

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**POTENCIAL ANTIBIÓTICO DAS PEÇONHAS DE
Bothrops pauloensis E *Crotalus durissus*
*terribilis***

Andreia Zago Ciuffa

Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**POTENCIAL ANTIBIÓTICO DAS PEÇONHAS DE
Bothrops pauloensis E *Crotalus durissus*
*terribilis***

Andreia Zago Ciuffa

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Anna Monteiro Correia Lima

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Santos Rodrigues

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Clínica Médica e Investigação Etiológica)

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Fevereiro de 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C581p Ciuffa, Andreia Zago, 1987
2016 Potencial antibiótico das peçonhas de *Bothrops pauloensis* E
Crotalus durissus terrificus / Andreia Zago Ciuffa. - 2016.
46 p. : il.

Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima.
Coorientadora: Renata Santos Rodrigues.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Serpente peçonhenta - Peçonha - Teses. 3.
Antibióticos - Teses. 4. Bacteriologia veterinária - Teses. I. Lima, Anna
Monteiro Correia. II. Rodrigues, Renata Santos, 1977-. III. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, eles são os responsáveis por eu ter conseguido chegar até aqui, este título é dedicado a eles. Agradeço também à toda a equipe do LADOC, pela amizade, por todos os momentos de alegria e por estarem sempre dispostos a me ajudar e apoiar todas as vezes que precisei. Agradeço à equipe do LABITOX, eles tornaram possível a realização deste trabalho, sempre solícitos e acolhedores. Em especial, agradeço à minha Orientadora Anna Lima, à minha Co-orientadora Renata e à Professora Denise, mulheres que admiro muito e sem elas eu não teria conseguido realizar esse trabalho. Finalmente agradeço a toda banca examinadora pela presença e colaboração.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	8
1. <i>INTRODUÇÃO</i>	8
2. <i>BACTÉRIAS UTILIZADAS PARA TESTE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PEÇONHAS</i>	9
2.1 <i>Escherichia coli (E. coli)</i>	9
2.2. <i>Staphylococcus aureus (S. aureus)</i>	10
2.3 <i>Leptospira interrogans (L. interrogans)</i>	11
3. <i>BIOATIVOS PRESENTES NAS PEÇONHAS.....</i>	13
3.1. LAAO (L-amino acid oxidase)	13
3.2 LECTINA	14
3.3 METALOPROTEASES	15
3.4 PEPTÍDEOS POTENCIALIZADORES DE BRADICININA (BPPs)	15
3.5 FOSFOLIPASES A2 (PLA2s)	16
4. <i>Bothrops pauloensis</i>	17
5. <i>Crotalus durissus</i>	18
REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO 2 – POTENCIAL ANTIBIÓTICO DAS PEÇONHAS DE <i>Bothrops pauloensis</i> E <i>C. durissus terrificus</i>.....	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
1. Microrganismos e peçonhas utilizados	28
2. Teste de difusão em disco (Kirby-Bauer)	29
3. Teste de Microdiluição em Caldo	30
3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	30
3.2. <i>Leptospira interrogans</i>	31
4. Teste de motilidade para <i>Leptospira interrogans</i>	31
5. Inoculação de <i>S. aureus</i> e <i>L. interrogans</i> em meio de cultura.....	31
6. Análise Estatística	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcento

°C – graus Celsius

µL – microlitros

BPPs – Peptídeos Potencializadores de Bradicinina

B. pauloensis – *Bothrops pauloensis*

C. d. terrificus – *Crotalus durissus terrificus*

E. coli – *Escherichia coli*

EMJH – Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

L. interrogans – *Leptospira interrogans*

LAAO – L-amino acid oxidase

LPS – Lipopolissacarídeos

mg – miligrama

mL – mililitro

mm - milímetro

nm – nanômetro

PBP – Peçonha de *Bothrops pauloensis*

PCT – Peçonha de *Crotalus durissus terrificus*

PLA 2 – Fosfolipase A2

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Valores médios das absorbâncias obtidas no teste de Microdiluição em Caldo realizado com <i>S.aureus</i> e peçonha de <i>B. pauloensis</i> nas concentrações obtidas de diluições seriadas decimais a partir de 1,5 mg/mL.....	36
Tabela 2. Valores médios das absorbâncias obtidas no teste de Microdiluição em Caldo realizado com <i>S.aureus</i> e peçonha de <i>C. d. terrificus</i> nas concentrações obtidas de diluições seriadas decimais a partir de 3,0 mg/mL.....	38
Tabela 3. Valores médios das absorbâncias obtidas no teste de Microdiluição em Caldo realizado com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Icterohaemorrhagiae e peçonha de <i>B. pauloensis</i> nas concentrações obtidas de diluições seriadas decimais a partir de 3,0 mg/mL.....	40
Tabela 4. Valores médios das absorbâncias obtidas no teste de Microdiluição em Caldo realizado com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Icterohaemorrhagiae e peçonha de <i>C. d. terrificus</i> nas concentrações obtidas de diluições seriadas decimais a partir de 3,0 mg/mL.....	42

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1. Triplicata dos testes de difusão em disco para <i>E. coli</i> e PBP nas concentrações 1,5 e 3,0 mg/mL (A) e <i>E. coli</i> com PCT nas concentrações 1,5 e 3,0 mg/mL (B)	33
Figura 2. Triplicata dos testes de difusão em disco para <i>S. aureus</i> e PBP nas concentrações 1,5 e 3,0 mg/mL (A) e <i>S. aureus</i> com PCT nas concentrações 1,5 e 3,0 mg/mL (B)	35
Figura 3. Ágar sangue demonstrando a ausência de colônias de <i>S. aureus</i> após a conjugação com PBP em cinco diluições diferentes.....	37
Figura 4. Ágar sangue demonstrando presença de colônias de <i>S. aureus</i> após a conjugação com PCT nas diluições 3×10^{-3} e 3×10^{-4}	39

RESUMO – A resistência bacteriana à antibióticos tem se tornado um grave problema em saúde pública. Os mecanismos de resistência estão emergindo e sendo disseminados globalmente, devido às deficiências nas condições sanitárias e uso indiscriminado de antibióticos em humanos e animais. *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* estão entre as bactérias mais presentes quando se trata de resistência a antimicrobianos. Infecções causadas por *Leptospira interrogans* possuem limitadas opções de tratamento e pouco se progrediu a cerca desta situação nos últimos anos. O Brasil possui uma fauna rica em espécies de serpente. Dentre as serpentes peçonhentas que causam a maior parte dos acidentes ofídicos no país encontram-se os gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. As peçonhas desses animais possuem uma diversidade de bioativos com funções biológicas, bioquímicas e farmacológicas. Por isso, diversos estudos têm sido realizados com essas substâncias a fim de se desenvolver novos fármacos. Em meio às diversas funções já descobertas sobre os bioativos das peçonhas, o potencial antimicrobiano tem sido alvo de importantes pesquisas visto o cenário mundial de resistência bacteriana.

Palavras chave: Antibióticos, Bactéria, Peçonha de Serpente

ABSTRACT – Bacterial resistance to antibiotics has become a serious problem in public health. Resistance mechanisms are emerging and being disseminated globally due to deficiencies in health conditions and the indiscriminate use of antibiotics in humans and animals. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* are among the most present bacteria when it comes to antimicrobial resistance. *Leptospira interrogans* infections have limited treatment options and little progress has been made about this in last years. Brazil has a rich ecosystem in snake species. Among the venomous snakes that cause most of the ophidian accidents in the country are the genera *Bothrops* and *Crotalus*. The venom of these animals has a diversity of bioactives with biological, biochemical and pharmacological functions. Therefore, several studies have been done with these substances to develop new drugs. Regarding the several functions already discovered about venom bioactives, the antimicrobial potential has been the object of important researchs, considering the world scenario of bacterial resistance.

Key words: Antibiotics, Bacteria, Sanke Venoms

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos resistentes aos antimicrobianos encontram-se nas pessoas, nos animais, nos alimentos e no ambiente (na água, no solo e no ar). Eles podem se espalhar entre as pessoas e os animais, e de pessoa para pessoa. O mau controle de infecção, condições sanitárias inadequadas e manuseio inadequado de alimentos encorajam a disseminação da resistência antimicrobiana. Novos mecanismos de resistência estão emergindo e se espalhando globalmente, ameaçando nossa capacidade de tratar doenças infecciosas comuns, resultando em doença prolongada, deficiência e morte (WHO, 2016).

A resistência em *Escherichia coli* a um dos medicamentos mais utilizados para o tratamento de infecções do trato urinário (antibióticos fluoroquinolona) é muito difundida. Existem países em muitas partes do mundo onde este tratamento é agora ineficaz em mais de metade dos pacientes (WHO, 2016).

A resistência aos medicamentos de primeira linha para tratar infecções causadas por *Staphylococcus aureus* - uma causa comum de infecções graves em estabelecimentos de saúde e na comunidade - é generalizada. Estima-se que as pessoas com MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) são 64% mais propensas a morrer do que as pessoas com uma forma não resistente da infecção (WHO, 2016).

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).

As peçonhas de serpentes são constituídas por uma mistura complexa de substâncias e como consequência podem apresentar distintas funções biológicas, bioquímicas e farmacológicas (KOH, 2006). Por isso, componentes

das peçonhas têm sido cada vez mais utilizados como instrumentos farmacológicos e como protótipos para o desenvolvimento de drogas (CALVETE et al, 2009).

2. BACTÉRIAS UTILIZADAS PARA TESTE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PEÇONHAS

2.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

A espécie *E.coli* possui como características fenotípicas ser bacilos curtos Gram negativos, anaeróbio facultativo, oxidase negativa, catalase positiva, fermentador de lactose, sacarose e glicose, com produção de gás, podendo ou não apresentar motilidade (WELCH, 2006). Crescer a partir de diversas fontes de carbono e em temperaturas de 5 a 45°C, sendo a temperatura ótima de crescimento 37°C. São bactérias resistentes ao calor, sobrevivendo a 55°C por 60 minutos, e toleram uma variação de PH entre 4,4 e 6,0 (ALTWEGG e BOCKMUHL, 1998).

E. coli faz parte da microbiota gastrointestinal de animais de sangue quente, numa relação de comensalismo, porém algumas cepas podem provocar uma grande variedade de doenças, como diarreia, infecções do trato urinário e infecções nosocomiais (YINGST et al., 2006).

Cada variante dos membros da espécie *E. coli*, podem expressar diferentes抗ígenos em sua superfície. Esses抗ígenos são analisados para classificar os membros em diferentes sorogrupos e sorotipos e podem ser: O (抗ígeno Lipopolisacarídeos – LPS), H (抗ígeno flagelar) e K (抗ígeno capsular). Cada sorogrupo e sorotipo possuem características individuais quanto à resposta contra antimicrobianos e com relação a sua patogenicidade.

Dentre os fatores de virulência, estão: a capacidade de produzir bacteriocinas, fímbrias, adesinas, sideróforos e cápsula com ação antifagocitária (LE GALL et al., 2007).

Além da virulência, a resistência a antimicrobianos em cepas de *E. coli* tem sido motivo de grande preocupação para a saúde pública, principalmente diante da evidência de que antibióticos exercem uma pressão seletiva tanto em bactérias patogênicas quanto nas comensais da microbiota (GUIMARÃES et al., 2015).

Cepas extraintestinais patogênicas e comensais de *E. coli* diferem de acordo com os fatores de virulência, expressos por genes geralmente agrupados em ilhas de patogenicidade, proporcionando um mecanismo de transferência horizontal coordenada desses genes de virulência (SHERLEY et al., 2004).

A produção da enzima Beta-lactamase é o mais comum mecanismo de produção de resistência frente a antibióticos beta-lactâmicos em bactérias Gram negativas. O uso contínuo de antibióticos de amplo espectro induz a produção destas enzimas (DOLEJSKA et al., 2007).

2.2. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

S. aureus são cocos Gram-positivos, catalase positivos, anaeróbios facultativos, imóveis e que se agrupam em formato de cachos de uva. Apresentam a enzima coagulase, fazendo parte do grupo denominado estafilococos coagulase positiva (BERGEY'S, 1994; TRABULSI et al., 2008). São considerados microrganismos mesófilos, apresentam temperatura ótima de multiplicação entre 30° e 37°, mas, conseguem crescer entre 7°C e 47,8°C e também em variações de pH entre 4,2 e 9,3 (LE LOIR et al., 2003).

Apesar de *S. aureus* ser um organismo comensal da pele e membranas mucosas dos seres humanos e animais, está frequentemente envolvido em surtos de intoxicação alimentar, podendo causar sintomas como náuseas, vômitos severos com ou sem diarreia e tendo os primeiros sintomas começando a aparecer entre 2 a 8 horas após a ingestão (BALABAN; RASOOLY, 2000).

S. aureus também é uma das espécies mais comumente encontradas em casos de mastites clínicas, subclínicas e crônicas, sendo responsável por um terço dos casos clínicos e subclínicos, além disso, ainda está relacionado com baixas taxas de cura da doença (KATHOLM et al., 2012).

A espécie *aureus* é considerada a mais virulenta do gênero e sua patogenicidade está relacionada à uma combinação de fatores de virulência como produção de toxinas, enzimas, fatores de adesão e invasão e resistência a antimicrobianos (ARGUDIN et al., 2010).

2.3 *Leptospira interrogans* (*L. interrogans*)

A *Leptospira* é uma espiroqueta, pertencente à ordem *Spirochaetales* e família *Leptospiraceae*. Possuem cerca de 0,1µm de diâmetro e 6 a 20µm de comprimento e crescimento in vitro em temperaturas de 28 a 30ºC. Apresenta formato helicoidal e é móvel devido à presença de dois flagelos periplasmáticos. A membrana externa possui várias camadas que envolvem os flagelos e o cilindro protoplasmático helicoidal, que contém o material nuclear, o citoplasma, a membrana citoplasmática e a porção de peptidioglicano da parede celular. Dentro da membrana externa, os lipopolisacarídeos (LPS) constituem o principal antígeno da *Leptospira*, são estrutural e imunologicamente semelhantes à LPS de organismos Gram-negativos. No entanto, são menos tóxicos para as células ou animais, quando comparados com LPS de *E. coli* (QUINN et al., 2005; FAINE et al., 1999).

Além dos LPS, proteínas estruturais e funcionais fazem parte da membrana externa. Grande parte destas proteínas são lipoproteínas relativamente abundantes na superfície da célula: LipL32, LipL21, LipL41 (CULLEN et al., 2005). Proteínas integrais, como a porina OmpL1 e secretinas também estão localizados na membrana externa e têm-se mostrado antigênicas (SHANG et al.1995).

Ambientes com temperaturas acima de 30ºC, a incidência de luz ultravioleta, desinfecção, dessecção, e variações de pH muito bruscas,

destroem facilmente a bactéria, o que a torna um micro-organismo lável em condições ambientais extremas (LARSON, 1963). Assim, temperaturas moderadas, com alta umidade, como rios, lagos, solos encharcados e lamas, propiciam a sobrevivência da bactéria no ambiente, e sua disseminação (LARSON, 1963; QUINN et al., 2005).

Além disso, as Leptospiras possuem crescimento lento, e utilizam ácidos graxos de cadeia longa como fonte de carbono e energia, necessitando de meios de cultura especiais, como EMJH, Fletcher, e Stuart (TAPERO et al., 2000). O meio de cultura EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) é o mais utilizado atualmente, e tem como base o ácido oleico, albumina sérica bovina e polisorbato (Tween) (ADLER et al., 2010).

Todas as espécies reconhecidas de *Leptospira* são classificadas em 24 sorogrupos e cerca de 250 sorovares com base na expressão dos LPS expostos na superfície (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Os vários sorovares circulantes produzem uma grande diversidade de situações de exposição, reservatórios e quadros clínicos. Roedores das espécies *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus* são os principais reservatórios da *L. Icterohemorrhagiae* e também são considerados os principais transmissores da leptospirose para humanos (LANGONI, 1999; BROD et al., 2005). Alguns animais domésticos também podem ser reservatórios para determinados sorovares, por exemplo: bovinos para Hardjo, Pomona e Grippotyphosa; suínos para Pomona, Tarassovi e Bratislava e cães para o sorovar Canicola (FAINE et al., 1999).

A patogenicidade da *Leptospira* depende do sorovar infectante e da susceptibilidade do hospedeiro. Os hospedeiros de manutenção geralmente apresentam a doença na forma na subclínica, a doença grave ocorre mais comumente em hospedeiros acidentais (QUINN et al., 2005).

Os fatores de virulência e a patogenia da *Leptospira* ainda não são totalmente conhecidos. Sabe-se que elas são disseminadas para o organismo pela corrente sanguínea, e cerca de dez dias após a infecção, aparecem os anticorpos. A bactéria pode evadir ao sistema imunológico (fagocitário e

complemento) e persistir no organismo alojada nos tubúlos renais e com menor frequência no útero, olhos e meninges. Estudos recentes mostram que este mecanismo de evasão pode estar relacionado com a capacidade das Leptospiras em aderir a proteínas de matriz extracelular das células do hospedeiro (QUINN et al., 2005; BARBOSA et al. 2010).

3. BIOATIVOS PRESENTES NAS PEÇONHAS

3.1. LAAO (L-amino acid oxidase)

As LAAOs são enzimas que catalisam a desaminação de L-aminoácidos para formar os correspondentes a-cetoácidos, peróxido de hidrogénio e amônia. São amplamente distribuídas nas famílias de serpentes venenosas Viperidae, Crotalidae e Elapidae e responsáveis pela coloração amarela das peçonhas, contendo flavina como grupo protético (TAN, 1998; ZHANG et al., 2004).

Provavelmente essas enzimas contribuem para a toxicidade do veneno devido à produção de peróxido de hidrogênio durante a reação de oxidação (ZHANG et al., 2004). Elas também podem apresentar atividade antimicrobianas, antiprotozoária, leishmanicida ou anticoagulante, induzem a agregação plaquetária, são citotóxicas e antiproliferativas em células tumorais. Porém as atividades da LAAO são inibidas na presença de catalase (RODRIGUES et al., 2009). No estudo de Rogrigues et al. (2009) a LAAO suprimiu o crescimento de Gram negativas (*E. coli*) e Gram-positivas (*S. aureus*), com maior ação bactericida em *E. coli*. De acordo com Zhang et al.(2004) a enzima LAAO (isolada da peçonha de *Agkistrodon halys*) liga-se à superfície celular das bactérias e assim gera concentrações elevadas de peróxido no local, inibindo crescimento bacteriano com uma pequena porção da enzima. LAAOs isoladas de outras serpentes, como *B. alternatus*, *Crotalus durissus cascavella*, *B. pirajai*, *B. moojeni*, *B. pauloensis* também expressaram ação antimicrobiana, inibindo o crescimento de *E. coli* e *S. aureus* (STÁBELI et al., 2004, 2007; TOYAMA et al., 2006; IZIDORO et al., 2006).

É relevante que a ação antibacteriana das LAAOs é provocada por H₂O₂ geradas a partir de L-amino ácidos como substrato, uma vez que essa ação é notavelmente reduzida no presença de H₂O₂ de catalase. Todavia, a forma detalhada da ação antibacteriana pela H₂O₂ não é totalmente compreendida, o H₂O₂ pode induzir o estresse oxidativo nas células alvo, promovendo uma desorganização da membrana celular e citoplasmática, culminando em morte celular (TOYAMA et al., 2006; TEMPONE et al., 2001).

3.2 LECTINA

As Lectinas são proteínas não enzimáticas presentes no veneno de várias serpentes. Acredita-se que ela contribua para os efeitos sistêmicos do envenenamento provocando edema e alterando a permeabilidade vascular (PANUNTO et al., 2006).

Outros efeitos podem incluir a ativação e migração de neutrófilos, indução da agregação plaquetária, aumento da secreção de insulina e alterações na pressão de perfusão, resistência vascular renal e urinária (HAVT et al., 2005; BARBOSA et al., 2010).

Diversas aplicações terapêuticas têm sido propostas para a Lectina, incluindo a terapia contra o câncer. A Lectina isolada da peçonha de *B. jararacuçu* demonstrou efeitos citotóxicos contra células de carcinoma gástrico devido à diminuição da viabilidade celular, desorganização dos filamentos de actina e apoptose. Da mesma forma, outras Lectinas isoladas de peçonha de cobra foram citotóxicas para diferentes células tumorais, distinguindo de maneira ainda desconhecida, entre células normais e malignas (MENDONÇA et al., 2011; NOLTE et al., 2012).

A Lectina isolada de *B. pauloensis* possui atividade hemoaglutinante 16 vezes maior do que a peçonha bruta (CASTANHEIRA et al., 2013).

De acordo com Du e Clementson (2010), Nunes et al. (2011) e Castanheira et al. (2013), a Lectina foi capaz de inibir o crescimento de bactéria Gram positiva (*S.aureus*), mas não teve efeito sobre bactéria Gram negativa (*E.coli*). Os autores sugerem que as Lectinas não são capazes de atravessar a membrana externa das bactérias Gram negativas, por isso não têm efeitos

sobre elas. No entanto, as Lectinas conseguem interagir com os peptideoglicanos presentes na parede celular das bactérias Gram positivas e dessa maneira inibem seu crescimento.

3.3 METALOPROTEASES

As Metaloproteases são enzimas que interferem na cascata de coagulação sanguínea e na agregação plaquetária. Juntamente com outras proteínas como as Serinoproteases, Desintegrinas, Fosfolipases A2 e Lectinas tipo-C, as Metaloproteases causam hemorragia e necrose local. Muitas dessas proteínas são usadas como drogas para o tratamento de tromboses (RODRIGUES, et al. 2012; RODRIGUES et al., 2015).

A depleção de fibrinogênio coagulável circulante em conjunto com a ação das Serinoproteases "Trombine-like" que atingem os fatores de coagulação, podem, sinergicamente potencializar a atividade das Metaloproteases (PIII), resultando em aumento da incidência de Sangramento. As metaloproteases são abundantes na peçonha de *B. pauloensis* e pouco presentes na peçonha de *C. durissus* (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012). A ação das Metaloproteases sobre bactérias é pouco conhecida.

3.4 PEPTÍDEOS POTENCIALIZADORES DE BRADICININA (BPPs)

Os BPPs são inibidores de ECA, aumentando assim o efeito hipotensor da bradicinina circulante, causando um choque vascular na vítima (FERREIRA et al., 1970; LUFT, 2008). Possuem efeitos biológicos de natriurese (excreção de sódio na urina através dos rins) e diurese (aumento da produção de urina pelos rins) (VINK et al., 2012).

O medicamento Captopril® foi desenvolvido com base na estrutura dos BPPs isolados da peçonha de *B. jararaca*. Este medicamento é um agente hipotensor capaz de inibir a enzima conversora da angiotensina (ECA), diminuindo a pressão arterial nos mamíferos (FERREIRA, 1965).

3.5 FOSFOLIPASES A2 (PLA2s)

As Fosfolipases estão principalmente relacionadas ao acentuado dano tecidual no local da picada. Causam mionecrose, edema, inflamação e lesão muscular aguda (RODRIGUES et al., 2012). As PLA2s podem atuar sobre membranas celulares de tecidos específicos por um mecanismo catalisador, e isso pode resultar em vários ações. Além da miotoxicidade e edema, pode haver neurotoxicidade pré e/ou pós-sináptica, cardiotoxicidade, ativação ou inibição da agregação plaquetária, hipotensão, entre outros (KINI, 2003; FERREIRA et al., 2013).

A alta concentração de PLA2 no proteoma da peçonha de *B. pauloensis* (26-32%) contribui para pronunciada necrose local, um sinal clínico característico da picada dessa serpente. Adicionalmente as PLA2s isoladas de *B. pauloensis* apresentaram alta atividade hemolítica indireta e inibem a agregação plaquetária induzida pelo colágeno ou ADP (RODRIGUES et al., 2007; RODRIGUES et al., 2012).

O mecanismo pelo qual as PLA2s induzem edema pode ser explicado por hidrólise de fosfolipídios, provavelmente devido à liberação dos precursores de diversos eicosanóides e fatores de ativação plaquetária (DOS SANTOS et al., 2008, LOMONTE et al., 2009). A PLA2 (K49) usa sua porção C-terminal para romper as membranas plasmáticas, causando o efeito de miotoxicidade (LOMONTE et al., 2003).

Devido às suas propriedades farmacológicas, as PLA2s são promissoras como modelos terapêuticos, uma vez que numerosos estudos têm focado em suas atividades microbicidas, antitumorais, antiplaquetárias, antiangiogênicas e hipotensoras (BARBOSA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2009; SAMEL et al., 2013).

Vários autores já confirmaram a atividade bactericida das PLA2s, inclusive sobre *E. coli* e *S. aureus* (PARAMO et al., 1998; SOARES et al., 2000; RODRIGUES et al., 2004; NEVALAINEN et al., 2008). O mecanismo de ação parece estar relacionado à habilidade das PLA2s mióticas de se ligar às camadas duplas de lipídio da membrana celular, desencadeando uma desordem na membrana plasmática. Esse fenômeno pode ocorrer independente da atividade catalítica das PLA2s, já que os peptídeos da porção

C-terminal demonstram efeito bactericida (PARAMO et al., 1998; SOARES et al., 2000).

As PLA2s de ação de neurotóxica, são também chamadas de Crotoxinas e constituem a maior parte da peçonha de *C. durissus*. As PLA2s miotóxicas também estão presentes, porém em menores concentrações. A peçonha de *C. durissus* ainda possui em seu proteoma a Crotamina, um peptídeo de efeito neurotóxico. Essa composição da peçonha explica o sinal clínico característico da picada dessa serpente, a neurotoxicidade sistêmica (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010).

4. *Bothrops pauloensis*

No Brasil existem 27 espécies de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* (BÉRNILS; COSTA, 2014), que são conhecidas popularmente por: Jararaca, Jararacuçu, Urutu ou Caiçara (BRASIL, 2001).

A *Bothrops pauloensis*, conhecida como Jararaca pintada, pode ser encontrada nos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Paraná, mas é particularmente comum no Triângulo Mineiro, região sudoeste de Minas Gerais (VALLE; BRITES, 2008).

As principais classes de toxinas encontradas na peçonha de *B. pauloensis* são as Metaloproteases (37%), PLA2s (26-32%) e os vasoativos BPPs (12-17%). Além disso, estão presentes as Lectinas (8,6%), Serinoproteases (5,3%), LAAO (2,9%). Em menor proporção encontra-se NGF - Fator de Crescimento Nervoso, CRISP - Proteína Secretora Rica em Cisteína, VEGF -Fator de Crescimento Endotelial Vascular, 5'nucleotidase, Ohanin e Hialuronidase (RODRIGUES et al., 2012).

As toxinas mais abundantes determinam a sintomatologia clínica característica da picada de *Bothrops*, que é formação rápida de edema, dor, equimose, hemólise sistêmica, hemorragia, inflamação, necrose cutânea, mionecrose local, perturbações da coagulação do sangue e choque hipotensivo (NISHIOKA; SILVEIRA, 1992; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995).

O acidente ofídico causado por serpentes do gênero *Bothrops* é o de maior importância e distribuição dentre os acidentes ofídicos no Brasil (BRASIL, 2014).

5. *Crotalus durissus*

No Brasil, o gênero *Crotalus* está representado por uma única espécie, a *Crotalus durissus*, também conhecida como Cascavel neotropical (WÜSTER et al., 2005). Sete subespécies de *C. durissus* são reconhecidas no Brasil (*C. d. Dryinas*, *C. d. Marajoensis*, *C. d. Ruruima*, *C. d. Trigonius*, *C. d. Terrificus*, *C. d. Cascavella* e *C. d. Collilineatus*) (CARDOSO, 2003). No entanto, alguns autores consideram *C. d. Cascavella* e *C. d. Collilineatus* como sinonímia de *C. d. Terrificus* (SANTORO et al., 1999; WÜSTER et al., 2005).

As composições das peçonhas de *C. d. subespécies cascavella* e *collilineatus* são semelhante a de *C. d. terrificus*, apoiando a visão de que essas subespécies podem ser considerados como variações geográficas da mesma espécie, sendo a *C. d. terrificus* encontrada na região sul do Brasil.

A constituição da peçonha da *C. durissus* se dá, em sua maior parte, pela Crotoxina (67,4 – 72,5%), além de outras PLA2s (4,6 – 18,1%) e Crotamina (20,8%). Em menor proporção aparecem a LAAO (0,1-0,5%), Lectina (<0,1%), Serinoproteases (1,2-1,9%), Metaloprotease (0,1-0,4%), VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular (1,1-2,1%) e CRISP - Proteína Secretora Rica em Cisteína (0,9-1,8%) (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010).

Essa toxinas desencadeiam na vítima sinais clínicos como neurotoxicidade sistêmica que é frequentemente acompanhada por abdomiólise (lesão de tecido muscular esquelético), distúrbios da coagulação seguidos de mioglobinúria e insuficiência renal aguda, que é a principal causa de morte. As cascavéis causam a maior parte dos acidentes ofídicos fatais no país (OSHIMA-FRANCO et al., 1999; CARDOSO, 2003; AZEVEDO-MARQUES et al., 2009).

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira and Leptospirosis*. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n.3-4, p. 287-296, 2010.
- ALTWEGG, M; BOCKMUHL, J. *Escherichia e Shigella*. In: COLLIER, L.; BALOWS, A. SUSSMAN, M. **Topley & Wilson Microbiology and microbial infection**. 9 ed., London: Arnold. 1998, pp. 948-950.
- ARGUDIN, M.A.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 1751-1773, 2010.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente crotálico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANCA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. (eds). **Animais Peçonhentos no Brasil**. Biología, Clínica e Terapêutica dos Acidentes, 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 108–115.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 1–10, 2000.
- BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; TOYAMA, M. H.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Purification and biological effects of a C-type lectin isolated from *Bothrops moojeni*. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 16, n. 3, pg. 493-504, May 2010.
- BARBOSA, P. S.; MARTINS, A. M.; HAVT, A.; TOYAMA, D. O.; EVANGELISTA, J. S.; FERREIRA, D. P.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O.; TOYAMA, M. H.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v. 46, n. 4, p. 376-386, 2005.
- BERGEY, S.; WILLIAMS, M.D.; WILKINS, S.T., **Manual of Determinative Bacteriology**, 9 ed., Baltimore, 1994, p.787.
- BÉRNILS, R.S.; COSTA, H.C. 2014. **Répteis brasileiros: Lista de espécies**. Versão 2014. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Acesso em: 04 jan.2017.
- BOLDRINI-FRANÇA, J.; CORRÊA-NETTO, C.; SILVA, M. M.; RODRIGUES ,R. S.; DE LA TORRE, P.; PÉREZ ,A.; SOARES, A. M.; ZINGALI, R.B.; NOGUEIRA, R. A.; RODRIGUES, V. M.; SANZ, L.; CALVETE ,J. J. Snake venomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **Journal of Proteomics**, Weinheim, v.73, n. 9, pg.1758–1776, August 2010.
- 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 em saúde.** Volume único, Brasília-DF, 2014. 719p.

BROD, C.S.; ALEIXO, J.A.G; JOUGLARD, S.D.D.; FERNANDES, C.P.H.; TEIXEIRA, J.L.R.; DELLAGOSTIN, O.A. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular, e utilização em inquérito sorológico. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v.38, n.4, p. 294-300, 2005.

CARDOSO, J. L. C. **Animais peçonhentos no Brasil:** biologia clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier; 2003.

CASTANHEIRA, L.E.; NUNES, D.C.; CARDOSO, T.M.; SANTOS, P.D.E. S.; GOULART, L.R.; RODRIGUES, R.S.; RICHARDSON, M.; BORGES, M.H.; YONEYAMA, K.A.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, Colorado, v. 54, pg.57-64, March 2013.

CULLEN, P.A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A.I.; HAAKE, D.A.; ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, v.73, p.4853–4863, 2005.

DOLEJSKA, M.; CIZEK, A.; LITERAK, I. High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from Black-headed Gulls in the Czech Republic. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.1, p.11-19, 2007.

DOS SANTOS, M. L.; FAGUNDES, F. H.; TEIXEIRA, B. R.; TOYAMA, M. H.; APARICIO, R. Purification and preliminary crystallographic analysis of a new Lys49-PLA₂ from *B. jararacussu*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 5, p. 736–750, May 2008.

DU, X.; CLEMENTSON, K.J. Thrombin-Like Snake Venom Serine Proteinases, In: MARCKESSY, S.P. (Ed.). **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. New York: CRC Press, 2010. cap. 6, pg. 139-154.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. Medisci: Melbourne, 1999, 272p.

FERREIRA, F. B.; GOMES, M. S.; DE SOUZA, D. L.; GIMENES, S. N.; CASTANHEIRA, L. E.; BORGES, M. H.; RODRIGUES, R. S.; YONEYAMA, K. A.; BRANDEBURGO, M. I.; RODRIGUES, V. M. Molecular cloning and pharmacological properties of an acidic PLA₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxins**, v. 5, n. 12, p. 2403-2419, 2013.

FERREIRA, S. H. A. Bradykinin-Potentiating Factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, London, v. 24, n.1, pg. 163-169, February 1965.

- FERREIRA, S.H.; BARTELT, D.C.; GREENE, L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, Washington, v.9, n.13, pg.2583-93, June 1970.
- GUIMARÃES, R.A.; NETO, D.F.L.; SARAIVA, M.D.M.S.; LIMA, R.P.; BARROS, M.R.; DA COSTA, M.M.; STIPP, D.T. (Caracterização filogenética molecular e resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de caprinos neonatos com diarreia. **Ciência Animal Brasileira**, v.16, n.4, p.615-622, 2015.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venoms. **Memórias do Instituto Butantan**, v.33, p.1405-1474.
- HAVT, A.; TOYAMA, M.H.; DO NASCIMENTO, N.R.; TOYAMA, D.O.; NOBRE, A.C.; MARTINS, A.M.; BARBOSA, P.S.; NOVELLO, J.C.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO EM, FONTELES MC, MONTEIRO HS. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney, **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Amsterdam, v.37, n.1, pg.130-141, January 2005.
- IZIDORO, L.F.; RIBEIRO, M.C.; SOUZA, G.R.; SANT'ANA, C.D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GOULART, L.R.; BELEBONI, R.O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. ; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v.14, n.20, pg. 7034-7043, October 2006.
- KATHOLM, J.; BENNEDSGAARD, T.W.; KOSKINEN, M.T.; RATTENBORG, E. Quality of bulk tank milk samples from Danish dairy herds based on real-time polymerase chain reaction identification of mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 5702-5708, 2012.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.
- LANGONI, H. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v.2, n.1, p.52-58, 1999.
- LARSON, R. **Bovine Leptospirosis**. Iowa State: University Veterinarian, v.26, n. 2, 1963.
- LE GALL, T.; CLERMONT, O.; GOURIOU, S.; PICARD, B.; NASSIF, X.; DENAMUR, E.; TENAILLON, O. "Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains." **Molecular biology and evolution**, v.24, n.11, p. 2373-2384, 2007.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, p. 63-76, 2003.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885-901, December 2003.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SASA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. The phospholipase A₂ homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. **Protein and Peptide Letters**, v. 16, n. 8, p. 860–876, 2009.

LUFT, F.C. The *Bothrops* legacy: vasoactive peptides from Brazil. **The Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, London, v.10, n.1, pg. 57–64, March 2008.

MENDONCA-FRANQUEIRO, E. P.; ALVES-PAIVA, R. M.; SARTIM, M. A.; CALLEJON, D.R.; PAIVA, H.H.; ANTONUCCI, G.A.; ROSA, J.C.; CINTRA, A.C.; FRANCO, J.J.; ARANTES, E.C.; DIAS-BARUFFI, M.; SAMPAIO,S.V. Isolation, functional, and partial biochemical characterization of galatrox, an acidic lectin from *Bothrops atrox* snake venom. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Oxford, v. 43, n. 3, pg. 181-192, March 2011.

NEVALAINEN, T. J.; GRAHAM, G. G.; SCOTT, K. F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A₂. Review. **Biochim Biophys Acta**, v. 1781, n. 1-2, p. 1-9, 2008.

NISHIOKA, S.A.; SILVERA, P.V.P. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.47, p.805–810, 1992.

NOLTE, S.; DE CASTRO, D. D.; BARÉA, A.C.; GOMES, J.; MAGALHÃES, A.; MELLO ZISCHLER, L.F.; STUEL-P-CAMPELO, P.M.; ELÍFIO-ESPOSITO, S.L.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; REIS, C.A.; MORENO-AMARAL, A.N. BJcuL, a lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. **Toxicon**, Amsterdam, v.59, n.1, pg. 81–85, January 2012.

NUNES, E.S.; DE SOUZA, M.A.; VAZ, A.F.; SANTANA, G.M.; GOMES, F.S.; COELHO, L.C.; PAIVA, P.M.; DA SILVA, R.M.; SILVA-LUCCA, R.A; OLIVA, M.L.; GUARNIERI, M.C; CORREIA, M.T. Purification of a Lectin with Antibacterial Activity from *Bothrops leucurus* Snake Venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v.159, n.1, pg.57-63, May 2011.

OSHIMA-FRANCO, Y.; HYSLOP, S.; PRADO, J. F.; CRUZ-HOFFLING, M. A.; RODRIGUEZ, L. S. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South-American rattlesnake) venom and its main toxin, crototoxin. **Toxicon**, v. 37, p. 1341-1357, 1999.

PANUNTO, P.C.; DA SILVA M.A.; LINARDI, A.; BUZIN, M.P.; MELO, S.E.; MELLO, S.M.; PRADO- FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, Amsterdam, v.1, n.47, pg. 21–31, January 2006.

PARAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDA, J.; BENGOCHEA, J. A.; GORVEL, J. P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom - Synthetic Lys49

myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. **European Journal of Biochemistry**, v. 253, n. 2, p. 452-46, May 1998.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical veterinary microbiology**. London: wolfe, 1994, 648p.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic PLA₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, n. 1, p. 153–165, July 2007.

RODRIGUES, R. S.; DA SILVA, J. F.; BOLDRINI FRANCA, J.; FONSECA, F. P.; OTAVIANO, A. R.; HENRIQUE SILVA, F.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S.; DOS SANTOS, J. I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie**, v. 91, n. 4, p. 490-501, April 2009.

RODRIGUES, R.S.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F.P.; DE LA TORRE, P.; HENRIQUE-SILVA, F.; SANZ, L.; CALVETE, J.J.; RODRIGUES, V.M. Combined snake venomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**, Weinheim, v.75, n.9, pg. 2707–2720, May 2012.

RODRIGUES, V. M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R. S.; DE ARAUJO, A. L.; MALTA-NETO, N. R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 305-314, 2004.

RODRIGUES, V. M.; LOPES, D.S.; CASTANHEIRA, L. E.; GIMENES, S.N.; NAVES DE SOUZA, D.L.; ACHE, D. C.; BORGE, I. P.; YONEYAMA, K.A.; RODRIGUES, R. S. *Bothrops pauloensis* Snake Venom Toxins: The Search for New Therapeutic Models. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Beijing, v. 15, n.5, pg. 670-684, March 2015.

SAMEL, M.; VIJA, H.; KURVET, I.; KUNNIS-BERES, K.; TRUMMAL, K.; SUBBI, J.; KAHRU, A.; SIIGUR, J. Interactions of PLA₂-s from *Vipera lebetina*, *Vipera berus berus* and *Naja naja oxiana* venom with platelets, bacterial and cancer cells. **Toxins**, v. 5, n. 2, p. 203-223, 2013.

SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; GONÇALVES, L. R. C.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; CARDOSO, D. F.; LAPORTA-FERREIRO, L. I.; SAIKI, M.; PERES, C. A.; SANO-MARTINS, I. S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 122, n. 1, p.61-73, 1999.

SHANG, E.S.; EXNER, M.M.; SUMMERS, T.A.; MARTINICH, C.; CHAMPION, C.I.; HANCOCK, R.E.; HAAKE, D.A. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. **Infection and Immunity**, v.63, p.3174–3181, 1995.

SHERLEY, M.; GORDON, D.M.; COLLIGNON, P.J. Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. **Microbiology**, v.150, n.5, p.1539-1546, 2004.

SOARES, A. M.; GUERRA-SA, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and Functional Characterization of BnSP-7, a Lys49 Myotoxic Phospholipase A₂ Homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* Venom. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 378, n. 2, p. 201-209, June 2000.

STÁBELI, R.G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; PIETRO, R.C.L.R.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, E.B.; SOARES, A.M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 12, n.11, pg. 2881–2886, June 2004.

STÁBELI, R.G.; SANT'ANA, C.D.; RIBEIRO, P.H.; COSTA, T.R.; TICLI, F.K.; PIRES, M.G.; NOMIZO, A.; ALBUQUERQUE, S.; MALTA-NETO, N.R.; MARINS, M.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v.41, n.2, pg.132–140, July 2007.

TAN, N.H.; L-Amino acid oxidases and lactate dehydrogenases, In: BAILEY, G.S. (Ed.). **Enzymes from Snake Venom**, Colorado: Alaken Inc., Fort Collins, 1998, pg. 579–598.

TAPERO, J.W., ASHFORD, D. A., PERKINS, B. A. *Leptospira* species (Leptospirosis). In: MANDELL, G.L.; BENNET, J. E.; DOLIN, R. M.; DOUGLAS and BENNETT's. **Principles and Practice of Infections diseases**, Philadelphia: Churchill, 2000, 3904p.

TAPERO, J.W.; ASHFORD, D.A.; PERKINS, B.A. *Leptospira* species (Leptospirosis) In: MANDELL, G.; BENNETT, J.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infectious Diseases**, Philadelphia: 5 ed., Churchill-Livingstone, 2000.

TEMPONE, A.G.; ANDRADE, H.F. JR.; SPENCER, P.J.; LOURENÇO, C.O.; ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills Leishmania spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v. 280, n.3, pg.620–624, January 2001.

TOYAMA, M.H.; TOYAMA, D.O.; PASSERO, L.F.D; LAURENTI, M.D.; CORBETT,C.E.; TOMOKANE, T.Y.; FONSECA, F.V.; ANTUNES, E.;

JOAZEIRO, P.P.; BERIAM,L.O.S.; MARTINS, M.A.C.; MONTEIRO, H.S.A.; FONTELES, M.C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, Amsterdam, v.47, n.1, pg. 47–57, January 2006.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 5 ed., São Paulo: Atheneu, 2008, 760 p.

VALLE, A.L.; BRITES, V.L.C. Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloensis* (Amaral, 1925) em áreas antropizadas do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zoociências**, v.10, p.155–161, 2008.

VINK, S.; JIN, A.H.; POTH, K.J.; HEAD, G.A.; ALEWOOD, P.F. Natriuretic peptide drug leads from snake venom. **Toxicon**, Amsterdam, v.59, n.4, pg. 434–45, March 2012.

WELCH, R. A. The genus *Escherichia*. **The prokaryotes**, v.6, p.60-71, 2006.

WÜSTER, W.; FERGUSON, J. E.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A.; POOK, C. E.; SALOMÃO, M. G.; THORPE, R. S. Tracing an invasion: landbridges, refugia and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). **Molecular Ecology**, 2005, v. 14, p. 105–108.

YINGST, S. L.; SAAD, M. D.; FELT, S. A. Classifying *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n.18, p. 1297-1298, 2006.

ZHANG, H.; TENG, M.; NIU, L.; WANG, Y.; LIU, Q.; HUANG, Q.; Q. HAO Y. DONG, P. LIU, Purification, partial characterization, crystallization and structural determination of AHP-LAAO, a novel L-amino-acid oxidase with cell apoptosis-inducing activity from *Agkistrodon halys pallas* venom. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, Chester, v.60, n.5, pg. 974–977, May 2004.

CAPÍTULO 2 – POTENCIAL ANTIBIÓTICO DAS PEÇONHAS DE *Bothrops pauloensis* E *C. durissus terrificus*

RESUMO – As peçonhas de serpentes são constituídas por uma diversidade de moléculas bioativas com funções biológicas, bioquímicas e farmacológicas. O potencial dessas substâncias para formulação de novos medicamentos tem sido amplamente investigado. Sendo assim, o objetivo dessa pesquisa foi identificar e avaliar a ação antibacteriana das peçonhas brutas das serpentes *Bothrops pauloensis* e *Crotalus durissus terrificus*. Para isso, foi realizado o Teste de difusão em disco e o Teste de microdiluição em caldo. As bactérias utilizadas nestes ensaios foram *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Leptospira interrogans*. *E. coli* se mostrou resistente à todas as concentrações das peçonhas testadas. *S. aureus* foi sensível às duas peçonhas, porém a sensibilidade foi significativamente maior para a peçonha de *B. pauloensis*. A *Leptospira* foi resistente à peçonha de *B. pauloensis* e apresentou sensibilidade dose dependente para a peçonha de *C. d. terrificus*.

Palavras chave: Antibacteriano, Peçonha, *B. pauloensis*, *C. durissus*

INTRODUÇÃO

As infecções causadas por bactérias resistentes à antibióticos, muitas vezes não respondem ao tratamento convencional, resultando em doença prolongada, com maior risco de morte e custos mais elevados de tratamento (WHO, 2013). Dentre as principais bactérias de importância clínica que apresentam resistências aos antimicrobianos estão *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (ANVISA, 2007; WHO, 2016). Por isso, se faz necessário a descoberta de novas alternativas para o tratamento das infecções que envolvem os diversos micro-organismos patogênicos.

Venenos de serpente representam uma rica fonte de moléculas bioativas com importantes atividades farmacológicas que possuem um grande potencial para a produção de medicamentos (KOH et al., 2006).

No Brasil, existem 27 espécies de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* (BÉRNILS; COSTA, 2014), e o gênero *Crotalus* está representado por uma única espécie, a *Crotalus durissus* (WÜSTER et al., 2005). Dentre as espécies de *Bothrops*, a *B. pauloensis* é particularmente comum no Triângulo Mineiro, região sudoeste de Minas Gerais (VALLE; BRITES, 2008) e a subespécie *C. d. terrificus*, pode ser encontrada na região sul (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010) .

As peçonhas dessas serpentes já foram caracterizadas quanto à composição bioquímica (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010; RODRIGUES et. al., 2012), e a atividade de componentes isolados já foi testada contra algumas bactérias, como *E. coli* e *S. aureus* (RODRIGUES et al. 2004; 2009; YAMANE,

2013). Contra *Leptospira interrogans*, bactéria que causa importante zoonose, ainda é desconhecida a ação das peçonhas de serpente.

Tendo em vista o potencial antimicrobiano das peçonhas de diversas espécies de serpente, o objetivo desta pesquisa foi identificar e avaliar a intensidade da ação antibacteriana da peçonha bruta da serpente *B. pauloensis*, em comparação com a peçonha bruta de *C. d. terrificus* contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Microrganismos e peçonhas utilizados

Foram utilizadas cepas bacterianas da American Type Culture Collection (ATCC), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, e *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae do acervo biológico do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da UFU.

As peçonhas foram extraídas de serpentes *Bothrops pauloensis* (PBP) e *Crotalus durissus terrificus* (PCT) mantidas no serpentário do Instituto de Biologia da UFU sob autorização do IBAMA (nº de registro 301286). As peçonhas foram cedidas liofilizadas pelo Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais da UFU.

Todas as peçonhas foram submetidas a teste de esterilidade em ágar sangue antes de serem utilizadas.

2. Teste de difusão em disco (Kirby-Bauer)

Os testes de difusão em disco foram realizados de acordo com o protocolo M02-A11 (CLSI, 2012) para *E. coli* e *S. aureus*. Este teste não foi realizado para *Leptospira interrogans*, pois ela rotineiramente não apresenta crescimento em ágar.

As peçonhas (PBP e PCT) brutas liofilizadas foram diluídas em água destilada estéril. Em seguida, aplicou-se sobre discos de papel filtro estéreis 40µl das peçonhas diluídas nas concentrações 1,5 e 3,0 mg/ml.

Colônias de *S. aureus* e *E.coli* foram diluídas em solução salina a 0,85% e ajustadas à escala 0,5 de McFarland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC. Em seguida, cada inóculo foi esgotado em placas de petri contendo ágar Mueller Hinton e em cada placa foi posicionado um disco contendo 1,5mg/ml e outro contendo 3,0mg/ml de PBP. O mesmo foi feito com discos contendo as duas concentrações de PCT.

Discos comerciais de enrofloxacina foram utilizados como controle positivo para validação dos testes.

Foram consideradas com atividade antimicrobiana aquelas concentrações das peçonhas que apresentassem qualquer halo de inibição do crescimento bacteriano em torno do disco. As zonas de inibição foram registradas em mm de diâmetro. Todos os testes foram realizados em triplicata e considerou-se a média dos diâmetros dos halos de inibição para cada concentração testada.

3. Teste de Microdiluição em Caldo

Os testes foram realizados com base no protocolo M07-A9 (CLSI, 2012). As bactérias que apresentaram qualquer halo de inibição após o teste de difusão em disco foram submetidas ao teste de Microdiluição em caldo para tentar determinar a concentração inibitória mínima (CIM). Estes testes foram realizados em triplicata e as leituras foram feitas em leitor de ELISA a 570nm.

3.1. *Staphylococcus aureus*

S.aureus foi diluída em solução salina a 0,85% e ajustada na escala 0,5 de McFarland. 100 μ l do inóculo juntamente com 100 μ l da PBP a 1,5mg/ml foi adicionado ao primeiro poço de uma placa de poliestireno (96 poços de fundo chato) estéril. Nos 4 poços abaixo, contendo 100 μ l de inóculo, foram realizadas diluições seriadas decimais. Sendo assim, o primeiro poço conteve a maior concentração DE PBP ($1,5 \times 10^0$) e o quinto poço conteve a menor concentração da PBP ($1,5 \times 10^{-4}$). O mesmo procedimento foi realizado para PCT na concentração 3,0mg/ml, e da mesma forma, o primeiro poço conteve a maior concentração de PCT ($3,0 \times 10^0$) e o quinto poço a menor concentração ($3,0 \times 10^{-4}$). Como controle havia poços contendo apenas inóculo, PBP a 1,5mg/ml e PCT a 3,0 mg/ml. As placas foram incubadas a 36°C por 20 horas.

3.2. *Leptospira interrogans*

Cultura de *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae com 7 dias de crescimento, foi submetida a diluições seriadas decimais de 200µl juntamente com 200µl de PBP a 3,0mg/ml. Sendo o primeiro poço da placa o de maior concentração da PBP, e o quinto, a menor concentração ($3,0 \times 10^0$ e $3,0 \times 10^{-4}$ respectivamente). O mesmo procedimento foi realizado para PCT também a 3mg/ml. Como controle havia poços contendo apenas inóculo, PBP e PCT a 3,0 mg/ml. As placas foram incubadas em estufa BOD a 30°C por 72 horas (MIRAGLIA, 2013; CLSI, 2012).

4. Teste de motilidade para *Leptospira interrogans*

Após o preparo das placas para o teste de Microdiluição em caldo, as mesmas foram observadas em microscópio de campo escuro (aumento 10X) no momento da adição das peçonhas e depois com 24, 48 e 72 horas de incubação. Foi analisada a movimentação característica da *Leptospira* para confirmação da sua viabilidade.

5. Inoculação de *S. aureus* e *L. interrogans* em meio de cultura

Para confirmação da inibição do crescimento bacteriano, as cinco diluições feitas para cada bactéria foram inoculadas em meio próprio para crescimento.

As cinco diluições de *S.aureus* e PBP, assim como as cinco diluições de *S. aureus* e PCT, após o período de incubação de 20 horas, foram inoculadas em ágar sangue e novamente incubadas a 36°C por 24 horas. A avaliação do crescimento foi feita visualmente, pela presença ou ausência de colônias características.

Da mesma forma, 100µl de cada uma das diluições de *L. interrogans* com PBP e com PCT, após 72 horas de incubação, foram pipetados para os respectivos tubos de vidro estéreis contendo 1 ml de meio EMJH enriquecido com soro de coelho. Em seguida, os tubos foram incubados em estufa BOD a 30°C por 7 dias. O crescimento da *L. interrogans* nos tubos foi avaliado por turvação do meio de cultura, em caixa de luz indireta, e por investigação da presença de Leptospiras viáveis no conteúdo de cada tubo em microscópio de campo escuro.

6. Análise Estatística

Foi realizado o teste estatístico T de Student, considerando duas amostras independentes, para comparar os tamanhos dos halos (em milímetros de diâmetro) formados no Teste de Difusão em Disco. Foi considerada a média dos diâmetros dos halos de inibição das triplicatas, para cada concentração testada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes de difusão em disco, *E.coli* foi resistente às duas peçonhas (de *Bothrops pauloensis* e *Crotalus durissus terrificus*), pois em todas as concentrações testadas não houve formação de halo de inibição. Por isso, não foi usada no teste de Microdiluição em Caldo para determinação da concentração inibitória mínima (Fig. 1A e 1B).

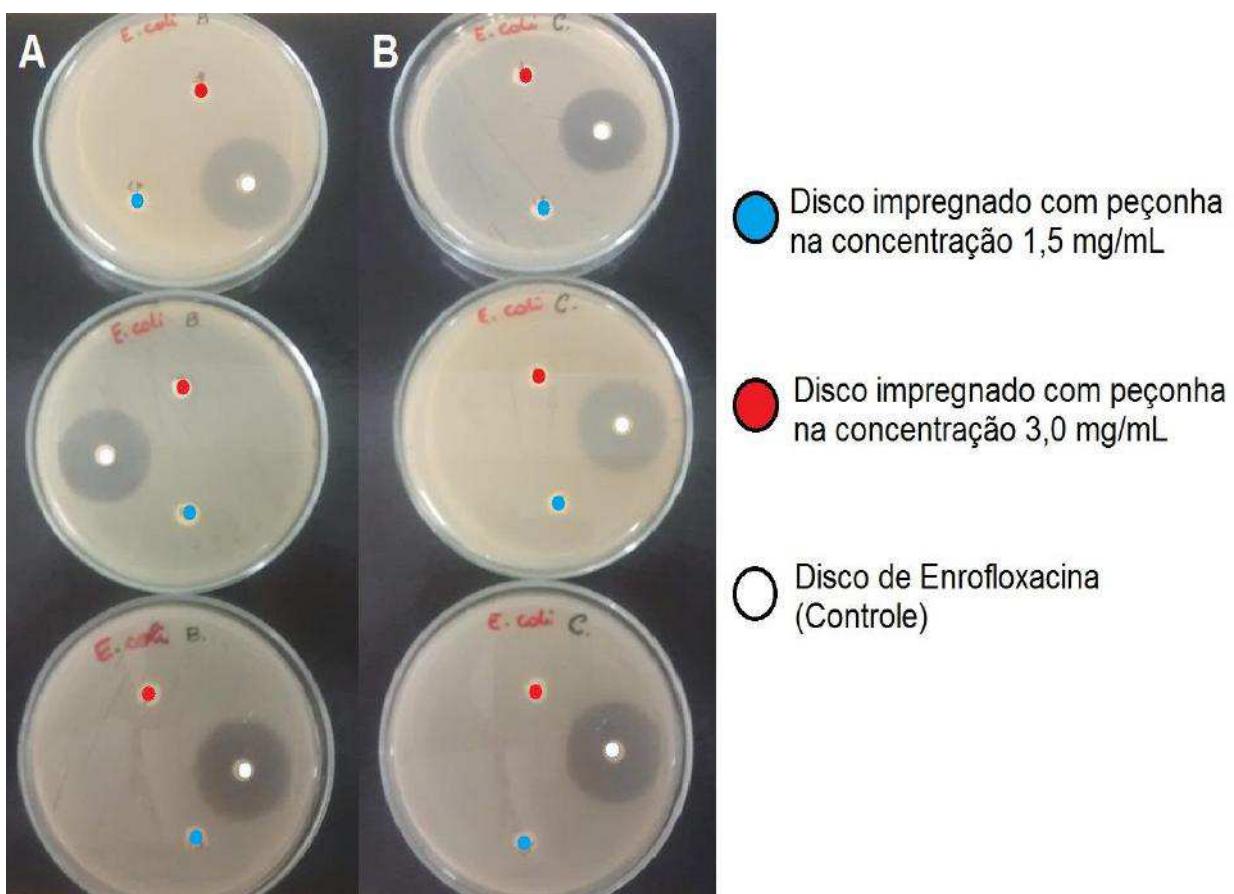


Fig.1. Triplicata dos testes de difusão em disco para *E. coli* e PBP nas concentrações 1,5 e 3,0 mg/mL (A) e *E. coli* com PCT nas concentrações 1,5 e 3,0 mg/mL (B).

Resultado semelhante foi obtido por Ciscoto et al. (2009) que utilizaram a peçonha bruta de *Bothrops* spp (*B. jararaca* e *B. jararacuçu*), e esta não conseguiu inibir a multiplicação de *E. coli*. Entretanto, vários pesquisadores demonstraram que componentes isolados da peçonha de diferentes espécies de *Bothrops*, inclusive a *B. pauloensis*, tiveram efeito bactericida sobre *E. coli*.

Dentre esses componentes isolados destacam-se a L-amino acid oxidase - LAAO (STÁBELI et al., 2004; IZIDORO et al., 2006; STÁBELI et al., 2007; RODRIGUES et al., 2009; PAIVA et al., 2011; COSTA, 2012) e Fosfolipases A2 - PLA2s (RODRIGUES et al., 2004).

Em relação à peçonha bruta de *C. durissus*, Stiles et al. (1991) também não encontraram inibição sobre *E. coli*. Porém, a LAAO isolada de *C. d. cumanensis* não inibiu a multiplicação de *E. coli* (VARGAS et al., 2013), mas a Crotamina isolada da peçonha de *C. d. terrificus*, inibiu (YAMANE et al., 2013).

Nota-se que, alguns componentes isolados das peçonhas, conseguem inibir a multiplicação de *E. coli*, porém nesta pesquisa, a peçonha bruta não foi eficiente. Sabe-se que alguns componentes isolados já demonstraram atividade várias vezes maior do que a peçonha bruta (CASTANHEIRA et al., 2013).

As colônias de *S. aureus* demonstraram sensibilidade às duas peçonhas, pois houve formação de halos de inibição nas concentrações 1,5 e 3,0mg/mL da peçonha de *B. pauloensis*, e na concentração 3mg/mL da peçonha de *C. d. terrificus* (Fig. 2A e 2B).

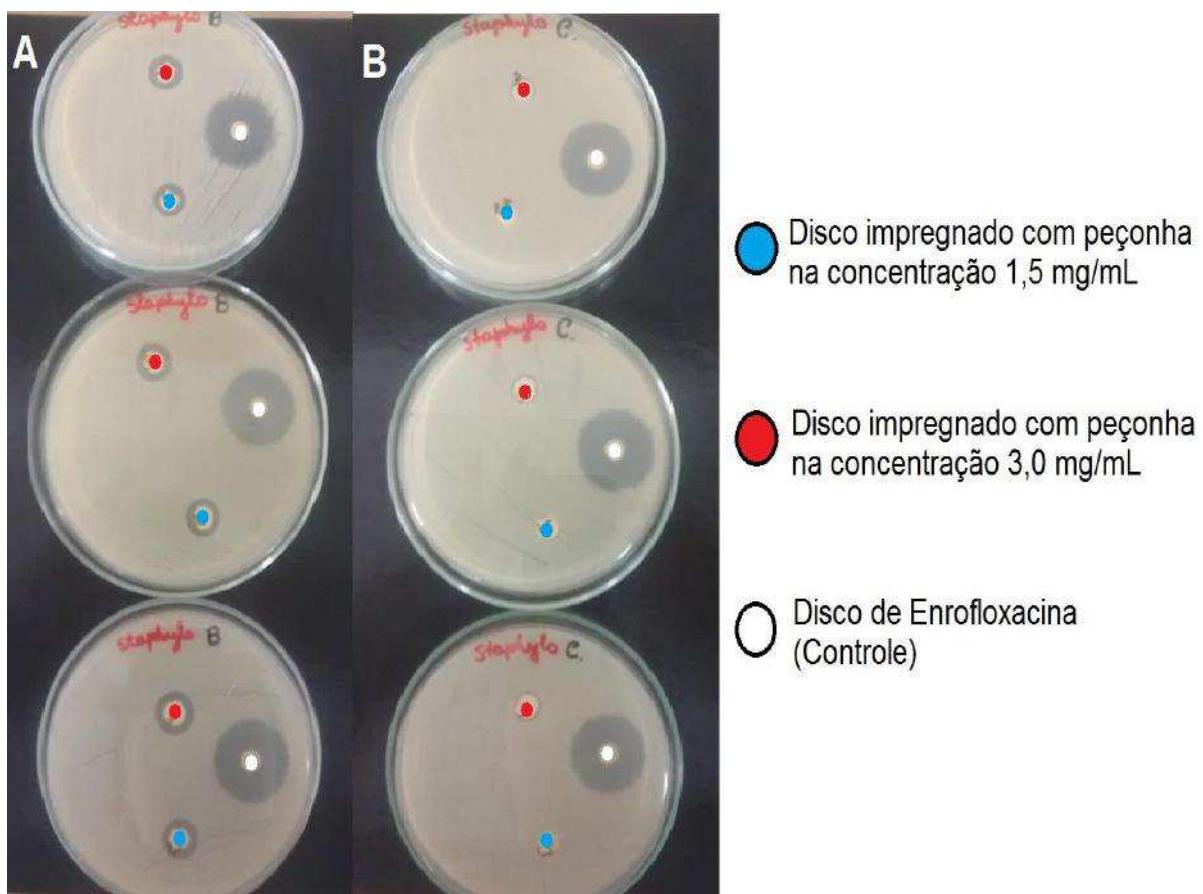


Fig.2. Triplicata dos testes de difusão em disco para *S. aureus* e PBP nas concentrações 1,5 e 3,0 mg/mL (A) e *S. aureus* com PCT nas concentrações 1,5 e 3,0 mg/mL (B).

Pelo teste estatístico T de Student, considerando duas amostras independentes, houve diferença estatística entre os halos formados pela PBP nas concentrações 1,5 e 3,0 mg/mL. Quando comparados os halos formados pela PBP na concentração 1,5 mg/mL, com os halos da PCT na concentração 3,0 mg/mL, houve diferença estatística ($p < 0,05$; $p = 0,0099$). E, quando comparados os halos formados pela PBP na concentração 3,0 mg/mL, com os halos formados pela PCT na mesma concentração, houve diferença estatística ainda maior ($p < 0,05$; $p = 0,0007$).

Isso mostra que a ação antibacteriana da PBP foi significativamente maior do que a ação da PCT, sobre *S. aureus*, nas duas concentrações testadas.

Nos testes de microdiluição em caldo, para a mistura *Staphylococcus aureus* e peçonha de *B. pauloensis* (1,5mg/ml) o resultado das absorbâncias estão discriminados na tabela 1. Observa-se que os valores das absorbâncias diminuíram à medida que a peçonha foi sendo diluída, e esses valores foram sempre inferiores à absorbância da peçonha pura. Isso indica que a bactéria com solução salina apenas diluiu a peçonha, e *S. aureus* não foi capaz de se multiplicar em nenhuma das diluições testadas.

Tabela 1. Valores médios das absorbâncias obtidas no teste de Microdiluição em Caldo realizado com *S.aureus* e peçonha de *B. pauloensis* nas concentrações obtidas de diluições seriadas decimais a partir de 1,5 mg/mL.

Diluições (mg/mL)	Médias das absorbâncias
$1,5 \times 10^0$	0,218
$1,5 \times 10^{-1}$	0,177
$1,5 \times 10^{-2}$	0,169
$1,5 \times 10^{-3}$	0,147
$1,5 \times 10^{-4}$	0,128

Como controle foram utilizados 100µl de *S.aureus* em solução salina (absorbância 0,074) e 100µl de PBP na concentração 1,5 mg/ml (absorbância 0,309).

A sensibilidade de *S. aureus* à peçonha foi confirmada pela ausência de crescimento bacteriano quando as 5 diluições foram esgotadas em ágar sangue (Fig.3)

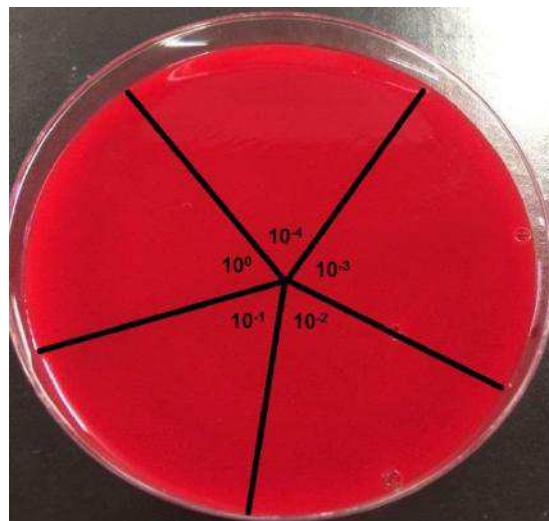


Fig. 3. Ágar sangue demonstrando a ausência de colônias de *S. aureus* após a conjugação com PBP em cinco diluições diferentes.

Mais de um componente das peçonhas de *Bothrops* spp. possuem atividade bactericida sobre *S. aureus*. Dentre esses componentes estão a LAAO (STÁBELI et al., 2004; 2007; CISCOTO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009; PAIVA et al., 2011; COSTA, 2012), PLA2s, que compõem grande parte da peçonha – de 26 a 30% (RODRIGUES et al., 2004; 2012), além da Lectina, que possivelmente consegue interagir com os peptideoglicanos presentes na parede celular das bactérias Gram positivas e dessa maneira inibem seu crescimento (DU E CLEMENTSON, 2010; NUNES et al., 2011; CASTANHEIRA, 2013).

Todos esses fatores podem ter colaborado para a eficiência da peçonha bruta encontrada neste e em outras pesquisas, como os de Ciscoto et al. (2009) e Aguiar (2014).

Para a mistura *S. aureus* e peçonha de *C. d. terrificus* (3,0mg/ml), o resultado das absorbâncias aumentou à medida que a peçonha foi diluída (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios das absorbâncias obtidas no teste de Microdiluição em Caldo realizado com *S.aureus* e peçonha de *C. d. terrificus* nas concentrações obtidas de diluições seriadas decimais a partir de 3,0 mg/mL.

Diluições (mg/mL)	Médias das absorbâncias
$3,0 \times 10^0$	0,044
$3,0 \times 10^{-1}$	0,054
$3,0 \times 10^{-2}$	0,060
$3,0 \times 10^{-3}$	0,072
$3,0 \times 10^{-4}$	0,079

Como controle foram utilizados 100µl de *S.aureus* em solução salina (absorbância 0,092) e 100µl de PCT na concentração 3,0 mg/ml (absorbância 0,049).

Quando as cinco diluições foram esgotadas em ágar sangue, observou-se que nas 3 primeiras diluições (3×10^0 ; 3×10^{-1} ; 3×10^{-2}) não houve multiplicação bacteriana, já nas diluições 3×10^{-3} e 3×10^{-4} a bactéria foi capaz de crescer, demonstrando resistência à peçonha nessas concentrações (Fig. 4).

Sendo assim, a concentração inibitória mínima da peçonha de *C. d. terrificus* para *S. aureus* foi 3×10^{-2} mg/mL.

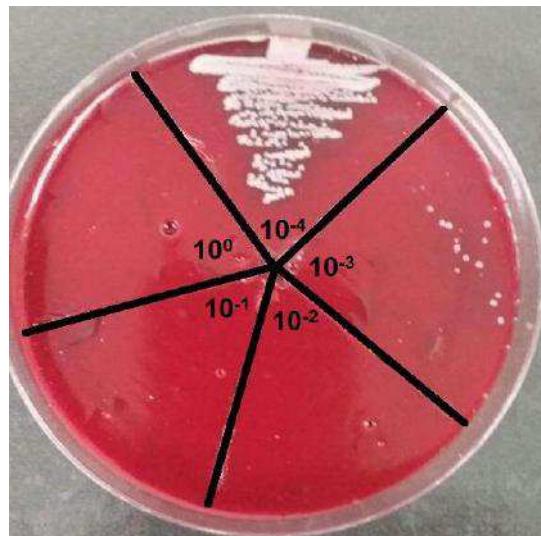


Fig. 4. Ágar sangue demonstrando presença de colônias de *S. aureus* após a conjugação com PCT nas diluições 3×10^{-3} e 3×10^{-4} .

Neste estudo, a eficiência da peçonha bruta de *C. d. terrificus* contra *S. aureus* foi dose-dependente, assim como registrado no estudo de Aguiar (2014).

De acordo com Ciscoto et al. (2009), a atividade antibacteriana da peçonha está diretamente ligada a LAAO. Na pesquisa de Vargas et al. (2013), a LAAO isolada da peçonha de *C. d. cumanensis* apresentou atividade antibacteriana sobre *S. aureus*, por outro lado, Yamane et al. (2013) mostraram que a Crotamina isolada da peçonha de *C. d. terrificus* não foi eficiente contra *S. aureus*.

Pode-se inferir que na peçonha de *C. durissus*, possivelmente não é a Crotamina a responsável pela atividade antibacteriana contra *S. aureus*. Ainda não se sabe se a atividade antimicrobiana é pela ação exclusiva da LAAO, ou outros bioativos não testados associados a esta.

Nos testes de microdiluição em caldo, *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae foi resistente à PBP. Já a eficiência da PCT foi dose-dependente.

Na conjugação Leptospira e peçonha de *B. pauloensis* (3,0mg/ml), os valores de absorbância aumentaram nas menores diluições da peçonha. Indicando multiplicação bacteriana (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios das absorbâncias obtidas no teste de Microdiluição em Caldo realizado com *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae e peçonha de *B. pauloensis* nas concentrações obtidas de diluições seriadas decimais a partir de 3,0 mg/mL.

Diluições (mg/mL)	Médias das absorbâncias
$3,0 \times 10^0$	0,165
$3,0 \times 10^{-1}$	0,150
$3,0 \times 10^{-2}$	0,165
$3,0 \times 10^{-3}$	0,170
$3,0 \times 10^{-4}$	0,218

Como controle foram utilizados 100 μ l de *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae em meio EMJH (absorbância 0,100) e 100 μ l de PBP na concentração 3,0 mg/mL (absorbância 0,040).

No teste de avaliação da motilidade bacteriana, dentre as cinco diluições observadas, apenas na maior concentração de peçonha (3×10^0), a Leptospira apresentou redução da motilidade após 48 horas. Nas demais diluições, a bactéria continuou com a motilidade inalterada, mesmo após 72 horas da adição da peçonha.

Em seguida, o cultivo das cinco diluições em meio EMJH, após 7 dias de incubação, demonstrou a presença de Leptospiras viáveis em todos os tubos cultivados. Esses resultados, mais uma vez indicam que a Leptospira foi resistente à peçonha de *B. pauloensis*.

Observou-se neste estudo, que a atividade antibacteriana das peçonhas, foi diferente para bactéria Gram positiva e Gram Negativa. A Leptospira apesar não se corar pela coloração de Gram, possui Lipopolissacarídeos (LPS) de membrana externa que são estrutural e imunologicamente semelhantes aos LPS de organismos Gram-negativos (HAAKE; ZUCKERT, 2016; QUINN et al., 2005; FAINE et al., 1999). Assim como *E. coli*, a Leptospira se mostrou resistente à peçonha de *B. pauloensis*.

Adicionalmente, quando a Leptospira foi conjugada com a peçonha de *C. d. terrificus* (3,0mg/ml), os valores de absorbância aumentaram à medida que as diluições diminuíram. Indicando multiplicação bacteriana (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios das absorbâncias obtidas no teste de Microdiluição em Caldo realizado com *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae e peçonha de *C. d. terrificus* nas concentrações obtidas de diluições seriadas decimais a partir de 3,0 mg/mL.

Diluições (mg/mL)	Médias das absorbâncias
$3,0 \times 10^0$	0,0670
$3,0 \times 10^{-1}$	0,0930
$3,0 \times 10^{-2}$	0,1132
$3,0 \times 10^{-3}$	0,1180
$3,0 \times 10^{-4}$	0,1201

Como controle foram utilizados 100µl de *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae em meio EMJH (absorbância 0,100) e 100µl de PCT na concentração 3,0 mg/mL (absorbância 0,049).

No teste de avaliação da motilidade bacteriana, as Leptospires pararam de se movimentar após 48 horas, na maior concentração da peçonha (3×10^0). Nas demais diluições, a movimentação cessou somente após 72 horas da adição da peçonha. Mesmo assim, quando estas diluições foram cultivadas em meio EMJH por 7 dias, pôde-se observar presença de Leptospires móveis nos cultivos correspondentes às diluições 3×10^{-2} , 3×10^{-3} , 3×10^{-4} .

Sendo assim, a concentração inibitória mínima da peçonha de *C. d. terrificus* para Leptospira foi 3×10^{-1} mg/ml.

Notou-se que a peçonha de *C. d. terrificus* foi capaz de interferir na motilidade da Leptospira, mas não teve ação bactericida nas concentrações 3×10^{-2} , 3×10^{-3} , 3×10^{-4} . Já nas concentrações 3×10^0 e 3×10^{-1} a bactéria foi sensível à peçonha.

A Leptospirose é uma doença endêmica em países tropicais. Tradicionalmente são poucas as drogas capazes de combater de forma eficaz as infecções renais por *Leptospira*, tanto em humanos, quanto em animais (ELLIS, 2015). Essa pesquisa demonstrou que a peçonha de *C. d. terrificus* pode ser uma alternativa como protótipo para o desenvolvimento de novos tratamentos contra Leptospirose.

CONCLUSÃO

As peçonhas de *B. pauloensis* e de *C. d. terrificus* possuem ação antibacteriana frente a *S. aureus*, mas não contra *E. coli*. Apenas a peçonha de *C. d. terrificus* demonstrou atividade antibacteriana para *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae.

Esses resultados são importantes, pois direcionam pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos, utilizando componentes das peçonhas de serpente como protótipos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. S. Avaliação do potencial antimicrobiano do veneno total de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. 2014. 79 f. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Bahia (UFB)**, Salvador, BA, 2014.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resistência Microbiana: Mecanismos e Impacto Clínico**. 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosauda/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mec_permeabilidade.htm> Acesso em: 07 jan.2017.
- BÉRNILS, R.S.; COSTA, H.C. 2014. **Répteis brasileiros: Lista de espécies**. Versão 2014. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Acesso em: 04 jan.2017.
- and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2006, v. 63, n. 24, p. 3030-3041.
- CASTANHEIRA, L.E.; NUNES, D.C.; CARDOSO, T.M.; SANTOS, P.D.E. S.; GOULART, L.R.; RODRIGUES, R.S.; RICHARDSON, M.; BORGES, M.H.; YONEYAMA, K.A.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, Colorado, v. 54, pg.57-64, March 2013.
- 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.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard—9th . **CLSI document M07-A9**. Wayne, PA., 2012.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard—11th . **CLSI document M02-A11**. Wayne, PA., 2012.
- 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.
- DU, X.; CLEMENTSON, K.J. Thrombin-Like Snake Venom Serine Proteinases, In: MARCKESSY, S.P. (Ed.). **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. New York: CRC Press, 2010. cap. 6, pg. 139-154.
- ELLIS, W. A. Animal Leptospirosis. In: ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis: Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.387, Melbourne, Australia: Springer, 2015. 121-122p.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. Medisci: Melbourne, 1999, 272p.

HAAKE, David A.; ZÜCKERT, Wolfram R.. The Leptospiral Outer Membrane. In: ADLER, Ben. *Leptospira and leptospirosis: Current Topics in Microbiology and Immunology*. Melbourne, Australia: Springer, 2016. p. 187-222.

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.

KOH, D. C.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components

MIRAGLIA, F. et al. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2013, v. 77, p.195–199.

NUNES E. S. et al. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2011, v.159, n.1, p.57-63.

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

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical veterinary microbiology**. London: wolfe, 1994, 648p.

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.

RODRIGUES, R.S.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F.P.; DE LA TORRE, P.; HENRIQUE-SILVA, F.; SANZ, L.; CALVETE, J.J.; RODRIGUES, V.M. Combined snake venomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**, Weinheim, v.75, n.9, pg. 2707–2720, May 2012.

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.

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.

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.

VALLE, A.L.; BRITES, V.L.C. Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloensis* (Amaral, 1925) em áreas antropizadas do Triângulo e Alto

Paranaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zoociências**, v.10, p.155–161, 2008.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial Resistance**. 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/> >. Acesso em: 07 jan. 2017.

WÜSTER, W.; FERGUSON, J. E.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A.; POOK, C. E.; SALOMÃO, M. G.; THORPE, R. S. Tracing an invasion: landbridges, refugia and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). **Molecular Ecology**, 2005, v. 14, p. 105–108.

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