



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

FRANCISCO AUGUSTO SANTOS DE AZEVEDO CARIOCA

**PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE QUITINOLÍTICA NO TRATO
GASTROINTERSTINAL DE *Erythrolamprus viridis***

MOSSORÓ - RN

2022

FRANCISCO AUGUSTO SANTOS DE AZEVEDO CARIOCA

**PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE QUITINOLÍTICA NO TRATO
GASTROINTERSTINAL DE *Erythrolamprus viridis***

Trabalho de conclusão de curso, feito na
Universidade Federal Rural do Semi-Árido -
UFERSA, Campus Mossoró, para a
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel de Sousa
Jereissati

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Cunha Passos

MOSSORÓ - RN

2022

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

A277p Augusto Santos de Azevedo Carioca, Francisco.
Prospecção de atividade quitinolítica no trato
gastrointestinal de *Erythrolamprus viridis*
Erythrolamprus viridis / Francisco Augusto Santos
de Azevedo Carioca. - 2022.
55 f. : il.

Orientador: Emmanuel de Sousa Jereissati.
Coorientador: Daniel Cunha Passos.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2022.

1. anurofagia. 2. atividade enzimática. 3.
bioquímica. 4. quitinase. 5. serpentes. I. de
Sousa Jereissati, Emmanuel, orient. II. Cunha
Passos, Daniel, co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

FRANCISCO AUGUSTO SANTOS DE AZEVEDO CARIOCA

**PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE QUITINOLÍTICA NO TRATO
GASTROINTERSTINAL DE *Erythrolamprus viridis***

Trabalho de conclusão de curso apresentado a
Universidade Federal Rural do Semi-Árido
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel de Sousa
Jereissati

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Cunha
Passos

Aprovado em: 28 / 04 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

Nome do Orientador, Prof. Dr. Emmanuel de Sousa Jereissati (UFERSA)
Presidente

Nome do Examinador Interno, Prof. Dr. Daniel Cunha Passos (UFERSA)
Membro Examinador

Nome do Examinador Interno, Profa. Dra. Michele Dalvina Correia da Silva (UFERSA)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, por sempre está do meu lado, nas alegrias ou tristezas. Esse trabalho é tanto meu como de vocês.

Agradeço a minha universidade, a Universidade Federal Rural do Semi-Árido, incluindo todo seu corpo docente e servidores, por ter me dado o apoio e ambiente ideal que necessitei durante toda minha graduação para que eu pudesse ter me tornado a melhor versão de mim.

Agradeço ao meu orientador e meu coorientador, os professores Dr. Emmanuel de Sousa Jereissati e o professor Dr. Daniel Cunha Passos, além da professora Dra. Michele Dalvina Correia da Silva, por serem os acadêmicos no qual sempre tive como modelos e sempre pude contar com suas orientações no meu trabalho, na minha carreira acadêmica e na minha vida, obrigado pela honra de tê-los como minha banca examinadora.

Agradeço aos meus amigos, por serem os melhores camaradas que qualquer um poderia ter.

“Visto à luz da evolução, a biologia é, talvez, intelectualmente a ciência mais satisfatória e inspiradora. Sem essa luz se torna uma pilha de fatos diversos – alguns deles interessantes ou curiosos, mas não fazendo nenhuma foto significativa como um todo.”

Theodosius Dobzhansky

RESUMO

A quitina é um polissacarídeo amplamente encontrado em diferentes organismos presentes em variados habitats. A digestão de quitina por organismos está associada à ação de, pelo menos, duas enzimas específicas, a quitinase responsável por clivar as ligações $\beta(1-4)$ da quitina em di- e tri-sacarídeos, e a β -N-acetil-D-glicosaminidase. Por conta de sua dieta anurófaga, espécimes da serpente *Erythrolamprus viridis* acabam ingerindo os restos ricos em material quitinoso em digestão consumidos pela sua presa, o que pode ser desvantajoso aos indivíduos dessa espécie pelo fato de que esse material duro pode causar obstruções e lacerações em seu trato digestivo. Para eliminar o excesso desse material, sabe-se que mecanismos fisiológicos adaptativos tais como a secreção de quitinases no lúmen do trato gástrico já foi estudado em outras espécies de répteis, porém nunca se foi identificada a presença dessas enzimas em qualquer serpente. Para detectar um possível potencial quitinolítico dessa espécie foram feitos extratos celulares do trato gastrointestinal de seis espécimes de *E. viridis*, através da maceração mecânica após congelamento em nitrogênio líquido seguida de extração proteica. Extratos dos tecidos gastrointestinais do lagarto *Tropidurus hispidus* foram feitos para servir como controle positivo devido à dieta insetívora dessa espécie. Os extratos foram então avaliados quanto à sua atividade quitinolítica em testes de açúcar redutor através do ensaio com reagente de Schales e quitina coloidal como substrato. Espécimes de *E. viridis* apresentaram menor potencial quitinolítico comparado a espécimes de *T. hispidus*. Cálculos da atividade com o teste de Schales demonstraram atividade média de 12,863 U/mL para espécimes de *E. viridis*, contra uma atividade de 25,17 para extratos de espécimes de *T. hispidus*. A atividade quitinolítica dos extratos também foi avaliada em substratos de p-nitrofenol com o auxílio de um kit de detecção de atividade quitinásica (Sigma-Aldrich). Esses ensaios também demonstraram uma atividade quitinolítica menor dos extratos de *E. viridis* comparados aos extratos de *T. hispidus* (atividade média dos extratos de *E. viridis* de 2,191 U/mL para substratos mono-, 0,29 U/mL para substratos di- e 0,20 U/mL para substratos tri-, contra as atividades médias dos extratos de *T. hispidus* de 9,78 U/mL para substratos mono-, 8,58 U/mL para substratos di- e 4,46 U/mL para substratos tri-). Esses resultados indicaram que os extratos de *T. hispidus* e *E. viridis* possuem atividade quitinolítica expressiva, sendo essa a primeira vez que foi detectada atividade quitinolítica no trato gastrointestinal de serpentes.

Palavras-chave: anurofagia, atividade enzimática, bioquímica, quitinase, serpentes.

ABSTRACT

Chitin is a polysaccharide widely found in different organisms present in different habitats. The digestion of chitin by organisms is associated with the action of at least two specific enzymes, the chitinase responsible for cleaving the $\beta(1-4)$ bonds of chitin into di- and tri-saccharides, and the β -N-acetyl- D-glucosaminidase. Due to their anurophagous diet, specimens of the snake *Erythrolamprus viridis* end up ingesting the remains rich in chitinous material in digestion consumed by their prey, which can be disadvantageous to individuals of this species due to the fact that this hard material can cause obstructions and lacerations in their digestive tract. To eliminate the excess of this material, it is known that adaptive physiological mechanisms such as the secretion of chitinases in the lumen of the gastric tract have already been studied in other species of reptiles, but the presence of these enzymes has never been identified in any snake. To detect the possible chitinolytic potential of this species, cell extracts from the gastrointestinal tract of six specimens of *E. viridis* were made through mechanical maceration after freezing in liquid nitrogen followed by protein extraction. Extracts from the gastrointestinal tissues of the lizard *Tropidurus hispidus* were made to serve as a positive control due to the insectivorous diet of this species. The extracts were then evaluated for their chitinolytic activity in reducing sugar tests using Schales reagent and using colloidal chitin as substrate. *E. viridis* specimens showed lower chitinolytic potential compared to *T. hispidus* specimens. Activity calculations with the Schales test showed a mean activity of 12.863 U/mL for *E. viridis* specimens, against an activity of 25.17 U/mL for extracts from *T. hispidus* specimens. The chitinolytic activity of the extracts was also evaluated on p-nitrophenol substrates with the aid of a chitinase activity detection kit (Sigma-Aldrich). These assays also demonstrated a lower chitinolytic activity of *E. viridis* extracts compared to *T. hispidus* extracts (mean activity of *E. viridis* extracts of 2.191 U/mL for mono-substrates, 0.29 U/mL for di- substrates and 0.20 U/mL for tri- substrates, against the average activities of *T. hispidus* extracts of 9.78 U/mL for mono- substrates, 8.58 U/mL for di-substrates and 4.46 U/mL for tri- substrates). These results indicated that *T. hispidus* and *E. viridis* extracts have significant chitinolytic activity, and this being the first time that chitinolytic activity has been detected in the gastrointestinal tract of snakes.

Keywords: anurophagy, biochemistry, chitinase, enzymatic activity, snakes.

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1	Espécime de <i>E. viridis</i> após laparotomia e remoção do seu trato gastrointestinal	49
Imagem 2	Laparotomia de um dos espécimes de <i>T. hispidus</i>	49
Imagem 3	Trato gastro intestinal de <i>T. hispidus</i> após lavagem	49
Imagem 4	Macerado do trato gastrointestinal após adição da solução de extração.	50
Imagem 5	Sistema de filtração a vácuo da quitina coloidal	50
Imagem 6	Placa contendo curva de concentrações de bsa e extratos após incubação em bca	51
Imagem 7	Tubos de ensaio com reagente de Schales e misturas dos extratos após incubação em fervura	51
Imagem 8	Placa contendo mistura de reagente de Schales e mistura de extrato e quitina coloidal após incubação	52
Imagem 9	Placa contendo soluções de substratos de p-nitrofenol após a adição de solução de parada	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Valores de absorvância dos extratos no teste de Schales	29
Gráfico 2	Valores de absorvância médios dos extratos no teste de Schales (Kruskal-Wallis – $\chi^2 = 24,06$; $p < 0,01$,Post-hoc Dunn Test – $p < 0,01$)	30
Gráfico 3	Curva padrão de N-acetil-glucosamina, valor de $R^2=0,988$ Valores de absorvância dos extratos nos substratos mono- no teste de p-nitrofenil	30
Gráfico 4	Valores de absorvância dos extratos nos substratos mono- no teste de p-nitrofenil	32
Gráfico 5	Valores de absorvância dos extratos nos substratos di- no teste de p-nitrofenil	33
Gráfico 6	Valores de absorvância dos extratos nos substratos tri- no teste de p-nitrofenil	33
Gráfico 7	Comparação de atividades médias entre os extratos testados no teste p-nitrofenil	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Concentrações proteicas após extração	28
Quadro 2	Valores da atividade quitinolítica calculadas em U/mL e em nkat/mL	31
Quadro 3	Atividade específica de cada extrato	34
Quadro 4	Valores brutos de absorbância do ensaio de açúcar redutor	53
Quadro 5	Valores brutos de absorbância do ensaio com p-nitrofenil substrato mono-	54
Quadro 6	Valores brutos de absorbância do ensaio com p-nitrofenil substrato di-	54
Quadro 7	Valores brutos de absorbância do ensaio com p-nitrofenil substrato tri- ...	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	PROSPECÇÃO ENZIMÁTICA EM <i>E. viridis</i>	16
2.1	<i>Erythrolamprus viridis</i> e outras serpentes	16
2.2	Enzimas: importâncias e isolamento	17
2.3	Enzimas Quitinolíticas em animais	18
2.4	Ensaio enzimático quitinolítico	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Coleta e preparo do material biológico	23
3.2	Preparo do extrato celular	23
3.3	Preparo de quitina coloidal	24
3.4	Dosagem das proteínas	24
3.5	Determinação da atividade quitinásica	25
3.5.1	Ensaio de açúcar redutor	25
3.5.2	Ensaio com p-Nitrofenil	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	Ensaio preliminar	28
4.2	Ensaio de açúcar redutor	28
4.2.1	Cálculo de atividade com o teste de açúcar redutor.....	30
4.3	Dos ensaios com p-Nitrofenil	32
4.3.1	Do cálculo de atividade com p-Nitrofenil	34
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	REFERÊNCIAS	39
	ANEXO A – IMAGENS	49
	ANEXO B – QUADROS	53

1 INTRODUÇÃO

A quitina é um polissacarídeo amplamente distribuído por vários habitats da terra. Esse carboidrato tem uma função principalmente estrutural, similar à celulose, sendo encontrado em uma grande gama de organismos, formando, por exemplo, a parede celular de fungos, compondo o exoesqueleto de artrópodes e a cutícula de anelídeos e moluscos (GOODAY, 1996; ROBYT, 1998). Similarmente à celulose, esse se trata de um homopolímero linear de monossacarídeos, sendo a celulose composta por D-glicose, ligadas por ligações glicosídicas de configuração $\beta(1-4)$, enquanto a quitina é composta por N-acetil-D-glucosamina, ligadas linearmente também na configuração $\beta(1-4)$. Essas cadeias lineares de carboidratos são então mantidas unidas e estabilizadas por pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxila expostos da cadeia. (ASGHARI, 2015).

A digestão de quitina por organismos está associada à ação de, pelo menos, duas enzimas específicas, a quitinase (EC 3.2.1.14) responsável por clivar as ligações $\beta(1-4)$ da quitina em di- e tri-sacarídeos, e a β -N-acetil-D-glucosaminasidase (EC 3.2.1.30), responsável por clivar esses di- e tri-sacarídeos em monossacarídeos de N-acetil-glicosamina (JEUNIAUX, 1993; MOON, 2017). As lisozimas também são enzimas capazes de degradar quitina. Essas enzimas geralmente são encontradas junto com as quitinases, porém as lisozimas são amplamente distribuídas nos organismos pelo fato de estarem associadas a alguns mecanismos de defesa contra parasitas e patógenos (KIRISTI, 2015). Lisozimas promovem a lise de bactérias gram-positivas por degradação dos peptideoglicanos presentes na parede celular desses organismos. No entanto, essas enzimas se diferenciam na especificidade por substratos, sendo as quitinases geralmente mais específicas que lisozimas e nem sempre as suas ações se encontrarem mutuamente (CORNELIUS e DANDRIFOSSE, 1977).

Dentre algumas funções diretas das quitinases, se destacam sua capacidade de degradação das cutículas de artrópodes (PARK, 2019), na capacidade embriogênica e proteção contra herbivoria de plantas (ZIELINSKI, 2019; DONG, 2017), no metabolismo de fungos e bactérias (VELIZ *et al*, 2017), no ciclo de crescimento de leveduras e na proteção contra patógenos em humanos (ADAMS, 1995; GUAN *et al*, 2020). Elas são geralmente encontradas no trato digestório de animais, principalmente na região estomacal, onde degradam o exoesqueleto quitinoso das suas presas artrópodes, permitindo a ação de outras enzimas sobre as partes antes recobertas pela carapaça dos invertebrados ingeridos e

permitindo o aproveitamento dos sacarídeos que compõe a quitina (DAHIYA *et al*, 2006). Quitinases são encontradas também no lúmen intestinal, possivelmente auxiliando na desobstrução do intestino, causado pelo congestionamento de fragmentos menores de quitina. (LINDSAY, 1984 *apud* GUTOWSKA *et al*, 2004).

No entanto, a função de enzimas quitinolíticas e proteínas com domínios de quitinases vai bem além da simples digestão do carboidrato quitina. Proteínas como a YKL-40, também chamada de chitinase3-like1, mostraram ter relações com o aparecimento de condições humanas tais como a asma e em inflamações (KONRADSEN, 2013). Como outro exemplo, a oviductina, uma enzima com domínios de ligação similares à quitinase encontrada no oviduto de sapos da espécie *Bufo japonicus* (TEMMINCK & SCHLEGEL, 1838) está intrinsecamente relacionada a maturação de ovos dessa espécie, sendo que espécimes fêmea que tiveram essa proteína suprimida perderam a capacidade reprodutiva (HIROSHI, 2002). De fato, uma grande gama de proteínas relacionadas a respostas imunológicas e metabólicas humanas e não humana possuem domínios de ligação e estrutura similares à quitinases.

A presença e função de enzimas quitinolíticas já foi estudada em espécies de invertebrados. No entanto, a existência de quitinases em vertebrados tem sido discutida. Pesquisas feitas por JEUNIAUX (1961), KARASOV (1989) e MICHA *et al*, (1973) provaram que vertebrados possuem essas enzimas em seu perfil enzimático, embora a localização e excreção dessas enzimas varie muito de acordo com a espécie a ser tratada. A presença de enzimas quitinolíticas em vertebrados tem significantes vantagens evolutivas. É estimado que cerca de 20% da energia total de artrópodes está contida no seu exoesqueleto quitinoso o que permitiria que os organismos pudessem aproveitar a energia química de suas presas mais eficientemente (KARASOV, 1989).

A predação de anfíbios é amplamente distribuída por uma grande gama de organismos vertebrados e já observada em organismos invertebrados (SANTANA, 2009). A predação de anuros está relacionada principalmente com o ciclo de vida tanto dos organismos predadores como com a fase de crescimento dos anuros adultos. Serpentes foram reportadas como predadores importantes da anurofauna, contribuindo para a manutenção e controle da população de anfíbios durante o período chuvoso da região Nordeste do Brasil (SANTOS, 2009). A ingestão de anfíbios por répteis, conseqüentemente, leva ao excesso de quitina proveniente da dieta dos anuros no aparelho digestivo dos organismos predadores, podendo causar obstruções no trato digestivo do animal. Os mecanismos fisiológicos para a eliminação desse material quitinoso continuam sob estudo.

A ingestão indireta de material quitinoso é comum por conta da ampla distribuição dos

artrópodes nos ambientes terrestres. Embora o volume de quitina digerida seja tolerável para indivíduos generalistas, a ingestão de grandes quantidades de quitina por indivíduos insetívoros ou que se alimentem principalmente de indivíduos insetívoros pode ser um fator de risco para a fisiologia do predador. Sem os hábitos específicos para eliminação do excesso de quitina, tal como a regurgitação, e sem o perfil enzimático específico para a degradação desse polissacarídeo o alto volume de quitina não digerida pode obstruir o trato gastrointestinal do animal, o que pode resultar na desnutrição e até morte do espécime (FERREIRA-FERNANDES *et al*, 2008).

2 PROSPECÇÃO ENZIMÁTICA EM *E. viridis*

2.1 *Erythrolamprus viridis* e outras serpentes

Erythrolamprus é um gênero de serpentes nativas da América central e do sul, possuindo 21 espécies registradas no Brasil (COSTA e BERNILS, 2018). Dentre essas espécies, 8 se encontram no bioma Caatinga, como descrevem GUEDES e colaboradores, 2014: *Erythrolamprus almadensis* (WAGLER e SPIX, 1824), *Erythrolamprus maryellenae* (DIXON, 1985), *Erythrolamprus miliaris* (LINNAEUS, 1758), *Erythrolamprus mossoroensis* (HOGE e LIMA-VERDE, 1973), *Erythrolamprus poecilogyrus* (WIED, 1824), *Erythrolamprus reginae* (LINNAEUS, 1758), *Erythrolamprus taeniogaster* (JAN, 1863) e *Erythrolamprus viridis* (GÜNTHER, 1862). Dentre os comportamentos em comum dessas serpentes, estão os hábitos diurnos e terrestres, além de terem como principal presa anfíbios da ordem anura (CORREA, 2016; GUEDES *et al.*, 2014; MESQUITA *et al.*, 2013; VITT e VANGILDER 1983).

Sabe-se que um comportamento comum de serpentes anurófagas, como a *Waglerophis merremii*, é a regurgitação de um bolo alimentar quitinoso (FERREIRA-FERNANDES *et al.*, 2008). É descrita também a regurgitação forçada na serpente *Philodryas patagoniensis*, sendo identificadas partes quitinosas proveniente de insetos, provenientes da dieta de suas presas (LÓPEZ e GIRAUDO, 2008). Incrustados quitinosos em bolos fecais em espécies de serpentes também foram descritos (HOSO e MICHIO, 2006). Esses comportamentos, alinhados com outras estratégias adaptativas na eliminação e digestão de material quitinoso, justificam a necessidade de estudos mais aprofundados sobre aspectos fisiológicos e evolutivos dos diferentes mecanismos de eliminação de material normalmente indigerível em espécies próximas filogeneticamente.

Por conta de sua dieta anurófaga, espécimes de *Erythrolamprus viridis* acabam ingerindo os restos ricos em material quitinoso em digestão consumidos pela sua presa, sendo observado alguns exemplares capazes de digerirem completamente as carapaças de artrópodes predados pelos anuros de sua dieta. Contudo, não foram feitos estudos expressivos sobre o potencial quitinolítico dessas serpentes, o que poderia comprovar a presença de enzimas com ação quitinolítica no trato digestivo desses répteis. Partindo disso, é necessária a realização de ensaios que possam comprovar o potencial quitinolítico do trato gastrointestinal desses répteis, o que indicaria a presença de quitinases nessa espécie, comprovando que esse seria o primeiro colubrídeo identificado capaz de secretar quitinases em seu trato gastrointestinal.

2.2 Enzimas: importâncias e isolamento

Enzimas são os mais fundamentais blocos do metabolismo de qualquer organismo. Suas presenças e suas atividades são o que permitem com que a vida biológica que conhecemos hoje exista. Com elas, reações que normalmente seriam altamente improváveis de acontecer espontaneamente passam a serem possíveis através da catálise dessa (CHEN, 2020). Na atual conjuntura, no entanto, sua importância transcendeu as dos organismos que essas se encontram. Hoje, vários setores da indústria, tais como a indústria de alimentos e de fármacos dependem dessas para que possam ter processos competitivos o suficiente para sustentar um mercado de demanda crescente. Não só pelo melhor custo-benefício se usam enzimas em processos industriais, essas tem sido reportadas como cada vez mais eficientes em relação ao tempo de produção, exigirem uma quantidade menor de equipamento em relação a processos puramente químicos além de gerarem menos resíduos e caso gerem esses tem menor impacto no meio ambiente (PRASAD, 2018).

Além dos seus usos industriais, as enzimas possuem um nicho de extrema importância em estudos acadêmicos. Além de serem tradicionalmente estudadas para a compreensão dos seus papéis metabólicos e fisiológicos, cada vez mais uma gama maior de estudos inclui ensaios enzimáticos como suas principais ferramentas de pesquisa e descoberta. Enzimas podem ser utilizadas para a identificação e estudo filogenético de microrganismos (MAYER, 2007) e macroorganismos (MARTIN, 2010). Além de estudos pontuais em organismos, estudos filogenéticos com enzimas de ampla distribuição, tais como glicosil-hidrolases e enzimas que participam do metabolismo do DNA e RNA tem sido feitos a fim de se entender melhor a evolução e origens do metabolismo celular (CANBACK, 2002; WANG 1997).

Por conta do crescente interesse científico e comercial sobre as enzimas, técnicas de prospecção, extração e isolamento enzimático tem sido cada vez mais abordados na comunidade científica. Técnicas de downstream normalmente são mais complexas e menos rentáveis do que técnicas de extração proteica tradicionais por conta de que enzimas precisam ter sua função catalítica mantida após a sua extração, o que dispensa técnicas de extração desnaturantes tais como eletroforese em gel de poliacrilamida auxiliado por dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), extração em fase fenólica e precipitação em sulfato de amônio (NANNIPIERI, 2006). Técnicas tradicionais de separação proteica, tais como a cromatografia líquida, tem sido utilizadas como técnicas de downstream. Porém, essas técnicas têm sido cada vez mais substituída pela técnica de partição em sistemas de duas fases aquosas (NADAR, 2017). Essa técnica tem várias vantagens comparadas a outras técnicas de downstream, sendo

as principais a maior quantidade e maior eficiência de produto separado, o menor tempo de separação e isolamento e a maior versatilidade da técnica e dos seus equipamentos, podendo ser aplicado a mais de um produto após ajustes (PETERS, 1987).

2.3 Enzimas Quitinolíticas em animais

A presença de quitinases gástricas foi inicialmente descrita por KARRER e HOFMANN, 1929 (*apud* OSHIMA, 2002) em gastrópodes. Essas enzimas posteriormente foram encontradas em outras espécies de animais, incluindo vertebrados superiores, tais como em morcegos insetívoros (JENIAUX, 1961; *apud* WHITAKER, 2004) e no tatu-galinha (SMITH *et al*, 1998; *apud* WHITAKER, 2004). Quitinases também foram identificadas em uma grande número de espécies de invertebrados artrópodes (AHMADI *et al*, 2008; FILHO, *et al*, 2002; PARK *et al*, 1997), peixes (GUTOWSKA, 2004; ROTTA, 2003), anfíbios (OSHIMA *et al*, 2002) e aves (SUZUKI *et al*, 2002). Mamíferos conhecidamente possuem duas quitinases ativas descritas nos seus organismos, a chitotriosidase (EC: 3.2.1.14) e a quitinase acídica mamífera (AMCase, sigla em inglês de acidic mammalian chitinase), da qual apenas a AMCase se encontra de fato no trato gastrointestinal desses (BUSSINK, 2008).

A presença de enzimas quitinolíticas no trato gastrointestinal de animais se deve principalmente à dieta do organismo. Porém, essas enzimas nem sempre são secretadas pelos órgãos e tecidos do animal em questão. Pesquisas identificaram a presença de bactérias autóctones da microbiota intestinal com ação quitinolítica em peixes (SUGITA e ITO, 2006; ZHOU, 2013), anfíbios terrestres (FONTAINE, 2018) e artrópodes (CHU e BODNAR, 1986). Esses estudos comprovam a importância de se realizar ensaios que além de detectar a atividade quitinásica no trato gastrointestinal da *Erythrolamprus viridis*, possam também identificar a sua origem de secreção no organismo. Da ordem dos répteis *Squamata* apenas nos lagartos foi observada a capacidade de produzir e secretar quitinase em seus tratos gastrointestinais, sendo estudados especificamente os gêneros *Anguis*, *Uromastix*, *Chamaleo*, *Lacerta*, *Anolis* e *Sceloporus*. (MARSH, 2001; JEUNIAUX, 1961, 1962, 1963).

No entanto, quitinases de répteis não são completamente autóctones desse clado. Estudos bacteriológicos dos tratos gastrointestinais das espécies de lagarto *Gekko gekko* (LINNAEUS, 1758) e *Mabouya multifasciata* (KUHL, 1820) identificaram a presença de dois isolados bacteriológicos de vinte extraídos, nomeados de LK12 e KD5. A estirpe LK12 possuía dois picos de atividade nas faixas de pH 4 e 8, enquanto a estirpe KD5 possuía apenas um pico de atividade no pH 8 (PARDOSI, 2018). Esses isolados se assemelhavam a estirpes

de *Stenothrophomonas maltophilia* e *Enterobacter tabaci*, respectivamente, duas espécies que já possuem quitinases ativas identificadas e caracterizadas (DAHIYA, 2005; JANKIEWICZ, 2012).

Já quitinases sem função gástrica e outras enzimas com domínios de ligação de quitinases tem uma distribuição bem mais ampla e geralmente tem funções menos claras. A chitotriosidase, a outra enzima ativa presente nos mamíferos, possui uma função intrinsecamente atrelada a ativação de macrófagos durante respostas imunes (BRINKMAN, 2005). A atividade de chitotriosidases no plasma sanguíneo já foi estudada em uma série de doenças lisossomais e não-lisossomais (RIES 2006; MICHELAKAKIS, 2004). Além de quitinases ativas, enzimas com domínios de ligação similares à de quitinases já foram identificadas em diversos tecidos do corpo humano por exemplo, tais como no sistema circulatório (HAKALA, 1993), articulações (TSURUHA et al, 2002) e nas vias aéreas (KUMAR, 2019). Essas enzimas desempenham funções importantes principalmente no sistema imunológico do organismo, sendo relacionadas a doenças como a artrite (JOHANSEN, 2006), câncer, pneumonia e fibrose pulmonar (KUMAR, 2019).

A carência dessas proteínas similares a quitinases também estão relacionadas a doenças nos organismos. Condições como a doença de Gaucher, que tem como característico a desordem no armazenamento de lisossomos, já estão descritas por serem desencadeadas pela deficiência da enzima glucocerebrosidase, uma enzima protease similar a quitinase acídica humana (RIBOLDI, 2019). Uma grande gama de proteínas homólogas a quitinases, porém que perderam sua atividade enzimática já se encontram descritas na literatura. As chamadas chi-lectinas são um grupo dessas proteínas que perderam sua atividade enzimática, porém reteram o sítio ativo característico dessas glicosil-hidrolases (RENKEMA et al, 1998). A função dessas enzimas ainda não é totalmente claro, apesar de serem conhecidas sua estrutura. No entanto, sabe-se que as chi-lectinas como a YKL-40 e CHI3L1 estão relacionadas a condições como artrite, fibrose e até câncer (HAKALA et al, 2013; JOHANSEN 2006).

O estudo do perfil enzimático de répteis é importante para se entender as diversas adaptações que esses devem passar para que possam se adequar ao seu meio ambiente. Entender as adaptações bioquímicas da fisiologia dos répteis pode elucidar como esses animais podem ser afetados pelas mudanças de dieta em seu ambiente, além de poder ser um fator chave para se entender a evolução desses organismos e ajudar na conservação de espécies afetadas pela redução do bioma Caatinga (RODRIGUES, 2013).

Aliados a ensaios genômicos, estudos de evolução de enzimas em espécies macro e microscópicas são uma das ferramentas mais utilizadas e confiáveis na classificação

taxonômica de espécies (SUENAGA, 2015). Análises proteômicas de serpentes geralmente se delimitam na comparação do perfil proteico do veneno de espécies peçonhentas, o que se define como venômica. Embora a venômica tenha marcado avanços na filogenia de serpentes, essa se restringe principalmente em espécies capazes de causar acidentes ofídicos de importância clínica em humanos (MODAHL, 2019; SUNAGAR, 2016). Abordagens mais tradicionais podem ser utilizadas no estudo proteômico de espécies fracamente peçonhentas ou não peçonhentas. Nunca antes foram detectadas enzimas quitinolíticas no trato gástrico de espécimes de *Erythrolamprus viridis*, ou em qualquer outro colubrídeo. A possível detecção dessas enzimas no trato dessas serpentes pode ter impactos significativos na compreensão da evolução dos colubrídeos e dos escamados.

2.4 Ensaaios enzimáticos quitinolíticos

Ensaaios enzimáticos têm sido plenamente utilizados no meio científico. Seus usos variam, no entanto eles sempre obedecem dois propósitos básicos quando são utilizados. O seu primeiro propósito é o de identificar a presença de uma enzima específica no meio em que esse está sendo utilizado, ou então identificar uma espécie ou estirpe específica que produza uma enzima conhecida. A identificação da presença de fungos e bactérias, por exemplo, é um exemplo clássico desse propósito, por conta desses dependerem de enzimas específicas durante sua reprodução para que possam dissolver suas respectivas paredes celulares e tornarem possíveis sua divisão (CAMPUZANO, 2017; NEUFEUD *et al*, 2013).

Já como segundo propósito, os testes enzimáticos podem ter a quantificação e avaliação da quantidade de enzima no meio testado. Esse propósito, no entanto, é de maior rigor experimental para ser testado, devido a esse necessitar de precisão em seus resultados a fim de dar resultados suficientemente confiáveis para ser utilizados como base na quantificação enzimática, enquanto ensaios enzimáticos apenas de identificação necessitam apenas de resultados positivos e negativos (SCHOMBURG, 2013). Essa necessidade de precisão e de consistência de dados levou a criação de vários guias e métodos padrões na testagem de uma grande quantidade de enzimas na literatura científica, além de databases de dados sobre ensaios e métodos, tais como o BRENDA (BISSWANGER, 2014; SCHOMBURG, 2017). Porém, mesmo com o mais alto rigor mecânico, instrumental e operacional, testes enzimáticos são conhecidamente inconsistentes, e frequentemente podem dar resultados completamente diferentes mesmo com parâmetros aparentemente idênticos quando feitos paralelamente ou posteriormente.

Um dos motivos dessa inconsistência é o grande número de variáveis que conhecidamente influenciam a atividade das enzimas. Os célebres cientistas Michaelis e Menten em 1913 foram os primeiros a estudarem as variáveis físicas e químicas que influenciam na atividade das enzimas, tais como pH, temperatura, concentrações de substratos e de produto e influência nas forças iônicas sobre as enzimas. Esses fatores porém tem sido bastante expandidos em estudos recentes, sendo que avanços no campo da química e física, tais como a melhor compreensão das forças quânticas sobre a funcionalidade e cinética de enzimas. Esses avanços permitiram até mesmo a modelagem computacional de atividade enzimática, permitindo níveis de precisão teórica cada vez mais avançados (QUESNE 2016).

Métodos de detecção de atividade quitinásica tem um histórico de serem pouco sensíveis na detecção de mínimas atividades quitinásicas. Esses se basearam inicialmente na detecção de agentes colorimétricos ligados covalentemente à quitina utilizada como substrato pelas enzimas a serem testadas ou na detecção de açúcares redutores resultantes da hidrólise da quitina. A pouca sensibilidade desses ensaios é derivada da baixa solubilidade da quitina em água, o que dificulta a ação das quitinases e de outras enzimas que atacam a quitina. Tal problema é tão expressivo que os padrões de absorbância dos testes de atividade quitinásica são normalmente baixos, comprovando a similaridade óptica dos substratos hidrolisados dos não hidrolisados (MAUCH, 1988). Já ensaios que se baseiam na detecção de açúcares redutores geralmente são menos específicos que os ensaios que visam detectar os agentes colorimétricos liberados do substrato inicial. Essa baixa especificidade é causada pelo fato de que algumas enzimas diferentes de quitinases podem ser capazes de atacar algumas partes dos substratos de quitina dos testes, o que consequentemente leva a liberação de açúcares redutores no ensaio. A sensibilidade desse teste também é limitada caso sejam utilizados substratos menos estáveis do que a quitina nos testes, o que facilitaria a hidrólise espontânea, e também caso já estejam presentes açúcares redutores nas amostras utilizadas (IMOTO, 1971).

Pesquisadores têm utilizado substratos alternativos à quitina *in natura* a fim de aumentar a solubilidade desse polissacarídeo nos ensaios e consequentemente aumentar a sensibilidade dos testes. ÔTAKARA, 1961, descreveu o uso de glicol-quitina em ensaios colorimétricos e viscosimétricos de degradação de quitina no mofo do *kōji*-negro. Esse substrato possui solubilidade superior à quitina natural e não tem suas propriedades viscosimétricas alteradas pelo pH do ensaio ou pela adição de sais. Além disso, testes que se utilizam de 4-metilumbeliferona como agente fluorogênico se demonstraram sensíveis o suficiente para serem realizados em escalas muito baixas (MCCREATH e GOODAY, 1992).

Substratos modificados quimicamente, porém tem uma desvantagem quando comparados a substratos não alterados; esses geralmente têm suas cadeias de sacarídeos alteradas ou até mesmos clivados, o que as difere molecularmente dos substratos naturais. Essa diferença é importante, pois pode dificultar a atividade de enzimas quitinásicas altamente específicas, e até mesmo permitir que outras enzimas que agem em sacarídeos possam clivar o substrato testado, o que pode comprometer a confiabilidade do teste (FERRARI *et al*, 2014). O uso de quitina isolada na forma de coloides viabilizou o uso de quitinas naturais em ensaios quitinolíticos. Ensaios com *chitin azure* coloidal foram descritos como mais baratos, rápidos e tão sensíveis quanto ensaios se utilizando de substratos alterados ou ensaios que quantifiquem a concentração de açúcares redutores após a hidrólise (SHEN, 2010).

MEGA *et al* em 1969 utilizou a identificação do p-nitrofenil derivado de substratos sintéticos para identificar e quantificar a atividade da enzima N-acetil- β -D-glucosaminidase, marcando o primeiro uso desse na identificação de glicosil-hidrolases. Esse método foi então adaptado por RENKEMA, 1995 para o estudo de chitobiosidase humana, presente no plasma. Esse método se demonstrou mais preciso e de melhor produtibilidade que outros métodos de determinação de atividade quitinolítica, principalmente devido a faixa estreita de comprimento de onda do seu cromógeno e a maior estabilidade do p-nitrofenil comparada aos resíduos de n-acetil-glucosamina presentes em outros testes de determinação quitinolítica por potencial de açúcares redutores.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e preparo do material biológico

Foram utilizados exemplares da espécie *Erythrolamprus viridis* e *Tropidurus hispidus*, coletados na cidade de Mossoró, para os ensaios. As serpentes foram mantidas no Laboratório de Ecologia e Comportamento Animal – LECA, em situação de jejum, até que todo conteúdo do seu trato intestinal fosse evacuado. As serpentes e lagartos foram sacrificadas, se obedecendo as normas éticas herpetológicas e as diretrizes do comitê de ética da UFRSA e tombadas na Coleção Herpetológica do Semiárido – CHSA. Foi conduzida a esterilização da parte ventral dos espécimes com álcool iodado seguido da dissecação por laparotomia (imagens 1 e 2). Em seguida, seus tratos gastrointestinais foram removidos. Os tratos foram transferidos para placas de Petri e lavados de 3 a 4 vezes com uma solução salina à 0,9% estéril (imagem 3). Após a lavagem, os tratos foram transferidos para novas placas de Petri e se procedeu para a lavagem do lúmen do trato, através da injeção de solução salina estéril à 0,9% no canal do trato com o auxílio de uma seringa de 1 mL, removendo a maior parte da microbiota não-aderente do TGI. Após isso, os tecidos removidos procederam para os processos de homogeneização.

3.2 Preparo do extrato celular

Após a medida da massa dos tratos intestinais dos espécimes, os tratos foram congelados em nitrogênio líquido, passando por maceração mecânica logo após seu total congelamento. Foi adicionado um tampão de acetato de sódio com o pH 5.8 ao extrato macerado, numa proporção de 1:3 de massa do trato intestinal para o volume do tampão adicionado (imagem 4). A suspensão obtida foi separada em tubos de 1,5 mL e então centrifugadas a 15000 G durante 15 minutos a temperatura ambiente. Foi coletado o sobrenadante desses tubos e descartado os pellets de material celular pesado. O sobrenadante coletado foi aliquotado e armazenado, prosseguindo para a dosagem proteica e ensaios quitinolíticos.

3.3 Preparo de quitina coloidal

A produção de quitina coloidal foi preparada de acordo com o método descrito por JOE & MAPANA (2017). Foram pesados 5 g de quitina em pó (Merck-Sigma, catálogo C7170) em um béquer de 1 litro, previamente lavado. Esse béquer foi posicionado em uma capela e então se foi adicionado lentamente e sob agitação constante 150 mL de ácido clorídrico 10 M sobre a quitina. A mistura foi agitada por um minuto em intervalos de 5 minutos por 60 minutos no total, em temperatura ambiente. Passado o tempo, a solução foi então filtrada com 6 camadas de panos filtrantes (morim), a fim de se retirar o excesso de quitina não solubilizada da solução. Após a filtração, foi adicionado 2 litros de água destilada a 2°C no filtrado, permitindo a precipitação da quitina suspensa. A solução foi então incubada a 4°C por 8 horas. Após a incubação, a solução foi filtrada a vácuo em um filtro Whatman nº 1 (imagem 5), se coletando os flocos de quitina coloidal no papel. A quitina coloidal coletada foi posta em um béquer de 1 litro e então foi lavada com água destilada até seu pH chegar a 7,00. O excesso de água foi removido por filtração a vácuo, se repetindo o processo até que a quitina atingisse ao pH ideal de 7.0. Após a quitina chegar ao pH ideal, o coloide de quitina foi pressionado gentilmente, a fim de se remover o excesso de água, e em seguida foi aliquoteado em béquers de 10 mL coberto com duas camadas de papel-alumínio. O coloide aliquoteado passou então por autoclavagem, a 15 psi, por 20 minutos à 120°C. Após a autoclavagem, a quitina foi então armazenada à 4° C até seu uso.

3.4 Dosagem das proteínas

Os extratos brutos passaram por uma quantificação proteica em duplicata, se utilizando do método do ácido bicinonínico de acordo com SMITH (1989). Aliquotas de 50 µL do extrato foram transferidos a tubos de ensaio contendo 1 mL de reagente BCA preparado. Os tubos foram incubados em banho maria a 38° C por 20 minutos. Passado esse tempo, foi feita a leitura da absorbância da solução, no comprimento de onda de 562 nm, em um leitor de microplacas (imagem 6). Os valores de absorbância foram aplicados na equação da reta de uma curva padrão de albumina sérica bovina nas concentrações de 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL e 0,0625 mg/mL, preparada em conjunto com o teste.

3.5 Determinação da atividade quitinásica

3.5.1 Ensaios de açúcar redutor

Para a determinação da atividade de quitinases pela liberação de açúcares redutores, foi utilizado uma adaptação da metodologia de FERRARI *et al* (2014). Foi adicionado em tubos de microcentrífuga, 1,2 mL de uma solução contendo 3 mg/mL de quitina coloidal, suspensa em tampão McIlvaine (pH 5,2). Foi transferido sobre a solução de quitina 200 μ L dos extratos celulares a serem testado, todos equilibrados na concentração proteica de 2 mg/mL. Os tubos foram então incubados por 60 minutos à 37°C em um banho maria. Passado o tempo da incubação, os tubos foram centrifugados à 5000 g à 4° C por 10 minutos. Após a centrifugação, foram transferidos 600 μ L do sobrenadante das soluções centrifugadas em tubos de ensaio. Em seguida, foi adicionado sobre os sobrenadantes coletados 600 μ L do reagente de Schales (0,05% de ferricianeto de potássio em uma solução de 0,5 M de carbonato de sódio). Os tubos foram vedados firmemente com papel-alumínio e incubados em um banho com água fervente por 15 minutos para que ocorresse o desaparecimento do complexo de cor do teste e a inativação das quitinases presentes (imagem 7). Após esse tempo, os tubos foram então resfriados em um fluxo de água corrente, e seus conteúdos foram transferidos para uma microplaca de 96 poços. Após a transferência, foi medida a absorbância dos poços em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 420 nm (imagem 8). Todos os ensaios foram feitos em duplicata. Foi feita análises estatísticas de distribuição de dados das absorbâncias obtidas, através do teste de Kruskal-Wallis seguindo pelo teste de Dunn pos-hoc, no software R.

Uma curva padrão de N-acetil-glucosamina (NAG) foi feita e utilizada como parâmetro para a conversão dos valores de absorbância em concentração de NAG liberado após a digestão. Foi utilizada uma curva de 7 pontos nos intervalos de em concentrações de 0 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 250 μ M e 300 μ M preparado de alíquotas de 1 mM de NAG diluído em tampão McIlvaine. Baseado nas concentrações de N-acetil-glucosamina encontrados pela curva padrão, o cálculo da atividade enzimática pode ser feito. Sabendo-se que uma unidade de atividade enzimática equivale a digestão de 1 μ M de substrato em 1 μ M de produto em 1 minuto (KING, 1961; NC-IUB, 1979), e que a atividade específica equivale a atividade total dividido pela concentração proteica das proteínas (NC-IUB, 1982; FÖLDESI 2019), a equação da atividade enzimática do teste realizado nesse projeto pode ser expressa pela seguinte equação:

$$A = \frac{([NAG]_{\text{pós incubação}}) * F.D}{T} * \frac{1}{[\text{proteína do extrato}]}$$

Onde F.D é o fator de diluição do teste e T o tempo em minutos. Foi utilizado 200 μL de extrato para os testes. Sabendo que se é necessário equivaler o cálculo para 1 mL (1000 μL) o fator de diluição inicial é de 5. Esse fator de diluição deve ser multiplicado pela proporção de reagente de Schales aplicada para o teste após a incubação. Sabendo que aplicado reagente na proporção de 1:1 do extrato após a digestão, diluindo o volume final a ser lido por 2, o fator de diluição final ser de 5 x 2, o que o faz ter um valor de diluição final de 10. Os valores também foram calculados em nanokatals, a fim de se melhor interpretar os valores expressos nesse trabalho, sabendo-se que um nanokatal equivale a liberação de 1 nano mol de substrato por segundo (NC-IUB, 1982).

3.5.2 Ensaio com p-Nitrofenil

As atividades de NAHase, quitobiosidase (exoquitinase) e quitotriosidase (endoquitinase) foram determinadas com os substratos de p-nitrofenil, com o auxílio de um kit de detecção de atividade quitinásica (Merck-Sigma, catálogo: CS0980), sendo que os ensaios da NAHase, quitobiosidase e quitotriosidase serão feitos como descrito por MEGA *et al.* 1970 e RENKEMA *et al.*, 1995. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. Os substratos p-nitrofenil β -N-acetilglucosaminida, p-nitrofenil β -N,N'-diacetilquitobiosídeo e p-nitrofenil β -N,N',N''-triacetilquitotriosídeo foram utilizados em concentrações finais de 0,25 mg/mL, todos solubilizados no tampão de ensaio fornecido pelo kit utilizado. Foi feito também uma solução padrão com p-nitrofenil, solubilizado na solução de carbonato de sódio de 41,66 mg/ml fornecido pelo kit, na concentração final de 10 mM. O procedimento se iniciou se equilibrando as soluções de substratos e a solução padrão na temperatura de 37 ° C, em banho maria. Após isso, os poços das placas foram preparados. O branco conteve 100 μL de cada solução de substrato, o poço padrão conteve 300 μL da solução padrão preparada, os controles positivos conteve 90 μL das soluções de cada substrato e 10 μL de uma solução de quitinase fornecida pelo kit, de concentração de 0,2 mg/mL. Os poços contendo os testes com os extratos testados contiveram 90 μL das soluções de cada substrato, e 10 μL do extrato celular do TGI das serpentes diluídos para a concentração proteica de 1 mg/mL. Foi adicionado primeiro as soluções de substratos, seguida das soluções de enzimas/extratos,

misturando-se levemente com uma ponteira de pipeta automática de 200 µL após a transferência. Após a adição dos extratos e dos controles, a placa foi incubada à 38° C por 30 minutos. Após a incubação, foi adicionado em cada poço 200 µL da solução de carbonato de sódio (solução de parada), o que permitiu a formação do complexo de cor do teste e impediu mais atividade das quitinasas presentes (imagem 9). O p-nitrofenol formado foi então determinado por espectrofotometria, no comprimento de onda de 405 nm. Todos os ensaios foram feitos em duplicatas e lidos em réplicas de 3. A atividade enzimática foi então determinada segundo a seguinte equação:

$$\text{Units/ml} = \frac{[(A_{405} \text{ amostra} - A_{405} \text{ branco}) \times 0.05 \times 0.3 \times \text{DFA}]}{A_{405} \text{ padrão} \times T \times V_{\text{enz}}}$$

Sendo:

- DFA o fator de diluição
- A 405 a absorbância em 405 nm
- T o tempo em minutos
- V_{enz} o volume adicionado das amostras/enzimas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaios preliminares

Foram feito extratos de 8 indivíduos diferentes, dos quais dois indivíduos são da espécie de lagarto *T. hispidus* e 6 indivíduos da espécie *E. viridis*. Extratos dos indivíduos da espécie *T. hispidus* foram utilizados como controle positivo devido ao hábito alimentar dessa espécie ser principalmente insetívoro. A dosagem proteica dos extratos brutos variou bastante de acordo com cada indivíduo, não havendo uma relação específica da massa dos tratos dos espécimes com sua dosagem proteica após a extração. Uma relação das dosagens proteicas está expressa na quadro abaixo (quadro 1):

Quadro 1: Concentrações proteicas após extração

Amostra	Dosagem proteica em mg/mL	Peso do trato digestivo em g
<i>T. hispidus</i> Macho	4,624 mg/mL	0,941 g
<i>T. hispidus</i> Fêmea	3,034 mg/mL	0,451 g
<i>E. viridis</i> ID 44	3,304 mg/mL	0,523 g
<i>E. viridis</i> ID 24	2,620 mg/mL	1,291 g
<i>E. viridis</i> ID 06	4,344 mg/mL	1,392 g
<i>E. viridis</i> ID 22	5,144 mg/mL	1,594 g
<i>E. viridis</i> ID 43	3,434 mg/mL	0,605 g
<i>E. viridis</i> ID 41	5,105 mg/mL	0,513 g

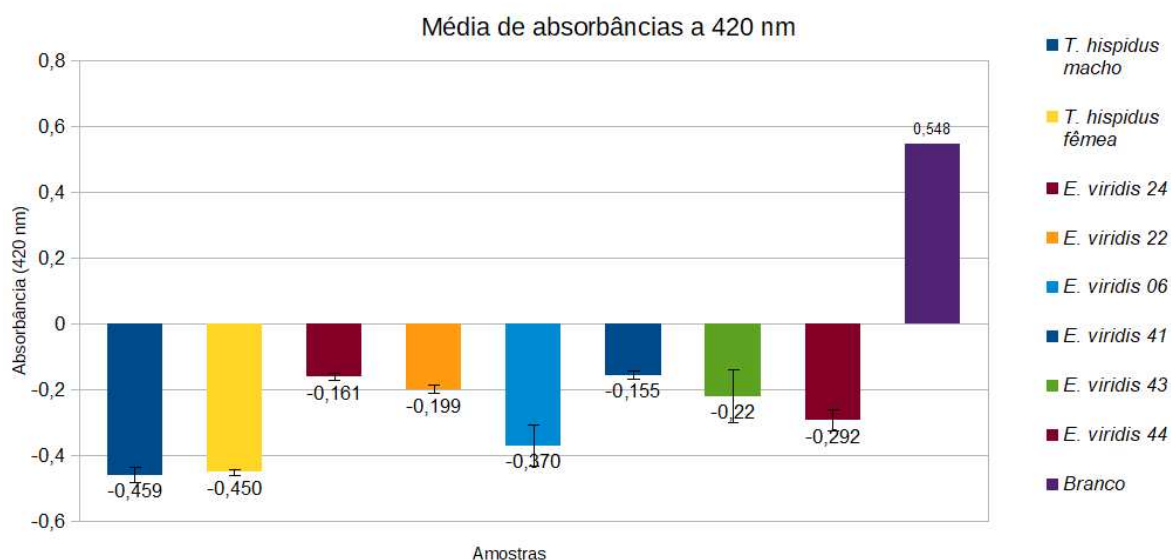
Fonte: dados da pesquisa

4.2 Ensaios de açúcar redutor

Ensaios com o reagente de Schales se baseiam no desaparecimento da cor amarelada do reagente utilizado, corada pelo ferricianeto de potássio, após a fervura. O desaparecimento é devido a oxirredução do ferro presente na molécula do ferricianeto de potássio na presença de açúcares redutores, tais como nesse caso monômeros e oligômeros de N-acetil-glucosamina, catalisado por altas temperaturas (IMOTO, 1971). Esse desaparecimento leva a mistura a se tornar transparente, e consequentemente permite a detecção e quantificação espectrofotométrica da concentração de açúcares redutores na amostra testada, que é proporcional a atividade quitinolítica do extrato testado. A absorbância obtida, no entanto, é inversamente proporcional a concentração de monômeros e oligômeros de N-acetil-glucosamina, o que significa que resultados positivos terão absorbância menor que a do branco. Isso é causado devido à descoloração do cromógeno na presença dos açúcares

redutores, como dito anteriormente.

Gráfico 1: Valores de absorbância dos extratos no teste de Schales

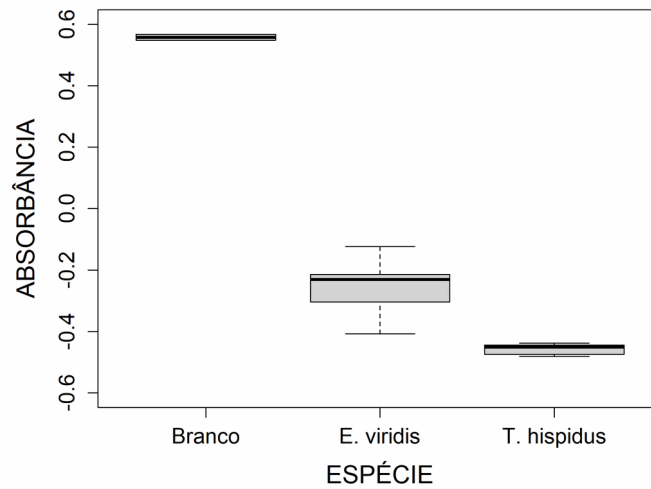


Fonte: dados da pesquisa

Extratos de *T. hispidus* demonstraram alta atividade quitinolítica, evidenciado pelo valor muito baixo de absorbância apresentada, tendo o valor médio de -0,459 UA para o espécime macho e -0,450 UA para o espécime fêmea. Todos os extratos de *E. viridis* testados demonstraram ter atividade quitinolítica. No entanto, essa atividade variou bastante de acordo com cada espécime testada. Os indivíduos de identificação 24, 22, 41 e 43 demonstraram ter a menor atividade quitinolítica, com valores de absorbância de -0,161 UA, -0,199 UA, -0,155 UA e -0,220 UA, respectivamente. Já os indivíduos de identificação 06 e 44 demonstraram alta atividade quitinolítica, tendo valores médios de -0,370 UA e -0,292 UA, respectivamente. Valores brutos de absorbância das duplicadas do teste estão representados na quadro 4 em anexos – B.

Embora todas os espécimes testados tenham demonstrado atividade quitinolítica, todas os espécimes testados tiveram diferenças entre si, evidenciados pelo teste de Kruskal-Wallis dos dados obtidos (Kruskal-Wallis – $\chi^2 = 24,06$; $p < 0,01$). Além disso, todas as amostras se diferiram do controle negativo, evidenciado pelo teste de Dunn post-hoc dos dados (Post-hoc Dunn Test – $p < 0,01$). Um gráfico comparando a absorbância total média dos espécimes dos lagartos *T. hispidus* e das serpentes *E. viridis* está expresso a seguir:

Gráfico 2: Valores de absorvância médios dos extratos no teste de Schales (Kruskal-Wallis – $\chi^2 = 24,06$; $p < 0,01$, Post-hoc Dunn Test – $p < 0,01$).

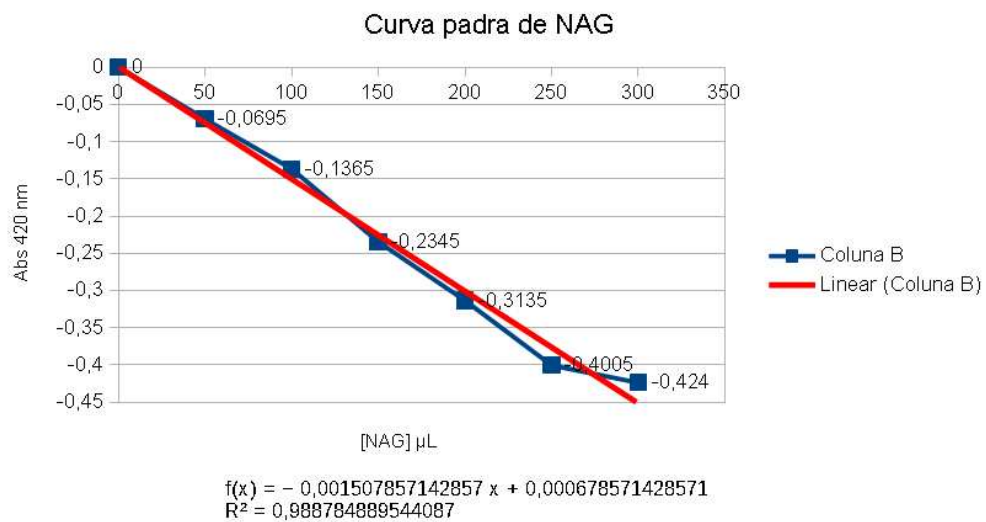


Fonte: dados da pesquisa

4.2.1 Cálculo de atividade com o teste de açúcar redutor

A curva de N-acetil-glucosamina teve valor de R^2 de 0,98, dando viabilidade a aplicação da sua equação da reta na determinação de NAG contido nas amostras. O gráfico contendo a curva, bem como sua equação da reta está disposto a seguir:

Gráfico 3: curva padrão de N-acetil-glucosamina, valor de $R^2=0,988$



Fonte: dados da pesquisa

Com base na equação da reta dessa curva, a concentração de NAG pode ser calculado a partir da seguinte equação:

$$[\text{NAG}]_{\text{pósincubação}} = \frac{(\text{Abs } 420 \text{ nm Amostra} - \text{Abs } 420 \text{ nm Branco}) - 0,0006785}{-0,001507}$$

Baseado nas concentrações de N-acetil-glucosamina encontrados pela curva padrão, o cálculo da atividade enzimática pode ser feito. Os valores de atividade quitinolítica média dos extratos testados estão expressos no quadro a seguir:

Quadro 2 : Valores da atividade quitinolítica calculada em U/mL e em nkat/mL

Indivíduo	Atividade	
	U/mL	nkat
<i>T. hispidus macho</i>	25,419	423,510
<i>T. hispidus femea</i>	24,921	415,333
<i>E. viridis id 24</i>	8,940	149,000
<i>E. viridis id 22</i>	11,041	184,000
<i>E. viridis id 06</i>	20,497	341,500
<i>E. viridis id 41</i>	8,608	143,333
<i>E. viridis id 43</i>	12,203	203,333
<i>E. viridis id 44</i>	16,184	169,667

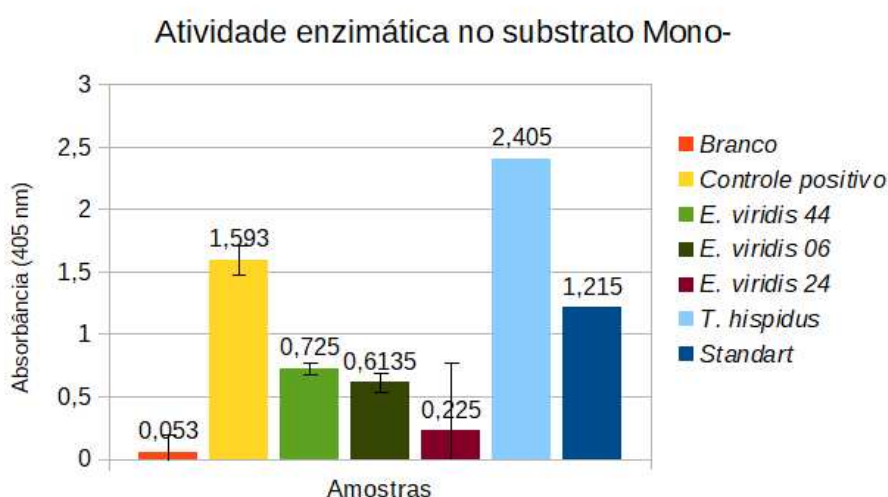
Fonte: dados da pesquisa

Indivíduos de *T. hispidus* tiveram uma atividade quitinolítica maior que os indivíduos de *E. viridis*, sendo a média de atividade de 25,17 U/mL em *T. hispidus* contra apenas de 12,863 U/mL em indivíduos de *E. viridis*, tendo os lagartos uma atividade cerca de 51% maior que as serpentes analisadas. A atividade maior dos lagartos era esperada devido a dieta desse comparado a das serpentes. Espécimes de *T. hispidus*, embora tenham sido observados se alimentando de uma grande diversidade de organismos, tais como anuros (RIBEIRO, 2009), plantas (VAN SLUYS, 2004), outros répteis (PERGENTINO, 2017; MASCARENHAS-JUNIOR 2021) e até mesmo outros indivíduos da mesma espécie (SALES, 2011), tem como principais presas invertebradas artrópodes, sendo que energia contida na quitina presente nas carapaças dessas presas é essencial para manter o hábito ativo dessa espécie (VAN SLUYS, 2004), o que teria causado pressões evolutivas favoráveis ao desenvolvimento de enzimas quitinolíticas no trato gastrointestinal dessa espécie.

4.3 Dos ensaios com p-Nitrofenil

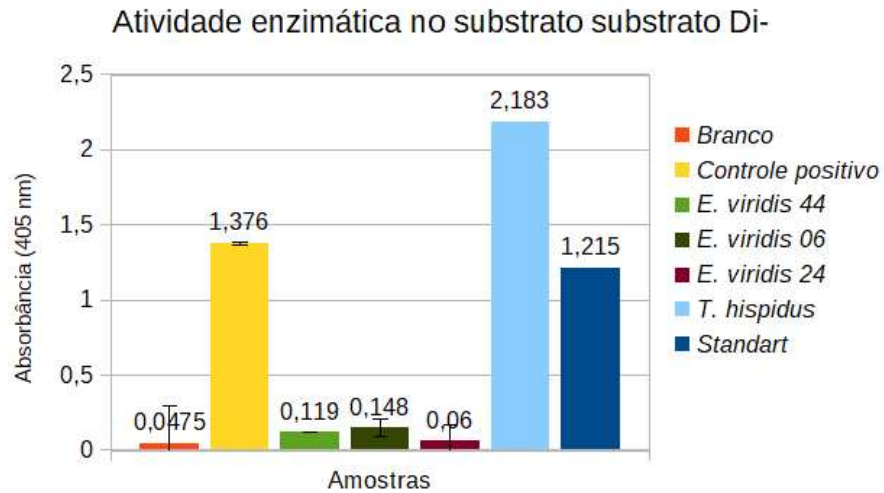
A existência de atividade quitinolítica nesse teste é evidenciada a partir da detecção de resíduos de p-nitrofenol em uma solução básica de carbonato de cálcio, o que torna a solução mais amarelada dependendo de maiores concentrações de p-nitrofenol. O p-nitrofenol é liberado após a digestão dos substratos artificiais utilizados no kit pela ação de enzimas quitinolíticas. Valores de absorbâncias brutas das duplicadas do teste com substratos de p-nitrofenil estão representados na quadro 5, nos anexos. Foi possível detectar ação quitinolítica no indivíduo da espécie *E. viridis* de ID 44, porém o indivíduo de ID 24 apresentou resultados próximos do Branco nos substratos β -N,N'-diacetilquitobiosídeo e p-nitrofenil β -N,N',N''-triacetilquitotriosídeo. A atividade quitinolítica dessa espécie se mostrou especialmente forte no substrato 4-Nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminidina. Extratos do *T. hispidus* macho mostraram grande atividade quitinolítica em todos os substratos, porém essa também foi especialmente forte no substrato 4-Nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminidina. As atividades quitinolíticas médias de acordo com cada substrato, bem como uma comparação entre as atividades em cada substrato podem ser interpretadas pelos gráficos abaixo:

Gráfico 4: Valores de absorbância dos extratos nos substratos mono- no teste de p-nitrofenil



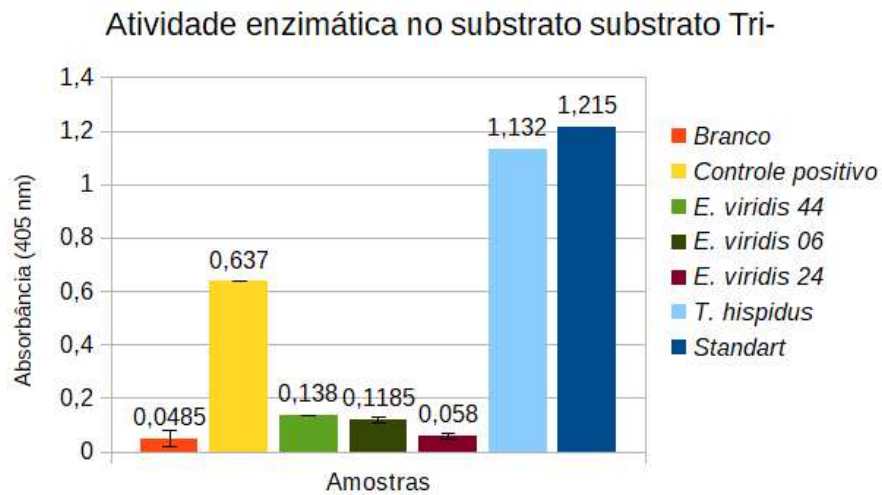
Fonte: dados da pesquisa

Gráfico 5: Valores de absorbância dos extratos nos substratos di- no teste de p-nitrofenil



Fonte: dados da pesquisa

Gráfico 6: valores de absorbância dos extratos nos substratos tri- no teste de p-nitrofenil



Fonte: dados da pesquisa

4.3.1 Do cálculo de atividade com p-Nitrofenil

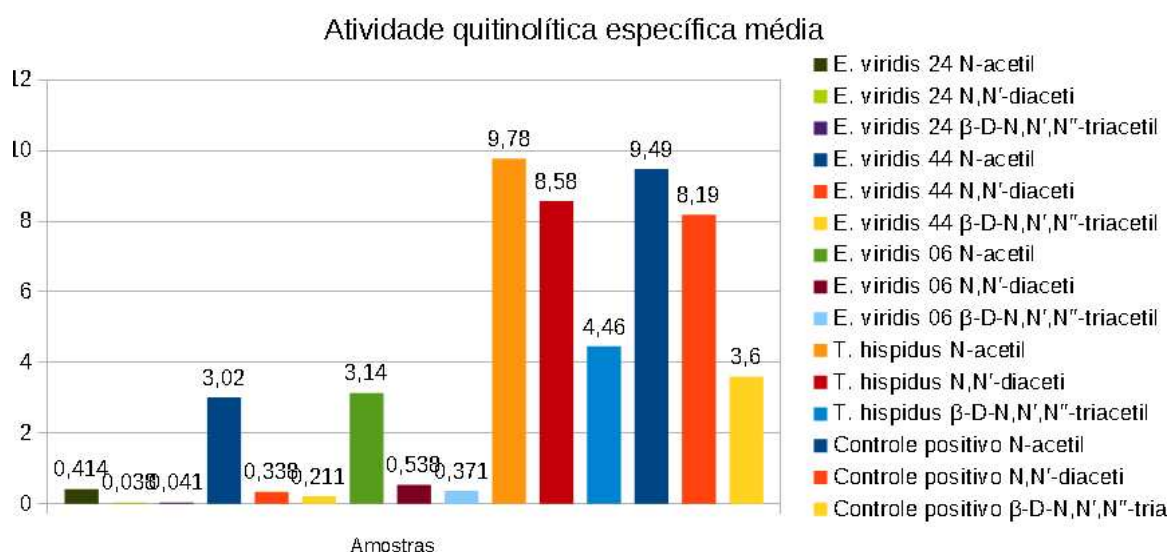
A atividade enzimática das quitinases presentes também foi passível de ser calculada a partir da absorbância a partir da equação descrita na metodologia. Valores brutos da absorbância do teste estão descritos nos quadros 5, 6 e 7 em anexos – B. A partir da equação de atividade, e sabendo que o fator de diluição utilizado foi de 100 para os extratos e 100 para o controle positivo, as atividades enzimáticas puderam ser calculadas. Valores de atividade no teste se utilizando o kit de tecção baseado no p-Nitrofenil se diferenciaram, sendo que testes se utilizando o reagente de Schales mostraram valores absolutos maiores. Um quadro contendo as unidades de atividade (quadro 3), bem como um gráfico comparando as atividades (gráfico 7) estão expressos a seguir:

Quadro 3: atividade específica dos extratos gastrointestinais dos espécimes testados

Amostra testada	Unidades por mL
<i>E. viridis</i> 44 N-acetil	3,020 U/mL
<i>E. viridis</i> 44 N,N'-diaceti	0,338 U/mL
<i>E. viridis</i> 44 β -D-N,N',N''-triacetil	0,211 U/mL
<i>E. viridis</i> 06 N-acetil	3,140 U/mL
<i>E. viridis</i> 06 N,N'-diaceti	0,538 U/mL
<i>E. viridis</i> 06 β -D-N,N',N''-triacetil	0,371 U/mL
<i>E. viridis</i> 24 N-acetil	0,414 U/mL
<i>E. viridis</i> 24 N,N'-diaceti	0,038 U/mL
<i>E. viridis</i> 24 β -D-N,N',N''-triacetil	0,041 U/mL
<i>T. hispidus</i> N-acetil	9,780 U/mL
<i>T. hispidus</i> N,N'-diaceti	8,580 U/mL
<i>T. hispidus</i> β -D-N,N',N''-triacetil	4,460 U/mL
Controle positivo N-acetil	9,490 U/mL
Controle positivo N,N'-diaceti	8,190 U/mL
Controle positivo β -D-N,N',N''-triacetil	3,600 U/mL

Fonte: dados da pesquisa

Gráfico 7: comparação de atividades médias entre os extratos testados no teste p-nitrofenil



Fonte: dados da pesquisa

A atividade específica foi maior nos substratos mono- o que indica que a principal enzima quitinolítica presente nos extratos foi uma exoquitinase (TRAN, 2019). A presença de exoquitinases em animais já foi identificada, sendo a principal quitinase desse tipo as enzimas da família da quitobiosidase (PLACE 1996). Ensaio quitinolíticos com *Sceloporus undulatus* (STEJNEGER, 1890) também identificaram a presença de exoquitinases nos seus tratos digestivos, inclusive se identificando também enzimas da família das quitobiosidases, além de outras quitinases (MARSH, 2001). Também já foram descritas e quantificadas quitobiosidases no trato gastro intestinal do jabuti *Testudo hermanni* (GMELIN, 1789) e do lagarto *Lacerta viridis* (LAURENTI, 1768) (JENIAUX, 1961).

A origem de secreção de enzimas quitinolíticas gástricas pode variar bastante de acordo com a espécie estudada. Em mamíferos, quitinases e outras enzimas com ação quitinolítica foram observadas principalmente no tecido estomacal e suco gástrico. Em espécies como nos roedores *Mus musculus* (LINNAEUS, 1758), *Rattus norvegicus* (BERKENHOUT, 1769) e *Cricetus frumentarius* (PALLAS, 1811) foi observada que a atividade quitinolítica se concentrou exclusivamente no tecido estomacal (RANKIGNOUL e JEUNIAUX 1964). De fato, quitinases gástricas já foram identificadas até mesmo no suco gástrico de humanos (PAOLETTI, 2007). No entanto, répteis demonstram uma fisiologia digestiva diferente dos mamíferos. Na espécie de lagarto *Sceloporus undulatus* (STEJNEGER, 1890), foram identificadas enzimas quitinolíticas nos tecidos do pâncreas, intestino e estômago desse

animal. Porém a atividade quitinolítica se concentrou principalmente no tecido pancreático e estomacal, sendo observado pouca atividade no tecido intestinal (MARSH, 2001). Resultados parecidos foram encontrados em ensaios quitinolíticos dos tecidos gástricos dos lagartos *Anolis carolinensis* (VOIGT, 1832) (JENIAUX, 1963) e *Lacerta viridis* (LAURENTI, 1768) (JENIAUX, 1963) e no cágado *Mauremys caspica* (GMELIN, 1774) (MICHA et al, 1973) tendo as quitinases detectadas nessas espécies atingido seu pico de atividade no tecido pancreático, inclusive sendo completamente ausentes no tecido intestinal das espécies *Anolis carolinensis* e *Mauremys caspica*. Baseado nesses estudos e na proximidade taxonômica entre essas espécies, os extratos de *T. hispidus* podem também ter o tecido pancreático como o principal secretor de quitinases. Porém, por nunca terem sido identificadas a presença e origem de quitinases em qualquer ofídio até a data de publicação desse estudo, não se sabe se indivíduos da espécie *E. viridis* seguem esse mesmo padrão.

Resultados positivos eram esperados devido aos hábitos alimentares da espécie *T. hispidus*, que depende significativamente da energia contida nas carapaças das suas presas (FERREIRA SANTANA, 2017). No entanto, a existência de serpentes contendo quitinases funcionais no trato digestivo é desconhecida na literatura. Testes quitinolíticos feito por MICHA et al (1973) com o trato digestivo da serpente *Natrix natrix* (LINNAEUS, 1758) demonstraram índices muito pequenos de N-acetil-glucosamina nos rins e baço da serpente, o que pode ter sido proveniente de reações cruzadas com outras enzimas glicosídicas e imunológicas dos órgãos, além de nenhum índice de N-acetil-glucosamina nos tecidos intestinais, pancreáticos e estomacais. Embora se conheça espécies de variados táxons com dietas principalmente insetívoras, tais como *Opheodrys aestivus* (LINNAEUS 1766) , *Tantilla coronata* (BAIRD & GIRARD 1853) , *Sonora semiannulata* (BAIRD & GIRARD 1853) e *Eirenis modestus* (MARTIN 1838) (MIZSEI 2019) a fisiologia digestiva dessas serpentes ainda não foi estudada e portanto não foram identificadas a presença de quitinases nos tratos digestivo dessas.

É conhecido que os venenos de algumas espécies de serpentes contêm toxinas com domínios de ligação à quitina e lectina (KIELISZEWSKI et al, 1994), tendo essas enzimas mudado sua função fisiológica nas serpentes ao longo da evolução das espécies, da mesma forma que algumas dessas enzimas podem ter conservado sua função digestiva. A origem de possíveis enzimas quitinolíticas no trato intestinal desses répteis pode ser debatida. A presença de isolados de bactérias quitinolíticas no trato gastrointestinal de répteis como os lagartos *Mabouya multifasciata* (KUHL 1820) e *Calotes versicolor* (FITZINGER, 1826) comprova que a atividade quitinolítica desses répteis nem sempre podem está relacionadas a enzimas

secretadas pelo próprio réptil em questão e podem ser provenientes da microbiota do animal. Ao todo, foram encontrados 10 estirpes isoladas com atividade quitinolítica em *Calotes versicolor* e 7 em *Mabouya multifasciata*, sendo que a faixa de atividade máxima em função do pH é de em torno do pH 6 para a estirpe com maior atividade quitinolítica de *Mabouya multifasciata* (estirpe SM6) e em torno do pH 8 para a estirpe com maior atividade quitinolítica de *Calotes versicolor* (estirpe SC9) (SIADARI, 2017). Estirpes quitinolíticas também já foram identificadas no lagarto *Gekko gecko*, sendo que nesse a estirpe com maior atividade quitinolítica possuía dois picos de atividade nas faixas de pH 4 e 8 (estirpe LK12) (PARDOSI, 2018), provando que não só o número de estirpes de bactérias quitinolíticas em lagartos é grande mas também esses possuem grande variedade e especificidade de suas quitinases.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos ensaios de açúcar redutor, foi possível identificar a ação de enzimas quitinolíticas nos extratos de *T. hispidus* e *E. viridis* testados. Essa atividade foi maior nos extratos de *T. hispidus* principalmente por conta dos hábitos alimentares dessa espécie, o que embasa o uso de extratos dessa espécie como controle positivo para os testes. Isso foi justificado por valores maiores de atividade nos dois testes utilizados, tendo tido a atividade do teste de Schales o valor médio de 12,863 U/mL para indivíduos de *E. viridis*, contra um valor médio de 25,17 para extratos de *T. hispidus*, tendo tido o lagarto uma atividade cerca de 51% maior que a serpente. Já nos ensaios de p-nitrofenil, a atividade quitinolítica das duas espécies foi especificamente maior nos substratos de 4-Nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminidina, tendo valor médio de 2,191 U/mL nos extratos dos três indivíduos de *E. viridis* e 9,78 U/mL do extrato testado de *T. hispidus*, o que corrobora que a enzima com melhor ação catalítica quitinolítica presente nos extratos pode trata-se de uma exoquitinase, capaz de atacar monômeros de N-acetil-glucosamina (TRAN, 2019).

No entanto, o extrato dos tecidos gastrointestinais de *T. hispidus* também tiveram uma reatividade considerável nos substratos N,N'-diacetilquitobiosídeo e p-nitrofenil β -N,N',N''-triacetilquitotriosídeo, com o valor médio de 8,385 U/mL para os substratos de N,N'-diacetilquitobiosídeo e 4,03 U/mL para os substratos de p-nitrofenil β -N,N',N''-triacetilquitotriosídeo, o que evidencia a presença de possíveis endoquitinases. Porém, os indivíduos de *E. viridis* demonstraram ter uma baixíssima atividade nesses dois últimos substratos, sendo os valores médios de 0,304 U/mL para os substratos de N,N'-diacetilquitobiosídeo e 0,207 U/mL para os substratos de β -N,N',N''-triacetilquitotriosídeo. Essa diferença no perfil de atividade enzimática das duas espécies testadas pode ser um indicativo de quitinases com origens e funcionamento totalmente distintos, o que justifica a realização de estudos mais aprofundados do perfil proteico dos tratos gastrointestinais dessas duas espécies.

REFERÊNCIAS

- AL-AHMADI, K. Jami et al. Optimization of medium and cultivation conditions for chitinase production by the newly isolated: *Aeromonas spp.* **Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 266-272, 2008.
- BENEDITO FILHO, P. D. et al. Presence of chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase in the *Aedes aegypti*: a chitinolytic system involving peritrophic matrix formation and degradation. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 12, p. 1723-1729, 2002.
- BUSSINK, Anton P. et al. **A single histidine residue modulates enzymatic activity in acidic mammalian chitinase**. FEBS letters, v. 582, n. 6, p. 931-935, 2008.
- BISSWANGER, Hans. Enzyme assays. **Perspectives in Science**, v. 1, n. 1-6, p. 41-55, 2014.
- BOLLER, Thomas; MAUCH, Felix. Colorimetric assay for chitinase. **Methods in enzymology**. Academic Press, 1988. p. 430-435.
- CAMPUZANO-F, Silvia E.; LAURA, Urquijo-T.; JESSICA, Valderrama. Evaluación de la actividad celulolítica y quitinolítica de hongos filamentosos aislados de rizósfera de cultivos de papa para control de rhizoctonia solani. **Nova**, v. 15, n. 28, p. 45-55, 2017.
- CANBACK, B.; ANDERSSON, S. G. E.; KURLAND, C. G. The global phylogeny of glycolytic enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 9, p. 6097-6102, 2002.
- CHEN, Kai; ARNOLD, Frances H. Engineering new catalytic activities in enzymes. **Nature Catalysis**, v. 3, n. 3, p. 203-213, 2020.
- CHU, T. L.; BODNAR, G. Are chitinolytic bacteria present in the gut of *Glomeris hexasticha* (Diplopoda)? **Opuscula zoologica**, v. 22, p. 133, 1986.
- CORNELIUS, C.; DANDRIFOSSE, G. Substrate specificity of the β (1 $\rightarrow$ 4)-N-acetylglucosaminidase of vertebrate. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 5, p. 5356, 1977.
- CORREA, Daniele N.; QUINTELA, Fernando M.; LOEBMANN, Daniel. Feeding ecology of *Erythrolamprus jaegeri jaegeri* (Günter, 1858) and *Erythrolamprus poecilogyrus* sublineatus (Cope, 1860) in the coastal zone of Subtropical Brazil (Serpentes, Dipsadidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 1, p. 293-308, 2016.

COSTA, Henrique Caldeira; BÉRNILS, Renato Silveira. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 11-57, 2018.

DAHIYA, Neetu et al. Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: Its purification, characterization and reaction pattern. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 14-25, 2005.

DAHIYA, Neetu; TEWARI, Rupinder; HOONDAL, Gurinder Singh. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 71, n. 6, p. 773-782, 2006.

DE MESQUITA, Paulo Cesar Mattos Dourado et al. Ecologia e história natural das serpentes de uma área de Caatinga no nordeste brasileiro. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 53, n. 8, 2013.

FERRARI, Alessandro R.; GABER, Yasser; FRAAIJE, Marco W. A fast, sensitive and easy colorimetric assay for chitinase and cellulase activity detection. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2014.

FERREIRA, Anthony Santana et al. The diet of six species of lizards in an area of Caatinga, Brazil. **Herpetological Journal**, v. 27, n. 2, 2017.

FERREIRA, Ricardo B. et al. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p. 677-700, 2007.

FERREIRA-FERNANDES, H.; BORGES-NOJOSA, D.M.; LIMA, D.C.; BORGES LEITE, M.J.; PASSOS, D.C.; TAVARES, A.A. *Waglerophis merremii* (Wagler's snake). Regurgitation of Prey's Stomach Content During Ingestion Process. **Herpetological Review**. 2008.

FONTAINE, Samantha S.; NOVARRO, Alexander J.; KOHL, Kevin D. Environmental temperature alters the digestive performance and gut microbiota of a terrestrial amphibian. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 20, p. jeb187559, 2018.

FÖRDESI, Blazit; Guide to Enzyme Unit Definitions and Assay Design, Biomol Blog Resources Biomol GmbH - **Life Science Shop**, 2019. Acessado em 04-09-2021

FRANKIGNOUL, M.; JEUNIAUX, Charles. Distribution des chitinases chez les mammifères rongeurs. **Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique**. Société Royale Zoologique de Belgique, 1964. p. 1-8.

GOODAY, G. W. Aggressive and defensive roles for chitinases. **Chitin enzymology**, v. 2, p. 125-134, 1996.

GUEDES, Thais B.; NOGUEIRA, Cristiano; MARQUES, Otavio AV. Diversity, natural history, and geographic distribution of snakes in the Caatinga, Northeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 3863, n. 1, p. 1-93, 2014.

GUTOWSKA, Magdalena A.; DRAZEN, Jeffrey C.; ROBISON, Bruce H. Digestive chitinolytic activity in marine fishes of Monterey Bay, California. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 139, n. 3, p. 351-358, 2004.

HACKMAN R.G. & GOLDBERG, M. New substrates for use with chitinases. **Analytical Biochemistry**, 1964, 8, 397-401

HAKALA, B. E.; WHITE, C.; RECKLIES, A. D. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 34, p. 25803-25810, 1993.

HIYOSHI, Masateru et al. Oviductin, the oviductal protease that mediates gamete interaction by affecting the vitelline coat in *Bufo japonicus*: its molecular cloning and analyses of expression and posttranslational activation. **Developmental biology**, v. 243, n. 1, p. 176-184, 2002.

HOSO, MASAKI; HORI, MICHIO. Identification of molluscan prey from feces of Iwasaki's slug snake, *Pareas iwasakii*. **Herpetological Review**, v. 37, n. 2, p. 174-176, 2006.

IMOTO, Taiji; YAGISHITA, Kazuyoshi. A simple activity measurement of lysozyme. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 35, n. 7, p. 1154-1156, 1971.

JANKIEWICZ, Urszula; BRZEZINSKA, Maria Swiontek; SAKS, Elżbieta. Identification and characterization of a chitinase of *Stenotrophomonas maltophilia*, a bacterium that is antagonistic towards fungal phytopathogens. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 113, n. 1, p. 30-35, 2012.

JEUNIAUX, Charles. Chitinase: an addition to the list of hydrolases in the digestive tract of vertebrates. **Nature**, v. 192, n. 4798, p. 135-136, 1961.

JEUNIAUX, Charles. Recherches de polysaccharideases dans l'estomac d'un paresseux. **Arch. Int. Physiol. Biochim.** 70, 407-408, 1962.

JEUNIAUX, Charles. Distribution, localisation et evolution des systemes enzymatiques chitino'lytiques dans le renge animal. Chitine et Chitinolyse: un Chapitre de la Biologie Moleculaire. **Masson et Cie**, Paris, pp. 107-167, 1963.

JOHANSEN, Julia S. Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. **Dan Med Bull**, v. 53, n. 2, p. 172-209, 2006.

JOE, Shaun; MAPANA, Sarojini S. An Efficient Method of Production of Colloidal Chitin for Enumeration of Chitinase Producing Bacteria. **Journal of Sciences**, v. 4, n. 16, p. 37-45, 2017.

KARASOV, W. H. Can terrestrial vertebrates digest and absorb chitin? **American Zoologist**. **1041 NEW HAMPSHIRE ST, LAWRENCE, KS 66044: AMER SOC ZOOLOGISTS**, p. A24-A24, 1989.

KIELISZEWSKI, Marcia J.; SHOWALTER, Allan M.; LEYKAM, Joseph F. Potato lectin: a modular protein sharing sequence similarities with the extensin family, the hevein lectin family, and snake venom disintegrins (platelet aggregation inhibitors). **The Plant Journal**, v. 5, n. 6, p. 849-861, 1994.

KING, E. J.; CAMPBELL, Diana M. International enzyme units an attempt at international agreement. **Clinica Chimica Acta**, v. 6, n. 3, p. 301-306, 1961.

KIRISTI, Melek et al. Lysozyme-based antibacterial nanomotors. **ACS nano**, v. 9, n. 9, p. 9252-9259, 2015.

KONRADSEN, Jon R. et al. The chitinase-like protein YKL-40: a possible biomarker of inflammation and airway remodeling in severe pediatric asthma. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 132, n. 2, p. 328-335. e5, 2013.

KUMAR, Ashutosh; ZHANG, Kam YJ. Human chitinases: structure, function, and inhibitor discovery. **Targeting Chitin-containing Organisms**, p. 221-251, 2019.

LÓPEZ, M.S; GIRAUDO, A.R. Ecology of the Snake *Philodryas patagoniensis* from Northeast Argentina. **Journal of Herpetology**, 42(3): 474-480. 2008.

MARSH, Rebekah S. et al. Characterization of gastrointestinal chitinase in the lizard *Sceloporus undulatus garmani* (Reptilia: Phrynosomatidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 128, n. 4, p. 675-682, 2001.

MARTIN, Diane M. et al. Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLcDNA cloning, and enzyme assays. **BMC plant biology**, v. 10, n. 1, p. 1-22, 2010.

MASCARENHAS-JUNIOR, Paulo Braga. New predation records: *Tropidurus hispidus* (Spix, 1805) preying *Hemidactylus mabouia* (Moreau and Jonnès, 1818) and *Amphisbaena vermicularis* Wagler, 1824 in Pernambuco, northeastern Brazil. **Herpetology Notes**, v. 14, p. 645-648, 2021.

MCCREATH, Kenneth J.; GOODAY, Graham W. A rapid and sensitive microassay for determination of chitinolytic activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 14, n. 4, p. 229-237, 1992

MEGA, Tomohiro; IKENAKA, Tokuji; MATSUSHIMA, Yoshio. Studies on N-Acetyl- β -D-glucosaminidase of *Aspergillus oryzae*. **The Journal of Biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 109-117, 1970.

MICHELAKAKIS, H.; DIMITRIOU, E.; LABADARIDIS, I. The expanding spectrum of disorders with elevated plasma chitotriosidase activity: an update. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 27, n. 5, p. 705-706, 2004.

MIZSEI, Edvárd et al. A trait-based framework for understanding predator-prey relationships: Trait matching between a specialist snake and its insect prey. **Functional Ecology**, v. 33, n. 12, p. 2354-2368, 2019.

MICHA, P. J.; DANDRIFOSSE, G.; JEUNIAUX, C. Distribution et localisation tissulaire de la synthèse des chitinases chez les vertébrés inférieurs. **Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie**, v. 81, n. 3, p. 439-451, 1973.

MICHAELIS, Leonor et al. Die kinetik der invertinwirkung. **Biochem. z.**, v. 49, n. 333-369, p. 352, 1913.

MODAHL, Cassandra M.; DURBAN, Jordi; MACKESSY, Stephen P. Exploring toxin evolution: venom protein transcript sequencing and transcriptome-guided high-throughput proteomics. **Snake and Spider Toxins**. Humana, New York, 2020. p. 97-127.

MOON, Chaeyeong et al. Antifungal activity and patterns of N-acetyl-chitooligosaccharide degradation via chitinase produced from *Serratia marcescens* PRNK-1. **Microbial pathogenesis**, v. 113, p. 218-224, 2017

MURTHY, N.; BLEAKLEY, B. Simplified method of preparing colloidal chitin used for

screening of chitinase-producing microorganisms. **Internet J Microbiol**, v. 10, n. 2, p. e2bc3, 2012.

MEYER, Birte; IMHOFF, Johannes F.; KUEVER, Jan. Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the *soxB* gene among sulfur-oxidizing bacteria—evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 2957-2977, 2007.

NADAR, Shamraja S.; PAWAR, Rohini G.; RATHOD, Virendra K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. **International journal of biological macromolecules**, v. 101, p. 931-957, 2017.

NANNIPIERI, Paolo. Role of stabilised enzymes in microbial ecology and enzyme extraction from soil with potential applications in soil proteomics. **Nucleic acids and proteins in soil. Springer**, Berlin, Heidelberg, 2006. p. 75-94.

NEUFELD, T. et al. Combined phage typing and amperometric detection of released enzymatic activity for the specific identification and quantification of bacteria. **Analytical chemistry**, v. 75, n. 3, p. 580-585, 2003.

NOGUEIRA, F. C. S. et al. Proteome analysis of embryogenic cell suspensions of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant cell reports**, v. 26, n. 8, p. 1333-1343, 2007.

NOMENCLATURE, Committee of the international union Of Biochemistry (NC-IUB). Units of enzyme activity. **Eur J Biochem**, v. 97, p. 319-320, 1979.

NOMENCLATURE, Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) Symbolism and terminology in enzyme kinetics. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 224, n. 2, p. 732-740, 1983.

OSHIMA, Hiroyuki et al. Isolation and sequence of a novel amphibian pancreatic chitinase. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 132, n. 2, p. 381-388, 2002.

ŌTAKARA, Akira. Studies on the Chitinolytic Enzymes of Black-koji Mold: Part I. Viscometric Determination of Chitinase Activity by Application of Glycol Chitin as a New Substrate Part II. Purification of Chitinase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 50-60, 1961.

PARDOSI, Lukas; SURYANTO, Dwi; SIREGAR, Ameilia Zuliyanti. Isolation of Chitinolytic Bacteria From Two Lizard Digestive Tract and Characterization of Their Crude Chitinase. **International Journal of ChemTech Research**, v. 11, n. 07, p. 17-28, 2018

PAOLETTI, Maurizio G. et al. Human gastric juice contains chitinase that can degrade chitin. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 51, n. 3, p. 244-251, 2007.

PARK, Jae Kweon et al. Purification and Characterization of the Chitinase (ChiA) from *Enterobacter* sp. Gl. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 61, n. 4, p. 684-689, 1997.

PARK, Kiyun et al. Changes in exoskeleton surface roughness and expression of chitinase genes in mud crab *Macrophthalmus japonicus* following heavy metal differences of estuary. **Marine pollution bulletin**, v. 138, p. 11-18, 2019.

PERGENTINO, Helânio Emanuel S. et al. A new case of predation on a lizard by *Tropidurus hispidus* (Squamata, Tropiduridae), including a list of saurophagy events with lizards from this genus as predators in Brazil. **Herpetology Notes**, v. 10, p. 225-228, 2017.

PENDARVIS, Richard. Essentials of Carbohydrate Chemistry by John F. Robyt. **The Chemical Educator**, v. 3, n. 5, p. 1-2, 1998.

PETERS, T. J. Partition of cell particles and macromolecules: Separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes and cells in aqueous polymer two phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. **P-A. Albertsson**. 1986, John Wiley and Sons, Chichester, £ 61.35 pages 346. 1987.

PLACE, A. R. The biochemical basis and ecological significance of chitin digestion. **Chitin enzymology**, v. 2, p. 39-54, 1996.

PRASAD, Shivcharan; ROY, Ipsita. Converting enzymes into tools of industrial importance. **Recent patents on biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 33-56, 2018.

QUESNE, Matthew G.; BOROWSKI, Tomasz; DE VISSER, Sam P. Quantum mechanics/molecular mechanics modeling of enzymatic processes: Caveats and breakthroughs. **Chemistry—A European Journal**, v. 22, n. 8, p. 2562-2581, 2016.

RENKEMA, G. Herma et al. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 5, p. 2198-2202, 1995.

RENKEMA, G. H., R. G. BOOT, F. L. Au, W. E. DONKER-KOOPMAN, A. STRIJLAND et al. Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding

lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. **Eur. J. Biochem.** 251: 504–509, 1998.

RIBEIRO, L. TROPIDURUS SEMITAENIATUS. TROPIDURUS HISPIDUS (NCN). FROG PREDATION. **Herpetological Review**, v. 40, n. 2, p. 228, 2009.

RIBOLDI, Giulietta M.; DI FONZO, Alessio B. GBA, Gaucher disease, and Parkinson's disease: from genetic to clinic to new therapeutic approaches. **Cells**, v. 8, n. 4, p. 364, 2019.

RIES, Markus et al. Critical assessment of chitotriosidase analysis in the rational laboratory diagnosis of children with Gaucher disease and Niemann–Pick disease type A/B and C. **Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism**, v. 29, n. 5, p. 647-652, 2006.

ROTTA, M. A. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. **Embrapa Pantanal-Documentos (INFOTECA-E)**, 2003.

RODRIGUES, Miguel Trefaut. Herpetofauna da caatinga. **Ecologia e conservação da Caa-tinga**, v. 1, p. 181-236, 2003.

SANON, A.; BORIES, C.; LOISEAU, P. M. Chitinolytic activities in *Trichomonas vaginalis*. **Parasite**, v. 5, n. 1, p. 75-78, 1998.

SALES, R. F. D. et al. A case of cannibalism in the territorial lizard *Tropidurus hispidus* (Squamata: Tropiduridae) in Northeast Brazil. **Herpetology Notes**, v. 4, p. 265-267, 2011.

SANTANA, Diego J.; SILVA, ET da; OLIVEIRA, EF de. Predação de *Dendropsophus elegans* (Anura, Hylidae) por *Phoneutria nigriventer* (Araneae, Ctenidae) em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, v. 26, p. 59-65, 2009.

SCHOMBURG, Dietmar; SCHOMBURG, Ida; CHANG, Antje (Ed.). Handbook of enzymes. **Springer Science & Business Media**, 2013.

SCHOMBURG, I. et al. The BRENDA enzyme information system—From a database to an expert system. **Journal of biotechnology**, v. 261, p. 194-206, 2017.

SHEN, Chia-Rui et al. Colloid chitin azure is a dispersible, low-cost substrate for chitinase measurements in a sensitive, fast, reproducible assay. **Journal of Biomolecular screening**, v. 15, n. 2, p. 213-217, 2010.

SIADARI, David Barita U. Isolasi Bakteri Kitinolitik dari Saluran Pencernaan: Beberapa Hewan Pemakan Serangga dan: Karakterisasi Kitinase Kasar. **Repositório institucional da universidade de Sumatra**, Sumatra 2017.

SMITH, Paul K. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **U.S. Patent n. 4,839,295**, 13 jun. 1989.

SUENAGA, H. Targeted metagenomics unveils the molecular basis for adaptive evolution of enzymes to their environment. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1018, 2015.

SUGITA, H.; ITO, Y. Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin. **Letters in applied microbiology**, v. 43, n. 3, p. 336-342, 2006.

SUNAGAR, Kartik et al. Ecological venomomics: How genomics, transcriptomics and proteomics can shed new light on the ecology and evolution of venom. **Journal of proteomics**, v. 135, p. 62-72, 2016.

SUZUKI, Masako et al. Cellular expression of gut chitinase mRNA in the gastrointestinal tract of mice and chickens. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1081-1089, 2002.

TRAN, Thi Ngoc et al. An exochitinase with N-acetyl- β -glucosaminidase-like activity from shrimp head conversion by *Streptomyces speibonae* and its application in hydrolyzing β -chitin powder to produce N-acetyl-D-glucosamine. **Polymers**, v. 11, n. 10, p. 1600, 2019.

VANGILDER, Larry D.; VITT, Laurie J. Ecology of a snake community in northeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 4, n. 2, p. 273-296, 1983.

VAN SLUYS, Monique et al. Diet, activity, and microhabitat use of two syntopic *Tropidurus* species (Lacertilia: Tropiduridae) in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 38, n. 4, p. 606-611, 2004.

WANG, Shuang Ping et al. Phylogeny of mRNA capping enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 18, p. 9573-9578, 1997.

WHITAKER JR, John O.; DANNELLY, H. Kathleen; PRENTICE, David A. Chitinase in insectivorous bats. **Journal of Mammalogy**, v. 85, n. 1, p. 15-18, 2004.

ZARGAR, Vida; ASGHARI, Morteza; DASHTI, Amir. A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. **ChemBioEng Reviews**, v. 2, n. 3, p. 204-226, 2015.

ZHOU, Zhigang et al. The effect of dietary chitin on the autochthonous gut bacteria of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Aquaculture Research**, v. 44, n. 12, p. 1889-1900, 2013.

ANEXO A – IMAGENS

Imagem 1: espécime de *E. viridis* após laparotomia e remoção do seu trato gastrointestinal



Fonte: PASSOS, 2020

Imagem 2: laparotomia de um dos espécimes de *T. hispidus*



Fonte: arquivo pessoal, 2020

Imagem 3: trato gastro intestinal de *T. hispidus* após lavagem



Fonte: arquivo pessoal, 2020

Imagem 4: macerado do trato gastrointestinal após adição da solução de extração



Fonte: arquivo pessoal, 2020

Imagem 5: Sistema de filtração a vácuo da quitina coloidal



Fonte: arquivo pessoal, 2020

Imagem 6: Placa contendo curva de concentrações de BSA e extratos após incubação em BCA



Fonte: arquivo pessoal, 2020

Imagem 7: tubos de ensaio com reagente de Schales e misturas dos extratos após incubação em fervura



Fonte: arquivo pessoal, 2020

Imagem 8: Placa contendo mistura de reagente de Schales e mistura de extrato e quitina coloidal após incubação



Fonte: arquivo pessoal, 2020

Imagem 9: Placa contendo soluções de substratos de P-nitrofenol após a adição de solução de parada



Fonte: arquivo pessoal, 2020

ANEXO B – QUADROS

Quadro 4: valores brutos de absorbância do ensaio de açúcar redutor

Valores de absorbância brutos do ensaio de açúcar redutor			
Indivíduo	Réplica	Absorbância zerada	Absorbância bruta
Branco	1	0	0,553
Branco	2	0	0,547
Branco	3	0	0,545
T. hispidus macho	1	-0,442	0,106
T. hispidus macho	2	-0,472	0,076
T. hispidus fêmea	1	-0,453	0,095
T. hispidus fêmea	2	-0,447	0,101
E. viridis id 24	1	-0,187	0,361
E. viridis id 24	2	-0,124	0,424
E. viridis id 22	1	-0,271	0,277
E. viridis id 22	2	-0,234	0,314
E. viridis id 06	1	-0,322	0,226
E. viridis id 06	2	-0,408	0,14
E. viridis id 41	1	-0,165	0,383
E. viridis id 41	2	-0,171	0,377
E. viridis id 43	1	-0,227	0,271
E. viridis id 43	2	-0,216	0,332
E. viridis id 44	1	-0,322	0,226
E. viridis id 44	2	-0,278	0,27

Fonte: dados da pesquisa

Quadro 5: valores brutos de absorbância do ensaio com p-nitrofenil substrato mono-

Substratos de Mono-Fenil		
Amostras	Absorbância	Réplica
Branco	0,046	1
Branco	0,064	2
Controle positivo	1,624	1
Controle positivo	1,586	2
E. viridis id 44	0,731	1
E. viridis id 44	0,721	2
E. viridis id 24	0,572	1
E. viridis id 24	0,086	2
T. hispidus	2,412	1
T. hispidus	2,384	2
Standart	1,216	1
Standart	1,212	2
E. viridis id 06	0,621	1
E. viridis id 06	0,604	2

Fonte: dados da pesquisa

Quadro 6: valores brutos de absorbância do ensaio com p-nitrofenil substrato di-

Substratos de Di-Fenil		
Amostras	Réplica	Absorbância
Branco	1	0,076
Branco	2	0,027
Controle positivo	1	1,369
Controle positivo	2	1,378
E. viridis id 44	1	0,119
E. viridis id 44	2	0,118
E. viridis id 24	1	0,097
E. viridis id 24	2	0,049
T. hispidus	1	2,212
T. hispidus	2	2,176
Standart	1	1,216
Standart	2	1,212
E. viridis id 06	1	0,158
E. viridis id 06	2	0,133

Fonte: dados da pesquisa

Quadro 7: valores brutos de absorbância do ensaio com p-nitrofenil substrato tri-

Substratos de Tri-Fenil		
Amostras	Réplica	Absorbância
Branco	1	0,052
Branco	2	0,041
Controle positivo	1	0,635
Controle positivo	2	0,638
E. viridis id 44	1	0,136
E. viridis id 44	2	0,14
E. viridis id 24	1	0,059
E. viridis id 24	2	0,055
T. hispidus	1	1,156
T. hispidus	2	1,124
Standart	1	1,216
Standart	2	1,212
E. viridis id 06	1	0,121
E. viridis id 06	2	0,116

Fonte: dados da pesquisa