



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CARINE SOUZA AGUIAR**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO VENENO  
TOTAL DE SERPENTES DOS GÊNEROS Bothrops E Crotalus**

Salvador  
2014

**CARINE SOUZA AGUIAR**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO VENENO  
TOTAL DE SERPENTES DOS GÊNEROS Bothrops E Crotalus.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque.  
Co-Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Luciana Lyra Casais-e-Silva.

Salvador  
2014

A282 Aguiar, Carine Souza

Avaliação do potencial antimicrobiano do veneno total de serpentes dos gêneros Bothrops e Crotalus / Carine Souza Aguiar. – Salvador, 2014.

79 f. il.

Orientadores: Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque;  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Lyra Casais-e-Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de Ciência da Saúde, 2014.

1. Venenos. 2. Bothrops. 3. Crotalus. 4. Antimicrobiano. I.  
Roque, Milton Ricardo de Abreu. II. Casais-e-Silva, Luciana  
Lyra. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 591.145

## CARINE SOUZA AGUIAR

### Avaliação do potencial antimicrobiano do veneno total de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 21 de março de 2014.

#### BANCA EXAMINADORA:

Milton Ricardo de Abreu Roque – Orientador

Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.

Ricardo Santana de Lima

Doutor em Patologia Humana pela Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil.  
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Matheus Santos de Sá

Doutor em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa pelo Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz /BA, FIOCRUZ, Brasil.  
Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por permitir que este trabalho fosse realizado;

A minha família que sempre aceitou minhas decisões e me apoiaram durante esses dois anos em tudo;

A Prof. Dra. Luciana Lyra Casais-e-Silva do laboratório de Neuro imuno Endocrinologia e Toxinologia da UFBA, pela compreensão, por aceitar o desafio e pela participação imprescindível na execução deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Milton R. A. Roque do Bioprospector, pela disposição em me ajudar a permanecer;

A Prof. Dra. Joyce Neves Reis do Laboratório de Ensino e Extensão em Microbiologia (LEEM) da Faculdade de Farmácia - UFBA, pelas cepas fornecidas;

A Prof. Dra. Tânia Fraga Bastos do Laboratório de Pesquisa em Micologia Clínica (LPMC) da Faculdade de Farmácia - UFBA, pelo material para confecção dos discos de difusão;

Ao Prof. Dr Cléber Alberto Schmidt do Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos Farmacêuticos e Correlatos, Faculdade de Farmácia – UFBA, pela gentileza em fornecer algumas cepas, os antimicrobianos e pela atenção em me ensinar os cálculos necessários;

A Prof. Dra. Suzana Ramos Ferrer da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, pela dúvidas tiradas e pelas cepas fornecidas;

A Prof. Dra. Melissa Hanzen Pinna e os alunos Tais Mota e Adriano Honorato Freire do Laboratório de Bacteriose da Escola de Medicina Veterinária da UFBA, pela gentileza de separar/ceder as cepas multirresistentes isolados da clínica;

Ao Msc. Válter Cruz Magalhães do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal do Recôncavo - UFRB, pelos fungos, pelos filtros, pelas explicações sobre como realizar alguns procedimentos;

A mestranda Caroline Lopes Damasceno do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal do Recôncavo - UFRB, pelas longas conversas e explicações sobre como executar alguns procedimentos, pelos artigos e pelo meio de cultura;

A Kathleen Ramos Deegan do Laboratório de Micose - HOSPMEV da UFBA, pelos fungos e antifúngico cedidos tão gentilmente e sem os quais este trabalho estaria comprometido;

A Erica Louvores e Mônica Silva pela atenção em procurar e conseguir fornecer alguns antimicrobianos utilizados neste trabalho;

A todos do Bioprospector, principalmente Luísa Andrade, pelo acolhimento, atenção, cuidado, ensinamentos, auxílio, conversas e risadas, sem a ajuda e paciência de vocês teria sido muito difícil executar todos os testes. Cada um sabe o carinho e a importância que representam pra mim;

A Fúlvia, pelas conversas, e por estar sempre disposta a ajudar e a resolver os problemas que surgiram nesses dois anos;

Aos meus amigos do LAPEMM, guardo com carinho minha passagem por aí;

A todos os vários amigos de outros laboratórios que me ajudaram de alguma forma a executar alguma etapa deste trabalho;

A Jéssica, Gaya, João, Daiane, Camila, Shirlei, Rafael e Zé, por serem presença constante em minha vida e por estarem comigo durante cada momento bom ou ruim, desde a seleção até a defesa. Vocês foram essenciais nestes dois anos;

A todos os funcionários, técnicos, pessoal da higienização que não somente me ajudaram em algum momento, mas também promoveram risos nos intervalos;

A todos meus professores, amigos e colegas de turma, e todos aqueles que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho;

Muito Obrigada.

AGUIAR, Carine Souza. Avaliação do potencial antimicrobiano do veneno total de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. 79 f. il. 2014. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

## RESUMO

Os venenos de serpentes são constituídos por uma mistura complexa de substâncias e como consequência podem apresentar distintas funções biológicas, bioquímicas e farmacológicas. Devido ao seu elevado grau de especificidade do alvo, toxinas têm sido cada vez mais utilizadas como instrumentos farmacológicos e como protótipos para o desenvolvimento de drogas. As infecções estão entre as dez principais causas de morte no mundo, por isso é necessária a descoberta de novas alternativas para o tratamento das infecções que envolvem os diversos microrganismos patogênicos. Apesar dos efeitos tóxicos, os venenos possuem grande potencial para produção de novos medicamentos. Através de metodologias como disco difusão e microdiluição é possível identificar se um composto possui ou não atividade antimicrobiana e avaliar a intensidade dessa atividade. Existem vários relatos de atividade antimicrobiana em venenos de diferentes serpentes. A descoberta de novas moléculas que possuam alguma atividade biológica decorre de testes com substâncias que ainda não foram utilizadas para este fim e/ou que não tenham sido estudadas em sua totalidade, por isso, dentre as várias espécies de serpentes peçonhentas, foram escolhidos como alvo deste trabalho as serpentes *Bothrops leucurus* e *Crotalus durissus cascavella*, pois o uso dos venenos produzidos por elas constituem-se como fontes potenciais para o estudo de atividades bactericida e antifúngico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana dos venenos totais dessas serpentes contra 20 cepas bacterianas e 8 espécies fúngicas através do teste de disco difusão, determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e comparar a atividade antimicrobiana desses venenos. Os testes mostraram que o veneno VBL apresentou atividade através da formação de halos de inibição frente a 19 cepas de bactérias e o VCC em 18 cepas. A ação dos dois venenos foi dose-dependente no teste de disco difusão para a maioria dos microrganismos. O veneno VBL em solução aquosa manteve sua atividade após o congelamento nos teste de microdiluição em caldo frente a 10 cepas de bactérias e o VCC em apenas 6 cepas. Em relação aos fungos filamentosos o VBL apresentou atividade em 4 e o VCC em 2 das espécies testadas. Os valores das CIM's determinadas para os dois venenos demonstram que o VBL possui maior atividade na inibição de todos os microrganismos do que o VCC. Diante dos resultados encontrados, acredita-se que é possível termos mais de uma substância agindo na inibição do crescimento dos microrganismos. É importante ressaltar que como se trata de venenos totais, muitas substâncias podem estar atuando sobre esses microrganismos. Bactérias e fungos variam amplamente na composição das suas membranas e paredes, portanto, era esperado que exibissem diferentes sensibilidades aos venenos, não sendo ainda possível avaliar se uma ou mais substâncias são responsáveis pelos resultados encontrados.

Palavras-chave: Venenos. *Bothrops*. *Crotalus*. Antimicrobiano. Teste de sensibilidade.

AGUIAR, Carine Souza. Evaluation of the antimicrobial potential of the crude venom of snakes of the Bothrops and Crotalus. 79 f. il. 2014. Master Dissertation - Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

## ABSTRACT

The snake venoms are constituted by a complex combination of substances and as consequence may present distinct biological, biochemical and pharmacological functions. Due to their high degree of specificity of the target, toxins have been increasingly used as pharmacological tools and as prototypes for drug development. Infections are among the ten leading causes of death worldwide, thus, the discovery of new alternatives for the treatment of infections involving various pathogenic microorganisms is required. Despite the toxic effects, the venoms have great potential to produce new medicines. Through methods such as disk diffusion and microdilution is possible to identify if a compound has antimicrobial activity or not and evaluate the intensity of this activity. There are several reports of antimicrobial activity in venoms of different snakes. The discovery of new molecules that have some biological activity, occurs from tests with substances that have not been used for this purpose and / or have not been studied in its entirety, for this, among the various species of venomous snakes, have been chosen as target this work the snakes *Bothrops leucurus* and *Crotalus durissus cascavella*, because the use of venoms produced by them constitute themselves as potential sources for the study of antibacterial and antifungal activities. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of crude venom of these serpents against 20 bacterial strains and 8 fungal species by disk diffusion test, determine of minimum inhibitory concentration (MIC) and compare the antimicrobial activity of these poisons. The tests showed that the VBL venom showed activity through the formation of inhibition zones against 19 bacterial strains and VCC 18 strains. The action of the two venoms was dose-dependent in the disk diffusion test for most microorganisms. The VBL venom in aqueous solution maintained its activity after freezing in the broth microdilution test against 10 strains of bacteria and VCC in only 6 strains. Regarding filamentous fungi, the VBL showed activity in 4 and VCC in 2 species tested. MIC values determined for the two venoms show that VBL has a higher activity in the inhibition of all the microorganisms than VCC. Considering the results, it is believed that it is possible to have more than one substance acting in inhibiting the growth of microorganisms. Note that, as it comes of the crude venoms, many substances may be acting on these microorganisms. Bacteria and fungi vary widely in composition of their membranes and cell walls, therefore, was expected that exhibit different sensitivities to venoms, being not yet possible to evaluate whether one or more substances are responsible for the found results.

Keywords: Venoms. *Bothrops*. *Crotalus*. Antimicrobial. Test sensitivity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 A</b> - <i>Bothrops leucurus</i> filhote .....	<b>19</b>
<b>Figura 2</b> - <i>Crotalus durissus cascavella</i> .....	<b>20</b>
<b>Figura 3</b> - Estrutura e componentes da parede celular de bactérias Gram-positivas e negativas. ....	<b>21</b>
<b>Figura 4</b> - Estrutura e componentes da parede celular fúngica .....	<b>22</b>
<b>Figura 5</b> - Preparação dos disco de VBL e VCC .....	<b>35</b>
<b>Figura 6</b> - Montagem do teste de disco difusão.....	<b>36</b>
<b>Figura 7</b> - Preparação dos inóculos (bacterianos) e montagem das placas.....	<b>37</b>
<b>Figura 8</b> - Preparação dos inóculos (fúngicos) e montagem das placas.....	<b>38</b>
<b>Figura 9</b> - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL e VCC em diferentes concentrações sobre <i>S. aureus</i> 25923 e 6538P.....	<b>41</b>
<b>Figura 10</b> - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL e VCC em diferentes concentrações sobre <i>S. aureus</i> SOMR 1 e 2.....	<b>41</b>
<b>Figura 11</b> - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL e VCC em diferentes concentrações .....	<b>43</b>
<b>Figura 12</b> - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL e VCC na cepa <i>E. faecalis</i> em diferentes concentrações .....	<b>44</b>
<b>Figura 13</b> - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL nas cepas de <i>K. pneumoniae</i> 70063 e 1705 em diferentes concentrações .....	<b>46</b>
<b>Figura 14</b> - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL e VCC em diferentes concentrações sobre o <i>V. mimicus</i> (ATCC 33653).....	<b>48</b>
<b>Figura 15</b> - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL e VCC em diferentes concentrações sobre <i>V. parahaemolyticus</i> (ATCC 17802).....	<b>48</b>
<b>Figura 16</b> - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL e VCC em diferentes concentrações sobre o <i>V. vulnificus</i> (ATCC 27562).....	<b>49</b>
<b>Figura 17 A</b> - Concentração inibitória mínima do VBL, VCC, Cpe e Cfx sobre as cepas de <i>S. aureus</i> 25923 e 6538P .....	<b>50</b>
<b>Figura 18</b> - Concentração inibitória mínima do VBL, VCC, Cpe e Cfx sobre as cepas de <i>S. intermedius</i> SOMR 1 e 2.....	<b>51</b>
<b>Figura 19</b> - Concentração inibitória mínima do VBL, VCC, Cpe e Imp sobre as cepas de <i>P. aeruginosa</i> SOMR 2 e 3 .....	<b>52</b>
<b>Figura 20 A</b> - Concentração inibitória mínima do VBL, VCC, Cpe e Cfx sobre <i>V. mimicus</i> e <i>V. parahaemolyticus</i> .....	<b>53</b>

<b>Figura 21 A</b> - Concentração inibitória mínima do VBL, VCC e AnfB sobre <i>M. canis</i> 1 e 2.	<b>56</b>
<b>Figura 21 B</b> - Concentração inibitória mínima do VBL e AnfB sobre <i>A. niger</i> e <i>M. gypseum</i> .....	<b>56</b>
<b>Quadro 1</b> - Estudos de atividade bactericida utilizando venenos e/ou frações dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> .....	<b>27</b>
<b>Quadro 2</b> - Estudos de atividade antifúngica utilizando venenos e/ou frações dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> .....	<b>28</b>
<b>Quadro 3</b> - Atividade antibacteriana de VBL e VCC em diferentes concentrações contra as cepas de <i>S. aureus</i> utilizando o teste de disco difusão.....	<b>42</b>
<b>Quadro 4</b> - Atividade antibacteriana do VBL em diferentes concentrações contra a cepa de <i>S. saprophyticus</i> utilizando o teste de disco difusão.....	<b>43</b>
<b>Quadro 5</b> - Atividade antibacteriana de VBL e VCC em diferentes concentrações contra as cepas de <i>S. intermedius</i> SOMR 1 e 2 utilizando o teste de disco difusão.....	<b>44</b>
<b>Quadro 6</b> - Atividade antibacteriana de VBL e VCC em diferentes concentrações contra a cepa de <i>E. coli</i> utilizando o teste de disco difusão.....	<b>45</b>
<b>Quadro 7</b> - Atividade antibacteriana de VBL e VCC contra as cepas de <i>P. aeruginosa</i> SOMR 1, 2 e 3 em diferentes concentrações utilizando o teste de disco difusão.....	<b>46</b>
<b>Quadro 8</b> - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL em diferentes concentrações .....	<b>47</b>
<b>Quadro 9</b> - Atividade antibacteriana de VBL e VCC contra as cepas de <i>Vibrios</i> em diferentes concentrações utilizando o teste de disco difusão.....	<b>47</b>
<b>Quadro 10</b> - Concentração inibitória mínima (CIM) do VBL, VCC, Cpe, Cfx e Imp determinados através do teste de microdiluição em caldo sobre cepas bacterianas.....	<b>55</b>
<b>Quadro 11</b> - Concentração inibitória mínima (CIM) do VBL, VCC e AnfB determinados através do teste de microdiluição em caldo sobre fungos filamentosos.....	<b>57</b>
<b>Tabela 1</b> - Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ATCC's utilizadas nos testes de sensibilidade.....	<b>32</b>
<b>Tabela 2</b> - Bactérias multirresistentes utilizadas nos testes de sensibilidade.....	<b>33</b>
<b>Tabela 3</b> - Linhagens fúngicas utilizadas nos testes de sensibilidade.....	<b>33</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AnfB	Anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração Bactericida Mínima
Cfx	Cefoxitina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	The Clinical and Laboratory Standards Institute
Cpe	Cefepima
Imp	Imipenem
IOC	Oswaldo Cruz Institute Collection
LAAO	L-aminoácido oxidase
NCCLS	The National Committee for Clinical Laboratory Standards
OMS	Organização Mundial de Saúde
SOMR	Secreção de Ouvido Multirresistente
VBL	Veneno total de <i>Bothrops leucurus</i>
VCC	Veneno total de <i>Crotalus durissus cascavella</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 VENENOS</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2 SERPENTES</b> .....	<b>18</b>
2.2.1 O Gênero <i>Bothrops</i> .....	18
2.2.2 O Gênero <i>Crotalus</i> .....	19
<b>2.3 MICRORGANISMOS DE INTERESSE NA SAÚDE</b> .....	<b>20</b>
<b>2.4 RESISTÊNCIA</b> .....	<b>23</b>
<b>2.5 TESTES DE SENSIBILIDADE</b> .....	<b>25</b>
<b>2.6 ANTIMICROBIANOS E VENENOS</b> .....	<b>26</b>
<b>2.7 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E NOVOS ESTUDOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1 GERAL</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2 ESPECÍFICOS</b> .....	<b>31</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1 INFRAESTRUTURA DISPONÍVEL</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2 MATERIAL BIOLÓGICO</b> .....	<b>32</b>
4.2.1 Extração dos venenos .....	32
4.2.2 Microrganismos.....	32
<b>4.3 CONTROLES</b> .....	<b>33</b>
<b>4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS</b> .....	<b>34</b>
4.4.1 Teste de disco difusão (Kirby-Bauer).....	34
4.4.1.1 Preparação dos discos .....	34
4.4.1.2 Preparação dos inóculos .....	35
4.4.1.3 Montagem do teste.....	35
4.4.2 Teste de microdiluição em caldo .....	36
4.4.2.1 Preparação dos inóculos e montagem das microplacas .....	37
4.4.2.2 Venenos e antimicrobianos .....	39
<b>4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>39</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
<b>5.1 TESTE DE DISCO DIFUSÃO</b> .....	<b>40</b>

5.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923, ATCC 6538P, SOMR 1 e SOMR 2)	40
5.1.2 <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (ATCC 15305)	42
5.1.3 <i>Staphylococcus intermedius</i> (SOMR 1 e SOMR 2)	43
5.1.4 <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	44
5.1.5 <i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341)	45
5.1.6 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	45
5.1.7 <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 70063 e ATCCC 1705)	45
5.1.8 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (SOMR 1, SOMR 2 e SOMR 3)	46
5.1.9 <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)	47
5.1.10 <i>Vibrio sp.</i>	47
5.1.11 <i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048)	49
5.1.12 Leveduras	49
<b>5.2 TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO</b>	<b>49</b>
5.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923, ATCC 6538P, SOMR 1 e SOMR 2)	50
5.2.2 <i>Staphylococcus intermedius</i> (SOMR 1 e SOMR 2)	51
5.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (SOMR 1, SOMR 2 e SOMR 3)	52
5.2.4 <i>Vibrio sp.</i>	53
5.2.5 Cepas Gram-positivas e Gram-negativas	54
5.2.6 Fungos filamentosos	56
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são as mais bem sucedidas fontes para desenvolvimento de novas drogas, eles proporcionam maior diversidade estrutural do que a química combinatória e por isso oferecem grandes oportunidades para encontrar novas estruturas que atuem contra uma ampla gama de alvos (HARVEY, 2000).

O Brasil possui uma fauna de serpentes com mais de 380 espécies catalogadas, existem 29 espécies de serpentes do gênero *Bothrops* e 6 sub-espécies do gênero *Crotalus* (BÉRNILS; COSTA, 2012), pertencentes a família Viperidae que é de importância médica no Brasil (BRASIL, 2010a). Os venenos de serpentes são constituídos por uma mistura complexa de substâncias e como consequência podem apresentar distintas funções biológicas, bioquímicas e farmacológicas (BJARNASON; FOX, 1994; KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006; QUEIROZ, 2010; WHC, 2013). Embora estas toxinas possam levar a emergências médicas causadas pela inoculação do veneno através da picada, estas mesmas moléculas, uma vez purificadas e caracterizadas podem ter valor terapêutico (NNTRC, 2013) e têm sido cada vez mais utilizadas como instrumentos farmacológicos e como protótipos para o desenvolvimento de drogas (CALVETE et al, 2009).

Apesar dos efeitos tóxicos, os venenos possuem grande potencial para produção de novos medicamentos, além dos que já são utilizados em tratamentos (ENG et al., 1992; GALLWITZ, 2006; McGIVERN, 2007; SHIELDS; ACLAN; SZATKOWSKI, 2008; SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011) e diagnóstico (BRAUD; BON; WISNER, 2000; JONEBRING et al., 2012; VU, et al., 2013). Existem vários estudos de atividade antimicrobiana com venenos de serpentes com objetivo de encontrar novas substâncias para o desenvolvimento de drogas. As infecções estão entre as dez principais causas de morte no mundo (OMS, 2008) e o surgimento de cepas resistentes torna o risco de infecções um problema mundial, por isso é necessária a descoberta de novas alternativas para o tratamento das infecções que envolvem os diversos microrganismos patogênicos. O estudo de diferentes fontes biológicas amplia as possibilidades de se encontrar novos agentes terapêuticos.

Metodologias como disco difusão e microdiluição são utilizadas para identificar se um composto possui ou não atividade antimicrobiana e avaliar a intensidade dessa atividade. A descoberta de novas moléculas que possuam alguma atividade biológica decorre de testes com substâncias de fontes que foram pouco ou não foram utilizadas com este objetivo, por isso, dentre as várias espécies de serpentes peçonhentas do Brasil, as serpentes *Bothrops leucurus* e *Crotalus durissus cascavella* foram escolhidas como alvo deste trabalho.

Devido à insuficiência de literatura referente a estudos relacionados à avaliação da atividade antimicrobiana dos venenos produzidos pelas duas espécies, justifica-se o interesse em avaliar a atividade antimicrobiana existente entre no veneno destas duas espécies de serpentes.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os produtos naturais têm desempenhado um papel essencial nos processos de descoberta e desenvolvimento de drogas (GALLO et al., 2008). Estas descobertas, juntamente com a elucidação de mecanismos biológicos e bioquímicos de ação terapêutica, têm sido fundamentais no trabalho de desenvolvimento de novos fármacos. No entanto, um aspecto decisivo a ser considerado para ser bem-sucedido na busca por novos produtos naturais úteis, é a seleção da fonte dos compostos bioativos a serem estudados. É importante levar em conta que fontes inexploradas de diversidade biológica estão frequentemente relacionadas com diversidade química nova (CLARDY; WALSH, 2004).

O Brasil possui uma enorme biodiversidade de espécies de fauna e flora, e conta com uma rica fauna de serpentes com mais de 380 espécies catalogadas, reunidas em 9 famílias (BÉRNILS; COSTA, 2012). As serpentes das famílias Viperidae e Elapidae têm grande importância no contexto dos acidentes ofídicos no Brasil (ALVES, 2007; COSTA, 2012; MOURA; MOURÃO, 2012), por serem responsáveis pelos principais acidentes com risco de óbito. Os venenos ofídicos podem apresentar diversas atividades fisiopatológicas, cujos efeitos são observados em nível local (região da picada) e sistêmico, e podem ser: inflamatória aguda, coagulante, hemorrágica, neurotóxica e miotóxica (BRASIL, 2001; BRASIL, 2010a).

Apesar dos efeitos tóxicos, os venenos em geral constituem uma rica fonte de moléculas bioativas com importantes propriedades farmacológicas e que possuem grande potencial para produção de novos medicamentos (KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006). Alguns produtos para diagnóstico e medicamentos já foram desenvolvidos a partir de estudos com toxinas/secreções de origem animal e são utilizadas no tratamento de algumas doenças.

O Byetta® (Exenatide) é um exemplo de medicamento para o tratamento de Diabetes Mellitus tipo 2, que foi isolada a partir da saliva do lagarto *Heloderma suspectum*, o Monstro de Gila (ENG et al., 1992; GALLWITZ, 2006), também existem estudos com esta mesma substância e sua possível atividade neuroprotetora (AVILES-OLMOS et al., 2013). Outro exemplo é o Prialt® (Ziconotide), um analgésico não opiáceo

utilizado no tratamento da dor crônica em adultos, que foi desenvolvido a partir do veneno do molusco marinho *Conus magnus*. Ele é o análogo sintético de um conopeptídeo ( $\omega$ -conotoxina MVIIA) que ocorre naturalmente neste animal (McGIVERN, 2007; SHIELDS; ACLAN; SZATKOWSKI, 2008).

Várias pesquisas com venenos de serpentes têm demonstrado a grande diversidade funcional e estrutural de componentes capazes de fornecer informações biológicas para algumas aplicações biotecnológicas, como por exemplo: analgésicos (YINGXIA et al., 2012); antimicrobiano (SANTAMARÍA et al., 2005; SAMY et al., 2008; LEE et al., 2011) anti-hipertensivo (LAMEU et al., 2010); antiviral (MULLER et al., 2012); antiparasitária (DEOLINDO et al., 2010; PAIVA et al., 2011) e antitumoral (BREGGE-SILVA et al., 2012).

Existem drogas que foram aprovadas e estão em uso para o tratamento de algumas doenças, que foram desenvolvidas a partir de estudos com toxinas de serpentes. O tratamento de várias doenças tromboembólicas utiliza proteínas do veneno de serpente e seus derivados para tratar diferentes distúrbios hemostáticos, visando coagulação, fibrinólise ou funções plaquetárias. Exemplos disso são o Aggrastat<sup>®</sup> (Tirofiban) e o Integrilin<sup>®</sup> (Eptifibatide) fármacos anti-plaquetários derivados de *Echis carinatus* e *Sistrurus miliaris barbouri* respectivamente, ambas as drogas são aprovadas para prevenção e tratamento de complicações trombóticas em pacientes submetidos à intervenção coronária percutânea (por exemplo, angioplastia, implante de *stent*) e em pacientes com síndrome coronariana aguda (SAJÉVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011).

A Batroxobina é uma serinoproteínase isolada do veneno da *Bothrops moojeni*, é o ingrediente ativo da Defibrase<sup>®</sup>, utilizada clinicamente para o tratamento de diversas doenças trombóticas, incluindo trombose de veias profundas, enfarte do miocárdio, embolia pulmonar, acidente vascular cerebral isquêmico agudo, angina pectoris inespecífica e surdez repentina (YOU et al., 2004; SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011; PENTAPHARMA, 2013). Além disso, a Batroxobina tem sido utilizada com frequência nos laboratórios clínicos para determinar se os tempos de coagulação prolongados da trombina são o resultado da contaminação de heparina ou de moléculas de fibrinogênio anormais (VU, et al., 2013).

A Haemocoagulase<sup>®</sup> é uma mistura de duas enzimas com atividade semelhantes a tromboplastina e trombina, isoladas a partir de *Bothrops atrox*, indicada para a prevenção e tratamento de hemorragias de uma variedade de origens, em diferentes áreas da medicina (KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006; PENTAPHARMA, 2013).

Proteínas do veneno de serpentes também são utilizadas em diagnóstico da função e disfunção dos elementos do sistema hemostático. A Ecarina, uma metaloprotease isolada do veneno da serpente *Echis carinatus*, é um ativador da protrombina (KORNALIK; BLOMBACK, 1975; PENTAPHARMA, 2013), utilizado em reagentes de diagnóstico para medir os níveis de protrombina no plasma ou tampão e para a determinação quantitativa de inibidores diretos da trombina (BRAUD; BON; WISNER, 2000; JONEBRING et al., 2012). Juntamente com o Textarin<sup>®</sup> (ativador de protrombina), isolado de *Pseudonaja textilis*, é um teste altamente sensível e específico para anticoagulantes lúpicos (imunoglobulinas) (TRIPLETT et al, 1993; MARSH, 2001).

O Botrocetin<sup>®</sup> é uma proteína semelhante a lectina tipo-C, isolada do veneno de *Bothrops jararaca*, com atividade de agregante plaquetário (USAMI et al., 1993), utilizada em ensaios de concentração do fator de von Willebrand e no diagnóstico da doença de von Willebrand e síndrome de Bernard-Soulier (BRAUD; BON; WISNER, 2000; SAJÉVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011). A Convulxin é uma lectina tipo-C heterodimérica isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, com função de ativador de plaquetas e é utilizado em estudos sobre receptores plaquetários (PENTAPHARMA, 2013).

Uma importante contribuição brasileira do uso de toxinas no desenvolvimento de medicamentos foi o Captopril<sup>®</sup> (fármaco anti-hipertensivo sintético largamente utilizado no controle da hipertensão e da insuficiência cardíaca), desenvolvido após a descoberta da bradicinina em 1949 por Maurício Rocha e Silva e colaboradores; dos fatores de potenciação da bradicinina (BPFs) em 1965 por Sérgio Henrique Ferreira e de pesquisas posteriores sobre a ação de um peptídeo potencializador da bradicinina, o BBP9a, isolado do veneno da *Bothrops jararaca* com efeito hipotensor, que demonstrou utilidade clínica no controle da hipertensão humana

(FERREIRA, 1998; LIMA et al., 2010). Os atributos farmacológicos e moleculares das toxinas de serpentes não só levou à descoberta de moléculas endógenas essenciais associadas ao equilíbrio da pressão arterial, como também permitiram a identificação da enzima conversora da angiotensina (ECA), como o alvo para uma droga de tratamento da hipertensão humana (QUEIROZ, 2010).

## **2.1 VENENOS**

Os venenos são inovações evolucionárias chave entre linhagens filogeneticamente diferentes e são utilizados não somente como um meio de defesa e predação, mas também como um meio de afirmar o domínio sobre membros da mesma espécie (WONG; BELOV, 2012). Além dos clados clinicamente importantes (cobras, escorpiões e aranhas) extensivamente estudados, animais peçonhentos incluem anêmonas, águas-vivas, moluscos marinhos, cefalópodes, centopéias, várias ordens de insetos, equinodermos, peixes, lagartos, e até mesmo alguns mamíferos (ornitorrinco e musaranhos). Os modos de inoculação/dispersão do veneno são também diversos e compreendem farpas, bicos, presas ou dentes modificados, arpões, nematocistos, probóscides, espinhos, esporões e ferrões. Os alvos de ação do veneno incluem os efeitos locais e praticamente todas as principais vias fisiológicas e tipos de tecidos acessíveis pela corrente sanguínea (FRY et al., 2009).

Os venenos de serpentes representam um traço adaptativo e um exemplo de evolução convergente (CALVETE et al., 2009), são produzidos em glândulas especializadas capazes de sintetizar e secretar grandes quantidades de substâncias biologicamente ativas, compostas principalmente de proteínas e polipeptídeos (GOMES, 2006; QUEIROZ, 2010). Os venenos representam um aperfeiçoamento fundamental na sua evolução, pois permitiu uma transição de um meio mecânico (construção) para um produto químico (veneno) como forma de conter e digerir presas maiores do que eles, e por isso as proteínas do veneno têm múltiplas funções, que incluem imobilização, paralisação, morte e digestão das presas (CALVETE et al., 2009).

Os venenos de serpentes são constituídos por uma mistura complexa de substâncias orgânicas - carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, aminoácidos e

nucleotídeos e inorgânicas - íons de cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, zinco, entre outros (BJARNASON; FOX, 1994), com efeitos tóxicos que podem atuar de forma isolada ou sinérgica, potencializando ainda mais os danos teciduais locais ou sistêmicos (IZIDORO, 2007). Como consequência desta mistura heterogênea, os venenos podem apresentar distintas funções biológicas, bioquímicas e farmacológicas (QUEIROZ, 2010; WHC, 2013).

Todos os Squamatos peçonhentos (serpentes e lagartos venenosos) compartilham um ancestral venenoso comum. A dieta desempenhou um papel central na radiação adaptativa das serpentes, e o veneno uma adaptação importante na diversificação destes animais (CALVETE et al., 2009). Muitas das toxinas de serpentes têm evoluído para alvos altamente específicos, tais como as junções neuromusculares ou componentes do sistema hemostático, cuja função primária está relacionada à imobilização (captura de alimento), morte e digestão das presas e, secundariamente, defesa contra predadores ou agressores (CISCOTTO, 2005; GOMES, 2006; QUEIROZ, 2010; WHC, 2013). As toxinas presentes no veneno perturbam a atividade de enzimas críticas, receptores ou canais de íons, desequilibrando assim o sistema nervoso central e periférico, cardiovascular e os sistemas neuromusculares, a coagulação sanguínea e homeostase (CALVETE et al., 2009).

Embora estas toxinas possam levar a emergências médicas causadas pela inoculação do veneno através da picada, estas mesmas moléculas, uma vez purificadas e caracterizadas podem ter valor terapêutico (NNTRC, 2013). Os variados motivos de interesse pelo estudo das características químicas e funcionais de toxinas ofídicas não está relacionado somente à sua importância no envenenamento, mas também pela sua possível utilização como valiosos instrumentos de pesquisa em outras áreas do conhecimento (TICLI, 2006; IZIDORO, 2007). Devido ao seu elevado grau de especificidade do alvo, toxinas têm sido cada vez mais utilizadas como instrumentos farmacológicos e como protótipos para o desenvolvimento de drogas (CALVETE et al., 2009).

## 2.2 SERPENTES

As serpentes pertencem a classe Reptilia, ordem Squamata e subordem Serpentes (RÉPTARIUM, 2013). Existem no mundo mais de 3000 espécies de serpentes (CASTRO, 2011; SAJÉVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011; REPTILE DATABASE, 2013) e no Brasil mais de 380 de espécies (BÉRNILS; COSTA, 2012; REPTILE DATABASE, 2013). As famílias Viperidae (composta pelos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*) e Elapidae (gênero *Micrurus*), são as de importância médica no Brasil (BRASIL, 2010a), pois causam o maior número de acidentes.

### 2.2.1 O Gênero *Bothrops*

No Brasil existem 29 espécies de serpentes que pertencem ao gênero *Bothrops* (BÉRNILS; COSTA, 2012), que são conhecidas popularmente por: jararaca, ouricana, jararacuçu, urutu-cruzeira, jararaca-do-rabo-branco, malha-de-sapo, patrona, surucucurana, combóia, caiçara, e outras denominações (BRASIL, 2001). Este gênero é o mais importante do ponto de vista médico, uma vez que é responsável por mais de 70% dos acidentes ofídicos notificados anualmente no Brasil (BRASIL, 2010a). Os venenos dessas serpentes apresentam ação proteolítica, coagulante e hemorrágica responsáveis pelos principais efeitos locais e sistêmicos observados no envenenamento (BRASIL, 2001). Existem diversos estudos que demonstram que os venenos de espécies do gênero *Bothrops*, também apresentam efeito citotóxico sobre parasitas (DEOLINDO et al., 2010; PAIVA et al., 2011); tumores de diferentes origens (RODRIGUES et al., 2009); até com atividade anti-HIV (STÁBELI et al., 2007).

A serpente *Bothrops leucurus* é uma espécie terrícola de médio porte, conhecida na Bahia por jararaca-de-rabo-branco (filhote) (Figura 1 A) e quando adulta (Figura 1 B) por malha-de-sapo, cabeça-de-capanga, jaracuçu-de-quatro-ventas (WHC, 2013). Seu veneno é composto de 89,9% de proteína, alto conteúdo de Zn, Ca, Cl, Cr, Na e Se, quantidades médias de K, Sb e Br, é a principal espécie causadora de acidentes na Região Metropolitana de Salvador (LIRA-DA-SILVA, 2001).

**Figura 1 A** - *Bothrops leucurus* filhote



Fonte: França (2012)

**Figura 1 B** - *Bothrops leucurus* adulta



Fonte: França (2012)

### **2.2.2 O Gênero *Crotalus***

As serpentes do gênero *Crotalus*, no Brasil, são representados por 6 sub-espécies (BÉRNILS; COSTA, 2012), conhecidas popularmente por cascavel, cascavel-quatro-ventas, boicininga, maracambóia, maracá e outras denominações (BRASIL, 2001). Este gênero é responsável por quase 8% dos acidentes ofídicos notificados anualmente no Brasil (BRASIL, 2010a) e o principal causador de óbitos entre os acidentes ofídicos. Os venenos dessas serpentes apresentam ação neurotóxica,

miotóxica, nefrotóxica e coagulante. Pesquisas demonstram que os venenos de espécies do gênero *Crotalus*, apresentam atividade analgésica (MANCIN et al., 1998; KONNO et al., 2008) antiviral (MULLER et al., 2012) e antiparasitária (TOYAMA et al., 2006).

A serpente *Crotalus durissus cascavella* (Figura 2) é encontrada nas áreas de caatinga da região Nordeste (RATELSLANGEN, 2013). Os venenos crotálicos são constituídos de várias substâncias: toxinas (crotoxina, crotamina, giroxina, convulxina), enzimas (5-nucleotidase, fosfodiesterase, trombina-like, L-amino-oxidase, e DNA hidrolase) e peptídeos (RANGEL-SANTOS et al., 2004).

**Figura 2** - *Crotalus durissus cascavella*



Fonte: Schaefer (<http://www.biologados.com.br>)

### **2.3 MICRORGANISMOS DE INTERESSE NA SAÚDE**

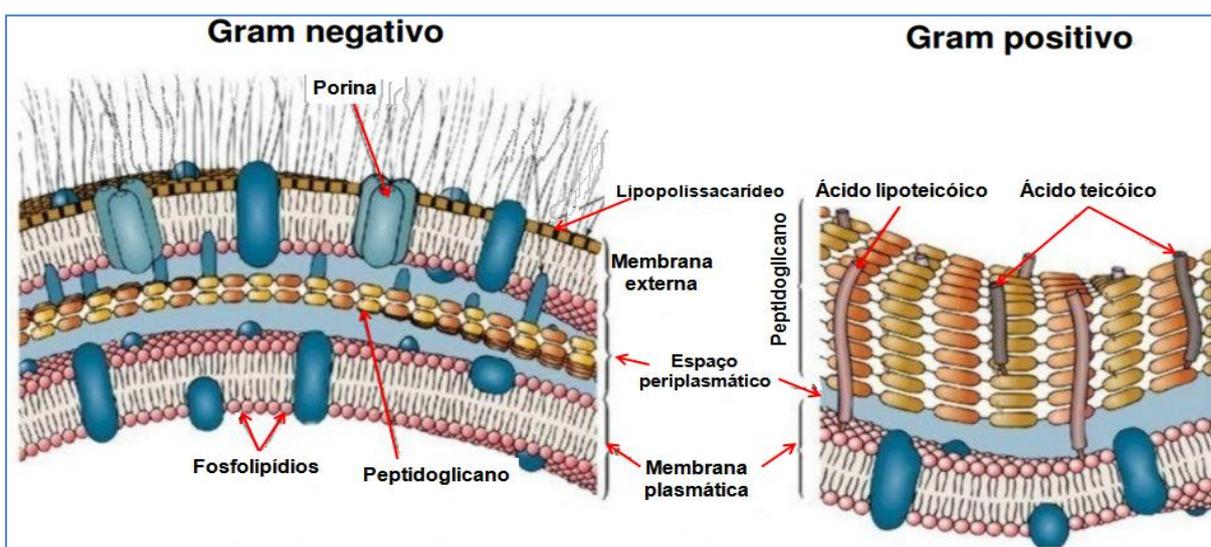
O estudo de microrganismos é importante nas diversas áreas do conhecimento, e apresenta grande relevância nas áreas da saúde tanto humana quanto animal e ambiental, no que diz respeito à busca por novas formas de sanar os problemas provocados por eles. Dois grupos têm ganhado atenção especial, as bactérias e os fungos, devido a sua capacidade de causar doenças.

Bactérias são microrganismos procarióticos, unicelulares que contêm tanto DNA como RNA. Não apresentam núcleo diferenciado e o nucleóide consiste de uma

única molécula circular de DNA organizado frouxamente, desprovido de uma membrana nuclear e de aparato mitótico. Elas se reproduzem por divisão binária e a maioria apresenta uma parede celular rígida contendo peptidoglicano (KONEMAN, 2008; LEVISON, 2010).

As bactérias podem ser classificadas de acordo com suas características morfológicas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Figura 3). Nas bactérias Gram-positivas, a parede da célula compreende múltiplas camadas de peptidoglicano (que impedem a passagem de compostos hidrofóbicos, devido a presença de açúcares e aminoácidos) intercalada com ácido teicóico e ácido lipoteicóico. A parede celular nas bactérias Gram-negativas, por sua vez é quimicamente mais complexa, com membrana externa composta principalmente por lipopolissacarídeos (LPS) que reveste uma fina camada de peptidoglicano. A membrana externa é permeável a moléculas hidrofílicas menores do que aproximadamente 600 Da, devido à presença de proteínas denominadas porinas (EPAND; EPAND, 2009). A porção de LPS é responsável pela elevada toxigenicidade, bem como, antigenicidade desses microrganismos (MOLINARO, CAPUTO; AMENDOEIRA, 2009; YOUNT; YEAMAN, 2013).

**Figura 3** - Estrutura e componentes da parede celular de bactérias Gram-positivas e negativas.

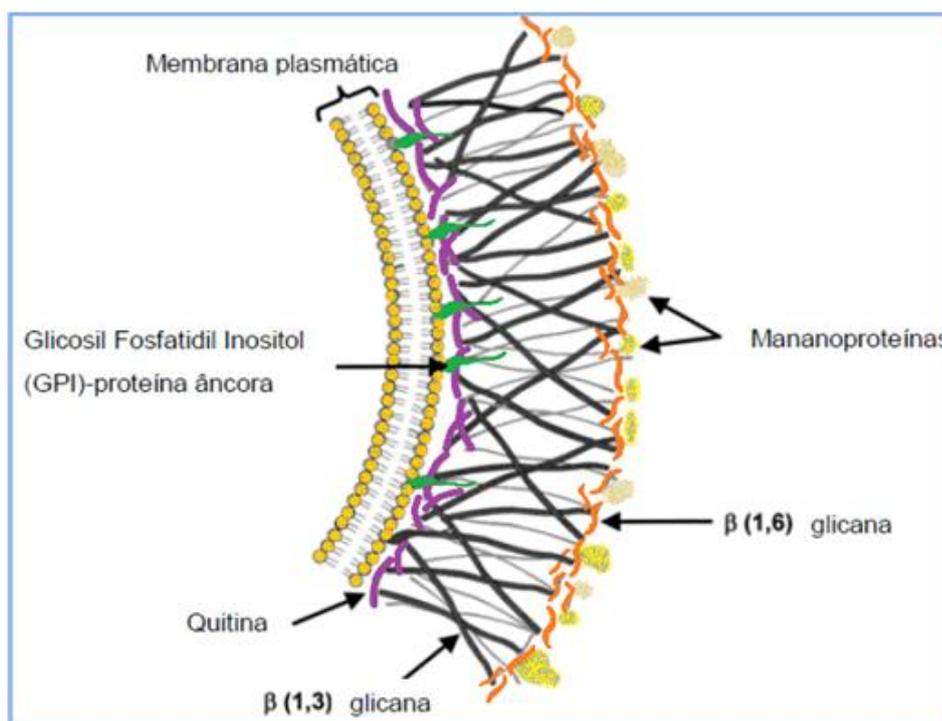


A parede celular de bactérias Gram-negativas, contém membrana externa composta principalmente por LPS com presença de porinas, uma fina camada de peptidoglicano e a membrana plasmática. A parede celular de bactérias Gram-positivas é composta por múltiplas camadas de peptidoglicano intercalada com ácido teicóico e ácido lipoteicóico. Fonte: Rivas (2006).

Os fungos são microrganismos eucarióticos, aclorofilados, nucleados, produtores de esporos, heterotróficos por absorção, com capacidade de reprodução tanto sexuada como assexuada, cujas estruturas somáticas filamentosas e ramificadas são envolvidas por paredes celulares contendo celulose, quitina, ou ambas (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; YOUNT; YEAMAN, 2013). As células fúngicas e humanas apresentam semelhanças e compartilham algumas vias do metabolismo intermediário, mas, diferente da membrana plasmática de células animais que apresentam colesterol, nos fungos o ergosterol é o principal componente da membrana celular (TADA; LATGÉ; AIMANIANDA, 2013). O ergosterol é como um bio-regulador da fluidez da membrana, assimetria e integridade e não é encontrado nas células bacterianas (KATHIRAVAN et al., 2012).

Estes organismos são encontrados praticamente em qualquer ambiente, inclusive no ar. Podem ser úteis na decomposição de resíduos, mas também podem agredir seres vivos, parasitando-os e, eventualmente, podem causar morte. Muitas doenças humanas, de animais e plantas são causadas por fungos (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2009).

**Figura 4** - Estrutura e componentes da parede celular fúngica



A parede celular fúngica é composta por quitina, (1-3)β-glicana, (1,6)β-glicana, lípidos, péptidos, embebidas numa matriz de proteína. Fonte: Adaptado de Selitrennikoff (2001).

## 2.4 RESISTÊNCIA

As infecções estão entre as dez principais causas de morte no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2008). A emergência de cepas resistentes torna o risco de infecções um problema mundial. As infecções causadas por microrganismos resistentes, muitas vezes não respondem ao tratamento convencional, resultando em doença prolongada, maior risco de morte e custos mais elevados (OMS, 2013). Assim, é necessária a descoberta de novas alternativas para o tratamento das infecções que envolvem os diversos microrganismos patogênicos.

A resistência pode surgir a partir tanto da evolução natural/pressão seletiva, bem como através de práticas pobres de controle e prevenção de infecção, uso indevido/inadequado de medicamentos antimicrobianos, incluindo na criação de animais, e diagnóstico, prevenção e terapêutica insuficiente (NATHAN, 2004; KURODA; CAPUTO, 2013; OMS, 2013). Independente da origem da resistência, o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos mais potentes serão sempre necessários para combater os microrganismos resistentes (LIMA et al., 2005).

Esforços significativos têm sido dados na busca por compostos de origem natural, semissintética ou sintética que apresentem uma elevada eficácia, que sejam capazes de inibir, em concentrações baixas, processos vitais de uma ou mais espécies de microrganismos resistentes e que sejam menos susceptíveis ao desenvolvimento de resistência nos microrganismos alvo (SILVEIRA et al., 2006; KURODA; CAPUTO, 2013).

A resistência antimicrobiana (RAM) é a resistência de um microrganismo a um medicamento para a qual era originalmente sensível. Os microrganismos resistentes são capazes de resistir a ação dos medicamentos antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivirais e antimaláricos), de modo que os tratamentos normais tornam-se ineficazes e as infecções persistem, aumentando o risco de contaminação de outras pessoas (OMS, 2013). Os mecanismos de resistência incluem a produção de enzimas de inativação de drogas (inativação do antibiótico diretamente na molécula bioativa por alterações químicas), alteração de sítios alvos (leva à perda de sensibilidade ao antibiótico) e alteração na absorção ou efluxo de drogas (promovem

a redução da concentração do antibiótico sem sua modificação química) (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; CLSI, 2012). Os microrganismos resistentes foram detectados pela primeira vez em ambientes hospitalares a partir de infecções nosocomiais, mas desde então se espalharam e agora são rotineiramente agentes de infecções comunitárias. Microrganismos resistentes isolados clinicamente incluem bactérias, vírus, fungos e parasitas (KURODA; CAPUTO, 2013).

A resistência aos antimicrobianos é uma ameaça crescente devido não apenas à perda inerente de eficácia dos antibióticos prescritos clinicamente, mas também devido ao ritmo lento de desenvolvimento de novos antibióticos para substituir aqueles que se tornaram ineficazes (NATHAN, 2004; FERNANDES, 2006; KURODA; CAPUTO, 2013). Em certos aspectos, o próprio sucesso dos antibióticos ao longo dos anos tem sido o seu fracasso. O uso de antibióticos generalizado fornece a pressão seletiva para que genes de resistência induzam a resistência aos medicamentos, o que pode se espalhar por toda a comunidade. Isto é um problema único aos antibióticos porque as outras classes de drogas, tais como as destinadas a doenças cardiovasculares e neurológicas, permanecem eficazes durante a vida de um doente, a doença alvo nunca se torna resistente (FERNANDES, 2006).

Os antibióticos mais utilizados clinicamente têm como mecanismo de ação a inibição de uma ou mais rotas metabólicas, que já são conhecidas há décadas: síntese do peptidoglicano (parede celular), síntese de proteína ribossômica, síntese de ácido fólico e síntese de ácidos nucleicos. As futuras gerações de modelos de fármaco/medicamentos existentes tendem a explorar esses alvos clássicos. No entanto, uma estratégia complementar e talvez, mais promissora é o de desenvolver novos modelos para esses alvos, evitando-se assim uma resistência cruzada com drogas existentes (FISCHBACH; WALSH, 2009). O estudo de diferentes fontes biológicas só amplia as possibilidades de se encontrar não apenas novos agentes para alvos terapêuticos já conhecidos, mas também testá-los frente a microrganismos diversos, neste sentido o uso de venenos é uma alternativa totalmente coerente de aplicação na pesquisa por novos antimicrobianos.

## 2.5 TESTES DE SENSIBILIDADE

Testes de sensibilidade (ou susceptibilidade) são indicados para qualquer organismo que contribui para um processo infeccioso. A técnica de disco difusão é um exemplo deste teste, um ensaio qualitativo, no qual discos de papel de filtro são impregnados com o agente a ser testado que são colocados sobre a superfície de uma placa de ágar, previamente inoculada com o microrganismo, seguido de incubação durante 18-24h. As zonas de inibição de crescimento à volta de cada disco (halos) são medidas e interpretadas como suscetível, intermediário ou resistente (CLSI, 2009 e 2012), com base em critérios pré-estabelecidos por órgãos internacionais de padronização, a exemplo do The Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI.

Outro tipo de teste de sensibilidade é o teste de microdiluição, um ensaio quantitativo no qual é possível estabelecer a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A CIM de um agente antimicrobiano é a menor concentração deste agente necessária para inibir o crescimento de um microrganismo. Os testes para determinação da CIM são realizados em placas de cultura (96 poços) e em meios de cultura seletivos para o crescimento dos micro-organismos testados. O teste de microdiluição em caldo está baseado nos protocolos M07-A9 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), M27-A2 e M38-A do The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002). As CIM's são consideradas 'padrão ouro' para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos. Nos laboratórios de diagnóstico, as CIM's são também usadas como uma ferramenta de pesquisa para determinar a atividade *in vitro* de novos antimicrobianos (ANDREWS, 2001). A partir da determinação da CIM pode-se estabelecer também a concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM) através da subcultura do poço com inibição em uma placa de ágar ou meio líquido. A ausência de crescimento do microrganismo no meio de cultura demonstra sua ação antimicrobiana (RIOS, RECIO E VILLAR, 1988).

Os testes de sensibilidade são mais frequentemente indicados quando o organismo causador pertence a uma espécie capaz de exibir resistência aos agentes antimicrobianos comumente utilizados. É também indicado para qualquer organismo que possa contribuir para um processo infeccioso garantindo a quimioterapia se a

sua susceptibilidade antimicrobiana não pode ser prevista com segurança a partir do conhecimento da identidade do organismo. Estes testes também são importantes em estudos de epidemiologia da resistência e, em estudos de novos agentes antimicrobianos (CLSI, 2012). Através de metodologias como disco difusão e microdiluição é possível identificar se um composto possui ou não atividade antimicrobiana e avaliar a intensidade dessa atividade.

## 2.6 ANTIMICROBIANOS E VENENOS

A descoberta de agentes antimicrobianos foi uma das grandes contribuições da medicina no século XX, que começou com Fleming através da penicilina, um antibiótico potente, ativo principalmente contra bactérias gram-positivas, isolado do fungo *Penicillium notatum* em 1928 (SOHRAB, 2005). Os antimicrobianos são substâncias utilizadas com o objetivo de matar ou inibir o crescimento de populações de microrganismos, podem ser de origem natural, sintética e semi-sintética. Estes agentes correspondem a uma classe de fármacos utilizada com frequência em hospitais e na comunidade (COSTA, 2012; ANVISA, 2013).

Para que o antimicrobiano exerça sua atividade, primeiramente deverá atingir concentração ideal no local da infecção, ser capaz de atravessar, de forma passiva ou ativa, a parede celular, apresentar afinidade pelo sítio de ligação no interior do microrganismo e permanecer tempo suficiente para exercer seu efeito inibitório. A sensibilidade dos microrganismos é determinada *in vitro* pela CIM de cada microrganismo para cada antimicrobiano (ANVISA, 2013). É importante lembrar que as diferenças existentes entre a parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, podem influenciar significativamente os mecanismos de ação dos agentes bacterianos (ARAGÃO, 2005) e que as semelhanças entre as células fúngicas e humanas dificultam a obtenção de agentes com a seletividade requerida para que se possa obter uma molécula antifúngica segura (PAIVA, 2013).

Existem vários relatos de atividade antimicrobiana em venenos de diferentes serpentes (BLAYLOCK, 2000; SAMY et al., 2008; CHEN et al., 2011; SHEBL et al., 2012), inclusive de serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus* eficazes contra várias cepas de microrganismos como mostram os Quadros 1 e 2.

**Quadro 1** - Estudos de atividade bactericida utilizando venenos e/ou frações dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*

CEPAS BACTERIANAS	<i>Bothrops sp.</i>	<i>Crotalus sp.</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>		VARGAS, 2013
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	CISCOTTO, 2009	
<i>Bacillus cereus</i>	COSTA, 2012	
<i>Bacillus subtilis</i>	NUNES, 2011; COSTA, 2012	
<i>Bacteróides fragilis</i>	CISCOTTO, 2009	
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		SAMY, 2006
<i>Clavibacter michiganensis michiganensis</i>		OLIVEIRA, 2003
<i>Citrobacter freundii</i>	COSTA, 2012	
<i>Eikenella corrodens</i>	CISCOTTO, 2009	
<i>Enterobacter sakazakii</i>	COSTA, 2012	
<i>Enterococcus faecalis</i>	CISCOTTO, 2009; NUNES, 2011	
<i>Escherichia coli</i>	RODRIGUES, 2004, 2009; STÁBELI, 2004, 2007; IZIDORO, 2006; NUNES, 2011; PAIVA, 2011; COSTA, 2012	VARGAS, 2013; YAMANE, 2013
<i>Eubacterium lentum</i>	CISCOTTO, 2009	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	QUEIROZ, 2010; NUNES, 2011	
<i>Listeria monocytogenes</i>	CISCOTTO, 2009; COSTA, 2012	
<i>Micrococcus luteus</i>		YAMANE, 2013
<i>Moraxella catarrhalis</i>	COSTA, 2012	
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	CISCOTTO, 2009	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	CISCOTTO, 2009	
<i>Prevotella intermédia</i>	CISCOTTO, 2009	
<i>Propionibacterium acnes</i>	CISCOTTO, 2009	
<i>Proteus vulgaris</i>	COSTA, 2012	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	STÁBELI, 2007; CISCOTTO, 2009; IZIDORO, 2006; TORRES, 2009, 2010 a, 2010b	YAMANE, 2013
<i>Salmonella typhimurium</i>	STÁBELI, 2007; CISCOTTO, 2009; COSTA, 2012	
<i>Salmonella choleraesuis</i>	TORRES, 2009, 2010a, 2010b	
<i>Shigella flexneri</i>	COSTA, 2012	
<i>Staphylococcus aureus</i>	RODRIGUES, 2004, 2009; STÁBELI, 2004, 2007; CISCOTTO, 2009; NUNES, 2011; PAIVA, 2011; COSTA, 2012	VARGAS, 2013; YAMANE, 2013
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CISCOTTO, 2009	
<i>Streptococcus mutans</i>	CISCOTTO, 2009	TOYAMA, 2006
<i>Xanthomonas axonopodis. pv. passiflorae</i>	BARBOSA, 2005	OLIVEIRA, 2003; TOYAMA, 2006; DIZ-FILHO, 2009

**Quadro 2** - Estudos de atividade antifúngica utilizando venenos e/ou frações dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*

ESPÉCIES FÚNGICAS	<i>Bothrops sp.</i>	<i>Crotalus sp.</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>		YAMANE, 2013
<i>Aspergillus terreus</i>		MAGALDI, 2002
<i>Candida albicans</i>	GOMES, 2005; NEVES, 2008; TORRES, 2009, 2010 a, 2010b	NEVES, 2008; YAMANE, 2013
<i>Candida dubliniensis</i>		MAGALDI, 2002
<i>Candida glabrata</i>		MAGALDI, 2002; YAMANE, 2013
<i>Candida guilliermondii</i>		YAMANE, 2013
<i>Candida krusei</i>		MAGALDI, 2002; YAMANE, 2013
<i>Candida parapslosis</i>		MAGALDI, 2002; YAMANE, 2013
<i>Candida tropicalis</i>		MAGALDI, 2002; YAMANE, 2013
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	GOMES, 2005	
<i>Cryptococcus neoformans</i>		MAGALDI, 2002; YAMANE, 2013
<i>Fusarium oxysporum</i>	GOMES, 2005	
<i>Fusarium spp.</i>		MAGALDI, 2002
<i>Mucor indicus</i>		MAGALDI, 2002
<i>Rhinochadiella aquaspersa</i>		MAGALDI, 2002
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GOMES, 2005	
<i>Sporothrix schenckii</i>		MAGALDI, 2002
<i>Trichophyton rubrum</i>		YAMANE, 2013
<i>Trichosporon spp.</i>		YAMANE, 2013

O potencial biotecnológico de venenos e toxinas, aliados à necessidade de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de processos infecciosos, encontra um importante cenário no contexto atual, pois um grande desafio dos sistemas de saúde é tratar quadros infecciosos, sobretudo devido a resistência adquirida pelos microrganismos aos agentes comumente utilizados na clínica. Assim a descoberta do potencial antimicrobiano não apenas do veneno de serpentes, mas também do veneno de outros animais se fazem cada vez mais necessárias, para superar este problema.

## 2.7 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E NOVOS ESTUDOS

Tem sido evidenciado que os venenos de serpentes são excelentes fontes de novos produtos naturais bioativos. A descoberta de novas moléculas que possuam alguma atividade biológica decorre de testes com substâncias que ainda não foram utilizadas para este fim e/ou que não tenham sido estudadas em sua totalidade. No manuscrito de Newman e Cragg publicado em 2012 sobre o papel dos produtos naturais como fonte no processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos, os autores mostram, através da análise de dados entre 1981 e 2010, que mais de 65% dos antibacterianos e mais 13% dos antifúngicos clinicamente utilizados são produtos naturais ou os seus derivados semissintéticos. Vários estudos têm mostrado a importância dos componentes do veneno como ferramentas para o estudo de sistemas biológicos e também para servir como modelos para desenho de drogas e desenvolvimento de produtos terapêuticos. Por isso, dentre as várias espécies de serpentes peçonhentas, foram escolhidos como alvo deste trabalho as serpentes *Bothrops leucurus* e *Crotalus durissus cascavella*, pois o uso dos venenos produzidos por elas constituem-se como fontes potenciais para o estudo de atividades bactericida e antifúngica.

Um grande número de estudos com venenos de serpentes e/ou suas frações já foram realizados, porém ainda há muito que se estudar sobre os venenos de algumas espécies frente a variados agentes infecciosos (bactérias, fungos, vírus, parasitas). Devido a esta diversidade, estudos com este enfoque ampliam o panorama da pesquisa por novas substâncias que possuam atividade antimicrobiana como fonte potencial de futuros agentes terapêuticos.

Pesquisas com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana entre os venenos totais de serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus* e determinar suas potencialidades biotecnológicas, serão úteis na busca de novos agentes antimicrobianos. Alguns poucos registros do uso de peçonhas e/ou frações da espécie *Bothrops leucurus* (TORRES, 2009, 2010b; NUNES et al., 2011) e *Crotalus durissus cascavella* (TOYAMA et al., 2006) com atividade bactericida foram encontrados na literatura, entretanto em relação à atividade antifúngica, foram encontrados apenas quatro estudos, conduzidos com estes gêneros separadamente

e apenas um comparando a atividade dos venenos de serpentes amazônicas *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* (NEVES, 2008). Raros estudos de atividade antimicrobiana utilizando os venenos totais das espécies *Bothrops leucurus* e *Crotalus durissus cascavella* foram encontrados.

Os produtos naturais constituem a estratégia de maior sucesso para descoberta de novos fármacos (HARVEY, 2000). Portanto, a investigação centrada nos venenos de diferentes serpentes é um campo promissor na descoberta de novas moléculas potencialmente bioativas para produção de medicamentos. Existe muito trabalho a ser feito sobre a diversidade de biomoléculas disponíveis, inclusive em venenos considerados como 'exaustivamente' estudados. Devido à insuficiência de literatura referente a estudos relacionados à avaliação da atividade antimicrobiana dos venenos dessas duas espécies, justifica-se o interesse em avaliar a atividade antimicrobiana existente entre eles.

Pesquisar venenos de espécies como a *Bothrops leucurus* e *Crotalus durissus cascavella*, que possuem venenos com características diferentes, que ainda não possuem muitos estudos sobre atividade antimicrobiana, além de considerar que existe variação geográfica dentro do mesmo gênero e/ou da mesma espécie, só vem reforçar a necessidade de investigação dessas espécies, como um primeiro passo para o isolamento do componente antimicrobiano.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar o potencial antimicrobiano dos venenos totais de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos venenos totais de *Bothrops leucurus* e *Crotalus durissus cascavella* contra cepas bacterianas e fúngicas.
- Avaliar a atividade bacterioestática mediante a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos venenos totais de *Bothrops leucurus* e *Crotalus durissus cascavella* contra linhagens bacterianas.
- Avaliar a atividade fúngistática mediante a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos venenos totais de *Bothrops leucurus* e *Crotalus durissus cascavella* contra linhagens fúngicas.
- Comparar a atividade antimicrobiana dos venenos totais de *Bothrops leucurus* e *Crotalus durissus cascavella*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 INFRAESTRUTURA DISPONÍVEL

As atividades deste projeto foram desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Bioprospecção (Bioprospector) e no Laboratório de Neuro imuno Endocrinologia e Toxinologia, ambos localizados no Instituto de Ciências da Saúde (ICS) na Universidade Federal da Bahia (UFBA).

### 4.2 MATERIAL BIOLÓGICO

#### 4.2.1 Extração dos venenos

Os venenos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana são um pool de venenos de serpentes adultas de *Bothrops leucurus* (VBL) e *Crotalus durissus cascavella* (VCC), provenientes do Estado da Bahia e mantidas no serpentário do Núcleo de Ofiologia e Animais Peçonhentos (NOAP) do Instituto de Biologia da UFBA. Os venenos foram coletados através da pressão manual das glândulas de serpentes, secos à vácuo, pesados em balança analítica e estocados à -20°C até o momento das análises, no Laboratório de Neuro imuno endocrinologia e Toxinologia no ICS, sob a coordenação da professora Dra. Luciana Lyra Casais e Silva.

#### 4.2.2 Microrganismos

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados com cepas bacterianas da American Type Culture Collection (ATCC) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ATCC's utilizadas nos testes de sensibilidade

Bactérias	
<b>Gram-positivas</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538P), <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (ATCC 15305), <i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341), <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)
<b>Gram-negativas</b>	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 1705), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCCC 70063), <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028), <i>Vibrio mimicus</i> (ATCC 33653), <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (ATCC 17802) e <i>Vibrio vulnificus</i> (ATCC 27562)

Também foram realizados testes com algumas cepas de bactérias multirresistentes de isolados clínicos de secreção de ouvido canino, identificadas como SOMR (Tabela 2).

**Tabela 2** - Bactérias multirresistentes utilizadas nos testes de sensibilidade

Bactérias	
<b>Gram-positivas multirresistentes</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> SOMR 1, <i>Staphylococcus aureus</i> SOMR 2, <i>Staphylococcus intermedius</i> SOMR 1 e <i>Staphylococcus intermedius</i> SOMR 2
<b>Gram-negativas multirresistentes</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SOMR 1, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SOMR 2 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SOMR 3

Foram utilizadas leveduras ATCC's e fungos filamentosos (ambiental e dermatófitos de isolados clínicos de animais de pequeno porte) nos testes de atividade antimicrobiana (Tabela 3).

**Tabela 3** - Linhagens fúngicas utilizadas nos testes de sensibilidade

Fungos	
<b>Leveduras</b>	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231), <i>Candida krusei</i> (ATCC 6258), <i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019) e <i>Candida tropicalis</i> (ATCC 28707)
<b>Fungos filamentosos</b>	Ambiental: <i>Aspergillus niger</i> Dermatófitos: <i>Microsporium canis</i> 1, <i>Microsporium canis</i> 2 e <i>Microsporium gypseum</i>

### 4.3 CONTROLES

A Cefoxitina (Cfx) (NOVAFARMA<sup>®</sup>) e o Imipenem (Imp) (Aspen Pharma) foram utilizados como controle positivo nos testes de disco difusão para as cepas bacterianas, no teste de concentração inibitória mínima além deles foi utilizado mais um controle positivo, a Cefepima (Cpe) (Antibióticos do Brasil Ltda).

A Anfotericina B (AnfB) (Cristália<sup>®</sup>), foi utilizada como controle positivo nos testes de disco difusão para leveduras e de microdiluição em caldo para os fungos filamentosos.

Água MiliQ autoclavada foi utilizada como controle negativo para demonstrar a sua não interferência nos testes devido a sua utilização como diluente dos venenos.

#### **4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS**

Para verificar a presença de atividade dos venenos totais frente aos microrganismos escolhidos, foram realizados testes qualitativos e quantitativos baseados nas normas dos protocolos M45-P, M44-A2, M07-A9, M02-A11 e M100-S23 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005, 2009, 2012, 2013) e M38-A do The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002).

##### **4.4.1 Teste de disco difusão (Kirby-Bauer)**

Os testes de disco difusão foram realizados com base nos protocolos M45-P e M02-A11 para bactérias (CLSI, 2005 e 2012) e M44-A2 para leveduras (CLSI, 2009).

###### *4.4.1.1 Preparação dos discos*

Os venenos totais secos à vácuo foram diluídos em água MiliQ autoclavada e esterilizados por filtração com filtro de 0,22µm (Vertical<sup>®</sup> Chromatography), acoplado em seringa de 1ml (Figura 5). Em seguida aplicou-se sobre discos de papel filtro estéreis em branco com 6mm de diâmetro, com 10 µl do veneno total diluído em diferentes concentrações (0,5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 3mg/ml, 4mg/ml, 5mg/ml, 6mg/ml, 7mg/ml e 8mg/ml). Como controle negativo foi confeccionado discos com o diluente do veneno. Os discos de cefoxitina, imipenem e anfotericina B foram confeccionados com as mesmas quantidades das substâncias encontradas nos discos comerciais (30µg, 10µg e 100µg respectivamente). A cefoxitina em pó foi diluída em água MiliQ autoclavada, o imipenem em pó foi diluído em salina 0,9% e a anfotericina B em dimetil sulfóxido - DMSO (VETEC<sup>®</sup>) seguindo as indicações dos protocolos M100-S23 e das bulas dos antimicrobianos.

**Figura 5** - Preparação dos disco de VBL e VCC



Os venenos foram diluídos em água MiliQ, em seguida, esterilizados por filtração em filtros de 0,22µm. Impregnou-se cada disco de papel filtro esteril com 10µl do veneno total em diferentes concentrações.

#### 4.4.1.2 Preparação dos inóculos

Os inóculos foram preparados em solução salina a 0,85%, através do método de suspensão direto da colônia. As suspensões foram homogeneizadas em um agitador tipo vortex (Vixar<sup>®</sup>) durante 15s e ajustadas até alcançarem a turvação correspondente ao padrão de 0,5 na escala de McFarland, resultando numa suspensão contendo cerca de  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml (Figura 6) para as bactérias e  $1-5 \times 10^6$  células/ml para as leveduras.

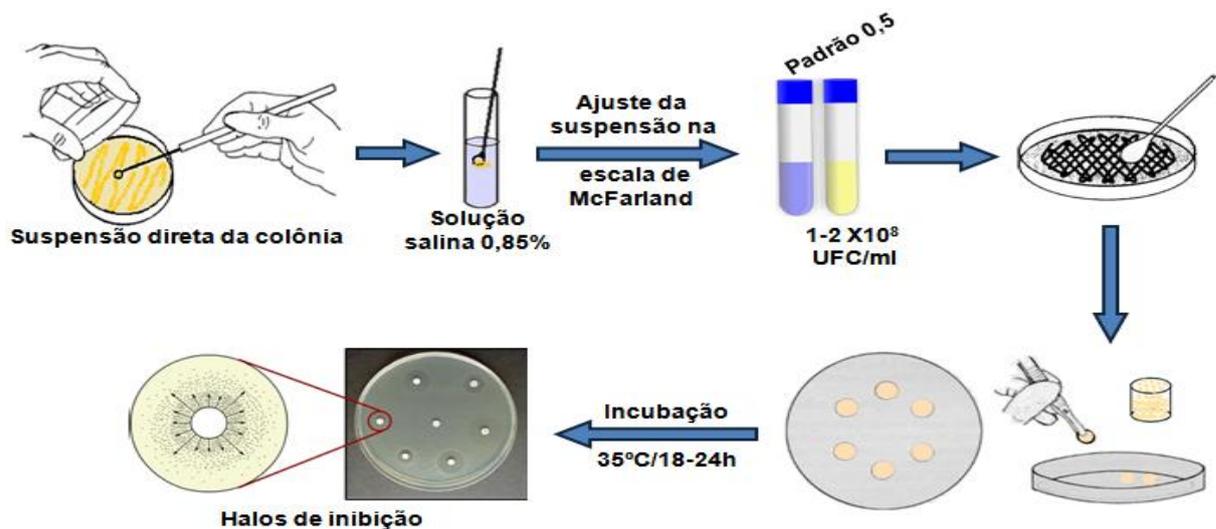
#### 4.4.1.3 Montagem do teste

A suspensão dos microrganismos foi inoculada com o auxílio de swab, através da técnica de três direções, em placas de Petri (90mm) contendo o meio de cultura ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA<sup>®</sup>) para as bactérias e ágar Mueller-Hinton + 2% glicose (VETEC<sup>®</sup>) + 0,5µg/ml de azul de metileno para as leveduras. As placas permaneceram à temperatura ambiente por aproximadamente cinco minutos em câmara de fluxo laminar para permitir que qualquer excesso de umidade da superfície do ágar fosse absorvido antes de aplicar os discos. Em seguida, fez-se aplicação dos discos contendo os venenos e dos discos controle, que foram retirados do freezer aproximadamente uma hora antes do uso e deixados à 25°C. A aplicação foi realizada com uso de uma pinça estéril e os discos pressionados suavemente contra a superfície do ágar, as placas permaneceram com a superfície

voltada para cima por alguns minutos para a completa fixação dos discos, por fim foram incubadas a 35°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), por 18-24h (CLSI, 2009; CLSI, 2012) (Figura 6).

Foi considerado com atividade antimicrobiana aquelas concentrações dos venenos totais que apresentassem qualquer halo de inibição do crescimento antimicrobiano em torno do disco de difusão. As zonas de inibição foram registradas em mm de diâmetro. Todos os ensaios foram desenvolvidos em triplicata e considerou-se a média dos diâmetros dos halos de inibição para cada concentração testada.

**Figura 6** - Montagem do teste de disco difusão



Os inóculos foram preparados em solução salina a 0,85%, através do método de suspensão direto da colônia e ajustadas até alcançarem a turvação correspondente ao padrão de 0,5 na escala de McFarland, em seguida a suspensão é inoculada com o auxílio de swab e os discos aplicados com uso de uma pinça estéril, por fim são incubadas a  $35^\circ\text{C}$  ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), por 18-24h. Após o período de incubação os halos formados são medidos.

#### 4.4.2 Teste de microdiluição em caldo

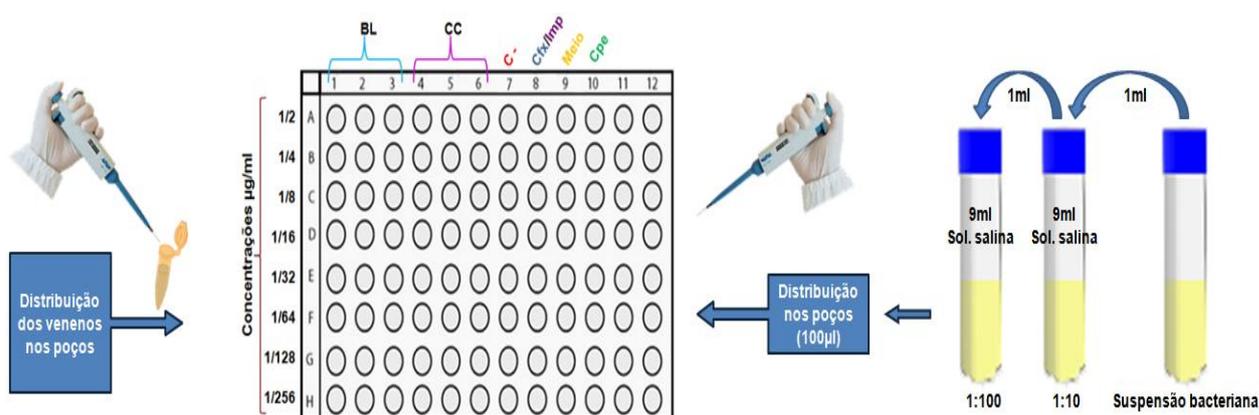
Os testes microdiluição foram realizados com base nos protocolos M45-P e M07-A9 para bactérias (CLSI, 2005, 2012) e M38-A para fungos filamentosos (NCCLS, 2002). Todos microrganismos nos quais se verificou a presença de qualquer halo de

inibição após o ensaio de disco difusão, foram submetidos ao teste de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

#### 4.4.2.1 Preparação dos inóculos e montagem das microplacas

O ensaio de microdiluição em caldo de cultura para as bactérias, foi efetuado de acordo com o protocolo M07-A9 (CLSI, 2012). A suspensão de cada inóculo foi preparada de acordo com a seção 4.4.1.2 e, em seguida, diluída 2x (1:10) em caldo nutriente (HIMEDIA<sup>®</sup>) até uma concentração final de  $1 \times 10^6$  UFC/ml. As suspensões bacterianas (50 $\mu$ l) foram incubadas em microplaca de 96 poços com fundo em "U", na presença de 50 $\mu$ l de diferentes concentrações iniciais dos venenos totais (esterilizados em filtro de 0,22 $\mu$ m) e antibióticos. No final, cada microplaca montada continha a densidade bacteriana de  $5 \times 10^5$  UFC/ml apropriada para o teste (Figura 7). As microplacas foram incubadas a 35°C ( $\pm 2^\circ$ C) por 16-20h em uma incubadora BOD (Cientec<sup>®</sup>). Após a incubação, os pontos finais para determinação da CIM foram observadas por inspeção visual sem e com a adição de 15 $\mu$ l de TTC (cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio - VETEC<sup>®</sup>) a 1%. O ponto final foi atingido quando o meio de cultura era transparente ou nenhum precipitado foi observado.

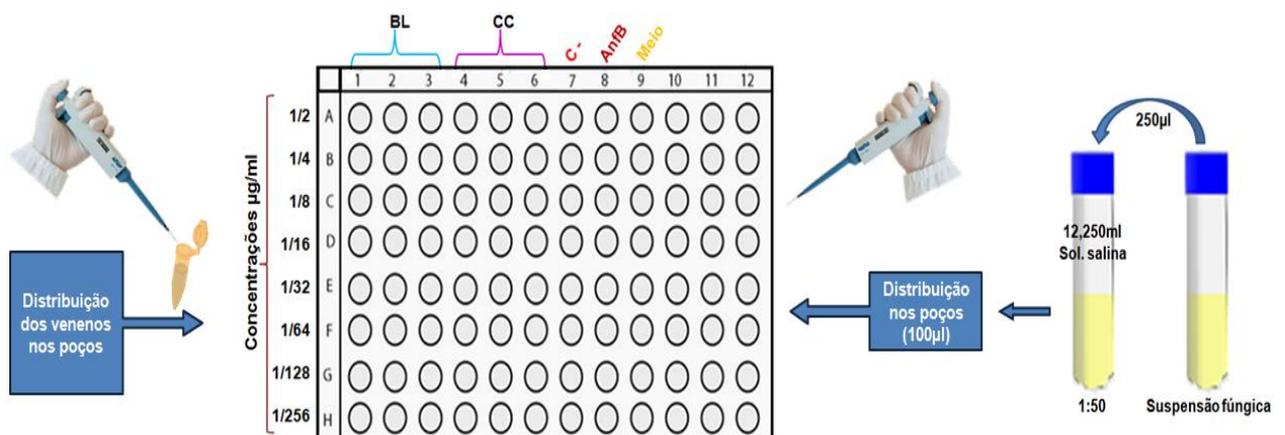
**Figura 7-** Preparação dos inóculos (bacterianos) e montagem das placas



Após a preparação da suspensão de cada inóculo bacteriano, ela é diluída 2x (1:10) em caldo nutriente. 50 $\mu$ l da última diluição é distribuída em cada poço contendo o total de 50 $\mu$ l do veneno + o caldo de cultura. As microplacas foram incubadas a 35°C ( $\pm 2^\circ$ C) por 16-20h.

O ensaio de microdiluição em caldo de cultura para os fungos, foi efetuado de acordo com o protocolo M38-A (NCCLS, 2012). Os fungos foram cultivados em placas de agar batata-dextrose (HIMEDIA<sup>®</sup>) e incubados por 7 dias a 35°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) numa incubadora BOD (Cientec<sup>®</sup>). A suspensão de cada inóculo foi preparado em solução salina a 0,85% com Tween 20 (PROMEGA<sup>®</sup>) através do método de suspensão direto da colônia. A proporção de Tween 20 em salina foi de 1:100. As suspensões foram homogeneizadas num agitador tipo vortex (Vixar<sup>®</sup>) durante 15s. As tampas dos tubos foram retiradas com cuidado, uma vez que o líquido aderido à tampa poderia produzir aerossóis. As suspensões foram ajustadas para a densidade de 0,5 na escala de McFarland. Essas suspensões foram diluídas 1:50 em caldo bata-dextrose (HIMEDIA<sup>®</sup>), correspondente a 2x a densidade necessária para o teste que é de  $0,4\text{-}5 \times 10^4$  UFC/ml, aproximadamente. O inóculo do teste foi produzido em quantidade suficiente para inocular diretamente cada poço com 100  $\mu\text{l}$  da suspensão de inóculo diluído. O volume final de cada poço após a microplaca montada foi de 200 $\mu\text{l}$ . As microplacas foram incubadas a 35°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) por 46-50h numa incubadora BOD (Cientec<sup>®</sup>). O ponto final foi atingido quando o meio de cultura era transparente ou nenhum precipitado foi observado.

**Figura 8** - Preparação dos inóculos (fúngicos) e montagem das placas



Após a preparação da suspensão de cada inóculo fúngico, ele é diluído 1:50 em caldo bata-dextrose. 100 $\mu\text{l}$  da diluição de 1:50 é distribuída em cada poço contendo o total de 100 $\mu\text{l}$  do veneno + o caldo de cultura. As microplacas foram incubadas a 35°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) por 46-50h.

#### 4.4.2.2 Venenos e antimicrobianos

Os venenos totais secos à vácuo foram diluídos em água MiliQ autoclavada e esterilizados por filtração com filtro de 0,22µm (Vertical<sup>®</sup> Chromatography), acoplado em seringa de 1ml. Em seguida passaram por uma diluição seriada de 1:2 no caldo de cultura, diretamente nos poços de cada microplaca testada. A primeira concentração (1<sup>o</sup> poço) no final dos testes variou para cada microrganismo testado.

Todos antimicrobianos empregados, foram diluídos nos mesmos solventes utilizados nas preparações dos discos, em seguida, passaram por uma diluição seriada de 1:2 no caldo de cultura, diretamente nos poços de cada microplaca testada. A primeira concentração (1<sup>o</sup> poço) no final dos testes foi de 32ug/ml para as bactérias e 16ug/ml para os fungos (CLSI, 2013; NCCLS, 2012).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos de disco difusão foram realizados em triplicata, e os resultados apresentados como a média ± desvio padrão dos halos de inibição. As CIM's só foram determinadas quando os valores das triplicatas foram iguais.

## 5 RESULTADOS

Muitos estudos sobre a ação antimicrobiana de venenos animais têm sido realizados em todo o mundo, com o propósito de descobrir novos compostos biológicos que possam ser utilizados pela indústria farmacêutica. Os venenos de serpentes são uma rica fonte de compostos protéicos e não protéicos que apresentam inúmeras atividades farmacológicas. No entanto, venenos das espécies de serpentes *Bothrops leucurus* e *Crotalus durissus cascavella* ainda não são tão bem estudadas, no que diz respeito as suas atividades antifúngica e bactericida. Neste trabalho, os testes realizados com os venenos totais dessas espécies revelaram a capacidade de inibir o crescimento de algumas bactérias e fungos.

### 5.1 TESTE DE DISCO DIFUSÃO

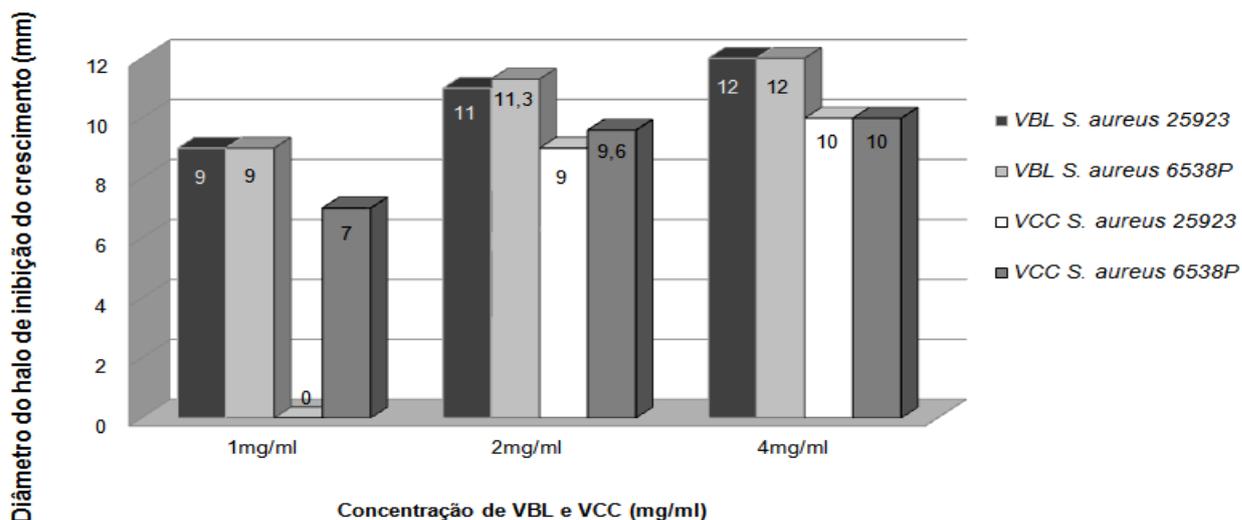
Inicialmente foram estabelecidas 3 diferentes concentrações (0,5mg/ml; 1mg/ml; 2mg/ml) dos venenos totais de *B. leucurus* (VBL) e de *C. d. cascavella* (VCC) a serem utilizadas no teste de disco difusão. A atividade antimicrobiana foi avaliada através da presença da zona de inibição após a inoculação em meio sólido, pelo método de disco difusão. O controle negativo não apresentou atividade antibacteriana indicando que o diluente dos venenos (água MiliQ) não interferiu na atividade dos venenos testados. Todas as cepas que apresentaram halo de inibição no ensaio de disco difusão foram submetidos ao teste de microdiluição para determinação da CIM.

Os testes com VBL apresentaram melhor resposta frente as cepas utilizadas do que os testes com VCC, observada através dos diâmetros dos halos de inibição, como mostram as Figuras 9 a 16.

#### 5.1.1 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, ATCC 6538P, SOMR 1 e SOMR 2)

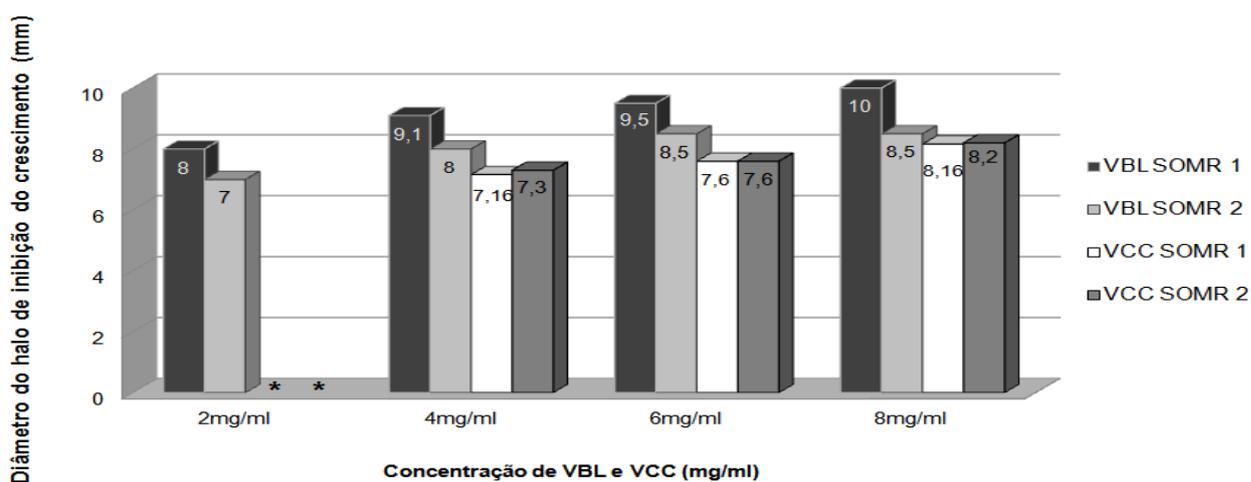
Os venenos VBL e VCC apresentaram halo de inibição do crescimento frente a todas as cepas de *S. aureus* testadas como mostram as Figuras 9 e 10. As barras representam o diâmetro dos halos encontrados para cada cepa distinta nas diferentes concentrações utilizadas.

**Figura 9** - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL e VCC em diferentes concentrações sobre *S. aureus* 25923 e 6538P



A ação do VBL foi semelhante entre a cepa 25923 e a 6538P, contudo o VCC mostrou melhor atividade contra 6538P quando comparada com sua ação sobre a 25923.

**Figura 10** - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL e VCC em diferentes concentrações sobre *S. aureus* SOMR 1 e 2



\* Teste não realizado nesta concentração com o VCC.

Em relação as cepas multirresistentes SOMR 1 e 2, o VBL agiu melhor sobre a SOMR 1 e o VCC sobre a SOMR 2. Nestas concentrações os halos apresentaram-se de forma dose-dependente para o VBL e VCC contra todas as cepas de *S.*

*aureus*. Os halos formados pelo VBL foram sempre maiores do que os halos formados por VCC nas concentrações utilizadas. O Quadro 3 apresenta os valores dos halos em milímetros  $\pm$  desvio padrão do VBL e VCC para as cepas de *S. aureus*.

**Quadro 3** - Atividade antibacteriana de VBL e VCC em diferentes concentrações contra as cepas de *S. aureus* utilizando o teste de disco difusão

Concentração do veneno no disco	Diâmetro do halo de inibição do crescimento (mm) $\pm$ desvio padrão							
	<i>S. aureus</i> 25923		<i>S. aureus</i> 6538P		<i>S. aureus</i> SOMR 1		<i>S. aureus</i> SOMR 2	
	VBL	VCC	VBL	VCC	VBL	VCC	VBL	VCC
1mg/ml	9*	Zero	9*	7*	NR	NR	NR	NR
2mg/ml	11*	9*	11,3 $\pm$ 0,58	9,6 $\pm$ 0,58	8*	NR	7*	NR
4mg/ml	12*	10*	12*	10*	9,1 $\pm$ 0,25	7,16 $\pm$ 0,29	8*	7,3 $\pm$ 0,58
6mg/ml	NR	NR	NR	NR	9,5 $\pm$ 0,50	7,6 $\pm$ 0,58	8,5*	7,6 $\pm$ 0,48
8mg/ml	NR	NR	NR	NR	10*	8,16 $\pm$ 0,29	8,5 $\pm$ 0,50	8,2 $\pm$ 0,50

Os valores dos halos representam a média das triplicatas de cada concentração  $\pm$  desvio padrão. \*Desvio padrão igual a zero. (NR) Teste não realizado nesta concentração.

O VBL e o VCC exibiram halos maiores para as cepas 25923 e 6538P em concentrações menores do que os halos formados nas cepas SOMR 1 e 2. A Cefoxitina (Cfx) foi usada como controle positivo e nas cepas 25923, 6538P e SOMR 2, apresentaram halo médio de inibição  $\geq$  22mm, indicado como 'sensível' pelo CLSI (2013), já SOMR 1 (halo=15,3mm) mostrou resistência. Embora os halos encontrados para a Cfx tenham sido maiores, os halos formados pelo VBL e VCC demonstram a presença de substâncias capazes de inibir o crescimento dessas cepas, ainda que seja com uma potência menor.

### 5.1.2 *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305)

O VBL apresentou halos de inibição a partir da concentração de 3mg/ml (Quadro 4). O VCC não inibiu o crescimento nas concentrações testadas, apenas exibiu uma linha tênue em volta do disco de difusão entre as concentrações de 4-8mg/ml, mas que não foi possível aferir o diâmetro, demonstrando assim sua baixa potência de atividade sobre esta cepa. A Cfx apresentou halo de inibição com média de 25,7mm, dentro dos critérios de sensibilidade do CLSI, (2013).

**Quadro 4** - Atividade antibacteriana do VBL em diferentes concentrações contra a cepa de *S. saprophyticus* utilizando o teste de disco difusão

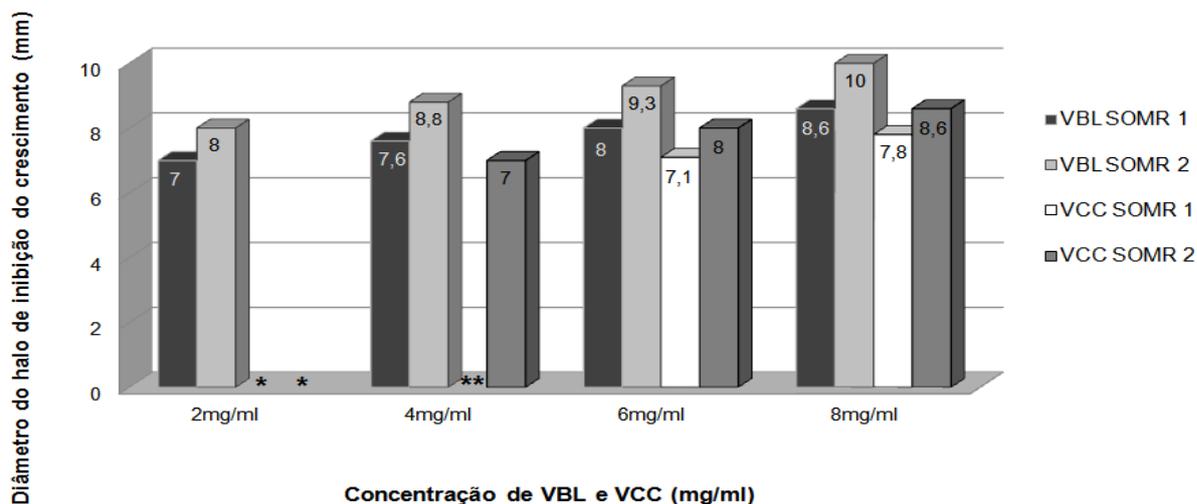
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>					
Concentração de VBL no disco	3mg/ml	4mg/ml	5mg/ml	7mg/ml	8mg/ml
Diâmetro do halo de inibição do crescimento $\pm$ desvio padrão	7mm*	7mm*	8mm*	8,25mm $\pm$ 0,35	9mm*

Os valores dos halos representam a média das triplicatas de cada concentração  $\pm$  desvio padrão.  
\*Desvio padrão igual a zero.

### 5.1.3 *Staphylococcus intermedius* (SOMR 1 e SOMR 2)

As cepas resistentes de *S. intermedius* foram susceptíveis a todas concentrações do VBL no teste de disco difusão. Na Figura 11, as barras representam a média dos diâmetros dos halos encontrados para o VBL e o VCC sobre as cepas SOMR 1 e 2. A média dos halos da Cfx para a cepa SOMR 1 foi de 20,8mm e de 39,8mm para a cepa SOMR 2, indicados com 'intermediário' e 'sensível' respectivamente (CLSI, 2013).

**Figura 11** - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL e VCC em diferentes concentrações



\* Teste não realizado nesta concentração com o VCC. \*\* Linha tênue em volta do disco de VCC, não foi possível aferir o diâmetro.

Da mesma maneira que foi observada para as cepas de *S. aureus*, na atividade inibitória contra as cepas de *S. intermedius*, os halos formados pelo VBL foram sempre maiores quando comparado com o VCC; o Quadro 5 apresenta os valores dos halos de inibição em milímetros  $\pm$  desvio padrão dos VBL e VCC.

**Quadro 5** - Atividade antibacteriana de VBL e VCC em diferentes concentrações contra as cepas de *S. intermedius* SOMR 1 e 2 utilizando o teste de disco difusão

Concentração do veneno no disco	Diâmetro do halo de inibição do crescimento (mm) ± desvio padrão			
	<i>S. intermedius</i> SOMR 1		<i>S. intermedius</i> SOMR 2	
	VBL	VCC	VBL	VCC
2mg/ml	7*	NR	8*	NR
4mg/ml	7,6 ± 0,48	Linha tênue	8,8 ± 0,26	7*
6mg/ml	8*	7,1 ± 0,25	9,3 ± 0,41	8*
8mg/ml	8,6 ± 0,58	7,8 ± 0,29	10*	8,6 ± 0,58

Os valores dos halos representam a média das triplicatas de cada concentração ± desvio padrão.

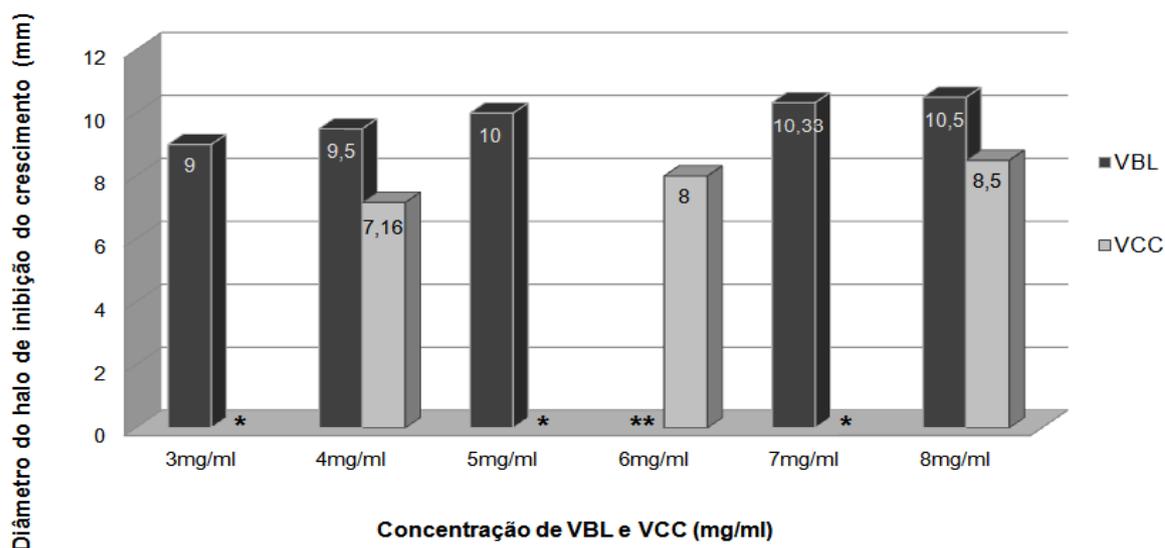
\*Desvio padrão igual a zero. (NR) Teste não realizado nesta concentração.

A ação de ambos os venenos foi mais acentuada sobre a cepa SOMR 2, apresentando halos maiores do que os encontrados na cepa SOMR 1.

#### 5.1.4 *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)

Os resultados encontrados para os halos formados pelo VBL foram maiores que os encontrados para o VCC nas mesmas concentrações e/ou em concentrações menores, como demonstrado na Figura 12. O controle positivo Imipenem (Imp) exibiu halo de 23,8mm, que corresponde a zona indicada como 'sensível' pelos estudos de Weinstein (2001) e Jones (2001).

**Figura 12** - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL e VCC na cepa *E. faecalis* em diferentes concentrações



\* Teste não realizado nesta concentração com o VCC. \*\* Teste não realizado nesta concentração com o VBL.

### 5.1.5 *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341)

Ao contrário do que foi observado nas outras cepas Gram-positivas, os venenos VBL e VCC não apresentaram inibição sobre a *K. rhizophila*, nas concentrações testadas.

### 5.1.6 *Escherichia coli* (ATCC 25922)

Os dois venenos demonstraram atividade para a *E. coli*. Os halos encontrados nos testes foram maiores com o uso do disco de VBL quando comparado com o disco de VCC, mesmo em concentrações menores de VBL (Quadro 6). O halo médio de inibição formado pela Cfx foi de 27,5mm, preconizado como 'sensível' ( $\geq 18\text{mm}$ ) (CLSI, 2013).

**Quadro 6** - Atividade antibacteriana de VBL e VCC em diferentes concentrações contra a cepa de *E. coli* utilizando o teste de disco difusão

Concentração do veneno no disco	Diâmetro do halo de inibição do crescimento (mm) $\pm$ desvio padrão	
	<i>E. coli</i>	
	VBL	VCC
3mg/ml	7*	NR
4mg/ml	8*	Linha tênue
5mg/ml	8*	NR
6mg/ml	NR	7*
7mg/ml	8,83 $\pm$ 0,29	NR
8mg/ml	NR	7,6 $\pm$ 0,58

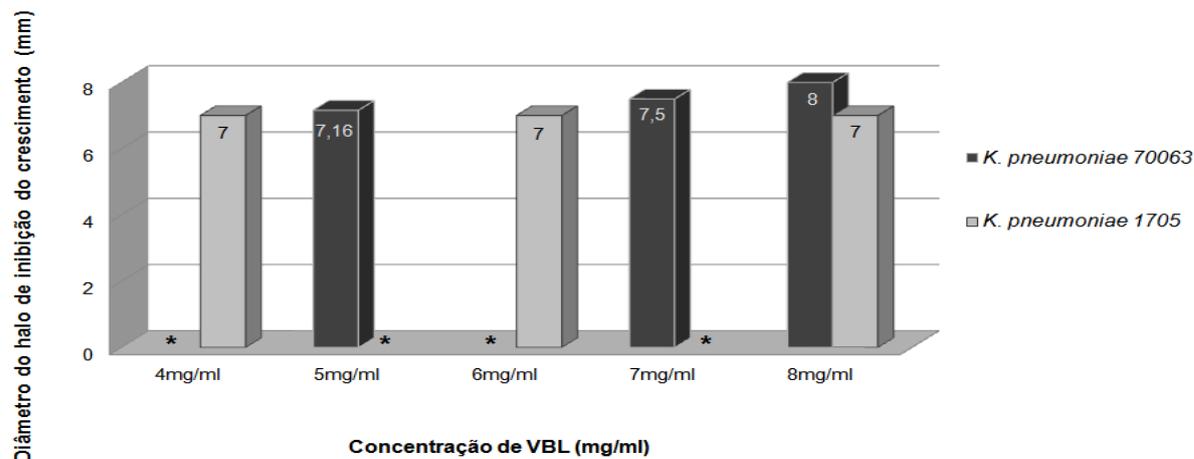
Os valores dos halos representam a média das triplicatas de cada concentração  $\pm$  desvio padrão.

\*Desvio padrão igual a zero. (NR) Teste não realizado nesta concentração.

### 5.1.7 *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 70063 e ATCCC 1705)

O VBL exibiu atividade para as duas cepas (Figura 13). Os halos medidos para a cepa 70063, com o uso do VBL, se apresentaram de forma dose-dependente, entretanto na cepa 1705, o halo se manteve constante mesmo com o aumento da concentração. O Imp apresentou uma halo de 23mm para cepa 70063 e de 14mm para cepa 1705, indicado como 'sensível' ( $\geq 23\text{mm}$ ) e 'resistente' ( $\leq 19\text{mm}$ ), respectivamente (CLSI, 2013).

**Figura 13** - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL nas cepas de *K. pneumoniae* 70063 e 1705 em diferentes concentrações



\* Teste não realizado nesta concentração com o VBL.

Observou-se apenas uma linha tênue em volta do disco de difusão na concentração de 8mg/ml do VCC para a cepa 70063; em relação a cepa 1705 uma linha tênue foi observada nas concentrações de 4 e 6mg/ml e um halo de 7mm na concentração de 8mg/ml.

### 5.1.8 *Pseudomonas aeruginosa* (SOMR 1, SOMR 2 e SOMR 3)

O VBL e o VCC foram capazes de inibir o crescimento das cepas multirresistentes *P. aeruginosa* SOMR 1, 2 e 3. A formação de halos de inibição, mesmo que discretos para a cepa SOMR 2, evidenciam o potencial de ação desses venenos em bactérias patogênicas multirresistentes (Quadro 7).

**Quadro 7-** Atividade antibacteriana de VBL e VCC contra as cepas de *P. aeruginosa* SOMR 1, 2 e 3 em diferentes concentrações utilizando o teste de disco difusão

Concentração do veneno no disco	Diâmetro do halo de inibição do crescimento (mm) ± desvio padrão					
	<i>P. aeruginosa</i> SOMR 1		<i>P. aeruginosa</i> SOMR 2		<i>P. aeruginosa</i> SOMR 3	
	VBL	VCC	VBL	VCC	VBL	VCC
2mg/ml	Zero	NR	NR	NR	NR	Zero
4mg/ml	8*	7*	Zero	Zero	Linha tênue	Linha tênue
5mg/ml	NR	NR	7,33 ± 0,58	NR	7,75 ± 0,35	NR
6mg/ml	NR	8*	NR	Linha tênue	NR	7*
8mg/ml	9,33 ± 0,58	8*	NR	7*	7*	7,16 ± 0,29

Os valores dos halos representam a média das triplicatas de cada concentração ± desvio padrão. \*Desvio padrão igual a zero. (NR) Teste não realizado nesta concentração.

Os halos formados pelo Imp foram de 21mm, 25mm e 27mm para SOMR 1, 2 e 3, respectivamente, todos indicados como 'sensível' ( $\geq 19\text{mm}$ ) pelo CLSI (2013).

### 5.1.9 *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028)

O VBL apresentou halos a partir da concentração de 3mg/ml (Quadro 8). O VCC apresentou uma linha tênue na concentração de 5mg/ml e um halo de 7mm na concentração de 7mg/ml. A Cfx apresentou um halo de 26,1mm indicado como 'sensível' ( $\geq 18\text{mm}$ ) (CLSI, 2013).

**Quadro 8** - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL em diferentes concentrações

<i>Salmonella typhimurium</i>				
Concentração de VBL no disco	3mg/ml	5mg/ml	7mg/ml	8mg/ml
Diâmetro do halo de inibição do crescimento $\pm$ desvio padrão	Linha tênue	7,6mm $\pm$ 0,58	8mm*	8mm*

Os valores dos halos representam a média das triplicatas de cada concentração  $\pm$  desvio padrão.  
\*Desvio padrão igual a zero.

### 5.1.10 *Vibrio sp.*

O VBL e VCC apresentaram atividade frente a todas cepas de *Vibrios*. É possível observar que os halos relacionados a ação do VBL foram sempre maiores quando comparados com os halos exibidos pelo VCC (Quadro 9.)

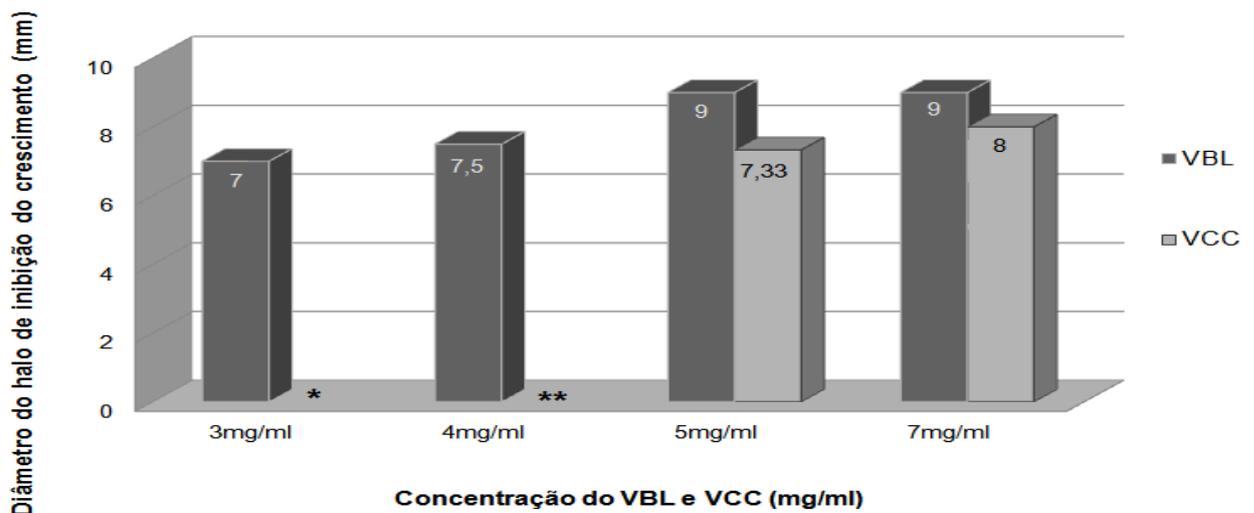
**Quadro 9** - Atividade antibacteriana de VBL e VCC contra as cepas de *Vibrios* em diferentes concentrações utilizando o teste de disco difusão

Concentração do veneno no disco	Diâmetro do halo de inibição do crescimento (mm) $\pm$ desvio padrão					
	<i>V. mimicus</i>		<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. vulnificus</i>	
	VBL	VCC	VBL	VCC	VBL	VCC
2mg/ml	NR	NR	10,16 $\pm$ 0,29	NR	Zero	Zero
3mg/ml	7*	Linha tênue	NR	8,33 $\pm$ 0,29	9*	7*
4mg/ml	7,5 $\pm$ 0,70	NR	11,16 $\pm$ 0,29	NR	10*	8*
5mg/ml	9*	7,33 $\pm$ 0,58	NR	9,5 $\pm$ 0,50	NR	NR
7mg/ml	9*	8*	NR	10,16 $\pm$ 0,29	NR	NR
8mg/ml	NR	NR	13 $\pm$ 1,0	NR	NR	NR

Os valores dos halos representam a média das triplicatas de cada concentração  $\pm$  desvio padrão.  
\*Desvio padrão igual a zero. (NR) Teste não realizado nesta concentração.

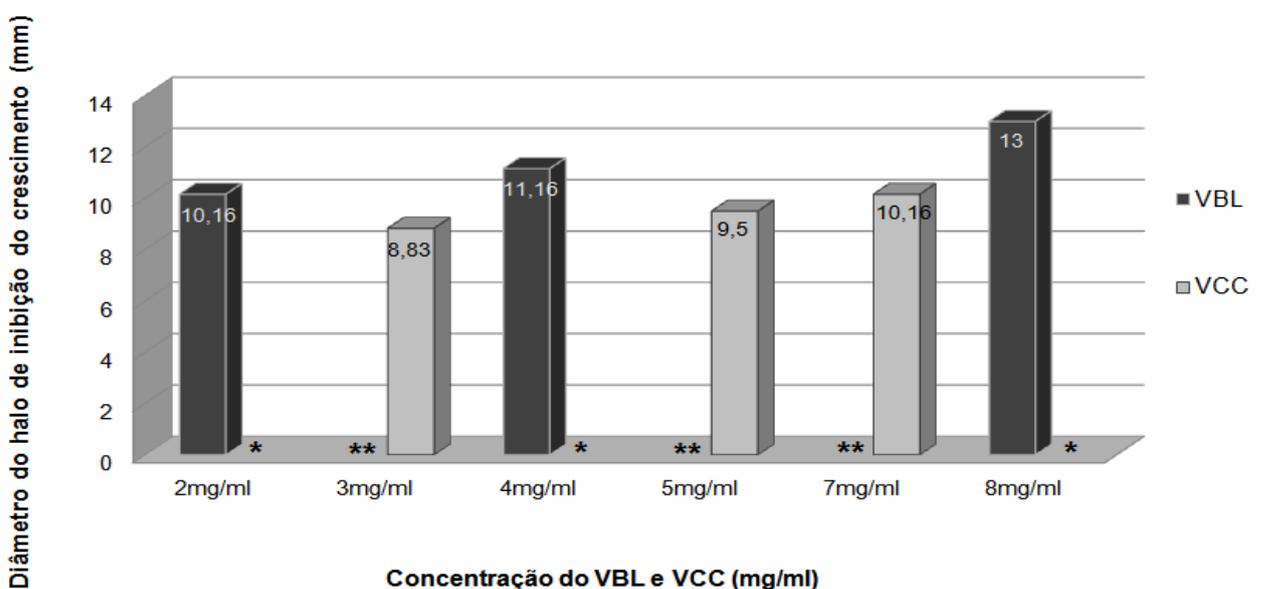
Nas Figuras 14, 15 e 16, as barras representam o diâmetro dos halos encontrados para cada cepa distinta nas diferentes concentrações utilizadas. A Cfx formou halo médio de 25mm para a *V. mimicus*, 29,8mm para a *V. parahaemolyticus* e 23,9mm para *V. vulnificus*, indicados como 'sensível' ( $\geq 18\text{mm}$ ) pelo CLSI (2005).

**Figura 14** - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL e VCC em diferentes concentrações sobre o *V. mimicus* (ATCC 33653)



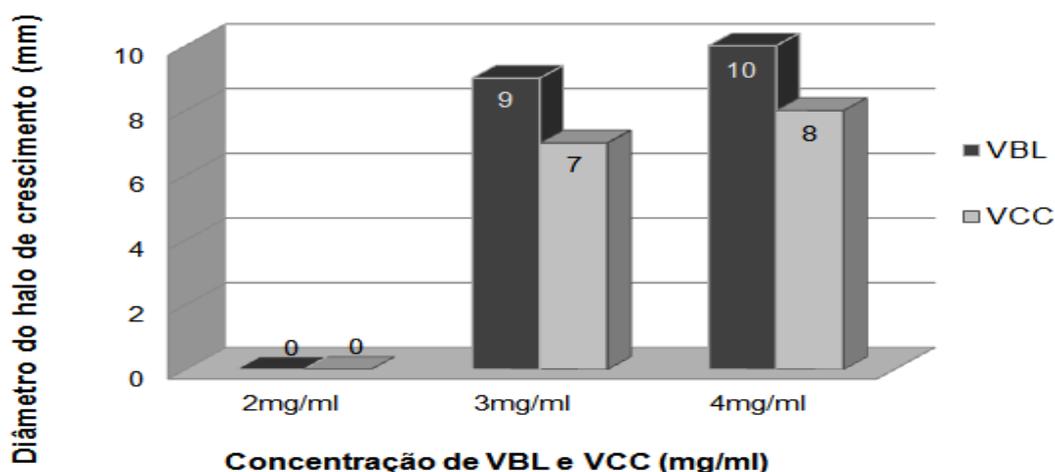
\* Linha tênue em volta do disco de VCC, não foi possível aferir o diâmetro. \*\* Teste não realizado nesta concentração com o VCC.

**Figura 15** - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL e VCC em diferentes concentrações sobre *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802)



\* Teste não realizado nesta concentração com o VCC. \*\* Teste não realizado nesta concentração com o VBL.

**Figura 16** - Diâmetro dos halos de inibição formados pelo VBL e VCC em diferentes concentrações sobre o *V. vulnificus* (ATCC 27562)



#### 5.1.11 *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048)

O VCC não apresentou inibição sobre a *E. aerogenes*, até a concentração de 7mg/ml. Nos testes com VBL, pode-se observar, a partir da concentração de 5mg/ml, uma linha tênue em volta do disco de difusão. O Imp apresentou um halo de 20,6mm na zona indicada como 'intermediário' (20-22mm) (CLSI, 2013).

#### 5.1.12 Leveduras

O VBL e VCC não apresentaram inibição sobre as linhagens de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* em nenhuma das concentrações testadas (1mg/ml; 2mg/ml; 4mg/ml e 8mg/ml). O controle positivo Anfotericina B (AnfB) apresentou halos de 17mm, 15mm, 20mm e 17mm respectivamente.

### 5.2 TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

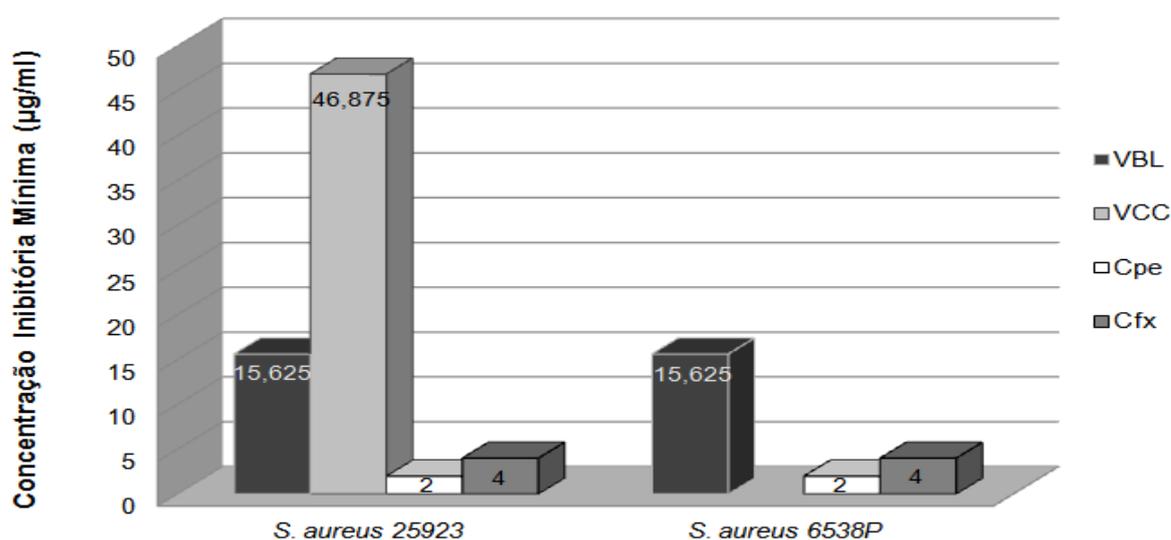
A partir dos resultados encontrados no ensaio de disco difusão, realizou-se o teste de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Durante a realização dos testes, observou-se uma diferença nas respostas frente aos microrganismos quando comparadas aos resultados do teste de disco difusão. Dos 23 microrganismos submetidos ao teste de microdiluição em caldo, apenas em 8 deles foi possível determinar a CIM do VCC e para o VBL não foi

possível determinar este valor para 9 microrganismos. A CIM dos antibióticos do controle estão de acordo com os critérios estabelecidos nos protocolos M45-P e M100-S23 (CLSI, 2005, 2013). Os menores valores de CIM encontrados na microdiluição em caldo representam os melhores resultados, o VBL apresentou os menores valores para todas as cepas quando comparado ao VCC. Para alguns microrganismos foi possível determinar a concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM).

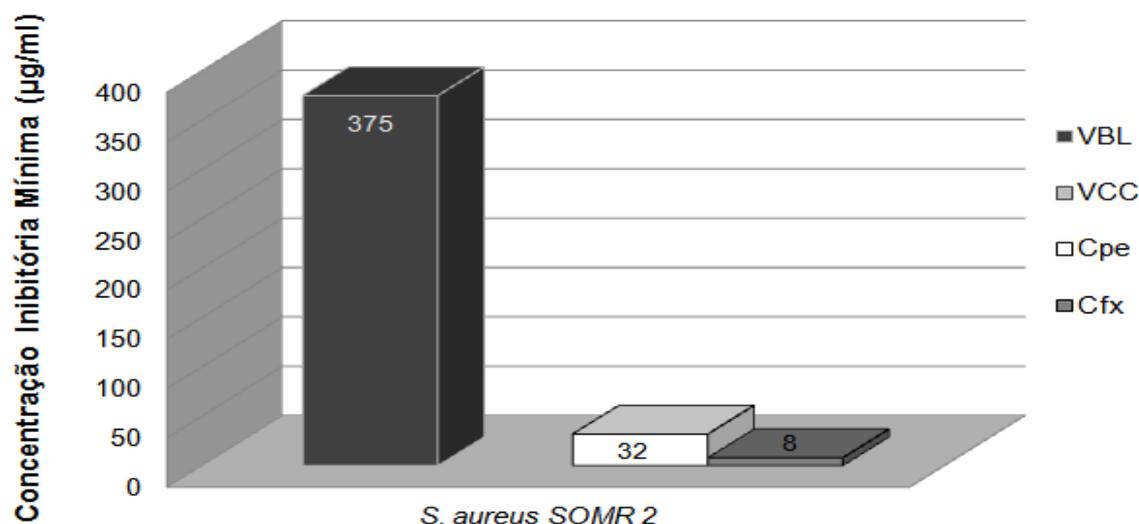
### 5.2.1 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, ATCC 6538P, SOMR 1 e SOMR 2)

Através do teste de microdiluição em caldo a CIM do VBL foi determinada para 3 cepas de *S. aureus* (Figura 17 A e B). Os valores encontrados para *S. aureus* 25923 e 6538P foram iguais a 15,625µg/ml para ambas as cepas, e de 375µg/ml para cepa resistente SOMR 2. O VBL apresentou uma ação 24 vezes mais potente sobre as cepas 25923 e 6538P quando comparada a cepa SOMR 2. As cepas 25923, 6538P foram sensíveis aos controles Cpe ( $\leq 4$  µg/ml) e Cfx ( $\leq 4$  µg/ml) e as cepas SOMR 1 e 2 foram resistentes (Cpe e Cfx  $\geq 8$ µg/ml) (CLSI, 2013). Não foi possível determinar a CIM do VCC para as cepas de *S. aureus* 6538P, SOMR 1 e SOMR 2, nem a CIM do VBL para a cepa *S. aureus* SOMR 1, nas concentrações estudadas. A cepa 25923 apresentou  $CBM_{VBL}=15,625\mu\text{g/ml}$  e  $CBM_{VCC}=93,75\mu\text{g/ml}$  e a cepa 6538P  $CBM_{VBL}=31,25\mu\text{g/ml}$

**Figura 17 A** - Concentração inibitória mínima do VBL, VCC, Cpe e Cfx sobre as cepas de *S. aureus* 25923 e 6538P



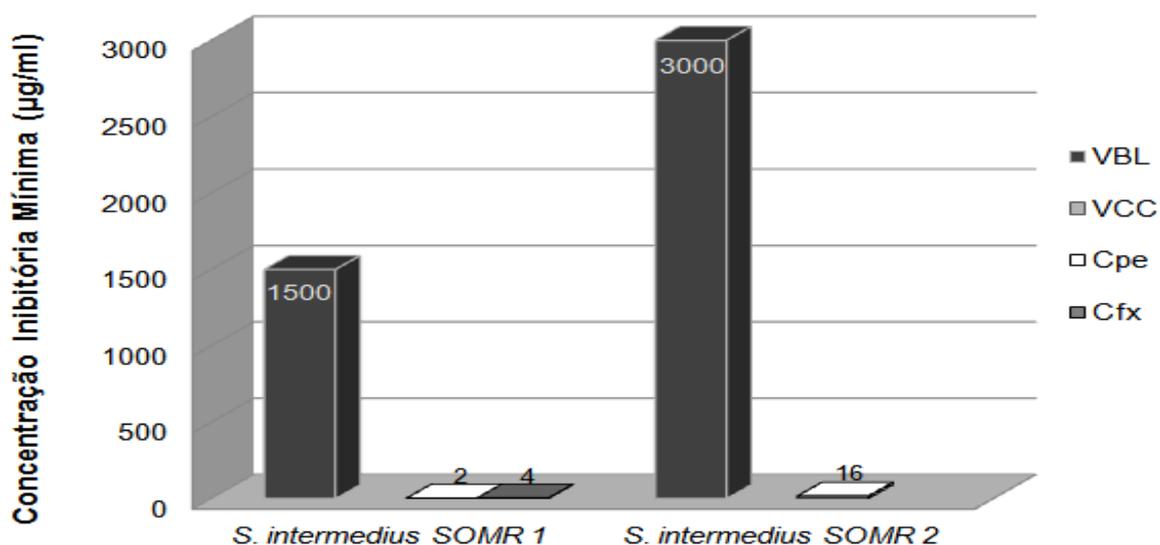
**Figura 17 B** - Concentração inibitória mínima do VBL, VCC, Cpe e Cfx sobre as cepas de *S. aureus* SOMR 2



### 5.2.2 *Staphylococcus intermedius* (SOMR 1 e SOMR 2)

O VBL exibiu uma CIM de 1500µg/ml e 3000µg/ml para as cepas SOMR 1 e 2 respectivamente (Figura 18), demonstrando uma capacidade de inibição duas vezes maior para a SOMR 1 em relação à SOMR 2. A cepa SOMR 2 foi resistente a Cpe ( $\geq 8\mu\text{g/ml}$ ) e na maior concentração utilizada de Cfx (32µg/ml). Não foi possível determinar a CIM do VCC para as duas cepas. A cepa SOMR 1 apresentou  $\text{CBM}_{\text{VBL}}=3000\mu\text{g/ml}$ .

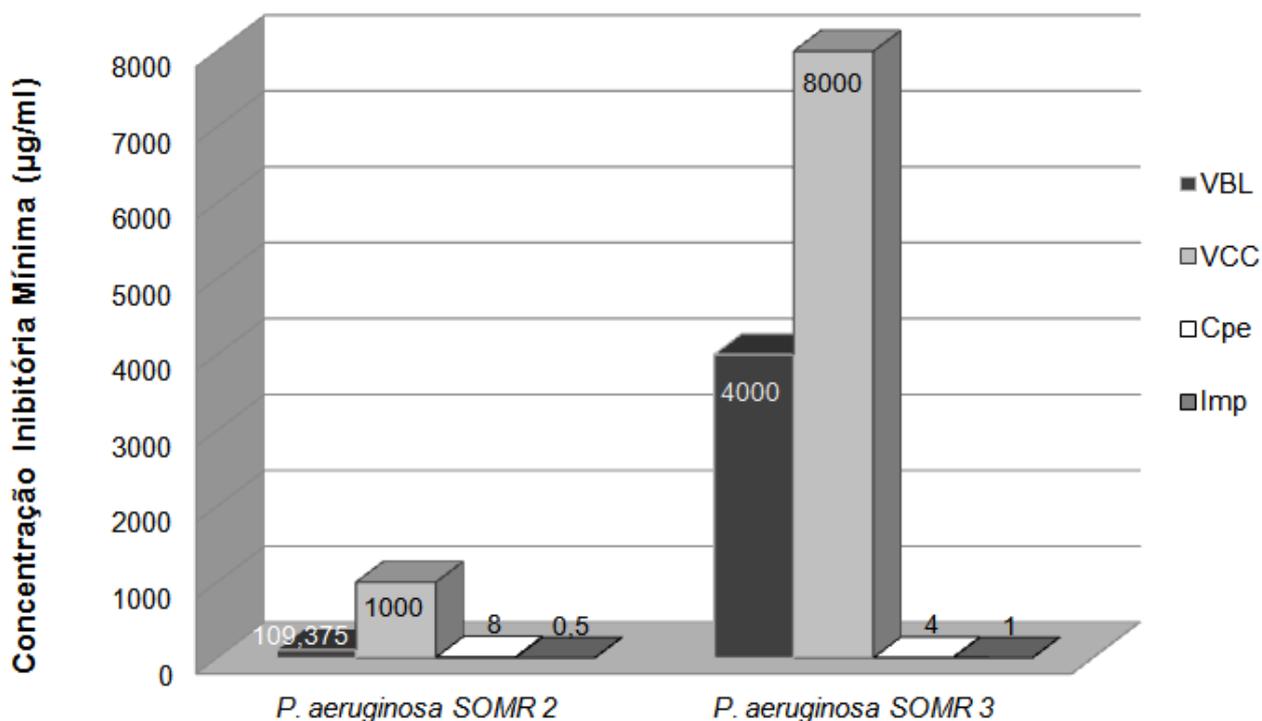
**Figura 18** - Concentração inibitória mínima do VBL, VCC, Cpe e Cfx sobre as cepas de *S. intermedius* SOMR 1 e 2



### 5.2.3 *Pseudomonas aeruginosa* (SOMR 1, SOMR 2 e SOMR 3)

Todas as cepas de *P. aeruginosa* foram submetidas ao teste de microdiluição pois apresentaram halos de inibição no teste de disco difusão, mesmo que discretos. Contudo, só foi possível estabelecer a CIM para as cepas SOMR 2 e 3 (Figura 19). A *P. aeruginosa* SOMR 1 apresentou resistência para o VBL e VCC e sensibilidade 'intermediária' (CLSI, 2013) para o Imp (CIM=4 $\mu$ g/ml) e a Cpe (CIM=16 $\mu$ g/ml). As cepas SOMR 2 e 3 foram sensíveis aos controles (Imp  $\leq$  2 $\mu$ g/ml; Cpe  $\leq$  8 $\mu$ g/ml). O VBL agiu com potência maior que 36,5 vezes na cepa SOMR 2 comparada com a ação sobre SOMR 3. O VBL foi mais potente que o VCC nas duas cepas, com ação aproximadamente de 9,15 vezes na cepa SOMR 2 e de duas vezes em SOMR 3. A cepa SOMR 2 apresentou CBM<sub>VBL</sub>=109,375 $\mu$ g/ml e CBM<sub>VCC</sub>=1000 $\mu$ g/ml, a cepa SOMR 3 CBM<sub>VBL</sub>=8000 $\mu$ g/ml.

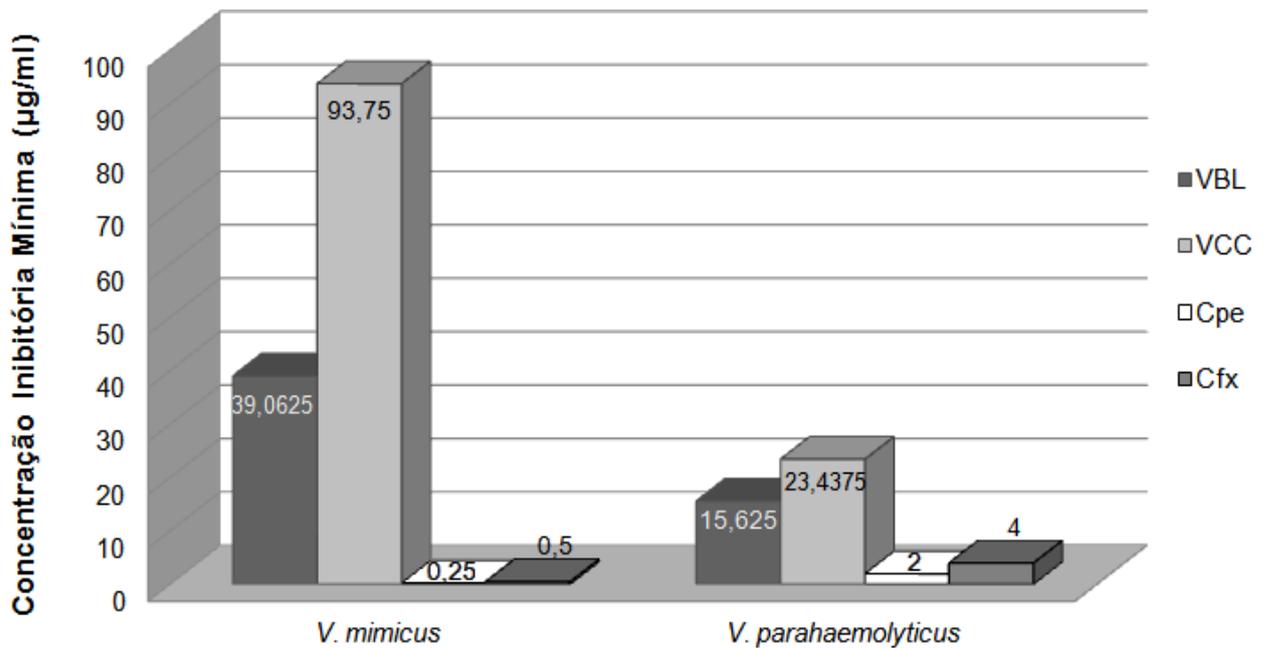
**Figura 19** - Concentração inibitória mínima do VBL, VCC, Cpe e Imp sobre as cepas de *P. aeruginosa* SOMR 2 e 3



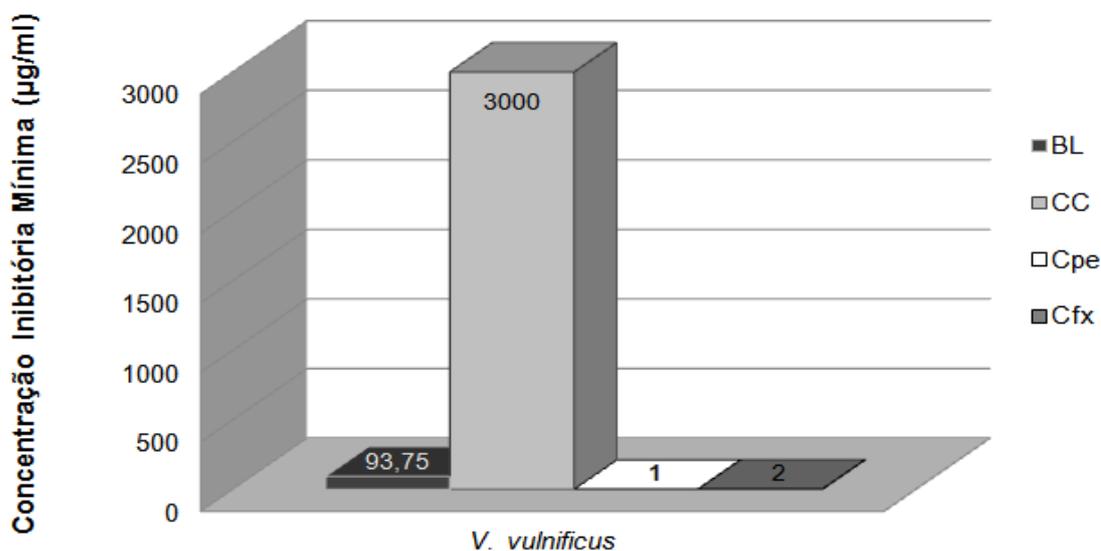
### 5.2.4 *Vibrio* sp

Todas as espécies de *Vibrios* submetidas ao teste de microdiluição tiveram a CIM determinada, como mostra a Figura 20 A e B. A resposta do VBL foi 32 vezes mais potente do que o VCC para o *V. vulnificus* ( $CIM_{VBL}=93,75\mu\text{g/ml}$ ), 2,4 para o *V. mimicus* ( $CIM_{VBL}=39,0625\mu\text{g/ml}$ ) e 1,5 para *V. parahaemolyticus* ( $CIM_{VBL}=15,625\mu\text{g/ml}$ ). O VBL e o VCC demonstraram melhor atividade sobre o *V. parahaemolyticus* com os menores valores de inibição encontrados,  $CIM_{VBL}=15,625\mu\text{g/ml}$  e  $CIM_{VCC}=23,4375\mu\text{g/ml}$ . Todas as cepas apresentaram sensibilidade aos controles Cpe ( $\leq 8\mu\text{g/ml}$ ) e Cfx ( $\leq 8\mu\text{g/ml}$ ). O *V. mimicus* apresentou  $CBM_{VBL/VCC}=93,75\mu\text{g/ml}$ , o *V. parahaemolyticus*  $CBM_{VBL}=62,5\mu\text{g/ml}$  e  $CBM_{VCC}=39,0625\mu\text{g/ml}$ , o *V. vulnificus*  $CBM_{VCC}=3000\mu\text{g/ml}$ .

**Figura 20 A** - Concentração inibitória mínima do VBL, VCC, Cpe e Cfx sobre *V. mimicus* e *V. parahaemolyticus*



**Figura 20 B** - Concentração inibitória mínima do VBL, VCC, Cpe e Cfx sobre *V. vulnificus*



### 5.2.5 Cepas Gram-positivas e Gram-negativas

As cepas Gram-positivas *S. saprophyticus* e *E. faecalis* e as Gram-negativas *E. coli*, *K. pneumoniae* (70063 e 1705) e a *S. typhimurium*, foram submetidas ao ensaio de microdiluição em caldo. Embora tenham apresentado halos de inibição no teste de disco difusão, não foi possível determinar a CIM's para estes microrganismos, com nenhum dos venenos testados.

Embora o VBL tenha mostrado apenas uma linha tênue em volta do disco no teste com a *E. aerogenes* (Gram-negativa), não foi possível determinar a CIM no teste de microdiluição em caldo.

O Quadro 10 apresenta todos os resultados do teste de microdiluição em caldo para as bactérias. O VBL agiu em duas cepas Gram-positivas, três cepas resistentes Gram-positivas, três Gram-negativas e duas resistentes Gram-negativas; o VCC agiu em uma cepa Gram-positiva, três Gram-negativas e duas resistentes Gram-negativas.

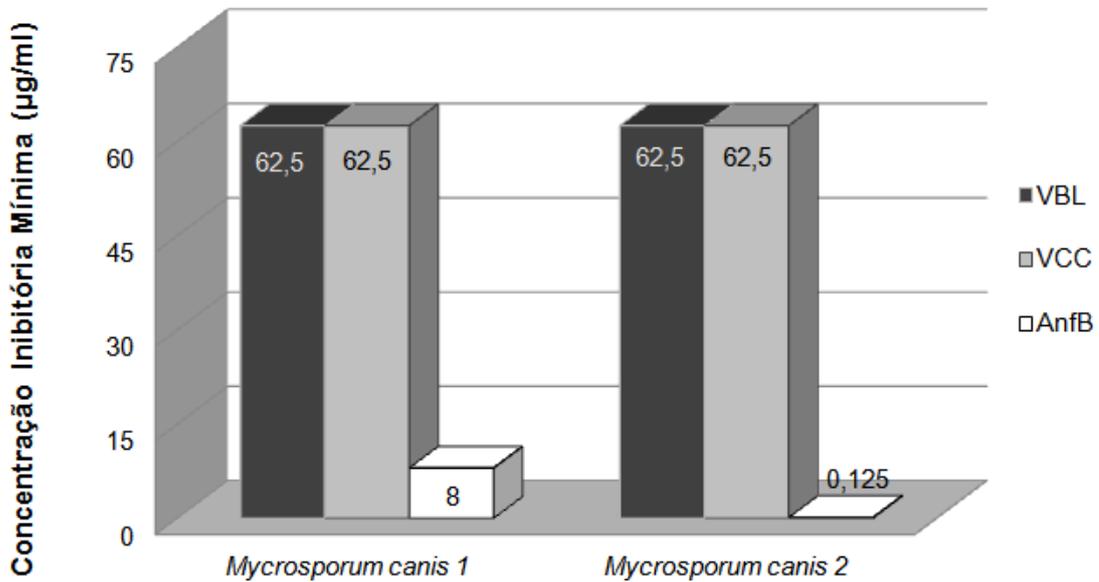
**Quadro 10** - Concentração inibitória mínima (CIM) do VBL, VCC, Cpe, Cfx e Imp determinados através do teste de microdiluição em caldo sobre cepas bacterianas

Microrganismos		Concentração Inibitória Mínima (µg/ml)			
		VBL	VCC	Cpe	Outros
Gram-positivas	<i>S. aureus</i> 25923	15,625	46,875	2	Cfx=4
	<i>S. aureus</i> 6538P	15,625	Não houve inibição	2	Cfx=4
	<i>S. saprophyticus</i>	Não houve inibição	Não houve inibição	4	Cfx=8
	<i>E. faecalis</i>	Não houve inibição	Não houve inibição	16	Imp=0,5
Gram-negativas	<i>E. coli</i>	Não houve inibição	Não houve inibição	0,25	Cfx=2
	<i>K. pneumoniae</i> 70063	Não houve inibição	Não houve inibição	0,25	Imp=0,25
	<i>K. pneumoniae</i> 1705	Não houve inibição	Não houve inibição	Não houve inibição	Imp=16
	<i>V. vulnificus</i>	93,75	3000	1	Cfx=2
	<i>V. parahaemolyticus</i>	15,625	23,4375	2	Cfx=4
	<i>V. mimicus</i>	39,0625	93,75	0,25	Cfx=0,5
	<i>E. aerogenes</i>	Não houve inibição	-----	0,5	Imp=4
	<i>S. typhimurium</i>	Não houve inibição	Não houve inibição	0,25	Cfx=1
Gram-positivas multirresistentes	<i>S. aureus</i> SOMR 1	Não houve inibição	Não houve inibição	16	Cfx - não houve inibição
	<i>S. aureus</i> SOMR 2	375	Não houve inibição	32	Cfx=8
	<i>S. intermedius</i> SOMR 1	1500	Não houve inibição	2	Cfx=4
	<i>S. intermedius</i> SOMR 2	3000	Não houve inibição	16	Cfx - não houve inibição
Gram-negativas multirresistentes	<i>P. aeruginosa</i> SOMR 1	Não houve inibição	Não houve inibição	16	Imp=4
	<i>P. aeruginosa</i> SOMR 2	109,375	1000	8	Imp=0,5
	<i>P. aeruginosa</i> SOMR 3	4000	8000	8	Imp=1

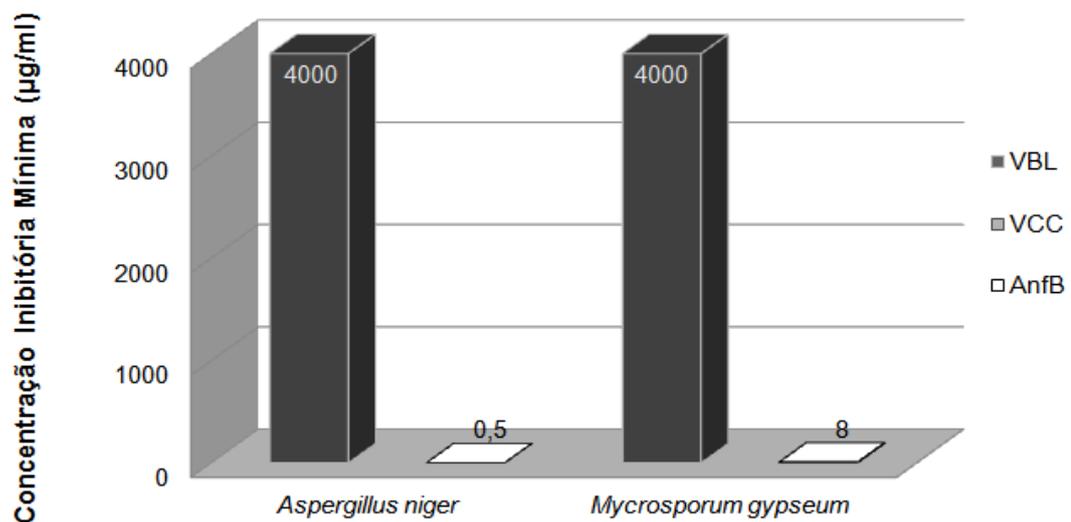
### 5.2.6 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos *Aspergillus niger*, *Microsporium canis 1*, *Microsporium canis 2* e *Microsporium gypseum*, foram submetidos apenas ao teste de microdiluição. Como pode-se observar na Figura 21 a CIM para o VBL foi estabelecida para todos os fungos filamentosos do teste. O *A. niger* e *M. gypseum* apresentaram  $CIM_{VBL}=4000\mu\text{g/ml}$  e o *M. canis 1* e 2  $CIM_{VBL/VCC}=62,5\mu\text{g/ml}$ .

**Figura 21 A** - Concentração inibitória mínima do VBL, VCC e AnfB sobre *M. canis 1* e 2



**Figura 21 B** - Concentração inibitória mínima do VBL e AnfB sobre *A. niger* e *M. gypseum*



Não foi possível determinar a CIM do VCC para o *A. niger* e o *M. gypseum* na concentração inicial de 8000µg/ml. O Quadro 11 apresenta todos os resultados do teste de microdiluição em caldo para os fungos filamentosos.

**Quadro 11** - Concentração inibitória mínima (CIM) do VBL, VCC e AnfB determinados através do teste de microdiluição em caldo sobre fungos filamentosos

Microrganismos	Concentração Inibitória Mínima (µg/ml)		
	VBL	VCC	AnfB
<i>Aspergillus niger</i>	4000	Não houve inibição	0,5
<i>Mycrosporum canis 1</i>	62,5	62,5	8
<i>Mycrosporum canis 2</i>	62,5	62,5	0,125
<i>Mycrosporum gypseum</i>	4000	Não houve inibição	8

## 6 DISCUSSÃO

Muitos trabalhos científicos com substâncias de fontes naturais têm sido realizados no sentido de encontrar novos compostos biológicos que possam ser utilizados tanto na descoberta de novos fármacos, quanto na melhoria de metodologias de diagnóstico, em modelos em estudos de processos na biologia celular e na produção de drogas. Os venenos de serpentes são constituídos por uma mistura complexa de substâncias orgânicas e inorgânicas e exibem uma vasta gama de atividades farmacológicas, inclusive atividades antimicrobianas. Até 2010, mais de 65% dos antibacterianos e mais 13% dos antifúngicos clinicamente utilizados, foram oriundos de produtos naturais ou os seus derivados semissintéticos (NEWMAN; CRAGG, 2012). Devido ao seu elevado grau de especificidade do alvo, toxinas têm sido cada vez mais utilizadas como instrumentos farmacológicos e como protótipos para o desenvolvimento de drogas (CALVETE et al., 2009).

No presente trabalho foram testados os venenos totais de *Bothrops leucurus* e *Crotalus durissus cascavella* na tentativa de avaliar e comparar a atividade antimicrobiana existente entre eles. Os testes de disco difusão e microdiluição em caldo permitem observar se os venenos totais são capazes ou não de exercer atividade antimicrobiana, e com a determinação da CIM verificar a potência deste efeito nos microrganismos. Ao testar o veneno total das duas serpentes contra diferentes microrganismos, verificou-se um amplo espectro de atividade, estes agiram contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Os testes de sensibilidade são os primeiros passos para avaliar o potencial biotecnológico de produtos naturais que possuem atividade antimicrobiana.

Neste estudo o VBL e VCC mostraram atividade frente a maioria das cepas de bactérias testadas pelo método de disco difusão, mesmo que bastante discreta para algumas. A *K. rhizophila* que não sofreu a ação dos venenos e a *E. aerogenes* que não apresentou inibição após o uso do VCC. As leveduras do gênero *Candida sp.* não sofreram inibição com o uso dos dois venenos. Torres e colaboradores (2010b), também não obtiveram resultado utilizando o veneno de *B. leucurus* contra a *Candida albicans*. Observou-se que nas concentrações utilizadas nos disco de difusão os halos apresentavam-se de forma dose-dependente para a maioria das

cepas e que os halos formados pelo VBL foram sempre maiores quando comparados com os halos formados pelo VCC. Este fato poderia indicar a presença de uma ou mais substâncias no VBL que promovem uma maior inibição do crescimento, ou que uma mesma substância esteja presente em maior quantidade no VBL e menor em VCC, ou ainda que substâncias diferentes agem em sinergismo potencializando a inibição pelo VBL.

Nas cepas multirresistentes de *S. intermedius* SOMR 1 e 2 observou-se que o VBL apresentou atividade de inibição, porém em concentrações muito elevadas ( $CIM_{VBL}=1500\mu\text{g/ml}$  e  $3000\mu\text{g/ml}$ ) quando comparada com os controles e os valores de CIM das outras cepas de *Staphylococcus* testadas (Figura 17 e Quadro 10). É importante considerar que se tratam de cepas multirresistentes e os valores da CIM encontrados correspondem ao uso do veneno total. Talvez, com o fracionamento do VBL, alguma de suas frações possa apresentar um resultado mais efetivo. Deve-se salientar que nem todos os componentes do veneno de serpentes tem características tóxicas, ou seja, apresentam algum risco ao organismo. Ainda assim, mesmo que a(s) substância (s) com atividade seja tóxica, existem mecanismos de atenuação deste efeito (CLISSA, 1997; FERREIRA-JÚNIOR et al., 2005). Desta forma, a ação do VBL é um importante achado, considerando que esta bactéria é uma importante causa de infecções de feridas, otite externa e média, cistite, doença ocular e respiratórias em animais de pequeno porte, principalmente em cães (WERCKENTHIN et al., 2001; GUARDABASSI; LOEBER; JACOBSON, 2004; OLIVEIRA et al., 2006; KELESIDIS; TSIODRAS, 2010; BLUNT; VAN VUUREN; PICARD, 2013).

O VBL mostrou inibição nos dois testes realizados e o VCC apenas no teste de disco difusão, pode-se sugerir que o componente com atividade antimicrobiana no VCC foi modificado ou perdeu sua atividade. Algumas frações dos venenos tem componentes mais instáveis, sensíveis a variação de temperatura ou mesmo à combinação com outras substância. Existem diversos estudos com variadas frações de venenos de serpentes, um exemplo é a enzima L-aminoácido oxidase (LAAO) que possui capacidade comprovada de inibir o crescimento de bactérias. Alguns estudos com LAAO's utilizaram as mesmas cepas deste trabalho, a exemplo de: LAAO de *C. d. cumanensis* e de *B. moojeni* em *S. aureus* ATCC25923 (VARGAS et

al., 2013; STABELI et al., 2007); LAAO de *B. pauloensis* e *Ophiophagus hannah* em *S. aureus* ATCC1556 e *S. aureus*, respectivamente (RODRIGUES et al., 2009; LEE et al., 2011); LAAO de *B. atrox* e *B. mattogrosensis* em *S. aureus* ATCC29213 (PAIVA et al., 2011; OKUBO et al., 2012); LAAO de *B. alternatus* e *B. moojeni* em *E. coli* ATCC 29648 (STABELI et al., 2004; STABELI et al., 2007), LAAO de *B. pirajai*, *B. pauloensis* e *O. hannah* em *E. coli* ATCC 25922 (IZIDORO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2009; LEE et al., 2011); LAAO de *B. mattogrosensis* em *E. coli* ATCC8739, *E. faecalis* ATCC 12953 e *K. pneumoniae* ATCC13885 (OKUBO et al., 2012); LAAO de *O. hannah* em *K. pneumoniae* (LEE et al., 2011); LAAO de *B. pirajai* e *B. moojeni* em *P. aeruginosa* ATCC27853 e ATCC 15442 (IZIDORO et al., 2006; STABELI et al., 2007); LAAO de *B. moojeni* e *B. mattogrosensis* em *S. typhimurium* ATCC14028 (STABELI et al., 2007; OKUBO et al., 2012).

A LAAO pode ter sua atividade alterada em presença da catalase (ALVES, 2007; RODRIGUES et al., 2009; GUO et al., 2012; VARGAS et al., 2013) e no congelamento (CURTI; MASSEY; ZMUDKA, 1968), contudo sabe-se que existem LAAO's que não sofrem inativação por congelamento a exemplo das LAAOs das serpentes *O. hannah* (LEE et al., 2011), *Agkistrodon halys blomhoffii* e *Naja naja oxiana* (GUO et al., 2012). São necessários a realização de mais estudos, tanto com o VCC quanto com o VBL, para investigar se o componente responsável pela ação é uma LAAO e também se ocorre alteração no processo de congelamento/descongelamento.

No teste inicial todas as cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* (SOMR 1, 2 e 3) apresentaram halo de inibição para os venenos testados, contudo, no teste de microdiluição em caldo apenas para a *P. aeruginosa* SOMR 1 não houve a determinação das CIM's para ambos os venenos. Não podemos afirmar qual mecanismo de resistência cada uma delas possui, embora possamos sugerir que na *P. aeruginosa* SOMR 1 esteja ligado a parede celular (devido a perda ou expressão reduzida de porinas), pois os controles utilizados nos testes foram antibióticos que agem nesta estrutura e somente esta cepa apresentou valores de CIM classificada como de sensibilidade 'intermediária' (CLSI, 2013). Outra hipótese está relacionada ao tipo de substâncias presentes no VBL e VCC com ação sobre esta bactéria. Apenas a cepa SOMR 1 apresentou mudança no padrão da resposta

entre os dois testes para os dois venenos, com isso podemos concluir que são substancias diferentes que agem neste grupo, uma vez que a SOMR 2 e 3 continuaram exibindo resposta.

Ao comparar a ação do VBL sobre as cepas de *S. aureus* (25923, 6538P, SOMR 1 e 2), percebemos que nas cepas 25923 e 6538P os valores de CIM encontrados são iguais ( $CIM_{VBL}=15,625\mu\text{g/ml}$ ), nas cepas multirresistentes o VBL só manteve sua capacidade de ação em SOMR 2 em uma concentração 24 vezes maior do que a observada para a 25923 e a 6538P. Isto pode ser devido a composição lipídica das membranas, talvez o mecanismo de resistência da SOMR 2 seja uma modificação na parede celular com alteração de cargas, o aumento da positividade impediria uma maior quantidade de ligações da substância com atividade (BROGDEN, 2005; EPAND; EPAND, 2010), isso pode ocorrer com as PLA2s por exemplo, que se ligam a lipídios com carga negativa (aniônico) (FOREMAN-WYKERT et al., 1999; DEVINE; HANCOCK, 2002; BARBOSA et al., 2005).

Os valores de  $CIM_{VBL}=15,625\mu\text{g/ml}$  e  $CIM_{VCC}=46,875\mu\text{g/mL}$  determinados no teste de microdiluição para a cepa *S. aureus* 25923, nos revela que estes venenos totais tem um potencial de atividade considerável quando comparados com os valores encontrados em outros estudos que utilizaram frações obtidas de outros venenos para esta mesma cepa, a exemplo de uma lectina isolada de *B. pauloensis* ( $CIM=31,25\mu\text{g/mL}$ ) (CASTANHEIRA et al., 2013); uma PLA2 de *Porthidium nasutum* ( $CIM=32\mu\text{g/mL}$ ) (VARGAS et al., 2012); uma LAAO de *C. d. cumanensis* ( $CIM=8\mu\text{g/mL}$ ) (VARGAS et al., 2013) e dos venenos totais de *Calloselasma rhodostoma* ( $CIM=125\mu\text{g/mL}$ ) e *O. hannah* ( $CIM=250\mu\text{g/mL}$ ) (SAN et al., 2010).

Nunes e colaboradores (2011) também utilizaram a cepa de *S. aureus* 6538P em testes de atividade biológica e encontraram o valor de CIM, para uma lectina purificada de *B. leucurus*, de  $31,25\mu\text{g/ml}$ , em nosso trabalho realizamos os testes com o veneno total da mesma serpente e encontramos a  $CIM_{VBL}=15,625\mu\text{g/ml}$ . O veneno total exibiu um valor de CIM duas vezes menor para esta cepa, dando indícios que existe mais de uma substância capaz de agir em sinergismo na cepa *S. aureus* 6538P. Além disso, que a substância que possui maior atividade nesta cepa não deve ser a lectina.

Além das espécies Gram-negativas *P. aeruginosa* SOMR 2 e 3 e a Gram-positiva *S. aureus* 25923, as espécies de *Vibrio* também apresentaram valores de CIM com o uso do VCC. É possível observar na Figura 20 que foram necessárias concentrações menores do VBL em relação ao VCC para exibir inibição nas cepas de *Vibrio*. Os valores das CIM's encontradas para as espécies de *Vibrio* neste trabalho, estão numa faixa menor de valores encontrados por alguns autores para outras bactérias Gram-negativas, a exemplo da *Burkholderia pseudomallei* (CIM=248µg/ml - *Daboia russelli siamensis*) (SAMMY et al., 2006); *Citrobacter freundii* (CIM=100µg/ml - *B. jararacussu*), *Shigella flexeneri* e *Moraxella catarrhalis* não sofreram inibição na C=400µg/ml - *B. jararacussu* (COSTA, 2012) e *Proteus mirabilis* (CIM=256µg/ml - *B. matogrosensis*) (OKUBO et al., 2012). Os valores encontrados para os *Vibrios* se relacionam com o uso do veneno total e os exemplos citados utilizam frações purificadas de outros venenos, ainda assim estas frações exibem um resultado de atividade com potência inferior quando comparado com o VBL.

No teste de disco difusão para as cepas Gram-positivas *S. saprophyticus* e *E. faecalis* e as Gram-negativas *E. coli*, *K. pneumoniae* (70063 e 1705) e a *S. typhimurium*, o VBL e VCC apresentaram halo de inibição demonstrando que estes venenos possuem atividade frente a estes microrganismos. Porém, no teste de microdiluição em caldo não foi possível determinar as CIM's destes venenos. A composição dos venenos com base em membros das famílias típicas de proteínas e suas quantidades relativas é o que dá a cada veneno de serpente suas propriedades únicas e características (FOX, 2013), com a capacidade ou não de exercer atividade antimicrobiana.

No nosso estudo o VBL não apresentou halo de inibição no teste de disco difusão para as cepas de *Candida*, semelhante ao observado por Torres e colaboradores (2010b) contra a *C. albicans*. O VCC também não formou halos de inibição contra as leveduras, como observado por Neves (2008) que utilizou o veneno de *Crotalus durissus ruruima* contra a *C. albicans* ATCC 3632. Por outro lado diversos estudos com venenos totais e frações, tem demonstrado o potencial desses compostos como agentes antifúngicos. Murillo e colaboradores (2007), mostraram que um peptídeo sintético derivado da miotoxina II, homólogo da PLA2 presente no veneno de *Bothrops asper*, foi capaz de exercer efeitos fungicidas potentes contra as leveduras

*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. viswanathii*, *C. krusei*, *C. albicans* SC5314, *C. glabrata*, *C. valida*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* e *Saccharomyces cerevisiae*. Magaldi e colaboradores (2002), realizando testes de difusão em agar observaram a formação de halos de inibição frente a isolados clínicos de leveduras (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*) e fungos filamentosos (*Sporothrix schenckii*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Aspergillus terreus*, *Mucor indicus*, *Rhizopus spp.* e *Rhinocladiella aquaspersa*) com o uso do veneno total de *Crotalus durissus cumanensis*. Yamane e colaboradores (2013) realizaram teste de microdiluição com crotamina isolada de *Crotalus durissus terrificus* que apresentou atividade contra leveduras (*C. albicans* IOC4558, *C. glabrata* IOC 4565, *C. guilliermondii* IOC 4557, *C. krusei* IOC 4559, *C. parapsilosis* IOC 4564, *C. tropicalis* IOC 4560 e *Cryptococcus neoformans* IOC 4528) e fungos filamentosos (*Aspergillus fumigatus* IOC 4526, *Trichophyton rubrum* IOC 4527 e *Trichosporon spp.* IOC 4569).

As serpentes *B. asper* e *B. leucurus*, além de serem de espécies diferentes estão presentes em regiões diferentes, vários estudos atribuem a variação na composição do veneno a uma adaptação evolutiva relacionada a dieta, a variação geográfica, a variação intraespecífica e a idade das serpentes (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; DALTRY; WUSTER; THORPE, 1996; SARAIVA et al., 2002; BARLOW et al., 2009; CALVETE et al., 2009; GUTIERREZ et al., 2009; BOLDRINI-FRANÇA, et al., 2010), isso também se aplica as espécies de *Crotalus*, daí a necessidade de estudar venenos de diferentes espécies. É possível que não existam na composição do VBL e do VCC nenhuma substância ativa contra as leveduras testadas ou ainda que existam substâncias ativas, mas em baixas concentrações e não tenham gerado respostas semelhantes ao observado nos estudos de Murillo e colaboradores (2007), Magaldi e colaboradores (2002) e Yamane e colaboradores (2013).

Os fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Microsporum gypseum* foram inibidos pelo VBL na mesma concentração ( $CIM_{VBL}=4000\mu\text{g/ml}$ ), mas não foi determinada a CIM para o VCC. Quando comparamos os resultados obtidos de CIM entre o VBL e o controle AnfB, percebemos que a inibição pelo VBL é gerada por uma concentração extremamente alta do veneno, diante disso podemos considerar que no veneno total a concentração de princípios ativos pode ser inferior ou não é

suficiente para exercer uma atividade mais intensa se comparada a de venenos fracionados, ou ainda, que existam substâncias que estão antagonizando com as substâncias que apresentaram atividade, diminuindo assim a potência desta ação. Em relação ao VCC, o fato de não termos conseguido determinar sua CIM para estes microrganismos, revela que eles podem apresentar mecanismos de defesa que impedem a ligação de substâncias específicas presentes no veneno a receptores na membrana da célula fúngica, levando assim a neutralização de um possível efeito inibitório ou que não existam componentes capazes de atuar no *A. niger* e no *M. gypseum*. Gomes e colaboradores (2005) isolaram um peptídeo de *B. jararaca* que inibiu o crescimento de diferentes espécies de fungos fitopatogênicos (*Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum*) e leveduras (*C. albicans* e *S. cerevisiae*), neste trabalho o VBL inibiu o crescimento de *A. niger*, um fungo que foi isolado do caule do sisal (*Agave sisalana*) e causa nesta planta a doença chamada de podridão vermelha (SÁ, 2009). Embora existam diferenças entre as composições de venenos do mesmo gênero e também da mesma espécie, as similaridades existentes entre eles também indicam que tipo de componentes são promissores de se investigar.

Os resultados das CIM's encontrados para os fungos *Microsporum canis* 1 e 2 foram iguais ( $CIM_{VBL/VCC}=62,5\mu\text{g/ml}$ ) com o uso dos dois venenos e o VBL foi 64 vezes mais potente nesses dois fungos filamentosos do que no *A. niger* e no *M. gypseum*. O resultado encontrado para o controle AnfB nos informa que o *M. canis* 1 é resistente e o *M. canis* 2 é muito sensível a este antifúngico. O protocolo M38-A do CLSI preconiza que o valor de CIM indicado como 'sensível' para os fungos filamentosos agrupam-se em torno de 0,5-2 $\mu\text{g/ml}$ . A AnfB é um antifúngico poliênico que forma complexo com o ergosterol e rompe a membrana plasmática fúngica, o que resulta no aumento da permeabilidade da membrana, a vazão do conteúdo citoplasmático e por fim a morte celular (BRASIL, 2010b; KATHIRAVAN et al., 2012). Podemos inferir que devido a resistência apresentada pelo *M. canis* 1 ao antifúngico, que os venenos atuam por outro mecanismo diferente do controle utilizado, ou seja eles não formam complexo com o ergosterol. Diante a alta sensibilidade apresentada pelo *M. canis* 2 a AnfB, sugere-se que os venenos não se liguem ao ergosterol, visto que a concentração dos venenos em relação ao antifúngico é 500 vezes maior, logo, eles devem agir por outra via.

Notamos que existe um efeito inibitório do VBL para todos os fungos filamentosos testados, entretanto os valores de CIM encontrados são muito distantes um do outro, e isso pode relacionar-se com as diferenças constitucionais (quantidade e natureza química dos componentes) desses microrganismos e/ou os mecanismos de ação do veneno na célula fúngica, esses fatores de interação com os compostos do veneno é que geram uma maior, menor ou nenhuma inibição do VBL e do VCC.

Com base nos estudos obtidos até aqui, podemos considerar os venenos totais das serpentes *Bothrops leucurus* e *Crotalus durissus cascavella* importantes ferramentas com potencial para obtenção de novos agentes terapêuticos. Diante dos resultados observa-se que existem compostos nos dois venenos que exerceram atividade na maioria dos microrganismos testados. É importante ressaltar que como se trata de venenos totais, muitas substâncias podem estar atuando sobre esses microrganismos. Bactérias e fungos variam amplamente na composição das suas membranas e paredes, portanto, era esperado que exibissem diferentes sensibilidades aos venenos, não sendo ainda possível avaliar se uma ou mais substâncias são responsáveis pelos resultados encontrados. Assim o isolamento, purificação e a caracterização funcional dos componentes de VBL e VCC poderá prover informações sobre seus alvos e mecanismos de ação, tornando possível o seu uso como agentes antimicrobianos.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados confirmam que ambos os venenos totais das serpentes *B. leucurus* e *C. d. cascavella* tem potencial antimicrobiano contra bactérias e fungos. Os dados apresentados sobre o VBL e o VCC demonstraram sua atividade através da formação de halos de inibição do crescimento frente a 19 e 18 cepas de bactérias, respectivamente. A ação dos dois venenos nos testes de disco difusão foi dose-dependente para a maioria dos microrganismos.

Nos testes de microdiluição em caldo, o VBL agiu frente a 10 cepas de bactérias e o VCC em 6 cepas, que tiveram suas CIM's determinadas. As diferenças encontradas nas respostas apresentadas entre os testes pode estar relacionada a alterações na estabilidade de uma ou mais substâncias.

O VBL apresentou atividade frente a todos quatro fungos filamentosos submetidos ao teste de microdiluição em caldo e o VCC em dois deles, apresentando valores menores ou iguais de CIM encontrados para as bactérias.

Os valores das CIM's determinadas para os dois venenos, demonstram que o VBL possui maior (atividade, intensidade ou potência) na inibição de todos microrganismos do que o VCC. Acredita-se, mediante os resultados encontrados, que é possível que mais de uma substância tenha agido na inibição do crescimento dos microrganismos.

Todos os resultados obtidos neste trabalho revelam o amplo potencial de uso dos venenos de *B. leucurus* e *C. d. cascavella* e reforçam a necessidade de fracionamento e purificação deles, para o isolamento dos componentes e seu posterior uso como agentes antimicrobianos.

## REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. 1996. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons, Inc. 865p.

ALVES, R. M. **Isolamento e caracterização bioquímica e funcional de L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops atrox***. 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, 2007.

ANDREWS, J. M. **Determination of minimum inhibitory concentrations**. J. Antimicrob. Chemother., 2001, v.48, Suppl. S1, p.5-16.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medidas de Prevenção e controle da Resistência Microbiana e Programa de uso Racional de Antimicrobianos em Serviços de Saúde**. Disponível em: < [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/inicio.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/inicio.htm) >. Acesso em: 20 jul 2013.

ARAGÃO, E. A. **Efeito bactericida de fosfolipase A2-Lys49: O papel da região C-terminal na atividade de Bothropstoxina-I em membranas biológicas e artificiais**. 2005. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP. 2005.

AVILES-OLMOS, I. et al. **Exenatide and the treatment of patients with Parkinson's disease**. The Journal of Clinical Investigation, 2013, v.123, n.6, p.2730-2736.

BARBOSA, P. S. F. et al. **Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom**. Toxicon, 2005, v.46, p.376–386.

BARLOW, A. et al. **Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution**. Proc. R. Soc. B, 2009, v.276, p.2443–2449.

BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. (Org.). 2012. **Répteis brasileiros: Lista de espécies. Versão 2012.2**. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Disponível em: < <http://www.sbherpetologia.org.br/> >. Acesso em: 15 abr.2013.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. **Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms.** *Pharmacol Ther*, 1994, v.62, n.3, p.325-72.

BLAYLOCK, R. S. **Antibacterial properties of KwaZulu Natal snake venoms.** *Toxicon*, 2000, v.38, n.11, p.1529-34.

BLUNT, C. A.; VAN VUUREN, M.; PICARD, J. **Antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus intermedius* isolates from clinical cases of canine pyoderma in South Africa.** *Journal of the South African Veterinary Association*, 2013, v. 84, n.1, Art. #276, 6 pages. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4102/jsav.a.v84i1.276> >. Acesso em: 20 fev. 2014.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. **Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management.** *Journal of proteomics*, 2010, v.73, p.1758 – 1776.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** 2.ed. Brasília, 2001. 112p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica.** 7. ed. Brasília-DF, 2010a. 816 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Formulário terapêutico nacional 2010: Rename.** 2. ed. Brasília-DF, 2010b. 1135 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. **Snake venom proteins acting on hemostasis.** *Biochimie*, 2000, v.82, p.851–859.

BREGGE-SILVA, C. et al. **Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom.** *Toxicon*, 2012, v.60, p.1263–1276.

BROGDEN, K. A. **Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?** *Nature Reviews Microbiology*, 2005, v.3, p.238-250.

CALVETE, J. J. et al. **Venoms, venomics, antivenomics**. FEBS Letters, 2009, v.583, p.1736–1743.

CASTANHEIRA, L. E. et al. **Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom**. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, v. 54, p.57– 64.

CASTRO, F. O. F. **Avaliação da atividade não citotóxica do veneno da cobra *Bothrops pauloensis* em células mononucleares do sangue periférico humano**. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC), Goiânia, GO, 2011.

CHEN, L.W. et al. **Bactericidal effect of *Naja nigricollis* toxin  $\gamma$  is related to its membrane-damaging activity**. Peptides, 2011, v.32, n.8, p.1755-63.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. **Snake venom variability: methods of study, results and interpretation**. Toxicon, 1991, v.29, n.11, p.1279-1303.

CISCOTTO, P. H. C. **Purificação e caracterização biológica (estrutural, antibacteriana, antiparasitária, hemolítica e antigênica) de componentes do veneno da serpente *Bothrops jararaca***. 2005. 102f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 2005.

CISCOTTO, P. et al. **Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom**. Toxicon, 2009, v.53, p.330–341.

CLARDY, J.; C. WALSH. **Lessons from natural molecules**. Nature, 2004, v. 432, p.829-837.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria**; Proposed Guideline. **CLSI document M45-P**. Wayne, PA., 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for antifungal disk diffusion susceptibility test of yeasts**; Approved Standard—2<sup>nd</sup>. **CLSI document M44-A2**. Wayne, PA., 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**; Approved Standard—11<sup>th</sup>. **CLSI document M02-A11**. Wayne, PA., 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; Approved Standard—9<sup>th</sup>. **CLSI document M07-A9**. Wayne, PA., 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**; Twenty-Third Informational Supplement. **CLSI document M100-S23**. Wayne, PA., 2013

CLISSA, P. B. **Otimização da atenuação da toxicidade do veneno crotálico irradiado e estudo de suas propriedades imunológicas**. 1997. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Autarquia associada à Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, 1997.

COSTA, N. C. S. **Caracterização parcial e avaliação do potencial antibacteriano e antitumoral de uma L-aminoácido oxidase isolada de *Bothrops jararacussu***. 2012. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal Viçosa (UFV), Viçosa, MG, 2012.

CURTI, B.; MASSEY, V.; ZMUDKA, M. **Inactivation of snake venom l-amino acid oxidase by freezing**. J. Biol. Chem. 1968, v.243, n.9, p.2306-2314.

DALTRY, J. C.; WUSTER, W.; THORPE, R. S. **Diet and snake venom evolution**. Nature, 1996, v.379, p.537–540.

DEOLINDO, P. et al. **L-amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi***. Toxicon, 2010, v.56, p.944–955.

DEVINE, D. A.; HANCOCK, R. E. W. **Cationic peptides: distribution and mechanisms of resistance**. Current Pharmaceutical Design, 2002, v.8, n.9, p.703-714.

DIZ-FILHO, E. B. S. et al. **Enzymatic and structural characterization of new PLA2 isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima***. Toxicon, 2009, v.53, p.104–114.

ENG, J. et al. **Isolation and characterization of Exendin-4, an Exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* Venom.** The Journal Of Biological Chemistry, 1992, v.267, n.11, p.7402-7406.

EPAND, R. M.; EPAND, R. F. **Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents.** Biochimica et Biophysica Acta, 2009, v.1788, p.289–294.

EPAND, R. M.; EPAND, R. F. **Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents.** J. Pept. Sci. 2010, v,17, p. 298–305.

FERNANDES, P. **Antibacterial discovery and development - the failure of success?** Nature Biotechnology, 2006, v.24, n.12, p. 1497-1503.

FERREIRA-JUNIOR R. S. et al. **Immunological assessment of mice hyperimmunized with native and cobalt-60-irradiated bothrops venoms.** J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis., 2005, v.11, n.4, p. 447-464.

FERREIRA, S. H. **Aspectos históricos da hipertensão. Do fator de potenciação da bradicinina aos inibidores da ECA.** HiperAtivo, 1998, v.5, n.1, p.6-7.

FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. **Antibiotics for emerging pathogens.** Science, 2009, v.325, n.5944, p.1089–1093.

FOREMAN-WYKERT, A. K. et al. **Cell-wall determinants of the bactericidal action of group IIA phospholipase A2 against Gram-positive bacteria.** The Journal of Clinical Investigation, 1999, v.103, n.5, p.715-721.

FOX, J. W. **A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases.** Toxicon, 2013, v.62, p.75–82.

FRANÇA, R.C.; GERMANO, C.E.S.; FRANÇA, F.G.R. **Composition of a snake assemblage inhabiting an urbanized area in the Atlantic Forest of Paraíba State, Northeast Brazil.** Biota Neotrop. v.12, n.3. Disponível em: < <http://www.biotaneotropica.org.br/v12n3/en/abstract?inventory+bn00612032012> >. Acesso em: 14 ago. 2013.

FRY, B. G. et al. **The toxicogenomic multiverse: Convergent recruitment of proteins into animal venoms.** *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2009, v.10, p.483–511.

GALLO M. B. C. et al. **Natural products from endophytic fungi.** *Microbial Biotechnology.* Biotechnology division North East Institute of Science and Technology. 410p. Assam. Índia. 2008.

GALLWITZ, B. **Exenatide in type 2 diabetes: treatment effects in clinical studies and animal study data.** *Int J Clin Pract,* 2006, v.60, n.12, p.1654–1661.

GOMES, V. M. et al. **Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom.** *Toxicon,* 2005, v.45, n.7, p.817-27.

GOMES, M. S. R. **Purificação e caracterização de BthMP: Uma nova metaloproteinase de veneno de *Bothrops moojeni* (Caiçaca).** 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 2006.

GUARDABASSI, L.; LOEBER, M. E.; JACOBSON, A. **Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners.** *Veterinary Microbiology,* 2004, v.98, p.23–27.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. **Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes.** *Quim. Nova,* 2010, v.33, n.3, p.667-679.

GUO, C. et al. **Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase.** *Toxicon,* 2012, v.60, p.302–311.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. **Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming.** *Journal of proteomics,* 2009, v.72, p.165–182.

HARVEY, A. **Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products.** *Drug Discovery Today,* 2000, v.5, n. 7, p.294-300.

IZIDORO, L. F. M. et al. **Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006, v.14, p.7034–7043.

IZIDORO, L. F. M. **Caracterização bioquímica e funcional de uma nova L-aminoácido oxidase isolada da peçonha da serpente *Bothrops pirajai*.** 2007. 74 f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, 2007.

JONEBRING, A. et al. **Expression and characterization of recombinant ecarin.** Protein J, 2012, v.31, p.353–358.

JONES, R. N. **Prediction of enterococcal imipenem susceptibility using ampicillin or penicillin mics: More evidence for a class concept.** Journal of Clinical Microbiology, 2001, v.39, n.10, p. 3810–3811.

KATHIRAVAN, M. K. et al. **The biology and chemistry of antifungal agents: A review.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2012, v.20, n.19, p.5678–5698.

KELESIDIS, T.; TSIODRAS, S. ***Staphylococcus intermedius* is not only a zoonotic pathogen, but may also cause skin abscesses in humans after exposure to saliva.** International Journal of Infectious Diseases, 2010, v.14, e838–e841.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. **Snake venom components and their applications in biomedicine.** Cell. Mol. Life Sci., 2006, v.63, p.3030–3041.

KONEMAN, E. W. **Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido.** 6. ed., Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.

KONNO, K. et al. **Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*.** Peptides, 2008, v.29, p.1293 –1304.

KORNALIK, F.; BLOMBACK, B. **Prothrombin activation induced by ecarin - a prothrombin converting enzyme from *Echis carinatus* venom.** Thrombosis Research, 1975, v.5, p.53-63.

KURODA, K.; CAPUTO, G. A. **Antimicrobial polymers as synthetic mimics of host-defense peptides.** WIREs Nanomed Nanobiotechnol, 2013, v.5, p.49–66.

LAMEU, C. et al. **The central nervous system as target for antihypertensive actions of a proline-rich peptide from *Bothrops jararaca* venom.** Cytometry Part A, 2010, 77A: 220-230.

LEE, M.L. et al. **Antibacterial action of a heat-stable form of L-amino acid oxidase isolated from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom.** Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2011, v.153, n.2, p.237-42.

LEVISON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia.** 10. ed., Porto Alegre, ARTMED, 2010.

LIMA, D. V. et al. **Snake Venom: Any clue for antibiotics and cam? Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,** 2005, v.2, n.1, p.39-47.

LIMA, M. E. et al. **Toxinology in Brazil: A big challenge for a rich biodiversity.** Toxicon, 2010, v.56 p.1084–1091.

LIRA-DA-SILVA, R. M. **Estudo farmacológico do veneno de *Bothrops leucurus* (Serpentes; Viperidae).** 2001. 182 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP. 2001.

MAGALDI, S. et al. **Antifungal activity of *Crotalus durissus cumanensis* venom.** Mycoses, 2002, v.45, p. 19-21.

MANCIN, A. C. et al. **The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (south american rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study.** Toxicon, 1998, v.36, n.12, p. 1927-1937.

MARSH, N. A. **Diagnostic uses of snake venom.** Haemostasis, 2001; v.31, p.211–217.

McGIVERN, J. G. **Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain.** Neuropsychiatric Disease and Treatment, 2007, v.3, n.1, p.69–85.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org.) **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 1.** Rio de Janeiro, 2009. 290 p.

MOURA, V. M.; MOURÃO, R. H. V. **Aspectos do ofidismo no brasil e plantas medicinais utilizadas como complemento à soroterapia.** Scientia Amazonia, Revista on-line, 2012, v. 1, n.3, p.17-26. Disponível em: < <http://www.scientia.ufam.edu.br> >. Acesso em:10 abr. 2013.

MULLER, V. D. M. et al. **Crotoxin and phospholipases A2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses.** Toxicon, 2012, v.59, p.507–515.

MURILLO, L. A. et al. **Fungicidal activity of a phospholipase A2-derived synthetic peptide variant against *Candida albicans*.** Rev Esp Quimioterap, 2007, v.20, n.3, p.330-333.

NATHAN, C. **Antibiotics at the crossroads.** Nature Commentary, 2004, v.431, p.899-902.

NEVES, M. S. **Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do veneno das serpentes amazônicas *Bothrops atrox* (LINNAEUS, 1758) e *Crotalus durissus ruruima* (HOGE, 1965).** 2008. 36 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infeciosas) – Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, 2008.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G. M. **Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010.** J Nat Prod. 2012, v.75, n.3, p.311–335.

NNTRC - National Natural Toxins Research Center. **Snake Venoms.** Disponível em: < <http://www.ntrc.tamuk.edu/> >. Acesso em: 6 abr. 2013.

NUNES E. S. et al. **Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom.** Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol., 2011, v.159, n.1, p.57-63.

OKUBO, B. M. et al. **Evaluation of an antimicrobial l-amino acid oxidase and peptide derivatives from *Bothropoides mattogrosensis* pitviper venom.** PLoS ONE, 2012, v.7, n.3, e33639.

OLIVEIRA, D. G. et al. **Structural and biological characterization of a crotapotin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom.** Toxicon, 2003, v.42, p.53–62.

OLIVEIRA, L. C. et al. **Perfil de isolamento microbiano em cães com otite média e externa associadas.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 2006, v.58, n.6, p.1009-1017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **The top 10 causes of death.** 2008. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html> >. Acesso em: 20 abr. 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Antimicrobial resistance.** Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/> >. Acesso em: 10 maio 2013.

PAIVA, R. M. A. et al. **Cell cycle arrest evidence, parasiticial and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom.** Biochimie, 2011, v.93, n.5, p.941-7.

PAIVA, R. O. **Avaliação das atividades antifúngicas de substâncias sintéticas frente a fungos micotoxigênicos de interesse agropecuário.** 2013. 90 f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária) – Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, 2013.

PENTAPHARM. **Convulxin.** Disponível em: < <http://www.pentapharm.com/content.cfm?nav=11&content=26> >. Acesso em: 10 ago. 2013.

PENTAPHARM. **Defibrase®.** Disponível em: < <http://www.pentapharm.com/content.cfm?nav=21&content=39&CFID=11440519&CFTOKEN=59099344> >. Acesso em: 10 ago. 2013.

PENTAPHARM. **Ecarin.** Disponível em: < <http://www.pentapharm.com/content.cfm?nav=11&content=26> >. Acesso em: 10 ago. 2013.

PENTAPHARM. **Haemocoagulase®.** Disponível em: < <http://www.pentapharm.com/content.cfm?nav=21&content=40> >. Acesso em: 10 ago. 2013.

QUEIROZ, S. J.. **Identificação da atividade antimicrobiana no veneno da serpente *Bothrops moojeni* em bactérias Gram-negativas.** 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC), GOIÂNIA, GO, 2010.

RANGEL-SANTOS, A. et al. **A comparative study of biological activities of crotoxina and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*,**

***Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus***. *Toxicon.*, v.43, n.7, p. 801-810, 2004.

RATELSLANGEN. ***Crotalus durissus* - South American rattlesnake**. Disponível em: < [http://www.ratelslangen.nl/gallery/Crotalus\\_durissus\\_South\\_American\\_rattlesnake/](http://www.ratelslangen.nl/gallery/Crotalus_durissus_South_American_rattlesnake/) >. Acesso em: 10 ago. 2013.

RÉPTARIUM. Disponível em: <<http://www.reptarium.cz/en/taxonomy> >. Acesso em: 10 ago. 2013.

REPTILE DATABASE (RDB ). Disponível em: < [http://reptile-database.reptarium.cz/advanced\\_search](http://reptile-database.reptarium.cz/advanced_search) >. Acesso em: 9 abr. 2013.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. **Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature**. *Journal of Ethnopharmacology*, 1988, v.23, p. 127-149.

RIVAS, C. S. **¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana...?** *Revista Química Viva*, 2006, v. 5, n.2, p.63-77.

RODRIGUES, V. M. et al. **Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom**. *Toxicon*, 2004, v.44, p.305–314.

RODRIGUES, R. S. et al. **Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom**. *Biochimie*, 2009, v.91, p.490–501.

SÁ, J. F. **Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma spp.*** 2009. 54 f. Dissertação (Mestrado Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, BA, 2009.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I. **Haemostatically active proteins in snake venoms**. *Toxicon*, 2011, v.57, p.627–645.

SAMY, R. P. et al. **In vitro antimicrobial activity of natural toxins and animal venoms tested against *Burkholderia pseudomallei***. *BMC Infectious Diseases*, 2006, 6:100. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/6/100> >. Acesso em: 17 abr. 2013.

SAMY, R. P. et al. **Purification, characterization and bactericidal activities of basic phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon halys* (Chinese pallas).** Biochimie, 2008, v.90, n.9, p.1372-88.

SAN, T.M. et al. **Screening antimicrobial activity of venoms from snakes commoly found in Malaysia.** Journal of Applied Sciences, 2010, v.10, n.19, p.2328-2332.

SANTAMARÍA, C. et al. **Bactericidal and antiendotoxic properties of short cationic peptides derived from a snake venom lys49 phospholipase A2.** Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 2005, v.49, n.4, p. 1340–1345.

SARAVIA, P. et al. **Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications.** Rev. Biol. Trop., 2002, v.50, n.1, p.337-346.

SCHAEFER, S. **Cobra Cascavel - *Crotalus durissus cascavella*.** 2009. Disponível em: < [http://www.biologados.com.br/especiais/instituto\\_butantan\\_turismo/cobra\\_cascavel\\_nome\\_cientifico\\_crotalus\\_durissus\\_cascavella\\_viperidae\\_fotos.htm](http://www.biologados.com.br/especiais/instituto_butantan_turismo/cobra_cascavel_nome_cientifico_crotalus_durissus_cascavella_viperidae_fotos.htm) >. Acesso em: 6 abr. 2013.

SELITRENNIKOFF, C. P. **Antifungal Proteins.** Applied and Environmental Microbiology, 2001, v.67, n.7, p. 2883–2894.

SHEBL, R. I. et al. **Antimicrobial profile of selected snake venoms and their associated enzymatic activities.** British Microbiology Research Journal, 2012, v.2, n.4, p.251-263.

SHIELDS, D.E.; ACLAN, J.; SZATKOWSKI, A. **Chemical stability of admixtures containing ziconotide 25mcg/mL and morphine sulfate 10mg/mL or 20mg/mL during simulated intrathecal administration.** International Journal of Pharmaceutical Compounding, 2008, v.12, n.6, p. 553-557.

SILVEIRA, G. P. et al. **Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana.** Quim. Nova, 2006, v.29, n. 4, p.844-855.

STÁBELI, R. G. et al. **Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004, v.12, p.2881–2886.

STÁBELI, R. G. et al. **Cytotoxic l-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization.** International Journal of Biological Macromolecules, 2007, v.41, p.132–140.

SOHRAB, H. **Isolation and structure elucidation of secondary metabolites from endophytic fungi and the plant *Prismatomeris tetrandra* and synthesis of (+) - ochromycinone.** 2005. 151 f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Faculdade de Ciências Naturais da Universidade de Paderborn, Alemanha, 2005.

TADA, R.; LATGÉ, J. P.; AIMANIANDA, V. **Undressing the fungal cell wall/cell membrane - the antifungal drug targets.** Current Pharmaceutical Design, 2013, v.19, p.3738-3747.

THE NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi;** Approved Standard. **NCCLS document M38-A.** Wayne, PA, 2002.

TICLI, F. K. **Caracterização funcional e estrutural de uma L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops jararacussu* e avaliação da sua ação antitumoral, antiparasitária e bactericida.** 2006. 111 f. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, 2006.

TORRES, A. F. C. **Ação antibacteriana, antifúngica e antiparasitária dos venenos das serpentes *Bothrops leucurus* e *Bothrops marajoensis* e de suas frações fosfolipase A2 e L-aminoácido oxidase.** 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, 2009.

TORRES, A. F. C. et al. **Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase.** Toxicon, 2010a, v.55, p.795–804.

TORRES, A. F. C. et al. **Antimicrobial activity of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops leucurus* snake venom.** J Venom Anim Toxins incl Trop Dis, 2010b, v.16, n.4, p. 614-622.

TOYAMA, M. H. et al. **Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom.** Toxicon, 2006, v.47, p.47–57.

TRIPLETT, D. A. et al. **The textarin/ecarin ratio: A confirmatory test for lupus anticoagulants.** *Thrombosis and Haemostasis*, 1993, v.70, n.6, p. 925-931.

USAMI, Y. et al. **Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, v.90, p. 928-932.

VARGAS, L. J. et al. **An acidic phospholipase A2 with antibacterial activity from *Porthidium nasutum* snake venom.** *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2012, v.161, Part B, p.341–347.

VARGAS, L. J. et al. **Cloning and characterization of an antibacterial L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cumanensis* venom.** *Toxicon*, 2013, v.64, p.1–11.

VU, T. T. et al. **Batroxobin binds fibrin with higher affinity and promotes clot expansion to a greater extent than thrombin.** *The journal of biological chemistry*, 2013, v.288, n.23, p.16862–16871.

WEINSTEIN, M. P. **Comparative evaluation of penicillin, ampicillin, and imipenem mics and susceptibility breakpoints for vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*.** *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, v.39, n.7, p. 2729–2731.

WERCKENTHIN, C. et al. **Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*.** *Vet. Res.* 2001, v.32, p.341–362.

WONG, E. S. W.; BELOV, K. **Venom evolution through gene duplications.** *Gene*, 2012, v.496, p.1–7.

WHC - Women's & Children Hospital, Toxinology Department. Clinical Toxinology Resources. **Snake venoms.** Disponível em: < <http://www.toxinology.com/fusebox.cfm?staticaction=snakes/ns-snvenom.htm> >. Acesso em: 6 abr. 2013.

YAMANE, E. S. et al. **Unraveling the antifungal activity of a South American rattlesnake toxin crotamine.** *Biochimie*, 2013, v.95, p.231-240.

YINGXIA, L. et al. **Behavioral and morphological evidence for the involvement of glial cells in the antinociceptive effect of najaanalgesin in a rat neuropathic pain model.** Biol. Pharm. Bull., 2012, v.35, n.6, p.850-854.

YOU, W. K. et al. **Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*.** FEBS Letters, 2004, v.571, p.67–73.

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. **Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target.** Ann. N.Y. Acad. Sci., 2013, v.1277, p.127–138.