OBSERVADA NOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS DE <i>L. LAETA</i> E <i>L.</i> <i>INTERMEDIA</i>	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ARANHAS DO GÊNERO <i>LOXOSCELES</i> PRESENTES NO BRASIL	20
TABELA 2. MASSAS MOLECULARES DETECTADAS NA ANÁLISE DA PEÇONHA BRUTA DE <i>L. LAETA</i> COM MATRIZ AS.	49
TABELA 3. MASSAS MOLECULARES DETECTADAS NA ANÁLISE DA PEÇONHA BRUTA DE <i>L.</i> <i>INTERMEDIA</i> COM MATRIZ AS.	49
TABELA 4. MASSAS MOLECULARES DETECTADAS NA ANÁLISE DA PEÇONHA BRUTA DE <i>L. LAETA</i> UTILIZANDO A MISTURA DE MATRIZES HCCA E DHB.	51
TABELA 5. MASSAS MOLECULARES DETECTADAS NA ANÁLISE DA PEÇONHA BRUTA DE <i>L.</i> <i>INTERMEDIA</i> UTILIZANDO A MISTURA DE MATRIZES HCCA E DHB.	52
TABELA 6. MASSAS MOLECULARES DETECTADAS NAS PEÇONHAS DE <i>L. LAETA</i> E <i>L. INTERMEDIA</i> . .	56
TABELA 7. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CISTEÍNAS PRESENTES EM ALGUNS DOS COMPONENTES DETECTADOS NA PEÇONHA DE <i>L. LAETA</i>	65
TABELA 8. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CISTEÍNAS PRESENTES EM ALGUNS DOS COMPONENTES DETECTADOS NA PEÇONHA DE <i>L. INTERMEDIA</i>	66
TABELA 9. EXEMPLOS DE ALGUMAS TOXINAS E SUAS ATIVIDADES.....	67
TABELA 10. SUGESTÕES DE POSSÍVEIS MODIFICAÇÕES PARA ALGUNS DOS PEPTÍDEOS-ESCADA VISUALIZADOS PARA <i>L. LAETA</i>	71
TABELA 11. SUGESTÕES DE POSSÍVEIS MODIFICAÇÕES PARA ALGUNS DOS PEPTÍDEOS-ESCADA VISUALIZADOS PARA <i>L. INTERMEDIA</i>	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: acetonitrila

BSA: albumina de soro bovino

DHB: ácido 2,5-di-hidroxibenzóico

DTT: ditioneitol

HCCA: alfa-ciano-4-hidroxicinâmico

kDa: Quilodaltons

LC-ESI-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa com ionização por

eletropulverização

nm: nanômetro

m/z: massa sobre carga

mL: Mililitro

µg: Microgramas

µL: Microlitro

MALDI -TOF / MS: espectrometria de massa com ionização por desorção a *laser* e análise por tempo

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RP- HPLC: cromatografia líquida de fase reversa

SA: ácido sinapínico

SMD: esfingomielinase D

TFA: ácido trifluoroacético

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. Anatomia e filogenia das aranhas

As aranhas estão descritas na Ordem Arachnida, dentro do Filo Arthropoda e embora pertençam ao mesmo Filo que os insetos, as aranhas se diferenciam anatomicamente principalmente pela presença de quelíceras, com as quais injetam a peçonha; pela ausência de asas e antenas; pelo pedipalpo (que ajuda a manipular e envolver a presa na seda) e por apresentarem quatro pares de patas. Elas possuem uma segmentação corporal a menos, compreendendo somente o cefalotórax (uma combinação de cabeça e tórax) e o abdômen¹. Estes artrópodes estão distribuídos em praticamente toda a superfície terrestre, sendo mais raro encontrá-los em tundras e estepes das regiões polares e subpolares de ambos os hemisférios. Atingem maiores densidades nas regiões de clima tropical e subtropical onde povoam selvas, campos, planícies e plantações².

Como apresentado na Figura 1, a Ordem Aranae pode ser dividida em duas Subordens: Mesothelae e Opisthothela: Mesothelae, a primeira contendo somente uma família, Liphistiidae, que são aranhas primitivas e raras³, enquanto que a segunda Subordem é composta por dois grupos, o Mygalomorphae e Aranaeomorphae. Os dois grupos apresentados estão organizados de acordo com a posição da quelícera na aranha: no primeiro grupo, ela se projeta à frente do cefalotórax enquanto as quelíceras se posicionam para baixo, enquanto que no segundo grupo, as quelíceras estão posicionadas verticalmente e que conjuntamente com as presas se movem lateralmente como pinças⁴.

As aranhas migalomorfas (aranhas do tipo tarântula) representam cerca de 7% das espécies já descritas para Opisthothela enquanto que as aranhas araneomorfas (todas as outras aranhas) representam os 93 % restantes⁵.

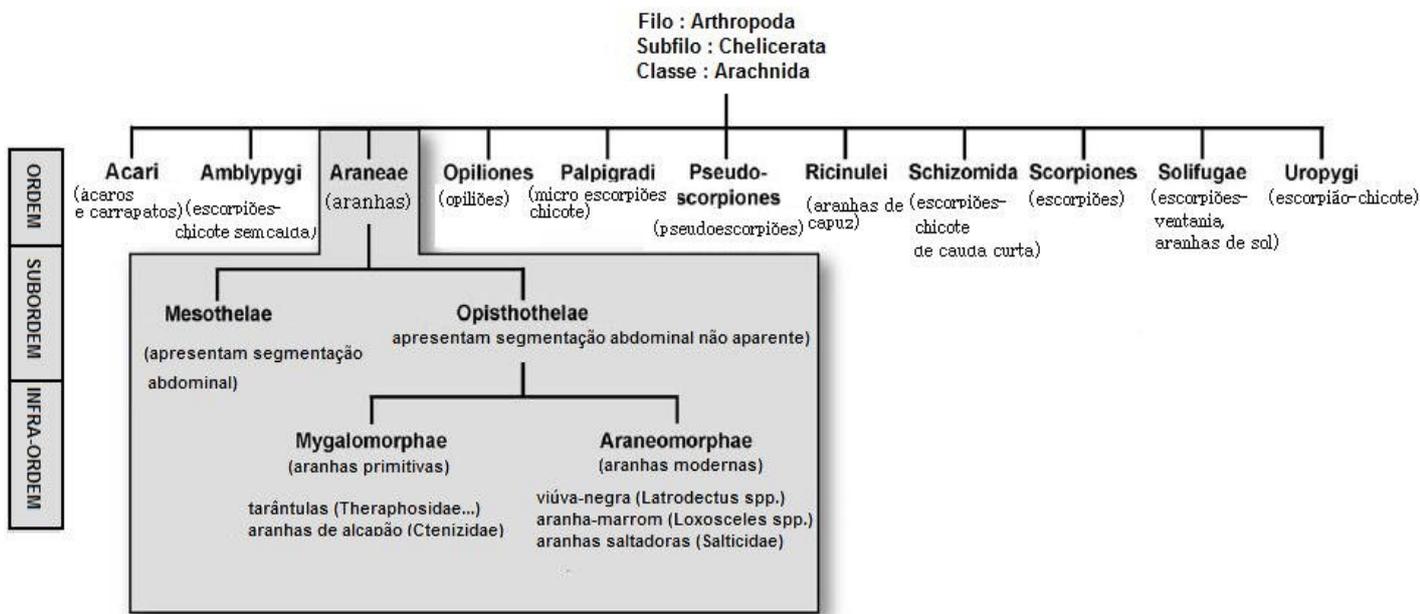


Figura 1. Classificação da classe Arachnida⁶.

1.2. Composição das peçonhas de aranhas

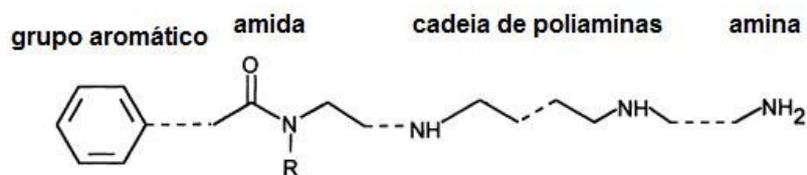
As peçonhas de aranhas possuem uma complexa mistura de componentes, cuja composição depende de fatores como gênero da aranha, nutrição, *habitat*, clima e é claro, da espécie. Os três grupos principais^{7,8} nos quais os componentes podem ser classificados serão discutidos nos próximos tópicos.

1.2.1. Componentes de massa molecular abaixo de 1.000 Da

A presença de diversos componentes inorgânicos e moléculas orgânicas de baixa massa molecular foi constatada na peçonha de diversas espécies de aranhas, tais como os ácidos livres (cítrico, láctico), glicose, aminoácidos livres, aminas (espermina, putrescina, cadaverina) e neurotransmissores (ácido glutâmico, ácido aspártico, além de sais e íons (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^-)). No entanto, os componentes de maior destaque para este grupo são as acilpoliaminas⁷.

As acilpoliaminas (Figura 2) são compostos orgânicos que apresentam atividade neurotóxica e atuam como antagonistas sobre vários tipos de canais iônicos, sendo os principais responsáveis pela paralisação do presa durante a predação. Em algumas espécies, esses componentes são os mais abundantes na peçonha⁸.

Figura 2. Estrutura geral de uma acilpoliamina⁴.



1.2.2. Componentes de massa molecular entre 3.000 Da e 10.000 Da

As funções dos diversos peptídeos identificados até o momento podem ser resumidas em duas principais: ação neurotóxica e citolítica. A maioria dos peptídeos identificados apresenta massa molecular entre 3.000 Da a 8.000 Da e cisteínas em sua estrutura primária. Em combinação com as poliaminas, aparentam compor o arsenal tóxico das peçonhas⁷. Essas toxinas são as mais investigadas e atuam nos canais iônicos de membranas, tais como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- , bloqueando seu funcionamento^{4,9}. Os canais mais estudados são os de sódio dependentes de voltagem, pois eles representam os principais alvos das toxinas, e sua inativação parcial implica na paralisação e imobilização da presa^{7,9}.

Parte da caracterização destas neurotoxinas, além dos ensaios biológicos que avaliam sua atuação nos canais iônicos, inclui a determinação do número e distribuição das cisteínas presentes. O padrão observado para os peptídeos exibindo o padrão ICK (*inhibitory cystine knot*) pode ser expandido para $\text{C}_1 \text{X}_{2-7} \text{C}_2 \text{X}_{3-11} \text{C}_3 \text{X}_{0-7} \text{C}_4 \text{X}_{1-17} \text{C}_5 \text{X}_{1-19} \text{C}_6$, no qual X representa um resíduo de aminoácido. A estrutura apresentada na Figura 3 é composta por duas pontes dissulfeto que forma uma espécie de anel, pela qual uma terceira ponte passa, resultando na formação de um “nó”¹⁰.

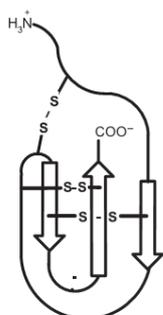


Figura 3. Representação do nó de cisteína¹¹.

Diferenças estruturais baseadas nesse padrão podem resultar em diferentes propriedades farmacológicas¹²; diversos peptídeos com esse padrão já foram descritos na literatura, possuindo diversas funções biológicas, tais como inibidores de proteases, peptídeos neurotóxicos, bioinseticidas e entre outros⁸.

Atualmente, tem-se o registro de toxinas contendo de 3 a 7 pontes dissulfeto. A presença de uma quantidade variável de cisteínas provém uma alta estabilidade química e resistência a desnaturação e proteólise, além de auxiliar na formação de uma superfície de contato, na qual a maioria de seus resíduos participa. Uma característica comum observada é o momento de dipolo, provocado pelos resíduos catiônicos e aniônicos. O momento de dipolo foi proposto como a maior força motriz que permite a difusão da toxina em direção ao seu receptor¹³.

É importante salientar que a presença de pontes de dissulfeto não faz com que a toxina obrigatoriamente apresente uma função farmacológica, no entanto, foi observado que a presença delas é essencial para a atividade inseticida¹¹.

Alguns peptídeos encontrados nas peçonhas de aranhas não apresentam resíduos de cisteína em sua sequência e adotam estruturas anfipáticas em solução e são formadoras de poros em membranas plasmáticas. Os peptídeos citolíticos (também conhecidos como antimicrobianos) identificados até o momento, apresentam entre 27 a 48 resíduos, são lineares, altamente catiônicos, geralmente sem cisteínas em sua sequência primária, de pI acima de 10,2 e apresentam uma alta carga total de +6 a +10 por conta da alta proporção de resíduos de lisina. Além disso, apresentam a porção C-terminal modificada (CONH₂) e geralmente apresentam resíduos de glicina ou serina na porção N-terminal^{14,8}.

1.2.3. Componentes de massa molecular acima de 10.000 Da

Neste grupo estão descritas as neurotoxinas de alta massa molecular e as enzimas. As diferenças mais significativas entre as peçonhas se justificam nas classes de proteínas expressas, como a enzima esfingomielinase D (SMD), presente para o gênero *Loxosceles* e principal responsável pela característica lesão dermonecrotica e para o gênero *Latrodectus*, cujos componentes protéicos possuem massa molecular acima de 40 kDa e são neurotóxicos para vertebrados também^{4,8}.

A presença de enzimas na peçonha deve ser confirmada, pois pode se tratar de

contaminação, por enzimas salivares ou fluidos digestivos, provocada pela eletroestimulação. Portanto, elas devem ser investigadas e caracterizadas antes de serem consideradas como um componente real da peçonha.

1.3. Aranhas do gênero *Loxosceles*

A Família Sicariidae compreende 122 espécies em dois gêneros¹⁵: *Sicarius* e *Loxosceles*. Existem aproximadamente 100 espécies de *Loxosceles* descritas^{16,17}, distribuídas principalmente entre o Continente Americano, Europa e África¹⁸, todavia esse gênero também ocorre na Oceania¹⁹ e na Turquia²⁰. Na Figura 4 está representada a distribuição das principais espécies do gênero *Loxosceles*.

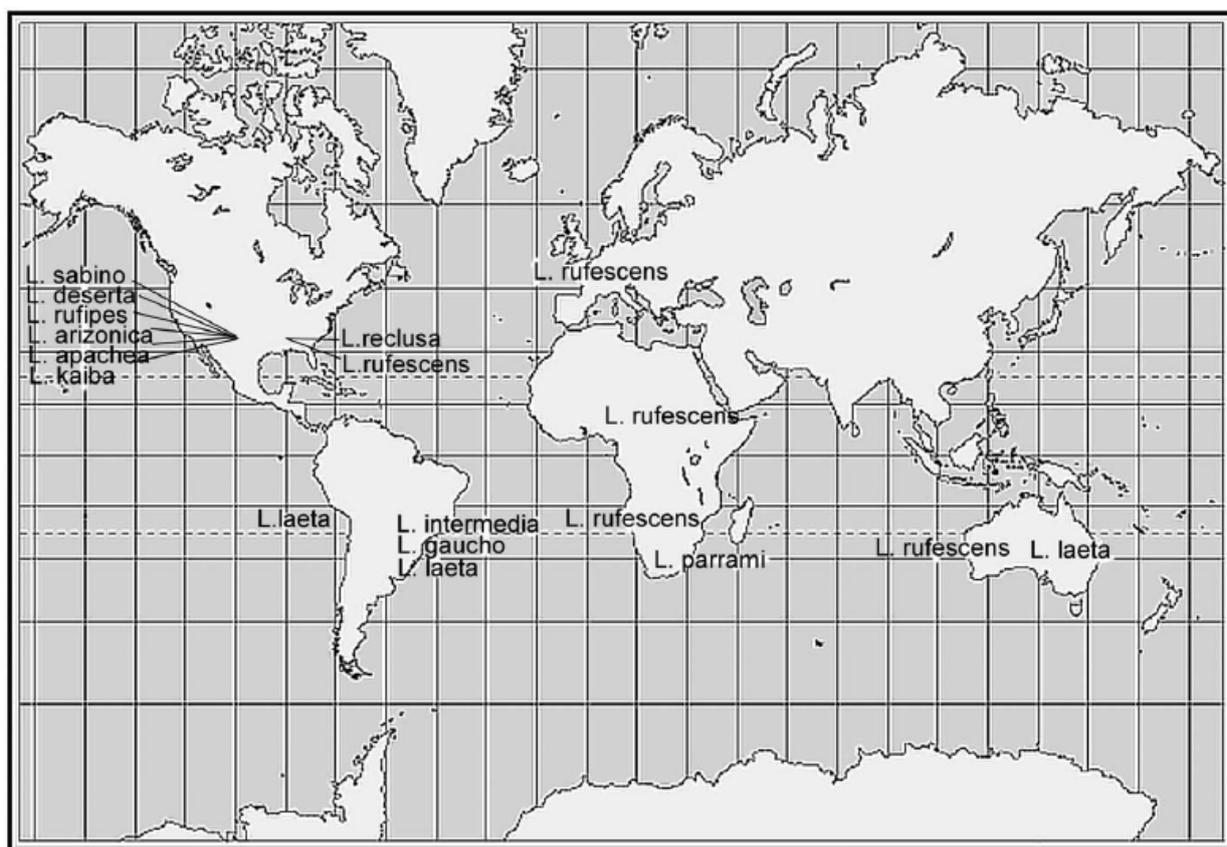


Figura 4. Distribuição geográfica das espécies do gênero *Loxosceles*¹⁷.

A primeira espécie de *Loxosceles* descrita no Brasil foi a *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898²¹ e atualmente tem-se o registro de 11 espécies de aranha marrom no Brasil¹⁵. A Tabela 1 relaciona cada espécie com sua respectiva distribuição no país.

Tabela 1. Aranhas do gênero *Loxosceles* presentes no Brasil (modificado)²²

Espécies de Aranhas Marrom encontradas no Brasil
<i>L. adelaida</i> Gertsch, 1967 (RJ) ²³
<i>L. amazonica</i> Gertsch, 1967 (BA, AM, MG, MA, PB) ^{24,25}
<i>L. anomala</i> Mello-Leitão, 1917 (MG) ²⁶
<i>L. gaucho</i> Gertsch, 1967 (RS, SP) ^{25,26} ,
<i>L. hirsuta</i> Mello-Leitão, 1931 (RS e PR) ²⁵
<i>L. immodesta</i> Mello-Leitão, 1917 (RJ) ²⁵
<i>L. intermedia</i> Mello-Leitão, 1934 (DF, RJ, RS, SP) ^{25,26}
<i>L. laeta</i> Nicolet, 1849 (MG, RJ, SP, PR, SC, RS) ^{25,26}
<i>L. puortoi</i> Martins, Knysak & Bertani, 2002 (TO) ^{25,27}
<i>L. similis</i> Moenkhaus, 1898 (PA,SP,MG,MS) ^{25,26}
<i>L. tropicus</i> Mello-Leitão, 1936*

* registro somente no Platnick,2008

A aranha do gênero *Loxosceles* possui o cefalotórax achatado, seu tamanho encontra-se entre 2 cm a 3 cm e sua coloração varia entre um marrom claro a um marrom escuro¹⁸. De acordo com o local onde é encontrada, a aranha marrom é conhecida por outros nomes, tais como *araña de detrás de los quadros*, *araña de los rincones* (América do Sul), *brown recluse spiders* e *violin spider* (América do Norte). Estas denominações revelam algumas das características deste gênero: a sua coloração, sua tendência a se esconder e a silhueta de violino presente no dorso do cefalotórax. Os seis olhos ficam dispostos em três pares (díades) formando um semicírculo²⁸. A Figura 5 reúne as características acima descritas.



Figura 5. Silhueta de violino no cefalotórax e disposição dos olhos em três díades - espécie *Loxosceles reclusa*²⁸.

No entanto, a identificação positiva para *Loxosceles* não deve ser baseada no desenho observado, porque nem todas as espécies apresentam uma coloração clara o suficiente para que ela seja visualizada²⁸. Uma característica que pode garantir uma identificação mais segura é a presença dos três pares de díades, uma vez que a maioria das aranhas possui oito olhos. Todavia, esse padrão não é exclusivo, sendo visualizado também nos gêneros *Scytodes* e *Sicarius*²⁹.

A espécie *L. intermedia* (Figura 6A) é uma predadora que tem como estratégia senta-espera e, portanto, apresenta uma dieta diversificada, que inclui formigas e vespas, presas que geralmente são rejeitadas por outras aranhas³⁰. As aranhas do gênero *Loxosceles* geralmente preferem presas já mortas a caçar presas vivas e suas teias são irregulares, parecendo fios de algodão (Figura 6B). Elas também podem sobreviver por muitos meses sem comida ou água e suportam temperaturas de 8°C a 43°C³¹.

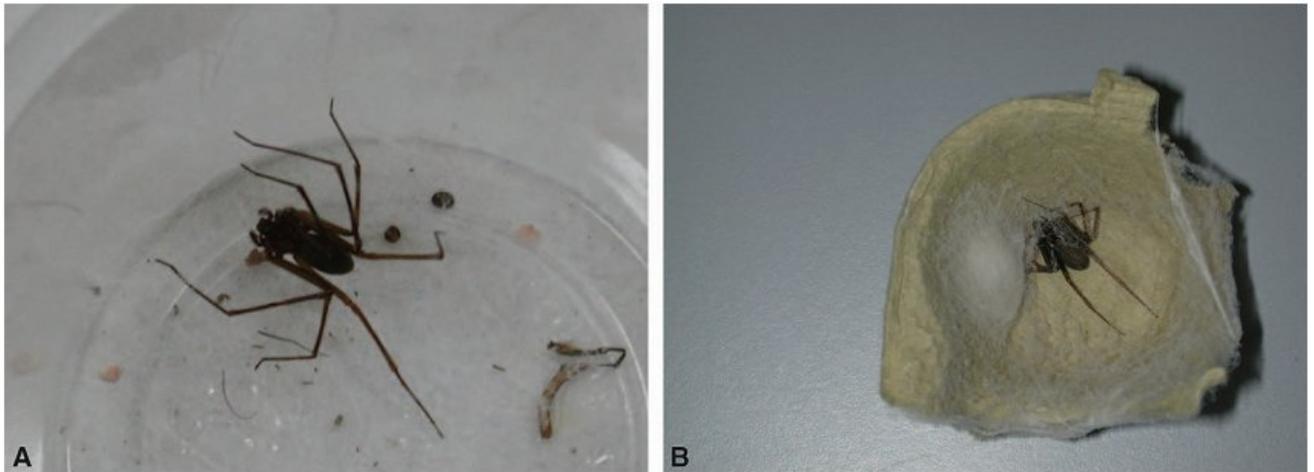


Figura 6. Macho de *L. intermedia* (A) e fêmea de *L. laeta* e ooteca(B)¹⁸.

Em geral, as aranhas *Loxosceles* preferem se esconder durante o dia, saindo somente à noite. Em ambientes naturais, são encontradas sob rochas ou em tocas de outros animais, onde fazem um pequeno abrigo com sua teia. Em *habitat* humano, são frequentemente encontradas atrás de móveis e armários, em porões e sótãos, além de outros lugares de pouco movimento²⁹.

As aranhas desse gênero não são agressivas; só atacam quando pressionadas, o que geralmente ocorre à noite, quando saem para procurar por presas³². Como sua picada é indolor e os efeitos iniciais do envenenamento só são observados de 2 a 8 horas após o acidente, a identificação positiva de um acidente loxoscélico é comprometida, uma vez que dificilmente a aranha é recuperada para esta análise³³.

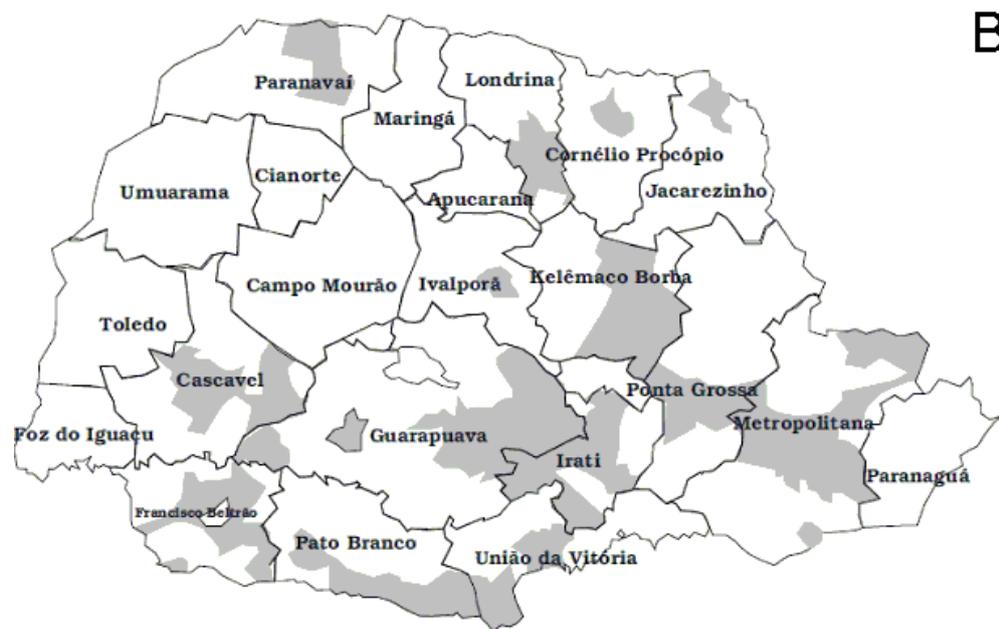
1.4. Loxoscelismo

O envenenamento provocado pela picada de aranhas do gênero *Loxosceles* é chamado de loxoscelismo. Embora no Brasil se tenha registro de ocorrência de acidentes provocados pela aranha marrom desde 1891, o reconhecimento da lesão como necrótica data de 1954³⁴. Embora não haja registros de acidentes no Distrito Federal, o loxoscelismo representa um problema de saúde pública nos estados de São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e principalmente no estado do Paraná, onde são registrados em média 2.577 acidentes por ano e ocorrem quatro espécies de *Loxosceles*: *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. hirsuta*²⁵.

Em Curitiba, capital do Paraná, centenas de acidentes provocados pelas espécies de *Loxosceles* são registrados anualmente, sendo que as duas espécies de

maior incidência são : *L. intermedia* Mello-Leitão 1934, com 90 % dos relatos, e *L. laeta* , com 10% (Figuras 7A e 7B). A justificativa para a presença dessas espécies nos centros urbanos é a grande abundância e riqueza de presas e a ausência de predadores para o controle da população de aranhas³⁰.

Figura 7. Distribuição das espécies *L. laeta* (A) e *L. intermedia* (B) no estado do Paraná (modificado)²⁵.



O loxoscelismo (Figura 8) apresenta duas variedades clínicas: a forma cutânea e a cutâneo-visceral. Na forma cutânea, o primeiro sintoma observado é a dor, que surge somente de 2 a 8 horas após o acidente, variando de média a intensa. Juntamente ocorre a formação de um eritema com coceira e inchaço. Após um período de 12 a 24 h, há a formação de bolha, que pode se tornar hemorrágica. Alguns dias depois do acidente, a região da picada torna-se violeta, apresentando também um espalhamento no sentido gravitacional. Pode ocorrer a formação de uma casca, passados três a sete dias e na semana subsequente, a área central torna-se dura e há a formação de uma úlcera, cuja cicatrização pode levar de 6 a 8 semanas. A lesão inflamatória pode evoluir para necrose e dependendo de sua extensão, pode haver a necessidade de excisão e posterior enxerto de pele. Essa manifestação descreve um exemplo clássico do loxoscelismo cutâneo^{29, 35, 36,37}.

Os casos mais complicados incluem hemoglobinúria, proteinúria, hemólise intravascular e vômitos, entre os efeitos provocados pela peçonha, denominados loxoscelismo sistêmico^{32,38}. Em casos mais extremos, é observada a insuficiência renal aguda. As complicações que podem ocorrer são muito temidas, pois podem ser letais, e são encontradas em aproximadamente 16% das vítimas³⁹.

O mecanismo de ação para o loxoscelismo ainda não está muito claro, mas um trabalho publicado neste ano permitiu uma maior compreensão a respeito deste processo, com a identificação de diversas proteínas envolvidas no envenenamento⁴⁰. A abordagem proteômica utilizada, denominada MudPIT - Tecnologia Multidimensional para Identificação de Proteínas - é uma técnica *gel-free*, baseada na cromatografia líquida 2D (LC-2D), acoplada à espectrometria de massas.

Figura 8. Possíveis loxoscelismo: (A) Dano local após 48 h da picada. O característico edema e eritema com áreas equimóticas e hemorrágicas podem ser observadas. (B) Um segundo paciente procurou cuidados médicos após 26 dias de uma suposta picada de aranha, apresentando uma ferida necrótica (C). O mesmo paciente apresentando formação de cicatriz 113 dias após o acidente. (D) Retorno deste paciente para avaliação da cicatriz, três anos depois do acidente (D). Ambos os pacientes sentiram a picada e notaram a presença a aranha, mas não a levaram para identificação¹⁸.



Tal análise permitiu a identificação de 39 proteínas presente na peçonha de *L. intermedia*, sendo 10 exclusivas para o gênero. As proteínas identificadas foram

agrupadas em três categorias diferentes, de acordo com a sua função: 14 proteínas que provocam danos aos tecidos; 15 proteínas, das quais 8 atuam por mecanismos secundários no envenenamento e as 7 restantes conferem proteção à peçonha contra a degradação/inativação; e 10 são responsáveis pela manutenção da glândula de peçonha. A partir dessa investigação, os autores apresentaram um esquema que une os conhecimentos obtidos até o momento sobre a composição da peçonha juntamente com os resultados, exemplificado na Figura 9.

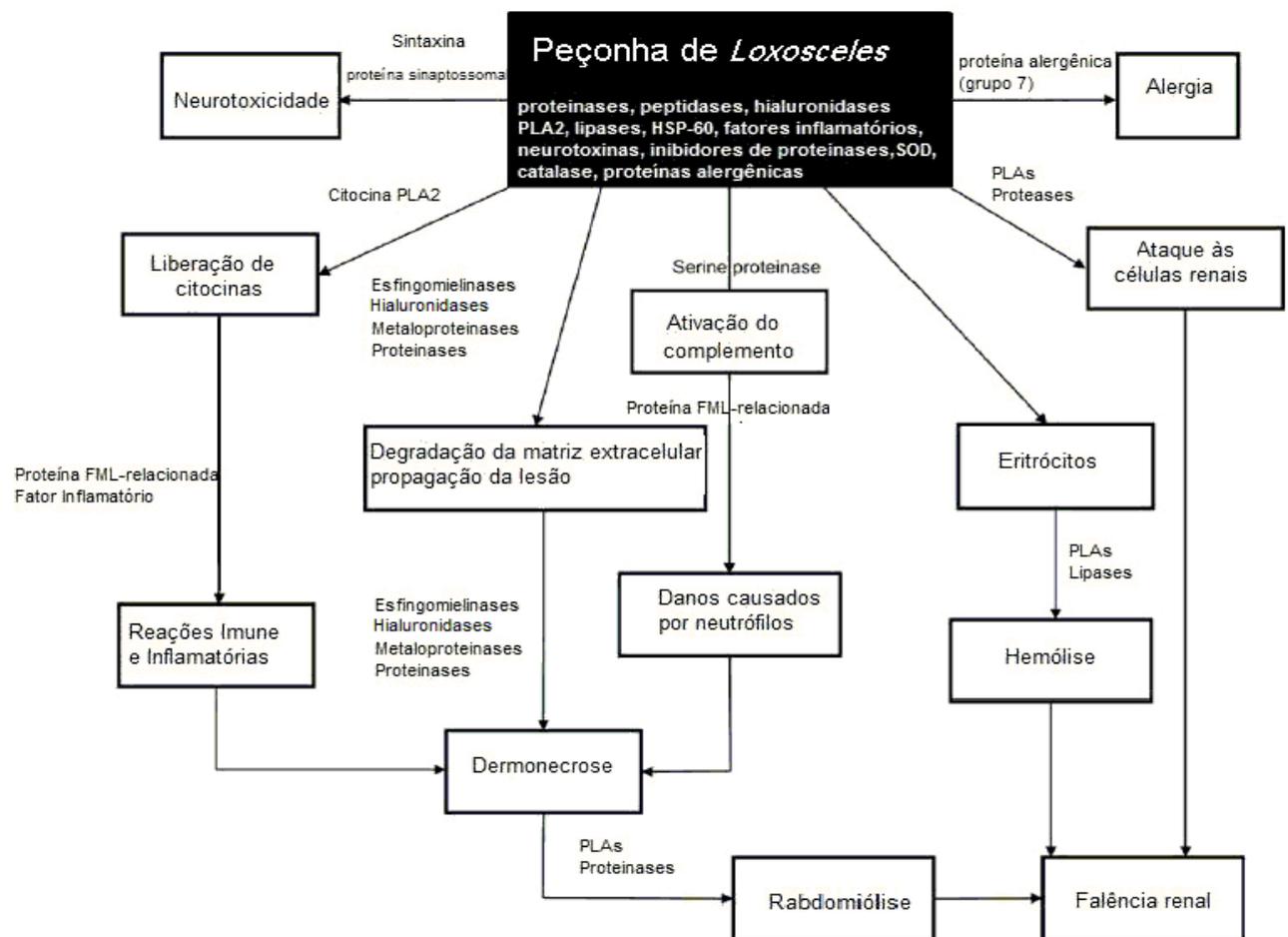


Figura 9. Mecanismo proposto de atuação da peçonha de *Loxosceles sp.* (modificado)⁴⁰.

O esquema apresentado pode ser compreendido da seguinte forma:

- O envenenamento pode resultar em dermonecrose, com envolvimento provável de esfingomielinas, PLA₂, hialuronidasas, metaloproteases e alguns fatores

inflamatórios;

- A lesão dermonecrótica geralmente resulta do efeito direto da peçonha nos componentes das membranas basal e celular, o que geralmente requer a participação de hialuronidases, SMD e metaloproteases;
- A interação entre alguns componentes e tecidos pode provocar ativação do complemento, migração de neutrófilos, liberação de enzimas proteolíticas, citocinas e quimocinas, promovidas provavelmente por proteases (fator de inflamação, proteínas similares ao plasmogênio e proteínas relacionadas ao FMLP);
- A agregação de plaquetas e alterações no fluxo sanguíneo pode resultar em edema e isquemia, com desenvolvimento de necrose, envolvendo possivelmente a participação de PLA₂s, proteases e fatores de inflamação;
- A ocorrência de hemólise parece ser causada pela presença de PLA₂s e lípases;
- Algumas doenças sistêmicas (principalmente nos rins) podem ocorrer devido à ação de PLA₂s, peptidases e proteases;
- A composição de proteínas encontradas na análise proteômica sugere uma possível ação neurotóxica, caracterizada pela liberação maciça de neurotransmissores, causada pela presença de proteínas ligantes de sintaxina e associadas às proteínas sinaptossoma, que provavelmente atuam em conjunto com alguns transportadores de neurotransmissores;

1.5. Revisão de toxinas presentes no gênero *Loxosceles* encontradas no Brasil

Dentro do gênero *Loxosceles*, a toxina mais estudada é a SMD, a proteína responsável pela necrose característica visualizada no loxoscelismo²⁹.

Em uma comparação entre as toxinas dermonecróticas presentes nas peçonhas das espécies *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucho*, após filtração em gel, separação por SDS – PAGE e estudo da atividade letal em camundongos, foi constatado que os componentes responsáveis pela ação dermonecrótica apresentam uma massa molecular de aproximadamente 35 kDa para as espécies *L. gaucho* e *L. intermedia* e

32 kDa para *L. laeta*. As sequências parciais obtidas após sequenciamento por Edman sugeriu que as proteínas presentes nas espécies *L. intermedia* e *L. laeta* apresentam maior similaridade entre si com a respectiva toxina do veneno de *L. gaucho*, sendo que a menor homologia foi observada entre as espécies *L. intermedia* e *L. gaucho*⁴¹. Os perfis eletroforéticos de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucho* são similares e foi confirmado que o principal componente, a SMD, estava localizado na região entre 32-35 kDa. Também foi apresentado que o veneno de *L. intermedia* é o mais letal, seguido por *L. gaucho* e *L. laeta*⁴².

A distribuição da proteína SMD nas peçonhas das aranhas *Haplogygne* e *Loxosceles* foi investigada e considerando que a presença dessa proteína só foi descrita até o momento nas peçonhas de *Loxosceles* e *Sicarius*, a hipótese é que a SMD surgiu na peçonha de um ancestral em comum da linhagem dessas duas espécies, sustentada pela comparação entre as proteínas de massa molecular entre 31 kDa a 35 kDa presentes nas peçonhas. Os autores constataram que todas as espécies indicaram, além da presença da SMD, pelo menos mais uma molécula nessa faixa de massa, aparentemente isoformas desta proteína⁴³.

Em 1998 foi mostrado pela primeira vez que a variedade dos diferentes efeitos biológicos característicos do loxoscelismo provocados pela espécie *L. intermedia* pode ser justificada pela presença de duas isoformas da proteína dermonecrótica. Elas mimetizam os efeitos biológicos de todo o veneno, exibindo atividade de SMD. Também foram encontradas duas outras proteínas a partir da mesma purificação (cromatografia líquida) da qual foram obtidas as outras isoformas supracitadas, no entanto, além de não conseguirem separá-las, os autores observaram que ambas estavam inativas em todos os ensaios realizados, embora possuíssem homologia com as outras duas toxinas ativas³⁹.

A caracterização das isoformas presentes nas peçonhas do gênero *Loxosceles* já foi abordada. Para a espécie *L. gaucho*, em um estudo realizado foi apresentada a separação de 11 isoformas para a *loxnecrogina*, a proteína dermonecrótica presente neste veneno⁴⁴; enquanto que para a espécie *L. intermedia*, foram isoladas 14 toxinas *Loxtox*, agrupadas em 6 famílias, cuja presença foi relacionada a diversas funções biológicas (como no caso específico, a atividade dermonecrótica), que seria útil para abranger uma maior variedade de presas⁴⁵.

O estudo da peçonha de *L. similis*, espécie geralmente encontrada dentro de cavernas (e com registros atuais em domicílios de Belo Horizonte, MG) permitiu a

clonagem de sua toxina dermonecrótica, denominada LsD1, de aproximadamente 31,2 kDa e *pI* estimado de 7,37, que indicou possuir homologia com a sequência da toxina LiD1 de *L. intermedia*. Também foi isolada a bactéria *Clostridium septicum* de suas quelíceras⁴⁶.

A espécie *L. adelaida*, também encontrada em cavernas (Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira, SP), teve sua toxina dermonecrótica caracterizada. Foram isoladas duas frações correspondentes à toxina dermonecrótica, denominadas A1 e A2. No entanto, somente A1 é biologicamente ativa, o que sugere que a mesma possua uma isoforma ativa. Como A2 apresentou imunorreatividade cruzada com antiSMD, isto sugeriu que ela contém uma isoforma inativa, similar à isoforma encontrada na peçonha de *L. intermedia*²³.

Para a contribuição da ação da peçonha, diversas proteínas já foram descritas na literatura. O estudo de serino-proteases na peçonha de *L. intermedia* indicou que elas possuem ação gelanolítica, mas não apresentam atividade proteolítica sobre hemoglobina, imunoglobulina, albumina, fibrinogênio ou laminina, sugerindo, desta forma, uma especificidade em suas ações proteolíticas e uma atuação em sinergia com outros componentes da peçonha⁴⁷.

A existência de proteases na peçonha de *L. laeta* e *L. intermedia* foi confirmada, provando que a presença dessas enzimas na peçonha bruta obtida após eletroestimulação não é resultado de contaminação; as proteases podem desempenhar uma série de papéis nas atividades patológicas observadas em algumas vítimas de loxoscelismo, tais como hemorragia, coagulação intravascular disseminada e na ativação de proteases que atuam na dermonecrose, como no caso de proteases de neutrófilos⁴⁸.

A identificação de metaloproteases na peçonha de *L. intermedia* resultou na caracterização de duas enzimas denominadas Loxolisina A (20 kDa a 28 kDa), com efeitos fibronectinolíticos e Loxolisina B (32 kDa a 35 kDa), uma metaloprotease gelanolítica. Foi sugerido que a ação das enzimas estivesse associada à dermonecrose e aos efeitos hemorrágicos característicos do loxoscelismo⁴⁹. Posteriormente, esta ação das metaloproteases foi comprovada com um estudo envolvendo as peçonhas de *L. intermedia* e *L. laeta*, indicando que esta seja uma característica conservativa de possível importância biológica⁴⁸. A presença de metaloproteases similares à astacina, enzima digestiva isolada do lagostin *Astacus astacus*, nas peçonhas de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*, sugere que a proteólise estaria de fato envolvida na hemorragia e

no aumento da permeabilidade vascular observados no local da picada, pois estas enzimas podem tornar as estruturas dos tecidos mais permeáveis, promovendo assim uma difusão das toxinas pelo organismo das vítimas⁵⁰.

Outro tipo de molécula identificado na peçonha de *L. intermedia* foi a enzima hialuronidase. A peçonha, obtida por eletroestimulação e também por extração das glândulas, foi testada para atividade hidrolítica sobre ácido hialurônico e indicou que as hialuronidases se tratam de componentes constituintes da peçonha e não contaminantes após o processo de eletroestimulação. Foi observado que as hialuronidases eram ativas em condições fisiológicas humanas, comprovando que elas devem atuar em moléculas vitais e estruturas teciduais⁵¹.

Os aminoácidos envolvidos na catálise e nos sítios de ligação de metais são estritamente conservados nas isoformas de SMD de *L. intermedia*. A toxina LiD1 hidrolisa SMD de forma menos eficiente que LiD2, o que pode ser atribuído pela substituição local de aminoácidos no canal hidrofóbico que poderiam provavelmente estar ligados ao reconhecimento de substratos⁵².

A bactéria *Clostridium perfringens* foi isolada na peçonha e quelíceras de *L. intermedia*, e a sua atuação na dermonecrose foi investigada. Foi constatado que a peçonha conjugada à bactéria resultou em um aumento da lesão dermonecrotica, comparado ao efeito da peçonha sozinha, o que sugere que *C. perfringens* participe deste processo.

Uma toxina fosfolipase-D recombinante de *L. intermedia* sofreu uma mutação em seu domínio catalítico, para o estudo de seu mecanismo de ação. Os resultados descritos forneceram evidências de que esta enzima desencadeia a hemólise direta sobre eritrócitos humanos, de maneira dependente da atividade catalítica^{22,53}.

A dificuldade em se obter quantidades de peçonha suficientes para a realização de ensaios para a elucidação dos mecanismos envolvidos no loxoscelismo contribuiu para busca de uma abordagem alternativa para a obtenção de toxinas e resposta encontrada por alguns grupos é a clonagem e expressão das toxinas da peçonha de *Loxosceles*⁵⁴. Para a espécie *L. intermedia* foram obtidas três proteínas recombinantes: LiRecDT1 (31,4 kDa e pI 7,37), LiRecDT2 (31.291 Da e pI 6,42) e LiRecDT3 (31.471 Da e pI 6,27)⁵⁵.

Uma análise comparativa das funcionalidades biológicas e das estruturas moleculares entre as três proteínas recombinantes de *L. intermedia* mostrou que

diferentes isoformas de uma mesma toxina podem representar um mecanismo biológico de defesa contra influências do meio e que em diferentes condições podem atuar na inibição da atividade de algumas toxinas. Esta família de moléculas representa uma adaptação sinérgica que tem como função paralisar e matar as presas, assim como promover a sua autodefesa. Além disso, uma isoforma pode representar uma molécula mutante, que apesar de apresentar um domínio catalítico, tem suas atividades biológicas influenciadas por certos resíduos de aminoácidos vizinhos⁵⁶.

A nefrotoxicidade da peçonha, observada em alguns casos clínicos de loxoscelismo foi confirmada⁵⁷ e a mesma resposta foi obtida para a toxina recombinante LiRecDT1⁵⁸, em estudos envolvendo a espécie *L. intermedia*. Esta forma recombinante LiRecDT1 apresenta atividades dermonecroticas, no entanto, a atividade enzimática para SMD foi baixa, assim como a atividade hemolítica dependente de complemento. Mas o estudo com anticorpos revelou que existe uma região antigênica na porção N-terminal da toxina e a sequência de resíduos de aminoácidos foi observada em proteínas dermonecroticas de outras espécies (*L. similis*, *L. gaucho* e na LiRecDT2 de *L. intermedia*) e alguns de seus resíduos estão correlacionados ao sítio ativo da toxina^{59,60}. Também foi observado um efeito pronunciado no envenenamento de camundongos com a peçonha bruta comparado à ação isolada da toxina recombinante⁵⁸. Isto seria esperado, uma vez que a ação de uma peçonha bruta é resultado da ação concomitante de diversos componentes que compõem uma mistura complexa de frações ativas e isoformas de toxinas.

A habilidade da peçonha de *L. intermedia* e de suas isoformas de induzir edemas e aumentar a permeabilidade vascular foi investigada e os camundongos que foram tratados previamente com receptores antagonistas de histamina e serotonina apresentaram significativa atenuação dos edemas e da permeabilidade vascular induzidas pelas toxinas. A purificação por HPLC da peçonha bruta indicou a presença de histamina em uma concentração suficiente para induzir respostas inflamatórias, o que sugere que ela atue como um componente adjuvante, potencializando a toxicidade da peçonha⁶¹.

A utilização de seis peptídeos como imunógenos foi avaliada como estímulo de resposta dos anticorpos em coelhos à presença da toxina dermonecrotica LiRecDT1. Eles observaram que somente um deles era imunogênico e os resultados obtidos encorajam a utilização de peptídeos sintéticos no desenvolvimento de soro para abordagens terapêuticas⁶². A extensão deste trabalho resultou em uma réplica sintética

do epítipo imunogênico: o peptídeo contém 27 resíduos, incluindo E³², D³⁴ e H⁴⁸, que estão envolvidos no site ativo de SMD e os cinco resíduos Y⁴⁷, H⁴⁸, G⁴⁹, I⁵⁰ e P⁵¹ do *loop* catalítico de SMD. Uma proteção de 70% contra as atividades necróticas e hemorrágicas foi conferida aos grupos que o receberam como imunógeno⁶³.

As proteínas recombinantes para a *L. laeta*, SMD I⁶⁴ e SMD II pertencem a classes diferentes de moléculas SMD por exibirem diferenças no potencial tóxico, sendo que as lesões provocadas por SMD II são menores que as causadas por SMD I⁶⁵.

Utilizando a estratégia *Expressed Sequencing Tag* foi possível revelar, pela primeira vez, o repertório genético de uma glândula de peçonha de uma aranha, no caso, para a espécie *L. laeta*. Os resultados mostraram uma ampla faixa de moléculas com diversas funções e estruturas. As SMDs corresponderam a 16,4 % das sequências presentes na glândula, confirmando a alta representatividade desta proteína. Outros genes apresentam similaridades com sequências depositadas no *GenBank*, que podem se tratar de outras classes de toxinas, tais como neurotoxinas, hialuronidases, metaloproteinases, lipases, serinoproteinases, lectinas tipo C, inibidores enzimáticos, cisteína peptidases e outras. Também foram encontradas transcritos com outras atividades, tais como proteínas salivares, 5' nucleotidases e quitinases. No entanto, 25 % dos transcritos não apresentaram nenhum *match* significativo, indicando haver muitas possibilidades de estudos destas moléculas ainda não caracterizadas, que certamente possuem um potencial biotecnológico⁶⁶.

A obtenção de três toxinas com potencial inseticida do veneno de *L. intermedia*, LiTx1, LiTx2 e LiTx3, foi realizada a partir da sequência deduzida do cDNA, de massas moleculares aproximadamente de 7,4 kDa, 7,9 kDa e 5,6 kDa respectivamente⁶⁷.

1.6. Alguns estudos comparativos dentro do gênero *Loxosceles*

As diferenças intraespecíficas nas peçonhas de machos e fêmeas de *Loxosceles intermedia* foram investigadas por meio da comparação de algumas propriedades biológicas. Foi constatado que as fêmeas produziam uma maior quantidade de peçonha, cuja atividade dermonecrótica era mais potente⁶⁸.

Mudanças na composição da peçonha de *L. intermedia* em função dos estágios de desenvolvimento ontogenético foram avaliadas. A toxina dermonecrótica surgiu na peçonha, em sua plena forma ativa, somente a partir do terceiro instar de

desenvolvimento, sendo que sua atividade foi aumentando gradativamente até que a aranha alcançasse sua forma adulta. A ausência deste componente no extrato dos ovos e nos filhotes dos estágios anteriores sugere que a toxina seja um importante componente para a defesa da aranha, uma vez que é somente no 3º instar que ela começa a desenvolver sua habilidade de caçar⁶⁹.

As contribuições na severidade do loxoscelismo das peçonhas de *L. intermedia* e *L. laeta*, entre machos e fêmeas de ambas as espécies foram comparadas. As análises mostraram que atividades biológicas, tais como diferenças na expressão de proteínas e glicoproteínas, além da atividade da SMD, foram mais expressivas nas fêmeas, especialmente da espécie *L. laeta*. O antiveneno produzido por estas fêmeas apresentou a maior eficácia em neutralizar os venenos das espécies comparadas e foi concluído que as variações nas composições em função do sexo e espécie são fatores que influenciam a severidade do loxoscelismo³⁸.

Comparando a fertilidade de fêmeas de *L. intermedia* e *L. laeta*, foi observada uma produção maior de ovos para a segunda espécie; isso sugere que a expansão significativa de *L. intermedia* observada no sul da região do país não está relacionada com a razão reprodutiva dessa espécie e que deve haver uma explicação para a sua predominância proliferação na região sul⁶⁹. Uma correlação pode ser o comportamento apresentado por cada uma das espécies: enquanto *L. intermedia* possui hábitos mais generalistas, se desloca mais e é mais tolerante ao filhote coespecífico²⁵, a espécie *L. laeta* é mais agressiva e sedentária, mas possui grande resistência, podendo permanecer muito tempo sem comida ou água, fator que provavelmente favoreceu sua maior dispersão pelo mundo, porém sua predileção por determinados ambientes ainda faz com que prevaleça em intradomicílio⁷⁰.

Após uma hora de exposição constante, foi reportado que 50% dos espécimes observados de *L. intermedia* morreram a uma temperatura de 35°C e *L. laeta*, a 32°C. O valor de LT_{50} , considerando um aumento gradual de temperatura, foi 42°C para *L. intermedia* e 40°C para *L. laeta*. Em baixas temperaturas e diminuição gradual, o valor determinado foi -5°C para ambas as espécies, enquanto que para uma temperatura constante, temperatura encontrada foi -7°C, também para ambas⁷¹.

1.7. Abordagens analíticas para o estudo da composição peptidômica de peçonhas

Para a obtenção do perfil da peçonha de aranhas, diversas abordagens podem ser adotadas, sendo que esta escolha depende do nível de caracterização que se deseja obter, pois quanto mais completo o estudo, mais complexa deve ser a estratégia.

Na escolha por uma abordagem *gel-free*, a cromatografia líquida assume a função de separar as proteínas e peptídeos presentes na peçonha de forma satisfatória. Nesse caso, ainda pode ser utilizada mais de uma dimensão de cromatografia líquida baseada em propriedades distintas, como troca iônica (promove a interação entre as cargas de um trocador e as das proteínas em determinado pH); acompanhada de uma etapa de cromatografia em fase reversa. Esta abordagem é utilizada tanto para o estudo proteômico quanto para o peptidômico. A opção por duas dimensões se justifica pela co-eluição observada em algumas frações, embora, em teoria, uma única dimensão cromatográfica deveria ser suficiente para separar os componentes presentes em uma amostra. No entanto, a natureza complexa das peçonhas torna a separação unidimensional limitada para a separação de peptídeos.

Como ferramenta complementar às técnicas de separação apresentadas acima, a espectrometria de massas tem um papel fundamental no estudo de toxinas, uma vez que é adequada para o estudo de proteínas e peptídeos. A utilização de diferentes tipos de espectrômetros de massas possibilita o acesso a uma rica quantidade de informações, desde a simples informação a respeito da massa molecular à sequências primárias de peptídeos⁷².

A análise da peçonha bruta por LC-ESI-MS ou MALDI-TOF-MS (*off line*) fornece o perfil das massas moleculares em função da distribuição dos componentes presentes. A escolha por uma abordagem LC-MS *off line* permite que as frações obtidas na etapa de purificação sejam liofilizadas e congeladas, tornando-as disponíveis para a repetição de uma análise. A dissolução do conteúdo da fração em solvente apropriado e em menor volume concentra os componentes presentes (em comparação com a fração original) e a utilização de matrizes adequadas para promoverem a ionização são alguns dos fatores determinantes para a espectrometria de massas.

Todavia, considerando novamente a complexidade das peçonhas, a análise direta por espectrometria de massas geralmente não é indicada, pela supressão do

sinal de alguns peptídeos, uma vez que os mais abundantes ou aqueles que melhor ionizam apresentarão um maior sinal, resultando na detecção de um número menor de componentes. Por isso um tratamento prévio é indicado, para que a análise qualitativa da peçonha seja a mais realista o possível⁷³.

Finalmente, a técnica hifenizada MS/MS permite que se faça sequenciamento *de novo*, que tem por finalidade elucidar a estrutura primária do peptídeo ou da proteína de interesse pela fragmentação dos mesmos, gerando a sequência, mesmo que parcial. Este estudo requer a utilização de equipamentos específicos, geralmente adequados para fontes ESI ou MALDI combinados com analisadores de massa, tais como *ion traps*, TOF (tempo de voo), híbridos quadrupolo/*ion trap*, Q-TOF (TOF ortogonal em série com quadrupolo), entre outros⁷⁴.

O sequenciamento de Edman é uma abordagem também utilizada para gerar informações a respeito da sequência N-terminal do componente de estudo⁷⁵. Esta técnica requer que a amostra esteja pura e, no caso da proteína ou peptídeos conte cisteínas, as pontes dissulfeto devem ser rompidas para facilitar o acesso às ligações peptídicas. Esse procedimento pode ser realizado de diversas formas, sendo sempre dependente do estado da amostra (em gel ou em solução). Considerando uma proteína em solução, ela pode ser tratada com a combinação de redução e alquilação com os reagentes adequados^{73,76}.

A utilização da espectrometria de massas permite, portanto os estudos filogenéticos, atuando como ferramenta complementar na diferenciação de espécies a partir da análise do mapeamento dos peptídeos e proteínas expressas⁷⁷, a descoberta de novas moléculas e a ainda promove estudos a respeito da função a partir da estrutura, uma abordagem muito utilizada quando a quantidade de peçonha disponível é limitante para a realização de ensaios biológicos⁷⁸.

Um esquema reunindo as metodologias mais utilizadas no estudo e caracterização de peçonhas está apresentado na Figura 10.

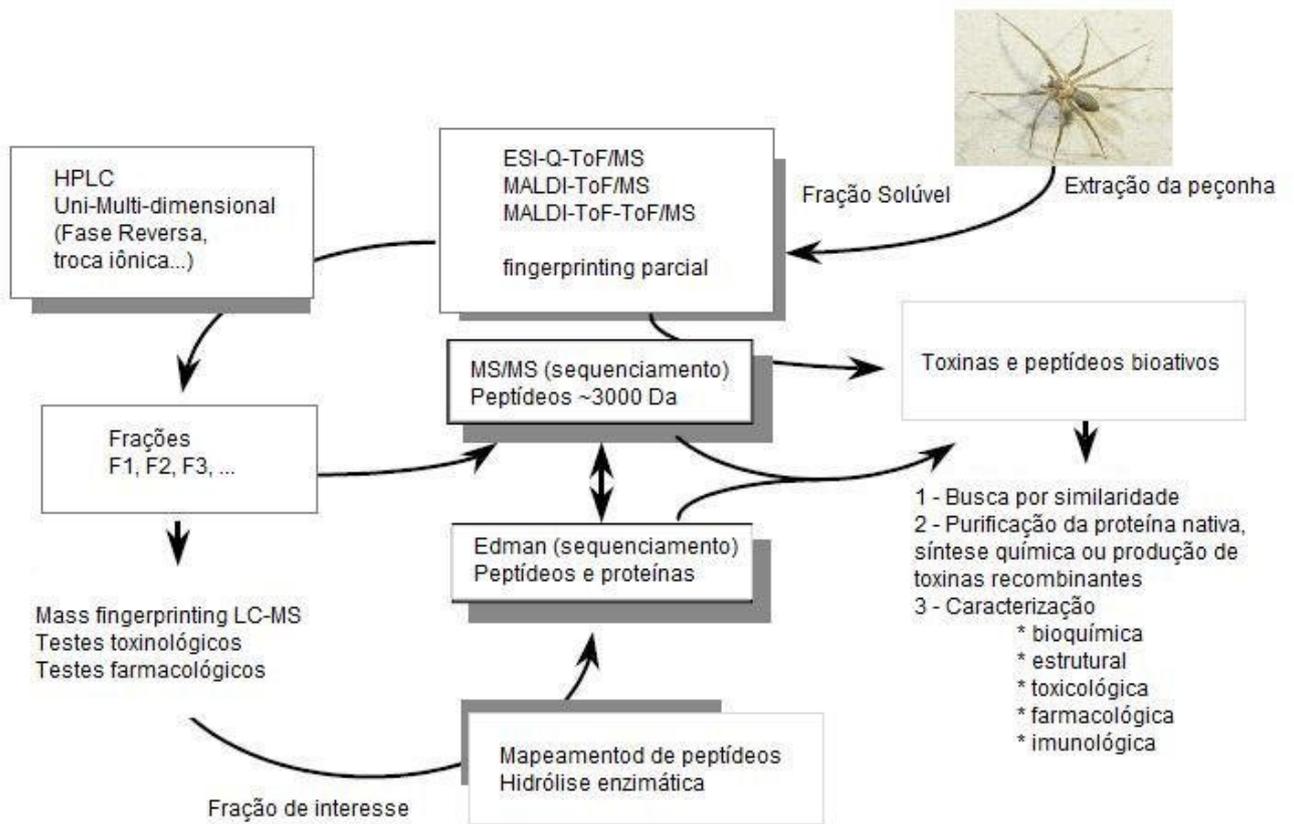


Figura 10. Estratégias utilizadas na abordagem peptidômica de peçonhas para a prospecção de moléculas bioativas (modificado)⁷⁹.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

- Realizar uma análise peptidômica comparativa entre os venenos das espécies *L. L. intermedia* e *L. laeta*, utilizando como ferramentas a cromatografia líquida de fase reversa e a espectrometria de massas.

2.2. Justificativa

Como apresentado, existem diversos estudos realizados para o gênero *Loxosceles* que, no entanto, estão concentrados na elucidação dos mecanismos de ação das SMDs e de outras proteínas presentes na peçonha no loxoscelismo. Todavia, há outros componentes na peçonha passíveis de estudo. Considerando que a maior parte dos componentes da peçonha de *Loxosceles* apresenta massa molecular abaixo de 8.000 Da, justificamos a nossa escolha pela faixa de 500 Da a 10.000 para este projeto de mestrado, uma vez que esses componentes também podem estar relacionados com o loxoscelismo, além de representarem possíveis componentes com interessantes atividades biológicas e aplicações, tais como bioinseticidas e composições farmacológicas, respectivamente.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3. 1. Obtenção da peçonha

As peçonhas de *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta* foram gentilmente fornecidas pela Prof^a. Kátia C. Barbaro, do Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, SP, Brasil. As amostras se tratavam de um *pool* de peçonhas de machos e fêmeas, obtidos por eletroestimulação.

3.2. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

Para efeito comparativo, as purificações em sistema HPLC deveriam ser feitas nas mesmas condições e com a mesma quantidade de peçonha. Por isso, a concentração de proteínas presentes em cada alíquota de peçonha total foi dosada pelo método de microensaio de Bradford⁸⁰. A curva de calibração foi construída utilizando a diluição seriada de albumina sérica bovina, BSA (solução-estoque 2 mg/mL). A absorvância foi obtida em 595 nm.

3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência – fase reversa (RP-HPLC)

Os componentes da peçonha de cada espécie foram separados por RP-HPLC. Alíquotas de 200 µL de peçonha bruta (1 mg/mL) foram utilizadas em cada separação, previamente centrifugadas por 3 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi injetado em uma coluna de fase reversa (coluna Shimadzu Shim-pack C₁₈, 300 Å, 4.6 mm, 150 mm), equilibrada com um solvente A (0,1% TFA em água milli-Q) e eluído a um fluxo de 0,5 mL/min, utilizando um gradiente de 0 a 50 % de solução B (0,1% TFA em acetonitrila) por 50 min, seguido por um gradiente de 50 % a 100 % de solução B por 10 min, seguido por uma lavagem com 100 % de tampão B por 10 min. A absorvância foi monitorada em 216 nm. O sistema utilizado foi um Shimadzu Co. (Kioto, Japão) série LC20A. Cada fração cromatográfica foi liofilizada após a etapa de separação.

Para auxiliar a comparação dos perfis cromatográficos, a interpretação dos dados obtidos para as áreas dos picos e os respectivos tempos de retenção foi feita *post run*.

3.4. Espectrometria de massas

A determinação das massas moleculares presentes em cada fração cromatográfica (correspondente a uma corrida) foi realizada em um espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF (Autoflex II, Bruker Daltonics, Alemanha).

Uma prospecção inicial foi feita para cada fração, no modo refletor, em um intervalo de massas entre 500 Da - 10.000 Da. Para a calibração do instrumento foi utilizada uma mistura de peptídeos (*Peptide mix*, Bruker Daltonics, Alemanha). A análise foi realizada com a intensidade do *laser* variando entre 15 até 26 % da intensidade máxima, com 200 tiros de *laser* em média.

Para aplicação das frações, cada uma foi ressuspensa com 10 µL de uma solução de TFA 0,1 %, transferido juntamente com 1 µL de mistura de matrizes (DHB 20 µg/µL e HCCA 20 µg/µL 1:1 v/v)⁸¹ para a placa de MALDI.

As frações que apresentaram massas moleculares acima de 4000 Da foram analisadas também em modo linear. Para a calibração, foi utilizada uma mistura de proteínas (*Protein mix*, Bruker Daltonics, Alemanha) e a matriz usada nesse caso foi o SA. O intervalo de massas permaneceu o mesmo da abordagem anterior. A intensidade do *laser* sofreu uma variação entre 24 e 30 % da intensidade máxima, enquanto que o número de *shots* foi de 150 por pulso do *laser*.

Para análise das peçonhas brutas de *L. laeta* e *L. intermedia* foram utilizados os mesmos protocolos de aplicação e análise das frações em modo refletor positivo e linear utilizados para as frações cromatográficas.

Todos os espectros obtidos foram analisados com a assistência do programa Flex Analysis 2.4 (Bruker Daltonics, Alemanha).

As listas de massas obtidas foram exportadas para planilhas do Excel[®] 2007 para organização dos dados e análise (determinação teórica de número de cisteínas, comparação entre lista de massas obtidas após modo refletor ou linear e possíveis modificações pós-traducionais).

3.5. Redução e Alquilação de frações de *L. laeta* e *L. intermedia*

Algumas frações obtidas após a purificação por RP-HPLC foram submetidas a redução e alquilação, para a determinação do número de resíduos de cisteínas presentes na cadeia polipeptídica. A cada fração liofilizada foram adicionados 200 μ L de tampão guanidina 6 mol/L, Tris 0,25 mol/L, DTT 10 mmol/L, pH 8,6. As amostras foram incubadas sob agitação constante de 400 rpm (Thermomixer Comfort, Eppendorf) por 1h a 37 °C, em atmosfera inerte (N₂). Em seguida, foram adicionados 4 μ L de 4-vinilpiridina, também na presença de N₂ e a mistura foi novamente incubada por 1 h a 37 °C. Para análise por espectrometria de massas, cada fração foi dessanilizada com ponteiros C₁₈ Zip Tip[®] (Millipore), de acordo com o seguinte protocolo: cada ponteira foi lavada com 10 μ L de ACN 100% (após dois ciclos de sugar e expulsar a solução) e equilibrada com 0,1 % TFA (dois ciclos de repetições). Para a ligação das proteínas e peptídeos na coluna, foi repetido o processo de sugar e expulsar a solução de cada fração por sete ciclos e então a coluna foi lavada com 0,1 % TFA. Com 4 ciclos, sem a introdução de ar na ponteira, o conteúdo ligado à coluna foi eluído com 2 μ L de uma solução de ACN 50%, TFA 0,05 %.

Em uma placa de MALDI, 1 μ L da solução obtida após a dessanilização foi misturado com 1 μ L de SA, seguindo os mesmos protocolos de aplicação e análise descritos anteriormente para essa matriz.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da peçonha bruta de *L. laeta* e *L. intermedia*

Previamente à etapa de purificação dos venenos, foi realizada a análise da peçonha bruta por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. Os espectros para ambas as espécies foram obtidos em modo refletor e em modo linear, como apresentado nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

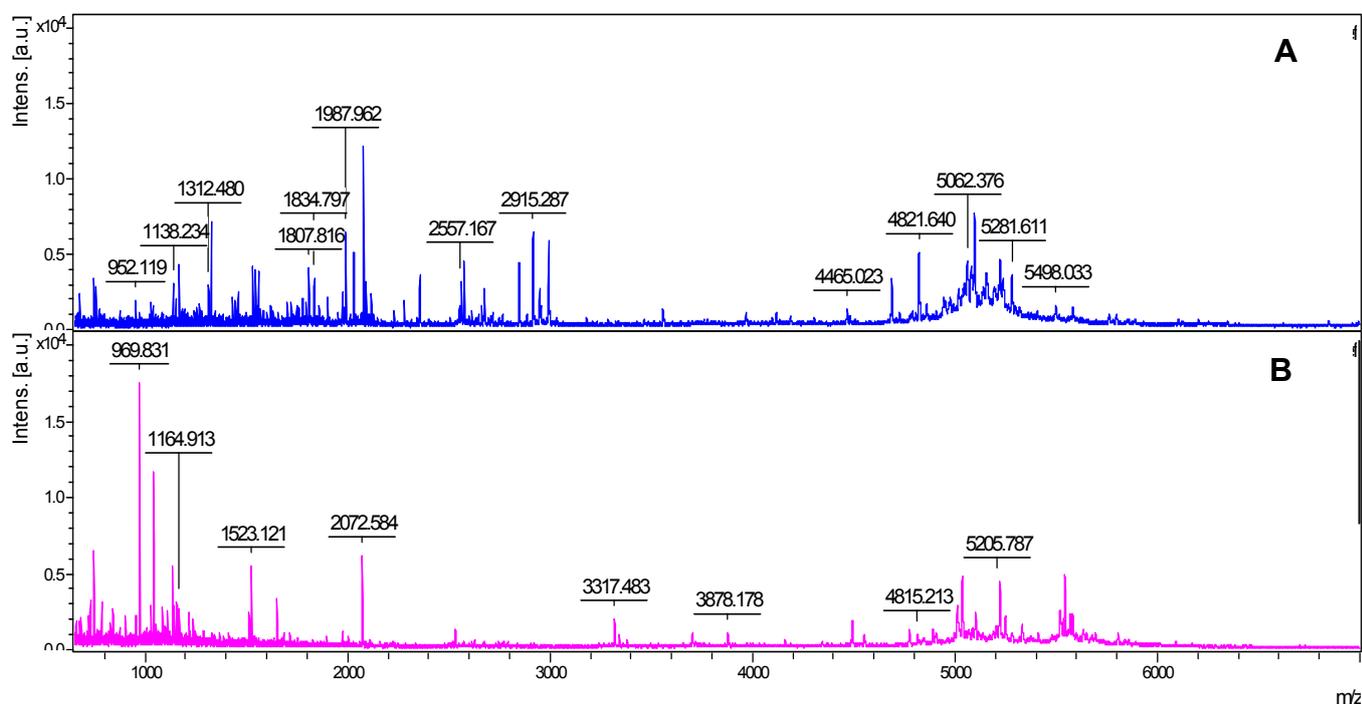


Figura 11. Espectros de massa do tipo MALDI-TOF da peçonha bruta de *L. laeta* (A) e *L. intermedia* (B). Aquisição de espectros em um intervalo entre 500 Da – 7.000 Da, em modo refletor positivo e com a mistura de matrizes (DHB e HCCA).

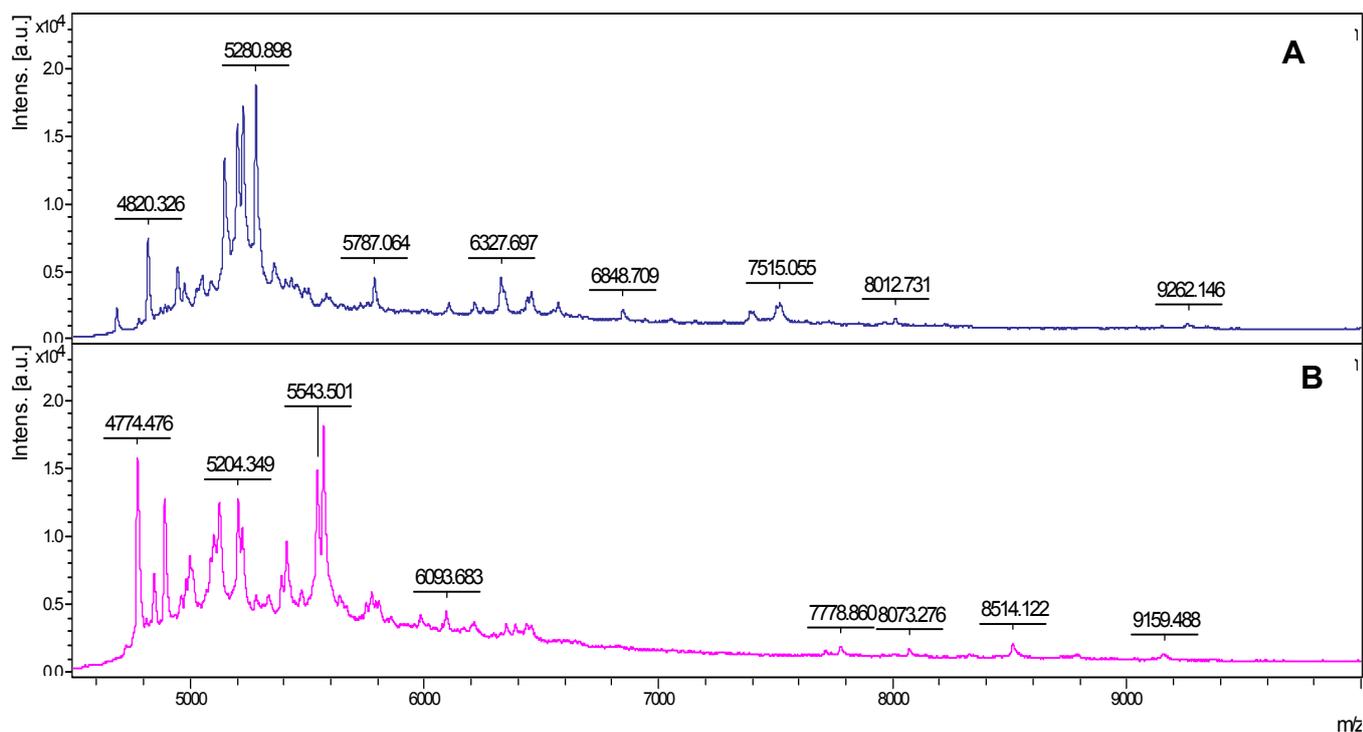


Figura 12. Espectros de massa do tipo MALDI-TOF da peçonha bruta de *L. laeta* (A) e *L. intermedia* (B). Aquisição de espectros em um intervalo entre 4.500 Da – 10.000 Da e modo linear e matriz AS.

4.2. Fracionamento das peçonhas de *L. laeta* e *L. intermedia*

Os perfis cromatográficos das espécies foram obtidos por fracionamento em sistema HPLC utilizando coluna C₁₈. Como o intuito era realizar um estudo comparativo, as condições experimentais foram idênticas para ambas as espécies. Dessa forma, foram utilizados os mesmos solventes para ambas as purificações, a mesma quantidade de peçonha foi aplicada e as análises foram realizadas no mesmo dia e com isso foi observada uma boa reprodutibilidade dos perfis. Para a espécie *L. laeta* (Figura 13A) foram coletadas 64 frações, enquanto que para a espécie *L. intermedia* (Figura 13B) foram obtidas 66 frações. Após a coleta, as frações foram liofilizadas para análise posterior por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF.

A sobreposição de ambos os perfis cromatográficos, na forma da Figura 14, tem como objetivo destacar as diferenças e semelhanças das expressões dos componentes presentes nas peçonhas de cada espécie.

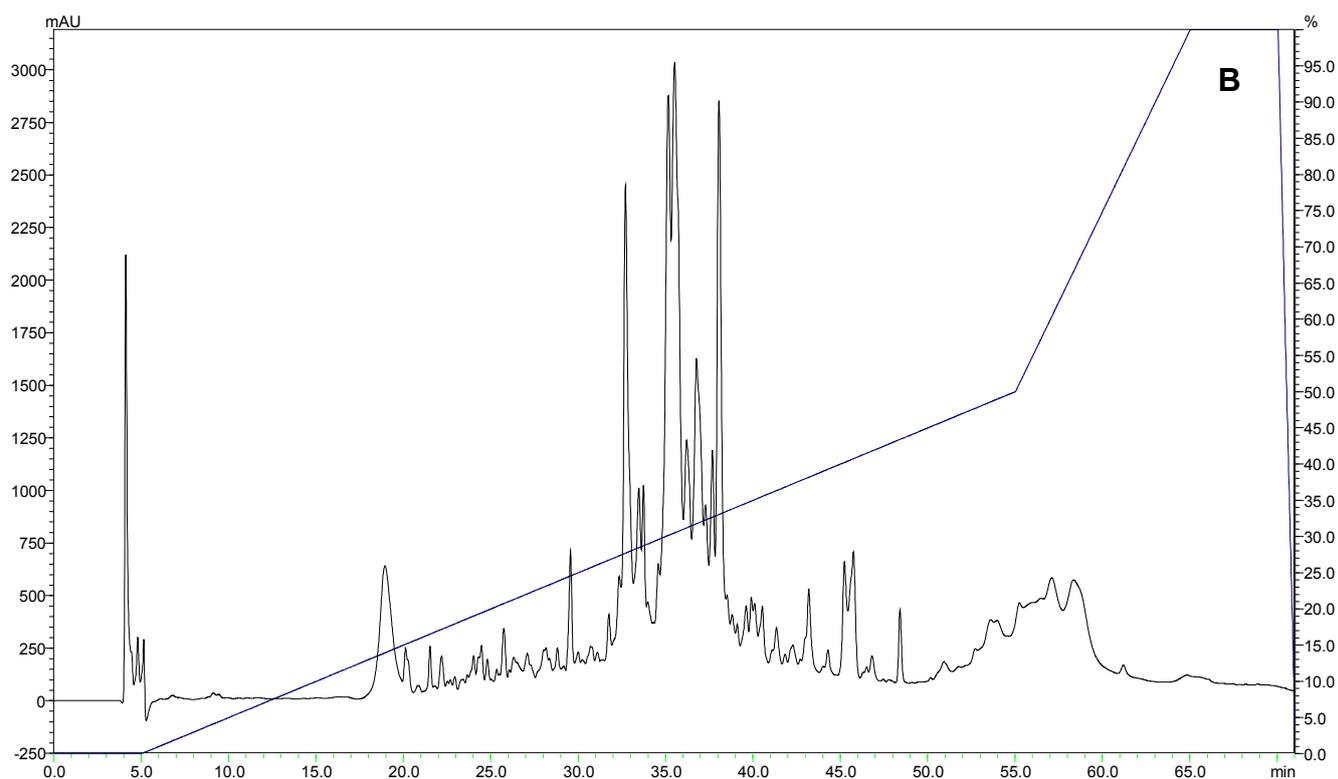
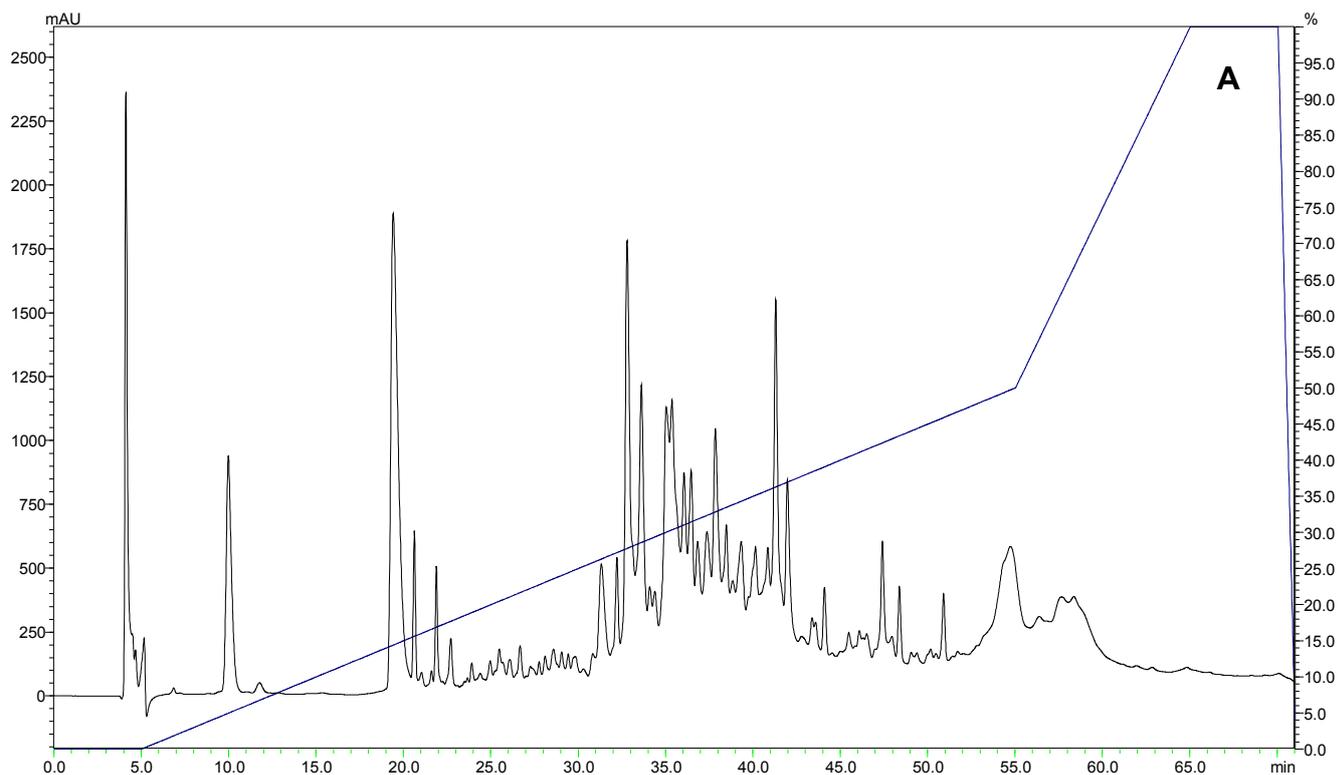


Figura 13. Perfis cromatográficos obtidos para as peçonhas das espécies *L. laeta* (A) e *L. intermedia* (B) por RP-HPLC em coluna C₁₈ (Shim-pack Shimadzu) com emprego de gradiente linear de acetonitrila/ TFA 0,1%. O monitoramento das frações foi realizado a 216 nm e a eluição feita com fluxo de 0,5 mL/min.

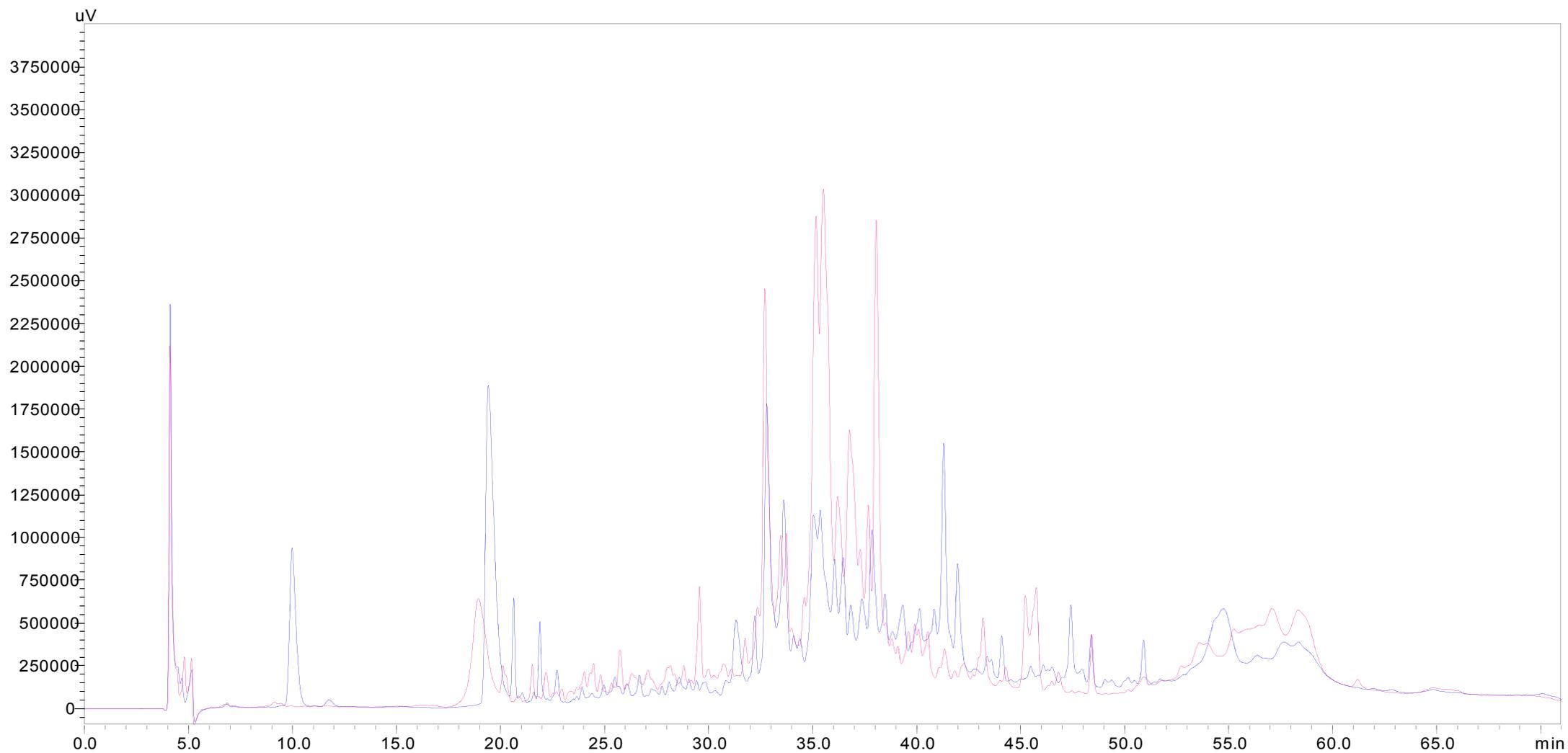


Figura 14. Sobreposição dos perfis cromatográficos obtidos para *L. laeta* (em azul) e *L. intermedia* (em vermelho).

A comparação entre perfis cromatográficos revelou algumas semelhanças entre as espécies de estudo. Pode ser observada a distribuição de três grupos de componentes, de acordo com sua hidrofobicidade (15 min a 26 min, 28 min a 55 min e 56 min a 63 min de tempo de corrida)

4.3. Análise por espectrometria de massas - comparação peptidômica geral

Cada fração foi analisada em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF (Autoflex II, Bruker Daltonics, Alemanha), em um intervalo de detecção de massas entre 500 Da a 10.000 Da. Os componentes detectados foram dispostos em uma tabela, de acordo com o tempo de retenção (Tabela 6). A análise revelou um total de 649 componentes para *L. laeta*, em uma faixa de massa que varia de 579,222 Da a 8.292,843 Da, e 567 para *L. intermedia*, entre 525,105 Da e 9.737,732 Da. No total, foram detectados 1.216 componentes e o resultado dessa composição está representado na Figura 15.

Aproximadamente 74 % e 61 % dos componentes encontrados para *L. laeta* e *L. intermedia*, respectivamente, apresentam uma massa molecular entre 500 Da a 5.000 Da, sendo a faixa de 1.001 Da a 1.500 Da a mais expressiva para *L. laeta*, enquanto que para a *L. intermedia*, foi observada a região entre 4.501 Da a 5.000 Da. É importante apontar que nenhum peptídeo foi detectado entre 2.501 Da a 3.000 Da para *L. intermedia*.

Na segunda parte do histograma, o número de componentes detectados para *L. intermedia* prevaleceu com 38,80 %, contra 25,38 % para *L. laeta*. Nessa região, nenhum componente foi detectado para *L. laeta* nas faixas de 8.501 Da a 10.000 Da.

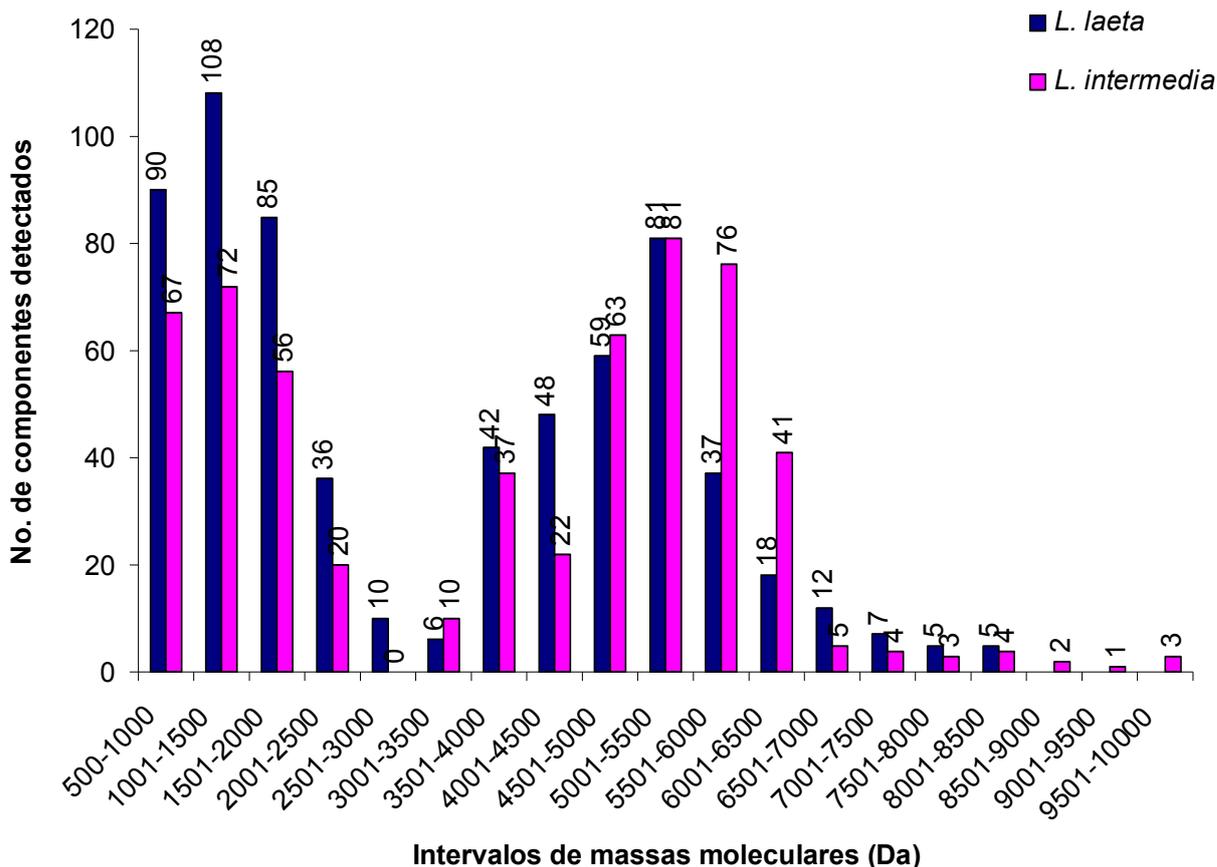


Figura 15. Histograma das massas moleculares encontradas na peçonha de *L. laeta* e *L. intermedia*.

Com o intuito de gerar um espectro que tivesse o maior número de informações a respeito da composição de cada peçonha bruta, foram utilizadas duas abordagens: aplicação de matriz SA e análise em modo linear, e utilização de mistura de matrizes HCCA e DHB em modo refletor positivo. Com a utilização da mistura de matrizes e análise em modo refletor, somente um componente visualizado na peçonha bruta não foi detectado após a etapa de purificação em sistema de RP-HPLC. O resultado observado com a matriz SA, por sua vez, permitiu a detecção prévia de alguns componentes, no entanto, somente de 41 a 50 % dos componentes visualizados na peçonha bruta, para as *L. laeta* e *L. intermedia* respectivamente, foram detectados pós-corrida.

É interessante observar que a maioria dos componentes relacionados nas Tabela 2, 3, 4 e 5 correspondem à eluição dos picos de intensidade intermediária, em ambos os perfis cromatográficos. No entanto, foi curioso o fato de que, para ambas as espécies, os picos mais intensos não tiveram nenhum de seus componentes detectados pela análise do veneno bruto (nas Tabelas, a sigla n.d. significa não determinado).

Tabela 2. Massas moleculares detectadas na análise da peçonha bruta de *L. laeta* com matriz AS.

t_R (min)	SA (Da)
31,32	5225,11
34,09	5225,11
38,48	4945,74
40,15	5147,14
43,39	5280,90
44,09	5787,06
46,09	5201,89
47,41	6105,40
48,38	4686,66; 4945,74
54,74	6848,71; 8012,73
n.d.	4820,33; 6215,53; 6327,70; 6457,15; 6571,93; 7515,06; 9262,15

Tabela 3. Massas moleculares detectadas na análise da peçonha bruta de *L. intermedia* com matriz AS.

t_R (min)	SA (Da)
34,30	5125,25
36,20	4846,33
37,68	5543,50
38,81	5204,35
41,83	7778,86
46,32	4891,26
n.d.	4774,48; 5412,53; 6093,68; 8073,28; 8514,12; 9159,49

Tabela 4. Massas moleculares detectadas na análise da peçonha bruta de *L. laeta* utilizando a mistura de matrizes HCCA e DHB.

t_R (min)	HCCA+DHB (Da)
21,03	772,88
21,89	675,70
23,493	1138,23; 1267,42
25,49	675,70
27,26	1834,80
28,59	952,12; 1312,48; 1443,52;
29,05	952,12; 1457,52; 1778,73; 1834,80;
29,43	1312,48
29,84	1037,16; 1151,23; 1312,48
30,84	758,87; 1807,82;
31,32	5281,61
34,09	1544,56; 5498,03
34,39	2846,08
35,36	1142,30; 1621,637
36,47	746,932;
37,37	1142,30; 1560,55;
38,48	1028,22; 4944,11
40,15	1793,92
40,85	5062,38
41,30	4976,08
41,97	5238,88
43,39	5281,61
44,09	4465,02
46,09	4976,08
47,41	1981,92; 2076,01; 2846,08; 4821,64;
47,95	2915,29; 4821,64
48,38	4821,64; 4944,11; 4686,21
49,06	1973,94
50,17	2089,00
50,91	1720,80; 1987,96; 2029,00; 4686,21
54,74	6845,64
n.d.	1700,78

Tabela 5. Massas moleculares detectadas na análise da peçonha bruta de *L. intermedia* utilizando a mistura de matrizes HCCA e DHB.

t_R (min)	mix matrizes (Da)
22,18	727,66; 746,62
25,34	1974,51
26,31	721,57; 1164,91
27,09	1514,16
29,56	3317,48
30,71	5541,07
31,10	3317,48
32,35	787,57; 1141,96; 1236,01
32,70	1651,22; 5035,10
33,47	1651,22; 1523,12
33,74	1523,12; 5541,07
34,30	1107,85; 1214,03; 1523,12
36,77	3878,18
37,28	954,77; 3701,99
37,68	972,78
38,06	969,83
38,52	5205,79
39,10	1134,94
44,29	1214,03
48,42	4815,21
n.d.	2072,58

A distribuição das massas moleculares detectadas para cada espécie em função do perfil de eluição está apresentada na Figura 16, assim com a sobreposição de ambos os perfis (Figura 17).

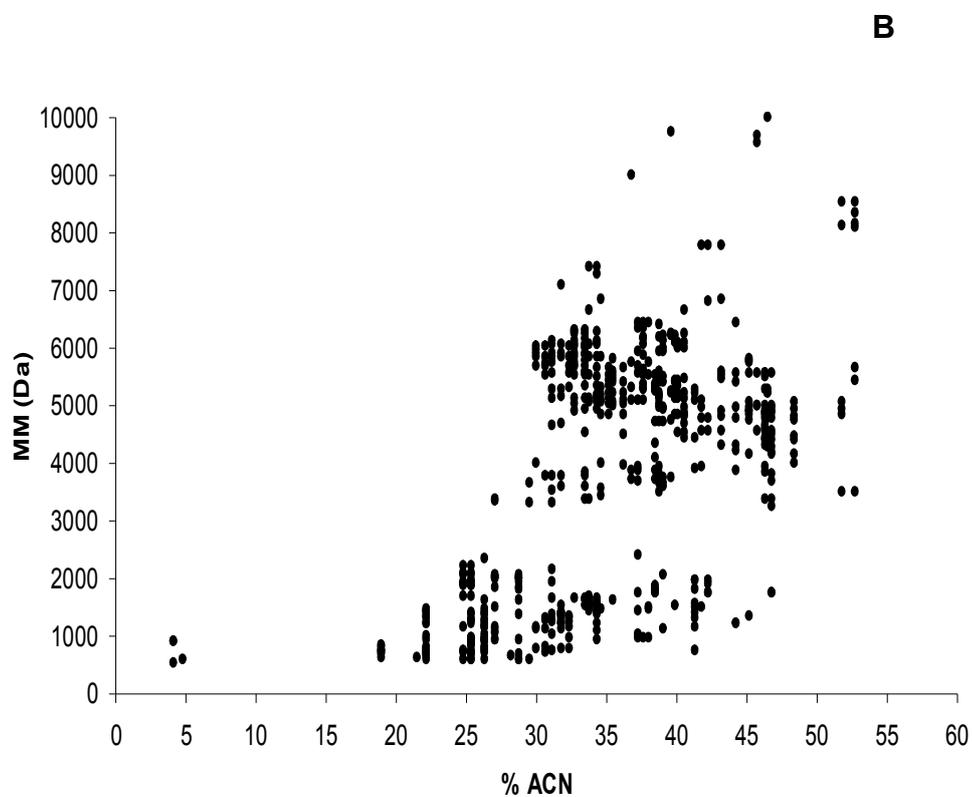
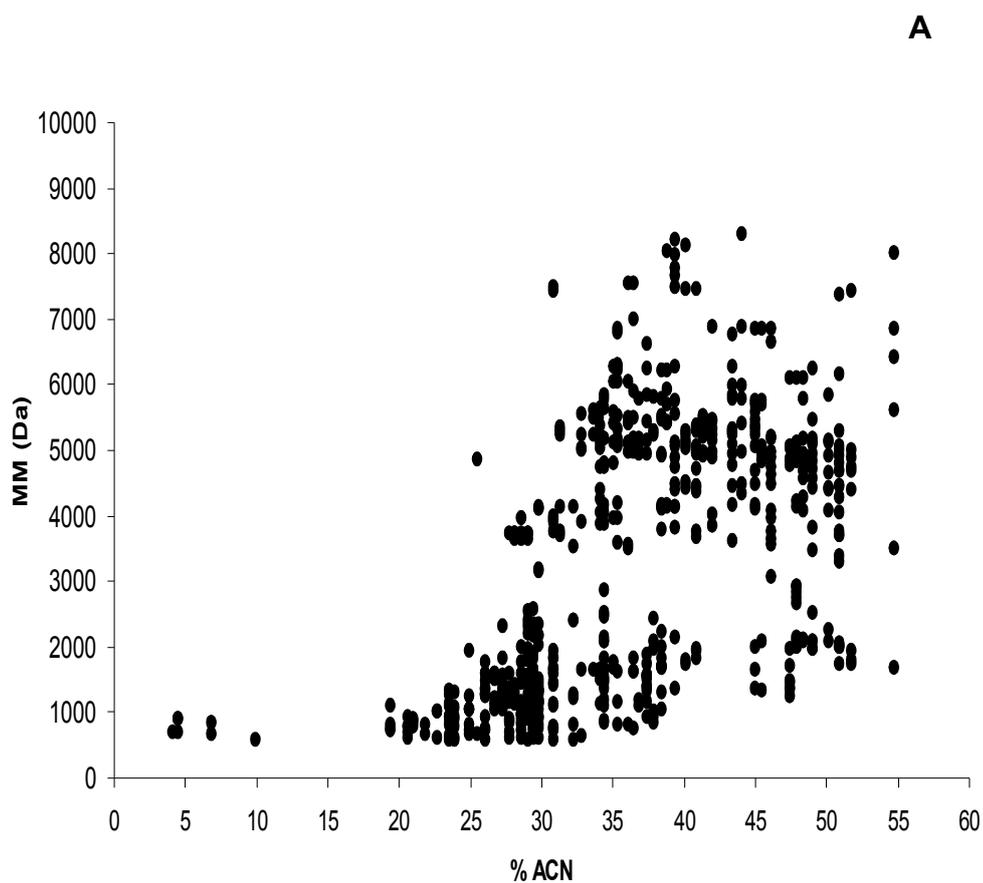


Figura 16. Distribuição dos componentes de massas moleculares em relação à hidrofobicidade.

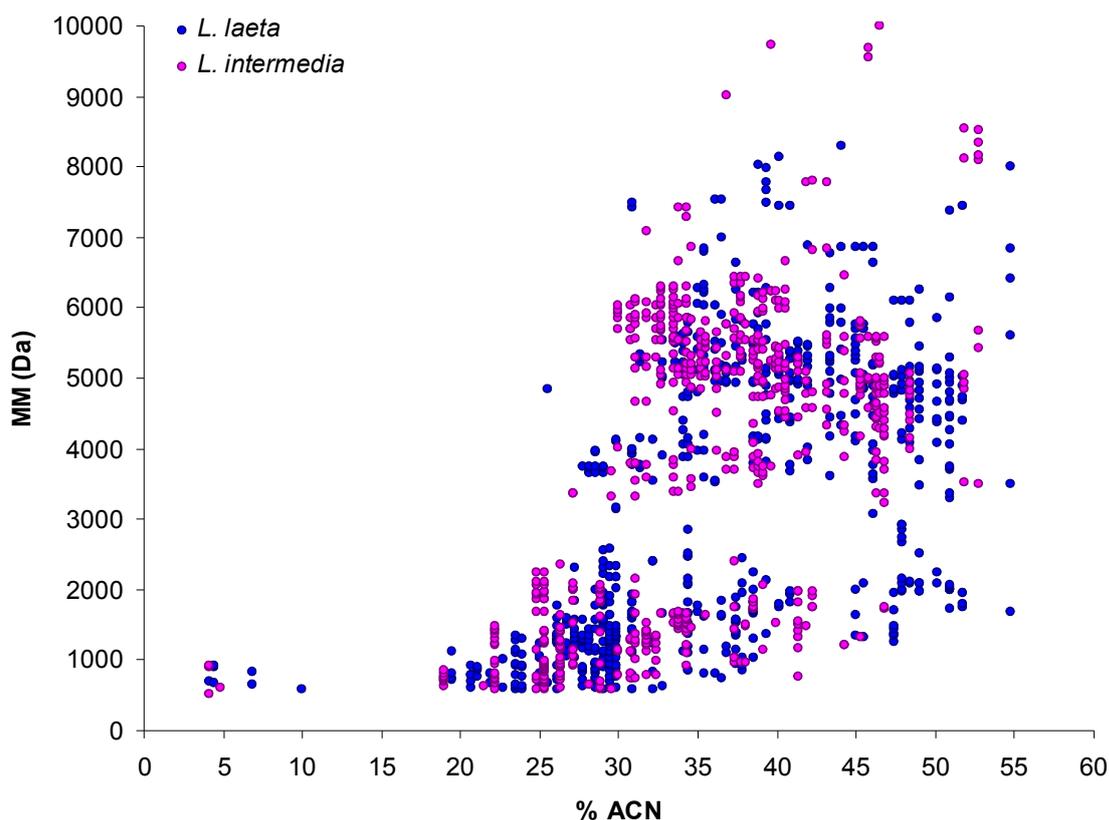


Figura 17. Sobreposição da distribuição dos componentes de massas moleculares em relação à hidrofobicidade para as espécies *L. laeta* (azul) e *L. intermedia* (rosa).

A listagem relacionando os componentes detectados nas frações após o fracionamento em RP-HPLC das peçonhas de *L. laeta* e *L. intermedia* pode ser visualizada na Tabela 6. Os componentes também foram comparados entre as espécies em função do tempo de retenção. Os limites fixados para a comparação foram de $\pm 0,5$ min, para o tempo de retenção, e ± 3 Da para a massa molecular. Na Tabela 6 também foi incluída a porcentagem da área do pico (com relação à área total). Os componentes que tiveram correspondentes em ambas as espécies estão sublinhados na Tabela 6.

No presente caso, não foi possível assumir que a expressão dos componentes detectados está relacionada com a área do pico no cromatograma correspondente, uma vez que a maioria das frações coletadas não estava pura, portanto há a influência dos outros componentes atuando na expressão da área de cada pico. Além disso, foi constatado que não houve uma relação diretamente proporcional entre a quantidade de

componentes e a porcentagem da área do pico, pois em alguns casos a porcentagem de área calculada foi menor mesmo esta apresentando um número maior de componentes (por exemplo, para o t_R 30,835 min para *L. laeta* e 30,706 min para *L. intermedia* – a área observada para o pico para o perfil de *L. laeta* foi praticamente a metade do encontrado valor para *L. intermedia*, no entanto, no mesmo pico foram obtidos 24 componentes, mais que o dobro do detectado para *L. intermedia* – 11 componentes).

Para o estudo da expressão de um componente de interesse, seria necessária uma etapa posterior de purificação de sua fração correspondente, para que essa relação fosse avaliada de maneira mais adequada.

Tabela 6. Massas moleculares detectadas nas peçonhas de *L. laeta* e *L. intermedia*.

<i>Loxosceles laeta</i>							<i>Loxosceles intermedia</i>								
t_R (min)	Massa molecular (Da)						Área (%)	t_R (min)	Massa molecular (Da)						Área (%)
4,12	703,94						0,27	4,11	525,11 <u>893,65</u> 909,72						2,49
4,48	681,93 <u>892,87</u> 908,85						0,27	4,80	595,39						0,54
19,41	<u>708,40</u> <u>749,48</u> <u>806,54</u> 1112,38						7,97	18,94	620,65 701,76 <u>709,37</u> <u>749,70</u> 755,71 <u>806,79</u> 849,72						18,94
21,03	773,47 844,54 867,40 901,54						0,32	21,52	631,76						0,50
21,89	674,53 <u>804,62</u>						0,77	22,18	585,45 671,48 682,46 727,56 746,52 789,49 <u>806,56</u> 943,66 989,64 1204,65 1225,64 1300,70 1356,69 1415,71 1427,76 1471,75						0,15
24,97	659,45 <u>719,34</u> 811,54 1035,43 1040,44 1050,59 1237,68 1934,66						0,37	24,81	591,47 <u>719,56</u> 752,49 1150,69 1673,82 1863,86 1919,92 1941,02 2069,11 2103,08 2231,2						0,40
25,49	<u>674,34</u> 4850,64						0,55	25,34	578,55 601,46 <u>672,51</u> 694,50 710,47 759,55 829,68 849,63 878,72 886,72 911,75 949,62 962,67 976,63 1233,82 1265,83 1281,84 1384,75 1402,89 1673,88 1863,95 1864,94 1941,10 1975,12 2069,24 2103,23 2232,29						0,28
26,09	579,41 709,43 762,37 928,32 1242,83... <u>1257,49</u> <u>1268,75</u> 1285,52 1331,56 1355,77 1372,55 1469,53 1598,561772,61						0,42	26,31	594,38 721,45 751,42 796,45 808,43 907,53 922,46 931,49 978,51 1036,49 1143,48 1164,57 1195,67 <u>1254,94</u> <u>1269,59</u> 1384,60 1410,66 1465,73 1634,76 2345,21						0,44
27,26	1036,36 1203,44 1220,58 1290,50 1363,53 1433,47 1563,72 1834,89 2307,10						0,46	27,09	922,61 952,64 1049,73 1051,73 1138,85 1153,73 1513,84 1830,03 2001,04 2004,14 2019,08 2022,15 2077,13 3358,39 3367,54						0,56
28,11	1113,40 1190,43 1269,46 1286,46 1346,50 1430,45 3650,32 3722,33 3737,23						0,42	28,16	654,54						0,36

<i>Loxosceles laeta</i>									<i>Loxosceles intermedia</i>										
t_R (min)	Massa molecular (Da)								Área (%)	t_R (min)	Massa molecular (Da)								Área (%)
28,59	<u>601,48</u>	714,98	729,59	801,62	847,61	885,58	946,66	0,63	28,81	579,43	<u>601,52</u>	700,59	<u>948,71</u>	1384,85	1613,94	0,66			
	<u>948,63</u>	950,68	972,61	1131,60	1158,60	1442,92				1813,17	1841,18	1931,02	<u>2000,55</u>	2002,12	2005,16				
	1576,86	1773,03	<u>2000,86</u>	3652,55	3740,05	3948,45				2016,18	2059,17								
	3966,23																		
29,43	601,51	684,57	753,62	765,57	841,59	921,62	948,64	0,34	29,56	579,43	3317,77	3668,80				1,29			
	1022,67	1106,75	1118,79	1183,74	1186,70	1236,85													
	1263,64	1282,90	1283,72	1311,81	1384,73	1490,85													
	1637,84	1646,89	1813,01	1914,07	2173,03	2329,12													
	2582,38																		
29,84	601,52	753,60	801,56	883,62	921,64	929,66	1037,62	0,55	30,00	780,86	1113,07	1143,09	4002,95	5688,22	5850,97	0,51			
	1118,82	1127,72	1152,67	1154,85	1170,77	1183,78				5908,42	5965,7	6025,00							
	1269,79	1311,87	1315,45	1316,77	1318,78	1342,84													
	1384,81	1433,80	1490,96	2011,13	2167,25	2173,22													
	2329,32	3140,74	3170,21	4094,92	4109,11	4123,10													
30,84	590,35	733,64	755,49	758,67	793,62	1100,91	<u>1123,98</u>	0,44	30,71	729,87	809,85	<u>1124,18</u>	1289,06	1308,14	3783,67	0,83			
	1417,92	1441,90	1586,96	1596,91	1632,98	1650,06				5541,39	5687,47	5703,20	5849,95	6026,81					
	1670,96	1808,02	1821,08	1931,20	3765,35	3915,71													
	3933,20	3973,77	3991,46	7421,52	7479,81														
31,32	3711,15	3768,79	4137,17	5225,93	5282,67	5339,28		1,86	31,10	748,69	1018,58	1237,83	1280,86	1359,84	1654,03	0,44			
										1932,20	2158,24	3317,04	3534,21	3794,81	4665,83				
										5140,06	5285,91	5550,85	5757,59	5851,85	5904,38				
										6066,20	6125,23								
32,22	588,45	822,72	<u>1222,76</u>	1274,81	2399,73	2402,44		1,24	31,76	795,64	1110,97	<u>1221,90</u>	<u>1223,89</u>	1233,91	1268,99	0,82			
	3533,52	4132,36								1337,20	1352,90	1381,07	1383,09	1395,24	1408,05				
										1409,15	1517,08	3598,05	3767,14	4672,60	5147,85				
										5295,26	5845,70	5913,91	6076,15	7087,05					

<i>Loxosceles laeta</i>								<i>Loxosceles intermedia</i>							
t_R (min)	Massa molecular (Da)						Área (%)	t_R (min)	Massa molecular (Da)						Área (%)
32,80	635,58	<u>1650,99</u>	3890,49	4995,53	5023,49	5230,74	4,81	32,35	787,69	983,90	1140,96	1236,01	1312,14	1342,07	1,48
	5539,75								5301,35	5549,11	5695,75	5858,60	6036,26		
								32,70							5,84
									<u>651,01</u>	4911,64	5038,19	5038,19	5534,27	5680,54	
									5696,69	5748,52	5843,17	5896,06	6020,36	6058,16	
									6122,58	6235,11	6285,92	6308,40			
33,62	650,96	5226,34	5502,45	5605,92			3,47	33,47	1522,94	1633,97	1650,99	3388,79	3596,62	3776,20	2,30
									3839,48	4539,42	4927,20	5136,23	5344,20	5518,84	
									5551,74	5590,52	5698,27	5767,13	5861,62	5914,66	
									5996,20	6039,61	6077,43	6143,01	6255,19	6305,96	
34,09	1120,82	1505,93	1508,12	1522,97	1527,02	1545,02	0,82	33,74	1439,05	1485,08	1509,29	1523,13	1525,21	1526,78	1,49
	1586,04	1634,02	<u>1651,05</u>	3882,86	4048,43	4255,72			1561,09	1634,19	<u>1651,23</u>	1676,29	3377,20	5047,08	
	4389,98	4725,79	5042,71	5116,73	5170,12	5225,41			5124,83	5541,74	5847,86	6063,03	6662,92	7416,47	
	5373,88	5498,68	5634,84												
34,39	842,85	859,91	<u>1107,95</u>	1195,03	1368,90	<u>1439,06</u>	0,90	34,30	926,76	<u>1107,87</u>	1213,99	1385,96	<u>1438,98</u>	<u>1505,99</u>	0,31
	1485,11	<u>1506,08</u>	<u>1523,06</u>	<u>1650,30</u>	1652,18	1660,19			<u>1523,07</u>	<u>1524,03</u>	1567,04	1568,13	1600,10	<u>1652,12</u>	
	1811,30	2071,53	2083,45	2146,33	2464,66	2471,72			4929,17	5047,27	5125,67	5191,96	5349,40	5504,97	
	2505,72	2846,86	3883,33	4049,15	4158,31	4726,15			5661,74	<u>5848,22</u>	6062,89	6128,43	6292,21	7288,46	
	4792,57	5171,23	5645,04	5780,80	<u>5847,46</u>				7416,75						
35,04	1687,13	1762,18	3970,94	4794,41	5101,21	5396,44	3,22	34,59	1458,05	3448,63	3564,02	3994,67	4854,92	5048,69	1,10
	5591,07	6048,82	6276,08						5106,65	5192,16	5303,41	5832,53	6850,24		
35,36	801,95	1142,10	1622,35	3577,76	3973,72	4190,51	3,72	35,16	4834,79	5021,15	5139,98	5232,87	5345,24	5440,92	9,73
	5046,13	5104,01	5161,94	5311,94	<u>5524,35</u>	6036,07			5533,30	5648,54					
	6199,61	6263,89	6314,43	6784,64	6842,83			35,52	1634,09	5014,16	5072,69	5224,22	5416,59	5483,72	9,73
									<u>5525,31</u>	5586,84	5811,25				

<i>Loxosceles laeta</i>								<i>Loxosceles intermedia</i>							
t_R (min)	Massa molecular (Da)						Área (%)	t_R (min)	Massa molecular (Da)						Área (%)
36,06	801,93	3510,84	3540,83	4958,57	5085,71	5102,52	1,91	36,20	3973,59	4497,88	4844,56	5016,48	5105,57	5224,26	3,21
	5413,66	5505,12	6034,35	7542,28					5418,35	5656,02					
36,83	1088,08	1192,15	4940,75	4958,62	5072,89	5160,73	1,49	36,77	3705,27	3879,90	5105,84	5313,91	5756,8	9002,56	5,43
	5768,47														
37,37	930,94	1142,92	1342,10	1382,51	1396,27	1517,32	1,98	37,28	954,80	1041,86	1431,00	1752,21	2399,28	3701,66	1,60
	1547,34	1560,18	1574,37	1741,32	1884,56	4936,89			3875,71	3935,96	5090,41	5564,44	5694,52	5924,24	
	5150,48	5442,56	5827,20	6254,71	6627,55				6354,14	6438,62					
37,85	842,95	919,98	<u>972,99</u>	1021,01	1954,59	2074,41	2,87	37,68	<u>972,91</u>	5088,51	5295,33	5313,33	5371,81	5543,54	2,17
	2441,82	5244,36	5303,17	5807,09					5613,85	5862,78	6078,05	6141,85	6173,01	6350,58	
									6437,13						
38,48	1028,07	1290,26	1664,50	1674,58	1710,66	1715,71	1,69	38,06	969,83	1473,04	1497,96	5544,06	5751,25	6437,50	5,79
	1817,77	1996,81	2231,01	3789,02	4101,34	4144,55									
	4171,46	4923,36	4945,37	5476,21	5525,37	5770,4		38,52	1735,07	1739,19	1810,17	1825,14	1863,13	3716,11	0,71
	6219,24								3869,11	4078,99	4357,55	4725,89	5239,39	5316,84	
									5389,79	5542,19					
38,84	4133,44	4160,66	<u>5393,51</u>	5446,91	5694,12	5917,14	0,96	38,81	3504,55	3646,36	3733,35	3808,72	3929,41	4727,55	0,71
	6202,79	8021,99							4963,28	5020,20	5127,47	5170,40	5189,20	5206,75	
									<u>5392,75</u>	5505,80	5527,72	5545,37	5599,76	5933,70	
									6174,99	6409,62					
39,33	357,02	2131,40	3812,71	4127,21	4138,34	4395,14	1,97	39,10	1134,85	2062,31	3607,58	3649,70	3736,04	4731,39	0,54
	4473,63	4750,00	4884,34	5070,86	5128,35	5548,71			4924,82	4966,11	5396,69	5507,80	5937,01	5985,42	
	5754,47	6267,63	7495,34	7658,82	7773,68	7980,04			6114,61	6206,30					
	8196,44							39,61	3751,36	4747,39	5229,91	5256,62	6230,62	6235,6	1,11
									9737,73						

<i>Loxosceles laeta</i>								<i>Loxosceles intermedia</i>							
t_R (min)	Massa molecular (Da)						Área (%)	t_R (min)	Massa molecular (Da)						Área (%)
								39,91	1516,81 5439,23	4853,47 6104,48	5133,21 6224,70	5212,42	5270,64	5421,19	0,68
40,15	1739,99 5140,61	1794,11 5244,40	4418,11 5297,80	4497,34 7449,31	5035,82 8135,42	5082,27	1,80	40,10	4527,41 5997,40	4856,87 6106,78	5136,01	5216,34	5343,74	5424,16	0,69
								40,54	<u>4438,84</u> 4975,11 6249,34	4523,31 5131,70 6649,35	4694,71 5210,99	4802,73 5481,19	4852,58 5990,78	4882,63 6085,83	1,14
41,30	4904,54 5373,11	4950,76 5500,38	4977,60 5518,37	5211,47	5252,82	5291,47	3,85	41,35	763,64 1824,09 5208,12	1154,79 1976,12 5282,46	1322,80 1984,28	1409,88 3910,98	1493,88 4437,19	1556,77 5084,14	0,82
41,97	3832,87 5319,14	4006,21 5446,85	4883,62 5464,96	4963,14 6883,19	5157,89	5238,03	2,35	41,83	1485,74 7778,70	3952,42	4574,99	4782,69	4959,28	5080,24	0,38
								42,28	1752,20 6810,85	1756,27 7796,41	1895,28	1976,31	4565,34	4794,47	0,78
43,39	3612,50 5226,36 5994,36	4168,15 5254,90 6274,82	4446,40 5281,73 6768,82	4768,65 5307,85	4933,97 5786,46	5100,34 5846,63	0,62	43,19	4319,72 5605,51	4557,18 6834,48	4798,08 7788,49	4910,87	5479,03	5536,80	1,59
44,09	4331,69 6867,68	4465,99 8292,84	4969,64	<u>5393,96</u>	5787,73	5988,21	0,84	44,29	1213,76 4954,86	1216,94 <u>5391,94</u>	3883,19 5573,78	4227,14 6453,02	4317,39	4779,69	0,54
45,02	1354,98 4693,72 <u>5571,60</u>	1642,38 5071,86 5699,07	1991,43 5241,53 5759,96	4112,13 5313,92 6854,53	4166,88 5381,88	4483,11 5469,09	0,40	45,23	1330,91 4967,50	4163,26 5063,24	4760,47 <u>5571,13</u>	4852,01 5744,98	4894,21 5779,65	4909,67 5796,98	1,29
45,49	1330,99	2078,51	4840,16	4864,63	4940,99	4960,54	0,77	45,75	4572,09	4987,46	5005,54	5575,08	9562,38	9679,00	1,77

<i>Loxosceles laeta</i>							<i>Loxosceles intermedia</i>								
t_R (min)	Massa molecular (Da)						Área (%)	t_R (min)	Massa molecular (Da)						Área (%)
	5052,41	5699,00	5756,59	6850,90											
46,09	3060,85	3560,49	3632,11	3761,38	3968,43	4062,93	0,47	46,32	3367,78	3837,37	3944,55	4315,64	4409,21	4429,67	0,14
	4468,48	4626,56	4737,76	<u>4896,32</u>	4978,57	5185,77			4571,38	4586,38	4642,84	4777,36	4851,83	4875,74	
	5203,22	6640,70	6854,73						4893,61	5000,31	5282,28	5504,69	5555,29	5572,54	
								46,51	4284,61	4514,15	4777,79	4894,62	5207,95	5225,58	0,19
									5283,15						
								46,81	1735,01	1743,90	3239,70	3368,27	3701,44	3816,67	0,44
									4160,76	4188,16	4285,52	4398,06	4515,21	4573,25	
									4778,84	4877,07	<u>4895,83</u>	4961,40	5001,82	5574,04	
48,38	2076,19	2098,72	4070,21	4283,92	4575,42	4686,45	0,83	48,42	4000,67	4143,71	4404,20	4475,29	4743,42	4815,97	0,64
	4804,96	4821,51	4908,75	<u>4944,83</u>	5166,13	5776,89			<u>4943,62</u>	5071,96					
	6106,30														
49,06	1973,46	1975,51	2074,56	2079,33	2502,89	3481,57	0,34								
	3829,19	4410,78	4554,88	4699,47	4818,83	4942,85									
	5085,58	5101,30	5163,99	5457,58	6250,14										
50,17	2088,44	2243,56	4079,36	4380,87	4417,13	4653,17	0,52								
	4911,17	5116,37	5134,04	5848,17											
50,91	1720,04	1987,15	1989,19	2005,76	2014,60	2031,50	0,76								
	2066,34	3300,41	3372,27	3696,20	3710,91	3745,13									
	4052,83	4267,05	4448,26	4461,97	4668,38	4685,18									
	4803,03	4926,74	5001,65	5070,01	5296,15	6152,99									
	7370,80														

<i>Loxosceles laeta</i>								<i>Loxosceles intermedia</i>									
t_R (min)	Massa molecular (Da)							Área (%)	t_R (min)	Massa molecular (Da)							Área (%)
51,71	1745,34	1787,27	1948,41	4392,40	4680,30	4737,31	0,35	51,78	3511,00	4836,89	4933,45	5048,83	8126,52	8540,27	0,36		
	4886,20	5014,12	7437,13														
															0,84		
								52,72	3505,55	5435,50	5671,51	8083,33	8156,89	8343,37			
									8529,88								
54,74	1672,00	3498,58	5596,38	6412,60	6846,11	8011,57	6,77										

4.3.1. Moléculas com m/z abaixo de 1000 Da

Como apresentado na seção anterior, foram detectados 90 componentes para *L. laeta* e 67 para *L. intermedia* na faixa de massas moleculares abaixo de 1000 Da. Para a análise das frações, cada espectro foi comparado com um espectro padrão da mistura de matrizes, para que os picos referentes aos *clusters* pudessem ser descartados.

Os picos observados nos cromatogramas referentes aos primeiros 20 min de eluição são consistentes com a possibilidade de presença de poliaminas e outros compostos de baixa massa molecular, no entanto, ainda foram detectados componentes de m/z abaixo de 1.000 Da até 30 min a 35 min de gradiente, variando de acordo com a espécie.

Alguns desses componentes foram escolhidos para serem fragmentados, mas os espectros obtidos, apesar de indicarem um padrão de fragmentação diferente do observado na fragmentação de peptídeos, os resultados da interpretação foram inconclusivos quanto à estrutura destes compostos. Como exemplo de um espectro obtido, tem-se a Figura. 18, que retrata a fragmentação do componente de m/z 674 Da, detectado na peçonha de *L. laeta*. Como pode ser observado, o íon pai fragmentado foi de m/z 656 Da. A diferença entre eles, 18 Da, sugere a perda de H_2O , após um rearranjo de um álcool benzílico presente na estrutura.

A observação dos picos de m/z 44 Da, 58 Da, 85 Da e 129 Da sugere a quebra de sucessivas ligações C-C, com a liberação de $(C_nH_{2n+2}N)^+$, com a formação de *clusters* de intervalos de massa molecular de 14 Da. Esse padrão é visualizado na fragmentação de aminas alifáticas. O pico m/z 598,235 Da sugere a saída de 58 Da, que pode se tratar do íon $C_3H_8N^+$, amina primária ou a uma amina terciária, $H_2NC(NH)NH^+$, sendo este o início da cadeia da poliamina^{82,83,84}.

Sabe-se que a técnica mais adequada para a análise desse tipo de composto é a RMN. Portanto, no futuro, seria interessante é fazer uso também desta técnica, para complementar o estudo a respeito da estrutura de alguns deste compostos. Esta técnica revelou recentemente que as peçonhas de *L. arizonica*, *L. deserta* e *L. reclusa* continham o composto guanósina 2,5-disulfato e guanósina 2-sulfato, em maior e menor abundância, respectivamente⁸⁵.

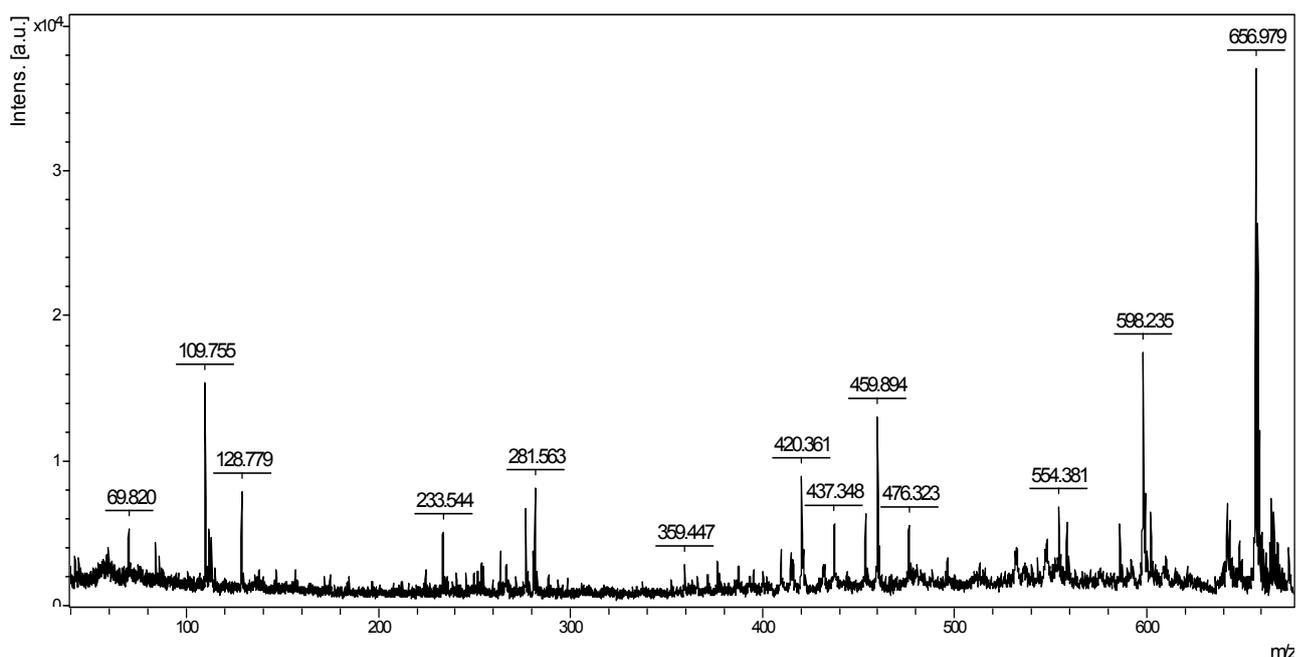


Figura 18. Espectro de MS/MS obtido para o composto de m/z 656, observado nos primeiros tempos de eluição para *L. laeta*.

4.3.2. Componentes com m/z acima de 1000 Da

Além das comparações apresentadas anteriormente, outros estudos também foram realizados. Uma vez que é esperado que as peçonhas contenham compostos com atividades biológicas, é realizada uma prospecção para complementar a caracterização da mesma. Isso pode ser contemplado pela realização de ensaios biológicos específicos ou por meio de estudos estruturais que, desta forma, podem sugerir sua atividade.

Para iniciar essa investigação, foram selecionados alguns dos picos que apresentaram uma porcentagem de área acima de 3% da área total, para terem seus componentes reduzidos e alquilados para a determinação do número de cisteínas presentes em suas estruturas.

Os resultados obtidos após este processo estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, para as espécies *L. laeta* e *L. intermedia*, respectivamente.

Tabela 7. Determinação do número de cisteínas presentes em alguns dos componentes detectados na peçonha de *L. laeta*.

Componente (m/z)	t_R (min)	Massa teórica (m/z)	Massa experimental (m/z)	Δ m/z	Nº. de Cisteínas
5502,45	33,62	6344,85	6345,09	-0,24	8
5226,34	33,62	5856,34	5859,03	-2,69	6
5591,07	35,04	6326,07	6327,13	-1,06	7
5104,01	35,36	6364,01	6362,90	1,117	12
5161,94	35,36	6211,94	6213,12	-1,18	10
5311,94	35,36	6361,94	6362,90	-0,95	10
5524,35	35,36	6574,35	6574,28	0,06	10
6036,07	35,36	7086,07	7085,55	0,52	10
6263,89	35,36	7313,89	7312,52	1,37	10
4950,76	41,30	6210,76	6209,51	1,24	12
5211,47	41,30	6051,47	6050,41	1,06	8
5252,82	41,30	6092,82	6090,17	2,65	8
5500,38	41,30	6130,38	6129,60	0,78	6
4883,62	41,97	5723,62	5725,68	-2,05	8
4963,14	41,97	5803,14	5804,87	-1,72	8
5157,89	41,97	5997,89	5999,67	-1,78	8
5238,03	41,97	6078,03	6079,11	-1,08	8
5319,14	41,97	6159,14	6158,46	0,68	8
5446,85	41,97	6286,85	6287,35	-0,50	8

Tabela 8. Determinação do número de cisteínas presentes em alguns dos componentes detectados na peçonha de *L. intermedia*.

Componente (<i>m/z</i>)	<i>t_R</i> (min)	Massa teórica (<i>m/z</i>)	Massa experimental (<i>m/z</i>)	Δ <i>m/z</i>	Nº. de Cisteínas
5551,74	33,47	6286,74	6285,67	1,07	7
5861,62	33,47	7121,62	7119,11	2,50	12
5021,15	35,16	6281,15	6281,32	-0,16	12
5440,92	35,16	6490,92	6489,58	1,33	10
5533,30	35,16	6583,30	6583,16	0,14	10
5648,54	35,16	6803,54	6801,85	1,69	11
5483,72	35,52	6428,72	6428,65	0,07	9
5525,31	35,52	6470,31	6472,65	-2,34	9
3879,90	36,77	4299,90	4301,24	-1,33	4
6078,05	37,68	7233,05	7234,64	-1,59	11
4557,18	43,19	5817,18	5819,64	-2,46	12
5605,51	43,19	6655,51	6657,18	-1,67	10

Foi observado que, para as frações avaliadas, a modificação característica de (+ 105 x *n*)Da - onde *n* indica o número de cisteínas passíveis de alquilação pelo grupo 4-vinilpiridina - não foi detectada para todos os componentes, o que sugere que tais componentes não possuam cisteínas em suas sequências.

Apesar de certa discrepância ter sido observada entre as massas teóricas e experimentais (o que pode ser atribuído à baixa resolução no modo linear), nas frações avaliadas de *L. laeta* foram detectadas modificações para 19 componentes, enquanto que para *L. intermedia*, para 12 somente. Para a espécie *L. laeta*, a maioria das modificações sugeriram a presença de 8 cisteínas, ou seja 4 pontes de dissulfeto, enquanto que para *L. intermedia*, foram observadas 10 ou 12 cisteínas, representando no final, 5 ou 6 pontes dissulfeto.

Interessante observar que para ambas as espécies alguns componentes apresentaram modificações ímpares: 7, 9 ou 11 cisteínas e como nenhum outro pico foi observado indicando uma alquilação subsequente, o padrão observado pode se tratar de um número par de pontes dissulfeto intramoleculares e uma intermolecular. Este padrão ímpar já foi descrito na literatura, no caso para a ω -agatoxin do grupo I, isolada

da peçonha de *Agelenopsis aperta*, que contém nove cisteínas distribuídas entre 60 resíduos, que formam 4 pontes dissulfeto intramoleculares e uma intermolecular⁸⁶.

As possíveis atuações dos componentes detectados, em função do número contabilizado de cisteínas podem ser sugeridas, uma vez que para toxinas atuantes em canais iônicos foram observadas de 3 a 7 pontes dissulfeto^{4,10,87}, como pode ser visualizado com os exemplos dispostos na Tabela 9. No entanto, os resultados obtidos devem ser confirmados e validados no futuro, por meio de ensaios biológicos que elucidem a sua atuação e pelo seqüenciamento das toxinas de interesse.

Tabela 9. Exemplos de algumas toxinas e suas atividades⁸⁷.

Nome	Sequência	cys	PD	pl	Atividade	Espécie
Gomesin	QCRRLCYKQRCVTYCRGR E	4	2	9,9	Citolítica	<i>A. gomesiana</i>
Hanatoxin 1	CRYLFGGCKTTSDCCKHLG CKFRDKYCAWDFTFS	6	3	8,3	Atuante em canais de potássio	<i>G. spatulata</i>
PnTX3-4	SCINVGDFCDGKKDCCQC DRDNAFCSCSVIFGY KTNCRCE	9	4	5,0	Antagonista dos receptores de glutamato	<i>P. nigriventer</i>
ω-AgalA	AKALPPGSVCDGNESDCK CYGKWHKCRCPWKWHFT GEGPCTCEKGMKHTCITKL HCPNKAEW	9	5	8,4	Atuante em canais de sódio	<i>A. aperta</i>
DW13.3	AECLMIGDTSCVPLGRRC CYGAWCYCDQQLSCRRVG RKRECGWVEVNCKCGWS WSQRIDDWRADYSCKCPE DQ	12	6	8,0	Atuante em canais de sódio	<i>F. hibernalis</i>
ω-phonetoxin IIA	SCINVGDFCDGKKDDCCQC CRDNAFCSCSVIFGYKTNC RCEVGTATSYGICMAKHK CGRQTTCTKPCLSKRCKKN	14	7	8,8	Atuante em canais de sódio	<i>P. nigriventer</i>

aa (número de aminoácidos); cys: número de resíduos de cisteína; pd: pontes dissulfeto; pl: ponto isoelétrico

No total foram detectados 1216 componentes no intervalo de 500 Da -10.000 Da. No entanto, somente 29 peptídeos foram identificados como presentes em ambas as peçonhas com massas moleculares semelhantes e tempos de retenção similares nas purificações cromatográficas.

Embora um número menor de frações tenha sido coletado para *L. laeta*, esta mostrou ter uma quantidade maior de componentes com relação à *L. intermedia*. Os perfis apresentaram algumas semelhanças em certas regiões do cromatograma, mas o baixo número de componentes em comum pode ser explicado pela presença de modificações pós-traducionais (que deslocariam os peptídeos similares para outros tempos de eluição), a presença de isoformas, a baixa concentração de alguns peptídeos na amostra, dificuldade de ionização desses peptídeos e a distinção estrutural entre eles considerando a diferença genética entre as espécies. Além disso, o intervalo de tolerância foi restrito para ± 3 Da, portanto certamente o número de componentes em comum ainda pode ser maior,

Como a qualidade de uma análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF é diretamente dependente das técnicas utilizadas na preparação da amostra e uma vez que as peçonhas se tratam de misturas complexas, era essencial avaliar o método mais adequado de preparação. Análises preliminares foram realizadas somente com a matriz HCCA e comparadas com os resultados obtidos com a mistura de HCCA e DHB. Para este estudo, a escolha pela mistura de matrizes levou à melhores resultados no modo refletor, com a faixa de massas moleculares entre 500 Da a 4.000 Da. Esta combinação pareceu ser mais adequada a análise das frações coletadas, resultando em boa resolução dos picos e supressão de grande parte dos picos esperados para os *clusters* de matriz. Para as amostras com componentes de massa molecular acima de 4.000 Da, outra matriz se fez necessária e optamos pelo SA e análise em modo linear. Desta forma, utilizadas duas abordagens de matrizes diferentes, foi possível aumentar a possibilidade de ionização de componentes distintos, aumentando desta forma o número de íons detectados.

O alto número de componentes detectados para as duas espécies pode ter sido superestimado, uma vez que foram observados diversos peptídeos e componentes de baixa massa molecular de m/z semelhantes, o que pode sugerir que a quantidade real de componentes presentes na peçonha na realidade é menor do que o observado experimentalmente.

Na comparação entre perfis cromatográficos de alguns escorpiões da família

Buthidae, houve certa redundância de massas moleculares detectadas, essa observação foi justificada pela distribuição de algumas proteínas em diferentes frações, seja por um algum comportamento inespecífico dessas moléculas, pela relativa abundância em que elas se encontrariam na amostra e à diferentes modificações sofridas pela cadeia polipeptídica, tais como modificações pós-traducionais e clivagens.

Os autores sugeriram o motivo de terem observados *clusters*: moléculas com estruturas relacionadas, isto é, com parâmetros físicoquímicos similares (massa molecular, carga formal, hidrofobicidade, estrutura terciária, etc), tendem a apresentar um mesmo comportamento cromatográfico e por esta razão, coeluem em uma mesma fração. Desta forma, a organização molecular em diferentes *clusters* é um espelho da complexidade molecular e permite comparar perfis de diferentes⁸⁸.

Entretanto, a comparação peptidômica entre as espécies de *A. robustus* e *H. versuta* resultou na detecção de um alto número de componentes, sendo 633 e 1018 para *A. robustus* e *H. versuta* respectivamente, em uma faixa de m/z semelhante à do nosso trabalho (1000 Da - 10.000 Da). Os autores argumentaram que o número de componentes obtidos foi calculado após diversos cuidados no tratamento dos dados, tais como a remoção de massas similares em frações adjacentes e a utilização de HCCA, que gera poucos adutos, dificultando a na escolha de componentes que supostamente seriam “falsos-positivos”⁸⁹.

Em nossas análises, contudo, a utilização da mistura de matrizes HCCA e DHB permitiu uma boa resolução dos componentes, além da supressão do sinal de matriz, o que possibilitou a detecção de diversos componentes, tanto na região de baixa massa (abaixo de 1000 Da) quanto para a região de até 4.000 Da, embora que para esta faixa, a detecção já estava consideravelmente comprometida, tornando necessária a utilização da matriz SA. Deve ser salientado que todas as frações foram analisadas em modo refletor positivo e com a mistura de matrizes, então foi possível comparar esses espectros com os obtidos com a matriz SA, permitindo também a confirmação dos diversos componentes observados em ambas as análises. É importante também frisar as massas relativas à presença de adutos de sódio (22,990 Da), potássio (39,098 Da) e ferro (55,845 Da) fossem removidas da lista final.

A complexidade dos perfis cromatográficos pode ser constatada com as figuras abaixo. Mesmo em picos de pequenas áreas de ambos os cromatogramas foram detectados diversos componentes, como pode ser observado na Figura 19.

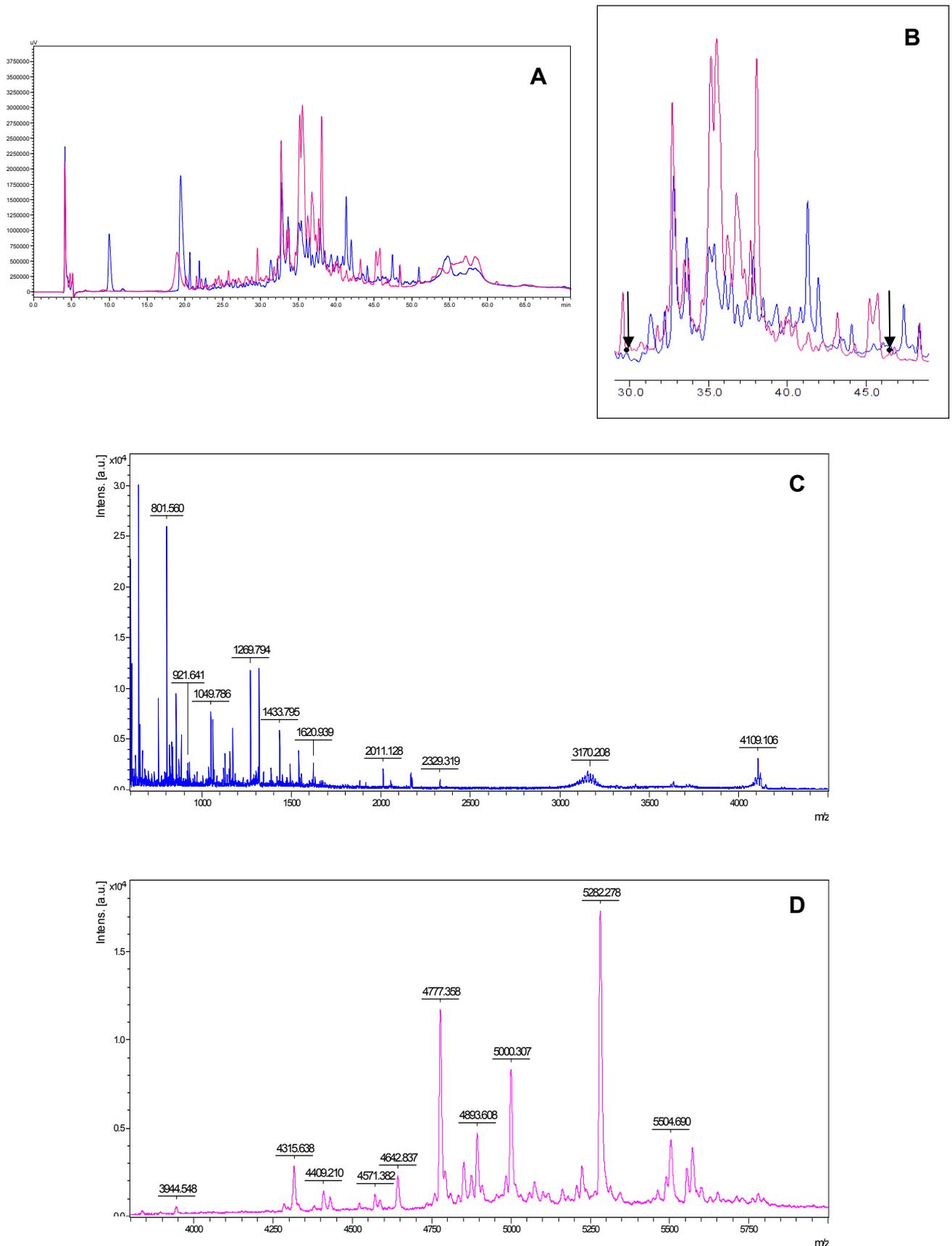


Figura 19. Complexidade observada nos perfis cromatográficos de *L. laeta* e *L. intermedia*. A partir da sobreposição dos perfis (A), a região do gradiente que compreende os picos t_R 29,838 min para *L. laeta* e t_R 46,320 min para *L. intermedia* foi destacada (B), ambos apontados por setas. As frações, de baixa abundância, mostram outra realidade na análise por MALDI-TOF: uma riqueza de componentes presentes para *L. laeta* (C) e para *L. intermedia* (D)

A justificativa apresentada pelo trabalho realizado para *Buthidae*⁸⁸ pode ajudar a explicar algumas das observações feitas em algumas frações, nas quais foram encontrados alguns componentes que aparentemente se tratam do mesmo peptídeo, mas que veio a sofrer a perda de um resíduo de aminoácido. As Tabelas 7 e 8 reúnem os peptídeos que aparentemente sofreram alguma modificação em sua estrutura. A identificação de proteases nas peçonhas de *L. intermedia* e *L. laeta*⁴⁸ e a detecção de 0,7 % do número total de sequências identificadas no repertório genético da peçonha de *L. laeta* equivalente a degradação de peptídeos sugerem a ação de proteases⁶⁶. Contudo, o estudo apresentado abaixo ainda deve ser confirmado com a análise das sequências dos fragmentos obtidos.

Tabela 10. Sugestões de possíveis modificações para alguns dos peptídeos-escada visualizados para *L. laeta*.

t_R (min)	Intervalo de massas observadas (Da)	Possível modificação
26,67	1501,67 - 1575,71	Perda de 97 Da - Prolina
27,26	1203,44 - 1290,50	Perda de 87 Da - Serina
29,84	1433,80 - 1490,96	Perda de 57 Da - Glicina
34,39	1107,95 - 1195,03	Perda de 87 Da - Serina
37,37	391517,32 - 1574,37	Perda de 57 Da- Glicina
47,95	2005,31 - 2076,	Perda de 71 Da - Alanina

Tabela 11. Sugestões de possíveis modificações para alguns dos peptídeos-escada visualizados para *L. intermedia*.

t_R (min)	Intervalo de massas observadas (Da)	Possível modificação
30,00	5908,42 - 5965,76	Perda de 57 Da- Glicina
31,71	1337,20 - 1408,04	Perda de 71 Da - Alanina
48,42	4404,20 - 4475,29	Perda de 71 Da - Alanina

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5. Conclusões e perspectivas

- O presente estudo possibilitou o início da compreensão a respeito da composição peptídica das peçonhas de *L. laeta* e *L. intermedia*;
- As peçonhas de *L. laeta* e *L. intermedia* apresentam uma grande diversidade de componentes, entre 500 Da e 10.000 Da, com uma diferenciada distribuição de acordo com a espécie;
- Os resultados sugerem a presença de um grande número de isoformas em ambas as peçonhas e a repetição de alguns componentes em tempos de eluição próximos torna necessária a identificação destes, para a confirmação dessa distribuição;
- É necessária a realização de ensaios biológicos para uma maior compreensão a respeito da atuação dos componentes presentes nessas peçonhas;
- Para a análise dos compostos de baixa massa molecular detectados, é necessário fazer uso de outras técnicas complementares, para uma caracterização mais fiel da estrutura.
- A utilização de duas matrizes em combinação (HCCA e DHBA), além de uma terceira (AS) para a análise dos componentes se mostrou eficaz para a visualização da maior parte dos componentes presentes;
- A complexidade sugere que, para estudos mais detalhados, seria adequado utilizar outras técnicas de separação, a fim de se obter frações mais puras, com menos interferentes;
- Apesar das limitações observadas, a combinação das abordagens aqui utilizadas permitiu obter importantes informações a respeito da complexidade e riqueza das peçonhas de *L. laeta* e *L. intermedia*.

Referências

1. Moore, J.; *And introduction to the invertebrates*, 2^a ed., New Hall: Cambridge, 2006.
2. Coddington, J. A.; Levi, H.W.; *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **1991**, 22, 565-592.
3. Lewbart, G. A. *Invertebrate medicine*, 1^a ed., Blackwell Publishing, 2006.
4. Rash, L. D.; Hodgson, W. C.; *Toxicon.* **2002**, 40, 225-254.
5. Mullen, G.; Durde, L. *Medical and Veterinary Entomology*. 1^a ed., Academic Press, **2002**.
6. King, G. F.; *Toxicon.* **2004**, 43, 471.
7. Escoubas, P.; Diochot, S.; Corzoc, G.; *Biochimie* **2000**, 82, 893-907.
8. Vassilevski, A. A.; Kozlov, S. A.; Grishin, E. V. *Biochemistry (moscow)* **2009**, 74, 1505-1534.
9. De Lima, M. E.; Figueiredo, S. G.; Pimenta, A. M. C.; Santos, D. M.; Borges, M. H.; Cordeiro, M. N.; Richardson, M.; Oliveira, L. C.; Stankiewicz, Pelhate, M. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* **2007**, 146, 264-279.
10. Craik, D. J.; Daly, N. L.; Waive, C. *Toxicon.* **2001**, 39, 43-60.
11. Belebony, R. de O.; Pizzo, A. B.; Fontana, A. C. K.; Carolino, R. de O. G.; Coutino-Netto, J.; dos Santos, W. F. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, 493, 1-17.
12. Escoubas, P.; Sollod, B.; King, G. F.; *Toxicon.* **2006**, 47, 650-663.
13. Strömgaard, K.; Jense, L. S.; Vogensen, S. B. *Toxicon*, **2005**, 45, 249-254.
14. Kastin, J. L.; *Handbook of Biologically Active Peptides*, 1^a ed., Academic Press : 2006.
15. Platcnick, N.I. *The World Spider Catalog*. <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/> acesso em Dezembro de 2009.
16. Gertsch, W. J.; *Bulletin of the American Museum of Natural History.* **1967**, 136, 117-175.
17. Ellison, C. E.; Duncan, P. R.; *Molecular Phylogenetics and Evolution.* **2008**, 49, 538-553
18. Hogan, C. J.; Barbaro, K. C.; Winkel, K.; *Ann. Emerg. Med.* **2004**, 4, 608-624.
19. Young, A. R.; Pincus, S. J.; *Toxicon.* **2001**, 39, 391-400.
20. Yigit, N.; Bayram, A.; Ulasoglu, D.; Danisman, T.; Corak O., L.; Sancak, Z.; *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* **2008**, 14, 178-187.
21. de Albuquerque, H. N.; Barbosa, A. R.; de Albuquerque, I. C. S.; de Menezes, I. R. *Revista de biologia e ciências da terra*, **2004**, 5.
22. Moreira, D. C.; *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
23. Pretela, F.; Gonçalves-de-Andrade, R. M.; Magnolia, F. C.; da Silva, M. E. R.; Ferreira Jr, J. M. C.; Van den Berg, C. W.; Tambourgi, D. V.; *Toxicon.* **2005**, 45, 449-458 .
24. Brazil, T. J.; Pinto-Leite, C. M.; Almeida-Silva, L. M.; Lira-da-Silva, R. M.; Brescovit, A. D. *Gaz. méd. Bahia* **2009**;79, 32-37.
25. Marques-da-Silva, E.; Fischer, M. L.; *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2005**, 38, 331-335.
26. Machado, E. O.; Álvares, E. S. S.; de Maria, M.; Kalapothakis, E. *Lundiana* **2005** 6 113-115.
27. Martins, R.; Knysak, I.; Bertani, R. *ZOOTAXA* **2002** 94, 1-6.
28. Peterson, M. E.; *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* **2006**, 21, 191-193.
29. Swanson, D. L.; Vetter, R. S. *Clinics in Dermatology* **2006**, 24, 213-221.
30. Fischer, M. L.; Vasconcellos-Neto, J.; dos Santos Neto, L. G.; *The Journal of Arachnology.* **2006**, 34, 485-488.
31. Appel, M. H.; Silveira, R. B.; Gemski, W.; Veiga, S. S.; *ISJ* **2005**, 2, 152-158.
32. Bonnet, M. S.; *British Homoeopathic Journal* **1996**, 85, 205-213.
33. Diekema, D. S.; Reuter, D. G.; *Clin. Ped. Emerg. Med.* **2001**, 2, 155-167.

34. Pauli, I.; Puka, J.; Gubert, I.; Minozzo, J. C.; *Toxicon*. **2006**, *48*, 123-137.
35. Vetter, R. S.; *The Journal of Arachnology*. **2008**, *36*, 150–163.
36. da Silva, P. H.; da Silveira, R. B.; Appel, M. H.; Mangili, O. C.; Gremski, W.; Veiga, S.S. *Toxicon*. **2004**, *44*, 693–709.
37. Bertoldi, I.; Erzinger, G. S.; *Revista Saúde e Ambiente/ Health and Environment Journal* **2004**, *6*, 58-66.
38. De Oliveira, K. C.; de Andrade, R. M. G.; Piazza, R. M. F.; Jr, J. M. C. F.; Van den Berg, C. W.; Tambourgi, D. V.; *Toxicon*. **2005**, *45*, 421-429.
39. Tambourgi, D. V.; Magnoli, F. C.; Van den Berg, C. W.; Morgan, B. P.; de Araujo, P. S.; Alvez, E. W.; Dias da Silva, W.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *251*, 366-373.
40. Santos, L. D.; Dias, N. B.; Pinto, J. R. A. S.; Palma, M. S.; *Protein Pept. Lett.* **2009**, *16*, 933- 943.
41. Barbaro, K. C.; Sousa, M. V.; Morhy, L.; Eickstedt, V. R. D.; Mota, I.; *J. Prot. Chem.* **1996**, *15*, 4.
42. Guilherme, P., Barbaro, K. C. *Toxicon*. **2001**, *29*, 1333-1342.
43. Binford G. J.; Wells, M. A. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *135*, 25–33.
44. Machado, L.F.; Laugesen, S.; Botelho, E.D.; Ricart, C.A.O.; Fontes, W.; Barbaro, K. C.; Roepstorff, P.; Sousa, M. V. *Proteomics* **2005**, *5*, 2167–2176.
45. Kalapothakis, E.; Chatzaki, M.; Gonçalves-Dornelas, H.; de Castro, C.S.; Silvestre, F.G.; Laborne, F.V.; de Moura, J.F.; Veiga, S.S.; Graniere, C.; Barbaro, K. C.; *Toxicon*. **2007**, *50*, 938–946.
46. Silvestre, F. G.; de Castro, C. S.; de Moura, J. F.; Giusta, M. S.; de Maria, M.; Álvares, É. S. S.; Lobato, F. C. C.; Assis, R. A.; Gonçalves, L. A.; Gubert, I.C.; Chávez-Olórtegui, C.; Kalapothakis, E.; *Toxicon*. **2005**, *46*, 927-936.
47. Veiga, S. S.; da Silveira, R. B.; Dreyfuss, J. L.; Haoacha, J.; Pereira, A. M.; Mangili, O. C.; Gremski, W. *Toxicon*. **2000**, *38*, 825-839.
48. Silveira, R. B.; dos Santos Filho, J. F.; Mangili, O. C.; Veigac, S. S.; Gramski, W.; Nader, H. B.; Von Dietrich, C. P.; *Toxicon*. **2002**, *40*, 815-822.
49. Feitosa, L.; Gremski, W.; Veiga, S. S.; Elias, M. C. Q. B.; Graner, E.; Mangili, O. C.; Brentani, R. R. *Toxicon*. **1998**, *36*, 1039-1051.
50. Trevisan-Silva, D.; Gremski, L. H.; Chaim, O. M.; da Silveira, R. B.; Meissner, G. O.; Mangili, O. C.; Bárbaro, K. C.; Gremski, W.; Veiga, S. S.; Senff-Ribeiro, A. *Biochimie* **2010**, *92*, 21-32.
51. da Silveira, R. B.; Chaim, O. M.; Mangili, O. C.; , Gremski, W.; Dietrich, C. P.; Nader, H. B.; Veiga, S. S. *Toxicon*. **2007**, *49*, 758–768.
52. *Toxicon* **47** (2006) 380–386 de Andrade, S. A.; Murakami, M. T.; Cavalcante, D. P.; Arni, R. K.; Tambourgi, D. V. *Toxicon.*, **2006**, *47*, 380-386.
53. Chaves-Moreira, D.; Chaim, O. M.; Sade, Y. B.; Paludo, K. S.; Gremski, L. H.; Donatti, L.; de Moura, J.; Mangili, O. C.; Gremski, W., da Silveira, R. B.; Senff-Ribeiro, A.; Veiga, S. S.; *J. of Cell. Biochem.* **2009**, *107*, 655–666.
54. Tambourgi, D. V.; Pedrosa, M. de F. F., van den Berg, C.; Gonçalves-de-Andrade, R. M.; Ferracini, M.; Paixão-Cavalcante, D.; Morgan, P.; Rushmere, N. K. *Mol. Immunol.* **2004**, *41*, 831–840.
55. da Silveira, R. B.; Pigozzo, R. B.; Chaim, O. M.; Appel, M. H.; Dreyfuss, J. L.; Toma, L.; Mangili, O. C.; Gremski, W.; Dietrich, C. P.; Nader, H. B.; Veiga, S. S. *Biochimie* **2006**, *88*, 1241–1253.
56. Ribeiro, R. O. S.; Chaim, O. M.; Silveira, R. B.; Gramski, L. H.; de Moura, L.; Chávez-Olórtegui, C.; Gramski, W.; Nader, H. B.; Veiga, S. S.; *Toxicon*. **2007**, *50*, 1162-1174.

57. Chaim, O. M.; Bacila Sade, Y.; da Silveira, R. B.; Toma, L.; Kalapothakis, E.; Chávez-Olórtegui, C.; Mangili, O. C.; Gremski, W.; von Dietrich, C. P.; Nader, H. B.; Veiga, S. S. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *211*, 64 – 77.
58. Christoff, A. O.; de Oliveira, A.; Chaim, O. M.; Lugarini, D.; Pereira, A. L. B.; Paludo, K. S.; Telles, J. E. Q.; Bracht, A.; Veiga, S. S.; Acco, A.; *Toxicon.* **2008**, *52*, 695-704.
59. Felicori, L.; Araujo, S. C.; Machado de Ávila, R. A.; Sanchez, E.F.; Granier, C.; Kalapothakis, E.; Chávez-Olórtegui, C. *Toxicon.* **2006**, *48*, 509–519.
60. Kalapothakis, E.; Araujo, S. C.; de Castro, C. S.; Mendes, T. M.; Gomez, M. V.; Mangili, O. C.; Gubertb, I. C.; Chávez-Olórtegui, C. *Toxicon.* **2002**, *40*, 1691–1699.
61. Paludo, K. S.; Biscaia, S. M. P.; Chaim, O. M.; Otuki, M. F.; Naliwaiko, K.; Dombrowski, P. A.; Franco, C. R. C.; Veiga, S. S. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *149*, 323–333.
62. Felicori, L.; Fernandes, P. B.; Giusta, M. S.; Duarte, C. G.; Kalapothakis, E.; Nguyen, C.; Molina, F.; Granier, C.; Chávez-Olórtegui, C. *Vaccine.* **2009**, *27*, 4201-4208.
63. Dias-Lopes, C.; Guimarães, G.; Felicori, L.; Fernandes, P.; Emery, L.; Kalapothakis, E.; Nguyen, C.; Molina, F.; Granier, C.; Chávez-Olórtegui, C. *Toxicon.* **2010**, *55*, 481–487.
64. Pedrosa, M. F. F.; Azevedo, I. L. M. J.; Gonçalves-de-Andrade, R. M.; Van den Berg, C. W.; Ramos, C. R. R.; Ho, P. L.; Tambourgi, D. V.. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *298*, 638-645.
65. Ferrara, G. I. S.; Fernandes-Pedrosa, M. F.; Junqueira-de Azevedo, I. L. M.; Gonçalves-de-Andrade, R. M.; Portaro, F. C. V.; Manzoni-de-Almeida, D.; Murakami, M. T.; Arni, R. K.; van der Berg, C. W.; Ho, P. L.; Tambourgi, D. V.; *Toxicon.* **2009**, *53*, 743-753.
66. Fernandes-Pedrosa, M. de F.; Junqueira-de-Azevedo, I. de L.M.; Gonçalves-de-Andrade, R. M.; Kobashi, L. S.; Almeida, D. D.; Ho, P. L.; Tambourgi, D. V. *BMC Genomics* **2008**, *9*, 279.
67. Castro, C. S.; Silvestre F. G.; Araújo S. C.; Yazbeck G. M.; Mangili O. C.; Cruz I.; Chávez-Olórtegui, C.; Kalapothasis, E.; *Toxicon.* **2004**, *44*, 273-280.
68. De Oliveira, K. C.; Andrade, R. M. G.; Giusti, A. L.; da Silva, W. D.; Tambourgi, D. V.; *Toxicon.* **1999**, *37*, 217-221.
69. de Andrade, R. M. G.; Lourenço, W.; Tambourgi, D. V.; *The Journal of Aracnology.* **2000**, *28*, 245-247.
70. Fischer, M. L.; Vasconcellos, Neto, J. *J. Med. Entomol.* , **2005**, *42*, 756-765.
71. Fischer, M. L.; Vasconcellos-Neto, J. *Journal of Thermal Biology* **2003**, *28*, 563- 570.
72. Editorial . *Toxicon.* **2006**, *47*, 609–613.
73. Favreau, P.; Menin, L.; Michalet, S.; Perret, F.; Cheneval, O.; Stöcklin, M.; Bulet, P.; Stöcklin, R.; *Toxicon.* **2006**, *47*, 676 – 687.
74. Cunha, R. B.; *Tese de doutorado*, Universidade de Brasília, Brasília, 2003.
75. Escoubas, P.; Rash, L.; *Toxicon.* **2004**, *43*, 555 – 574.
76. Fields, G.B.; *Peptide Characterization and Application Protocols, Methods in Molecular Biology*, 386, Human Impress. : New Jersey, 2007.
77. Escoubas, P.; Quinton, L.; Nicholson, G. M.; *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 279 – 295.
78. Calvete, J. J.; Sanz, L.; Angulo, Y.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J. M.; *FEBS Letters.* **2009**, *583*, 1736 – 1743.
79. Pimenta, A. M. C.; Lima, M., E.; *J. Peptide Sci.* **2005**, *11*, 670- 676.
80. Bradford, M. M. *Anal. Chem.* **1976**, *72*, 248-254.
81. Laugesen, S.; Roepstorff, P.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 992-1002.
82. Cesar, L. M. M.; Mendes, M. A.; Tormena, C. F.; Marques, M. R.; de Souza, B. M.; Saidemberg, D. M.; Bittencourt, J. C.; Palma, M. S. *Toxicon.* **2005**, *46*, 786–796.
83. Palma, M. S.; Itagaki, Y.; Fujita, T.; Naoki, H.; Nakajima, T. *Toxicon.* **1998**, *36*, 485-493.

84. R. M. Silverstein, G. C. Bassler e T. C. Morrill. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 5ª Ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro.
85. Schroeder, F. C.; Taggi, A. E.; Gronquist M.; Malik, R. U.; Grant, J. B.; Eisner, T.; Meinwald, J.; *PNAS*. **2008**, *105*, 14283–14287.
86. Grishin, E. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264*, 276-280.
87. Corzo, G.; Escoubas, P. *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 2409-2426.
88. Nascimento, D. G.; Rates, B.; Santos, D. M.; Verano-Braga, T.; Barbosa-Silva, A.; Dutra, A. A. A.; Biondi, I.; Martin-Eauclaire, M. F.; Lima, M. L.; Pimenta, A. M. C.; *Toxicon*. **2006**, *47*, 628–639.
89. Escoubas, P.; Sollo, B.; King, G. F. *Toxicon*. **2006**, *47*, 650–663.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)