

# Actividad fosfolipasa, hemolítica y bactericida preliminar del veneno de la serpiente de cascabel del Tolima

## Preliminary phospholipase, hemolytic and bactericidal activity of the venom of the snake of cascabel del Tolima

Jennifer Alexandra Solano Godoy<sup>a</sup>

Emerson David Molano Cardona<sup>b</sup>

Manuel Hernando Bernal Bautista<sup>c</sup>

Walter Murillo Arango<sup>c\*</sup>

Fecha de Recepción :02.8.2019

Fecha de Aceptación: 12.12.2019

Doi: <https://doi.org/10.19053/01217488.v11.n1.2020.9869>

### Resumen

En el departamento del Tolima no hay estudios que permitan precisar con certeza la magnitud del accidente ofídico causado por *Crotalus durissus*, existiendo la necesidad de generar información sobre el perfil proteico, como forma de aproximación a la comprensión de algunas actividades biológicas relacionadas con la toxicidad del veneno, así como su potencial biotecnológico. En este trabajo se analizó el perfil electroforético por SDS-PAGE del veneno crudo extraído de individuos colectados en el municipio de Natagaima (Tolima) y la asociación con actividades fosfolipasa, hemolítica directa e indirecta y bactericida sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. El veneno crudo presentó bandas de peso molecular 26.6 kDa., 17, 14.2, 6.5, 3.5 y 1.06 kDa., correspondientes con otros reportes previos del veneno para la especie. Se presentaron niveles considerables de actividades hemolítica (200 µg) y fosfolipasa (1.25 UA/mg. ± 0.88) dependientes de Calcio, y el efecto bactericida del veneno crudo fue diferencial sobre los microorganismos evaluados, presentando actividad moderada sobre *Escherichia coli*. Los resultados constituyen datos valiosos que confieren un acercamiento hacia el conocimiento del potencial tóxico del veneno de *Crotalus durissus* (cascabel) de la zona de Natagaima-Tolima, así como de la capacidad bactericida y posibles aplicaciones futuras en campos de investigación relacionados con la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos.

**Palabras clave:** Actividad bactericida, Cascabel, *Crotalus durissus*; Fosfolipasas, Hemolisis, Toxinología, Veneno.

### Abstract

In the department of Tolima, there are no studies that allow us to determine with certainty the magnitude of the ophidian accident caused by *Crotalus durissus*, and there is a need to generate information on the protein profile, as a way of approaching the compression of some biological activities related to the toxicity of the venom, as well as its biotechnological potential. In this work, the SDS-PAGE electrophoretic profile of the crude venom extracted from individuals collected in the municipality of Natagaima (Tolima) and the association with phospholipase, direct and indirect hemolytic and bactericidal activities on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* were analysed. The crude venom presented bands of molecular weight 26.6 kDa., 17, 14.2, 6.5, 3.5 and 1.06 kDa., corresponding to other previous reports of the venom for the specie. Considerable levels of calcium-dependent-hemolytic (200 µg) and phospholipase (1.25

a Grupo de Investigación en Productos Naturales de la Universidad del Tolima GIPRONUT, Facultad de Ciencias Universidad del Tolima-Colombia

b Programa de Biología, Facultad de Ciencias Universidad del Tolima-Colombia

c Programa de Biología, Facultad de Ciencias Universidad del Tolima-Colombia

c\* Programa de Biología, Facultad de Ciencias Universidad del Tolima-Colombia

AU/mg.  $\pm$  0.88) activities were presented, and the bactericidal effect of the crude venom was differential on the microorganisms evaluated, showing moderate activity on *Escherichia coli*. The results constitute valuable data that confer an approach towards the knowledge of the toxic potential of the venom of *Crotalus durissus* (rattlesnake) from the Natagaima-Tolima area, as well as the bactericidal capacity and possible future applications in research fields related to the search for new antimicrobial agents.

**Keywords.** *Crotalus durissus*, Bactericidal activity, Hemolysis, Phospholipases, Rattlesnake, Toxinology, Venom.

## INTRODUCCIÓN

*Crotalus durissus*, es una serpiente de cascabel considerada una de las especies más letales de América Latina. En Colombia, según las estadísticas del Instituto Nacional de Salud, los accidentes por serpientes venenosas tienen una incidencia de 10,1 por cada 100,000 habitantes. Alrededor del 5-9% de los eventos en Colombia son fatales y el 6-10% tienen secuelas [1], [2]. En el departamento del Tolima no hay estudios que permitan precisar con certeza la magnitud del accidente ofídico causado por esta especie; sin embargo, según los reportes del Instituto Nacional de Salud hasta el segundo periodo del 2014 se reportaron 99 registros de casos de accidentes para el departamento, los cuales fueron ocasionados en su mayoría por serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* [3].

El veneno de *C. durissus* se compone de una mezcla compleja de péptidos, enzimas de tipo fosfolipasas A2, metaloproteinasas, Serin-Proteinasas y otras familias de proteínas tales como las proteínas tipo Lectina C, Desintegrinas, y L-aminoácido Oxidasas [4]–[8] y toxinas (Crotamina, Giroxina, Convulxina, entre otros) los cuales son los responsables de la alta actividad neurotóxica, nefrotóxica y miotóxica del veneno [9], sin embargo se ha demostrado que la abundancia de estos componentes puede variar, por ejemplo las actividades biológicas de los venenos de serpientes capturadas en diferentes áreas geográficas varían significativamente, no obstante, el estudio de los perfiles proteicos, y su bioactividad, permite establecer aproximaciones de manera cualitativa con la presencia de ciertas proteínas y enzimas relacionadas con la fisiopatología de los envenenamientos por su comparaciones con los perfiles de otras especies [10].

El veneno de las serpientes de la familia Viperidae se ha venido estudiando como una fuente importante para el aislamiento de moléculas con potencial uso farmacológico, en algunas de ellas ya

se ha demostrado su eficiencia en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y del sistema nervioso [11]. Para el caso de varias especies del género *Crotalus*, se han encontrado algunas enzimas con propiedades antibacterianas, tanto para bacterias gram positivas como gram negativas y antifúngicas [12]. Estudios recientes han mostrado el potencial antibacterial del veneno crudo de *Crotalus durissus terrificus* sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium glutamicum* y *Salmonella enterica serovar typhimurium* [13] valorando este recurso como fuente de nuevos agentes antimicrobianos, cuyo blanco principal parece estar más relacionado con los daños causados a nivel de la membrana celular.

De acuerdo a lo anterior, es pertinente evaluar el veneno de *C. durissus* teniendo en cuenta que la especie está sujeta a variaciones interespecíficas que son de importancia al momento de comprender los efectos locales y sistémicos que se generan producto de la mordedura, y los posibles usos biotecnológicos, los cuales dependen de variaciones en la composición de diferentes proteínas, tales como metaloproteinasas, fosfolipasas y toxinas de tres dedos [14]. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar algunas actividades bioquímicas y reconocer preliminarmente el potencial antimicrobiano del veneno de *Crotalus durissus* (cascabel) de la zona de Natagaima-Tolima, Colombia.

## METODOLOGÍA.

### ANIMALES Y VENENO.

El veneno crudo se obtuvo de tres individuos de *C. durissus* con las siguientes medidas de longitud total: 98 cm, 115 cm y 123 cm, colectados a los alrededores del municipio de Natagaima, Tolima, Colombia. La extracción del veneno se realizó mediante la técnica de ordeño manual presionando las glándulas productoras de veneno. La secreción colectada se liofilizó y almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La

concentración de proteína se determinó mediante el Método de Bradford [15]. Los individuos fueron capturados en el sitio de colecta y liberados después de la extracción del veneno.

#### **ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.**

Prevía determinación del contenido de proteína del veneno por el Método de Bradford, el perfil por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes, con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) se realizó siguiendo el protocolo sugerido [16] en geles al 12 %. Se aplicó un voltaje constante de 100 Voltios durante 60 minutos, la tinción se hizo con azul de Comassie R-250 y el peso molecular se estimó con el marcador estándar marca Sigma Aldrich C6210 (1.06 kDa-26.6kDa).

#### **ACTIVIDAD FOSFOLIPASA**

La actividad fosfolipasa del veneno se evaluó a 4 concentraciones diferentes (2 µg/µl., 1 µg/µl. y 0.5 µg/µl.) sobre una solución lipoproteica a partir de yema de huevo en presencia de Cloruro de Calcio (CaCl<sub>2</sub>), y un control negativo con buffer fosfato 0,25M.

La hidrólisis de los fosfolípidos se detectó luego de realizarse una incubación durante 15 minutos a una temperatura de 37°C de la solución lipoproteica con el veneno, se tituló con Hidróxido de Sodio (NaOH) 0,01 N, y se expresaron los resultados en UA/mg. de veneno [17]. Todas las concentraciones y blancos se realizaron por triplicado.

#### **ACTIVIDAD HEMOLÍTICA INDIRECTA E INDIRECTA**

Se evaluó utilizando geles de agarosa con glóbulos rojos, con presencia y sin presencia de Cloruro de Calcio (CaCl<sub>2</sub>) con solución de yema de huevo, asumiendo Dosis Hemolítica Indirecta Mínima (DHeIM) como la dosis de veneno que produce un halo hemolítico de 20 mm. de diámetro en un tiempo de 24 horas [18], los diámetros fueron medidos con Escala de Vernier.

El veneno fue disuelto en buffer fosfato 0,25M pH 7,0, se probaron diferentes concentraciones (400,200 y 100µg/ml), adicionadas en pozos de 3mm de diámetro dentro del gel. Como control negativo se utilizó buffer fosfato 0,25M pH 7,0 [19], [20].

#### **ACTIVIDAD BACTERICIDA EN AGAR Y MICRO-DILUCIÓN EN PLACA.**

Se utilizaron cepas de bacterias obtenidas de la colección de cepas patogénicas del Grupo de Investigación en Productos Naturales de la Universidad del Tolima (GIPRONUT): *Escherichia coli* (ATCC25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) y *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) en concentraciones de 400, 200, 100 y 50 µg/mL. Las bacterias se sembraron en Agar de Soja Trípico (cajas de 9 cm. Ø), se adicionó en pozos 5 µl. de las concentraciones señaladas y se incubó durante 24 horas a 37 °C., se midió el diámetro del halo inhibitorio mediante el uso de la Escala de Vernier. Como control negativo se usó buffer fosfato pH 7.

Como ensayo confirmatorio se realizó medición de la actividad antibacteriana en microplacas de 96 pozos. Se depositó 130 µl. del cultivo bacteriano activo en fase exponencial, ajustado a 0,5 en la escala de McFarland en caldo Infusión Cerebro Corazón y 70 µl. de las diluciones del veneno. Se incubó 24 horas a 37 °C. y se determinó el crecimiento bacteriano midiendo la absorbancia de cada pozo a 610 nm. en un espectrofotómetro para microplacas Multiskan™ Go [21]–[23]. El porcentaje de inhibición se calculó a partir de la comparación entre las curvas de crecimiento de las bacterias en el medio de cultivo control frente a los medios de cultivo tratados con las respectivas concentraciones de veneno. Como sustancia de referencia se usó oxitetraciclina a 80 µg/mL.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

#### **ANIMALES Y VENENO.**

El total de la producción de veneno crudo de los tres individuos se obtuvo de una única extracción. Los individuos no se mantuvieron en cautiverio para futuras extracciones ya que no se contaba con instalaciones apropiadas para su adecuada manutención y manipulación (Fig.1). La cantidad extraída fue aproximadamente 0.5 ml equivalentes a 130 mg. de veneno liofilizado. La cuantificación de proteína del veneno crudo determinó que 821 mg/g. corresponden a proteína pura, cantidad que se ajusta al número y tamaño de los individuos colectados.

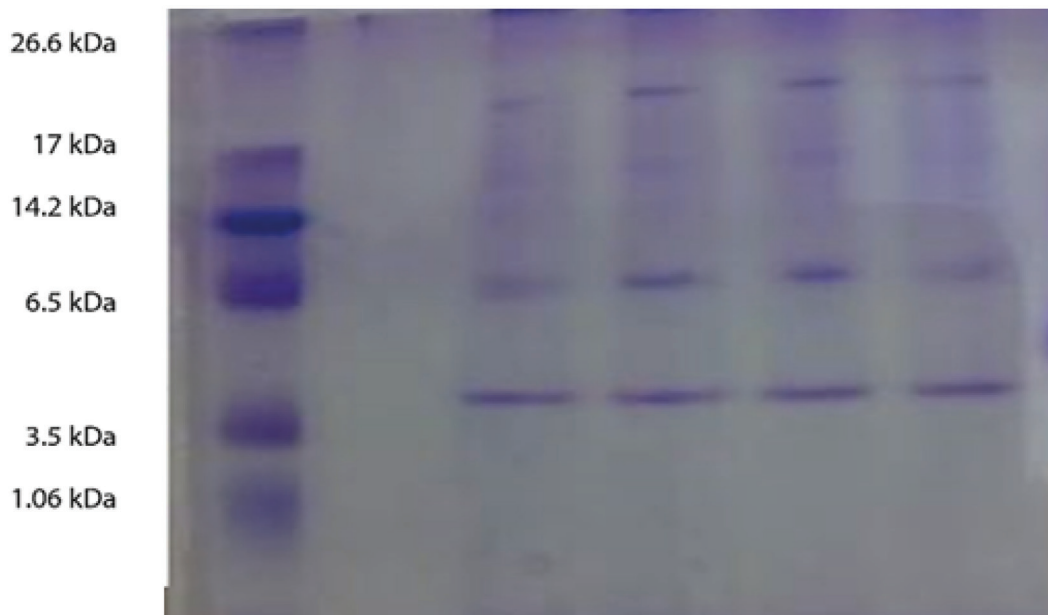


**Figura 1.** Individuos adultos de *C. durissus* colectados en Natagaima, Tolima, Colombia.

#### **ELECTROFORESIS DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE.**

El gel de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% mostró 4 bandas para el veneno crudo de los individuos de *C. durissus* de Natagaima, Tolima, Colombia (Fig.2). La primera banda presentó un peso superior a 17 KDa., la segunda banda, menos definida oscila entre los 17 -14 KDa., y finalmente se observaron dos bandas

de peso molecular bajo entre los 6.5 kDa. y los 3.5 KDa. Estas bandas concuerdan con pesos moleculares reportados para el veneno de esta especie en sur américa, el predominio de proteínas con pesos moleculares por debajo de 20 kDa. [8], [24] que posiblemente corresponden a proteínas de tipo fosfolipasa, ya que las fosfolipasas A2 (sPLA2) se caracterizan por tener baja masa molecular (13-18 kDa.), junto con la Crotoxina B, cuya masa molecular es de 14.197,6 KDa., [25]–[27].



**Figura 2.** Electroforesis en gel 12% del Veneno crudo de la serpiente *Crotalus durissus* del departamento del Tolima, a la izquierda el marcador molecular C6210 (1.06 kDa-26.6kDa). Los demás carriles corresponden al veneno crudo.

#### **ACTIVIDAD FOSFOLIPASA.**

El veneno crudo de *C. durissus* presentó actividad fosfolipasa de 1.25 UA/mg.  $\pm$  0.88, la cual es baja si se compara con reportes previos desarrollados bajo el método de coagulación de

yema de huevo. Al respecto se ha reportado [17] para esta especie en Perú, actividad de 3,50 UA/mg, mientras que para la especie *C. durissus terrificus* se ha reportado actividad de 3.14 UA/mg [28]. Por otro lado, a nivel de subfamilia, la

actividad enzimática reportada para especies como *Bothrops atrox* con esta metodología oscila entre 2,7 UA/mg. y 0,8UA/mg. [29]. Métodos más precisos como el espectrofotométricos se han usado para determinar la actividad fosfolipasa en venenos de serpiente [30], no obstante el método de coagulación de yema de huevo es un método reproducible y de fácil acceso para realizar evaluaciones de actividad fosfolipasa que se sigue usando para evaluar la actividad de esta enzima [31].

#### ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DIRECTA E INDIRECTA

La actividad hemolítica indirecta fue dosis dependiente (Tabla 1), con una Dosis Hemolítica Indirecta Mínima (DHeIM) de 200 µg, mientras que la actividad hemolítica directa fue más baja, y sin apreciable efecto dosis respuesta. Esta actividad suele estar asociada con la presencia de enzimas de tipo metaloproteinasas en el veneno, mientras que la actividad indirecta está mediada por la presencia de un cofactor que se atribuye a la presencia de enzimas de tipo Fosfolipasa A2 dependientes de Ca<sup>2+</sup> en el veneno, debido a que las fosfolipasas A2 secretadas (sPLA2) presentan numerosos puentes disulfuro, residuos catalíticos histidilo y aspartilo y una región de unión a Calcio (Ca<sup>2+</sup>) altamente conservada [27], [32]–[34].

Estos valores son acordes con los resultados de actividad fosfolipasa presentados previamente, además contrastan con datos reportados previamente para el veneno crudo de esta especie. para *C. durissus cumanensis* en Venezuela (DHeIM) de 379,51 µg [32], dosis de 350 µg. para *Crotalus durissus ruruima* de Brasil [35] y actividad hemolítica indirecta de fracciones en el complejo de Crotoxina del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de 25 µg. y 12.25 µg. [25], de acuerdo a lo anterior se observó que el veneno de *C. durissus* de Natagaima, Tolima, Colombia presenta un actividad hemolítica alta que los reportes previos mencionados con anterioridad. En general el conocimiento de la actividad hemolítica es de particular interés ya que se asocia con los efectos hemorrágicos y necróticos asociados con el envenenamiento, pero además en el caso de la actividad hemolítica indirecta se ha relacionado con el daño de membranas, y de allí su asociación con el potencial antibacteriano de venenos de serpientes mediado por las fosfolipasas [36].

**Tabla. 1.** Actividad hemolítica directa e indirecta del veneno crudo de *C. durissus* evaluado a diferentes concentraciones.

	Actividad Indirecta	Actividad Directa
µg. de veneno	Halo (mm)	Halo (mm)
400	23± 2.4	15±0.9
200	21± 1.9	16±1.6
100	22±2.1	15±1.7
Control negativo	0	0

#### ACTIVIDAD BACTERICIDA

El veneno crudo y las diluciones no presentaron en placa de agar actividad bactericida contra bacterias Gram +, sin embargo, en bacterias Gram– la cepa de *E. coli* (ATCC25922) fue en la única sobre la que se observó halo de inhibición de crecimiento. Este efecto selectivo se ha reportado previamente, y depende de varios factores, siendo uno de ellos el tipo de fosfolipasas presentes en el veneno[36]. Una evaluación posterior de la actividad bactericida en microplacas realizado con esta cepa bacteriana permitió establecer un efecto bacteriostático moderado que a las diferentes concentraciones evaluadas no superó el 50% de la inhibición del crecimiento (Tabla 2).

**Tabla 2.** Porcentajes de inhibición del crecimiento sobre *E. coli* (ATCC25922) a diferentes concentraciones de veneno de *C. durissus*

Concentración de veneno (µg/ml.)	% inhibición
400	48.07±5.1
200	35.07± 4.3
100	10.21± 1.6
50	0
25	0
*Oxitetraciclina	100

\*usada a 80 µg/ml

Estos resultados contrastan con reportes de actividad bactericida por parte del veneno de esta especie en diferentes cepas bacterianas ya que resulto ser potente frente a lo que se conoce de reportes previos, y al parecer de menor espectro ya que como se indicó solo se observó efecto moderado sobre *E. coli*, no obstante se ha reportado para el veneno crudo de *Crotalus durissus terrificus* actividad sobre bacterias Gram + y Gram – con valores de CIM para *S. aureus* ATCC 25923 de 125 µg/mL., *P. aeruginosa* ATCC 27853 de 62.5 µg/ml. y *Micrococcus luteus* ATCC 9341 de ≤500

$\mu\text{g}/\text{mg}$ . [13], también hay reportes para *C. durissus cascavella* contra *Staphylococcus mutans*, y *Xanthomonas axonopodis pv passiflorae*, mientras que *Crotalus durissus cumanensis* contra *S. aureus* y *Acinetobacter baumannii* [37].

Por otro lado, se ha reportado potencial antifúngico sobre *Candida albicans* e inhibición sobre el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas junto con una inhibición débil en el crecimiento de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *M. luteus* tratados con Crotamina, uno de los componentes del veneno [38]. La Crotamina mostró una Concentración Mínima Inhibitoria de 25, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . contra tres cepas de *E. coli* (O157: H7, ML-35p y ATCC 25922), respectivamente, mientras que no se observó un crecimiento bacteriano de inhibición completa contra otras dos bacterias Gram negativas (*P. aeruginosa* y *Salmonella typhimurium*) y dos bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *Listeria monocytogenes*) en concentraciones de hasta 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

De modo general, se sabe que las fosfolipasas A2 de los venenos de serpientes son reconocidas por sus actividades fisiológicas, como miotoxidad, neurotoxicidad, actividad anticoagulante, la actividad edematizante, cardiotoxicidad, efecto antiparasitario, actividad agregante de las plaquetas y su potencial terapéutico a nivel antibacteriano como antibióticos, ya que, por ejemplo, la Crotamina es un antibiótico peptídico de espectro estrecho con preferencias hacia ciertas especies bacterianas [13], [24], [25], [38], [39].

Diferentes estudios han demostrado que el veneno de cada especie es diferente tanto a nivel interespecífico como intraespecífico, lo que determina que los efectos sobre un organismo vivo y sus manifestaciones clínicas sean diferentes [10], así por ejemplo, la variación intraespecífica es muestra de que el veneno de *Crotalus durissus terrificus* ha evidenciado diferencia en composición de proteínas [40]. Además, se reporta que las actividades biológicas de los venenos de serpientes capturadas en diferentes áreas geográficas varían significativamente [33].

## CONCLUSIÓN

Estos resultados muestran que al igual que otras especies de serpiente Cascabel, especímenes *C. durissus* colectados en el departamento del Tolima presentan actividades enzimáticas y hemolíticas

que son comunes dentro de la familia, y que pueden ayudar a comprender los síntomas de los pacientes por envenenamiento de esta especie que se puedan presentar en el departamento, y los riesgos de daño tisular o hemolítico significativo producto de un eventual accidente ofídico.

Igualmente, de forma preliminar se estableció que el veneno crudo presentó baja actividad bactericida y de menor espectro, manifestándose efecto diferencial y bacteriostático a las concentraciones con la bacteria Gram negativa *E. coli*, no obstante dados los efectos que la variación intraespecífica causa sobre la composición y actividad biológica del veneno, se requieren de más estudios que permitan establecer con mayor detalle el rango de acción bactericida, así como otras actividades biológicas de interés del veneno crudo, de la serpiente de cascabel del Tolima.

**AGRADECIMIENTOS:** Los autores agradecen a la oficina de investigaciones y desarrollo científico, y al laboratorio Laserex de la Universidad del Tolima por la financiación de este proyecto de investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. J. Sevilla-Sánchez, D. Mora-Obando, J. J. Calderón, J. A. Guerrero-Vargas, and S. Ayerbe-González, "Accidente ofídico en el departamento de Nariño, Colombia: análisis retrospectivo (2008-2017)," *Biomédica*, vol. 39, no. 4, May 2019, doi: 10.7705/biomedica.v39i4.4830.
- [2] M. A. Bárcenas Rojas, "INFORME DE EVENTO ACCIDENTE OFÍDICO, COLOMBIA, 2017," 2018.
- [3] M. Acero and J. Usaquen, "INFORME DEL EVENTO ACCIDENTE OFÍDICO HASTA EL PERIODO EPIDEMIOLÓGICO XII, Colombia, 2014," vol. 2. Instituto Nacional de Salud, pp. 1–29, 2014.
- [4] J. J. Calvete, L. Sanz, Y. Angulo, B. Lomonte, and J. M. Gutiérrez, "Venoms, venomics, antivenomics," *FEBS Lett.*, vol. 583, no. 11, pp. 1736–1743, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.febslet.2009.03.029.
- [5] M. S. R. Gomes *et al.*, "BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from Bothrops moojeni snake venom," *Toxicon*, vol. 53, no.

- 1, pp. 24–32, Jan. 2009, doi: 10.1016/J.TOXICON.2008.10.007.
- [6] O. H. P. Ramos and H. S. Selistre-de-Araujo, “Snake venom metalloproteases — structure and function of catalytic and disintegrin domains,” *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 142, no. 3–4, pp. 328–346, Mar. 2006, doi: 10.1016/J.CBPC.2005.11.005.
- [7] R. Zouari-Kessentini *et al.*, “Two purified and characterized phospholipases A2 from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration,” *Toxicon*, vol. 53, no. 4, pp. 444–453, Mar. 2009, doi: 10.1016/J.TOXICON.2009.01.003.
- [8] A. C. Patiño, J. A. Pereañez, J. M. Gutiérrez, and A. Rucavado, “Biochemical and biological characterization of two serine proteinases from Colombian *Crotalus durissus cumanensis* snake venom,” *Toxicon*, vol. 63, pp. 32–43, Mar. 2013, doi: 10.1016/J.TOXICON.2012.11.010.
- [9] J. Quintana-Castillo *et al.*, “Characterization of the Venom of *C. d. cumanensis* of Colombia: Proteomic Analysis and Antivenomic Study,” *Toxins (Basel)*, vol. 10, no. 2, p. 85, Feb. 2018, doi: 10.3390/toxins10020085.
- [10] I. M. . Francischetti, M. E. . Gombarovits, J. G. Valenzuela, C. R. Carlini, and J. A. Guimarães, “Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*),” *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, vol. 127, no. 1, pp. 23–36, Aug. 2000, doi: 10.1016/S0742-8413(00)00129-8.
- [11] F. E. Lozano Manrique, “purificación, caracterización y actividad biológica de una l-aminoácido oxidasa presente en el veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (jergón),” 2005.
- [12] F. Lazo, O. Málaga, A. Yarlequé, R. Severino, and S. Gutiérrez, “Actividad antimicrobiana de una flavoproteína aislada del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* (‘jergón’),” *Rev. la Soc. Química del Perú*, vol. 73, no. 4, pp. 197–207, 2007.
- [13] J. Do Carmo Dietz, D. A. De Almeida, L. C. Cintra, B. F. R. De Oliveira, M. R. Magalhães, and R. S. A. Jesuíno, “Evaluation of the antibacterial activity of *Crotalus durissus terrificus* crude venom,” *Cienc. Anim. Bras.*, no. 19, pp. 1–12, 2018, doi: 10.1590/1809-6891v19e-51322.
- [14] J. L. Rheubert, M. F. Meyer, R. M. Strobel, M. A. Pasternak, and R. A. Charvat, “Predicting antibacterial activity from snake venom proteomes,” *PLoS One*, vol. 15, no. 1, p. e0226807, Jan. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0226807.
- [15] M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Anal. Biochem.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, May 1976, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [16] C. A. Yábar Varas, *Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN*, 1era. Lima, Perú., 2003.
- [17] F. Lazo, E. Rodríguez, and A. Yarlequé, “Evaluación comparativa de dos métodos para determinar la actividad de fosfolipasa en veneno de serpientes,” *Rev. Biol. Trop.*, vol. 5, pp. 98–102, 1998, doi: <https://doi.org/10.15381/rpb.v5i2.8325>.
- [18] J. A. Pereañez J., S. L. Jiménez., J. C. Quintana., V. Nuñez., M. Fernández., and Y. Restrepo., “Inhibición de las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta inducidas por el veneno de *Bothrops asper* por extractos etanólicos de tres especies de heliconias,” *Vitae (Medellín)*, pp. 157–164, 2008.
- [19] J. M. Gutiérrez, F. Chaves, E. Rojas, J. Elizondo, C. Avila, and L. Cerdas, “Production of monovalent anti-*Bothrops asper* antivenom: development of immune response in horses and neutralizing ability,” *Rev. Biol. Trop.*, vol. 36, no. 2B, pp. 511–7, Nov. 1988.
- [20] E. Habermann and K. L. Hardt, “A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases,” *Anal. Biochem.*, vol. 50, no. 1, pp. 163–173, 1972, doi: 10.1016/0003-2697(72)90495-2.
- [21] J. B. Patel *et al.*, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 10th ed., vol. 35, no. 2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

- [22] S. R. Pritchard, M. Phillips, and K. Kailasapathy, "Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese," 2010.
- [23] C. Rivera, L. Flores, C. Pantigoso, and E. Escobar, "Aislamiento y caracterización de un péptido antibacteriano del veneno de *Centruroides margaritatus*," *Rev. Peru. Biol.*, vol. 17, no. 1, pp. 129–132, 2014, doi: 10.15381/rpb.v17i1.61.
- [24] J. do C. Dietz, D. A. de Almeida, L. C. Cintra, B. F. R. de Oliveira, M. R. Magalhães, and R. S. A. Jesuino, "EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Crotalus durissus terrificus* CRUDE VENOM," *Ciência Anim. Bras.*, vol. 19, no. 0, Nov. 2018, doi: 10.1590/1809-6891v19e-51322.
- [25] J. C. Quintana-Castillo, I. C. Ávila-Gómez, J. F. Ceballos-Ruiz, L. J. Vargas-Muñoz, and S. Estrada-Gómez, "Efecto citotóxico de fosfolipasas A2 del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de Colombia," *Rev. Investig. en Salud Univ. Boyacá*, vol. 4, no. 1, p. 16, Jul. 2017, doi: 10.24267/23897325.194.
- [26] T.-W. Wu and D. O. Tinker, "Phospholipase A2 from *Crotalus atrox* Venom," *Biochemistry*, vol. 8, pp. 1558–1568, 1969.
- [27] E. Coles, D. L. McIlwain, and M. M. Rapport, "The activity of pure phospholipase a2 from crotalus venom on myelin and on pure phospholipids atrox," *Biochimic*, vol. 337, pp. 68–78, 1974.
- [28] C. Remuzgo, M. P. Alvarez, F. Lazo, and A. Yarleque, "Caracterización parcial del veneno de la serpiente cascabel peruana *Crotalus durissus terrificus*," *Rev. Peru. Biol.*, vol. 7, no. 1, pp. 67–73, Jun. 2000, doi: 10.15381/rpb.v7i1.6729.
- [29] C. Ortiz, F. Lazo, C. Bellido, E. Gonzales, and A. Yarleque, "Variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* "jergón", de tres zonas geográficas del Perú," *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica*, vol. 29, pp. 198–205, 2012, doi: 10.1590/S1726-46342012000200005.
- [30] M. Holzer and S. P. Mackessy, "An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2," *Toxicon*, vol. 34, no. 10, pp. 1149–1155, 1996, doi: 10.1016/0041-0101(96)00057-8.
- [31] J. A. Pereañez *et al.*, "Correlation of the inhibitory activity of phospholipase A2 snake venom and the antioxidant activity of Colombian plant extracts," *Brazilian J. Pharmacogn.*, vol. 20, no. 6, pp. 910–916, Dec. 2010, doi: 10.1590/S0102-695X2010005000030.
- [32] C. Pirela, D. Salas, J. Carlos, L. Jim, and L. Hernández, "CARACTERIZACIÓN TOXINOLÓGICA DEL VENENO TOTAL DE LA SERPIENTE DE CASCABEL *Crotalus durissus cumanensis* (VIPERIDAE), PRESENTE EN LA LOCALIDAD DE PORSHOURE, Toxinological Characterization of the Whole Venom of the Rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis*," vol. XVI, pp. 232–238, 2006.
- [33] A. Lourenço *et al.*, "Individual venom profiling of *Crotalus durissus terrificus* specimens from a geographically limited region: crotamine assessment and captivity evaluation on the biological activities," *Toxicon*, vol. 69, pp. 75–81, Jul. 2013.
- [34] J. G. Soto, J. C. Perez, and S. A. Minton, "Proteolytic, hemorrhagic and hemolytic activities of snake venoms," *Toxicon*, vol. 26, pp. 875–882, 1988, doi: https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90328-5.
- [35] M. C. Dos Santos, L. C. L. Ferreira, W. D. Da Silva, and M. de F. D. Furtado, "Caracterización de las actividades biológicas de los venenos 'amarillo' y 'blanco' de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*," *Toxicon*, vol. 31, no. 11, pp. 1459–1469, Nov. 1993, doi: 10.1016/0041-0101(93)90211-Z.
- [36] L. J. Vargas *et al.*, "An acidic phospholipase A2 with antibacterial activity from *Porthidium nasutum* snake venom," *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 161, no. 4, pp. 341–347, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.cbpb.2011.12.010.
- [37] L. J. Vargas, J. C. Quintana, J. A. Pereañez, V. Núñez, L. Sanz, and J. Calvete, "Cloning and characterization of an antibacterial l-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cumanensis* venom," *Toxicon*, vol. 64, pp. 1–11, Mar. 2013, doi: 10.1016/J.TOXICON.2012.11.027.



- [38] E. S. Yamane *et al.*, “Unraveling the antifungal activity of a South American rattlesnake toxin crotamine,” *Biochimie*, vol. 95, no. 2, pp. 231–240, Feb. 2013, doi: 10.1016/J.BIOCHI.2012.09.019.
- [39] N. Oguiura, M. Boni-Mitake, R. Affonso, and G. Zhang, “In vitro antibacterial and hemolytic activities of crotamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*,” *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 64, no. 4, pp. 327–331, Apr. 2011, doi: 10.1038/ja.2011.10.
- [40] A. J. Magro, R. J. DA Silva, P. R. R. Ramos, A. L. Cheruboni, and M. R. Hataide, “Intraspecific variation in the venom electrophoretic profile of recently captured *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes,” *J. Venom. Anim. Toxins*, vol. 7, no. 2, pp. 276–301, Dec. 2001, doi: 10.1590/S0104-79302001000200010.

