



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

YONNE KAROLINE TENÓRIO DE MENEZES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA PEÇONHA DE *Lachesis*
*muta rhombeata***

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

YONNE KAROLINE TENÓRIO DE MENEZES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA PEÇONHA DE *Lachesis*
*muta rhombeata***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Coorientadora: Profa. Dra. Jeanne Claíne Albuquerque Modesto

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2016

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4: 2018

M541a Menezes, Yonne Karoline Tenório

Avaliação da atividade antibacteriana da peçonha de *Lachesis muta rhombeata*. / Yonne Karoline Tenório Menezes. Vitória de Santo Antão, 2016.

72 folhas: il.; tab.

Orientadora: Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Coorientadora: Jeanne Claíne Albuquerque Modesto

TCC (Graduação) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Licenciatura em Ciências Biológicas, 2016.

Inclui referências e anexo.

1. Microbiologia. I. Cavalcanti, Isabella Macário Ferro (Orientadora). II. Modesto, Jeanne Claíne Albuquerque (Coorientadora). III. Título.

579 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-127/2016

YONNE KAROLINE TENÓRIO DE MENEZES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA PEÇONHA DE *Lachesis muta rhombeata*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Aprovado em: ___ / ___ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Érika Maria Silva Freitas (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fábio Marcel da Silva Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a Deus, que guia meus passos. Aos meus pais, Miguel Menezes e Lia Menezes e aos meus irmãos, Suênya e Lucas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois me concedeu saúde e força e permitiu que eu chegasse até aqui. E por todas as bênçãos que derramou sobre mim ao longo desses quatro anos. E por ter me ajudado a enfrentar todas as dificuldades e a realizar mais um sonho. Obrigada Senhor! Sem ti não seria possível ter chegado até aqui!!! *“Todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus. Rm 8:28”*

Aos meus pais, que são meu tudo! Obrigada por sempre acreditarem em mim, por toda força, por todo apoio, por todo amor! Por sempre orarem por mim e torcerem pela minha felicidade! Vocês são minha força, o motivo desta vitória! Amo vocês incondicionalmente.

À minha tia Nena, por ser tão amável e ter sido uma segunda mãe e a minha prima Sumatra por me acolher em sua casa durante alguns anos da graduação. Serei eternamente grata a vocês por tudo o que fizeram por mim!

Aos meus irmãos, em especial à minha irmã Suênya, por ter sido minha companheira de todos os dias, minha amiga, por ter me dado forças e por me ajudar a segurar a barra de morarmos longe dos nossos pais.

Aos meus professores de graduação, por todo conhecimento compartilhado! À Profa. Dra. Érika Freitas, por ter me dado as primeiras oportunidades no início da minha graduação, como sua monitora. Imensamente grata à senhora, por ter feito me apaixonar pela biologia ao lecionar Biologia Celular e pelo exemplo de profissional dentro e fora da sala de aula, por estar sempre disposta a me ajudar.

À Profa. Dra. Claíne Albuquerque por ter me inserido no mundo da pesquisa, por todos ensinamentos e broncas. Muito obrigada por tudo! Por ter aceitado me orientar neste trabalho. Por ter me instigado a buscar sempre o melhor e a não ter medo dos desafios da vida. Obrigada pela confiança, apoio e por todos os momentos de “puxões de orelha” e risadas na sua sala!

À Profa. Dra. Isabella Macário por ser um referencial de profissional a qual desejo me tornar um dia, por sua humildade, disponibilidade e paixão pelo que faz. A senhora é um exemplo para mim. Nenhum professor até hoje me ajudou a crescer tanto quanto a senhora. Obrigada por todas as broncas que contribuíram para o meu crescimento profissional. Por todas as responsabilidades depositadas sobre mim que me fizeram crescer e amadurecer dentro do laboratório de Microbiologia. E por sua orientação neste trabalho. Sou imensamente grata por tudo professora.

À minha família, pelo apoio incondicional, por compreender a minha ausência durante esses anos de graduação.

Aos amigos que fiz durante a graduação. A André Campos, que desde o início da graduação esteve comigo, nas monitorias e no laboratório de microbiologia. Obrigada, muito obrigada por ter me ajudado durante os experimentos deste trabalho. Obrigada aos meus colegas do laboratório de microbiologia: Sayonara, Gleyce, Jamildo, Patrícia, Karina e Larissa. E em especial a Silvio Francisco! Sílvia, você é um presente que Deus me deu. Obrigada por todas as noites de estudo no Skype, por me ajudar sempre nos laboratórios, por tirar minhas dúvidas, por sonhar junto comigo em cada etapa dessa graduação e por ser meu amigo inseparável! Quero morrer sendo sua amiga! À Nicássia e Kelly, por todos os momentos de compreensão e imenso apoio. Muito grata a vocês!

Aos meus amigos: Cinara, Sayonara, Maya, Priscila e John pela compreensão, pelo apoio e força. Amo muito vocês meus amigos.

À Profa. Dra. Ana Lisa Gomes, pelas orientações na monitoria de microbiologia, por ser exemplo de profissional que ama o que faz. E por fazer parte de mais uma conquista na minha vida acadêmica.

E a todos do laboratório de microbiologia e imunologia do CAV/UFPE que diretamente e indiretamente fizeram parte desta trajetória. Obrigada!!!

“Confiança é importante, mas não basta
dizer a si mesmo: vou conseguir.
É preciso acreditar nisso.”
Legrand

RESUMO

Com o crescente aumento de casos de morte por infecções, assim como o desenvolvimento de resistência microbiana, estudos que investiguem diferentes fontes biológicas que contenham moléculas bioativas amplia a possibilidade de se encontrar novos agentes terapêuticos para infecções microbianas. As peçonhas constituem uma fonte rica de moléculas bioativas com importantes propriedades farmacológicas e possui grande potencial para produção de novos medicamentos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana da peçonha da subespécie *Lachesis muta rhombeata*. Para a avaliação da atividade antibacteriana dessa peçonha foram utilizados os métodos da difusão em poço, difusão em disco e da Microdiluição. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a peçonha de *Lachesis muta rhombeata* não apresentou atividade antibacteriana frente às bactérias gram negativas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Escherichia coli* ATCC 25922, porém, apresentou atividade moderada frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ($12,3 \pm 2,2$ mm). Em relação às bactérias gram positivas, a peçonha de *Lachesis muta rhombeata* foi capaz de apresentar atividade antibacteriana para os isolados clínicos de *S. aureus* ($19 \pm 0,1$ mm), assim como para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ($11,7 \pm 0,5$ mm). Essa peçonha não foi ativa frente a *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) ATCC 33591. No método da microdiluição, a peçonha de *Lachesis muta rhombeata* mostrou maior atividade frente aos isolados clínicos de *S. aureus* (CIM = 64 $\mu\text{g/mL}$), atividade moderada frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 (CIM = 256 $\mu\text{g/mL}$) e *S. aureus* ATCC 29213 (CIM = 128 $\mu\text{g/mL}$), fracamente ativa frente a *E. coli* ATCC 25922 (CIM = 512 $\mu\text{g/mL}$) e inativa para *K. pneumoniae* ATCC 700603 e MRSA ATCC 33591 (CIM ≥ 512 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados sugerem que a peçonha de *Lachesis m. rhombeata* é uma alternativa promissora como agente antibacteriano

Palavras-chave: Atividade antibacteriana, peçonha ofídica, *Viperidae*.

ABSTRACT

With the increased cases of death caused by infections, as well as the development of microbial resistance, studies that investigate different biological sources that contain bioactive molecules amplify the possibility of finding new therapeutic agents for microbial infections. In general, venoms constitute a rich source of bioactive molecules with important pharmacological properties and have great potential for the production of new drugs. Thus, the aim of this study was evaluate the antibacterial activity of venom of the subspecies *Lachesis muta rhombeata*. For the evaluation of the venom antibacterial activity, were used well diffusion, disk diffusion and microdilution methods according to the *Clinical and Laboratory Standards Institute*. The results obtained in this study demonstrated that the *Lachesis muta rhombeata* venom did not present antibacterial activity against gram negative bacteria *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Escherichia coli* ATCC 25922, however, the venom presented moderated activity against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (12.3 ± 2.2 mm). Regarding the gram positive bacterial, the *Lachesis muta rhombeata* venom was able to present antibacterial activity for the clinical isolates *S. aureus* (19 ± 0.1 mm), as well as *S. aureus* ATCC 29213 (11.7 ± 0.5 mm). This venom was not active against methicilin-resistant *S. aureus* (MRSA) ATCC 33591. In the microdilution method, the *Lachesis muta rhombeata* venom showed higher activity against *S. aureus* clinical isolates (MIC = 64 $\mu\text{g/mL}$), moderate activity against *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MIC = 256 $\mu\text{g/mL}$) and *S. aureus* ATCC 29213 (MIC= 128 $\mu\text{g/mL}$), weakly active against *E. coli* ATCC 25922 (MIC= 512 $\mu\text{g/mL}$) and inactive for *K. pneumoniae* ATCC 700603 and MRSA ATCC 33591 (MIC \geq 512 $\mu\text{g/mL}$). Considering the results obtained in this study, *Lachesis muta rhombeata* venom is a promising alternative as an antibacterial agent presenting active against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Antimicrobial activity, snake venoms, *Viperidae*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Fosseta loreal..... | 16 |
| Figura 2 - <i>Lachesis muta rhombeata</i> (surucuru, pico-de-jaca, surucutinga)..... | 16 |
| Figura 3 - Distribuição geográfica do gênero <i>Lachesis</i> nas Américas Central e do Sul. <i>Lms</i> = <i>L.muta stenophrys</i> (delimitado em amarelo); <i>Lme</i> = <i>L. muta melanocephala</i> (delimitado em preto); <i>Lmm</i> = <i>L. muta muta</i> (delimitado em verde) e <i>Lmr</i> = <i>L. muta rhombeata</i> (delimitado em roxo)..... | 17 |
| Figura 4 - Ponte terrestre de bering..... | 18 |
| Figura 5 - Fatores de risco para infecção hospitalar..... | 23 |
| Figura 6 - Aspectos microscópicos de <i>Staphylococcus aureus</i> (A), e infecções da pele e tecidos (B), abscesso (C), pústula (D), impetigo e sarna (E) causados por <i>S. aureus</i> | 25 |
| Figura 7 - Principais mecanismos envolvidos no processo de geração de bactérias resistente | 27 |
| Figura 8 - Aspectos Morfológicos em 3D (A) e Microscópicos (B) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 29 |
| Figura 9 - Microscopia Eletrônica de Varredura (A) e Microscopia Óptica (B) de <i>Escherichia coli</i> | 30 |
| Figura 10 - Microscopia Eletrônica de Varredura (A) e Microscopia Óptica (B) de <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 32 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Avaliação da atividade antibacteriana da peçonha de <i>Lachesis muta rhombeata</i> pelos métodos do disco e do poço..... | 54 |
| Tabela 2 - Avaliação da atividade antibacteriana da peçonha de <i>Lachesis muta rhombeata</i> pelo método da microdiluição..... | 55 |

LISTA DE ABREVIACOES

| | |
|-------------------|--|
| ATCC | American Type Culture Collection |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| CBM | Concentração Bactericida Mínima |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| ESBL | Beta-lactamases de amplo espectro |
| KPC | <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase |
| LAAOs | L-aminoácido oxidases |
| LAPT _x | Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas |
| LPS | Lipopolissacarídeos |
| MRSA | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PBP | Proteína de Ligação  Penicilina |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| PLA ₂ | Fosfolipases A ₂ |
| SABL | Soro antibotrópico-laquetico |
| SAL | Soro antilaquetico |
| SINAM | Sistema Nacional de Atendimento Médico |
| UTI | Unidade de Terapia Intensiva |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1 SERPENTES NO MUNDO E NO BRASIL..... | 15 |
| 2.1.1 GÊNERO <i>Lachesis</i> | 16 |
| 2.1.2 ACIDENTE LAQUÉTICO | 19 |
| 2.2 COMPOSIÇÃO DA PEÇONHA | 20 |
| 2.2.1 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE ENZIMAS DA PEÇONHA DE SERPENTES .. | 21 |
| 2.3 INFECÇÕES BACTERIANAS | 22 |
| 2.3.1 PATÓGENOS GRAM POSITIVOS | 24 |
| 2.3.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> | 24 |
| 2.3.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> RESISTENTE À METICILINA (MRSA)..... | 25 |
| 2.3.2 PATÓGENOS GRAM NEGATIVOS..... | 28 |
| 2.3.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 28 |
| 2.3.2.2 <i>Escherichia coli</i> | 29 |
| 2.3.2.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 31 |
| 3 OBJETIVOS..... | 33 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 33 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 33 |
| 4 REFERÊNCIAS | 34 |
| 5 ARTIGO..... | 48 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 65 |
| 7 ANEXO | 66 |
| 7.1 NORMAS DO JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY | 66 |

1 INTRODUÇÃO

O Brasil conta atualmente com 773 espécies de répteis, tendo 392 espécies de serpentes catalogadas (COSTA; BÉRNILS, 2015). Dentre as 10 famílias encontradas no Brasil (BERNARDE, 2011) somente duas abrangem as serpentes consideradas peçonhentas: a família *Viperidae*, destacando-se a subfamília *Crotalinae*, à qual pertencem os gêneros *Crotalus* (cascavéis), *Bothrops* (jararaca) e *Lachesis* (surucucu); e família *Elapidae* que incluem as serpentes do gênero *Micrurus*, conhecidas popularmente como corais verdadeiras (CARDOSO *et al.*, 2009).

As peçonhas de serpentes são, provavelmente, as mais complexas, pois contêm cerca de 25% de sólidos totais, dos quais cerca de 70% a 90% são proteínas e polipeptídeos. O restante corresponde a substâncias de baixo peso molecular como carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, compostos inorgânicos e íons (BUCARETCHI, 2006). Apesar da inoculação da peçonha através da picada levar a emergências médicas, suas toxinas, uma vez purificadas e caracterizadas podem exibir potencial terapêutico e estas têm sido cada vez mais utilizadas como instrumentos farmacológicos e protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos como por exemplo, agentes antibacterianos (AGUIAR, 2014).

As bactérias são microrganismos procariotos e unicelulares que contêm tanto DNA quanto RNA. Não apresentam núcleo delimitado por membrana e o seu material genético é circular e está disposto no citoplasma. Estes microrganismos reproduzem-se por divisão binária e a grande maioria apresenta uma parede celular rígida contendo peptidoglicano (KONEMAN, 2008; LEVISON, 2010). As bactérias são capazes de provocar infecções que podem ser desde quadros localizados até infecções graves. As infecções estão entre as dez principais causas de morte no mundo e a resistência antimicrobiana tem se tornado nos últimos anos uma ameaça cada vez mais grave para a saúde pública global, pois geram elevados custos devido à longa duração da doença, exames complementares e medicamentos de alto custo (WHO, 2014).

Com o número crescente de mortes causadas por infecções bacterianas, faz-se necessária a descoberta de novas alternativas para o tratamento das infecções ocasionadas por microrganismos patogênicos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana da peçonha da subespécie *Lachesis muta rhombeata*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SERPENTES NO MUNDO E NO BRASIL

Serpentes são animais vertebrados pertencentes à classe *Reptilia* e a ordem *Squamata* que incluem além das serpentes, os lagartos e os anfisbênios. Atualmente são conhecidas no mundo cerca de 10.450 espécies de répteis (UETZ, 2016) e 3.567 espécies de serpentes (UETZ, 2016). Já foram descritas seis superfamílias de serpentes: *Acrochordoidea*, *Uropeltoidea*, *Pythoidea*, *Booidea*, *Colubroidea* e *Typhlopoidea*. A superfamília *Culobroidea* inclui a maioria das espécies de serpentes, possuindo 1.863 espécies conhecidas até o momento (PYRON *et al.*, 2011; UETZ, 2016).

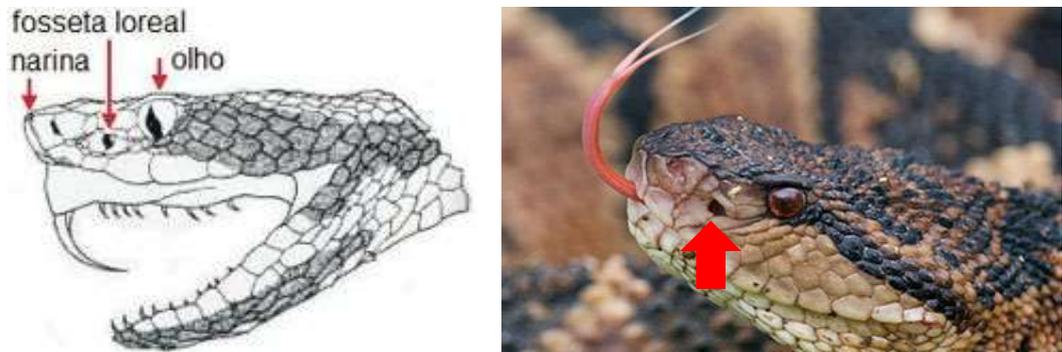
O Brasil conta com 773 espécies de répteis, sendo 392 espécies de serpentes catalogadas (COSTA; BÉRNILS, 2015) e dentre as famílias conhecidas, somente duas abrangem as serpentes consideradas peçonhentas: a família *Viperidae* e família *Elapidae* (CARDOSO *et al.*, 2009). Dentre essas duas principais famílias, 73 espécies são consideradas peçonhentas (COSTA; BÉRNILS, 2015).

A família *Elapidae* encontra-se distribuídas pelo mundo, apresentando 363 espécies conhecidas. Essa família possui espécies famosas, como as najas asiáticas, najas africanas e as mambas africanas. No Brasil, compreendem as corais verdadeiras distribuídas em todo território nacional. As espécies dessa família diferenciam-se da *Viperidae* por não apresentarem fosseta loreal e por possuírem denteição proteróglifa. O principal gênero no Brasil é o *Micrurus*, com cerca de 21 espécies amplamente distribuídas no país (CARDOSO *et al.*, 2009; BERNARDE, 2011; UETZ, 2016).

A família *Viperidae* representa o grupo de serpentes que causam maior impacto na saúde pública, pois são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos de relevância clínica no Brasil e também em outros países da América. Atualmente, o grupo está dividido em duas subfamílias: *Viperinae* e *Crotalinae* e contêm 340 espécies distribuídas em 34 gêneros (CARDOSO *et al.*, 2009; COSTA; BÉRNILS, 2011; UETZ, 2016). A subfamília *Viperinae* está restrita ao Velho Mundo, não sendo encontrada nas Américas. Assim, no Brasil todos os viperídeos pertencem a subfamília *Crotalinae* (presente no Novo e Velho Mundo) (CASTOE; PARKINSON, 2006). A subfamília *Crotalinae* apresenta um par de fosseta loreal, órgão termosensível localizado entre as narinas e os olhos, com importante função na captura da presa (Figura 1) (MELGAREJO, 2003) e, no Brasil, é representada por 4 gêneros:

Bothrocophias, *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*, que são responsáveis pela grande maioria dos acidentes ofídicos no país (CARDOSO *et al.*, 2009; COSTA; BÉRNILS, 2015).

Figura 1 - Fosseta Loreal



Fonte: SOUZA, 2015.

2.1.1 GÊNERO *Lachesis*

As serpentes da família *Viperidae* e gênero *Lachesis* são as maiores serpentes peçonhentas da América e podem atingir até 4 m de comprimento. Essa serpente é conhecida no Brasil como surucuru, surucucu-pico-de-jaca e surucutinga (Figura 2) (MELGAREJO, 2003; FRANÇA; MALÁQUE, 2009). O termo *Lachesis* foi extraído da mitologia grega, sendo *Lachesis* uma das Deusas do destino, responsável pela determinação do tempo de vida concedido aos humanos (BULFINCH, 1998).

Figura 2 - *Lachesis muta rhombeata* (Surucuru, pico-de-jaca, surucutinga).



Fonte: SOUZA, 2015.

O gênero *Lachesis* inclui em sua única espécie *L. muta*, quatro subespécies: *L. m. stenophrys*, que está distribuída na Costa Rica, Panamá e Nicarágua; *L. m. melanocephala* que é restrita apenas à Costa Rica; *L. m. muta* que está presente na Colômbia, Equador, Venezuela, Peru, Bolívia, Suriname, Guianas e Brasil e *L. m. rhombeata* que é endêmica no Brasil (Figura 3) (CAMPBELL; LAMAR, 1989; UETZ, 2016).

Figura 3 - Distribuição geográfica do gênero *Lachesis* nas Américas Central e do Sul. *Lms* = *L.muta stenophrys* (delimitado em amarelo); *Lme* = *L. muta melanocephala* (delimitado em preto); *Lmm* = *L. muta muta* (delimitado em verde) e *Lmr* = *L. muta rhombeata* (delimitado em roxo).



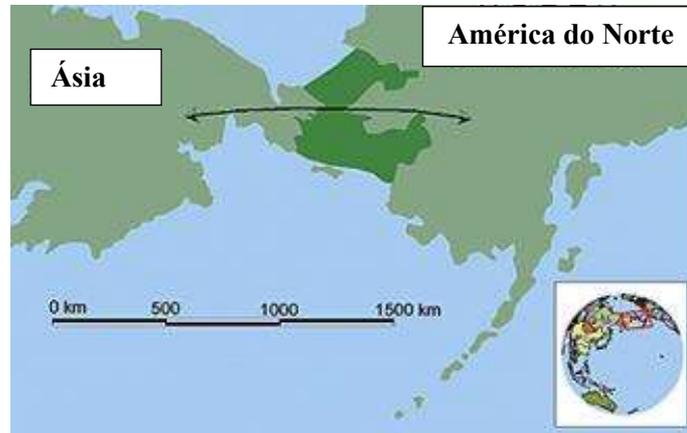
Fonte: SANTOS, 2013.

A *Lachesis muta rhombeata* encontra-se distribuída na faixa da Mata Atlântica dos seguintes estados brasileiros: Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Zona da Mata do estado de Minas Gerais. Em Pernambuco, a região costeira é pequena e contém apenas áreas vestigiais de Mata Atlântica. Apesar de ser uma região com intensa atividade humana, possui vestígios bem conservados da Mata Atlântica misturada com uma floresta semidecídua garantindo características ambientais vantajosas para a sobrevivência de *Lachesis muta rhombeata* (LIMA; HADDAD, 2005; UETZ, 2016).

Evidências morfológicas e moleculares até o momento oferecem poucos indícios sobre a origem do gênero *Lachesis*. O que se conhece até o momento é que, provavelmente, estas serpentes divergiram de outros viperídeos na Eurásia durante o período terciário e teriam

invadido o Novo Mundo através da Beríngia ou Ponte Terrestre de Bering (Figura 4), durante o Mioceno (CADLE, 1987; KRAUS *et al.*, 1996).

Figura 4 - Ponte Terrestre de Bering.



Fonte: Adaptado de PAULICK, 2015.

Embora este gênero esteja muitas vezes atribuído à América do Sul nas análises biogeográficas, a partir da biogeografia vicariante, a hipótese acreditada é que as serpentes do gênero *Lachesis* localizadas na América Central são remanescentes da colonização dos trópicos do norte (VIAL; JÍMENEZ, 1967). Na América central, os eventos geológicos vicariantes, devido ao surgimento e elevação das Cordilheiras do Tamanca e dos Andes, teriam promovido a alopatria das subespécies atuais. Os dados moleculares sugerem que *Lachesis muta melanocephala* e *L. m. stenophrys* divergiram durante o final do Mioceno ou início do Plioceno e sua diferenciação corrobora com os acontecimentos geológicos da época, como o soerguimento das Cordilheiras do Tamanca que atualmente separa essas duas subespécies (ZAMUDIO; GREENE, 1997).

Na América do sul, o ancestral de *Lachesis* foi continuamente distribuído das planícies Amazônicas ao Pacífico antes da fragmentação e elevação dos Andes no Mioceno. No período quaternário do Pleistoceno ocorreram várias mudanças climáticas e de vegetação, prevalecendo vários períodos de seca que poderiam ter gerado essa diferenciação e formado as duas subespécies: *L. m. muta* e *L. m. rhombeata* (ZAMUDIO; GREENE, 1997).

A ocorrência dessas mudanças leva a acreditar na teoria de refúgios, onde populações ecologicamente especializadas na floresta amazônica ficaram isoladas nos refúgios florestais e não florestais durante as fases climáticas adversas. Algumas populações tornaram-se extintas ou sobreviveram sem muita alteração ou diferenciaram-se até o seu nível taxonômico de subespécie ou espécie. Uma série de reversões climáticas e vegetacionais, assim como

eventos vicariantes associados ocorridos no Pleistoceno serviram como hipótese para a causa da diferenciação de taxa (HAFFER, 1992; VANZOLINI, 1992).

BIGARELLA e ANDRADE-LIMA (1982) propuseram, com base nos domínios morfoclimáticos de AB'SABER (1977), que a Floresta Amazônica e a Floresta Atlântica estiveram em contato durante algum período no Quaternário, na região que atualmente é ocupada pela Caatinga. COSTA (2003) argumentou que as florestas centrais brasileiras foram fundamentais para explicar os padrões de distribuição de algumas espécies. Existem registros fósseis de *Lachesis* encontrados no domínio da Caatinga, sugerindo que os grupos de *Lachesis* da Floresta Amazônica e da Floresta Atlântica de alguma forma mantiveram o fluxo gênico que impediu a diferenciação total entre elas (FERNANDES; FRANCO; FERNANDES, 2004).

2.1.2 ACIDENTE LAQUÉTICO

O gênero *Lachesis* é de importância médica, tendo sido responsável por 3,9 % dos acidentes ocorridos entre 2009 e 2013 (SILVA; BERNARDE; ABREU, 2015). A peçonha laquética possui três atividades semelhantes às peçonhas botrópicas: atividades coagulante, proteolítica e hemorrágica. Além destas, a peçonha laquética apresenta ação neurotóxica (KAMIGUTI; CARDOSO, 1989; ROSENFELD; HAMPE; KELEN, 1959; ROSENFELD, 1971). Os sintomas clínicos são: dor, edema, hipotensão, alteração da coagulação sanguínea, sangramentos, náuseas, vômitos, diarreia e principalmente a síndrome vagal, que é característica marcante do acidente laquético. As manifestações sistêmicas caracterizam-se por bradicardia, cólicas abdominais e exacerbação da síndrome vagal (FUNASA, 2001). Apesar dos sintomas serem semelhantes ao acidente botrópico, apenas o acidente laquético desenvolve a síndrome vagal e a ação coagulante é bem mais intensa, sendo diferencial no diagnóstico clínico (CARDOSO *et al.*, 2009).

Os acidentes laquéticos são classificados como moderados e graves. A gravidade é avaliada segundo os sinais locais e pela intensidade das manifestações sistêmicas. Para tratamento, o soro antilaquético (SAL) ou antibotrópico-laquético (SABL) deve ser ministrado por via intravenosa (FUNASA, 2001). Os soros antiofídicos são produzidos através da inoculação subcutânea de doses crescentes da peçonha em animais de grande porte como equinos para que produzam anticorpos contra a peçonha (DA SILVA, 2008). O sangue rico em anticorpos é retirado do cavalo, e deste sangue, retira-se o plasma, que é então

purificado. Os dois tipos de soro podem ser utilizados em caso de acidentes ofídicos com surucuru, porém como é difícil distinguir acidentes botrópicos e laquéuticos, SABL é recomendando (FUNASA, 2001). Esse soro é composto por frações de $F(ab')_2$ de imunoglobulinas específicas purificadas obtidas do plasma de equinos hiperimunizados com uma mistura da peçonha de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Lachesis* (DA SILVA, 2008). O efeito deste soro inicia-se imediatamente após a sua administração intravenosa ou subcutânea e ele atua neutralizando as toxinas da peçonha destes dois gêneros encontradas no sangue e tecidos (FUNASA, 2001).

Segundo dados do Sistema Nacional de Atendimento Médico (SINAN) (2015), o gênero *Lachesis* foi responsável em 2015 por cerca de 524 acidentes ofídicos ocorridos no Brasil e apenas 1 caso notificado em Pernambuco.

2.2 COMPOSIÇÃO DA PEÇONHA

As peçonhas de serpentes representam um traço adaptativo e um exemplo de evolução convergente. Evolutivamente são utilizados como um meio de defesa e predação (CALVETE *et al.*, 2009; WONG; BELOV, 2012). As peçonhas são produzidas em glândulas especializadas capazes de produzir e secretar grande quantidade de substâncias biologicamente ativas (GOMES, 2006; QUEIROZ, 2010). Essa peçonha é constituída principalmente de proteínas e peptídeos (WARRELL, 2010), englobando enzimas (fosfolipases A_2 , serinoproteases, metaloproteases e L-aminoácido oxidases), componentes proteicos não-enzimáticos (miotoxinas, lectinas tipo-C, cistatina, inibidores de proteases tipo-Kunitz) e proteínas não tóxicas (FRANÇA; MALÁQUE, 2003). As peçonhas ofídicas apresentam diferentes atividades biológicas que afetam processos fisiológicos, como neurotransmissão e homeostase (GOLD *et al.*, 2002; DE LIMA *et al.*, 2005).

Com relação a peçonha de *Lachesis muta*, ela possui componentes orgânicos, dos quais podemos citar as proteínas, peptídeos, aminoácidos, carboidratos e lipídios, e componentes inorgânicos como Zn^{+2} , Ca^{+2} , K^+ , Mg^{+2} , Na^+ , SO_4^{+2} , Cl^- , PO_4^{-3} (CARDOSO *et al.*, 2009). Dentre os componentes orgânicos, encontramos algumas enzimas como: a) fosfolipases A_2 (PLA_2), que clivam os fosfolipídios de membranas celulares em várias posições levando ao extravasamento celular; b) metaloproteases, responsáveis pela mionecrose no local da picada, hemorragias e reações inflamatórias; c) L-aminoácido oxidase (LAAOs), que são flavoenzimas que catalisam a deaminação de L-aminoácidos, contribuindo

para a toxicidade, apoptose celular e potente atividade catalítica e d) serinoproteases, enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas afetando principalmente a cascata de coagulação sanguínea (CALVETE; JUAREZ; SANZ, 2007; ESPINO-SOLIS *et al.*, 2009; CUNHA; MARTINS, 2012).

2.2.1 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE ENZIMAS DA PEÇONHA DE SERPENTES

Existem vários estudos que relatam atividade antimicrobiana em peçonhas de serpentes. Grande parte destes trabalhos são realizados com a peçonha total e outros com enzimas isoladas (SAMY *et al.*, 2008; OKUBO *et al.*, 2012; AL-ASMARI *et al.*, 2015; CORRÊA *et al.*, 2016; SAMY *et al.*, 2016).

Enzimas do tipo fosfolipases A₂ hidrolisam fosfolipídios de membrana catalisando a hidrólise da ligação éster sn₂ de fosfolipídios que compõe as membranas celulares. Como resultado da quebra das ligações, ocorre a liberação de ácidos graxos, destacando o ácido araquidônico que é um precursor de prostaglandinas, importante promotor da inflamação (CUNHA; MARTINS, 2012). Essas fosfolipases também podem apresentar efeito lítico através da hidrólise de fosfolipídios presentes na membrana celular bacteriana (NEVALAINEN *et al.*, 2008). Estudos antimicrobianos realizados com a enzima Fosfolipase A₂ R49 isolada da peçonha de *Protobothrops mucrosquamatus* demonstram que esta molécula exibe atividade bacteriostática frente a *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* (WEI *et al.*, 2006) e outra fosfolipase s-PLA 2-I (BFPA) isolada da peçonha de *Bungarus faciatus* mostrou-se fortemente ativa frente a *Staphylococcus aureus* e *E. coli* (XU *et al.*, 2007) demonstrando que fosfolipases podem exibir atividade frente a bactérias de interesse clínico.

Outra enzima amplamente encontrada na peçonha de serpentes é a metaloprotease, que é uma hidrolase do tipo endopeptidase (CUNHA; MARTINS, 2012). Estas enzimas são os principais fatores hemorrágicos encontrados nas peçonhas ofídicas, sendo responsáveis pela degradação enzimática da membrana basal, pois estas enzimas possuem afinidade específica por proteínas presentes na matriz extracelular (CASTRO, 2011). SAMY *et al.* (2008) isolaram uma metaloprotease da peçonha de *Agkistrodon halys* e realizaram testes para verificar se ela exibiria atividade antimicrobiana, e a mesma conseguiu inibir o crescimento de *Bacillus pseudomallei*, *Proteus vulgaris* e *S. aureus* (SAMY *et al.*, 2008).

L-aminoácido oxidase (LAAOs) são flavoenzimas que catalisam a deaminação oxidativa de L-aminoácido produzindo α -ceto ácidos, amônia e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BREGGE-SILVA *et al.*, 2012; CUNHA; MARTINS, 2012). Elas contribuem para a toxicidade da peçonha devido a produção de H_2O_2 , podendo induzir apoptose celular e citotoxicidade (WARRELL, 2010; CUNHA; MARTINS, 2012). As LAAOs têm uma potente ação catalítica, tendo um considerável efeito bactericida (OKUBO *et al.*, 2012).

2.3 INFECÇÕES BACTERIANAS

As bactérias são microrganismos procariotos unicelulares que não apresentam núcleo diferenciado e o nucleóide consiste em uma única fita dupla de DNA circular. Esses microrganismos se reproduzem por divisão binária e a maioria apresenta uma parede celular rígida composta por peptidoglicano (LEVISON, 2014; MADIGAN *et al.*, 2016).

Infecções bacterianas se caracterizam pela multiplicação de bactérias prejudiciais à saúde, podendo ser caracterizada de forma leve, média ou grave e podem atingir desde a pele até órgãos internos. A infecção pode acontecer quando um microrganismo supera as defesas imunológicas do hospedeiro, provocando vários sintomas, como febre e inflamações (LEVISON, 2014; HEGGENDORNN *et al.*, 2016). Bactérias patogênicas são classificadas em primárias e oportunistas. As primárias causam infecções em indivíduos saudáveis e as oportunistas afetam indivíduos com o sistema imunológico comprometido. Os locais mais comuns de infecção em adultos são o trato urinário, respiratório, sistema gastrointestinal e a pele (HEGGENDORNN *et al.*, 2016).

A infecção hospitalar é considerada um grande problema de saúde pública, com impacto na morbidade, mortalidade, tempo de internação e aumento dos gastos com procedimentos diagnósticos e terapêuticos (DA COSTA *et al.*, 2015). Antimicrobianos geralmente são utilizados no tratamento de infecções e possuem alto custo gerando muitas despesas médicas (LISBOA; NAGEL, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Há vários fatores que elevam os números de casos por infecção hospitalar, dentre eles, os fatores relacionados ao paciente, como transplantes, imunossupressão, queimadura e etc, e aqueles relacionados aos procedimentos e métodos que o paciente está exposto (Figura 5) (FIGUEREDO, 2012).

Infecções relacionadas à assistência a saúde causadas por microrganismos multirresistentes contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade devido à dificuldade do tratamento, em razão da pouca disponibilidade de fármacos eficazes para o tratamento

destas infecções (SADER *et al.*, 2001). Na atualidade a resistência bacteriana aos antimicrobianos é um sério problema mundial de saúde pública (PAN *et al.*, 2011; RUSSO; SPELLBERG; JOHNSON, 2016). Os antimicrobianos desempenham um papel essencial para o tratamento das infecções e a descoberta do mesmo foi um grande avanço para a saúde da população mundial. Muitas mortes foram evitadas e doenças controladas, aumentando a qualidade de vida da população que era acometida pelas infecções microbianas. Contudo, a facilidade de obtenção tornou a sua utilização de uso comum, e muitas vezes inadequado e abusivo, surgindo então a resistência bacteriana (ACAR; MOULIN, 2012).

A resistência bacteriana pode ser atribuída a vários fatores como: facilidade de acesso ao composto antimicrobiano; uso excessivo, indiscriminado e abusivo de antimicrobianos; antibioticoterapia empírica inadequada; uso errôneo em tratamentos não infecciosos; entre outros fatores. O impacto da resistência bacteriana reflete diretamente na saúde da população e na saúde mundial (COLLIGNON, 2012; HEGGENDORNN *et al.*, 2016; MARSTON *et al.*, 2016).

Figura 5 – Fatores de risco para infecção hospitalar.



Fonte: Adaptado FIGUEREDO, 2012.

A resistência aos antimicrobianos também é um fenômeno genético relacionado à existência de genes que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação dos fármacos frente aos microrganismos. A resistência bacteriana também pode ser transferida entre bactérias através de métodos de recombinação como, por exemplo,

transdução, transformação e conjugação e, frequentemente, envolve normalmente genes situados em plasmídeos e transposons (SOUSA, 2014; MARSTON *et al.*, 2016).

2.3.1 PATÓGENOS GRAM POSITIVOS

2.3.1.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcae* e possui 37 espécies. A espécie de maior interesse dentro deste gênero é *S. aureus*, que está frequente relacionado a diversas infecções em humanos (DOS SANTOS *et al.*, 2007).

S. aureus é uma bactéria gram positiva e catalase positiva, esférica com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóvel, não esporulada e geralmente não encapsulada (Figura 6) (DOS SANTOS *et al.*, 2007; MADIGAN, 2016).

Este gênero faz parte da microbiota da pele humana saudável e de outros sítios anatômicos de 30% da população, desenvolvendo uma relação de simbiose com seu hospedeiro humano (TONG *et al.*, 2015). Entretanto pode provocar doenças desde simples infecções como espinhas ou furúnculos até infecções mais graves como pneumonia, meningite, endocardite, septicemia, dentre outras. Este microrganismo traz riscos principalmente em unidades de terapia intensiva hospitalar (UTIs) para pacientes que fazem diálise, queimados, diabéticos e aidéticos (DOS SANTOS *et al.*, 2007; CORREAL *et al.*, 2013; TONG *et al.*, 2015; MADIGAN, 2016).

Infecções nosocomiais são frequentemente associadas a *S. aureus*, comumente transmitida tanto pelo contato direto com o colonizado e trabalhadores, ou como resultado de procedimentos médicos invasivos incluindo cirurgias e introdução de implantes médicos (BHATTACHARYA *et al.*, 2015).

Figura 6 - Aspectos microscópicos de *Staphylococcus aureus* (A), e infecções da pele e tecidos (B), abscesso (C), pústula (D), impetigo e sarna (E) causados por *S. aureus*.



Fonte: Adaptado de TONG *et al.*, 2015.

O mecanismo de invasão do *S. aureus* consiste primeiramente em aderência à pele ou à mucosa do hospedeiro, e rompimento das barreiras do epitélio, comprometendo estruturas de junções intercelulares como os desmossomos (MADIGAN, 2016). Após o rompimento do epitélio, este microrganismo utiliza diversas estratégias que permitem a sua sobrevivência e proliferação no organismo do hospedeiro. Estas estratégias estão relacionadas com a bloqueio da opsonização do patógeno pelas proteínas do sistema complemento, neutralização da fagocitose e inibição de respostas imune humoral e celular. A capacidade de colonização e patogenicidade são, portanto, uma consequência dos seus fatores de virulência, os quais desempenham papel fundamental na adesão celular, captação de nutrientes e na sua evasão da resposta imunológica do hospedeiro. O alto potencial infeccioso não está restrito apenas à sua facilidade de multiplicação e disseminação nos tecidos, mas também à produção de moléculas com grande potencial patogênico que incluem uma grande variedade de toxinas e enzimas como: betalactamases, coagulases, hialuronidases, catalases, DNases, lipases, proteases e esterases (DOS SANTOS *et al.*, 2007; TONG *et al.*, 2015; MADIGAN, 2016).

2.3.1.2 *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA (MRSA)

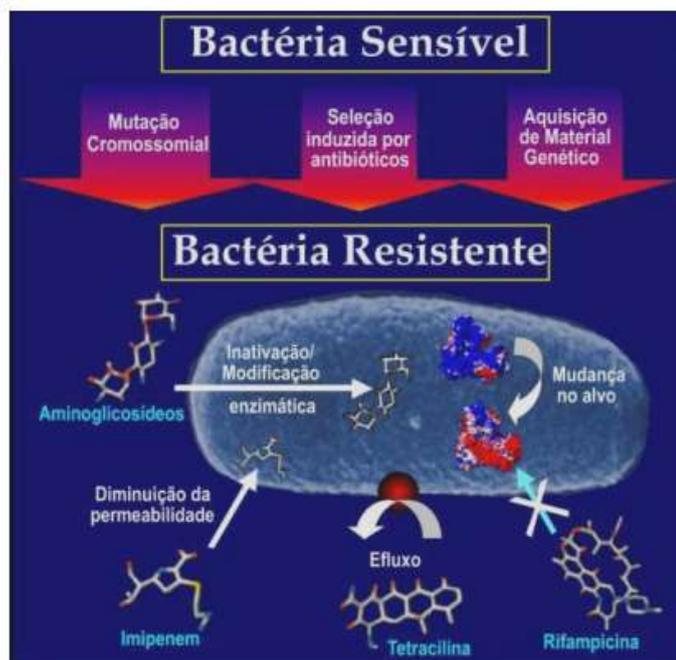
Em 1929, Alexandre Fleming conduziu uma pesquisa e relatou os efeitos bactericidas de uma substância produzida por fungos do gênero *Penicillium* frente a cepas de *S. aureus*

(FLEMING, 1929). Essa substância foi denominada penicilina e a partir desta descoberta este agente antimicrobiano começou a ser amplamente produzido e utilizado durante a Segunda Guerra Mundial (NEUSHUL, 1993), conseqüentemente, reduzindo a taxa de mortalidade causada por pneumonias e meningite durante este período (ABRAHAM; CHAIN, 1940). Em 1940, uma enzima denominada penicilinase, capaz de hidrolisar o anel β -lactâmico da penicilina tornando-a inativa, foi descoberta em *E. coli* (DOS SANTOS *et al.*, 2007; SHENOY *et al.*, 2014; GREMA *et al.*, 2015). Em 1944, a produção de penicilinase foi descoberta em *S. aureus* e em 1948 foi observado que cerca de 50% dos isolados estafilocócicos de pacientes em um hospital do Reino Unido eram resistentes à penicilina (GREMA *et al.*, 2015). Em 1959, essa resistência já alcançava a taxa de 80%, sendo estendida tanto à amoxicilina como à ampicilina (DOS SANTOS *et al.*, 2007).

Desde então 90 a 95% das cepas de *S. aureus* são resistente à penicilina, pois como a penicilinase é codificada pelo plasmídeo, sua transferência é facilitada por transdução ou conjugação (GREMA *et al.*, 2015). Para conter este problema, foi criada a meticilina, um β -lactâmico sintético que era resistente à ação das β -lactamases produzida por *S. aureus*. Entretanto, logo após o advento da meticilina, surgiram relatos de amostras resistentes também a este antimicrobiano. Essas cepas foram denominada de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (SANTOS, 2015; GREMA *et al.*, 2015; PURRELLO *et al.*, 2016). As cepas de MRSA se disseminaram rapidamente em ambientes hospitalares, limitando a antibioticoterapia de combate a infecções por *S. aureus* aos glicopeptídios vancomicina e teicoplanina (PURRELLO *et al.*, 2016).

A resistência a antimicrobianos geralmente é desenvolvida por mutações em seus genes ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias através da conjugação ou transdução de plasmídeos que contenham estes genes (LEE; HUTTNER; HARBARTH, 2016). Normalmente a resistência que ocorre por mutações geram alterações no sítio de ação do antibiótico enquanto que a resistência por aquisição de genes de resistência envolvem a inativação ou destruição do fármaco, sendo transmitida por transposons e plasmídeos (Figura 7) (WONG *et al.*, 2016).

Figura 7 - Principais mecanismos envolvidos no processo de geração de bactérias resistentes.



Fonte: FERREIRA, 2007.

O mecanismo de resistência à meticilina está relacionado à aquisição do gene *mecA*, que a torna resistente a todos os β -lactâmicos. Essa resistência é causada pela produção de uma proteína de ligação à penicilina (PBP) PBP A2 que reduz as afinidades de ligação aos β -lactâmicos (WIELDERS *et al.*, 2002). Em 2011 foi descoberto um novo homólogo do gene *mecA*, denominado gene *mecC*, encontrado em isolados de humanos e animais. Até o momento, os isolados contendo este gene *mecC* provaram ser resistentes fenotipicamente aos β -lactâmicos, mas não conseguem ser reconhecidos como MRSA clássica por PCR já que apresentam composição de nucleotídeos diferente (SHORE *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2012; STEGGER *et al.*, 2012).

MRSA é endêmico em hospitais, mas já vem sendo isolado com frequência na comunidade, e sua epidemiologia está em constante mudança (PURELLO *et al.*, 2016). As taxas de mortalidade por MRSA são elevadas e isso pode ser devido à virulência intrínseca desses patógenos, a atrasos significativos na administração de antimicrobianos apropriados ou, na pior das hipóteses, ambos. Os custos associados a uma infecção por MRSA são elevados, com uma média de tempo hospitalar de 10 dias e custos hospitalares médios de \$ 14.000 nos EUA (SUTTON *et al.*, 2013; STRYJEWSKI; COREY, 2014).

MRSA pode causar uma variedade de infecções cutâneas, dos tecidos moles e infecções que estão associadas com inserção de dispositivos médicos, osteomielite, endocardite infecciosa bem como abscessos de órgãos e pneumonia nosocomial. Muitas destas

infecções podem causar bacteremias e sepse levando a morte do paciente (CORREAL *et al.*, 2013). Os agentes que são administrados atualmente para o tratamento de infecções graves causadas por MRSA são: vancomicina e daptomicina para bacteremias, vancomicina e daptomicina ou linezolida para infecções graves da pele e tecidos moles e vancomicina ou linezolida para pneumonia associada ao hospital (PURELLO *et al.*, 2016)

2.3.2 PATÓGENOS GRAM NEGATIVOS

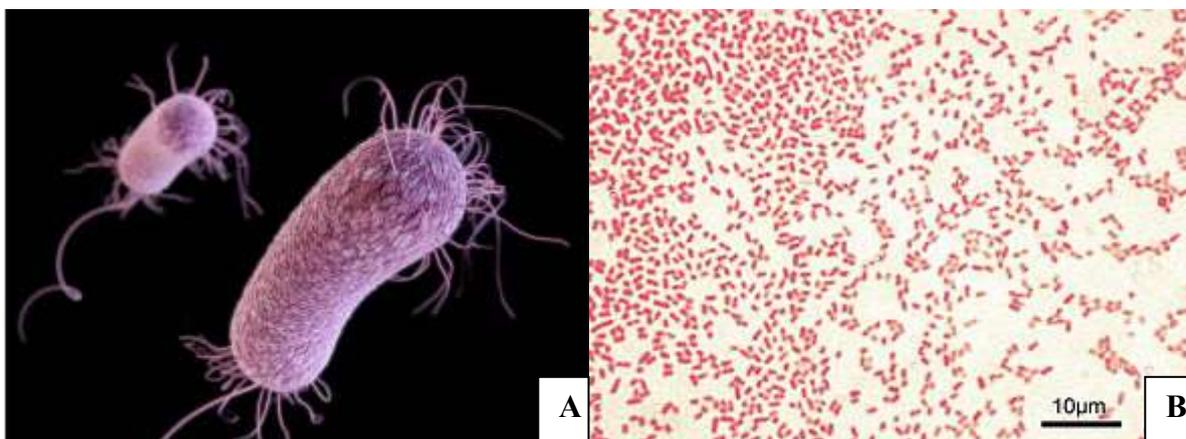
2.3.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria aeróbia com um único flagelo, medindo cerca de 0,5-1,0 µm de diâmetro e 1,5-5,0 µm de comprimento (Figura 8). Essa bactéria é considerada um patógeno oportunista responsável por um amplo espectro de infecções em humanos, afetando principalmente imunocomprometidos (LEVISON, 2014; MADIGAN, 2016).

Infecções causadas por este patógeno são uma das causas mais comuns de infecções associadas aos cuidados de saúde (BÉDARD; PRÉVOST; DÉZIEL, 2016; VAZ *et al.*, 2016). Essas infecções podem ser adquiridas em ambientes comunitários (piscinas, banheiras de hidromassagem e outros), mas ocorrem principalmente na área da saúde. Em hospitais, especialmente, em UTIs e em procedimentos médicos invasivos. Este patógeno utiliza uma gama de ambientes, como, por exemplo, aerossóis, água potável, torneiras, pia, chuveiro, drenos, equipamentos respiratórios, umidificadores, endoscópios, bacias de banho e hidroterapia. Essa bactéria pode ser transmitida pelas mãos dos profissionais da saúde e de paciente para paciente. As populações de risco incluem recém-nascidos, pacientes com instrumentos invasivos, queimaduras, neutropenia profunda e pacientes com bronquiectasia e fibrose cística (BÉDARD; PRÉVOST; DÉZIEL, 2016; O'LOUGHLIN *et al.*, 2016).

P. aeruginosa pode causar uma variedade de infecções, incluindo pneumonia, bacteremia e urosepse. Sua importância deve-se pela expressão de múltiplos mecanismos de resistência à ação de antimicrobianos, ocasionando altos índices de morbidade e mortalidade (GELLATLY; HANCOCK *et al.*, 2013; BÉDARD; PRÉVOST; DÉZIEL, 2016).

Figura 8 - Aspectos morfológicos em 3D (A) e microscópicos (B) de *Pseudomonas aeruginosa*.



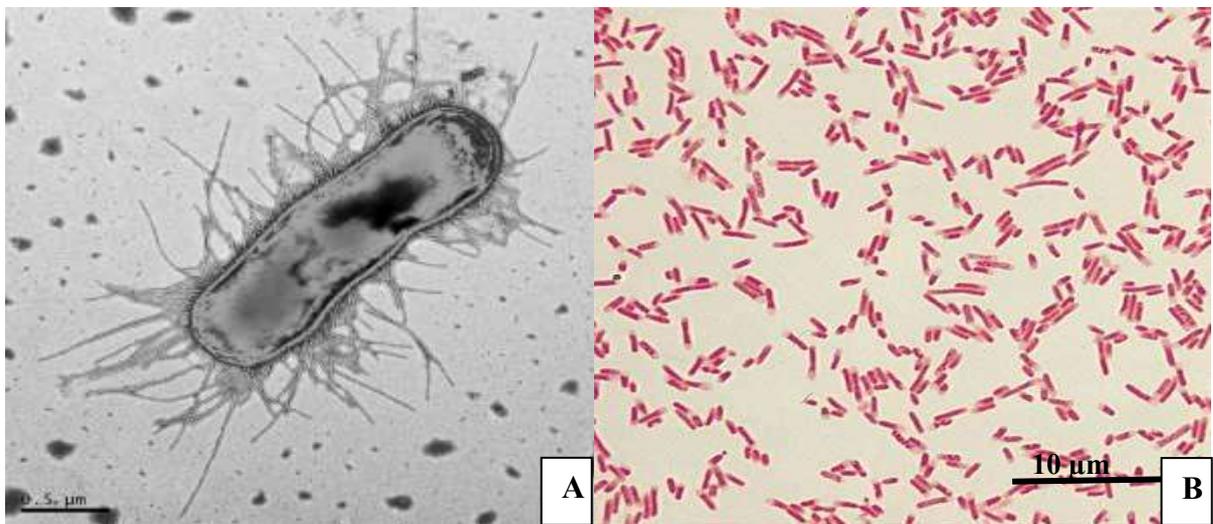
Fonte: NEWMAN, 2015.

2.3.2.2 *Escherichia coli*

E. coli é um bacilo gram negativo, oxidase-negativo, anaeróbio facultativo, imóvel ou móvel apresentando flagelos peritríquios (Figura 9). *E. coli* pertence a família *Enterobacteriaceae* e pode ser prontamente isolado a partir de amostras fecais por plaqueamento em meio seletivo. Esse patógeno possui grande interesse científico, pois parte dos conhecimentos sobre metabolismo, recombinação gênica, expressão de proteínas heterólogas e patogenicidade deve-se aos estudos em *E. coli* (CROXEN *et al.*, 2013; JOHNSON *et al.*, 2013; ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Esta bactéria faz parte da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis, sendo um comensal inofensivo em animais homeotérmicos, isto é, de sangue quente. No entanto, representa um importante agente patogênico de infecções adquiridas na comunidade quanto hospitalares, causando infecções extra-intestinais e intestinais, tanto em pessoas saudáveis como em imunocomprometidos (CROXEN *et al.*, 2013; DOI *et al.*, 2013; JOHNSON *et al.*, 2013). *E. coli* está estritamente ligado a infecções do trato urinário, mas pode infectar qualquer local extra-intestinal causando meningite, miosite, osteomielite, infecções da estrutura da pele, respiratórias, epidídimo-orquite e bacteremia (CROXEN *et al.*, 2013; VILA *et al.*, 2016).

Figura 9 - Microscopia Eletrônica de Varredura (A) e Microscopia Óptica (B) de *Escherichia coli*.



Fonte: NEWMAN, 2015.

Essa bactéria possuem também diversos fatores de virulência como adesinas, toxinas, sistemas de aquisição de ferro, revestimento de polissacarídeo e invasinas que estão presentes em cepas patogênicas (VILA *et al.*, 2016). É um dos bacilos gram negativos mais frequentemente relacionados a infecções urinárias em mulheres, podendo causar diferentes infecções em mulheres grávidas, como infecção intra-amniótica e puerperal e infecções neonatais, tais como sepse neonatal precoce e tardia (CROXEN *et al.*, 2013; VILA *et al.*, 2016).

Em um relatório recente da Organização Mundial de Saúde (OMS), a *E. coli* foi incluída em uma lista dos nove principais microrganismos de interesse internacional causando infecções mais comuns em diferentes contextos: na comunidade, em hospitais ou transmitidas através da cadeia alimentar. Este relatório destacou a resistência antimicrobiana em *E. coli*, observando aumentos significativos na emergência e disseminação de bactérias multirresistentes, incluindo cepas resistentes a novos antibióticos, tais como fluoroquinolonas e cefalosporinas de espectro estendido (DOI *et al.*, 2013; JOHNSON *et al.*, 2013; WHO, 2014).

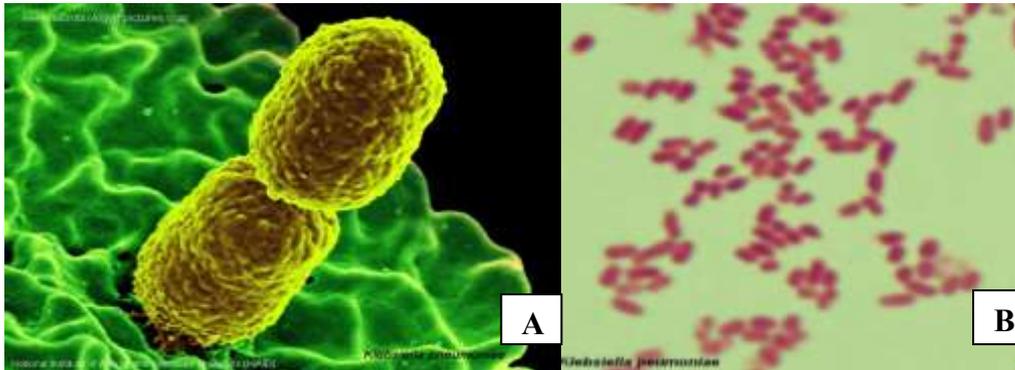
2.3.2.3 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae, conhecida inicialmente como “A bactéria de Friedlander”, foi isolada pela primeira vez no século XIX. *K. pneumoniae* é uma bactéria gram negativa encapsulada, imóvel e pode ser encontrada em diversos ambientes como: solo, águas superficiais e equipamentos médicos (Figura 10). Seus principais sítios de colonização são a mucosa humana, trato gastrointestinal e a orofaringe. A partir destes locais, as cepas de *K. pneumoniae* podem utilizá-los como porta de entrada e migrar para outros locais causando infecções graves em humanos (PACZOSA; MECSAS, 2016).

K. pneumoniae é um patógeno oportunista adquirido no hospital e na comunidade. Os tipos mais comuns de infecção causada por *K. pneumoniae* são pneumonia, sepse, bacteremia, meningite e abscessos hepáticos piogênicos (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013; CHUNG, 2016). Esta bactéria ganhou recente notoriedade devido ao aumento do número de infecções graves e crescente escassez de tratamentos eficazes. Estas circunstâncias surgiram devido à emergência de cepas que adquiriram características genéticas adicionais e se tornaram “hipervirulento” ou resistentes a antibióticos (CHUNG, 2016; PACZOSA; MECSAS, 2016;). Ao longo das últimas décadas, registrou-se um grande aumento de aquisição de resistência a uma ampla gama de antibióticos por cepas “clássicas” de *K. pneumoniae*. Como consequência desta resistência a antibióticos, infecções simples como infecções do trato urinário tornaram-se de difícil tratamento, e infecções graves como pneumonias e bacteremias têm se tornado cada vez mais mortal (CHAUDHARY *et al.*, 2013; CHUNG, 2016).

Dois tipos principais de resistência a antibióticos são observados em *K. pneumoniae*, um deles envolve a expressão de β -lactamases de amplo espectro (ESBL), que tornam as bactérias resistentes a cefalosporinas e monobactâmicos; e o outro mecanismo de resistência é a expressão de carbapenemases, que torna as bactérias resistentes a quase todos os betalactâmicos disponíveis, incluindo os carbapenem, esses microrganismos são denominados *K. pneumoniae* carbapenemases (KPC) (CHUNG, 2016; YUE *et al.*, 2016).

Figura 10 - Microscopia Eletrônica de Varredura (A) e Microscopia Óptica (B) de *Klebsiella pneumoniae*.



Fonte: NEWMAN, 2015.

As infecções bacterianas estão entre as dez principais causas de morte mundial de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2014) e o desenvolvimento de resistência microbiana a antimicrobianos dificultam o tratamento dessas infecções, aumentando assim a morbidade e mortalidade. Portanto, a pesquisa em busca de novos agentes antimicrobianos de diferentes fontes biológicas, como peçonhas de serpentes, amplia a possibilidade de se encontrar novos agentes terapêuticos para o tratamento destas infecções.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antibacteriano da peçonha de *Lachesis muta rhombeata*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os halos de inibição da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* utilizando as metodologias do poço e disco difusão frente a bactérias patogênicas;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* frente a bactérias patogênicas.

4 REFERÊNCIAS

AB'SABER, A. N. Os Domínios Morfoclimáticos na América do Sul: Primeira aproximação. **Geomorfologia**, São Paulo. n. 52, p.1–21, 1977.

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, Oxford, v. 146, n. 3713, p. 837, 1940.

ACAR, J. F.; MOULIN, G. Antimicrobial resistance: a complex issue. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, Paris, v. 31, n. 1, p. 23-31, 2012.

AGUIAR, C. S. **Avaliação do potencial antimicrobiano do veneno total de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus***. 84 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia), Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2014.

AL-ASMARI, A. K. *et al.* Assessment of the Antimicrobial Activity of Few Saudi Arabian Snake Venoms. **The open microbiology journal**, Hilversum, v. 9, p. 18, 2015.

ALVES, R.M. *et al.* Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by Lamino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Amsterdam, v.151, n. 4, p. 542-550, 2008.

BÉDARD, E.; PRÉVOST, M.; DÉZIEL, E. *Pseudomonas aeruginosa* in primise plumbing of large buildings. **Microbiology open**, Bruxelas, v. 5, n. 6, p. 937-956, 2016.

BERNARDE, P. S. Mudança na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. **Gazeta Médica da Bahia**, Bahia, v. 81, n.1, p. 55-63, 2011.

BHATTACHARYA, M. *et al.* Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. **Expert review of anti-infective therapy**, Londres, v. 13, n. 12, p. 1499-1516, 2015.

BIGARELLA, J.J.; ANDRADE-LIMA, D. Paleoenvironmental changes in Brazil. In: *Biological diversification in the Tropics*. **Plenum Press**, New York, p. 27-40. 1982.

BOLZANI, V.S. Biodiversidade, Bioprospecção e Inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 68, n. 1, Mar. 2016. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252016000100002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 4 set. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. **Acidentes por animais peçonhentos - Notificações Registradas**: banco de dados. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

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**, Oxford, v. 60, p. 1263-1276, 2012.

BUCARETCHI, F. *et al.* Bites by coral snakes (*Micrurus* spp.) in Campinas, State of São Paulo, Southeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 141-145, 2006.

BULFINCH, T. **Bulfinch's mythology**. Londres, Random House Digital, 1998.

CADLE, J.E. Geographic distribution: problems in phylogeny and zoogeography. **Snakes: ecology and evolutionary biology**, Nova York, v. 3, p. 77-105, 1987.

CALVETE, J. J. *et al.* Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.583, n. 11, p.1736–1743, 2009.

CALVETE, J.J.; JUAREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, Malden, v. 42, n. 11, p. 1404-1413, 2007.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. Ithaca, Cornell University Press, 1989.

CAMPOS, L.B. *et al.* Analysis of phospholipase A2, L-amino acid oxidase, and proteinase enzymatic activities of the *Lachesis muta rhombeata* venom. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, New York, v. 26, n. 8, p. 308-314, 2012.

CAMPOS, V.R. *et al.* Synthesis, biological, and theoretical evaluations of new 1,2,3-triazoles against the hemolytic profile of the *Lachesis muta* snake venom. **Bioorganic & medicinal chemistry**, Oxford, v. 12, n. 21, p. 7429-7434, 2009.

CARDOSO, J. L. C. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier, 2009.

CASTOE, T. A.; PARKINSON, C. L. Bayesian mixed models and the phylogeny of pitvipers (*Viperidae*: Serpentes). **Molecular phylogenetics and evolution**, San Diego, v. 39, n. 1, p. 91-110, 2006.

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

CHAUDHARY, M.; KUMAR, S.; PAYASI, A. In vitro susceptibilities of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella species* to CSE1034 and other [beta]-lactams. **Journal of Antibiotics**, Tokio, v. 66, n. 8, p. 495, 2013.

CHUNG, P. Y. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, 22 set. 2016. Disponível em:

<<http://femsle.oxfordjournals.org/content/early/2016/09/22/femsle.fnw219.abstract>>.

Acesso em: 01 nov. 2016.

COLLIGNON, P. Clinical impact of antimicrobial resistance in humans. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, Paris, v. 31, n. 1, p. 211-220, 2012.

CORRÊA, E. A. *et al.* Isolation, structural and functional characterization of a new Lys49 phospholipase A 2 homologue from *Bothrops neuwiedi* urutu with bactericidal potential. **Toxicon**, Oxford, v. 115, p. 13-21, 2016.

CORREAL, J. C. *et al.* Infecções por *Staphylococcus aureus*: mudança do perfil epidemiológico no Hospital Universitário Pedro Ernesto. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 31-46, 2013.

COSTA, H.C.; BÉRNILS, R.S. Répteis brasileiros: Lista de espécies 2015. **Herpetologia Brasileira**, São Paulo, v.4, n.3, p. 75-93, 2015.

COSTA, L. P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 71-86, 2003.

CROXEN, M. A. *et al.* Recent advances in understanding enteric pathogenic *Eschericia coli*. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.

CUNHA, E.; MARTINS, O. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*—uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 21-26, 2012.

DA COSTA, F. M. *et al.* Fatores associados à ocorrência de infecção hospitalar em idosos: uma revisão integrativa. **Renome**, Montes Claros, v. 4, n. 1, p. 70-86, 2015.

DA SILVA, F. S. Q. **Avaliação da pureza de soros antiofídicos brasileiros e desenvolvimento de nova metodologia para essa finalidade**. 186 f. Tese de Doutorado. (Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2008.

DE LIMA, D.C. *et al.* Snake Venom: Any Clue for Antibiotics, CAM? **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand Oaks, v. 2, n. 1, p. 39-47, 2005.

DE OLIVEIRA, R. C.; WEN, F. H.; SIFUENTES, D. N. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In CARDOSO, J. L. C, 2^a Ed. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, São Paulo, p. 6-21, 2009.

DOI, Y.; PARK, Y. S. *et al.* Community-associated extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, Philadelphia v. 56, n. 5, p. 641-648, 2013.

DOS SANTOS, A. *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, p. 413-423, 2007.

DU, X.Y.; CLEMETSON, K.J.; Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**. New York, v. 40, n. 6, p. 659-665, 2002.

ESPINO-SOLIS, G.P. *et al.* Antidotes against venomous animals: state of the art and perspectives. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 183-199, 2009.

FERNANDES, D. S.; FRANCO, F.L.; FERNANDES, R. Systematic revision of the genus *Lachesis* Daudin, 1803 (Serpentes, *Viperidae*). **Herpetologica**, Austin, v. 60, n. 2, p. 245-260, 2004.

FERREIRA, B. L. A. **Identificação da atividade antibiótica e relação estrutura-atividade de moléculas de origem sintética e animal**. 110 f. Dissertação (Pós-graduação em Neuroimunologia), Universidade federal Fluminense, Niterói, RJ, 2007.

FERREIRA, B. L.A. *et al.* Comparative analysis of *Viperidae* venoms antibacterial profile: a short communication for proteomics. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxorfd, v. 2011,n. 1, p. 1-4, 2011.

FIGUEREDO, D. A. **Fatores de risco associados à infecção hospitalar em uma Unidade de Terapia Intensiva.** (2012). 107 f. Tese de Dissertação (Pós Graduação em Modelos de Decisão e Saúde). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2012.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British journal of experimental pathology**, London, v. 10, n. 3, p. 226, 1929.

FORTES-DIAS, C.L. *et al.* Plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). I. Interaction with PLA 2 from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, New York, v, 37, n. 12, p. 1747-1759, 1999.

FRANÇA, F.O.S; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, J.L.C. *et al.* **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes.** 2.ed. São Paulo: Savier, 2009. P.81-95.

FULY, A.L. *et al.* Myotoxic activity of an acidic phospholipase A 2 isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Toxicon**, New York, v. 38, n. 7, p. 961-972, 2000.

FUNASA, MdS. **Manual de Diagnóstico e Tratamento por Animais Peçonhentos.** 2. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. Disponível em <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/manu_peco01.pdf> p. 29-31. Acesso em: 23 set de 2016.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and disease**, Malden, v. 67, n. 3, p. 159-173, 2013.

GOLD, B.S.; DART, R.C.; BARISH, R.A. Bites of venomous snakes. **New England Journal of Medicine**, Melbourn, v. 347, n. 5, p. 347-356, 2002.

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, Belo Horizonte, MG, 2006.

GREMA, H. A. *et al.* Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a review. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, Pakistan, v. 3, n. 2, p. 79-98, 2015.

HAFFER, J. Ciclos de tempo e indicadores de tempos na história da Amazônia. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 6, n. 15, p. 7-39, 1992.

HEGGENDORNN, L. H. *et al.* Epidemiological profile and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from nosocomial infections. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, Três Lagoas, v. 2, n. 1, p. 25-48, 2016.

JOHNSON, J. R. *et al.* Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 207, n. 6, p. 919-928, 2013.

KALAYCI, S. *et al.* Evaluation of Antimicrobial and Antiviral Activities of Different Venoms. **Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)**, Sharjah, v. 16, n. 1, p. 44-53, 2016.

KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. L. C. Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. **Toxicon**, Oxford, v. 27, n. 9, p. 955-963, 1989.

KAMIGUTI, A. S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R. D. G. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 853-862, 1998.

KIM, C. *et al.* Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the β -lactam-resistant phenotype. **Journal of Biological Chemistry**, Hong Kong, v. 287, n. 44, p. 36854-36863, 2012.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, Basel, v. 63, n. 24, p. 3030-3041, 2006.

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

KRAUS, F.; MINK, D. G.; BROWN, WESLEY M. Crotaline intergeneric relationships based on mitochondrial DNA sequence data. **Copeia**, Washington, v. 1996, n. 4, p. 763-773, 27 dez. 1996.

LEE, A. S.; HUTTNER, B.; HARBARTH, S. Prevention and Control of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Acute Care Settings. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 30, n. 4, p. 931-952, 2016.

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

LIMA, P. H. S; HADDAD, J. V. A snakebite caused by a bushmaster (*Lachesis muta*): report of a confirmed case in State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 5, p. 636-637, 2015.

LISBOA, T.; NAGEL, F. Infecção por patógenos multi-resistentes na UTI: como escapar. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 120-4, 2011.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MADRIGAL, M. *et al.* Snake venomomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 77, p. 280-297, 2012.

MARSTON, H.D. *et al.* Antimicrobial Resistance. **JAMA**, Chicago, v. 316, n. 11, p. 1193-1204, 20 set. 2016.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In CARDOSO, J. L. C; FRANÇA, F. O. S. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*, São Paulo: Sarvier, p. 33-61, 2003.

MUNOZ-PRICE, L. S. *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet infectious diseases**, New York, v. 13, n. 9, p. 785-796, 2013.

NEUSHUL, P. Science, government and the mass production of penicillin. **Journal of the history of medicine and allied sciences**, New Haven, v. 48, n. 4, p. 371-395, 1993.

NEVALAINEN, Timo J.; GRAHAM, Garry G.; SCOTT, Kieran F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A 2. Review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, Amsterdam, v. 1781, n. 1, p. 1-9, 2008.

NEWMAN, H. **Microbiology in pictures**. (2015). 6 fotografias. Disponível em: <<http://www.microbiologyinpictures.com/index.php>>. Acesso em: 06 dez. 2016.

O'LOUGHLIN, C. T. *et al.* A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 110, n. 44, p. 17981-17986, 2013.

OKUBO, B.M. *et al.* Evaluation of an antimicrobial L-amino acid oxidase and peptide derivatives from *Bothropoides matogrosensis* pitviper venom. **PloS one**, San Francisco, v. 7, n. 3, 2012.

OLIVEIRA, P. C. C.; DE MELO, N.; MACHADO, A. T. B. D. Impacto financeiro das infecções nosocomiais em unidades de terapia intensiva em hospital filantrópico de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 357-361, 2012.

PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016.

PAN, A. *et al.* Secular trends in antibiotic consumption in the adult population in Emilia-Romagna, Italy, 2003–2009. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 17, n. 11, p. 1698-1703, 2011.

PAULICK, E. **Land Bridge Helped Ice Age Horses Flourish**. 2015. 1 fotografia. Disponível em: <<http://www.paulickreport.com/horse-care-category/land-bridge-helped-ice-age-horses-flourish/>>. Acesso em: 15 out. 2016.

PURRELLO, S. M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of the currently available treatment options. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, Amsterdam, v. 7, p. 178-186, 2016.

PYRON, R. A.; BURBRINK, F. T.; WIENS, J. J. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. **BMC evolutionary biology**, London, v. 13, n. 1, p. 1, 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.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Recombinant protein expression in microbial systems**, London, v.5, p. 172-189, 2014.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. **Venomous animals and their venoms**, New York, v. 2, p. 345-384, 1971.

ROSENFELD, G.; HAMPE, O. G.; KELEN, E. M. Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms; determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 29, p. 143, 1959.

RUSSO, T. A.; SPELLBERG, B; JOHNSON, J. R. Important complexities of the antivirulence target paradigm: a novel ostensibly resistance-avoiding approach for treating infections. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 213, n. 6, p. 901-903, 2016.

SADER, H. S. *et al.* Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 5, n. 4, p. 200-214, 2001.

SAMY, R. P.; SETHI, G.; LIM, L. H. K. A brief update on potential molecular mechanisms underlying antimicrobial and wound-healing potency of snake venom molecules. **Biochemical pharmacology**, New Jersey, v. 1, n. 115, p. 1-9, 2016.

SAMY, R.P. *et al.* Viper metalloproteinase (*Agkistrodon halys pallas*) with antimicrobial activity against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of cellular physiology**, Philadelphia, v. 216, n. 1, p. 54-68, 2008.

SANTOS, L. S. ***Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina adquirido na comunidade (CA-MRSA)**. 2015. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina). Centro Universitário de Brasília, Faculdade de Ciências da Educação e Saúde. Brasília, DF. 2015

SANTOS, P. K. *et al.* **Proteoma da peçonha de *Lachesis muta rhombeata***. 2013. 117f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP. 2013.

SHENOY, E. S. *et al.* Natural history of colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE): a systematic review. **BMC Infectious Diseases**, Londres, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.

SHORE, A. C. *et al.* Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 8, p. 3765-3773, 2011.

SILVA, A. M.; BERNARDE, P.S.; ABREU, L. C. Acidentes com animais peçonhentos no Brasil por sexo e idade. **Revista brasileira de crescimento e desenvolvimento humano**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 54-62, 2015.

SOUSA, R. R. F. **Pesquisa de genes de resistência a quinolonas em bacilos Gram negativos de origem clínica e ambiental**. 2014. 97 f. Tese de Doutorado. (Pós-graduação em Saúde Pública). São Paulo, SP, 2014.

SOUZA, R. **Núcleo serra grande**. 2015. 2 fotografias. Disponível em: <<http://lachesisbrasil.blogspot.com.br/>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

STEGGER, Á. *et al.* Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 18, n. 4, p. 395-400, 2012.

STRYJEWSKI, M. E.; COREY, G. R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. **Clinical infectious diseases**, Amsterdam, v. 58, n.1, p. 10-19, 2014.

SUTTON, J. P. *et al.*, Hospital, Health Care, and Community-Acquired MRSA: Estimates From California Hospitals, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK396238/pdf/Bookshelf_NBK396238.pdf>. Acesso em 7 dez. 2016.

TONG, S. Y. *et al.* *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

UETZ, PETER. The Reptile Database Turns 20. **Herpetological Review**, Lawrence, v. 47, n. 2, p. 330-334, 2016.

VANZOLINI, P. E. Paleoclimas e especiação em animais da América do Sul tropical. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 6, n. 15, Aug. 1992.

VAZ, R. A. P. *et al.* Microaerophilic growth characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* importance to the successful treatment of chronic infections in cystic fibrosis lungs. **Pathogens**, Basel, v.3, n.3, p. 680-703, 2016.

VIAL, J. L.; JIMENEZ-PORRAS, J. M. The ecogeography of the bushmaster, *Lachesis muta*, in Central America. **American Midland Naturalist**, Notre Dame, v. 78, n. 1, p. 182-187, 1967.

VILA, J. *et al.* *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. **FEMS microbiology reviews**, Amsterdam, p. 437-463, 2016. Disponível em: <<http://femsre.oxfordjournals.org/content/40/4/437.long>>. Acesso em: 15 out. 2016.

WARRELL, D. A. Snake bite. **Lancet**, London, v. 375, p. 77-88, 2010.

WEI, J.F. *et al.* Purification, characterization and cytokine release function of a novel Arg-49 phospholipase A 2 from the venom of *Protobothrops mucrosquamatus*. **Biochimie**, Paris, v. 88, n. 10, p. 1331-1342, 2006.

WHO – World Health Organization 2014 – **The Top 10 causes of death**. Disponível em: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/ Acesso em: 04 dez. 2016.

WHO – World Health Organization 2016 – **Antibiotic resistance**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>>. Acesso em 7 dez. 2016.

WIELDERS, C. L. C. *et al.* *mecA* gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 40, n. 11, p. 3970-3975, 2002.

WONG, E. S. *et al.* A 10-Year Review of Ocular Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Clinical Features, and Treatment. **Cornea**, Basel, v. 36, n. 1, p. 92-97, 2016.

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

XU, C. *et al.* A bactericidal homodimeric phospholipases A 2 from *Bungarus fasciatus* venom. **Peptides**, New York, v. 28, n. 5, p. 969-973, 2007.

YUE, D. *et al.* Hospital-wide comparison of health care-associated infection among 8 intensive care units: A retrospective analysis for 2010-2015. **American Journal of Infection Control**, 14 nov. 2016. Disponível em: < [http://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553\(16\)30964-6/abstract](http://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553(16)30964-6/abstract)>. Acesso em: 25 nov. 2016.

ZAMUDIO, K. R.; GREENE, H. W. Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: *Viperidae*): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 62, n. 3, p. 421-442, 1997.

5 ARTIGO

O PRESENTE TRABALHO ESTÁ APRESENTADO NO FORMATO DE ARTIGO REQUERIDO PELO **JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY**, CUJAS NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS SE ENCONTRAM EM ANEXO.

Avaliação da atividade antibacteriana da peçonha de *Lachesis muta rhombeata*

Yonne Karoline Tenório de Menezes^{1,2}, Sílvio Francisco da Silva^{1,2}, Patrícia Luana Barbosa da Silva¹, Luís André de Almeida Campos^{1,3}, Sayonara Stéfane Tavares de Moura^{1,3}, Jeanne Claine Modesto Albuquerque², Isabella Macário Ferro Cavalcanti^{1,3*}

¹Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória (UFPE- CAV), Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Vitória de Santo Antão, Brasil.

²Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória (UFPE-CAV), Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Vitória de Santo Antão, Brasil.

³Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Recife, Brasil.

***Autor Correspondente**

Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco

Rua do Alto do Reservatório s/n, Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil

Tel: + 55 81 35233351; fax: +55 81 35233351

E-mail: bel_macario@yahoo.com.br

Abbreviated running headline: **Atividade antibacteriana da peçonha de *Lachesis muta rhombeata*.**

Resumo

Objetivo

Avaliar a atividade antibacteriana da peçonha de *Lachesis muta rhombeata*.

Métodos e Resultados

Foram utilizados os métodos do poço, do disco e da microdiluição de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Nos métodos do poço e disco, a peçonha de *Lachesis muta rhombeata* não apresentou atividade antibacteriana frente às bactérias gram negativas analisadas, exceto para *Pseudomonas aeruginosa*. Essa peçonha foi capaz de apresentar atividade antibacteriana para *Staphylococcus aureus*, porém não foi ativa frente a *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). Na microdiluição, essa peçonha mostrou maior atividade frente a isolados clínicos de *S. aureus* (CIM= 64 µg/mL), atividade moderada frente a *P. aeruginosa* (CIM= 256 µg/mL) e *S. aureus* (CIM= 128 µg/mL), fracamente ativa frente a *E. coli* (CIM= 512 µg/mL) e inativa para *K. pneumoniae* e MRSA (CIM ≥ 512 µg/mL).

Conclusão

A peçonha de *Lachesis m. rhombeata* é uma alternativa promissora como agente antibacteriano apresentando-se muito ativo frente a *Staphylococcus aureus*.

Significância e Impacto do Estudo

Com o crescente aumento de mortes causadas por infecções, assim como o desenvolvimento de resistência microbiana, estudos que investiguem diferentes fontes biológicas que contenham moléculas bioativas amplia a possibilidade de se encontrar novos agentes terapêuticos para infecções microbianas.

Palavras-chave

Atividade antimicrobiana

Crotalinae

Infecção

Peçonha Ofídica

Viperidae

INTRODUÇÃO

Infeções bacterianas estão entre as dez principais causas de morte mundial de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2014). A capacidade de colonização e patogenicidade bacterianas são, portanto, uma consequência dos seus fatores de virulência, os quais desempenham papel fundamental na adesão celular, captação de nutrientes e na sua evasão da resposta imunológica do hospedeiro. O alto potencial infeccioso não está restrito apenas à sua facilidade de multiplicação e disseminação nos tecidos, mas também à produção de moléculas com grande potencial patogênico. Esses patógenos podem também produzir enzimas que tornam as cepas resistentes a agentes antimicrobianos dificultando o tratamento dessas infecções aumentando a morbidade e mortalidade (Dos Santos et al. 2007; Tong et al. 2015; Chung 2016; Madigan 2016; Paczosa e Mecsas 2016).

Desde a origem do homem, os produtos naturais eram utilizados para tratar e prevenir doenças, e têm sido provenientes de plantas, microrganismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres (Chin et al. 2006). Os produtos naturais sempre desempenharam um papel importante no desenvolvimento de novos fármacos e são uma das principais fontes de agentes terapêuticos para doenças infecciosas (Koehn e Carter 2005).

O Brasil é detentor de uma enorme biodiversidade de espécies da fauna e flora e conta com uma rica fauna de serpentes com cerca de 392 espécies catalogadas (Costa e Bérnils 2015). Peçonhas de serpentes representam um traço adaptativo e um exemplo de evolução convergente. Evolutivamente são utilizados como um meio de defesa e predação (Calvete et al. 2009; Wong e Belov 2012). As peçonhas ofídicas são produzidos em glândulas especializadas e constituem uma fonte rica de moléculas bioativas com importantes propriedades farmacológicas, possuindo assim grande potencial para produção de novos medicamentos (Calvete et al. 2007; Wong e Belov 2012; Almeida et al. 2015). Alguns medicamento e produtos para diagnósticos já foram desenvolvidos a partir de estudos com toxinas e secreções de origem animal (Koh et al. 2006). Uma importante contribuição brasileira do uso de toxinas no desenvolvimento de medicamentos foi o Captopril[®], um fármaco anti-hipertensivo sintético largamente utilizado no controle da hipertensão e insuficiência cardíaca desenvolvido a partir de uma molécula de origem animal presente na peçonha de *Bothrops jararaca* (Ferreira, 1998; Lima et al. 2010).

A família *Viperidae* é representada por um grupo importante de serpentes (Cardoso et al. 2009; Costa e Bérnils 2015). As serpentes da família *Viperidae* e gênero *Lachesis* são uma das maiores serpentes da América e podem atingir até 4 metros de comprimento. No Brasil,

esta cobra é conhecida como surucuru, surucucu-pico-de-jaca e surucutinga (Melgarejo 2003; Cardoso et al. 2009). O gênero *Lachesis* inclui em sua única espécie *L. muta*, quatro subespécies: *L. m. stenophrys*, que está distribuída na Costa Rica, Panamá e Nicarágua, *L. m. melanocephala* restrita apenas à Costa Rica; *Lachesis m. muta* presente na Colômbia, Equador, Venezuela, Peru, Bolívia, Suriname, Guianas e Brasil e *L. m. rhombeata* endêmica no Brasil (Campbell e Lamar 1989; Uetz, 2016).

A peçonha de *Lachesis m. rhombeata* possui componentes orgânicos, tais como proteínas, peptídeos, aminoácidos, carboidratos e lipídios e componentes inorgânicos como Zn^{+2} , Ca^{+2} , K^{+} , Mg^{+2} , Na^{+} , SO_4^{-2} , Cl^{-} e PO_4^{-3} (Cardoso et al. 2009). Dentre as proteínas enzimáticas encontradas nesta peçonha destacam-se as fosfolipases A_2 (PLA_2), metaloproteases, L-aminoácido oxidases (LAAOs) e serinoproteases (Calvete et al. 2007; Espino-Solis et al. 2009). Vários estudos têm demonstrado o potencial antimicrobiano dessas moléculas presentes em peçonhas ofídicas (Matsui et al. 2000; Samy et al. 2016; Sudharshan et al. 2015), porém peçonhas de serpentes da família *Viperidae* ainda não foram totalmente explorados quanto à atividade antibacteriana (Ferreira et al. 2011).

Portanto, a pesquisa em busca de novos agentes antimicrobianos de diferentes fontes biológicas aumenta as possibilidades de se encontrar agentes terapêuticos para o tratamento destas infecções. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* frente a cepas bacterianas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

A peçonha liofilizada da subespécie *Lachesis muta rhombeata* foi fornecida pelo Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas da Universidade Federal de Pernambuco (LAPT_x – UFPE). Caldo Müeller-Hinton (MHC), Ágar Müeller-Hinton (MHA) e Brain Heart infusion (BHI) foram obtidos da Himedia® (Vadhani, Mumbai, IND) e Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Os isolados clínicos bacterianos utilizados nesse estudo foram fornecidos pelo Hospital das Clínicas de Pernambuco e conservadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco (CAV/UFPE). As cepas padrões foram obtidas do American Type Culture Collection (ATCC).

Bactérias e condições de crescimento

Neste trabalho foram utilizadas bactérias gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, dois isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) ATCC 33591) cultivadas em ágar nutriente e incubadas a 35 ± 2 °C.

Preparação da solução da peçonha

Inicialmente, 10,24 mg da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* foi pesada e diluída em 10 mL de salina a 0,9% para a obtenção de uma solução estoque na concentração de 1024 µg/mL. A amostra foi esterilizada por filtração com filtro de 0,22 µm (Vertical® Chromatography).

Avaliação da atividade antibacteriana

Para a avaliação da atividade antibacteriana da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* foram utilizados os métodos do poço, do disco e da microdiluição de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016).

Método da difusão em poço

As bactérias foram diluídas em salina a 0,9% esterilizada e ajustadas por espectrofotometria no comprimento de onda de 630 nm na concentração de 0,5 da escala de McFarland e em seguida semeadas em placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton.

As placas foram deixadas em repouso por aproximadamente 3 minutos. Posteriormente, foram realizados poços nas placas utilizando furadores de 6 mm previamente esterilizados. Em seguida, 20 µL da peçonha na concentração de 1024 µg/mL foi depositado nos poços. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h e o resultado foi obtido através da leitura dos halos de inibição. Os testes foram realizados em triplicata e em diferentes dias.

Método da difusão em disco (Kirby-Bauer)

Como descrito anteriormente, as bactérias foram ajustadas na concentração de 0,5 da escala de McFarland e em seguida semeadas em placas contendo ágar Müller-Hinton. As placas foram deixadas em repouso por aproximadamente 3 minutos. Posteriormente, foram

aplicados 20 µL da peçonha na concentração de 1024 µg/mL em discos de papel filtro secos e esterilizados medindo 6 mm de diâmetro. Por fim os discos foram distribuídos uniformemente sobre as placas que foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. O resultado foi realizado através da leitura dos halos de inibição. Os testes foram realizados em triplicata e em diferentes dias.

A classificação da atividade antibacteriana através dos métodos do poço e do disco foi realizada de acordo com os halos de inibição segundo Qiao e Sun (2014): Halos de inibição ≤ 10 mm corresponde a molécula inativa; halo de inibição entre 10 e 13 mm representa atividade moderada; halo de inibição entre 14 e 19 mm é ativo e halo ≥ 19 mm é muito ativo.

Método da microdiluição

Inicialmente foi adicionado caldo Müeller-Hinton em cada poço das placas de microdiluição. Em seguida foi adicionado a peçonha de *Lachesis muta rhombeata* na faixa de concentração de 1 a 512 µg/mL através de diluição seriada. Posteriormente as bactérias foram ajustadas no 0,5 da escala de McFarland, diluídas (1:10) e depositadas nos poços para obter uma concentração final de 10^5 UFC/poço. Por fim, as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano por análise colorimétrica utilizando resazurina. A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada depois dos resultados de CIM. Uma alíquota dos poços em que não há crescimento foi inoculada em ágar Müeller-Hinton e as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Após este período, a CBM foi determinada como a menor concentração onde não houve crescimento microbiano.

A classificação da atividade antibacteriana através do método da microdiluição foi realizada de acordo com a CIM segundo Holetz e colaboradores (2002) e Ayres e colaboradores (2008): $CIM > 1000$ µg/mL corresponde a molécula inativa; $500 < CIM \leq 1000$ µg/mL corresponde a fraca atividade; $100 < CIM \leq 500$ µg/mL corresponde a atividade moderada e $CIM \leq 100$ µg/mL corresponde a molécula muito ativa.

RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que nos métodos do poço e disco, a peçonha de *Lachesis muta rhombeata* não apresentou atividade antibacteriana frente às bactérias gram negativas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Escherichia coli* ATCC 25922, porém a peçonha apresentou atividade moderada frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Em relação às bactérias gram positivas, a peçonha de *Lachesis muta rhombeata*

apresentou atividade antibacteriana em ambas metodologias para os isolados clínicos de *S. aureus*, assim como para *S. aureus* ATCC 29213. Esta peçonha não foi ativa frente a MRSA ATCC 33591 (Tabela 1).

Tabela 1 - Avaliação da atividade antibacteriana da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* pelos métodos do disco e do poço.

| | Método | Classificação | Método | Classificação |
|--|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | Poço | | Disco | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | 8 ± 2,3 mm | INT | 5,7 ± 0,3 mm | INT |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 7,3 ± 1,4 mm | INT | 6,2 ± 1,2 mm | INT |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 12,3 ± 2,2 mm | MOD | 11,4 ± 0,5 mm | MOD |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 | 11,7 ± 0,5 mm | MOD | 10,9 ± 0,4 mm | MOD |
| Isolado clínico de <i>Staphylococcus aureus</i> (A) | 19 ± 0,1 mm | MAT | 15,4 ± 1,1 mm | ATV |
| Isolado clínico de <i>Staphylococcus aureus</i> (B) | 16,5 ± 2,5 mm | ATV | 14,3 ± 0,2 mm | ATV |
| <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) ATCC 33591 | 0 mm | INT | 0 mm | INT |

Os valores dos halos representam a média das triplicatas da concentração ± desvio padrão.
INT: inativo; FRA: fracamente ativo; MOD: atividade moderada; ATV: ativo; MAT: muito ativo.

Na microdiluição, a peçonha de *Lachesis muta rhombeata* também apresentou atividade antibacteriana frente a algumas cepas utilizadas neste estudo (Tabela 2). A peçonha mostrou maior atividade frente aos isolados clínicos de *S. aureus* (CIM= 64 µg/mL), atividade moderada frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 (CIM = 256 µg/mL) e *S. aureus* ATCC 29213 (CIM = 128 µg/mL), fracamente ativo frente a *E. coli* ATCC 25922 (CIM = 512 µg/mL) e inativo para *K. pneumoniae* ATCC 700603 e MRSA ATCC 33591 (CIM ≥ 512 µg/mL). Como não foi observado CBM a peçonha de *Lachesis muta rhombeata* só apresenta efeito bacteriostático frente a *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Tabela 2 - Avaliação da atividade antibacteriana da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* pelo método da microdiluição.

| | CIM | Classificação |
|--|-------------|---------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | > 512 µg/mL | INT |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 512 µg/mL | FRA |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 256 µg/mL | MOD |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 | 128 µg/mL | MOD |
| Isolado clínico de <i>Staphylococcus aureus</i> (A) | 64 µg/mL | MAT |
| Isolado clínico de <i>Staphylococcus aureus</i> (B) | 64 µg/mL | MAT |
| <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA) ATCC 33591 | > 512 µg/mL | INT |

CIM: Concentração inibitória mínima; INT: inativo; FRA: fracamente ativo; MOD: atividade moderada; ATV: ativo; MAT: muito ativo.

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir também que os três métodos utilizados neste estudo apresentaram resultados reprodutíveis (Tabela 1 e Tabela 2).

DISCUSSÃO

Produtos naturais e os seus derivados representam mais de 30% dos produtos farmacêuticos atuais disponíveis no mercado e são umas das principais fontes de agentes

terapêuticos inovadores (Pimentel et al. 2015). As peçonhas de serpentes constituem uma fonte rica de compostos proteicos e não proteicos que apresentam diversas atividades farmacológicas. No entanto, a peçonha da subespécie *Lachesis muta rhombeata* ainda não é bem explorado em relação à sua atividade antimicrobiana. Neste trabalho, os testes realizados com a peçonha de *Lachesis muta rhombeata* revelaram sua capacidade em inibir o crescimento de algumas bactérias, em especial frente a *Staphylococcus aureus*.

Peçonhas de serpentes têm sido estudadas quanto as suas propriedades antimicrobianas. Estudos realizados por San et al. (2010) utilizando a peçonha da serpente *Calloselasma rhodostoma* que pertence à família *Viperidae*, demonstraram efeitos inibitórios com CIM de 125 µg/mL quando testados frente a *S. aureus*.

Ferreira et al. (2011) avaliaram a atividade antibacteriana de quatro peçonhas de diferentes serpentes da família *Viperidae*, *Agkistrodon rhodostoma*, *Bothrops atrox*, *Bothrops jararaca* e *Lachesis muta* utilizando a peçonha na concentração de 20000 µg/mL frente a dez cepas de bactérias gram positivas e gram negativas. Os resultados obtidos em seus estudos demonstraram que a peçonha da subespécie *L. m. muta* não apresentou atividade antibacteriana frente às cepas bacterianas testadas. Nos testes de disco difusão utilizando esta peçonha foram obtidos os seguintes resultados: 2 ± 1 mm de halo de inibição frente a *S. aureus*, 1 ± 1 mm frente a *P. aeruginosa* e 0 mm frente a *K. pneumoniae*. Por outro lado, no nosso estudo utilizando a peçonha da subespécie *Lachesis muta rhombeata* na concentração de 1024µg/mL os resultados na metodologia do disco foram diferentes. Isolados clínicos de *S. aureus* apresentaram halos de inibição de $19 \pm 0,1$ mm e $16,5 \pm 2,5$ mm. Assim, nos métodos do poço e disco, os resultados nos revelaram uma atividade antibacteriana significativa quando comparado aos resultados obtidos por Ferreira et al. (2011).

Segundo Chippaux et al.(1991), a composição química e as atividades biológicas das peçonhas ofídicas podem variar entre diferentes famílias, gêneros, espécies e espécimes. As variações que ocorrem entre espécies de um mesmo gênero são chamadas de variações interespecíficas, já as que ocorrem entre indivíduos (espécimes) de uma mesma espécie são designadas variações intraespecíficas. Na variação intraespecífica, as peçonhas podem sofrer alterações devido a vários fatores como variações sazonais, hábitos alimentares, localização geográfica em que o animal habita, variações ontogênicas, interpopulacionais, intrapopulacionais e variação em um mesmo indivíduo (Dos Santos et al. 1995; Schradin 2013).

As duas subespécies *Lachesis muta muta* e *Lachesis muta rhombeata* são encontradas em regiões geográficas distintas. A primeira é distribuída no norte do Brasil, na região

amazônica, e a segunda é amplamente distribuída no nordeste brasileiro. Regiões geográficas distintas, bem como sazonalidade, hábitos alimentares e outros fatores que já foram citados anteriormente contribuem para a variação da composição da peçonha dentro da mesma espécie (Campbell e Lamar 1989; Dos Santos et al. 1995; Uetz 2016).

Outras serpentes da família *Viperidae* também se mostraram promissoras frente a bactérias gram positivas e gram negativas na metodologia da difusão em disco, como é o caso da peçonha da espécie *Daboia russelli siamensis* que foi muito ativo para *S. aureus* ($25,2 \pm 0,84$ mm) e moderadamente ativa frente a *E. coli* ($14,8 \pm 0,83$ mm) (Samy et al. 2008). Neste mesmo estudo foi avaliada a atividade antibacteriana da peçonha de *Daboia russelli russelli* e *Agkistrodon halys*. A peçonha de *Daboia russelli russelli* se mostrou muito ativa para *S. aureus* ($29,4 \pm 0,89$ mm), muito ativa para *Proteus vulgaris* ($26,4 \pm 0,98$ mm) e moderadamente ativa para *P. mirabilis* ($16,8 \pm 0,84$ mm). Já a peçonha de *Agkistrodon halys* foi muito ativa para *S. aureus* ($24,1 \pm 1,23$ mm), e moderadamente ativa para *P. vulgaris* ($15,4 \pm 0,74$ mm) e *P. mirabilis* ($17,2 \pm 0,83$ mm) (Samy et al. 2008).

San e colaboradores (2010) realizaram um estudo avaliando a atividade antimicrobiana de serpentes encontradas na Malásia. A CIM encontrada em nosso estudo utilizando a peçonha de *Lachesis m. rhombeata* para *S. aureus* foi menor quando comparada ao viperídeo *Calloselasma rhodostoma* ($64 \mu\text{g/mL}$ e $125 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). Oguiura e colaboradores (2011) avaliaram a atividade da peçonha de *Crotalus d. cascavella* frente a *S. aureus* e obtiveram CIM $\geq 200 \mu\text{g/mL}$. Estes resultados indicam que a peçonha de *Lachesis m. rhombeata* é um agente antimicrobiano promissor frente a *S. aureus* quando comparado a outras peçonhas da mesma família *Viperidae*, uma vez que a CIM da peçonha de *Lachesis m. rhombeata* foi igual ou inferior aos obtidos nos estudos acima relatados.

Os estudos envolvendo o isolamento de moléculas da peçonha das serpentes que pertencem à família *Viperidae* revelam as principais classes de proteínas com propriedade antimicrobiana. Enzimas como fosfolipases A₂, metaloproteases e LAAOs já foram descritas por possuírem atividade antibacteriana (De Lima et al. 2005; Wei et al. 2006; Xu et al. 2007; Samy et al. 2008; Okubo et al. 2012).

Algumas fosfolipases A₂ possuem efeito lítico sobre os fosfolipídios da membrana plasmática de bactérias gram positivas e gram negativas (*S. aureus* e *E. coli*) (Aloof et al. 1968; De Lima et al. 2005). A eficiência antibacteriana desta classe enzimática depende significativamente das cargas presentes em sua estrutura, o que as classifica em ácidas ou básicas, e do seu potencial enzimático frente aos fosfolipídios da membrana bacteriana, uma vez que estes microrganismos apresentam diversidade estrutural quando se trata de parede

celular e membrana externa (Nevalainen et al. 2008). Estudos antimicrobianos realizados com a enzima PLA₂ R49 isolada da peçonha de *Protobothrops mucrosquamatus* demonstram que esta molécula exibe atividade bacteriostática em *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* (Wei et al. 2006). Outra fosfolipase s-PLA 2-I (BFPA) isolada da peçonha de *Bungarus faciatus* mostrou-se fortemente ativa frente a *S. aureus* e *E. coli* (Xu et al. 2007), demonstrando que fosfolipases podem exibir atividade frente a bactérias de interesse clínico.

Samy e colaboradores (2008) isolaram uma metaloprotease da peçonha de *Agkistrodon halys* que mostrou atividade inibitória frente a *Bacillus pseudomallei*, *P. vulgaris* e *S. aureus* (Samy et al. 2008). Segundo estes autores, um dos possíveis mecanismos de ação desta enzima seria através da alteração do arranjo dos fosfolipídios na membrana bacteriana e da inibição de alvos mecanossensíveis.

Okubo e colaboradores (2012) demonstraram que as LAAOs isoladas da peçonha de *Bothrops mattogrosensis* apresentavam atividade antibacteriana com CIM entre 2 e 8 µg/mL quando testadas frente a bactérias gram negativas como *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa* e CIM entre 8 e 32 µg/mL quando testadas frente a bactérias gram positivas como *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Um possível mecanismo de ação para as LAAOs já havia sido sugerido também por Okubo e colaboradores (2011), em que a interação destas enzimas com a membrana bacteriana induziria aumento na permeabilidade e produção de H₂O₂ que é importante para induzir danos celulares. Ainda em 2012, outro mecanismo foi proposto por Wang e colaboradores, onde a indução de danos celulares causados pela peroxidação lipídica causariam a degradação oxidativa dos lipídios presentes na membrana celular bacteriana e a quebra da cadeia de DNA causaria a redução no desenvolvimento bacteriano.

Com relação aos constituintes da peçonha de *L. muta rhombeata*, um estudo recente de proteômica demonstrou que cerca de 29,5 % desta peçonha corresponde a metaloproteases e 10,8 % a fosfolipases A₂, sendo estas as proteínas majoritárias na peçonha. Por outro lado, o conteúdo de LAAOs presente foi de apenas 0,5 % (Pla et al. 2015). Diante destes dados, uma vez que no nosso estudo utilizamos a peçonha total de *L. muta rhombeata*, é possível sugerir que as metaloproteases e/ou as fosfolipases A₂ desta peçonha tenham papel importante em sua atividade antibacteriana.

A peçonha de *L. m. rhombeata* não foi muito promissora quando testada frente a bactérias gram negativas. Uma possível explicação para este fato seriam as diferenças na composição da parede celular. Em bactérias gram positivas, a parede celular é relativamente espessa, mas porosa e compreende múltiplas camadas de peptidoglicanos intercalados com ácido teicóico e lipoteicóico. Por outro lado, as bactérias gram negativas possuem uma

membrana externa contendo lipolissacarídeos (LPS) situados acima de uma camada delgada de peptidoglicano formando uma barreira para a passagem de moléculas exteriores. (Fuly et al. 2000; Wiegand et al. 2013; Dueñas-Cuellar et al. 2015).

Diante do exposto, podemos concluir que a peçonha da subespécie *Lachesis muta rhombeata* tem potencial antimicrobiano, mostrando-se muito ativa frente a *S. aureus*. Estudos posteriores visando a purificação e identificação das moléculas responsáveis por esta atividade antibacteriana serão realizados.

AGRADECIMENTOS

Ao LAPT_x pelo fornecimento da peçonha e ao Hospital das Clínicas pelo fornecimento das Cepas bacterianas utilizadas neste trabalho.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não existe conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

Aguiar, C. S. (2014). *Avaliação do potencial antimicrobiano do peçonha total de serpentes dos gêneros Bothrops e Crotalus*. Dissertation, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2010.

Almeida, F.D.M., Pimenta, A., Oliveira, M.C. and De Lima, M.E. (2015) Venoms, toxins and derivatives from the Brazilian fauna: Valuable sources for drug discovery. *Acta Physiologica Sinica*. **67**, 261-270.

Aloof-Hirsch, S., De Vries, A. and Berger, A. (1968) The direct lytic factor of cobra venom: purification and chemical characterization. *Biochim Biophys Acta*. **154** 53-60.

Ayres, M.C.C., Brandão, M.S., Vieira-Júnior, G.M., Menor, J.C.A.S., Silva, H.B., Soares, M.J.S. and Chaves, M.H. (2008) Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Rev Bras Farmacog*. **18**, 90-97.

Calvete, J.J., Juárez, P. and Sanz, L. (2007) Snake venomomics. Strategy and applications. *J Mass Spectrom.* **42**, 1405-1414.

Campbell, J.A. and Lamar, W.W. (1989) The venomous reptiles of Latin America. *Herpetile.* **16**, 54-55.

Cardoso, J.L.C. (2009) *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. In *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2^a ed., Sarvier: São Paulo.

Chin, Y.W., Balunas, M.J., Chai, H.B. and Kinghorn, A.D. (2006) Drug discovery from natural sources. *AAPS.* **8**, E239-E253.

Chippaux, J. P., Williams, V. and White, J. (1991) Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon.* **29**, 1279-1303.

Chung, P.Y. (2016) The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*, available at: <http://http://femsle.oxfordjournals.org/content/363/20/fnw219.long> (accessed 30 September 2016).

Clinical and Laboratory Standards Institute (2016) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA.

Costa, H.C. and Bérnils, R.S. (2015) Répteis brasileiros: Lista de espécies 2015. *Herp Bras.* **4**, 75-93.

De Lima, D.C., Alvarez Abreu, P., de Freitas, C.C., Santos, D.O., Borges, R.O., dos Santos, T.C. and Castro, H.C. (2005) Snake venom: any clue for antibiotics and CAM?. *Evid based Complement Alternat Med.* **2**, 39-47.

Dos Santos, M.C. (1995) *Serpentes de interesse médico da amazônia: biologia, peçonhas e tratamento de acidentes*, Universidade do Amazonas, Amazonas, pp. 19-22.

Dueñas-Cuellar, R.A., Kushmerick, C., Naves, L.A., Batista, I.F.C., Guerrero-Vargas, J.A., Pires Jr., O.R., Fontes, W. and Castro, M.S. (2015) Cm38: A new antimicrobial peptide active against *Klebsiella pneumoniae* is homologous to Cn11. *Protein Pept Lett.* **22**, 164-172.

Espino-Solis, G.P., Riaño-Umbarila, L., Becerril, B. and Possani, L.D. (2009) Antidotes against venomous animals: state of the art and perspectives. *J Proteomics.* **72**, 183-199.

Ferreira, B.L., Santos, D.O., Santos, A.L.D., Rodrigues, C.R., de Freitas, C.C., Cabral, L.M. and Castro, H.C. (2011). Comparative analysis of *Viperidae* venoms: Antibacterial profile: a short communication for proteomics. *Evid Based Complement Alternat Med.* **2011**, 1-4.

Ferreira, S.H. (1998) Do fator potenciação da bradicinina (BPF) aos inibidores da ECA. *Rev Bras Hipertens.* **5**, 6-8.

Foreman-Wykert, A.K., Weinrauch, Y., Elsbach, P. and Weiss, J. (1999) Cell-wall determinants of the bactericidal action of group IIA phospholipase A 2 against Gram-positive bacteria. *J Clin Invest.* **103**, 715-721.

Fuly, A.L., Calil-Elias, S., Zingali, R.B., Guimarães, J.A. and Melo, P.A. (2000) Myotoxic activity of an acidic phospholipase A 2 isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. *Toxicon.* **38**, 961-972.

Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A. and Nakamura C.V. (2002) Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem I Oswaldo Cruz.* **97**, 1027-1031.

Koduri, R.S., Grönroos, J.O., Laine, V.J., Le Calvez, C., Lambeau, G., Nevalainen, T.J. and Gelb, M.H. (2002) Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *J Biol Chem.* **277**, 5849-5857.

Koehn, F E. and Carter, G.T. (2005) The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat rev Drug Discov.* **4**, 206-220.

Koh, D.C.I., Armugam, A. and Jeyaseelan, K. (2006) Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci. CMLS* **63**, 3030-3041.

Lima, M.E., Fortes-Dias, C.L., Carlini, C.R. and Guimarães, J. A. (2010) Toxinology in Brazil: A big challenge for a rich biodiversity. *Toxicon* **56**, 1084-1091.

Madrigal, M., Sanz, L., Flores-Díaz, M., Sasa, M., Núñez, V., Alape-Girón, A. and Calvete, J.J. (2012) Snake venomomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. *J proteomics*. **77**, 280-297.

Matsui, T., Fujimura, Y. and Titani, K. (2000) Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta*. **1477**, 146-156.

Melgarejo, A.R. and Cardoso, J.L.C. (2003), *Serpentes peçonhentas do Brasil. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*, 2nd. Savier, São Paulo, BR, pp. 33-61.

Nevalainen, T. J., Graham, G. G. and Scott, K. F. (2008). Antibacterial actions of secreted phospholipases A 2. Review. *Biochim Biophys Acta*, **1781**, 1-9.

Oguiura, N., Boni-Mitake, M., Affonso, R. and Zhang, G. (2011). *In vitro* antibacterial and hemolytic activities of crotamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. *J Antibiot*. **64**, 327-331.

Okubo, B.M., Silva, O.N., Migliolo, L., Gomes, D.G., Porto, W.F., Batista, C.L. and Moreno, S.E. (2012). Evaluation of an antimicrobial L-amino acid oxidase and peptide derivatives from *Bothropoides matogrosensis* pitviper venom. *PloS one*. **7**, 1-10.

Paczosa, M. K. and Meccas, J. (2016) *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. **80**, 629-661.

Pimentel, V.P., Vieira, V.A.M., Mitidieri, T.L., Oliveira, F.F.S. and Pieroni, J.P. (2015) Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança?. *Rev BNDES*, **43**, 41-89.

Pla, D., Sanz, L., Molina-Sánchez, P., Zorita, V., Madrigal, M., Flores-Díaz, M., and Calvete, J.J. (2013). Snake venomomics of *Lachesis muta rhombeata* and genus-wide antivenomics assessment of the paraspecific immunoreactivity of two antivenoms evidence the high compositional and immunological conservation across *Lachesis*. *J Proteomics*, **89**, 112-123.

Queiroz, S.J.D. (2010) Identificação da atividade antimicrobiana no peçonha da serpente *Bothrops moojeni* em bactérias gram negativas. Dissertation, Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC), Goiânia, GO, 2010.

Samy, R.P., Gopalakrishnakone, P., Chow, V.T. and Ho, B. (2008) Viper metalloproteinase (*Agkistrodon halys pallas*) with antimicrobial activity against multi-drug resistant human pathogens. *J Cell Physiol.* **216**, 54-68.

Samy, R.P., Sethi, G. and Lim, L.H. (2016) A brief update on potential molecular mechanisms underlying antimicrobial and wound-healing potency of snake venom molecules. *Biochem Pharmacol.* **115**, 1-9.

San, T.M., Vejayan, J., Shanmugan, K. and Ibrahim, H. (2010) Screening antimicrobial activity of venoms from snakes commonly found in malaysia. *J Appl Scien.* **10**, 2328-2332.

Schradin, C. (2013) Intraspecific variation in social organization by genetic variation, developmental plasticity, social flexibility or entirely extrinsic factors. *Phil Trans R Soc B.* **368**, 1-10.

Sudharshan, S. and Dhananjaya, B.L. (2015) Antibacterial potential of a basic phospholipase A 2 (VRV-PL-VIIIa) from *Daboia russelii pulchella* (Russell's viper) venom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* **21**, 1-8.

Talan, D.A., Citron, D.M., Overturf, G.D., Singer, B., Froman, P. and Goldstein, E.J. (1991) Antibacterial activity of crotalid venoms against oral snake flora and other clinical bacteria. *J Infect Dis.* **164**, 195-198.

Uetz, P. (2016) The Reptile Database Turns 20. *Herpetol Rev.* **47**, 330-334.

Wang, F., Li, R., Xie, M. and Li, A. (2011). The serum of rabbitfish (*Siganus oramin*) has antimicrobial activity to some pathogenic organisms and a novel serum L-amino acid oxidase is isolated. *Fish Shellfish Immunol.* **30**, 1095-1108.

Wei, J. F., Li, T., Wei, X. L., Sun, Q. Y., Yang, F. M., Chen, Q. Y. and He, S. H. (2006). Purification, characterization and cytokine release function of a novel Arg-49 phospholipase A 2 from the venom of *Protobothrops mucrosquamatus*. *Biochimie.* **88**, 1331-1342.

WHO – World Health Organization (2014) – The Top 10 causes of death. Available at: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/ (Accessed 04 december 2016)

Wiegand, C., Bauer, M., Hipler, U.C. and Fischer, D. (2013) Poly (ethyleneimines) in dermal applications: Biocompatibility and antimicrobial effects. *Int J Pharm.* **456**, 165-174.

Wong, E.S. and Belov, K. (2012) Venom evolution through gene duplications. *Gene.* **496**, 1-7.

Xu, C., Ma, D., Yu, H., Li, Z., Liang, J., Lin, G. and Lai, R. (2007). A bactericidal homodimeric phospholipases A 2 from *Bungarus fasciatus* venom. *Peptides.* **28**, 969-973.

6 CONCLUSÃO

Os produtos naturais desempenham um papel importante no desenvolvimento de novos fármacos e são uma das principais fontes de agentes terapêuticos para doenças infecciosas. Portanto, a busca de novos agentes antimicrobianos utilizando peçonhas de serpentes é promissora. Os resultados deste trabalho sugerem que a peçonha de *Lachesis muta rhombeata* é uma alternativa promissora como agente antibacteriano, apresentando atividade moderada frente a gram negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* e alta atividade frente a *S. aureus*. A caracterização de biomoléculas presentes na peçonha de *L. muta rhombeata* possui um potencial biotecnológico para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para infecções bacterianas.

7 ANEXO

7.1 NORMAS DO JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY

MANUSCRIPT PREPARATION AND PRESENTATION

Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in the Journal is at a premium, the Editors always reserve the right to require authors to reduce the length of their your submission to the Journal.

The main text of the manuscript should be prepared as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. Text must be double-spaced, and the pages of the manuscript must be numbered manuscripts. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard.

It is strongly recommended that you use the author submission checklist to help you to prepare consecutively.

The title page should show the title of the manuscript; the names of authors and place(s) where the work was done; an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; and the complete contact details for the corresponding author.

Original Articles should contain the following sections in this order:

- **ABSTRACT:** A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following four headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added;
- **INTRODUCTION:** A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;
- **MATERIALS AND METHODS:** Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control (JAM 2004 96(2):221; available here).
- **RESULTS:** Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper.

Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the principal findings of the study. In general, journal papers will contain between one and seven figures and tables;

- **DISCUSSION:** This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section;
- **ACKNOWLEDGEMENTS:** Contributors who do not qualify as authors should be acknowledged and their particular contribution described. All sources of funding for the work reported, for all the authors, must be acknowledged. Both the research funder and the grant number (if applicable) should be given for each source of funds;
- **CONFLICT OF INTEREST:** If no conflict of interest exists, then 'no conflict of interest declared' should appear within this section. Otherwise, authors should list all pertinent commercial and other relationships that may be perceived as a potential source of conflict of interest.
- **REFERENCES;**
- **SUPPORTING INFORMATION (if applicable):** Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text. The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript by a section headed 'Supporting Information', under which should be appropriate legends for the material. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit:<http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppinfo.asp>

Review Article manuscripts must normally not exceed 32 pages (A4) including references, figures and tables. As references can make a heavy demand on the pages available to you, it is suggested that you select key references only. The headings in Review Articles are of the author's choice, but the manuscript should begin with a short SUMMARY of 150-200 words.

Please check and confirm that your article is optimized for search engines. Keywords should appear in the title, abstract and throughout your article in order to increase your article's online visibility. For more information, please see Writing for SEO.

References

The Harvard system should be used. Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones *et al.* (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones *et al.* 1956). Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. Web sites should be quoted in the text with an access date. Abbreviate journal titles according to Index Medicus (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html). Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

The following is an example of order and style to be used in the manuscript:

Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In Protozoan Parasites in Water ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91-96. London: The Royal Society of Chemistry.

Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office.

Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127-135.

Tables

Tables must be prepared in the same format as the manuscript text, and should ideally appear at the end of the main manuscript file. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): *, †, ‡, §, ¶, **, †† etc. For an example of table style.

Figures

Figures should be uploaded to the online submission site as separate files. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend. For an example of figure style.

Photographs must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers).

- Save line art such as charts, graphs and illustrations in EPS or PDF format. Most programs have a 'Save as...' or 'Export...' feature to allow you to do this
- Save photographic images in TIFF format. These should be at a resolution of at least 300 dpi at final size
- Save figures containing a combination of photographic images and text (eg annotated photographic images with text labels) as EPS or PDF. Any photographic images embedded within these should be at least 300 dpi
- Perform a visual check of the quality of the generated image. You should be able to zoom in to about 300% without the image becoming noticeably blurred or pixelated. If the image does appear pixelated at this zoom, then try going back to the original image and checking that it complies with the recommended format and settings
- Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at:http://media.wiley.com/assets/7323/92/electronic_artwork_guidelines.pdf

Colour figures

Online-only colour in figures is free of charge, however it is essential in these cases that the figure legends apply equally well to both printed greyscale and online colour versions, and do not specifically refer to the colour. Alternatively you can opt to pay for colour in the print and online versions. If your paper is accepted and you have opted for printed colour, we will need a completed Colour Work Agreement Form. This form can be downloaded as a PDF from here and should be sent to the provided address on acceptance.

English usage, abbreviations and units

Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulfur, sulfate, etc. When using numbers in the text, one to nine should be written in full and 10 and above should be written as numerals. The Journal uses SI units: g l⁻¹ not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l⁻¹ (not M or N); probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (*g*). Please refer to the Biochemical Journal 'Instructions to Authors' www.biochemj.org/bj/bji2a.htm.

Please click [here](#) for some examples of common abbreviations used in the Journal.

Microbial nomenclature

The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Pediococcus*, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*); groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group A). Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae).

Please click [here](#) for a list of abbreviations currently in use for common generic names and for notes on referring to plant pathogenic bacteria.

Gnotobiotic animals

The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. *Germ-free* implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. *Conventional animals* have a full complement of associated microbes. *Open conventional animals* are housed in a standard animal house. *Isolator conventional animals* are maintained in isolators and associated with full flora. *Ex-germ-free* animals are those with an associated flora which have become conventional.

Statistics

Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. Statistical tests used in the study should be clearly indicated in the Materials and Methods section. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated.

Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

Footnotes

Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

Experimental hazards

Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

English-language editing service

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found here. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

AFTER ACCEPTANCE

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF file from this site and corrections made following the instructions sent with the proofs. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, may be charged separately.

Early View

Journal of Applied Microbiology is covered by Wiley Online Library's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid

and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the Journal.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Managing Editor or Production Editor.

Disclaimer

Whilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement.