



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO  
LICENCIATURA INTEGRADA EM BIOLOGIA E QUÍMICA**

**ELIMARY ELANNE SANTOS DA SILVA**

**PURIFICAÇÃO DE UM PEPTÍDEO INIBIDOR DA ENZIMA  
CONVERSORA DA ANGIOTENSINA OBTIDO DA PEÇONHA  
DA CARANGUEJEIRA *Acanthoscurria geniculata***

**Santarém  
2018**

**ELIMARY ELANNE SANTOS DA SILVA**

**PURIFICAÇÃO DE UM PEPTÍDEO INIBIDOR DA ENZIMA  
CONVERSORA DA ANGIOTENSINA OBTIDO DA PEÇONHA  
DA CARANGUEJEIRA *Acanthoscurria geniculata***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Ciências Naturais para a obtenção do grau em Licenciatura Integrada em Biologia e Química do Instituto de Ciências da Educação, Universidade Federal do Oeste do Pará.

Orientadora: Deyanira Fuentes Silva

Coorientador: Joacir Stolarz de Oliveira

**Santarém  
2018**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

---

S586p Silva, Elimary Elanne Santos da  
Purificação de um peptídeo inibidor da enzima conversora da angiotensina obtido da peçonha da caranguejeira *Acanthoscurria geniculata* / Elimary Elanne Santos da Silva. – Santarém, Pa, 2018.

46fls.: il.

Inclui bibliografias.

Orientador Prof. Dra. Deyanira Fuentes Silva

Co-orientador: Joacir Stolarz de oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências da Educação, Licenciatura Integrada em Biologia e Química, Santarém, 2018.

1. Aranha – Venenos. 2. Animais venenosos – Bioquímica – Análise. 3. Toxicologia. 4. *Acanthoscurria geniculata*. I. Silva, Deyanira Fuentes, orient. II. Título.

CDD: 23 ed. 615.942

**ELIMARY ELANNE SANTOS DA SILVA**

**PURIFICAÇÃO DE UM PEPTÍDEO INIBIDOR DA ENZIMA  
CONVERSORA DA ANGIOTENSINA OBTIDO DA PEÇONHA  
DA CARANGUEJEIRA *Acanthoscurria geniculata***

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Programa de Ciências Naturais para a obtenção de grau em Licenciatura Integrada em Biologia e Química do Instituto de Ciências da Educação, Universidade Federal do Oeste do Pará.

Conceito: 9

Data de Aprovação: 09/ 07/ 2018



---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Deyanira Fuentes Silva – Orientadora  
Universidade Federal do Oeste do Pará



---

Prof. Dr. Joacir Stolarz de Oliveira – Co-orientador  
Universidade Federal do Oeste do Pará



---

Prof. Dr. Dércio Pena Duarte – Examinador 01  
Universidade Federal do Oeste do Pará



---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Gisele Afonso Bento Mello – Examinador 02  
Universidade Federal do Oeste do Pará

Dedico este trabalho ao meu amado pai,  
que em vida me incentivou a trilhar os  
caminhos do conhecimento.

## AGRADECIMENTOS

Estou chegando ao fim de mais uma etapa de minha vida, nesse trajeto vivenciei momentos de muito aprendizado, descobertas e alegrias. Para que eu chegasse até aqui muitas pessoas me incentivaram. Agradeço imensamente à minha família que é meu porto seguro e minha base.

A meu tio Beto, que me criou com muito carinho e me incentivou em meus estudos.

À minha mãe, meu exemplo de força e coragem.

Aos meus irmãos, que sempre me ajudaram nesse percurso.

Ao André, meu companheiro, pelo seu amor, compreensão e motivação.

Meu agradecimento especial a minha orientadora Professora Deyanira Fuentes Silva, que durante esses quatro anos ao seu lado pude lhe conhecer e admirar, por ser uma pessoa muito generosa, professora que se preocupa com o real aprendizado dos seus alunos e com a qualidade do seu trabalho. Agradeço por explorar uma parte de mim que eu não conhecia, e acreditar que eu conseguiria quando muitas vezes nem eu acreditava no meu potencial. Durante todo esse tempo de bancada ao seu lado, percebo que nossa Instituição pode contar com uma profissional muito competente, espero ter um dia a metade da sua energia e sabedoria.

Ao meu coorientador Professor Joacir Stolarz de Oliveira, por me instigar a ser uma aluna melhor, por compartilhar seus conhecimentos e por suas críticas construtivas que foram muito válidas para meu crescimento profissional.

Ao professor Juarez de Souza e ao Técnico em Laboratório Railson Moraes Franco do Instituto Esperança de Ensino Superior (IESPES), por disponibilizarem camundongos para nossos ensaios de DL<sub>50</sub>.

Ao Dr. Antonio Domingos Brescovit, especialista em Taxonomia de aranhas do Instituto Butantan, pela identificação da espécie *Acanthoscurria geniculata*.

À Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela colaboração na análise da sequência e caracterização da massa molecular do peptídeo isolado neste trabalho.

Ao Laboratório de Química e Estrutura de Macromoléculas Biológicas e ao Laboratório de Fisiologia e Toxinas Animais da UFOPA, que possibilitou a realização dos experimentos deste trabalho e tornou-se meu segundo lar.

Aos meus amigos de laboratório, em especial à Fabricia e à Brenna, pelos pensamentos positivos, ensinamentos, lanches e conversas nos finais da tarde.

Aos meus mestres do curso de Licenciatura em Biologia e Química, palavra alguma pode descrever a gratidão que sinto por seus ensinamentos.

À Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) que concedeu todo o espaço e funcionários para a realização deste trabalho.

Ao PIBIC-CAPES e CNPq que, através da PROPPIT, concederam as bolsas de iniciação científica.

Às minhas amigas Helen e Janini, saber que vocês estão ao meu lado me dá forças para continuar e enfrentar qualquer situação, agradeço de coração. Ao Raylan e Andressa, companheiros de classe, pelas conversas, pelos cafés nos intervalos das aulas e trabalhos compartilhados.

Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, deve participar da responsabilidade coletiva por toda humanidade.

***Marie Curie***

## RESUMO

A aranha Mygalomorphae *Acanthoscurria geniculata* é encontrada na região amazônica. Esse animal possui aspectos fenotípicos como coloração preta com listras esbranquiçadas nas patas, *setae* extremamente urticantes e pode chegar até 20 cm de comprimento, sendo uma das maiores aranhas encontradas na Amazônia. De modo geral, as peçonhas das aranhas são misturas de substâncias usadas para a defesa e captura de presas. Dentre elas, os peptídeos são os componentes majoritários e apresentam um amplo espectro de ação em mamíferos, insetos, parasitas, bactérias e fungos, entre outros. Porém, relatos de peptídeos isolados de peçonhas de caranguejeiras com atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ECA) são inexistentes. Estes foram encontrados primeiramente nas peçonhas de serpentes e depois em outros animais como escorpiões, anfíbios e aranhas verdadeiras (Araneomorphae). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar bioquímica e biologicamente a peçonha da caranguejeira *A. geniculata* e isolar compostos bioativos. A metodologia consistiu inicialmente da extração da peçonha por eletroestimulação. A concentração proteica foi dosada por espectrofotometria UV no comprimento de onda de 280 nm e pelo método do ácido bicinonínico. A distribuição das massas moleculares dos compostos proteicos foi realizada por eletroforese em condições redutoras com gel de 12% de poliacrilamida e sua atividade tóxica foi estimada calculando a  $DL_{50}$  em camundongos *Swiss*. A atividade inibitória da ECA foi evidenciada utilizando um extrato de pulmão de camundongo e o substrato *furanacryloyl-L-phenylalanyl-glycyl-glycine* (FAPGG). A atividade inibitória da ECA da peçonha foi monitorada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-rp.) e, através da purificação bioguiada, foi isolado um peptídeo inibidor da ECA. Nossos resultados mostram que a peçonha de *A. geniculata* contém compostos com massas moleculares distribuídas entre 16 kDa e 90 kDa. Por análise de Probit a  $DL_{50}$  calculada foi de  $22,4 \pm 2,8$  mg/kg e dentre seus constituintes foi isolado um peptídeo com massa de 8581,2 Da que inibe a ECA. A presença deste peptídeo na peçonha de *A. geniculata* constitui o primeiro relato na literatura de um peptídeo hipotensor isolado deste tipo de animais e sua função biológica pode ser a mesma indicada para a peçonha de serpentes, cuja a função seria a imobilização da presa.

Palavras-chave: Mygalomorphae. Aranhas.  $DL_{50}$ . Amazônia

## ABSTRACT

*Acanthoscurria geniculata* is a tarantula belongs to the Mygalomorphae infraorder. This spider is native of the Amazon basin in Northern Brazil and it has phenotypic traits such as distinctive black legs with white knees and hairs extremely urticating. This species is one of the largest spiders found in the Amazon with a body length of up to 20 cm. Tarantula venom is used for defense and prey capture and it is mostly constituted of proteins and peptides. These peptides have been demonstrated to have broad-spectrum activities. Currently, no evidence in the literature concerning angiotensin-Converting Enzyme (ACE) inhibitory peptides from Mygalomorphae or tarantula are known to us. These molecules were first discovered in snake's venom and following in other animals such as scorpions, frogs, and spiders belonged to Aranemorphae infraorder. Therefore, we analyzed the *A. geniculata* venom as a source of novel ECA-inhibitory peptides. Initially, the relative molecular masses from *A. geniculata* venom was analyzed on 12 % SDS-PAGE under reducing conditions and peptide purification was performed using a reverse phase chromatography. Median Lethal Dose (LD50) of the crude venom was determined by three independent experiments, following the recommended WHO protocol using Swiss albino mice (n= 6 for each dose). ACE inhibitory activity was performed by the furanacryloyl-L-phenylalanyl-glycyl-glycine (FAPGG) assay method. Both FAPGG substrate and its hydrolysis product furanacryloyl-L-phenylalanine (FAP) were monitoring by HPLC-UV at two different wavelengths 306 nm and 340 nm. Moreover, ECA extract was obtained from mouse lung and used for enzymatic tests at 24,2 UA<sub>280nm</sub>. Our results showed that *A. geniculata* venom contains proteins with relative molecular masses ranging from 96 kDa to 16 kDa and its LD50 calculated by Probit analysis was 22,4 ± 2,8 mg/kg. It also inhibited ACE activity by more than 50% when compared with 99% inhibition produced by captopril. Following, an ACE-inhibitory peptide was isolated with a molecular mass of 8.581 Da. The occurrence of BPP in tarantula venoms may be the same as that suggested for snake venom, whose function is believed to be the immobilization of preys to ensure feeding.

**Keywords:** Mygalomorphae, spiders, LD<sub>50</sub>, Bradykinin, Amazon.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DL<sub>50</sub> - Dose Letal 50%

BK - Bradicinina

ECA - Enzima conversora de angiotensina

SRAA - Sistema renina-angiotensina-aldosterona

BPPs - Peptídeos potencializadores da bradicinina

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

UV - Ultravioleta

BCA - Método do Ácido bicinconínico

BSA - Albumina sérica bovina

SDS - PAGE - Gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio.

IESPES - Instituto de Ensino Superior de Santarém

i.p. - via intraperitoneal

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CLAE-rp - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa

TFA - Ácido trifluoroacético

FAPGG - *furanacryloyl-L-phenylalanylglycyl-glycine*

FAP - *furanacryloyl-L-phenylalanine*

UA - Unidade de absorvância

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

r.p.m. – rotação por minuto

mL - mililitro

kg - kilograma

µg - micrograma

mg - miligrama

MΩ - megaohm

ACN - acetonitrila

x g - gravidade

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
2.1. Biologia das aranhas.....	13
2.2. Morfologia das aranhas .....	14
2.3. Aranhas de importância médica.....	15
2.4. O gênero <i>Acanthoscurria</i> .....	16
2.5. A espécie <i>Acanthoscurria geniculata</i> .....	16
2.6. Composição das peçonhas de caranguejeiras.....	17
2.7. Os peptídeos inibidores da ECA .....	18
2.8. Sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. Objetivo geral .....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
4. METODOLOGIA.....	22
4.1. Coleta dos animais .....	22
4.2. Extração da peçonha.....	22
4.3. Dosagem proteica.....	22
4.3.1. Dosagem proteica por espectrofotometria UV.....	22
4.3.2. Dosagem proteica pelo método do ácido bicinconínico (BCA).....	22
4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) .....	23
4.5. Dose Letal 50% (DL <sub>50</sub> ) da peçonha de <i>A. geniculata</i> .....	23
4.6. Purificação do composto com atividade inibitória da ECA .....	24
4.7. Determinação da atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA).....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	26
5.1. Coleta e manutenção dos animais .....	26
5.2. Extração da peçonha.....	26
5.3. Dosagem proteica.....	27
5.4. Análise da distribuição das massas moleculares dos componentes proteicos da peçonha de <i>A. geniculata</i> .....	29

5.5. DL <sub>50</sub> da peçonha de <i>A. geniculata</i> .....	31
5.6. Purificação bioguiada e obtenção de compostos puros.....	32
5.7. Atividade inibitória da ECA pela peçonha de <i>A. geniculata</i> . ....	34
6. CONCLUSÃO .....	40
REFERÊNCIAS.....	41

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo de milhões de anos de evolução as aranhas caranguejeiras vêm utilizando a força física e a peçonha como estratégias para agir rapidamente sobre suas presas e imobilizá-las. As peçonhas de caranguejeiras são uma complexa mistura de compostos biologicamente ativos. Existem apenas duas espécies do gênero *Acanthoscurria* cujas peçonhas foram estudadas em nível bioquímico, porém nenhuma com a espécie *Acanthoscurria geniculata*.

Este trabalho teve como objetivo o estudo da peçonha da caranguejeira *A. geniculata*, espécie distribuída na região amazônica. Os trabalhos reportados com este animal são escassos, e estão apenas relacionados à genética e composição proteica dos fluidos digestivos.

Para analisar bioquímica e biologicamente a peçonha deste animal e isolar compostos bioativos, a metodologia consistiu em dosar a peçonha por métodos espectroscópicos, investigar as distribuições das massas moleculares, testar o efeito tóxico da peçonha em mamíferos e fracionar a peçonha por Cromatografia por exclusão molecular e, posteriormente, através de uma estratégia baseada em purificações bioquímicas, encontrar o composto com atividade biológica.

Os resultados mostraram que *A. geniculata* possui compostos de alta massa molecular e um alto conteúdo de compostos de baixa massa que correspondem aos peptídeos. A atividade tóxica da peçonha em mamíferos teve uma  $DL_{50}$  de  $22,4 \pm 2,8$  mg/kg. Constatou-se que a peçonha possui potencial inibitório da ECA, e através das purificações bioquímicas isolou-se o peptídeo inibidor FIV.3.1.14, com massa molecular de 8581,2 Da. O mesmo não apresentou atividade hemolítica na concentração máxima testada de 1 mg/mL.

Desta forma, o presente trabalho constitui o primeiro relato na literatura de um peptídeo inibidor da ECA isolado da peçonha de aranhas Mygalomorphae. A espécie *A. geniculata* é uma caranguejeira comumente encontrada na região Oeste do Pará e este novo peptídeo poderia representar uma forma diferente de inibir a ECA, uma vez que os peptídeos inibidores até agora isolados de animais peçonhentos apresentam massas moleculares ao redor de 1,5 kDa, diferentemente do peptídeo isolado neste trabalho que é de 8,5 kDa.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Biologia das aranhas

As aranhas pertencem ao Reino Animalia, Filo Arthropoda, Subfilo Chelicerata, Classe Arachnida e Ordem Araneae (CARDOSO et al., 2009). O fóssil mais antigo destes animais data de 300 milhões de anos, dentro do período Carbonífero (RASH; HODGSON, 2002). A Classe Arachnida é o segundo maior grupo do Reino animal sendo superada, em termos de número em espécies, apenas pelos insetos (BONALDO et al., 2009).

Atualmente são descritas cerca de 44.906 espécies de aranhas, distribuídas em 114 famílias e 3.935 gêneros (PLATNICK, 2015). Entretanto, as estimativas acerca da diversidade real da Ordem poderiam variar de 80.000 a 170.000 espécies, de modo que até o momento seriam conhecidas aproximadamente de 20% a 50% do total de espécies viventes (BONALDO et al., 2009).

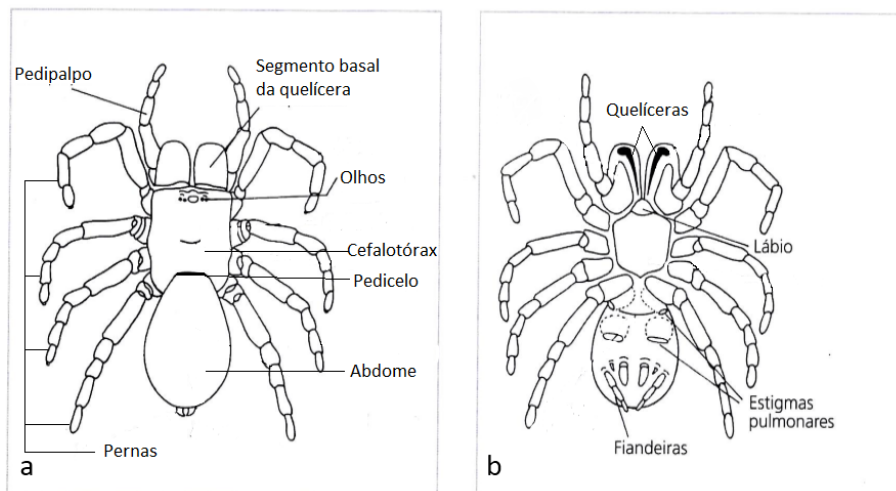
A ordem Araneae pode ser dividida em duas subordens: a primeira Mesothele, que contém a infraordem Liphistiomorphae na qual se encontram as aranhas com os caracteres mais primitivos, as quais apresentam cefalotórax segmentado e ausência de glândulas produtoras de peçonha. A segunda subordem é a Opisthotelae, a qual se encontra dividida nas infraordens Mygalomorphae e Araneomorphae, e diferentemente da Liphistiomorphae, elas possuem glândulas produtoras de peçonha. À infraordem Mygalomorphae pertencem as aranhas caranguejeiras e à Araneomorphae as aranhas verdadeiras. A característica morfológica externa mais evidente que diferenciam as aranhas dessas duas infraordens são o modo como as quelíceras se articulam em relação ao eixo longitudinal do corpo, sendo que nas Mygalomorphae as quelíceras são paraxiais, enquanto que nas Araneomorphae a articulação é diaxial (OTTONI, 2009).

A infraordem Mygalomorphae engloba 15 famílias, dentre as quais podemos citar a Theraphosidae, onde estão inseridas as aranhas caranguejeiras. Esta família contém 126 gêneros e 953 espécies; sendo que destas, 161 estão presentes no Brasil (PLATNICK, 2015). Na região Amazônica, especificamente no Estado do Pará, foram identificados representantes de 7 das 15 famílias de aranhas pertencentes à Mygalomorphae. Entretanto, devido à grande extensão de áreas inexploradas ou não inventariadas estima-se que este número possa ser maior (BONALDO et al., 2009).

“As aranhas podem ser classificadas de acordo com seus hábitos em subterrâneas, terrícolas, cavernícolas e subaquáticas”. Espécies subaquáticas pertencem ao gênero *Argyroneta* e estes animais vivem durante um período da sua vida dentro de bolhas de água em lagos e rios (FOELIX, 1996 apud BORGES, 2008). As aranhas são animais carnívoras e caçam suas presas através de duas estratégias básicas: a primeira, utilizando a construção de teias, característica típica das Araneomorphae. A segunda estratégia é a inoculação da peçonha como mecanismo químico de imobilização da presa (BORGES, 2008). As aranhas têm uma grande importância ecológica, uma vez que são comedoras naturais de insetos, elas reduzem significativamente a densidade populacional destes e contribuem para o equilíbrio ecológico (NYFFERLER; BIRKHOFFER, 2017).

## 2.2. Morfologia das aranhas

O corpo das aranhas é diferenciado de outros aracnídeos pela presença do pedicelo, estrutura estreita e curta que separa o cefalotórax do abdômen (figura 1a). O cefalotórax apresenta seis pares de apêndices, sendo estes um par de quelíceras, um par de pedipalpos e quatro pares de patas. Os pedipalpos apresentam aspecto que se igualam às patas, principalmente em fêmeas jovens. No cefalotórax estão também situados os olhos, geralmente em número de oito, dispostos em duas fileiras, além do segmento basal da quelícera (Figura 1a).



Fonte: CARDOSO et al. (2009) com modificações.

**Figura 1- Características morfológicas externas das aranhas: (a) Vista dorsal. (b) Vista ventral do corpo das caranguejeiras onde é mostrada algumas das suas estruturas anatômicas.**

No cefalotórax estão também situados os olhos, geralmente em número de oito, dispostos em duas fileiras, além do segmento basal da quelícera (Figura 1a) onde, internamente encontra-se a glândula produtora de peçonha, que por sua vez, é inoculada através da quelícera (Figura 1b) (CARDOSO et al., 2009; PECHMANN; PRPIC, 2009).

### 2.3. Aranhas de importância médica

A infraordem Araneomorphae é composta pelas aranhas comumente encontradas dentro de residências e, dentre estas, incluem as espécies de maior importância médica. Segundo a Organização Mundial da Saúde, no Brasil são encontrados apenas três gêneros de Araneomorphae que podem causar acidentes graves em seres humanos. Eles são, o gênero *Latrodectus*, também conhecidas como aranhas viúvas-negras; o gênero *Loxocles* ou aranhas-marrons; e o gênero *Phoneutria*, também conhecidas como aranhas-armadeiras (CARDOSO et al., 2009).

As caranguejeiras consideradas de importância médica pertencem aos gêneros *Atrax*, *Trechona* e *Harpactirella* (ESCOUBAS; DIOCHOT; CORZO, 2000). A espécie Australiana *Atrax robustus* é considerada a caranguejeira mais perigosa do mundo, pois sua peçonha é letal para humanos. A dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) em mamífero para esta espécie foi de 0,2 mg/kg (KAIRE, 1963). Acidentes com esta espécie causaram no século passado 14 mortes (ESCOUBAS; DIOCHOT; CORZO, 2000). A peçonha da caranguejeira africana *Harpactirella lightfooti* também pode ocasionar morte em humanos, como documentado no trabalho de Finlayson et al. (1939). A espécie *Trechona venosa* é encontrada no Brasil e a sua peçonha também pode ser perigosa para humanos, e a DL<sub>50</sub> de sua peçonha para mamíferos foi de 0,03 mg/kg (VELLARD, 1925).

Contudo, as aranhas pertencentes à Mygalomorphae, embora possuam um tamanho corpóreo relativamente grande, estas na sua maioria não representam perigo à espécie humana, a não ser pela dor temporária advinda da picada e da ação das *setae* ou “pelos” urticantes, que podem causar lesão ocular e até reações inflamatórias (McANENA; MURPHY; O’CONNOR, 2013).

#### 2.4. O gênero *Acanthoscurria*

O gênero *Acanthoscurria*, descrito por Ausserer em 1871, pertence à família Theraphosidae e infraordem Mygalomorphae. O gênero contém 30 espécies que podem ser encontradas na América do Sul e América Central e desta, 17 são encontradas no Brasil (PLATNICK, 2015). Estas aranhas se caracterizam por serem terrestres e se alimentar de insetos, mamíferos, anfíbios, assim como de outras aranhas. “Elas são principalmente escavadoras e caçadoras, paralisando sua presa por inoculação da peçonha” (FOELIX, 1996 apud BORGES, 2008).

Atualmente, apenas de quatro espécies do gênero *Acanthoscurria* foram isolados compostos biologicamente ativos, tanto da hemolinfa quanto da peçonha. Nos trabalhos de Silva et al. (2000) foram isolados quatro peptídeos da hemolinfa da espécie *A. gomesiana*, nomeados de Theraphosinina, Mygalomorphina, Gomesina e Acanthoscurrina, todos com atividade antibacteriana. Ainda desta mesma espécie foi isolado dos hemócitos uma acilpoliamina, a Migalina, com atividade antibacteriana apenas para bactérias gram-negativas (PEREIRA et al., 2007).

A partir da hemolinfa da espécie *A. rondoniae* foi isolado um peptídeo com atividade antifúngica denominado Rondonina (RICILUCA et al., 2012). Os estudos de Rates et al. (2013) relataram a purificação de uma toxina anti-inseto nomeada  $\mu$ -theraphotoxin-An1a ( $\mu$ -TRTX-An1a) da peçonha da espécie *A. natalensis* e no trabalho de Mourão et al. (2013) foi determinada a DL<sub>50</sub> da peçonha da espécie *A. paulensis* em  $25,4 \pm 2,4$  mg/kg, além de avaliar a atividade cardiotoxica das principais frações da peçonha provenientes de uma separação cromatográfica.

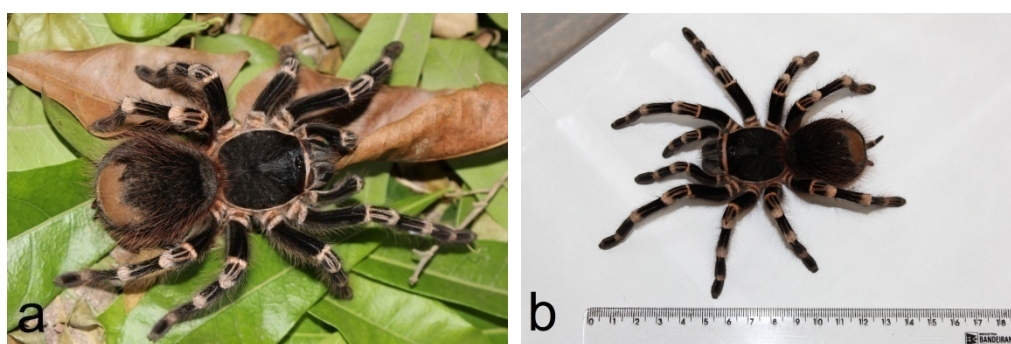
Os trabalhos reportados com a espécie *A. geniculata* estão relacionados com a composição proteica dos fluidos digestivos (WALTER et al., 2017) e com o estudo comparativo da expressão dos genes dos apêndices entre embriões de *A. geniculata* (Mygalomorphae) e *Cupiennius salei* (Araneomorphae) (PECHMANN; PRPIC, 2009).

#### 2.5. A espécie *Acanthoscurria geniculata*

A espécie em estudo, *A. geniculata* (figura 2), descrita por C.L. KOCH em 1841, é considerada uma aranha de grande porte, podendo chegar até 15 cm de comprimento, como mostrado na figura 2b. Ela é de coloração corpórea preta com os segmentos das patas apresentando um padrão de manchas de coloração esbranquiçada (figura 2a), característica pela qual esta aranha é chamada

popularmente de “aranha do joelho branco”. O abdômen é coberto por *setae* longas de cor vermelho-cobre, localizadas na parte dorsal. As fêmeas desta espécie apresentam maior cefalotórax, abdome e pedipalpos, quando comparado com os machos.

No Brasil, *A. geniculata* pode ser encontrada nos estados de Rondônia, Roraima, Pará e Mato Grosso. A espécie é principalmente noturna, mas em períodos reprodutivos, os machos podem ser encontrados durante o dia (PAULA et al., 2014).



Fonte: Autores (2015)

**Figura 2- Caranguejeiras *Acanthoscurria geniculata*.** (a) Exemplar fêmea em cativeiro. Na imagem é possível observar o padrão de cores, característico dessa espécie. (b) Exemplar fêmea sendo medido.

## 2.6. Composição das peçonhas de caranguejeiras

Ao longo de milhões de anos de evolução as aranhas caranguejeiras veem utilizando a força física e a peçonha como estratégias para agir rapidamente sobre suas presas e imobilizá-las. A composição bioquímica da peçonha das aranhas, incluindo as caranguejeiras, está diretamente influenciada pelo nicho ecológico e pelo comportamento predatório em que o animal está inserido (ESCOUBAS; RASH, 2004).

As peçonhas de caranguejeiras são uma complexa mistura de compostos, que podem ser divididos, de forma geral, em proteicos como as enzimas, proteínas e peptídeos e não proteicos como os lípideos, nucleotídeos, açúcares, íons e acilpoliaminas. Esses mesmos constituintes também podem ser agrupados em três classes de acordo com a sua massa molecular: *i*) Componentes de baixa massa molecular, onde se incluem as acilpoliaminas e outras moléculas não peptídicas

menores que 1 kDa; *ii*) As neurotoxinas, ricas em pontes dissulfeto e peptídeos citolíticos lineares com massas moleculares entre 1 e 10 kDa; e *iii*) as proteínas com massas moleculares maiores a 10 kDa e constituídas principalmente de enzimas com atividades de fosfolipases, proteases e hialuronidases (ESCOUBAS; DIOCHOT; CORZO, 2000; ESCOUBAS; RASH, 2004; CARDOSO, 2009).

Dentre todas as moléculas presentes nas peçonhas de aranhas, os peptídeos são as substâncias mais abundantes. Atualmente, de um total de 100 espécies de aranhas, tanto da infraordem Araneomorphae quanto Mygalomorphae foram descritas 1561 toxinas peptídicas no banco de dados Arachno Server 3.0 e, destas, 470 toxinas pertencem à família Theraphosidae (Em: <[www.arachnoserver.org/mainMenu.html](http://www.arachnoserver.org/mainMenu.html)> Acesso em: 10 maio 2018)

As toxinas encontradas tanto nas peçonhas de aranhas quanto de outros animais peçonhentos, como escorpiões e serpentes, possuem uma variedade de atividades biológicas, dentre as quais se destacam os peptídeos que agem em canais iônicos, peptídeos antimicrobianos, antihelmínticos, inseticidas, anestésicos e peptídeos potencializadores da bradicinina (BPPs), dentre outras. (ESTRADA et al., 2007; FERREIRA, 1965; FERREIRA et al., 1993). Entretanto, até a presente data, nós não encontramos na literatura BPPs isolados da peçonha de aranhas Mygalomorphae, nem de divulgações sobre a atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ECA) pela peçonha destes animais.

## 2.7. Os peptídeos inibidores da ECA

Os peptídeos inibidores da ECA, também são chamados de peptídeos potencializadores da bradicinina (do inglês, Bradykinin-potentiating peptides, BPP). A bradicinina (do grego, *bradys* = lento, *kinesis* = movimento) é um potente vasodilatador que aumenta a permeabilidade dos vasos capilares e tem também uma ação direta sobre a musculatura lisa.

Os BPPs vêm despertando interesse, pois além de potencializar os efeitos da bradicinina, eles também inibem a ECA. Os BPPs reportados até a data pertencem a uma classe de oligopeptídeos de cinco a quatorze resíduos de aminoácidos, caracterizados por apresentarem um alto conteúdo de prolina (**Pro**) (KODAMA, 2009).

O primeiro BPP foi a teprotida, nonapeptídeo (Pyr-Trp-**Pro**-Arg-Pro-Gln-Ile-**Pro-Pro**) isolado da peçonha da serpente *B. jararaca*. Esta toxina é extremamente potente e causa uma rápida queda de pressão arterial em mamíferos (FERREIRA, 1965; ROCHA E SILVA; BERALDO; ROSENFELD, 1949). A descoberta da teprotida e sua caracterização possibilitou o conhecimento básico para o desenvolvimento comercial, por indústrias farmacêuticas, de inibidores da ECA, como o medicamento Captopril (ONDETTI et al., 1977).

Baseado nas descobertas de Ferreira (1965), outros BPPs foram isolados de peçonhas e venenos de animais como, por exemplo, o peptídeo do escorpião *Tityus serrulatus*, (Lys-Lys-Asp-Gly-Tyr-**Pro**-Val-Glu-Tyr-Asp-Arg-Ala-Tyr) isolado por Ferreira et al. (1993); na peçonha da Araneomophae *Lycosa erythrognatha* foi isolado um peptídeo com 11 resíduos de aminoácidos (Glu-Ala-**Pro**-Trp-**Pro**-Asp-Thr-Ile-Ser-**Pro**-Pr) (FERREIRA et al., 1996); e no veneno da perereca *Phyllomedusa hypochondrialis* foi encontrado um peptídeo contendo 11 resíduos de aminoácidos (Val-Hyp-**Pro**-Gly-Phe-Thr-**Pro**-Phe-Arg-Gln-Ser) (BRAND et al., 2006).

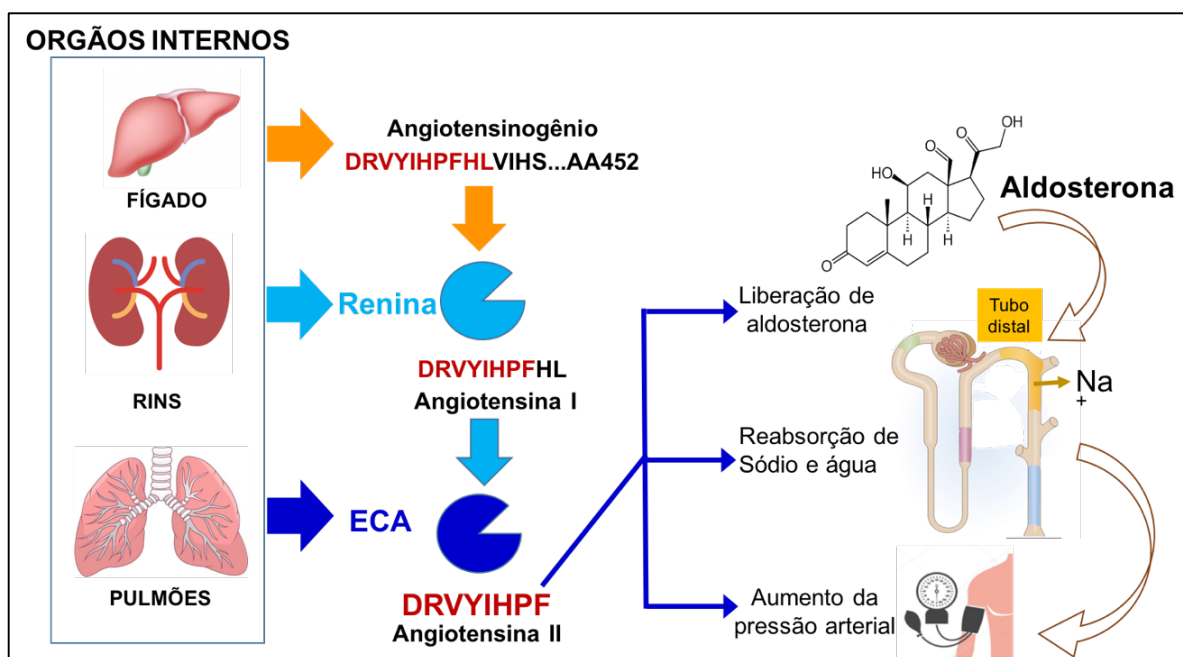
Pela sua composição, as peçonhas são misturas cientificamente atraentes, o que explica o grande número de pesquisas no campo da Toxinologia, área da ciência que estuda tanto as peçonhas como os venenos, como o intuito de entender seus efeitos e alvos moleculares nos humanos, bem como sua composição química.

## 2.8. Sistema renina-angiotensina-aldosterona

A enzima conversora de angiotensina, ECA, é uma metaloproteinase de zinco que desempenha uma ação importante na regulação da pressão arterial em humanos. Esta enzima catalisa a hidrólise da angiotensina I para produzir a angiotensina II.

A ECA faz parte do sistema plasmático renina-angiotensina-aldosterona, SRAA, no qual o substrato angiotensinogênio, que é sintetizado e liberado pelo fígado, é clivado pela renina, uma proteína sintetizada pelo rim. A renina hidrolisa o Angiotensinogênio nos 10 primeiros aminoácidos da sua extremidade amino-terminal gerando desta forma, um decapeptídeo denominado angiotensina I. A angiotensina I, por sua vez, é convertida em angiotensina II pela ação da ECA. Finalmente, a angiotensina II é o octapeptídeo vasoconstritor que, quando ligado ao seu receptor

específico AT1, promove diversos efeitos fisiológicos no organismo, como vasoconstrição, aumento da pressão arterial, secreção de vasopressina (ADH), aldosterona e retenção de sódio (Figura 3) (DE GASPARO et al., 2000; KURTZ; WAGNER, 1999).



Fonte: Autores (2018)

**Figura 3- Sistema renina-angiotensina-aldosterona.** O sistema envolve a produção do angiotensinogênio pelo fígado e de várias enzimas proteolíticas pelos órgãos internos, como os rins e os pulmões, para produzir finalmente o octapeptídeo angiotensina II. Angiotensina II é indutor da produção da Aldosterona, hormônio que causa diversos efeitos fisiológicos como a vasoconstrição e, conseqüentemente, o aumento da pressão arterial.

Embora a diversidade molecular da peçonha de caranguejeiras seja ampla, podendo ser consideradas verdadeiras bibliotecas de compostos biologicamente ativos, as pesquisas com peçonhas destas aranhas ainda são escassas. A caranguejeira *A. geniculata*, originária da Amazônia, é uma espécie pouco estudada e representa uma rica fonte de novos compostos peptídicos, os quais foram selecionados ao longo de milhares de anos de evolução. Assim, este trabalho, trata-se do primeiro estudo que visa caracterizar, em nível bioquímico, a peçonha da caranguejeira amazônica *A. geniculata*, contribuindo para o conhecimento de novas substâncias isoladas de aranhas e ampliando a informação da aracnofauna da região.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Caracterizar bioquímica e biologicamente a peçonha da caranguejeira *Acanthoscurria geniculata* e isolar compostos bioativos.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Obter peçonha bruta da caranguejeira *A. geniculata* por eletroestimulação a partir de exemplares mantidos em cativeiro.
- Analisar a distribuição das massas moleculares das proteínas presentes na peçonha bruta.
- Determinar a DL<sub>50</sub> da peçonha.
- Avaliar a atividade inibitória da peçonha sobre a ECA de mamífero.
- Isolar e caracterizar a estrutura do componente responsável pela atividade inibitória da ECA.
- Determinar a atividade inibitória da ECA do composto purificado.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Coleta dos animais**

Os animais foram coletados pelo método de coletas por terceiros na região de Belterra, Santarém-PA, com a licença 24420-1 para captura e transporte do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Os exemplares capturados foram colocados em potes de plástico e hidratados através de algodão umedecido com água até a chegada ao laboratório. No laboratório os animais são mantidos individualmente em potes plásticos e alimentados semanalmente com insetos. Durante a execução deste trabalho foram coletados aproximadamente 21 exemplares de *A. geniculata* e sua identificação taxonômica foi realizado pelo o especialista em Taxonomia de aranhas, Antonio Brescovit do Instituto Butantan.

### **4.2. Extração da peçonha**

A peçonha da caranguejeira *A. geniculata* foi obtida mensalmente por meio de eletroestimulação utilizando uma fonte de 12 V. Os estímulos elétricos foram aplicados na base da quelícera com intervalos de tempo de 2 segundos. A peçonha advinda da caranguejeira foi armazenada em tubo tipo *ependorff* de 1,5 mL e estocada a -20°C até seu uso.

### **4.3. Dosagem proteica**

#### **4.3.1. Dosagem proteica por espectrofotometria UV**

A concentração proteica da peçonha e dos compostos isolados foi estimada pelo método de espectrofotometria UV nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. Para sua determinação foi utilizada uma solução diluída da peçonha (1:1000) em tampão acetato de amônio 50 mM pH 5,0 (HARRIS E ANGAL, 1989).

#### **4.3.2. Dosagem proteica pelo método do ácido bicinonínico (BCA)**

A concentração de proteína da peçonha também foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA) utilizando um kit comercial de dosagem, *The Thermo Scientific Micro BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, USA), seguindo-se as especificações do fabricante. O método se baseia no princípio das proteínas reduzirem os íons  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  em condições alcalinas, de tal forma que os íons  $\text{Cu}^+$

gerados reagem com o BCA (cor verde) para formar um complexo que apresenta forte absorvância a 562 nm (cor roxo).

Resumidamente, inicialmente foi preparada uma solução 1:1000 de peçonha em tampão acetato de amônio a 50 mM e determinou-se a sua absorvância a 260 e 280 nm. A partir da diluição anterior foram preparadas três amostras da peçonha de 20 µg/mL. Separadamente, uma curva padrão foi realizada por diluições seriadas da proteína padrão, albumina sérica bovina (BSA), no mesmo tampão da peçonha. A faixa de concentração foi de 20 µg/mL até 5 µg/mL de proteína. Após a adição da solução de trabalho ou revelado, a qual contém os íons Cu, as amostras em triplicata foram aquecidas a 60 °C durante 1 hora, centrifugadas durante 5 segundos e lidas sua absorvância a 562 nm. Com os valores da absorvância foi possível obter uma relação linear da absorvância *versus* concentração de proteína em µg/mL, possibilitando o cálculo da concentração de proteína na peçonha bruta (SMITH et al., 1985)

#### **4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)**

A distribuição das massas moleculares dos compostos proteicos na peçonha de *A. geniculata* foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio utilizando o método de Laemmli, (1970). Para a análise foi utilizado um gel de concentração de 12% de bis-poliacrilamida e carregado com 2 µL da peçonha bruta em duplicata. As amostras de peçonha e o padrão de massas moleculares foram misturadas com o tampão da amostra (50 mM Tris-HCl; 50 mM DTT; 2,5% SDS; 10% glicerol; 0.002% azul de bromofenol; pH 6,8), incubadas a 100 °C durante 10 minutos, centrifugadas a 3300 rpm e, subsequentemente, carregadas em poços separados no gel. A condição inicial de corrida foi de 80 volts (150 mA) e depois modificada para 100 volts (180 mA). A imagem do gel foi visualizada e capturada através de scanner.

#### **4.5. Dose Letal 50% (DL<sub>50</sub>) da peçonha de *A. geniculata***

A toxicidade da peçonha de *A. geniculata* foi determinada pela dose letal 50%, ou DL<sub>50</sub>, que é a dose capaz de matar 50% dos animais testados. Para os

testes foram usados grupos de seis camundongos *Swiss* machos e fêmeas, pesando entre 18 e 22 g, provenientes do biotério do Instituto de Ensino Superior de Santarém (IESPES). As doses inoculadas foram de 20; 22,5; 25; 27,5 e 35 mg de peçonha/kg de camundongo. Ao todo foram realizados três experimentos independentes, sendo empregados seis animais para cada dose testada. A peçonha foi dissolvida em solução salina (NaCl 0,9%) até um volume final de 200 µL e injetadas via intraperitoneal (i.p.). O controle consistiu apenas de 200 µL de solução salina. A taxa de sobrevivência dos animais foi observada até 48 h após a inoculação da peçonha. Também foram consideradas as alterações de comportamento, aquelas visíveis nos animais injetados com a peçonha e ausentes nos animais do controle (WHO,1981).

Após o ensaio de toxicidade, os animais foram mortos com CO<sub>2</sub> gasoso e levados para o IESPES para o descarte final. Os valores de DL<sub>50</sub> e os índices de confiança foram calculados usando o teste estatístico probit. A curva foi feita através do programa minitab 17. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais.

#### **4.6. Purificação do composto com atividade inibitória da ECA**

A partir de uma fração denominada FIV, a qual foi obtida previamente pela equipe do laboratório, foram separadas alíquotas e posteriormente sub-fracionadas pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-rp), utilizando o equipamento Accela 600 (Thermo Scientific, USA). Amostras com aproximadamente 284 µg de proteína foram injetadas em uma coluna C18 (4,6 x 250 mm), previamente equilibrada com tampão A (H<sub>2</sub>O + 0,12% de ácido trifluoroacético - TFA). A separação consistiu da aplicação de um gradiente linear de 30% de tampão B (Acetonitrila em TFA 0,1%) em 32 minutos, com monitoramento da absorbância a 215 e 280 nm. As sub-frações obtidas foram repurificadas no mesmo sistema de acordo com o seu perfil de eluição. Posteriormente, o pico isolado foi enviado ao Instituto de Química da USP onde foi determinada sua massa molecular pela técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization – Time of flight*) e sua sequência de aminoácidos por EDMAN, mediante prestação de serviços.

#### 4.7. Determinação da atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA)

Inicialmente a ECA foi obtida de pulmões de camundongos. Para sua obtenção, camundongos *Swiss* foram mortos por deslocamento cervical e em seguida, foram retirados os pulmões. Os pulmões foram lavados em solução tampão pH 7 contendo 50 mM Tris-HCl; 0,3 M NaCl; 10 mM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1mM PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) e 0,2 mM iodoacetamida. Após a lavagem, os pulmões foram macerados no mesmo tampão. A suspensão de tecido foi centrifugada a 8960 x g e 4 °C durante 7 minutos. O sobrenadante foi filtrado com membrana de 20 µm e lidas as unidades de absorbância a 280 nm. O extrato contendo a enzima foi armazenado a 4 °C até seu uso.

A determinação da atividade inibitória da ECA foi realizada adicionando 10 µL da solução do substrato *furanacryloyl-L-phenylalanyl-glycyl-glycine* (FAPGG) em tampão (100 mM ácido bórico; 300 mM NaCl; pH 7,5 ) a 290 µL de tampão de enzima (50 mM Tris-HCl; 0,3 M NaCl; 10 mM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; pH 7) e 200 µL extrato de pulmão de camundongo contendo 24,22 UA para um volume final de 500 µL. Posteriormente, as reações foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e após a incubação a reação foi parada adicionando 350 µL de metanol e incubada por 10 minutos. Após os 10 minutos, foram adicionados 650 µL de água ultrapura (18 MΩ) e em seguida, centrifugadas a 8960 x g e filtradas em membrana de 0,22 µm.

Na sequência, volumes de 1000 µL da solução filtrada foram analisados por CLAE-rp para o monitoramento da hidrólise do FAPGG em *furanacryloyl-L-phenylalanine* (FAP) seguindo a metodologia de LAHOGUE et al. (2010), com modificações. Para o ensaio foram utilizados os comprimentos de onda de 306 nm e 340 nm, pH do tampão do substrato e tampão de enzima de 7,0 e foi empregado uma coluna C18 (4,6 x 250 mm) com um sistema de dois solventes: (A) 0,12% de TFA em água e (B) 0,1% de TFA em acetonitrila.

A velocidade hidrolítica da ECA foi determinada em triplicata utilizando 5,74 nmol/mL de FAPGG (Santa Cruz Biotechnology, USA) e 24,22 UA de extrato da enzima nos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos com um volume final de reação de 1 mL.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Coleta e manutenção dos animais

Durante a execução deste trabalho foram coletadas 15 fêmeas e 6 machos de *A. geniculata*. Estes animais são mais facilmente encontrados durante a época de chuva em Santarém, o que coincide com o período de acasalamento.

Em cativeiro, foi observado que os machos sobrevivem menos tempos do que as fêmeas e se alimentam pouco.

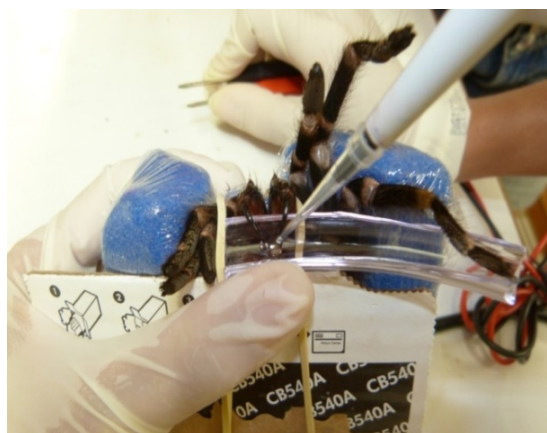
### 5.2. Extração da peçonha

A extração da peçonha foi realizada por eletroestimulação em todos os exemplares coletados, porém apenas a peçonha extraída dos exemplares fêmeas de *A. geniculata* (figura 4) foi utilizada para a realização deste trabalho. O volume total coletado da peçonha foi de aproximadamente 1 mL, sendo que cada adulto de *A. geniculata* produz em média de 30 a 50  $\mu\text{L}$  de peçonha, quantidade esta que pode ser considerada como boa quando comparado com outros invertebrados peçonhentos, como os escorpiões.

A peçonha de *A. geniculata* é um líquido incolor e pouco viscoso, diferentemente das peçonhas de escorpiões que, geralmente, são opalescentes e altamente viscosas (CARVALHO, 2017). Outra diferença entre estes animais está relacionada com a quantidade de peçonha produzida. Os escorpiões produzem menos peçonha. Por exemplo, a espécie *Rhopalurus amazonicus*, endêmica da região de Santarém, produz de 0,1  $\mu\text{L}$  a 3  $\mu\text{L}$  de peçonha por animal. Enquanto que o escorpião *Tityus obscurus*, conhecido como o escorpião preto da Amazônia, produz de 2 a 10  $\mu\text{L}$  de peçonha por animal, como observado por nosso grupo de pesquisa.

Curiosamente, observamos que a primeira extração da peçonha em aranhas mantidas em cativeiro gera um volume bem maior, volume que diminui no decorrer das extrações. Fato que pode ser justificado pela mudança do habitat original associado ao estresse que o animal experimenta no momento da extração da peçonha. No seu habitat, as aranhas expelem sua peçonha por vários fatores externos, como a predação ou como mecanismo de defesa (ESCOUBAS; RASH, 2004). Por fim, vale mencionar que o método de eletroestimulação é comumente utilizado para artrópodes e, segundo Oukkache et al. (2013), ele garante maior

quantidade de peçonha com menos contaminação de hemocianina, além de minimizar o estresse do animal causado durante a extração.



Fonte: Autores (2014)

**Figura 4- Extração da peçonha de *A. geniculata* pelo método de eletroestimulação.**

### 5.3. Dosagem proteica

A Tabela 1 mostra os valores obtidos na determinação da concentração de proteína da peçonha bruta pelos métodos espectrofotométricos na faixa do ultravioleta e do visível pelo ácido bicinconínico (BCA). Nela, o valor obtido pela leitura da absorbância a 280 nm foi de 315 mg/mL, enquanto que pelo método colorimétrico do BCA foi de 121 mg/mL. Como pode ser observado, a leitura a 280 nm foi quase três vezes o valor determinado pelo método padronizado do ácido bicinconínico. A superestimação na concentração de proteína por este último método é originada pela absorção de outros constituintes não proteicos como nucleotídeos e acilpoliaminas, presentes na peçonha, e que também absorvem a 280 nm ou próximos a este comprimento de onda. Outra desvantagem do método por UV é a limitante de ler apenas aminoácidos com anéis aromáticos como o triptofano, a tirosina e a fenilalanina, além da cisteína (ZAIA et al., 1998).

Pelo anterior, e visando obter um valor na concentração de proteína mais próximo do real foi dosada a peçonha pelo método de BCA, que utiliza a proteína albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão. O método de BCA apresenta alta estabilidade e sensibilidade, com níveis de detecção entre 0,5 µg/mL e 200 µg/mL de proteína, porém este procedimento tem como desvantagens a perda total

da amostra, devido à reação colorimétrica, e o emprego de maior tempo para sua execução.

Para relacionar estes dois métodos de quantificação proteica foi calculado, para uma mesma solução, um fator numérico de conversão entre a concentração determinada pelo método de BCA e a concentração por UV a 280 nm (Equação 1). Este cálculo gerou um valor de 0,348 para o referido fator, o que significou que por cada unidade de absorbância a 280 nm lida, de nossa amostra, teremos uma concentração de 0,348 mg/mL de proteína, correspondendo ao que se obteria por BCA. Dessa maneira, o valor de 315, obtido por UV<sub>280nm</sub>, multiplicado pelo fator de 0,348 nos gerou o valor de proteína por BCA de 121 mg/mL (tabela 1). Assim, utilizando este fator calculamos, de maneira mais próxima ao valor real, a concentração de proteína da peçonha utilizando apenas a leitura a 280 nm sem perder a amostra.

Na peçonha também foram quantificados nucleotídeos e acilpoliaminas pela leitura a 260 nm. O valor para estes constituintes foi de 157 mg/mL.

**Tabela 1-** Quantificação de proteína da peçonha de *A. geniculata*

<b>M É T O D O</b>		
<b>Espectrofotometria – UV</b>		<b>BCA – VIS</b>
$\lambda$ (260 nm)	$\lambda$ (280 nm)	$\lambda$ (562 nm)
<b>157,1 mg/mL</b>	<b>315 mg/mL</b>	<b>121 mg/mL</b>

Fonte: Autores (2018)

$$\text{Fator da peçonha} = \frac{[BCA]}{A_{280 \text{ nm}}} = \mathbf{0,348} \quad \text{Eq. (1)}$$

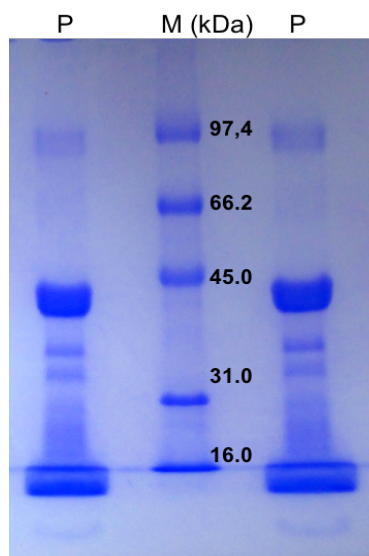
A concentração proteica das peçonhas de caranguejeiras é muito variável, por exemplo, para a espécie *Avicularia juruensis* foi publicado o valor de 11,2 mg/mL de proteína (AYROZA, 2012), enquanto que o dado para a espécie

*Aphonopelma hentzi* foi de 200 mg/mL de proteína (SCHANBACHER et al., 1973). A concentração de proteína da peçonha de *A. hentzi* é próxima da concentração presente na peçonha de *A. geniculata*, e quando comparado com o valor de *A. juruensis*, ele é 10 vezes maior.

Entretanto, quando comparada com a concentração de proteínas das peçonhas de aranhas Araneomorphae, estas últimas geralmente possuem uma concentração proteica menor, por exemplo a espécie *Lasiodora* sp. possui 4,53 mg/mL e a espécie *Latrodectus* sp. tem 10,15 mg/mL de proteína (FERREIRA et al., 2016; RUEDA; REALPE; URIBE, 2017). Provavelmente a diferença da concentração nas peçonhas de caranguejeiras pode estar relacionada diretamente no seu hábito alimentar e nicho ecológico.

#### **5.4. Análise da distribuição das massas moleculares dos componentes proteicos da peçonha de *A. geniculata***

A peçonha bruta de *A. geniculata* foi separada por eletroforese utilizando um gel de 12% de poliacrilamida (SDS-PAGE). No perfil são observadas bandas que migram entre 97 e 45 kDa, correspondentes às proteínas de alta massa molecular (Figura 5). Nesta faixa, uma banda intensa aparece abaixo de 45 kDa que corresponde à hialuronidase, enzima ubíqua nas peçonhas de invertebrados. Outras duas bandas intensas aparecem no perfil entre 45 e 31 kDa, que até o momento não foram identificadas, e também não aparecem em outros perfis de peçonhas de caranguejeiras (GARCIA-ARREDONDO et al., 2015). Na peçonha é observada uma banda alargada e intensa migrando com a frente do tampão da amostra, correspondente aos componentes de baixa massa molecular ou peptídeos. Finalmente, no final das amostras aparece também uma banda fracamente corada correspondente aos componentes peptídicos de menor massa molecular.



Fonte: Autores (2017)

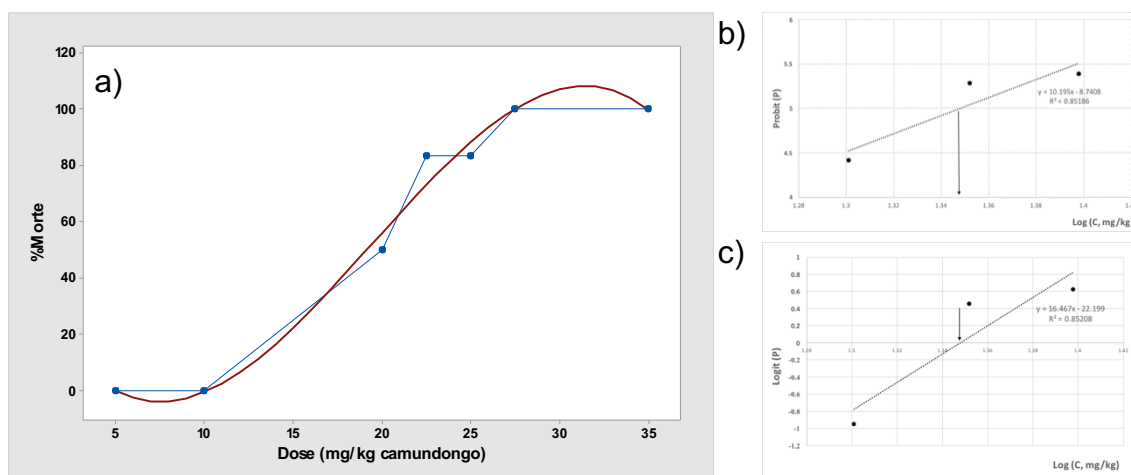
**Figura 5. Perfil eletroforético da peçonha bruta de *A. geniculata*.** As linhas identificadas como P, correspondem a 2 µL de peçonha bruta (242 µg de proteína total). A linha identificada como M, corresponde ao marcador de proteína. O gel foi corado com uma solução de azul de Coomassie R-250.

As peçonhas do gênero *Acanthoscurria* possuem similaridades no seu perfil de bandas de proteínas em gel SDS-PAGE. A peçonha de *A. natalensis*, possui bandas de alta massa molecular e um alto conteúdo de componentes de baixa massa molecular que correspondem aos peptídeos (BORGES, 2008).

Os perfis eletroforéticos de peçonhas de outros gêneros de caranguejeiras também mostram similaridades no padrão de distribuição de massas moleculares em gel de poliacrilamida, por exemplo, a peçonha das espécies *Ceratogyrus darlingi* e *Poecilotheria regalis* possuem bandas proteicas de alta massa molecular distribuídas, entre 45 e 100 kDa, e bandas intensas abaixo de 10 kDa, similares ao padrão de *A. geniculata* (GARCÍA-ARREDONDO et al., 2015). Esses dados evidenciam que o padrão de proteínas entre as peçonhas de caranguejeiras é altamente conservado e que os componentes majoritários destas peçonhas são os peptídeos.

### 5.5. DL<sub>50</sub> da peçonha de *A. geniculata*

O valor da DL<sub>50%</sub> para a peçonha de *A. geniculata* foi de 22,4 mg/kg de camundongo com desvio padrão de  $\pm 2,8$  (figura 6). Este valor foi calculado utilizando os modelos de regressão de Logit e Probit (figura 6). A DL<sub>50</sub> encontrada para a peçonha de *A. geniculata* foi semelhante ao encontrado para a peçonha da *A. paulensis*, cujo valor da DL<sub>50</sub> foi de  $25,42 \pm 2,42$  mg/kg de camundongo (MOURÃO et al., 2013). No entanto, ambos valores são muito superiores às encontradas para as peçonhas de caranguejeiras consideradas de importância médica como a espécie australiana *Atrax robustus* e a espécie brasileira *Trechona venosa*, cujas peçonhas apresentaram DL<sub>50</sub> de 0,2 mg/kg e 0,03 mg/kg, respectivamente (KAIRE, 1963; VELLARD, 1925).



Fonte: Autores (2017)

**Figura 6. Determinação da toxicidade da peçonha de *A. geniculata* em camundongo.** (a) Curva dose resposta da toxicidade da peçonha, via i.p., em camundongos; (b) Determinação da DL<sub>50</sub> pelo método de Probit e (c) pelo método de Logit.

Podemos destacar que as espécies de aranhas verdadeiras que podem causar envenenamento grave no ser humano e consideradas de importância médica pela Organização Mundial da Saúde possuem valores de DL<sub>50</sub> muito menor ao encontrado para a peçonha de *A. geniculata*. Elas todas pertencem à Infraordem Aranemorphae e aos gêneros *Latrodectus*, *Loxocoles* e *Phoneutria* (CARDOSO et al., 2009). A espécie *Latrodectus mactans* mostrou uma DL<sub>50</sub>, em mamíferos, de 0,26 mg/kg (DALY et al., 2001). A DL<sub>50</sub> da peçonha da espécie *Loxocoles intermedia* em mamífero foi de 0,48 mg/kg (SILVESTRE et al., 2005). Bucherl, (1953) em seus

estudos detectou que a DL<sub>50</sub> da peçonha da espécie *Phoneutria bahiensis* foi de 0,67 mg/kg.

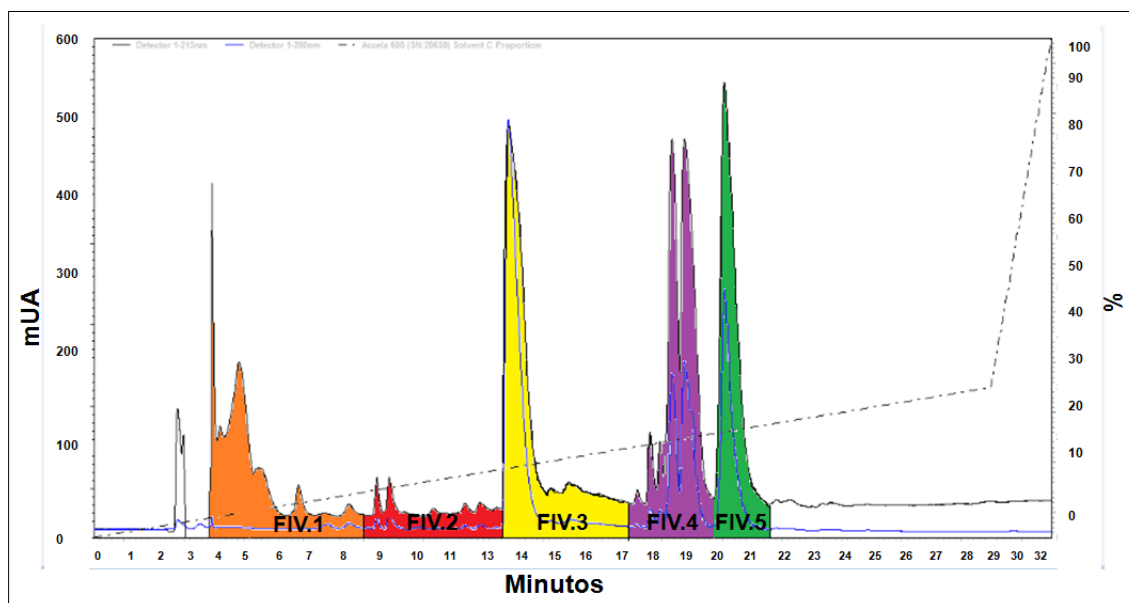
Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN, em 2016 foram registrados no Brasil 11.500 casos de acidentes com espécies desses três gêneros de aranhas e, desse total, 59 casos foram registrados somente no estado do Pará. Porém, acidentes com aranhas caranguejeiras são raros, pois estas constroem suas tocas embaixo do solo em florestas fechadas. Segundo Moura et al., (2017), entre os anos de 2006 e 2016 foram relatados 151 acidentes com aranhas e segundo a plataforma iDoutor em três hospitais de Manaus-AM, apenas 7,2% desses casos ocorreram por caranguejeiras.

Pelas considerações anteriores, a peçonha de *A. geniculata* provavelmente não causa envenenamentos graves em humanos, devido possuir uma DL<sub>50</sub> maior do que a das espécies consideradas de importância médica, além do animal não apresentar risco para o homem uma vez que tem hábitos subterrâneos.

## **5.6. Purificação bioguiada e obtenção de compostos puros**

O presente trabalho fez parte de um projeto maior, denominado Bioprospecção de novas moléculas antimicrobianas do gênero *Acanthoscurria* e *Avicularia* da região Amazônica: alternativas biotecnológicas e ferramentas em pesquisa básica, e dentro do desenvolvimento do mesmo, prévio ao desenvolvido deste TCC, foram realizados experimentos, como a cromatografia de exclusão molecular à gravidade da peçonha de *A. geniculata*, que levaram à obtenção de várias frações. Uma delas, a fração FIV mostrou ter atividade inibitória da ECA.

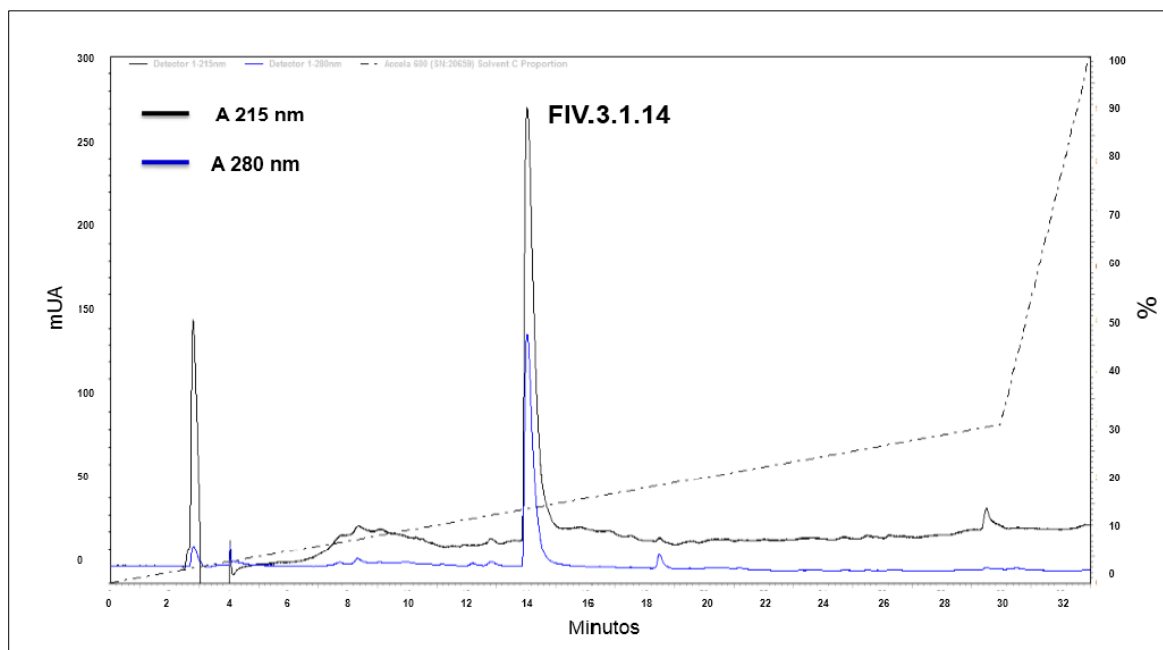
Neste trabalho, a fração FIV foi subfracionada por CLAE-rp e obtidas cinco subfrações denominadas de FIV.1 (eluição de 2 a 9 min); FIV.2 (de 9 a 13 min); FIV.3 (de 13 a 18 min); FIV.4 (de 18 a 20 min) e FIV.5 (de 20 a 23 min), como mostrado na figura 7 onde cada subfração foi destacada com uma cor diferente. O subfracionamento foi padronizado com uma quantidade de 284 µg da fração FIV. Para a obtenção de quantidade suficiente de material foram realizadas aproximadamente 60 corridas ao longo da pesquisa. As frações foram coletadas manualmente em tubos *falcons* e, posteriormente, liofilizadas, ressuspendidas com 500 µL de água ultrapura (18,2 MΩ) e quantificada sua concentração proteica por espectrofotometria UV.



Fonte: Autores (2016)

**Figura 7. Perfil cromatográfico da fração FIV da aranha *A. geniculata*.** O monitoramento da CLAE-rp foi realizado em dois comprimentos de onda, a 215 nm (linha em preto) e a 280 nm (linha em azul). O gradiente de acetonitrila está representado pela linha tracejada. As subfrações coletadas foram numeradas de FIV.1 a FIV.5 e encontram-se destacadas em cores.

Testes *in vitro* evidenciaram que a fração FIV.3 foi a que teve maior efeito inibitório sobre a ECA e, portanto, esta fração foi posteriormente repurificada (figura 8). A repurificação ocorreu nas mesmas condições de separação da fração FIV. Foram realizadas 40 repurificações, sendo estas liofilizadas e quantificadas por UV. É importante destacar que o peptídeo isolado não possui pontes de sulfeto, causando assim, muita instabilidade na molécula quando este é manuseado nos processos laboratoriais. Por isso, requer muito cuidado no processo de sua purificação, já que uma vez desnaturado perde totalmente sua atividade biológica.



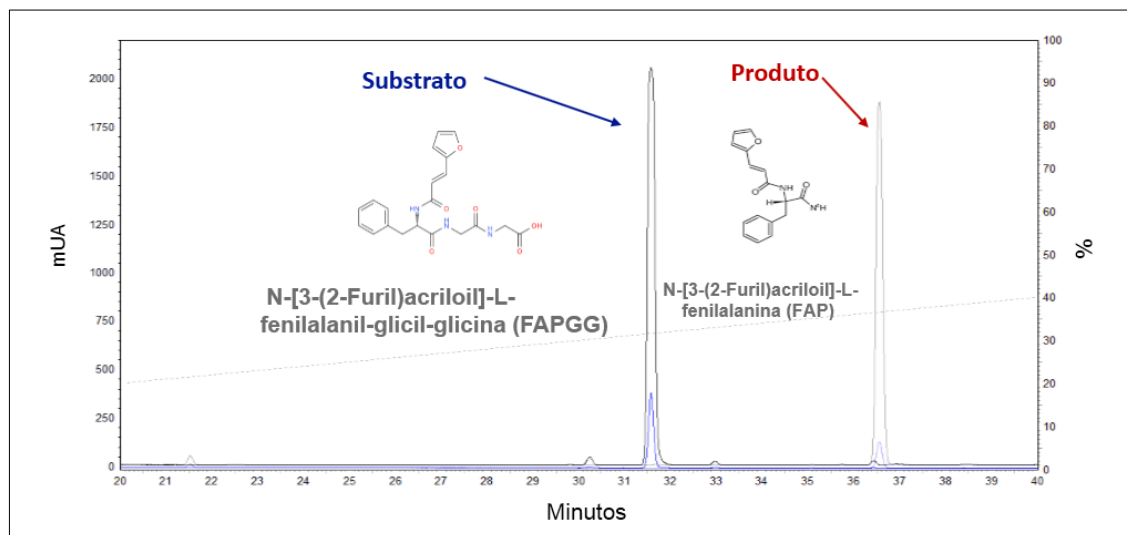
Fonte: Autores (2017)

**Figura 8. Cromatograma do peptídeo inibidor (FIV.3.1.14).** A análise de pureza do peptídeo inibidor mostrou que ele tem um tempo de eluição de 14 minutos, utilizando um gradiente linear de 30% de ACN em 28 min.

### 5.7. Atividade inibitória da ECA pela peçonha de *A. geniculata*.

A determinação da atividade inibitória da ECA foi inicialmente testada utilizando a metodologia descrita por MURRAY et al. (2004). Após vários experimentos, esta metodologia foi descartada devido a não reprodutibilidade da sensibilidade para a detecção do substrato a 340 nm. Com o intuito de estabelecer o comprimento de onda característico do substrato foi realizada uma varredura na faixa do UV-Vis, de 200 a 750 nm, do substrato FAPGG. O espectro gerado mostrou que o substrato FAPGG apresenta um máximo de absorvância em 306 nm, e desta forma, foi selecionado este valor para quantificar a atividade inibitória. Também foi mantido o comprimento de 340 nm sugerido por MURRAY et al. (2004) para comparar a sensibilidade da detecção. Os tempos de retenção do substrato e o produto da hidrólise do mesmo, FAP, foram determinados independentemente por CLAE-rp, sendo que os tempos de retenção foram de 31 minutos para o FAPGG e de 36 minutos para o FAP, como mostrado na figura 9. Assim, o substrato e o produto são separados com boa resolução nas condições do ensaio (figura 11). O

FAPGG foi usado na quantidade de 5,7 nmol, essa quantidade em nossos testes foi suficiente para sua detecção.

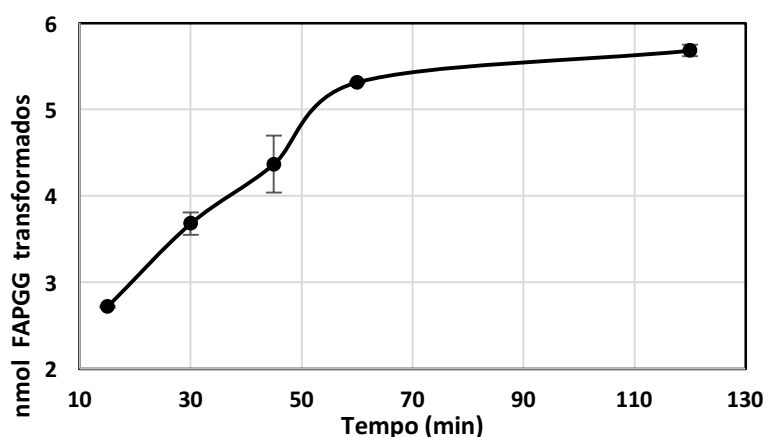


Fonte: Autores (2017).

**Figura 9 - Tempos de eluição do FAPGG e FAP.** Perfis cromatográficos sobrepostos do substrato (FAPGG) e do produto (FAP).

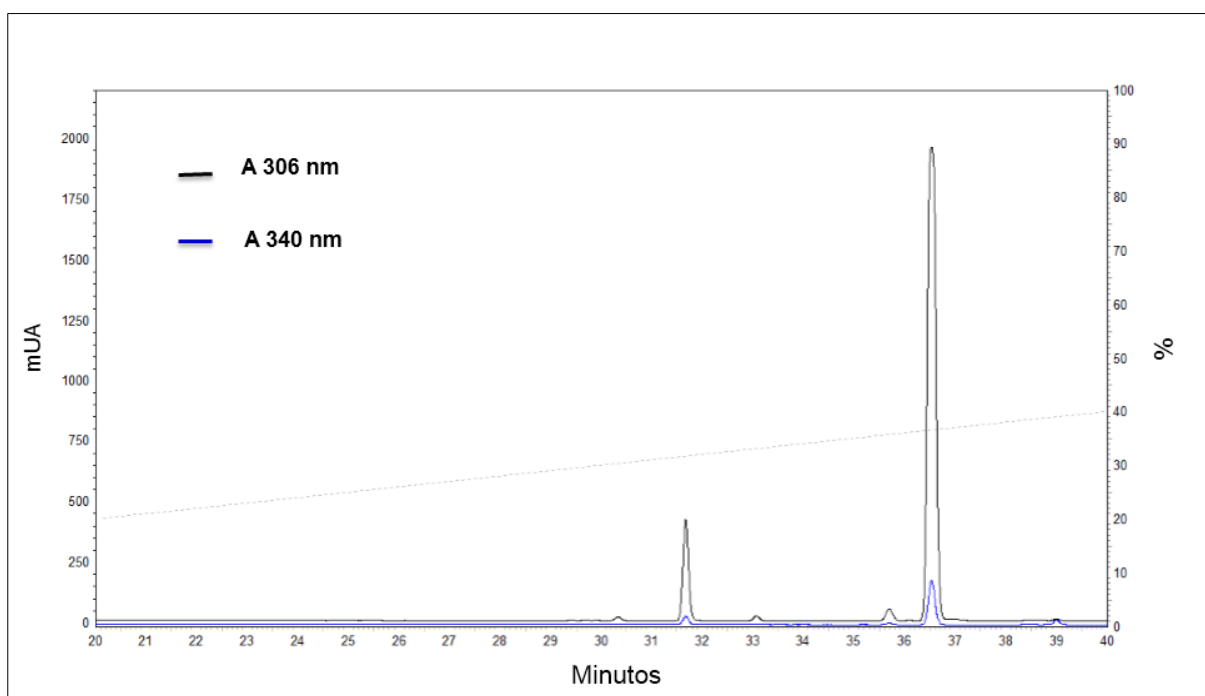
Os resultados dos experimentos para a determinação da velocidade inicial da atividade da enzima mostraram que esta é praticamente constante entre 15 e 30 minutos, como mostrado na figura 10, no qual o comportamento é linear. Com isso, adotou-se o tempo de 30 minutos como padrão para os nossos testes. Como controle positivo da inibição foi usado o Captopril (Santa Cruz Biotechnology) na quantidade de 218 ng. A figura 12 mostra que este fármaco inibiu completamente a ECA, pois o FAP não foi formado. A  $IC_{50}$  do Captopril, quantidade necessária para inibir 50% a atividade da enzima ECA, foi reportada por Lahogue et al. (2010) no valor de  $0,19 \pm 0,09$  ng.

Os testes da inibição da ECA pela peçonha de *A. geniculata* foram realizados em triplicatas com volumes de 1  $\mu$ L, 2  $\mu$ L e 5  $\mu$ L de peçonha bruta. Como mostrado na figura 13, a inibição na formação do FAP foi dependente do volume da peçonha (quantidade) e eles foram reprodutíveis em todas as concentrações testadas.



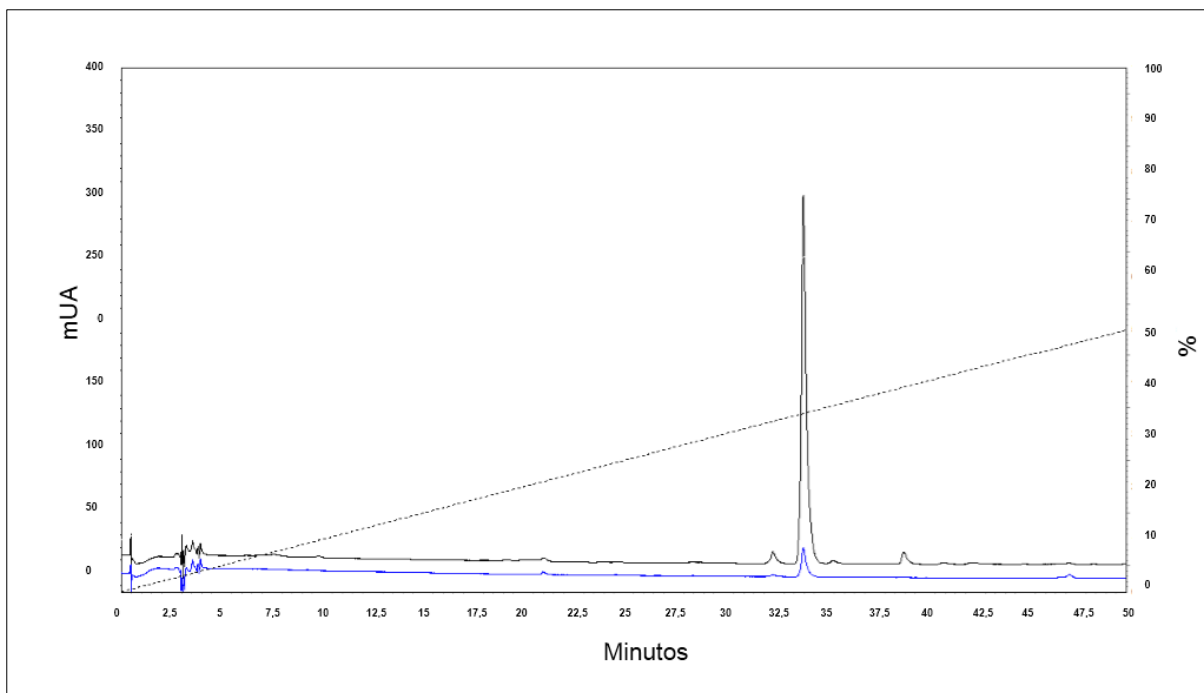
Fonte: Autores (2017).

**Figura 10 - Curva da velocidade da ECA.** O gráfico mostra que a velocidade da enzima apresentou um comportamento linear no intervalo dos primeiros 50 min. Portanto, o tempo dos ensaios enzimáticos foi estabelecido em 30 minutos e utilizando uma quantidade de 5,7 nmol de FAPGG.



Fonte: Autores (2017).

**Figura 11 - Hidrólise do FAPGG pela ECA.** A reação de hidrólise do FAPGG pelo extrato de pulmão (ECA) de camundongo foi evidenciada pela maior intensidade do pico correspondente ao produto FAP, dentro das condições estabelecidas da reação.



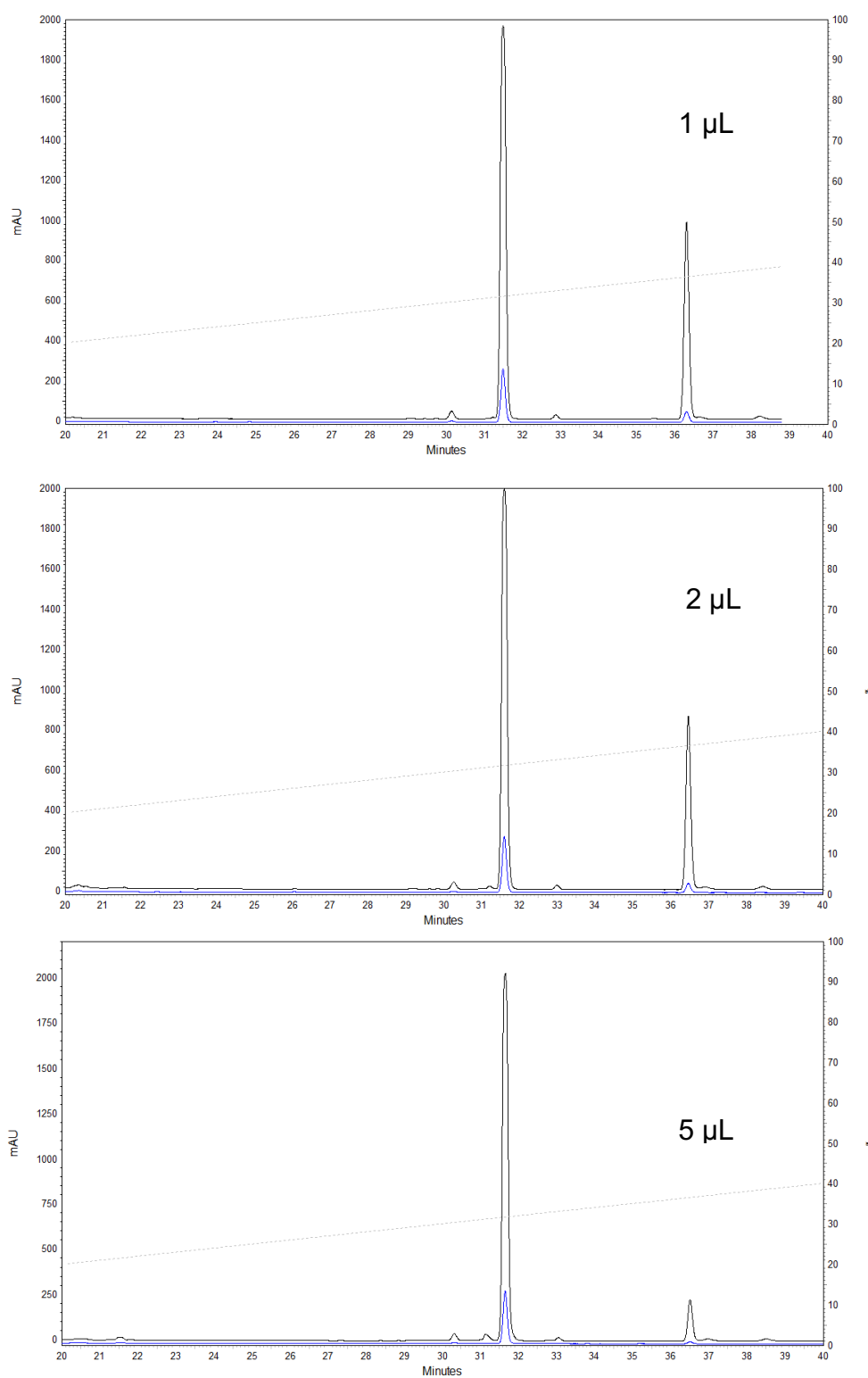
Fonte: Autores (2017).

**Figura 12 - Inibição da ECA pelo medicamento Captopril.** O medicamento Captopril, na quantidade de 218 ng, inibiu quase completamente a atividade do extrato, uma vez que no cromatograma aparece apenas um pequeno sinal do produto FAP.

Uma vez que a composição proteica da peçonha de caranguejeiras é constituída de misturas complexas de peptídeos, proteínas, acilpoliaminas, etc. (ESCOUBAS et al., 2006) foi realizada a purificação bioguiada para a identificação da molécula inibitória. Desta forma, a partir da fração FIV foi purificado o pico FIV 3.1.14, o qual inibiu completamente a atividade da ECA de pulmão de camundongo, utilizando-se uma quantidade de 20 µg deste pico (figura 14).

A caracterização da massa molecular pela técnica de MALDI-TOF mostrou um valor 8581,2 Da. Contudo, no espectro se evidenciam outros picos produtos da ionização múltipla da amostra (figura 15).

Estes resultados alcançados com a peçonha da caranguejeira *A. geniculata* são ainda preliminares. Experimentos finais precisam ser realizados para caracterizar a atividade inibitória da peçonha e do peptídeo, calcular o valor da  $IC_{50}$  tanto da peçonha quanto do peptídeo e caracterizar estruturalmente o peptídeo inibidor, uma vez que os peptídeos inibidores da ECA, até agora isolados de animais peçonhentos, apresentam massas moleculares ao redor de 1,5 kDa, diferentemente do peptídeo isolado neste trabalho que é de 8 kDa



Fonte: Autores (2017)

**Figura 13 - Inibição da ECA pela peçonha de *A. geniculata*.** Os perfis cromatográficos acima mostram a redução no sinal do FAP a medida que se incrementa a quantidade de peçonha adicionada na reação de inibição. O efeito inibitório foi de aproximadamente 50% utilizando 1 µL de peçonha, e quase teve total inibição quando utilizado 5 µL.



## 6. CONCLUSÃO

A caranguejeira amazônica *A. geniculata* tem grande porte e setae extremamente urticantes. Espécimes em cativeiro produzem mensalmente entre 30 a 50  $\mu$ L de peçonha por animal.

A peçonha é um líquido incolor, pouco viscosa e possui concentração média de proteína em 121 mg/mL calculada pelo método colorimétrico do ácido bicinconínico (BCA).

A análise por eletroforese da peçonha bruta comprovou ter compostos de alta massa molecular distribuídos entre 97 a 31 kDa e elevado conteúdo de compostos de natureza proteica de baixa massa molecular, distribuídos abaixo de 16 kDa.

A  $DL_{50}$  da peçonha, calculada por análise de Probit, foi de  $22,4 \pm 2,8$  mg/kg de camundongo.

Ensaio enzimáticos demonstraram que a peçonha possui atividade inibitória sobre a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) de camundongo.

A separação da peçonha de *A. geniculata* por cromatografia de exclusão molecular gerou quatro frações. A fração FIV mostrou ser letal para mamíferos na dose de 100 mg/kg de camundongo (dados obtidos por outros trabalhos do Laboratório).

Da fração FIV, foi isolado um peptídeo inibidor da ECA. Este peptídeo inibidor da peçonha de *A. geniculata* se configura como o primeiro relato de um inibidor da ECA obtido da peçonha bruta de caranguejeira.

O peptídeo purificado, denominado FIV.3.1.14, não possui atividade hemolítica (dados obtidos no laboratório), tem massa molecular de 8581,2 Da e a elucidação da sua sequência está em andamento.

Desta forma, o presente trabalho é o primeiro relato para a peçonha de *A. geniculata*, aranha comumente encontrada na região Oeste do Pará, a presença de um peptídeo hipotensor em peçonha de caranguejeira, constitui-se o primeiro relato na literatura. Sabe-se que as peçonhas de aranhas são uma rica fonte de compostos biologicamente ativos e este novo peptídeo torna-se uma possível ferramenta para o estudo de fármacos anti-hipertensivos.

## REFERÊNCIAS

Acidentes por animais peçonhentos: **Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>>. Acesso em 27 de abril, 2018.

ArachnoServer 3.0. Disponível em: <[www.arachnoserver.org/mainMenu.html](http://www.arachnoserver.org/mainMenu.html)> Acesso em: 10 de maio, 2018.

AYROZA, Gabriela. **Peptídeos antimicrobianos do veneno de *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae, Theraphosidae)**. 2012. 99 f. Tese (Mestrado) em Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de São Paulo, São Paulo, 2012.

BONALDO, A. B. et al. 2009. Inventário e história natural dos aracnídeos da Floresta Nacional de Caxiuanã. In: LISBOA, P. L. B. (Org.). Caxiuanã: desafios para a conservação de uma Floresta Nacional na Amazônia. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. p. 577-621.

BORGES, Carlos Liverton da Silva. **Purificação e caracterização biológicas parciais da peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria natalensis***. 2008. 29 f. Tese (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2008.

BRAND, G. D. et al. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hipochondrialis*. **The International Journal of Peptide**, v. 27, p. 2137-2146, 2006.

BUCHERL, Wolfgang. Escorpiões e Escorpionismo no Brasil. I: LD50 dos venenos de *Tityus serulatus* e *bahiensis*. **Mem.Inst. Butantan**. v. 25, p. 83-108, 1953.

CARDOSO, João Luiz Costa. et al. Capítulo 2, Aracnidismo. In: Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: **Editora Savier**, 2009. v. 2, p. 155-195.

CARVALHO, Brenna Celina Ferreira. **Isolamento e caracterização bioquímica e biológica de um peptídeo antimicrobiano extraído da peçonha do escorpião *Tityus obscurus* Gervais 1843 (Scorpiones, Buthidae)**. 2017. f. 44. Tese (mestrado) - Programa em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, Pará, 2017.

DALY, F. F. et al. Neutralization of *Latrodectus mactans* and *L. hesperus* venom by redback spider (*L. hasseltii*) antivenom. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 39, p. 119-23, 2001.

DE GASPARO, M. et al. International Union of pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. **Pharmacol Reviews**, v. 52, p. 415-72, 2000.

ESCOUBAS, Pierre, DIOCHOT, S.; CORZO, G. Structure and Pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie**, v. 33, p. 893-907, 2000.

ESCOUBAS, Pierre; RASH, Lachlan. Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. **Toxicon**, v. 43, p. 555-574, 2004.

ESCOUBAS, Pierre; SOLLID, Brianna; KING, Glenn. F. Venom landscapes: Mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. **Toxicon**, v. 47, p. 650-663, 2006.

ESTRADA, G.; VILLEGAS, E., CORZO, G. Spider venoms: a rich source of acypolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 145-161, 2007.

FOELIX, R. S. Biology of spiders. 2ed. New York: Oxford University Press. 1996.

FERREIRA, Sérgio Henrique. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **British Journal of Pharmacology**, v. 24, p. 163-9, 1965.

FERREIRA, L. A. F.; ALVES, E. W.; HENRIQUES, O. B. Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 31, p. 941-7, 1993.

FERREIRA, L. A. F. et al. Isolation and characterization of a bradykinin potentiating peptide (BPP-S) isolated from *Scaptocosa raptorial* venom. **Toxicon**, v. 34, p. 599-603, 1996.

FERREIRA, F. R. et al. Evolution of antimicrobial, cytotoxic and hemolytic activities from venom of the spider *Lasiadora* sp. **Toxicon**, v. 122, p. 119-126, 2016.

FINLAYSON, M. H.; et al. *Harpactirella lightfooti* as a cause of spider-bite in the Union. **South African Medical Journal**, v. 13, p. 808-809, 1939.

GARCÍA-ARREDONDO, A. et al. Pharmacological characterization of venoms from three theraphosid spiders: *Poecilotheria regalis*, *Ceratogyrus darlingi* and *Brachypelma epicureanum*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, p. 1-9, 2015.

KAIRE, G.H. Observations on some funnel-web spiders (*Atrax* species) and their venoms, with particular reference to *Atrax robustus*. **The Medical Journal of Australia**, v. 2, p. 307-311, 1963.

KODAMA, Roberto Tadashi. **Análise dos constituintes de baixa massa molecular de quatro venenos do gênero *Bitis* e suas atividades biológicas**. 2015. 64 f.

Tese (Mestrado) em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

KURTZ, A; WAGNER C. Cellular control of renin secretion. **Journal Experimental Biological**, v. 202, p. 219-25, 1999.

HARRIS, E. L. V.; ANGAL, S. Protein purification methods: a practical approach. **IRL Press** - Oxford University, Oxford, p. 317, 1989.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAHOUE, Veronique. et al. A HPLC-UV Method for the determination of angiotensin i-converting enzyme (ace) inhibitory activity. **Food Chemistry**, v. 118, p. 870–875, 2010.

McANENA, L.; MURPHY, C.; CONNOR, J. O. “Tarantula Keratitis” a case report. **Journal Med. Science**, v. 182, p. 349-350, 2013.

MOURA, Valéria Mourão et al. Spider bites in Manaus, Western Brazilian Amazon: a Hospital-based clinical and epidemiological characterization and factors related to underreporting. In. Congresso of the Brazilian Society of Toxinology, XIV, 2017, Florianópolis-SC. Anais Toxinology in a comprehensive approach: from animal biology to toxins, envenomation and treatment, 2017, p. 130-131.

MOURÃO, Carolina Barbosa. et al. Venomic and pharmacological activity of *Acanthoscurria paulensis* (Theraphosidae) spider venom. **Toxicon**, v. 61, p. 129-138, 2013.

MURRAY, B. A; WALSH, D. J; FUTZGERALD, R. J. Modification of the furanacryloyl-L-phenylalanyl-glycylglycine assay for determination of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. **Jornal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 59, p. 127-137, 2004.

NYFFERLER, Martin; BIRKHOFER, Klaus. An estimated 400-800 million of prey are killed by the global spider community. **The Sciencer of Nature**, v. 104, p. 1-12, 2017.

ONDETTI, M. A.; RUBIN, B.; CUSHMAN, D. W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. **Science**, v. 196, p. 441-444, 1977.

OTTONI, Christiano. Capítulo I, Aranhas. In: Plantas e animais de importância médica. Belo Horizonte-MG: **Editora Coopmed**, p. 3-17, 2009.

OUKKACHE, N. et al. Comparison between two methods of scorpion venom milking in Morocco. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 19, p. 1-5, 2013.

PAULA, Felipe dos S. et al. On the Brazilian Amazonian species of *Acanthoscurria* (Araneae: Theraphosidae). **Zoologia**, v. 31, p. 63-80, 2014.

PECHMANN, Matthias; PRPIC, Nikola-Michael. Appendage patterning in the South American bird spider *Acanthoscurria geniculata* (Araneae: Mygalomorphae). **Development Genes and Evolution**, v. 219, p. 189-198, 2009.

PEREIRA, Lourivaldo S. et al. Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 352, p. 953-959, 2007.

PLATNICK, Norman I. The world Spider Catalog Version 15. **American museum of Natural history**, v. 15, p. 1-26, 2015.

RASH, L. D.; HODGSON, W. C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**, v. 40, p. 225-254, 2002.

RATES, B. et al.  $\mu$ -Theraphotoxin-An1a: Primary structure determination and assessment of the pharmacological activity of a promiscuous anti-insect toxin from the venom of the tarantula *Acanthoscurria natalensis* (Mygalomorphae, Theraphosidae). **Toxicon**, v. 70, p. 123-134, 2013.

RICILUCA, K. C. T. et al. Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. **Results in Immunology**, v. 2, p. 66-71, 2012.

ROCHA e SILVA, M.; BERALDO, Wilson T.; ROSENFELD, G. Bradykinin hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulins by snake venoms and by trypsin. **American Journal of Physiology**, v. 156, p. 261-277, 1949.

RUEDA, A.; REALPE, E.; URIBE, A. Toxicity evaluation and initial characterization of the venom of a Colombian *Latrodectus* sp. **Toxicon**, v. 125, p. 53-58, 2017.

SILVA, Ismael Pedro Junior; DAFFRE, Sirlei; BULET Philippe. Isolation and Characterization of Gomesin, an 18-Residue Cysteine-rich Defense Peptide from the Spider *Acanthoscurria gomesiana* Hemocytes with Sequence Similarities to Horseshoe Crab Antimicrobial Peptides of the Tachyplesin Family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 33463 -33470, 2000.

SILVESTRE, F. G. et al. Characterization of the venom from Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). **Toxicon**, v. 46, p. 927-936, 2005.

SCHANBACHER, F. L. et al. Composition and properties of tarantula *Dugesiella hentzi* (Girard) venom. **Toxicon**, v. 11, p. 21-9, 1973.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem**, v. 150, p. 76-85, 1985.

VELLARD, J. Um novo gênero e duas espécies novas de aranha do estado de São Paulo. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 2, p. 78–84, 1925.

WALTER, André. et al. On the Brazilian Amazonian species of *Acanthoscurria* (Araneae: Theraphosidae). **BMC Genomics**, v. 18, p 1-13, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. **WHO off set publication**, v. 58, p. 1-44, 1981.

ZAIA, Dimas A. M.; ZAIA, Cássia Thais B. V.; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, p. 787-792, 1998.