

Caracterização eletroforética e cromatográfica das toxinas do muco da raia de água doce *Paratrygon aiereba*

Fernanda Mouro Galluzzi e Nanci do Nascimento
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

As raias ou arraias fluviais são peixes peçonhentos que vivem no fundo dos rios, como na Bacia Amazônica e causam muitos acidentes nos moradores da região conforme mostrado na Figura 1 [1].



Figura 1: Ferimentos dolorosos, difícil cicatrização, necroses extensas, infecções bacterianas em mão e pé. [2]

Fazem parte do filo *Chordata*, classe *Chondrichthyes*, integram a família *Potamotrygonidae*, compreendendo quatro gêneros: *Paratrygon*, *Plesiotrygon*, *Potamotrygon* e *Heliotrygon*. O gênero *Potamotrygon* apresenta em torno de 18 espécies; *Plesiotrygon* abrange duas espécies; *Heliotrygon* possui duas espécies, a *gomesi* e *rosai*; o gênero *Paratrygon* é considerado monoespecífico até o momento, pois alguns estudos indicam que esse grupo pode compreender um complexo de espécies [3]. Estudos de caracterização do veneno, obtido a partir das raspagens do ferrão, já foram realizados com raias dos gêneros *Potamotrygon* e *Plesiotrygon* [1]. Entretanto, não há relatos sobre trabalhos utilizando o gênero *Paratrygon* [1].

Os acidentes acontecem quando banhistas, por exemplo, pisam no ferrão das raias, que é revestido pelo veneno deste animal [3]. Contudo, o dorso e a cauda das raias são recobertos por grande quantidade de muco, por esse motivo, seria importante comparar as toxinas presentes no muco com aquelas encontradas no veneno [4].

Feitas estas considerações optamos por realizar este estudo com a espécie *P. aiereba* que também ocasiona acidentes.

OBJETIVO

Avaliar o perfil eletroforético e cromatográfico do muco da raia *Paratrygon aiereba*, comparando com o veneno desta mesma espécie.

METODOLOGIA

Foram coletadas raias *Paratrygon aiereba* (n=17) no Ribeirão do Carmo, afluente do rio Tocantins no município de Porto Nacional – TO. A extração do muco e do veneno de raias *Paratrygon* foi realizada no Laboratório de Ictiologia da UFT/Porto Nacional – TO e no laboratório de Pesquisa da FAPC/ITPAC Porto por meio de raspagem do epitélio que recobre o dorso (muco) e o ferrão (veneno).

Foi realizado um *pool* do muco e um *pool* do veneno de todas as raias capturadas. As amostras foram diluídas em salina 0,9% e centrifugadas por 15 minutos a 1190 g e o sobrenadante foi filtrado à vácuo com filtro de 8 μ m.

Foi realizada a separação das proteínas da peçonha por eletroforese SDS-Page, para analisar o grau de pureza das proteínas e determinar a massa molecular.

Para analisar o perfil das proteínas das amostras de raspado do muco do dorso do animal foi utilizado um sistema de cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) e Coluna C18

Shimadzu shim-pack UP-ODS (4,6 mm/ 250 mm/5 mm). A amostra foi eluída com um gradiente formado por ácido trifluoroacético (TFA)/água (A-1:1000) para de TFA/acetonitrilo (ACN)/água (B-1:900:100) . Os peptídeos foram eluídos a um gradiente constante de 1,0 mL/min com um gradiente de 10-80% de solvente B ao longo de 40 min. Os eluatos das colunas foram

monitorizados pela sua absorvância de UV a 214 nm.

RESULTADOS

Com base na metodologia utilizada, observa-se que o perfil eletroforético do muco é muito semelhante ao perfil do veneno. Nota-se que o muco apresenta as mesmas bandas observadas na eletroforese do veneno, porém, em maior concentração (Figura 2).

Estes resultados nos guiaram para a identificação dos componentes do muco por meio de cromatografia em HPLC de fase reversa.

Na cromatografia foram revelados oito picos, mas ainda não foi realizada a caracterização dos mesmos (Figura 3).

Em trabalhos realizados com raias de água doce, como de *Potamotrygon motoro*, observou-se um perfil eletroforético semelhante. Portanto, os resultados sugerem que os constituintes do veneno de *P. aireba* são semelhantes aos componentes de outros gêneros.

Para o próximo passo pretende-se imunizar animais para obtenção de soro policlonal antimuco e antiveneno desta espécie, a fim de buscar um tratamento para os principais efeitos do envenenamento como edema e dor.

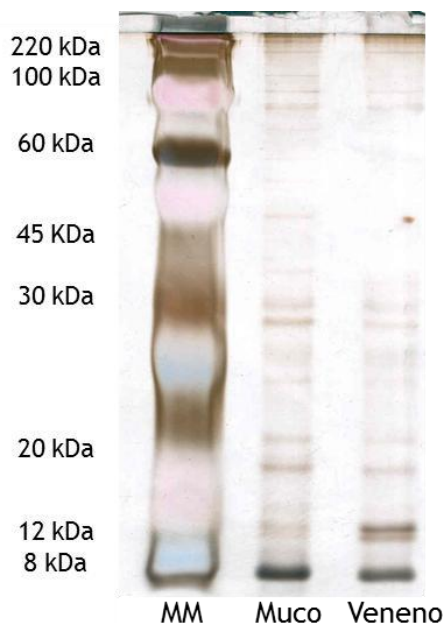


Figura 2: Análise por SDS - PAGE em gel de Poliacrilamida 12 % e coradas com Nitrato de Prata. Legenda: 1) MM – Marcador de massa molecular. 2) Muco; 3) Veneno.

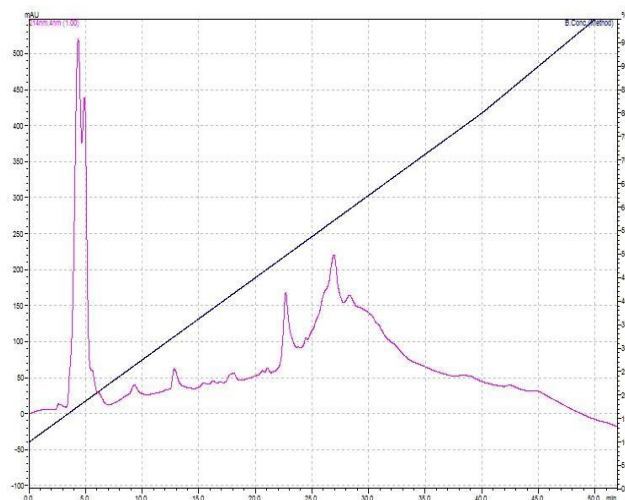


Figura 3: Cromatografia em HPLC - Fase Reversa Coluna C18 Shimadzu shim-pack UP-ODS (4,6 mm/ 250 mm/5 mm).de muco da raia *P. aireba*. Absorvância a 214 nm.

CONCLUSÕES

Os resultados preliminares indicam que o muco apresenta os mesmos componentes proteicos que o veneno, o que permitirá, dentre outras vantagens, coletar mais amostras e, portanto utilizar um menor número de raias, além de permitir devolvê-las ao seu *habitat*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AIRES, R. S. **Identificação e caracterização bioquímica e farmacocinética das raias de água doce**. Versão preliminar da Tese apresentada ao programa de Pós- graduação em Tecnologia Nuclear - Aplicações, como requisito para a Qualificação no curso de Doutorado. São Paulo, 2015.
- [2] LAMEIRAS, J. L. V.; COSTA, O. T. F.; MORONI, F. T.; ARAÚJO, J. R.; CARANHAS, S. M. E.; MARQUES, C. M. A.; DOS-SANTOS M. C.; DUNCAN, W. L. P. *Toxicon*, 77, 105-113, 2014.
- [3] CARVALHO, M.R., LOVEJOY, N. R. *Zootaxa*, 2776, p. 13-48, 2011.
- [4] FREDERICO, R. G.; FARIAS, I. P.; ARAÚJO, M. L. G.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALVES-GOMES, J. *Neotropical Ichthyology*, 10(1): 71-80, 2012.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq