



Avaliação da atividade citotóxica das frações CA e CB do veneno, variedade branca, da serpente *Crotalus durissus ruruima*¹

Vanessa Tavares Gomes², Patrícia Danielle Oliveira de Almeida³, Consuelo Latorre Fortes Dias⁴, Maria Cristina Dos Santos⁵, Ilia Gilmara Carvalho dos Santos⁶

Resumo

Os venenos animais constituem uma das mais ricas fontes de substâncias *biologicamente* ativas encontradas na natureza. Estudos farmacológicos e bioquímicos, realizados nas últimas décadas, têm mostrado a riqueza de proteínas com atividade enzimática, toxinas, peptídeos, aminas bioativas, dentre outros compostos, encontrados nos venenos de serpentes com grande diversidade de suas ações biológicas. Os venenos de serpentes *Crotalus durissus* ssp., encontradas no Brasil, são compostos por aproximadamente 90% de proteínas e peptídeos, apresentando como principais toxinas, a crotoxina, convulxina, giroxina (ou trombina-similes) e, em alguns exemplares, a crotamina. A crotoxina é a principal neurotoxina e miotoxina do veneno *Crotalus durissus* ssp. formada pela associação iônica de duas subunidades, uma básica, a fosfolipase A₂ (CB, Componente B ou Crotoxina B) e a outra ácida, a crotapotina (CA, Componente A ou Crotoxina A). As PLA₂ exibem uma grande variabilidade de efeitos farmacológicos por mecanismos que podem ser independentes ou dependentes de sua atividade enzimática, como, miotoxicidade, ação anticoagulante, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, antibacteriana e antitumoral. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi isolar e verificar o potencial citotóxico das frações CA e CB do veneno individual variedade branca de *Crotalus durissus ruruima*. A cromatografia de exclusão molecular do veneno branco Cdr110 resultou em 4 picos com tempos de retenção diferentes. A cromatografia de fase reversa resultou em dois picos principais correspondentes a crotapotina e fosfolipase A₂. A avaliação da atividade citotóxica de CA e CB demonstrou que as duas frações são citotóxicas para as linhagens de HCT-116 e MCR-5 sendo que CB apresentou maior toxicidade frente a essas linhagens celulares testadas.

Palavras-chave: cascavel, veneno branco, citotoxicidade

Evaluation of the cytotoxic activity of the CA and CB fractions of the white variety venom of the *Crotalus durissus ruruima* snake.

Animal venoms are one of the richest sources of biologically active substances found in nature. Pharmacological and biochemical studies carried out in recent decades have shown the wealth of proteins with enzymatic activity, toxins, peptides and biologically active amines, among other compounds, found in snake venoms and their many different mechanisms of action. The venoms of *Crotalus durissus* ssp., snakes found in Brazil, consist mainly of proteins and peptides, which account for approximately 90% of the venom, and the main toxins are crotoxin, convulxin, gyroxin (a thrombin-like enzyme)

¹ Trabalho PIBIC/UFAM

² Bolsista PIBIC, aluna ICB, UFAM, tavaresvanessa1@hotmail.com

³ Laboratório de atividade Biológica, FCF/UFAM, Manaus, AM, Brasil, pattdanielle@hotmail.com

⁴ Serviço de Enzimologia, Fundação Ezequiel Dias, BH, MG, Brasil, consuelolatorre9@gmail.com

⁵ Lab Imunoquímica, Depto Parasitologia, ICB/UFAM, Manaus, Brasil, mcsantos@ufam.edu.br

⁶ Lab Imunoquímica, Depto Parasitologia, ICB/UFAM, Manaus, Brasil, gilmara-carvalho@ufam.edu.br



and, in some specimens, crotamine. Crotoxin, the main neurotoxin and myotoxin in the venom of *Crotalus durissus* ssp., consists of two non-covalently associated subunits: one a base, phospholipase A₂ (component B or crotoxin B), and the other an acid, crotoapotin (component A or crotoxin A). PLA₂s exhibit a wide variety of chemical effects via mechanisms that can be independent of or dependent on their enzymatic activity, such as myotoxicity, anticoagulant activity, neurotoxicity, cardiotoxicity and antibacterial and antitumor activity. The aim of this study was to isolate the CA and CB fractions of individual white venom from *Crotalus durissus ruruima* and determine their cytotoxic potential. Molecular exclusion chromatography of white Cdr110 venom produced four peaks with different retention times. Reverse phase chromatography produced two main peaks corresponding to crotoapotin and phospholipase A₂. Assessment of the cytotoxic activity of CA and CB showed that the two fractions are toxic for the HCT-116 and MCR-5 cell lines and that CB had the greater toxicity for the cell lines tested.

Keywords: rattlesnake, white venom, cytotoxicity

1. Introdução

Veneno crotálico

As principais serpentes de importância médica da fauna brasileira pertencem às famílias Elapidae (*Micrurus* sp. e *Leptomicrurus* sp.) e Viperidae (*Bothrops* sp., *Bothrocophias* sp., *Porthidium* sp., *Crotalus* sp. e *Lachesis* sp.) (BRASIL, 2020). No Brasil, o gênero *Crotalus* é amplamente distribuído, representado por uma única espécie a *C. durissus* e sete subespécies: *C. d. dryinas* (Amapá), *C. d. terrificus* (regiões Sul e Sudeste), *C. d. collilineatus* (Minas Gerais e Goiás), *C. d. cascavella* (região de caatinga nordestina), *C. d. trigonicus* (Roraima), *C. d. ruruima* (Roraima) e *C. d. marajoensis* (ilha do Marajó – Pará) (JORGE; RIBEIRO, 1992; PINHO; PEREIRA, 2001; UETZ et al., 2020).

As serpentes *Crotalus durissus* ssp. são conhecidas popularmente como cascavel, cascavel quatro-ventas, boicininga, maracambóia, maracá, dentre outras denominações. Habitam campos abertos, áreas secas, arenosas, pedregosas e, raramente, a faixa litorânea. Atacam somente quando se sentem ameaçadas e, quando excitadas, denunciam sua presença pelo ruído característico do guizo ou chocalho, presente em sua cauda (PINHO; PEREIRA, 2001). De 2015 a 2019 foram notificados 268.445 mil casos de acidentes ofídicos, no Brasil, sendo que 2.652 foram causados por

serpentes do gênero *Crotalus* sp. (BRASIL, 2020). Esses acidentes são os que apresentam maior mortalidade, sendo quatro vezes superior à mortalidade causada por serpentes do gênero *Bothrops* sp. (MATOS; IGNOTTI., 2020), pois frequentemente, evoluem para insuficiência renal aguda (TOKARNIA et al., 2014).

O veneno é sintetizado em glândulas especializadas localizadas próximas ao seu aparelho inoculador. Quando inoculado, em sua vítima, facilita a captura, imobilização e digestão da presa, sendo essencial para a alimentação e defesa da serpente (CUNHA; MARTINS, 2012).

As proteínas e peptídeos de pequena massa molecular representam aproximadamente 90% do veneno total seco (BIEBER, 1979). A peçonha das serpentes das subespécies de *Crotalus durissus* é composta por uma mistura de moléculas de natureza proteica com ou sem atividade catalítica, como fosfolipases A₂, serinoproteases, hialuronidases, L-aminoácido oxidases (LAAO), peptídeos, compostos orgânicos de baixo peso molecular como carboidratos, serotonina; íons inorgânicos como o cálcio, magnésio, cobre, ferro, bem como inibidores enzimáticos (DA SILVA et al., 2016; TASOULIS; ISBISTER, 2017). As fosfolipases A₂ (PLA₂), em particular, catalisam a hidrólise de glicerofosfolipídeos na posição sn-2, liberando ácidos graxos livres, lisofosfolípidos e



ácido araquidônico precursor de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, (ARNI; WARD, 1996). Devido a tais mediadores, as PLA₂ têm o potencial de interferir na resposta inflamatória do organismo (DIAS, 2015; MESGARZADH et al., 2017).

Estudos mostram que existem variações tanto na composição química quanto nas atividades biológicas dos venenos. Essas variações podem ocorrer interfamílias, intergêneros, interespecies e subespécies, e também dentro de uma única espécie (CHIPPAUX et al., 1991). A variabilidade intraespécie pode ser ontogenética (ANTUNES et al., 2010; BRAGA et al., 2020), sexual (MENEZES, 2006; BRAGA et al., 2020) ou devido à localização geográfica (ALAPE-GIRO et al., 2008). A dieta dos indivíduos também pode influenciar na constituição do veneno das serpentes (DALTRY et al., 1996). Os estudos destas variações fornecem dados para auxiliar no tratamento de acidentes ofídicos e no desenvolvimento de soros antiofídicos (CHIPPAUX et al., 1991; DA COSTA et al., 2020).

Em 2005, Dos-Santos e colaboradores analisaram, isoladamente, os venenos de seis exemplares de *Crotalus durissus ruruima* capturados na Fazenda Monte Cristo (60°46'18"W, 2°52'20"N), no município de Boa Vista, (os mesmos utilizados por DOS SANTOS et al., 1993), quanto às suas atividades biológicas e constituintes proteicos, e observaram que os venenos da variedade branca apresentaram maior concentração de crotoxina (CTX) do que os da variedade amarela, além de variações no perfil proteico, nas atividades biológicas e nas intensidades de suas ações induzidas. Esses mesmos venenos, denominados Crd 82, Cdr 110 e Cdr173 (venenos brancos), Cdr 68, Cdr69 e Cdr81 (venenos amarelos) (DOS-SANTOS et al., 1993), tem sido objeto de estudos funcionais e estruturais detalhados. Calvete e colaboradores (2010), demonstraram que 82,7% do veneno Cdr110 era composto por CTX e, dentre os venenos estudados, foi o que apresentou maior

concentração desta toxina. Neste mesmo estudo, a concentração de CTX determinada no veneno de *C. d. terrificus* foi de 59,5%.

O efeito neurotóxico da CTX envolve a inibição da liberação de acetilcolina e bloqueio da transmissão na junção neuromuscular, causando insuficiência respiratória, paralisia dos músculos esqueléticos e diminuição da motricidade ocular. Além da neurotoxicidade, diversos estudos apontam para atividades imunomoduladora, anti-inflamatória, antitumoral e antimicrobiana (LIMA, 2015; CAVALCANTE et al., 2017). A CTX tem sido estudada por sua aplicação eficaz em tratamentos de tumores malignos, *in vivo* ou *in vitro*, isoladamente ou em combinação com medicamentos antitumorais (YE et al., 2011; HAN et al., 2014; SANTOS, 2017; MULLER et al., 2018).

Potencial terapêutico

As toxinas de veneno representam um reservatório enorme e pouco explorado de componentes bioativos que podem ser usados na produção de medicamentos devido às inúmeras atividades biológicas que possuem (CALVETE et al., 2009; OLIVEIRA, 2019). Dessa forma, o uso de toxinas com potencial terapêutico tem aumentado nas últimas décadas e compostos isolados de peçonhas e venenos animais vem sendo averiguados. Desta forma, trabalhos relatando a ação de toxinas ofídicas com potencial terapêutico têm crescido significativamente e diversas dessas proteínas estão sendo testadas, demonstrando melhoria em algumas patologias, como hipertensão, doenças autoimunes, disfunção erétil, diabetes e câncer (NATESH et al., 2004; REBELLO H. et al., 2016).

A diversidade biológica de venenos de serpentes, têm resultado em avaliações para detecção de possíveis atividades antimicrobiana (EL CHAMY MALUF et al., 2016; SULCA et al., 2017; CHARVAT et al., 2018), antitumoral (GIMENES et al., 2017; COSTA et al., 1998; SANTOS et al., 2018), citotóxica



(MELÉNDEZ; MARTÍNEZ et al., 2017) e no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento do câncer (SAAVEDRA et al., 2020) a partir dos venenos totais ou de seus componentes isolados e caracterizados. Além disso, permitem o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos em processos fisiológicos de atuação da peçonha, portanto um melhoramento nas terapias, para tratar pacientes acidentados por serpentes além do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos aplicados a medicamentos (MCCLEARY; KINI, 2013; VIEIRA, 2014).

Em estudo prévio de caracterização individual, realizado com os venenos brancos de *C. d. ruruima* (Cdr110 e Cdr173) foi demonstrado que os referidos venenos possuem atividade PLA₂ na seguinte ordem de atividade 173>110. Em relação à mitotoxicidade o Cdr110 foi o mais ativo (DOS SANTOS et al., 2005). Posteriormente, SANTOS et al. (2018) verificaram a variabilidade intraespecífica nos venenos brancos (Cdr110) e amarelos (Cdr68 e Cdr69) de *C. d. ruruima* em relação ao seu potencial antitumoral e antibacteriano. Os venenos amarelos apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* e foram citotóxicos para as linhagens tumorais SK-Mel-103 (melanoma), MCF7 (adenocarcinoma de mama), HCT-116 (carcinoma colorretal) enquanto os venenos brancos não exibiram atividade.

Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade citotóxica do Cdr 110 variedade branca, porém não na forma bruta, mas sim com a PLA₂ (Componente B e ou CTX B) e a crotapotina (Componente A ou CTX A) isoladas, sobre linhagens de células tumorais, para comparar com a atividade do veneno total.

2. Metodologia

2.1. Obtenção dos venenos

O veneno individual de *Crotalus durissus ruruima* (Cdr110) foi obtido de uma serpente adulta capturada na Fazenda Monte Cristo

(60°46'18"W, 2°52'20"N), no município de Boa Vista e mantida no Núcleo de Animais Peçonhentos, da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas. Para a extração do veneno o animal foi anestesiado com vapor de gás carbônico. O veneno foi coletado, filtrado (Millipore 0,45µm), liofilizado e estocado a -20 °C.

2.2. Cromatografia de exclusão molecular

O veneno Cdr110 foi dissolvido em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,8, até dissolução máxima em banho de gelo, seguido pelo processo de clarificação por centrifugação (13000 rpm por 20 min). O sobrenadante obtido foi coletado e aplicado em coluna de exclusão molecular Superdex 200 10x300 GL (GE HealthCare) acoplada em sistema HPLC (Akta Purifier 10, GE HealthCare), previamente equilibrada com o mesmo tampão utilizado para a diluição do veneno. Cada aplicação continha aproximadamente 1,3 mg de veneno em 200 µL de tampão e o número de corridas foi de acordo com a disponibilidade do veneno. As frações foram obtidas em fluxo constante de 0,5 ml/min e coletadas em intervalos constantes de 1 min para cada tubo. O monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a 280 nm e as frações coletadas foram liofilizadas e armazenadas a -20°C para posterior utilização.

2.3. Cromatografia de fase reversa

O pico de interesse da exclusão molecular foi submetido à cromatografia de fase reversa, usando coluna analítica Small Pore Vydac C-18 201SP54 (Grace Vydac, CA, USA). O pico foi reconstituído em 2 mL de solução aquosa de TFA 0,1% em água e a coluna foi equilibrada, previamente, com o mesmo solvente. A eluição foi feita com gradiente linear de 20% a 100% de TFA 0,1% em acetonitrila, com 48 volumes de



coluna. O monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a 280 nm e as frações obtidas foram liofilizadas e armazenadas a -20°C . O software utilizado para as análises dos cromatogramas foi o UNICORN (GE HealthCare).

2.4. Atividade Fosfolipásica

A atividade fosfolipase A_2 (PLA₂) foi mensurada pela ação hidrolítica sobre gema de ovo incorporada a ágar, na presença de íons cálcio, de acordo com Habermann; Hardt, 1972. A atividade foi expressa pelo diâmetro do halo de hidrólise, em milímetros.

2.5. Avaliação da citotoxicidade pelo método Alamar Blue.

A avaliação da atividade citotóxica do veneno foi feita na linhagem tumoral de carcinoma colorretal humano (HCT-116) e na linhagem não tumoral de fibroblastos humanos (MRC-5).

As linhagens tumorais foram compradas do Banco de Células do Rio de Janeiro e tiveram as condições de cultivo adaptadas para o Laboratório de Atividade Biológica II (BIOPHAR II), da

Universidade Federal do Amazonas (UFAM). As células foram cultivadas em meio DMEM (Gibco®, Life Technologies, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino

(FBS) (Gibco®, Life Technologies, EUA), 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen) e mantidas a 37°C em estufa a 5% de CO_2 .

O ensaio de Alamar Blue foi realizado segundo metodologia descrita por AHMED et al. (1994). As células foram plaqueadas na concentração de 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços. Como controle positivo de morte, foi usada a Doxorubicina (5 µg/mL) (Sigma) e como controle negativo foi usado o meio de cultura. Após 72 horas de tratamento, 10 µL da solução de Alamar Blue® (Sigma), 0,4% foi adicionado em cada poço da placa e após 2h de exposição, a fluorescência foi medida em leitor de microplaca (DTX800 Beckman e Coulter).

3. Resultados e Discussão

Isolamento das frações do veneno individual, variedade branca, de *Crotalus durissus ruruima*.

3.1. Cromatografia de exclusão molecular

O perfil cromatográfico do veneno branco Cdr110 fracionado por cromatografia de exclusão molecular está representado na Figura 1. Observa-se que este veneno apresenta quatro picos principais com diferentes tempos de retenção.

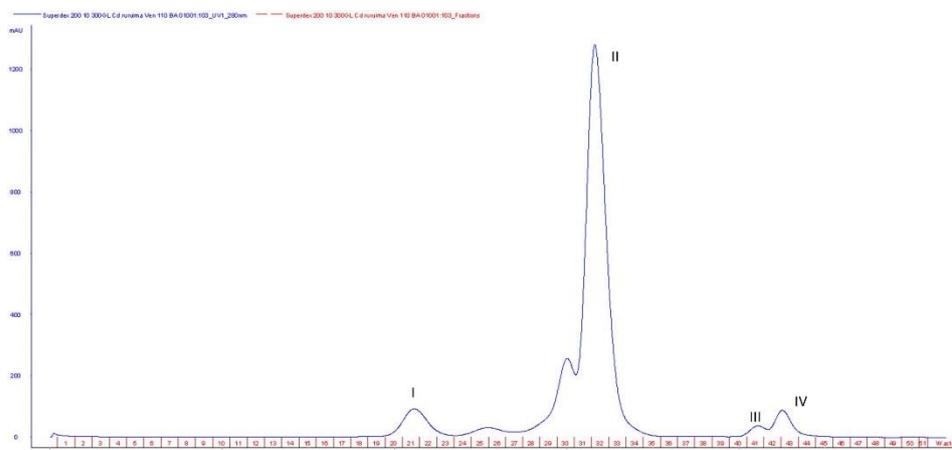


Figura 1. Perfil cromatográfico em exclusão molecular (Superdex 200 10X300 GL) do veneno branco Cdr110. Condições: Tampão Bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,8, fluxo 0.5 ml/min, coleta de 0.5 ml/fração. Amostra aplicada: cerca de 1,3 mg (peso seco) em 200 µl.

Tabela 1 - Estimativa de massa molecular (MM) média (em kDa) das proteínas nos picos da cromatografia de exclusão molecular (Superdex 200) do veneno branco de *C. d. ruruima* Cdr110.

Veneno Cdr 110	MM (kDa)
Pico I	103,6
Pico II	22,9
Pico III	3,7
Pico IV	2,0

As massas moleculares para as proteínas contidas nos picos da cromatografia de

exclusão molecular de Cdr110 foram estimadas pelo volume médio de eluição no cromatograma (Tabela 1).

3.2. Cromatografia de Fase Reversa

O pico II (PII) da etapa anterior foi aplicado em coluna analítica de fase reversa (Fig. 2). Os picos de proteína foram identificados de acordo com a ordem de eluição no cromatograma (FRP1 e FRP2). FRP1 corresponde a crotapotina ou componente A e FRP2 corresponde a fosfolipase A₂ ou componente B.

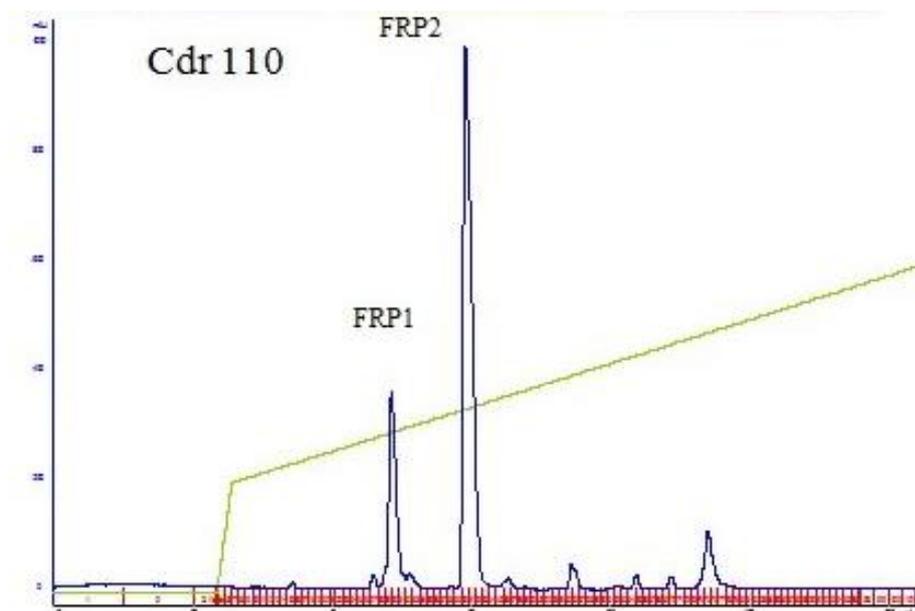


Figura 2. Perfil cromatográfico em fase reversa dos picos II (PII) obtidos por exclusão molecular no fracionamento do veneno branco Cdr110. As ordenadas representam as leituras em mAU280 (em azul) ou percentual do gradiente de acetonitrila (em verde). A abcissa mostra o volume de eluição (em mL).

Neste trabalho utilizou-se duas etapas cromatográficas para isolamento de frações do veneno Cdr 110. Primeiramente foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular, também conhecida como filtração em gel, que separa biomoléculas com base nas diferenças em seu tamanho molecular (COLLINS, 2011).

As cromatografias de exclusão molecular do veneno Cdr110 (branco) resultaram em 4 picos com tempos de retenção

diferentes. O pico II com massa estimada em 22,9 kDa possivelmente corresponde a crotaxina (CTX) que é a principal neurotoxina e miotoxina do veneno crotálico e tem aproximadamente 20 kDa (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971).

A cromatografia de fase reversa, do PII, resultou em dois picos o FRP1 que corresponde a crotapotina ou componente A e FRP2 que corresponde a fosfolipase A₂ ou componente B. Em um estudo, a análise

das sequências de aminoácidos aminoterminais de PLA₂ de *C. d. ruruima* foram semelhantes às de *C. d. terrificus* enquanto as PLA₂ de *C. d. cumanensis* apresentaram maior homologia com as PLA₂ de *C. d. cascavella* e de *C. d. collilineatus* (FONSECA, 2011).

PONCE-SOTO et al. (2007) utilizaram um protocolo de purificação de PLA₂ de veneno branco de *C. d. ruruima* usando exclusivamente a fase reversa e obtiveram dezoito frações, sendo que duas apresentaram atividade PLA₂. Posteriormente DIZ FILHO et al. (2009) fizeram uso de cromatografia de exclusão molecular seguida de fase reversa, para isolamento e purificação

de duas isoformas de PLA₂ a partir do veneno *C. d. ruruima* (variedade branca). O mesmo protocolo de isolamento foi usado por FONSECA et al. (2010), demonstrando que estas etapas cromatográficas são eficientes no isolamento de PLA₂ de venenos crotálicos.

3.3. Atividade Fosfolipásica

Todas as frações de Cdr110 foram submetidas ao teste de atividade fosfolipásica (Fig. 3). Observa-se que o pico de atividade fosfolipásica acompanha o pico cromatográfico correspondente a fração com massa estimada em 22,9 KDa, que possivelmente corresponde a CTX.

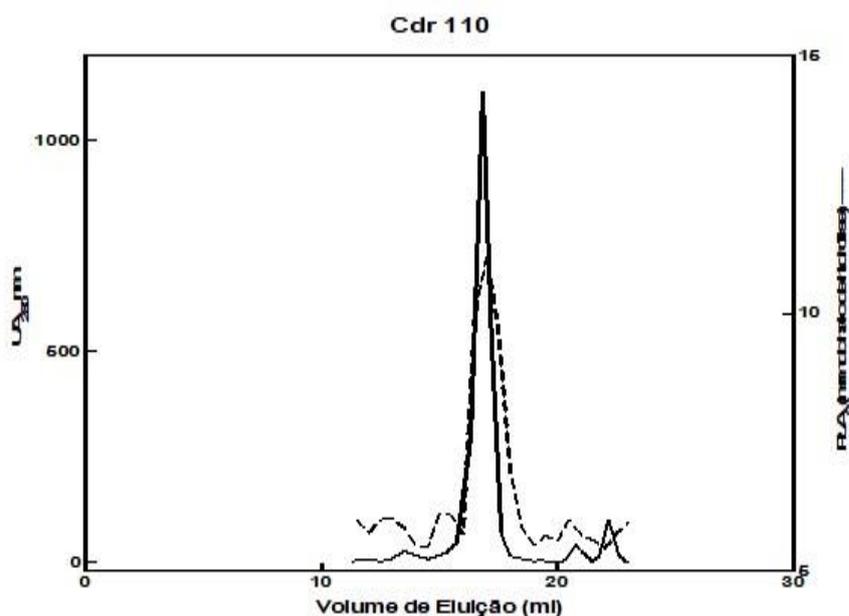


Figura 3. Perfil cromatográfico (linha contínua) do veneno Cdr110 em gel filtração (Superdex 200 10X300 GL). Tampão Formiato de amônio 100mM pH 6.5, fluxo 0.5 ml/min, coleta de 0.5ml/fração. Amostra aplicada: cerca de 1.3mg (peso seco) em 200 µL e perfil de atividade de PLA₂ (linha pontilhada).

O veneno bruto de Cdr 110 de *C. d. ruruima* tem maior concentração de CTX (82,7%) quando comparado ao veneno de *C. d. terrificus* (59,5%) (CALVETE et al., 2010). Entretanto, a CTX de *C. d. cumanensis* induziu atividades neurotóxica e miotóxica direta comparativamente mais altas do que a CTX de veneno branco de *C. d. ruruima*, nas mesmas concentrações (CA-

VALCANTE et al., 2015). Não é possível afirmar qual dos venenos é mais tóxico, pois existem as variações individuais, entre venenos secretados por serpentes de uma espécie ou subespécie.

Estudo realizado por JOHNSON et al., (1987) com cascáveis (subespécie) da costa sul do Oceano Pacífico demonstrou que esta serpente produzia veneno branco na glândula à direita enquanto a glândula



esquerda produzia veneno amarelo, ambos com diferenças significativas tanto na composição quanto nas atividades biológicas. Ao estudar *C. d. ruruima*, DOS SANTOS et al., (1993) observaram que esta cascavel também secretava duas variedades de venenos: branco e amarelo. Além de diferenças na composição, o veneno branco foi mais letal em modelo murino e desencadeou atividades coagulantes, miotóxicas, formadoras de edema e miolíticas. Já o amarelo apresentou, além das atividades desencadeadas pelos venenos brancos, hemorragia e necrose e, em um teste usando caseína como substrato, exibiu atividade proteolítica. Mais de uma década depois, os mesmos venenos individuais foram submetidos à cromatografia de fase reversa, e mostraram a presença de componentes com tempos de retenção muito próximos aos observados para as subunidades da CTX isolada de *C. d. terrificus* (crotapotina e fosfolipase A₂). Para Cdr110, o pico cromatográfico correspondente à PLA₂, mostrou-se simétrico, sugerindo ausência de isoformas importantes. O mesmo foi observado para Cdr68 e Cdr 173. Em análise semelhante dos venenos Cdr82 e Cdr69 foi observado o desdobramento do pico de fosfolipase A₂, sugerindo a presença de isoformas (manuscrito em preparação).

Em relação a variabilidade entre os venenos de subespécies, estudos proteômicos foram realizados por Boldrini-França e colaboradores (2009), em que compararam a composição das peçonhas da *C. d. cascavella* e da *C. d. collilineatus*. As diferenças observadas nas peçonhas se atribuíram a abundância de PLA₂ miotóxica, no qual em *C. d. collilineatus* conferiu-se 4,6% do total de proteínas, e 18,1% na *C. d. cascavella*, e à presença de crotamina apenas nas amostras de *C. d. collilineatus*, representando 20,8% do total de proteínas (BOLDRINI FRANÇA et al, 2009).

DOS SANTOS e colaboradores (2005) avaliaram as peçonhas de diferentes indivíduos de *C. d. ruruima*, oriundos da mesma área geográfica (estado brasileiro de Roraima). Foram observadas diferenças tanto na coloração como nas atividades biológicas, da variedade branca dos venenos que apresentaram maior concentração de CTX comparado aos da variedade amarela, além de ausência de crotamina em todas as peçonhas analisadas. No entanto, a Crotamina IL-19 foi isolada e sequenciada do veneno variedade amarela, extraído de uma serpente *C. d. ruruima* coletada em Vila de Pacaraima, Roraima, Brasil (DOS-SANTOS et al., 1993).

As diferenças no ambiente ecológico das serpentes, pode ser um fator que influencia essas variações encontradas entre os venenos da mesma subespécie, propiciando variação no conteúdo proteico. Quanto a variabilidade das CTXs, podem ser explicadas com base na existência de diferentes isoformas de Crotapotina e Crotoxina B (SOUZA et al., 2020). Tais estudos confirmam a variabilidade intrapopulacional em *C. d. ruruima*, que pode esclarecer a diversidade de sintomas observados em pacientes picados por essa subespécie (DOS SANTOS et al, 2005). Essas pesquisas, mostram a importância de corroborar a variação entre os venenos de serpentes de uma mesma subespécie, além de fornecer dados que auxiliam no tratamento de acidentes ofídicos, visando a produção de soros antiofídicos que neutralizem o máximo de substâncias tóxicas da peçonha de uma determinada serpente.

3.4. Avaliação da citotoxicidade pelo método Alamar Blue.

Os dois picos da fase reversa (FRP) de Cdr110 foram submetidos a ensaio de citotoxicidade em linhagens de células HCT-116 e MRC-5 em concentração única de 20 µg/mL. (Fig. 4). Os resultados demons-

tram a porcentagem de células que permaneceram viáveis após tratamento com as frações.

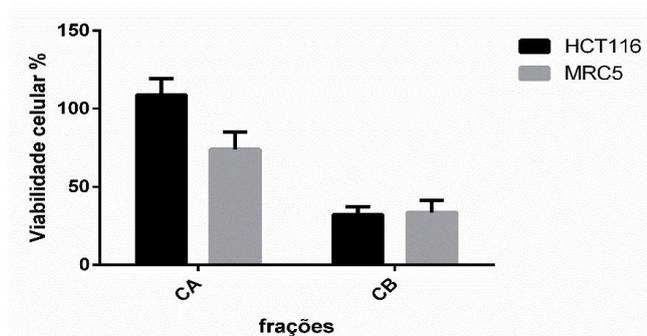


Figura 4. Ensaio de citotoxicidade em células de fibroblasto humano linhagem MRC-5 e carcinoma colorretal linhagem HCT116 realizado com as frações CA e CB de Cdr110. CB foi mais citotóxica que CA ($p < 0,0001$).

O veneno Cdr110 total foi testado para as linhagens celulares HCT116 e MRC5 nas concentrações de 100 a 1.56 $\mu\text{g/mL}$ e não apresentou atividade citotóxica (SANTOS et al., 2018). Neste trabalho foram testadas as frações CA e CB de Cdr110. CA foi mais citotóxica para MRC5 do que para HCT116 e em relação a CB não houve diferença estatística entre a citotoxicidade para HCT116 e MRC5.

Quando comparamos as duas frações, a fração CB fosfolipásica foi mais citotóxica do que a CA

(crotapotina) ($p < 0,0001$), apresentando médias de viabilidade celular de 32,18 e 33,52 para HCT-116 e MRC-5 respectivamente. Esses resultados demonstram a importância de se estudar não só as atividades em venenos brutos, mas também de suas frações isoladas.

Alguns dos efeitos citotóxicos e antitumorais induzidos por venenos de serpentes são atribuídos as PLA₂. Segundo CORIN et al. (1993) a ação citotóxica da CTX em células de eritroleucemia murina é mediada pela PLA₂. A PLA₂ de *Naja naja naja* mostrou atividade antitumoral contra tumor de Ehrlich (RUDRAMMAJI; GOWDA, 1998), en-

quanto a PLA₂ de *Bothrops asper* foi citotóxica para mioblastos L6 de ratos (BULTRÓN et al., 1993).

O potencial antitumoral das PLA₂ é tão promissor que foi desenvolvido um agente antineoplásico, o VRCTC-310, composto por CTX de *Crotalus durissus terrificus* e a cardiotoxina de *Naja naja atra*. Esta combinação foi seletiva para certas linhagens tumorais, além de que, a cardiotoxina potencializou o efeito citotóxico da CTX e diminui o seu efeito neurotóxico (NEWMAN et al., 1993). COSTA et al. (1998) reportam a experiência clínica com VRCTC-310 em dois pacientes, um com câncer avançado, com a pele gravemente comprometida, cujo tratamento levou ao desaparecimento de células escamosas da pele, e uma paciente com câncer de mama, cujo tratamento levou a uma redução de mais de 80% do tumor. Os níveis séricos de IL1-a e TNF-a não foram alterados em pacientes que fizeram uso do VRCTC-310, porém houve um aumento dose-dependente na citocina anti-inflamatória IL-10 o que poderia explicar a extensão relativamente limitada da inflamação produzida após a injeção do medicamento (COSTA et al., 2001).

Em um estudo realizado em 2018, Muller e colaboradores isolaram a CTX de *C. d. terrificus* e demonstraram efeito citotóxico em diferentes linhagens de células tumorais. Esse estudo revelou a atividade citotóxica e potencial pró-apoptótico da toxina, contribuindo para o conhecimento das propriedades da CTX e para seu possível uso em pesquisas sobre o câncer, principalmente em linhas celulares de glioma e câncer de pâncreas.

Outro estudo de relevância, constatou que a variedade amarela do veneno de *C. d. ruruima* apresentou atividade citotóxica em linhagens de tumores de melanoma, adenocarcinoma de mama e carcinoma colorretal (SANTOS et al., 2018). CTX também pode induzir a morte celular pela ativação de mecanismos de autofagia, demonstrados em células tumorais da



mama (YAN ET AL., 2007). Além disso, a capacidade do CTX de causar imunidade citotóxica e antitumoral de memória em camundongos foram determinados em linfoma, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas do pulmão humano e linhas celulares de câncer de esôfago (FERGUSON, DUNCAN, 2009; WANG et.al., 2012).

4. Conclusão

Neste trabalho, foi possível evidenciar a importância do estudo de atividades biológicas das frações isoladas, uma vez que o veneno total não apresentou atividade citotóxica frente as linhagens testadas. Além disso, esses resultados confirmam a existência de variabilidade intrapopulacional em venenos de *Crotalus durissus ruruima*, pois os resultados obtidos mostram que os venenos variedade branca da mesma subespécie apresentam diferentes propriedades dos venenos e variedade amarela, já testados. Dessa forma são necessários mais estudos para explorar de maneira mais efetiva a ação das toxinas de serpentes do gênero *Crotalus*, e como essas enzimas podem ser aplicadas de forma terapêutica, no tratamento de doenças.

Agradecimentos

A todos os integrantes do Laboratório do Serviço de Enzimologia Aplicada da FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS (FUNED) e especialmente a Ana Valentim e Gabriel Latorre Fortes Dias pela valiosa colaboração. À Fapeam pela concessão de bolsa de doutorado a profa. Ilia Gilmara Carvalho dos Santos. À UFAM pela bolsa de PIBIC concedida a aluna Vanessa Tavares Gomes.

Divulgação

Este artigo é inédito. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

- ALAPE-GIRO, A.; SANZ, L.; FLORES-DI, M.; MADRIGAL, M.; SASA, M.; CALVETE, J. Snake Venomics of the Lanchad Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. *Journal of Proteome Research*, v. 7, 2008.
- ANTUNES, T. C., YAMASHITA, K. M., BARBARO, K. C., SAIKI, M., & SANTORO, M. L. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*, 56(8), 1443-1458, 2010.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A2—a structural review. *Toxicon*, v. 34, n. 8, p. 827-841, 1996.
- Bernarde, P. S. Relationship between snake size and clinical, epidemiological and laboratory aspects of *Bothrops atrox* snakebites in the Western Brazilian Amazon. *Toxicon*, 186, 160-167, 2020.
- BIEBER, A. L. Metal and Nonprotein Constituents in Snake Venoms. In: LEE, C.-Y. (Eds.). **Snake Venoms**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 295-306, 1979.
- biological effects and relevant applications. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. 2016.
- BOLDRINI-FRANÇA, J., RODRIGUES, R. S., FONSECA, F. P., MENALDO, D. L., FERREIRA, F. B., HENRIQUE-SILVA, F.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile. *Biochimie*, 91(5), 586-595, 2009.
- BRAGA, J. R. M., DE MORAIS-ZANI, K., DOS SANTOS PEREIRA, D., SANT'ANNA, S. S., DA COSTA GALIZIO, N., TANAKA-AZEVEDO, A. M.; DA ROCHA, M.M.T. Sexual and ontogenetic variation of *Bothrops leucurus* venom. *Toxicon*. 2020.
- BRASIL. SINAN/SVS/MS. Sistema de Informação de Agravos de Notificação—Sinan, Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def>> Acessado em 11.07.2020.
- BULTRÓN, E.; THELESTAM, M.; GUTIÉRREZ, J. Effects on cultured mammalian cells of myotoxin III, a phospholipase A2 isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1179, n. 3, p. 253-259, 1993.
- CALVETE, J.J.; L. SANZ, Y. ANGULO, B. LOMONTE, J.M. GUTIÉRREZ. **Venoms, venomics, anti-venomics FEBS Lett.**, 583,pp. 1736-1743, 2009.



- CALVETE, JUAN J. et al. Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. **Journal of proteome research**, v. 9, n. 1, p. 528-544, 2010.
- CAVALCANTE, W. L. G.; NORONHA-MATOS, J. B.; TIMÓTEO, M. A.; FONTES, M. R.; GALLACCI, M.; CORREIADESA, P. Neuromuscular paralysis by the basic phospholipase A2 subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom needs its acid chaperone to concurrently inhibit acetylcholine release and produce muscle blockage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 334, p. 8-17, 2017.
- CAVALCANTE, W.L.; PONCE-SOTO, L.A.; MARANGONI, S.; GALLANCCI, M. Neuromuscular effects of venoms and crotoxin-like proteins from *Crotalus durissus ruruima* and *Crotalus durissus cumanensis*. **Toxicon**, 96:46- 49, 2015.
- CHARVAT RA, STROBEL RM, PASTERNAK MA, KLASS SM, RHEUBERT JL. Analysis of snake venom composition and antimicrobial activity. **Toxicon**, 2018.
- CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. **Snake venom variability: methods of study, results and interpretation**. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.
- COLLINS, C. H. Separações em colunas abertas: cromatografia por exclusão e por bioafinidade. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 2, p. 107-114, 2011.
- CORIN, R.E.; VISKATIS, L.J.; VIDAL, J.C.; ETCHEVERRY, M.A., Cytotoxicity of crotoxin on murine erythroleukemia cells in vitro. **Invest. New Drugs**, v. 11 n.1, p. 11-15, 1993.
- COSTA, L. A.; FORNARI, M. C.; BERARDI, V. E.; MILES, H. A.; DIEZ, R. A. In vivo effect of snake phospholipase A2 (crotoxin+cardiotoxin) on serum IL-1 α , TNF- α and IL-1ra level in humans. **Immunology Letters**, v. 75, n. 2, p. 137-141, 2001.
- COSTA, L. A.; MILES, H.; ARAUJO, C. E.; GONZALEZ, S.; VILLARRUBIA, V. G. Tumor Regression of Advanced Carcinomas Following Intra-and/or Peri-Tumoral Inoculation with VRCTC-310 in Humans: Preliminary Report of Two Cases. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 20, n. 1, p. 15-25, 1998.
- CUNHA, E.M. & MARTINS, O.A. Principais compostos químicos presentes nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – uma revisão. **Rev Ele de Educ e Ciên**. 2(2): 21-26, 2012.
- DA COSTA, T. N., Mota-da-Silva, A., Colombini, M., Moura-da-Silva, A. M., de Souza, R. M., Monteiro, W. M., &
- DA SILVA A.L.; CONCEIÇÃO A.S.M.M, DE SOUZA; C.D.M., DE MORAIS G.B.; DE MORAES SILVEIRA J.A.; JÚNIOR F.A.F.X.; MACAMBIRA K.D.S.; ARAÚJO S.L.; PESSOA N.O.; EVANGELISTA J.S.A.M., *Crotalus durissus* venom:
- DALTRY, J. C.; WÜSTER, W.; THORPE, R.S. Dieta e evolução do veneno de cobra. **Nature**, 1996.
- DIAS, E. H. V. Peçonha de *Bothrops alternatus*: avaliação in vitro da atividade antiviral contra a infecção pelo vírus da dengue e a influência de uma toxina isolada na secreção de citocinas. 2015
- DIZ FILHO, E. B. S.; MARANGONI, S.; TOYAMA, D. O.; FAGUNDES, F. H. R.; OLIVEIRA, S. C. B.; FONSECA, F. V.; CALGAROTTO, A. K.; JOAZEIRO, P. P.; TOYAMA, M. H. Enzymatic and structural characterization of new PLA2 isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**, v. 53, n. 1, p. 104114, 2009.
- DOS SANTOS, M. C.; FERREIRA, L. C. L.; DA SILVA, W. D.; FURTADO, M. D. F. D. Caracterización de las actividades biológicas de los venenos 'amarillo' y 'blanco' de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**. 31(11):1459-1469, 1993.
- DOS-SANTOS, M. C.; ASSIS, E. B.; MOREIRA, T. D.; PINHEIRO, J.; FORTES-DIAS, C. L. Individual venom variability in *Crotalus durissus ruruima* snakes, a subspecies of *Crotalus durissus* from the Amazonian region. **Toxicon**, v. 46, n. 8, p. 958-961, 2005.
- FERGUSON, Elaine L.; DUNCAN, Ruth. Dextrin-phospholipase A2: synthesis and evaluation as a bioresponsive anticancer conjugate. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 6, p. 1358-1364, 2009.
- FONSECA, F. V. Modificação estrutural de PLA2 de *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus cumanensis* com p-bromofenacil e cumarinas sintéticas – Caracterização bioquímica e biológica. Estudo da agregação plaquetária e efeito edematogênico. Campinas, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2011.
- FONSECA, F. V.; BALDISSERA JR, L.; CAMARGO, E. A.; ANTUNES, E.; DIZ-FILHO, E. B. S.; CORRÊA, A. G.; BERIAM, L. O. S.; TOYAMA, D. O.; COTRIM, C. A.; TOYAMA, M. H. Effect of the synthetic coumarin,



ethyl 2-oxo2H-chromene-3-carboxylate, on activity of *Crotalus durissus ruruima* sPLA2 as well as on edema and platelet aggregation induced by this factor. *Toxicon*, v. 55, n. 8, p. 1527-1530, 2010.

GIMENES, SARAH NC et al. Efeitos antitumorais de γ CdcPLI, um inibidor de PLA 2 de *Crotalus durissus collilineatus* através da via PI3K / Akt em células de câncer de mama MDA-MB-231. **Relatórios científicos**, v. 7, n. 1, pág. 1-15 de 2017.

HAN, R.; LIANG, H.; QIN, Z.; LIU, C. Crotoxin induces apoptosis and autophagy in human lung carcinoma cells in vitro via activation of the p38 MAPK signaling pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 35, p. 1323-1332, 2014.

HENDON, R.A.; FRAENKEL-CONRAT, H. **Biological roles of the two components of crotoxin**. *Proc Natl Acad Sci*, v. 68, p. 1560-1563, 1971.

Internacional de células cancerígenas, v. 17, n. 1, 2017.

JOHNSON, EK, KARDONG, KV, & OWNBY, C.L. Observações sobre venenos brancos e amarelos de uma cascavel individual do sul do Pacífico (*Crotalus viridis helleri*). *Toxicon*, v. 25, n. 11, 1169-1180, 1987.

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sulamericana (*Crotalus durissus*). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 34, p. 347-354, 1992.

LIMA, T. S. **Caracterização do efeito da crotoxina sobre a funcionalidade dos neutrófilos da medula óssea**. 2015. 111 f. Trabalho de conclusão de curso (Tese) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2015.

MALUF, S. EL CHAMY et al. Inhibition of malaria parasite *Plasmodium falciparum* development by crotoamine, a cell penetrating peptide from the snake venom. **Peptides**, v. 78, p. 11-16, 2016.

MATOS, R.R.; IGNOTTI, Eliane. Incidência de acidentes ofídicos por gêneros de serpentes nos biomas brasileiros. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, p. 2837-2846, 2020.

MCCLEARY R.J.R., R.M. KINI Non-enzymatic proteins from snake venoms: a gold mine of pharmacological tools and drug leads. *Toxicon*, v. 62, p. 56-74, 2013.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, David et al. Rattlesnake *Crotalus molossus nigrescens* venom induces oxida-

tive stress on human erythrocytes. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, 2017.

MESGARZADEH, AH, AKBARZADEH, A., RASIPOUR, A., RASIPOUR, T., MEHDIZADEH, A., & SHAAKER, M. Composição de fosfolipase-A2 secretora e ácidos graxos em lesões reativas orais: um estudo transversal.

MULLER, S.P.; SILVA, V.A.O.; SILVESTRINI, A.V.P.; DE MACEDO, L.H.; CAETANO, G.F.; REIS, R.M.; MAZZI, M.V. **Crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*: atividade citotóxica in vitro de uma fosfolipase heterodimérica A2 em linhas celulares humanas derivadas de câncer**. *Toxicon*, 156 1322, 2018.

NATESH R, SCHWAGER SL, EVANS HR, STURROCK ED, ACHARYA KR. Structural details on the binding of antihypertensive drugs captopril and enalaprilat to human testicular angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry*, v. 43, n. 27, 2004.

NEWMAN, R. A.; VIDAL, J. C.; VISKATIS, L. J.; JOHNSON, J.; ETCHEVERRY, M. A. VRCTC-310 — A novel compound of purified animal toxins separates antitumor efficacy from neurotoxicity. **Investigational New Drugs**, v. 11, n. 2, p. 151-159, 1993.

OLIVEIRA, I. S. DE, CARDOSO, I. A., BORDON, K. DE C. F., CARONE, S. E. I., BOLDRINI-FRANÇA, J., PUCCA, M. B., ARANTES, E. C. Análise proteômica e funcional global da variação individual do veneno de *Crotalus durissus collilineatus* e seu impacto no envenenamento. *Journal of proteomics*, 191, 153-165. 2019.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 47, p. 24-29, 2001.

PONCE-SOTO, L. A.; BALDASSO, P. A.; ROMERO-VARGAS, F. F.; WINCK, F. V.; NOVELLO, J. C.; MARRANGONI, S. Biochemical, Pharmacological and Structural Characterization of Two PLA2 Isoforms Cdr-12 and Cdr-13 from *Crotalus durissus ruruima* Snake Venom. *The Protein Journal*, v. 26, n. 1, p. 39-49, 2007.

REBELLO HORTA, C. C. et al. **Cardiovascular-Active Venom Toxins: An Overview**. *Curr Med Chem*, v. 23, n. 6, p. 603-22, ISSN 1875-533X (Electronic) 0929- 8673 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26812904>> 2016.

reports, 27 (5), 1341-1347, 2012.



RUDRAMMAJI, LMS; GOWDA, TV Purificação e caracterização de três fosfolipases A2 citotóxicas ácidas do veneno da cobra indiana (*Naja naja naja*). **Toxicon**, v. 36, n. 6, pág. 921-932, 1998.

SAAVEDRA, SL, ACOSTA, G., ÁVILA, L., GIUDICCESSI, SL, CAMPERI, SA, ALBERICIO, F., ... & CERON, MCM.

SANTOS, I. G. C. D., Fortes-Dias, C. L., & dos Santos, M. C. Aplicações farmacológicas dos venenos de serpentes brasileiras enfoque para *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus ruruima*. *Scien Amaz*, 6(1), 42-53, 2017.

SANTOS, I. G. C. D., Lopes, A. L. R. B., Fortes-dias, C. L., Dos-santos, M. C., Almeida, P. D. O. D., Souza, M. C. S. D., ... & Nunez, C. V. Antitumor and antibacterial activity of white and yellow venoms of *Crotalus durissus ruruima* tested individually. *Volume 7, Pags. B-1-B-14*, 2018.

SOUZA, N. M. V. Comparação da atividade paralisante de peçonhas e Crotoxinas isoladas de serpentes da subespécie *Crotalus durissus terrificus* de diferentes regiões do estado de Minas Gerais. 2020.

SULCA, M. A. et al. Venom of the Peruvian snake *Bothriopsis oligolepis*: Detection of antibacterial activity and involvement of proteolytic enzymes and C-type lectins in growth inhibition of *Staphylococcus aureus*. **Toxicon**, v. 134, p. 30-40, 2017.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G.K. A review and database of snake venom proteomes. **Toxins**, v. 9, n. 9, p. 290, 2017.

TOKARNIA, C. H., BRITO, M. F., BARBOSA, J. D., DÖBEREINER, J. Quadros clínico-patológicos do envenenamento ofídico por *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops* spp. em animais de produção. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(4), 301-312, 2014.

UETZ, P., FREED, P., HOŠEK, J. The Reptile Database. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org>> 2020.

Utilização de um fosfopéptido como ligando para purificar a fosfolipase A2 a partir do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por cromatografia de afinidade. **Journal of Chromatography B**, 122070, 2020.

VIEIRA C.A., FERREIRA D., C. DE MOURA PESSOA, A. **Um estudo do rendimento do veneno de cobras corais brasileiras e seu uso na avaliação do soro antielapídico**. *Scientia Medica*, 24(2). 2014.

WANG, JH, Xie, Y., Wu, JC, Han, R., Reid, PF, Qin, ZH, & He, JK. A crotoxina aumenta a atividade antitumoral de gefinitib (Iressa) em células de carcinoma escamoso de pulmão humano SK-MES-1. *Oncology*

YAN, C. H., YANG, Y. P., QIN, Z. H., GU, Z. L., Reid, P., & LIANG, Z. Q. Autophagy is involved in cytotoxic effects of crotoxin in human breast cancer cell line MCF-7 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28(4), 540-548, 2007.

YE, Bin et al. Anti-tumor activity of CrTX in human lung adenocarcinoma cell line A549. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32, n. 11, p. 1397-1401, 2011.