



MESTRADO EM CIÊNCIAS  
AMBIENTAIS E SAÚDE

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*  
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

**IDENTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA NO VENENO  
DA SERPENTE *Bothrops moojeni* EM BACTÉRIAS GRAM  
NEGATIVAS**

**SILVIO JOSÉ DE QUEIROZ**

GOIÂNIA  
2010



MESTRADO EM CIÊNCIAS  
AMBIENTAIS E SAÚDE

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU***  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

**IDENTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA NO VENENO  
DA SERPENTE *Bothrops moojeni* EM BACTÉRIAS GRAM  
NEGATIVAS**

**SILVIO JOSÉ DE QUEIROZ**

Orientador: Prof. Dr. José Rodrigues do Carmo Filho

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

GOIÂNIA  
2010

## DEDICATÓRIA

Quero neste primeiro momento dedicar este trabalho a Deus pela força e objetivo alcançado. Fonte de inspiração e refúgio nos momentos mais difíceis desta trajetória.

À minha querida e amável mãe. O amor e o carinho dispensados a minha pessoa sempre fez com que eu pudesse romper os obstáculos da vida. Obrigado pelo companheirismo, pelo carinho e pelas palavras nos momentos difíceis. Sempre tive e sempre terei o orgulho de ser seu filho. Obrigado por tudo. Obrigado por existir e fazer parte da maneira tão intensa na minha vida. A senhora, a melhor mãe do mundo, dedico este trabalho.

Aos meus irmãos Elizabett, Sandra e José Henrique. Pessoas especiais na minha vida.

Aos meus queridos avós João Batista e Rosalina Moura (*in memoria*), que mesmo ausentes tenho a absoluta convicção que estão transmitindo vibrações positivas.

A Profa. Madalena Del Duque do Departamento de Enfermagem, Fisioterapia e Nutrição da PUC-Go pelo companheirismo, auxílio e a atenção dispensada, principalmente na fase final do trabalho.

Aos membros do Centro Acadêmico de Enfermagem Silvio José de Queiroz – PUC-Go. Em especial aos Diretores Bruno, Fabiane, Luiz Eduardo, Maycon, Raquel e Wesley.

Enfim, dedico este à aquelas pessoas que acreditaram em mim, mesmo nos momentos em que eu achava ser impossível continuar. Muito obrigado a todos vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. José Rodrigues do Carmo Filho, ilustre orientador, pela oportunidade de desenvolver a pesquisa em uma área até então de pouco domínio. Obrigado pela paciência, pelo apoio e por encorajar-me naqueles momentos quando, eu, achava não ter mais possibilidades de prosseguir.

A Prof<sup>ª</sup>. Dra. Marta Regina, Bióloga do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, pela paciência em ensinar algumas técnicas de laboratório e principalmente pelo respeito e companheirismo dispensado a minha pessoa.

A Prof<sup>ª</sup>. Daniela Braz dos Santos, que acompanhou toda a pesquisa. Ensinando com muita paciência desde uma simples pipetagem a técnicas mais complexas. Obrigado por tudo. Você foi peça fundamental durante todas as etapas do trabalho.

A Prof<sup>ª</sup>. Sayonara Ay More de Oliveira, Mestranda do serviço de Pós graduação da Faculdade de Farmácia da UFGO, pelo auxílio na realização da análise estatística.

A Edilaine Montalvão, biomédica do Laboratório de Microbiologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Pelo apoio a pesquisa. Por disponibilizar espaço físico e materiais sempre que necessitei. Muito obrigado.

A todos os colegas do Serviço de Atendimento em Saúde, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, pelo apoio e confiança. Em especial ao Eng. Fernando de Brito Jardim, pela compreensão.

Aos amigos do SAMU 192 de Goiânia, Sistema Integrado de Atendimento ao Trauma e Emergência – SIATE e Corpo de Bombeiros Militar do Estado de Goiás.

Aos colegas professores e funcionários do Departamento de Enfermagem, Fisioterapia e Nutrição, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Em especial

as professoras Rosângela Montefusco, Maria Aparecida Silva e Vanessa Villa. Vocês são pessoas importantes na minha vida. Tenho e terei sempre um carinho especial por vocês.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Paula Regina de Souza e Eivalda Pereira, pelo companheirismo.

A todos os estagiários do Centro de Ensino e Pesquisas Biológicas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pelo apoio a pesquisa, em especial Hugo Marques Cabral e Lilibete Pereira de Oliveira do laboratório de Toxinologia.

Aos meus queridos alunos da PUC Goiás pela paciência, compreensão e respeito.

Aos grandes amigos Jefferson, Joana Angélica, Renato Bueno e Rossini. Mesmo não dispondo de tempo vocês não me privaram da suas amizades.

Grandes amigos e colegas de profissão Prof. Álamo e Enfermeiro Vinícius. Vocês são pessoas que sempre me deram apoio. Sempre se colocaram a disposição para auxiliar no necessário.

Aos grandes amigos Cláudio Medrado e Ana Paula Perillo médicos do Serviço de Atendimento em Saúde da PUC-Go.

A amiga Prof<sup>a</sup>. Ms. Vanusa Claudente Usier, pelo companheirismo durante essa jornada.

A Profa. Dra. Ana Cristina Gales da Universidade Federal de São Paulo, por haver cedido as amostras de ATCC e amostras clínicas usadas neste experimento.

Enfim, agradeço todos aqueles que de uma forma ou de outra torceram para que eu pudesse alcançar mais um objetivo na minha vida. A todos o meu carinhoso muito obrigado.

*“A grandeza  
não consiste em receber honras,  
mas em mantê-las”*

*Aristóteles*

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** As infecções causadas por microrganismos multirresistentes estão associadas com bactérias adquiridas no meio ambiente hospitalar. A pressão seletiva dos antimicrobianos é um importante fator de seleção e disseminação dos genes de resistência no meio ambiente. O uso de moléculas produzidas por diferentes seres vivos tem demonstrado atividade contra microrganismos.

**OBJETIVOS:** Avaliar a atividade do veneno bruto da *Bothrops moojeni* sobre bactérias gram-negativas produtoras e não produtoras de metalo- $\beta$ -lactamase e de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado, identificar o(s) componente(s) do veneno com atividade contra bactérias gram-negativas produtoras e não produtoras de metalo- $\beta$ -lactamase e  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado e identificar a atividade antibacteriana do veneno bruto da serpente *B. moojeni* em bactérias gram negativas fermentadoras e não fermentadoras de glicose produtoras de diferentes enzimas degradadoras de  $\beta$ -lactâmicos.

**METODOLOGIA:** O veneno utilizado foi extraído das serpentes *B. moojeni*, mantidas no serpentário do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas (CEPB) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Os microrganismos utilizados neste estudo foram obtidos da “*American Type Culture Collection*” e do Banco de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia Clínica e do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, sendo *Acinetobacter baumannii* ( $bla_{IMP2}$ ), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Pseudomonas aeruginosa*  $bla_{IMP1}$ ,  $bla_{VIM1}$ ,  $bla_{VIM2}$ ,  $bla_{SPM1}$  e produtora de carbapenemase banco n° 278) *Escherichia coli* (ATCC 25922 e ATCC 35218), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). O ensaio foi realizado com o veneno bruto aplicado sobre disco de difusão em diferentes diluições. A partir das amostras obtidas, foi realizada a dosagem de proteínas utilizando o método descrito por Bradford.

**RESULTADOS:** O teste microbiológico mostrou que o veneno bruto possui atividade antimicrobiana, tanto para bactérias produtoras como para as não produtoras de metalo- $\beta$ -lactamase e  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado e que esta atividade se deve possivelmente pela ação da L-aminoácido oxidase.

**CONCLUSÕES:** Diferentes concentrações diluições do veneno bruto da serpente *B. moojeni* inibiram o crescimento de bactérias gram-negativas produtoras e não produtoras de metalo- $\beta$ -lactamases e  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado e que o tamanho do alo de inibição do crescimento bacteriano diminuiu na medida em que diminui a concentração do veneno bruto e conseqüentemente à quantidade de proteínas, demonstrando que o veneno bruto foi dose dependente.

**PALAVRAS-CHAVE:** Resistência bacteriana, *Bothrops moojeni*, serpentes, cromatografia, L-aminoácido oxidase.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Infections caused by multiresistant microorganisms are associated with bacteria acquired in the hospital environment. The selective pressure of antimicrobials is an important factor in the selection and spread of resistance genes in the environment. The use of different molecules produced by living organisms has demonstrated activity against microorganisms. **OBJECTIVES:** To assess the activity of the crude venom of *Bothrops moojeni* on gram-negative bacteria producing and non producing metallo- $\beta$ -lactamase and  $\beta$ -lactamases with wide spectrum, to identify component (s) of the poison with activity against gram-negative bacteria producing and non producing metallo-  $\beta$ -lactamase and  $\beta$ -lactamases with wide spectrum and to identify the antibacterial activity of crude venom of the snake *B. moojeni* in gram negative non-fermentative and fermentative glucose producing different enzymes to degrade  $\beta$ -lactams. **METHODOLOGY:** The poison used was extracted from snake *B. moojeni* kept on the collection of the Center for Biological Studies and Research (CEPB) Catholic University of Goias Micro-organisms used in this study were obtained from the American Type Culture Collection and Bank of Microorganisms, Laboratory of Clinical Microbiology and MSc in Environmental and Health Sciences at the Catholic University of Goias, including *Acinetobacter baumannii* (blaIMP2), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Pseudomonas aeruginosa* blaIMP1, blaVIM1, blaVIM2, blaSPM1 and producing carbapenemase No. 278 bank) *Escherichia coli* (ATCC 25922 and ATCC 35 218), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). The test was conducted with the crude venom applied on disk diffusion in different dilutions. Protein concentration was determined for each venom sample, buy using the Bradford. **RESULTS:** The microbiological test showed that the venom demonstrated antimicrobial activity, both for producing bacteria and non-producing  $\beta$ -lactamase and  $\beta$ -lactamases bactérias with wide spectrum and that this activity is probably due to the action of L-amino acid oxidase. **CONCLUSIONS:** Different concentrations of crude venom of the snake *B. moojeni* inhibited growth of gram-negative bactéria producing ond non producing metallo-beta-lactamase and extende spectrum beta-lactamese ond the size of the allo of growth inhibited diminished when decreased concentration of the crud venom and consequentley the decrease of concentration of protein, demonstrating that the effect of crude venom was dose dependent.

**KEY WORDS:** Bacterial resistance, *Bothrops moojeni*, snakes, chromatography, L-amino acid oxidase.

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS .....	iv
EPIGRÁFE .....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1. <i>Bothrops moojeni</i> .....	17
1.2. VENENO BOTRÓPICO.....	20
1.3. VENENOS E ANTIMICROBIANOS .....	25
2. AGENTE ETIOLÓGICO .....	36
2.1. <i>Pseudomonas</i> spp.....	36
2.2. <i>Acinetobacter</i> spp.....	36
2.3. <i>Escherichia coli</i> .....	36
2.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	37
2.1.1. Epidemiologia das infecções causadas por microrganismos não fermentadores e fermentadores da glicose .....	38
3. Mecanismos de resistência bacteriana .....	44
3.1. Degradação de $\beta$ -lactâmicos: principal mecanismo de resistência identificado em bactérias Gram-negativas .....	44
3.2. Metalo- $\beta$ -lactamase (M $\beta$ L).....	48

3.2.1. IMP .....	49
3.2.2. VIM .....	50
3.2.3. SPM.....	50
4. OBJETIVOS .....	52
4.1. Objetivo Geral .....	52
4.2. Objetivos Específicos .....	52
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	53
5.1. Extração dos venenos .....	53
5.2. Microrganismos .....	53
5.3. Ensaio antibacteriano com veneno bruto – disco de difusão.....	54
5.4. Determinação de proteínas .....	55
5.5. Análise Estatística.....	55
6. RESULTADOS .....	56
7. DISCUSSÃO .....	62
8. CONCLUSÃO.....	67
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1.** Atividade antibacteriana do veneno bruto de *B. moojeni*, em diferentes concentrações, contra microrganismos fermentadores de glicose.....60

**TABELA 2.** Atividade antibacteriana do veneno bruto de *B. moojeni*, em diferentes concentrações, contra microrganismos não fermentadores de glicose.....61

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Exemplar da espécie <i>B. moojeni</i> .....	17
<b>FIGURA 2.</b> Distribuição geográfica da espécie <i>B. moojeni</i> .....	18
<b>FIGURA 3.</b> Transferência de material genético entre bactérias.....	45
<b>FIGURA 4.</b> Mecanismos de resistência aos antimicrobianos.....	46
<b>FIGURA 5.</b> Estrutura terciária da $\beta$ -lactamase tipo TEM classe A.....	47
<b>FIGURA 6.</b> Ação da serina de uma $\beta$ -lactamase.....	47
<b>FIGURA 7.</b> Estrutura cristalográfica de uma metalo beta-lactamase do <i>Bacillus cereus</i> .....	48
<b>FIGURA 8.</b> Efeitos antimicrobianos de diferentes concentrações do veneno da Serpente <i>B. moojeni</i> para bactérias não fermentadoras de glicose.....	58
<b>FIGURA 9.</b> Efeitos antimicrobianos de diferentes concentrações do veneno da serpente <i>B. moojeni</i> para bactérias fermentadora de glicose.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CEPB** – *Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas*
- DNA** – *Ácido Desoxirribonúcleico*
- ESBL** – *Beta-lactamase de Espectro Ampliado*
- FAD** - *Flavina adenina dinucleotídeo*
- IgA** – *Imunoglobulina A*
- kDa** – *Kilodaltons*
- KGD** – *Lisina-glicina-ácido Aspártico*
- LAAO** – *L-aminoácido oxidase*
- MBL** – *Metalo- $\beta$ -lactamase*
- MM** – *Marcador Molecular*
- Mr** – *Massa relativa*
- NCCLS** – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
- NFG** – *Fator de Crescimento Neural*
- NNISS** – *National Nosocomial Infections Surveillance System*
- nm** – *Nanômetro*
- PPBs** - *Peptídeos potenciadores de bradicinina*
- RGD** – *Desintegrina Recombinante*
- SENTRY** – *Worldwide Antimicrobial Surveillance Program - do inglês*
- SPM-1** – *metalo- $\beta$ -lactamase São Paulo*
- UFC** – *Unidade Formadora de Colônia*
- UTI** – *Unidade de Terapia Intensiva*
- VB** – *Veneno Bruto*
- VIM-1** – *Verona imipenemase 1*
- VIM-2** – *Verona imipenemase 2*

# 1. INTRODUÇÃO

O século XXI revela um novo cenário no cuidado à saúde em consequência do intenso avanço científico e tecnológico, do reconhecimento cada vez maior de novos agentes infecciosos e do ressurgimento de infecções que, até pouco tempo, estavam presumivelmente controladas. Parte de tudo isto se deve à facilidade de comunicação entre as diferentes regiões do planeta, os meios de transporte mais rápidos e ao uso maciço de substâncias antimicrobianas com as mais diversas finalidades, o que fez com que a resistência microbiana deixasse de ser restrita ao meio ambiente hospitalar.

As infecções causadas por microrganismos multirresistentes estão associadas com microrganismos adquiridos no meio ambiente hospitalar e com isso gerando impacto socioeconômico negativo, devido ao prolongamento do período de hospitalização, ao aumento da morbi-mortalidade e aos altos custos decorrentes da necessidade de maior número de exames complementares, o uso de medicamentos coadjuvantes e a necessidade de medicamentos mais potentes e mais caros. Tal situação pode ser agravada pelo fato dos microrganismos multirresistentes apresentarem mais de um mecanismo de resistência.

Por outro lado, com a crescente prevalência de bactérias multirresistentes, sobretudo em Unidades de Terapia Intensiva, e a emergência de resistência em microrganismos causadores de infecções comunitárias, bem como o aparecimento de novos mecanismos de resistência em espécies que até então não os expressava, demandam o desenvolvimento de novos e mais potentes agentes antimicrobianos.

A emergência de resistência antimicrobiana bem como das doenças infecciosas, é uma consequência frequentemente associada às mudanças sociais, tecnológicas, uso abusivo e desnecessário de antimicrobianos, uso de desinfetantes na rotina doméstica, uso de grande quantidade de antimicrobianos para promover crescimento animal, uso de doses sub-terapêuticas de agentes antimicrobianos e às próprias condições ambientais.

Outros fatores contribuem para a emergência e disseminação da resistência, como alteração da resposta imune do hospedeiro como resultado da própria doença, hemorragias, traumas e extremos de idade, tornando os pacientes mais vulneráveis aos processos infecciosos, sobretudo os causados por fungos. A habilidade microbiana para selecionar e transmitir genes de resistência e bem como as condições ambientais promovem a persistência dos determinantes de resistência.

### 1.1. *Bothrops moojeni*

O gênero *Bothrops* Wagler, 1824 inclui oito espécies descritas no território brasileiro, as quais estão classificadas dentro da Ordem Squamata, Subordem Serpentes, Família Viperidae e Subfamília Crotalinae (Bérnils, 2010).

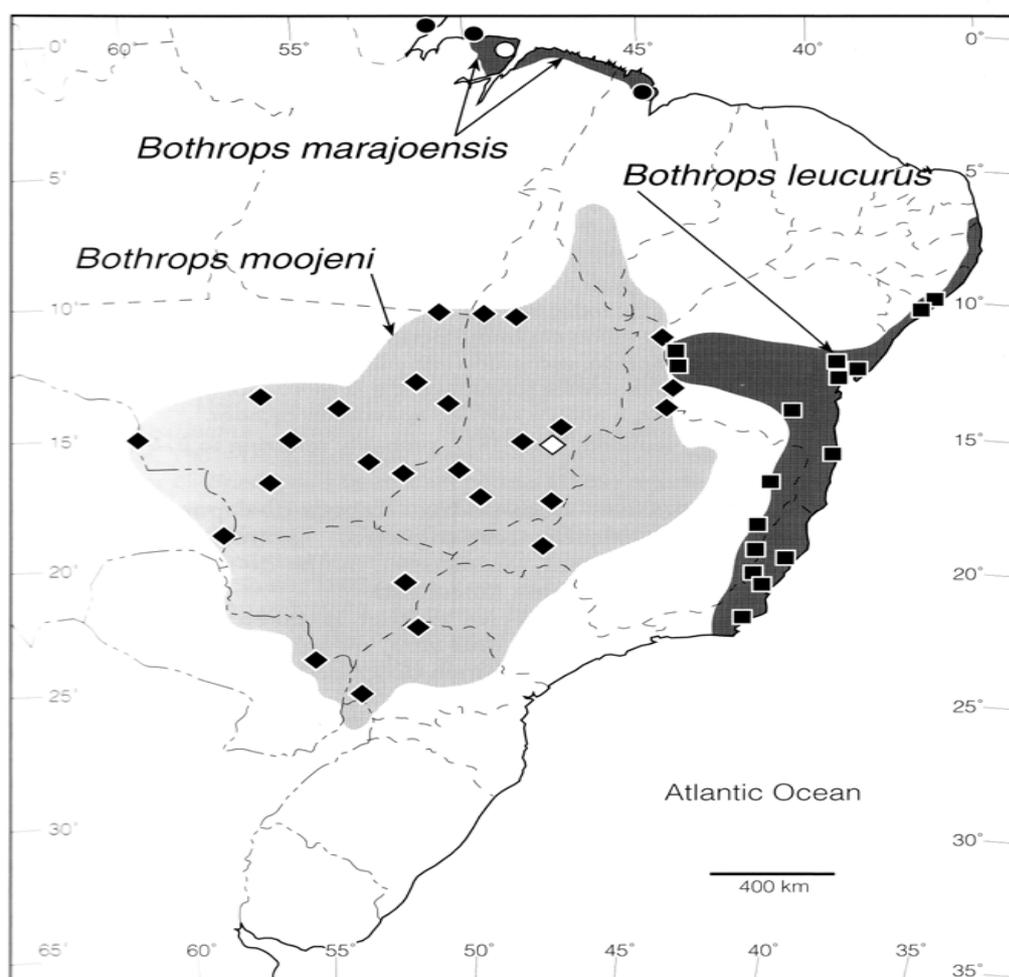
A serpente *Bothrops moojeni* (Figura 1) é conhecida popularmente como jararacão, caissaca, jararacão do cerrado, podendo atingir até 2,5 m de comprimento. É uma espécie terrestre, utilizando-se, comumente, de tocas no solo e cupinzeiros para se abrigar. Normalmente, fica inativa durante o dia, iniciando sua atividade no fim do dia ou no início da noite e possui hábitos generalistas, alimentando-se principalmente de pequenos mamíferos, anfíbios, lagartos, serpentes e aves. Seus predadores naturais incluem gaviões, garças, ema, seriema, gambás e furão. O colorido de sua pele proporciona o recurso de uma perfeita camuflagem no ambiente (Nogueira *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Exemplar da espécie *B. moojeni* (Foto: João Latuf, 2009).

É uma serpente com comportamento extremamente agressivo, e, quando se sente ameaçada, enrodilha-se escondendo a cabeça sob o corpo para protegê-la. A imobilidade é também utilizada como estratégia para se defender de predadores visualmente orientados. Quando o confronto com o predador é inevitável, o bote é utilizado (Marques & Sazima, 2003).

A distribuição geográfica desta espécie está descrita principalmente para os cerrados do Brasil Central, abrangendo os estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão (Campbell & Lamar, 2004) (Figura 2).



**Figura 2.** Distribuição geográfica da espécie *Bothrops moojeni* (Campbell & Lamar, 2004).

A serpente *B. moojeni* demonstra preferência por áreas úmidas, ocorrendo em densidades altas, matas ciliares, campos úmidos e veredas, usando áreas antrópicas vizinhas, o que demonstra grande versatilidade em se adaptar a áreas urbanizadas (Nogueira *et al.*, 2003).

O gênero *Bothrops* é o mais importante do ponto de vista médico, uma vez que é responsável por cerca de 80% dos acidentes ofídicos notificados anualmente no Brasil. O quadro clínico típico do acidente botrópico caracteriza-se por dor e edema no local da picada, de intensidade variável; sangramentos no ponto da picada são freqüentes, infartamento ganglionar e bolhas podem aparecer durante a evolução do quadro, acompanhados ou não de necrose (Bochner & Struchiner, 2003; Bucarechi *et al.*, 2007).

Apesar do grande número de acidentes notificados, o gênero *Bothrops* possui importante papel nas cadeias tróficas de diversos ambientes naturais e perturbados. Desta forma, sua conservação é vital não só para a manutenção das serpentes em si, mas também para o equilíbrio dos ecossistemas brasileiros (Martins *et al.*, 2001; Marques & Sazima, 2003).

Por serem predadores secundários, indivíduos da espécie *B. moojeni* possuem papel de grande importância nas cadeias tróficas de diversos ambientes naturais e perturbados (Martins *et al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2003; Marques & Sazima, 2003).

## 1.2. Veneno Botrópico

A complexa diversidade de funções biológicas, bioquímicas e farmacológicas dos venenos ofídicos é consequência da presença de uma mistura heterogênea de substâncias cuja principal função está relacionada à captura de alimento. O veneno é utilizado para paralisar e matar a presa, uma vez que interfere rápida e seletivamente em mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares muito específicos, atuando direta ou indiretamente, sozinhos ou em associação, perturbando o funcionamento dos nervos, músculos ou do sistema cardiovascular da presa (Daltry *et al.*, 1996; Ménez, 1996; Markland, 1997; Silva Jr. & Aird, 2001).

Noventa por cento do peso seco do veneno é composto por moléculas de caráter protéico, com ou sem atividade catalítica, como as fosfolipases A<sub>2</sub>, proteases, L-aminoácido oxidase, hialuronidases, acetilcolinesterases, fatores de crescimento, ativadores de proteína C, lectinas, peptídeos representados principalmente por potencializadores de bradicinina e desintegrinas, compostos orgânicos de baixa massa molecular como carboidratos, serotonina, histamina, citrato e nucleosídeos, íons inorgânicos como o cálcio, cobalto, magnésio, cobre, ferro, potássio, e os inibidores enzimáticos (Stocker, 1990). Todos estes componentes sofrem grande variabilidade dentro das famílias, gêneros e espécies, tanto inter como intraespecífica, as quais são decorrentes da idade, sexo, sazonalidade, variação geográfica das espécies (Chippaux *et al.*, 1991; Daltry *et al.*, 1996).

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* apresentam grande atividade proteolítica, característica responsável pelos principais efeitos locais e

sistêmicos observados no envenenamento (Gutierrez *et al.*, 2009). Os efeitos sistêmicos envolvem alterações da coagulação sanguínea e do sistema cardiovascular, enquanto que as reações locais são caracterizadas por hemorragia, mionecrose e inflamação intensa, com edema proeminente e dor (Fernandes *et al.*, 2006; Ramos & Selistre-de-Araujo, 2006; Giron *et al.*, 2008).

A reação inflamatória aguda ou a ação proteolítica local é o fenômeno resultante das ações de um conjunto de frações, heterogêneas do veneno, com especificidades diversas, tais como aminas biogênicas, pequenos peptídeos ou proteínas como fosfolipase A<sub>2</sub>, esterases, proteases, enzimas liberadoras de cininas (calicreínas, cininogenases) e lectinas. Estes componentes, frequentemente, têm atividade indireta, induzindo ou liberando potentes alcalóides, como a bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, protaciclina, que atuam de maneira complexa e interrelacionada (Marunak *et al.*, 1999; Carneiro *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2009).

As alterações na coagulação sanguínea provocadas pelo veneno botrópico estão relacionadas com desfibrinação, coagulação intravascular disseminada e trombocitopenia, resultantes da ação de proteínas que afetam diversos componentes do sistema hemostático, enzimas do tipo coagulante e pró-coagulante, tais como serinoproteinases “tipo trombina” e metaloproteinases que ativam os fatores X e II da cascata de coagulação. Quando há ativação do fator X, há também consumo dos fatores V, VII e plaquetas, levando à produção de coagulação intravascular disseminada, com formação e deposição de microtrombos na rede capilar (Kamiguti *et al.*, 1986; Serrano *et al.*, 1995; Rucavado *et al.*, 2001; Braga *et al.*, 2007; Lopez-Johnston *et al.*, 2007; Giron *et al.*, 2008).

A hemorragia é atribuída fundamentalmente aos componentes específicos denominados hemorraginas, as quais fazem parte da família das metaloproteinases, as quais são enzimas dependentes de íons metálicos, especialmente o zinco, para exercer sua função biológica. Estas enzimas degradam colágeno e outros componentes da lâmina basal dos vasos capilares, levando a um rompimento dos mesmos, promovendo equimoses e sangramentos (Kamiguti, 2005; Ramos & Selistre-de-Araujo, 2006).

Outros componentes que estão presentes no veneno botrópico que devem ser destacados por influenciarem direta ou indiretamente no efeito fisiopatológico do envenenamento são as fosfolipases do tipo A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Estas enzimas são abundantes na natureza e, além de fluidos e tecidos de mamíferos, estão presentes em vários outros tipos de venenos animais, especialmente abelhas e vespas (Harris, 1991). As PLA<sub>2</sub> pancreáticas de mamíferos, de caráter não tóxico e as PLA<sub>2</sub> de venenos, altamente ativas e tóxicas, possuem propriedades catalíticas comuns e considerável grau de homologia quanto às estruturas primária, secundária e terciária (Dufton *et al.*, 1983).

As fosfolipases A<sub>2</sub> presentes nos venenos ofídicos, além de sua participação na digestão de presas apresentam um grande espectro de atividades que incluem ação hemolítica indireta, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, agregadora de plaquetas, anticoagulante, edematogênica, miotóxica, bactericida e pró-inflamatória. Nos venenos botrópicos, estas enzimas estão relacionadas à mionecrose local que pode provocar sequelas drásticas, como perda tecidual permanente, incapacidade ou amputação do membro afetado (Andrião-Escarso *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2005; Abreu *et al.*, 2007; Calgarotto *et al.*, 2008; Angulo & Lomonte, 2009).

Embora se conheça parcialmente a estrutura química destas proteínas, nada se sabe a respeito de miotoxicidade, atividades bioquímicas e farmacológicas, estudos imunoquímicos de reatividade cruzada, efeitos sobre lipossomos e estudos de neutralização das mesmas. Pesquisadores isolaram uma miotoxina básica com Mr 13.5 kDa do veneno de *B. atrox* da Colômbia, que apresentava atividade fosfolipásica e anticoagulante (Arni & Ward, 1996; Lomonte *et al.*, 1990).

As PLA2 conhecidas como “clássicas”, que contêm um aminoácido aspartato na posição 49 (Asp-49) e catalisam de maneira dependente de  $Ca^{+2}$ , a hidrólise da ligação éster, na posição *sn*-2 de glicerofosfolipídeos. Os outros tipo de PLA2 é descrito como “variante” e contém uma lisina na mesma posição (Lys-49), sem atividade ou com baixa atividade catalítica (Maraganore *et al.*, 1984). O modo de ação muscular de ambas, Lys49 e Asp49, diferentes, mas, em geral, elas podem causar rápida lise do sarcolema levando ao estado de mionecrose. O papel da atividade catalítica destas miotoxinas é controverso e não está totalmente esclarecido, já que as miotoxinas PLA2 homólogas Lys49 não possuem uma atividade lipolítica, portanto, outros mecanismos devem estar envolvidos na expressão da atividade miotóxica (Stabeli *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2007).

Outra enzima que deve ser destacada no veneno botrópico é L-aminoácido oxidase (LAAO), pertencente à classe das oxidoredutases e que catalisa a desaminação oxidativa estereoespecífica de um L-aminoácido para um  $\alpha$ -cetoácido com produção de amônia e peróxido de hidrogênio (Kommoju *et al.*, 2007). São consideradas flavoenzimas, por apresentarem como grupo prostético a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) ou flavina mononucleotídeo (FMN), sendo

que esta característica está relacionada com a cor amarela dos venenos botropicos (Du & Clemetson, 2002; Butzke *et al.*, 2005).

As LAAO exibem uma preferência para aminoácidos hidrofóbicos. Apesar do mecanismo de toxicidade nos venenos ofídicos ser pouco conhecido vários trabalhos realizados “*in vivo*” com LAAO de venenos ofídicos demonstraram uma eficiente indução de efeitos tóxicos relevantes, tais como hemorragia, hemólise, indução de apoptose, edema e atividades bactericidas (Ali *et al.*, 2000; Du & Clemetson, 2002; Stabeli *et al.*, 2004; Izidoro *et al.*, 2006; Calvete *et al.*, 2007; Faust *et al.*, 2007; Braga *et al.*, 2008).

Uma grande variedade de componentes já foram isolados e estudados a partir do veneno da serpente *B. moojeni* incluindo proteases (Assakura *et al.*, 1985; Reichl & Mandelbaum, 1993; Oliveira *et al.*, 1999), metaloproteases hemorrágicas (Bernardes *et al.*, 2008), fosfolipases A<sub>2</sub> com atividade inflamatória, miotóxica, e sobre a atividade plaquetária (Soares *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2005; Stabeli *et al.*, 2006; Calgarotto *et al.*, 2008; Santos-Filho *et al.*, 2008), L-aminoácido oxidase (Tempone *et al.*, 2001; Stabeli *et al.*, 2007), peptídeos potenciadores de bradicinina (Menin *et al.*, 2008).

### 1.3. Venenos e Antimicrobianos

Embora um grande número de vítimas de acidentes ofídicos, cerca de 2,5 milhões em todo o mundo, e, destes aproximadamente 100.000 casos evoluírem para o óbito em consequência dos efeitos tóxicos já descritos (Tennesen, 2009), estes mesmos venenos representam uma rica fonte de moléculas bioativas com importantes atividades farmacológicas que possuem um grande potencial para a produção de medicamentos (Koh *et al.*, 2006).

Os primeiros estudos com o objetivo de se isolar moléculas bioativas, demonstraram que a bradicinina, um peptídeo hipotensor, é produzida quando o veneno de *Bothrops jararaca* é injetado na circulação do sangue de mamíferos. Este importante peptídeo bioativo está associado ao controle da pressão arterial e muitos outros processos fisiológicos e patológicos. Mais tarde, descobriu-se que este veneno não só gera bradicinina, mas também aumenta muito seu efeito hipotensor através da formação de peptídeos potenciadores de bradicinina (PPBs) (Ferreira, 1965; Ferreira *et al.*, 1998).

Os atributos farmacológicos e moleculares das toxinas de serpentes não só levaram à descoberta de moléculas endógenas essenciais associadas ao equilíbrio da pressão arterial, como também permitiram a identificação da enzima conversora da angiotensina (ECA), como o alvo para uma droga de tratamento da hipertensão humana (Prêmio Nobel para John Vane, em 1982). Estes estudos levaram ao desenvolvimento do Captopril, o primeiro inibidor do sítio ativo da ECA, é uma das drogas de maior sucesso no tratamento da hipertensão, que foi criado pelo Squibb Institute, em 1977. Desde então, vários outros medicamentos foram desenvolvidos a partir de venenos ofídicos, como por exemplo: Reptilase,

utilizado no diagnóstico de desordem no sistema de coagulação sanguínea, desenvolvido a partir do veneno de *B. jararaca*; Hemocoagulase, que tem atividade similar à trombina, utilizado na prevenção de hemorragia, desenvolvido a partir do veneno de *Bothrops atrox*, dentre outros. Estudos que envolvem a análise de coagulopatias e hemostase utilizam uma série de compostos identificados como desintegrinas (eptifibatide e tirofiban) e tem demonstrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, serem poderosos inibidores da agregação plaquetária (Koh *et al.*, 2006). Também deste mesmo veneno, os resultados de uma pesquisa desenvolvida na Universidade de Brasília, indicam o desenvolvimento de um medicamento anticoagulante mais eficiente e com efeitos colaterais menores do que os encontrados no mercado (Lopez-Lozano *et al.*, 2002).

Além de moléculas que atuam no sistema circulatório e na coagulação, vários outros estudos vêm sendo desenvolvidos na busca de moléculas que possam ser utilizadas como fonte para novos medicamentos, como analgésicos (Rajendra *et al.*, 2004; Cury & Picolo, 2006) e anti-inflamatórios (Soares *et al.*, 2003).

Moléculas isoladas a partir dos venenos ofídicos, com atividade antimicrobiana, também tem sido alvo de vários estudos. Glaser (1948), foi o pioneiro a identificar que o veneno de duas espécies de cascavéis, *Crotalus mitchellii pyrrhus* e *C. ruber*, apresentavam atividade bactericida sobre *Bacillus subtilis*, *Sarcina* spp. *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus*. Posteriormente Aalof-Hirsch *et al.* (1968) mostrou que o veneno de *Haemachatus haemachates* possui um proteína básica de baixa massa molecular, denominada fator lítico direto (DLF), que interfere no crescimento bacteriano. Em 1970, Skarnes foi o

primeiro a demonstrar que a L-aminoácido oxidase presente no veneno de *Crotalus adamanteus* possui atividades antibactericida.

Stocker & Traynor (1986) descreveram efeitos inibitórios dos venenos de *Naja naja soutratrix*, *Vipera russelli* e *Crotalus adamanteus* em *E. coli*. Em 1991, (Stiles *et al.*) demonstraram que 30 diferentes venenos de serpentes asiáticas, africanas, australianas e norte-americanas possuem atividade antibacteriana.

A partir destes estudos pioneiros, vários outros foram realizados, sendo que, nos últimos anos estas pesquisas se intensificaram bastante e têm demonstrado que a enzima L-aminoácido oxidase isolada de vários venenos ofídicos tem-se mostrado importante para a inibição do crescimento de vários microrganismos. Além do trabalho de Skarnes (1970), já citado anteriormente, a enzima L-aminoácido oxidase do veneno de *Pseudechis australis*, foi muito eficiente contra *Aeromonas*, sendo 70 vezes mais eficiente que a tetraciclina (Stiles *et al.*, 1991), a de *Agkistrodon halus*, inibiu o crescimento de *E. coli* e *Staphylococcus aureus* (Yan *et al.*, 2000). Esta mesma enzima isolada do veneno de *Bothrops alternatus*, impediu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (Stabeli *et al.*, 2004), a encontrada no veneno de *Trimeresurus jerdoni* inibiu a atividade de *Bacillus megaterium* (Lu *et al.*, 2002). Em testes “*in vitro*”, a LAO de *B. moojeni*, provocou a morte em diferentes espécies de *Leishmania* (Tempone *et al.*, 2001). A TSV-LAO, isolada e clonada a partir da peçonha de *Trimeresurus stejnegeri*, inibiu a replicação de células infectadas por HIV-1 (Zhang *et al.*, 2003).

A L-aminoácido oxidase foi estudada ainda nos venenos de *Bothrops marajoensis* (Costa Torres *et al.*, 2010), onde foi capaz de inibir do crescimento de *P. aeruginosa*, *Candida albicans* e *S. aureus* e nos venenos de *Naja naja oxiana* (Samel *et al.*, 2008) e *Daboia russelli siamensis* (Zhong *et al.*, 2009).

Outra enzima muito importante na atividade antimicrobiana estudada a partir dos venenos ofídicos, é a fosfolipase (Iglesias *et al.*, 2005; Nevalainen *et al.*, 2008). As miotoxinas com atividade fosfolipásica, BthTx-I e BthTx-II, isoladas do veneno de *B. jararacussu*, apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas *Xanthomonas axonopodis. pv. Passiflorae* (Barbosa *et al.*, 2005). Fosfolipases secretórias dos grupos IA, IB, IIA e III foram capaz de inibir o crescimento de *Plasmodium falciparum* (Guillaume *et al.*, 2004).

Outras moléculas presentes nos venenos ofídicos também foram identificadas como potentes inibidores do crescimento bacteriano. Nair *et al.* (2007) isolaram a partir da peçonha de *Taipan microlepidotus*, uma molécula denominada Omwaprin, uma proteína catiônica, com 50 aminoácidos, a qual não é tóxica para camundongos em doses de até 10 mg/kg quando administrada por via intraperitoneal e que mostra atividade seletiva e dose-dependente contra bactérias Gram-positivas.

Magaldi *et al.* (2002), estudando a peçonha de *Crotalus durissus cumanensis*, frente à sua atividade antifúngica contra leveduras e fungos filamentosos, identificou uma susceptibilidade destes à peçonha de 78,6% e 50% respectivamente. Outro trabalho mais recente, realizado com peptídeo sintético, homólogo da fosfolipase A, presente na peçonha de *B. asper*, também demonstrou que o veneno possui uma potente atividade fungicida contra algumas espécies clínicas de *Candida*, em particular a espécie de *Candida albicans* (Murillo *et al.*, 2007). Outro estudo demonstrou que a fração Pep5Bj, do veneno de *B. jararaca* possui atividade de inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos (*Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum*) e leveduras (*C.albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*) (Gomes *et al.*, 2005).

A crotacetina, uma lectina do tipo C, isolada do veneno de *C. durissus cascavella*, além de sua atividade de indução na atividade plaquetária, foi capaz de inibir o crescimento de várias bactérias gram positivas e negativas (Radis-Baptista *et al.*, 2006). Uma metaloproteinase isolada do veneno de *Agkistrodon halys pallas* exibiu propriedades antibacterianas e foi ativa contra *S. aureus*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis* e *B. pseudomallei* multirresistente (cepa KHW) (Samy *et al.*, 2008).

Estudos da ação antimicrobiana com venenos animais são realizados em todo o mundo, no entanto, peçonhas de espécies de serpentes típicas do cerrado brasileiro são pouco estudadas, principalmente no que diz respeito à atividade antimicrobiana. Além disso, a maioria destes estudos não inclui bactérias isoladas de pacientes com infecção hospitalar. Desta forma, componentes presentes nas peçonhas de serpentes encontradas no centro-oeste brasileiro podem constituir em importantes opções para a produção de antibióticos potentes contra bactérias multirresistentes a diferentes classes de antimicrobianos, que frequentemente estão associadas com infecções hospitalares e mais recentemente com infecções comunitárias.

Os venenos de animais desempenham diversas funções na natureza: funções defensivas como em alguns lepidópteros (taturanas); alimentares, nos venenos de serpentes, escorpiões, aranhas, sendo utilizados na imobilização e no início da digestão do animal (presa) que servirá como alimento (alguns casos); ataque, com intuito de defesa, no caso de serpentes e principalmente de formigas, vespas e abelhas e na proteção de suas colônias (Bolanõs, 1984).

Os venenos de serpentes são produzidos em glândulas especializadas capazes de sintetizar e secretar grandes quantidades de substâncias

biologicamente ativas, compostas principalmente de proteínas e polipeptídeos. Várias destas substâncias já analisadas demonstraram efeitos biológicos diversificados (Bolanós, 1984).

Esta variabilidade na composição química e nas ações biológicas dos venenos pode ter caráter tanto interespecífico como intraespecífico, caracterizado pelas ações biológicas dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (Meier 1986; Furtado *et al.* 1991; Otero *et al.*, 1992).

Estudos detectaram no veneno de *B. atrox* a atividade L-aminoácido oxidase, uma enzima que catalisa a conversão de um L-aminoácido em seu respectivo  $\alpha$ -cetoácido (Zeller & Maritz, 1944). Do veneno desta serpente, também foram isolados componentes denominados "fatores de crescimento dos nervos" (*Nerve Factor Growth*, NFG). São proteínas solúveis que regulam a sobrevivência, crescimento e plasticidade morfológica ou atuam na síntese de proteínas para funções diferenciadas dos neurônios (Kostiza & Meier, 1986). O NFG é uma proteína com massa molecular (Mr) de 35 kDa, com 10-20% de carboidratos (Hogue-Angeletti *et al.*, 1976). Isolou-se também, do veneno de *B. atrox*, uma lectina denominada trombolectina, que apresenta atividade agregadora de plaquetas (Gartner *et al.*, 1980).

As enzimas que atuam sobre o fibrinogênio para formar fibrina, denominadas trombina-símile, foram isoladas de venenos de serpentes. Algumas destas enzimas clivam, conjuntamente, as cadeias Aa e Bb do fibrinogênio, liberando os fibrinopeptídeos A e B. Outras clivam apenas a cadeia Aa, liberando o fibrinopeptídeo A (Stocker *et al.*, 1986).

Duas enzimas apresentam funções essenciais da trombina, a protease trombina-símile "batroxobina", isolada do veneno de *B. atrox*, que possui atividade

apenas sobre a cadeia Aa do fibrinogênio, formando-se coágulos fracos de fibrina. A serinaproteinase "trombocitina" apresenta baixa atividade proteolítica sobre o fibrinogênio, mas induz agregação plaquetária e ambas são complementares (Kirby *et al.*, 1979; Meier *et al.*, 1986).

Em outros estudos foram isoladas duas frações do veneno de *B. atrox* capazes de ativar o fator X da cascata da coagulação. Estas frações são constituídas por uma cadeia polipeptídica com Mr 59 kDa, ligada por pontes dissulfeto a uma ou duas cadeias leves com Mr 14-15 kDa, não sendo inibidas por inibidores específicos de serinaproteases (Hoffmann & Bom 1987).

Além destas frações, foi purificado um fator ativador da protrombina, que possui Mr 70 kDa, também não inibido por inibidores de serinaproteases, mas inibido por inibidores específicos de metaloproteases, indicando que esta, provavelmente, seja uma metaloprotease (Hofmann & Bom, 1987). A função destes fatores no envenenamento é desconhecida (Sano-Martins, 1997).

Presentes em vários venenos, as enzimas PLA2 atuam hidroliticamente na ligação éster do carbono 2 dos fosfolídeos. Além da atividade enzimática, as PLA2 podem apresentar outros efeitos farmacológicos como: cardiotoxícos, neurotóxicos, hemorrágicos, hemolíticos (Torres *et al.*, 2010)

Pesquisadores isolaram uma miotoxina básica com Mr 13.5 kDa do veneno de *B. atrox* da Colômbia, que apresentava atividade fosfolipásica e anticoagulante (Arni & Ward, 1996; Lomonte *et al.*, 1990). Em estudo feito com veneno de 21 exemplares adultos de *B. atrox* procedentes de diferentes regiões geográficas do Estado do Amazonas, com a finalidade de verificar a frequência das duas isoformas de PLA2, observou-se que 76,19% apresentaram BaPLA2M-I e 100%

BaPLA2M-II. A presença ou ausência de BaPLA2M-I é independente da procedência geográfica dos animais (López-Lozano *et al.*, 2002).

Foram isoladas do veneno de *B. moojeni*, duas miotoxinas I e II com Mr 13,5 kDa, que possuem estrutura de PLA2 mas não possuem atividade fosfolipásica (Lomonte *et al.*, 1990). Do veneno de *B. pirajai*, foi isolada uma miotoxina denominada piratoxin-I (PrTX-I), com atividade de PLA2 não detectada. Supostamente, trata-se de uma miotoxina Lys-49 com estrutura de PLA2 (Mancuso *et al.*, 1995).

Várias miotoxinas têm sido isoladas do veneno de *B. asper* como a miotoxina denominada miotoxina I com Massa molecular 10,7 kDa e com atividade de PLA2 (Gutierrez *et al.*, 1984).

Em 1986, foi isolada uma fosfolipase miotóxica com Massa molecular 14,1 kDa (Mebis & Samejima 2001). Também isolaram a miotoxina II com Mr 13,3 kDa, sem atividade fosfolipásica (Lomonte; Gutierrez, 1990). Posteriormente isolaram a miotoxina III, uma proteína básica com Mr 13,9 kDa, que possui atividade de PLA2, e em 1995 foi isolado a miotoxina IV, uma miotoxina sem atividade PLA2 e com Mr 15,5 kDa (Kaiser *et al.*, 1990).

A hemorragia é um dos efeitos mais característicos induzidos pelos venenos de serpentes da sub-família *Crotalinae*. Dois mecanismos são descritos para o escape de hemácias e componentes do sangue para os compartimentos teciduais (Gutierrez; Lomonte 1989; Kamiguti *et al.*, 1996) a seguir:

a) hemorragia por "diapedese"- através do alargamento das junções entre as células endoteliais, com conseqüente escape.

b) hemorragia "per rhexis" - desfazendo a integridade das células endoteliais, com escape de hemácias através da fenda formada dentro destas células.

Estudos de componentes dos venenos de serpentes, com capacidade de inibir a função plaquetária, tais como as desintegrinas, enzimas PLA2 e metaloproteinases hemorrágicas, têm sido realizados. As desintegrinas são peptídeos desprovidos de atividade enzimática, com Mr entre 5 a 7 kDa aproximadamente, contendo sequências desintegrinas-*like* - RGD ou KGD (região desintegrina) pelas quais elas podem se ligar às integrinas da superfície plaquetária (receptores de membrana, potencializando a inibição da agregação plaquetária) (Kamiguti *et al.*, 1996).

Foi isolada do veneno de *B. atrox*, uma desintegrina, "batroxostatina", com potente atividade inibidora da agregação plaquetária (Rucinski, *et al.*, 1990). Do veneno de *B. jararaca*, foi isolada uma metaloproteinase denominada "jararhagina" com atividade hemorrágica; entretanto, os domínios semelhantes às desintegrinas, nas metaloproteinases, não possuem a sequência RGD e sim uma sequência ECD (região não desintegrina-símile), próxima da região onde se encontra a sequência RGD nas desintegrinas. Esta região da jararhagina é a responsável pela inibição da agregação plaquetária (Kamiguti, *et al.*, 1996).

Em outro estudo isolou-se do veneno de *B. atrox* uma metaloproteinase com Massa molecular 50 kDa, com atividade hemorrágica. Os venenos botrópicos possuem ação vasodilatadora, em função da sua capacidade de gerar peptídeos vasoativos (atividade cininogenase), denominados de cininas. Do ponto de vista fisiológico, estas cininas encontram-se sob estrito controle regulador de enzimas

específicas inativadoras. Por exemplo, a enzima de conversão da angiotensina (cininase II) cliva dipeptídeos da bradicinina, tornando-a inativa (Cavinato, 1994).

Outros autores isolaram do veneno de *B. jararaca*, peptídeos de 5 a 13 resíduos de aminoácidos potencializadores da atividade hipotensora da bradicinina. Estes peptídeos agem inibindo a atividade proteolítica da cininase II sobre a bradicinina (Ferreira, *et al* 1970).

Estudos realizados "in vitro" demonstraram o efeito citolítico do veneno bruto de *B. atrox* sobre células tumorais (Cotte, *et al.*, 1972).

## 2. Agentes Etiológicos: bacilos gram-negativos fermentadores e não fermentadores de glicose

### 2.1. *Pseudomonas* spp.

As *Pseudomonas aeruginosa* estão amplamente distribuídas no meio ambiente e são causa crescente de infecções sérias em hospitais, onde afetam principalmente pacientes imunocomprometidos. Muitas espécies são conhecidas pela sua resistência a todas as classes de antimicrobianos e pela facilidade com a qual podem adquirir novos mecanismos de resistência (Enoch *et al.*, 2007).

A família *Pseudomonadaceae* é formada por diversos gêneros, dentre eles, *Pseudomonas* que envolve um grande grupo de espécies de bastonetes retos ou curvos, aeróbios, não esporulados (Pollack, 1995). Mede aproximadamente de 1,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  de comprimento por 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  de largura e quase todas as cepas apresentam motilidade devido à presença de apenas um flagelo polar (Koneman 2001).

As *Pseudomonas* são produtoras de pigmentos de diferentes tonalidades, dentre os principais destacam-se a piocianina (azul), a pioverdina (verde), a piorrubina (vermelho) e a piomelanina (marrom para o preto) (Visca, *et al.*, 1992). Possuem também o odor de fruta adocicado e formação de colônias com aspectos morfológicos variados, podendo ser diminutas ou até planas, difusas ou mucóides com bordos serrados e brilho metálico (Gillard, 1980).

A *P. aeruginosa* é um bacilo gram-negativo não fermentador de glicose. Apresenta como característica oxidase positiva,  $\beta$ -hemólise em ágar sangue, motilidade positiva, crescimento a 42°C, redução de nitrato a nitrito, lisina descarboxilase negativa, acetamida positiva, malonato positivo, citrato positivo, indol negativo, formação de ácido oxidativamente a partir da glicose e do manitol,

incapacidade de oxidar maltose e lactose, DNase negativa (Hugh & Leifson, 1953). Este microrganismo tem a capacidade de crescer dentro de um espectro variado de temperatura que pode variar entre 5°C a 42°C. Entretanto, a temperatura ideal para o crescimento é de 37°C (Pollack, 2000; Koneman *et al*, 2001).

## **2.2. *Acinetobacter* spp.**

O gênero *Acinetobacter*, atualmente classificado na família *Moraxellaceae* compreende cocobacilos gram-negativos, não-fermentadores de glicose, estritamente aeróbicos, imóveis, catalase positiva e oxidase negativa. Apresentando melhores taxas de crescimento entre 20°C e 30°C, sem requerimento de fatores de crescimento e raramente reduzindo o nitrato (Bouvet & Grimont, 1986; Bergogne-bérézin & Tower, 1996).

As espécies desse gênero são saprófitas de vida livre que podem ser facilmente isoladas do solo, água, alimentos e também colonizando a pele de profissionais da saúde e de pacientes (Towner, 2002).

A diversidade do gênero *Acinetobacter* é observada pela variedade de grupos fenotípicos e de grupos de DNA homólogos. Em razão de critérios insuficientes para a identificação, porém, costumava-se considerar os membros do gênero como pertencentes a uma única espécie, *Acinetobacter calcoaceticus*.

## **2.3. *Escherichia coli***

O gênero *Escherichia* é composto por cinco espécies bacterianas: *Escherichia blattae*, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia*

*hermannii* e *Escherichia vulneris*. Este gênero pertence à família *Enterobacteriaceae*. Dessas cinco espécies, a *E. coli* é a mais comumente isolada de espécimes humanos. São bactérias encapsuladas, com 0,5 a 2,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 2,0 a 4,0  $\mu\text{m}$  de comprimento, não esporuladas, com motilidade variável e são anaeróbias facultativas. Caracterizam-se também por não utilizarem o citrato como fonte única de carbono e por fermentarem a glicose (Koneman, 2001).

As amostras de *E. coli* apresentam-se sobre a superfície do ágar sangue como colônias sobrelevadas, com diâmetros de 2 a 3 mm, opacas, de aspecto mucóide e com coloração acinzentada. Pela coloração de Gram, são visualizadas como bacilos gram-negativos isolados, aos pares ou em cadeias curtas. Estão presentes na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis e pode acarretar infecções intestinais e extraintestinais em indivíduos saudáveis e imunodeprimidos (Koneman, 2001)..

#### **2.4. *Klebsiella pneumoniae***

O gênero *Klebsiella*, também pertence à família *Enterobacteriaceae*, a qual é constituída por um grupo heterogêneo de bactérias gram-negativas. Este gênero foi designado por Trevisan em 1885, sendo que este também foi responsável pela descrição da espécie *K. pneumoniae*. O gênero *Klebsiella* foi definido por hibridação do ácido desoxirribonucléico (DNA) e permitiu a identificação de cinco espécies: *K. oxytoca*; *K. planticola*; *K. terrigena*; *K. mobilis* e *K. pneumoniae*. Esta última é subclassificada em três subespécies: *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subespécie *ozaenae* e *K.*

*pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis*. Entre as três subespécies de *K. pneumoniae* é a mais importante (Podschun & Ullmann, 1998; Martinez *et al.*, 2004; Umed, 2008;).

A *K. pneumoniae* é um bacilo gram-negativo com melhor crescimento em condições aeróbias, não esporulado e cujo tamanho varia de 0,3 a 1 µm de diâmetro e 0,6 a 6 µm de comprimento. É imóvel e produz colônias grandes e gomosas quando cultivadas em placas com nutrientes. Apresentam colônias róseas, brilhantes, com aspecto sobrelevado e de consistência mucóide no ágar MacConcKey. As colônias formadas são grandes devido à cápsula mucóide polissacarídica (Antígeno K), que protege contra a fagocitose por granulócitos, contra a ação de fatores bactericidas do soro e ainda tem função de auxiliar na aderência (Umed, 2008; Martinez *et al.*, 2004).

### **2.1.1. Epidemiologia das infecções causadas por microrganismos não fermentadores e fermentadores da glicose**

A *P. aeruginosa* é uma causa rara de infecção no ser humano sadio, apesar do microrganismo ser encontrado na microbiota intestinal de adultos sadios (Souto, 2006). As infecções causadas por esse microrganismo, principalmente os multirresistente a diferentes classes de antimicrobianos são motivo de alerta quando detectados, sobretudo, em pacientes hospitalizados. Em função da frequência, da gravidade da doença causada e do custo do tratamento, as infecções por bacilos Gram-negativos adquiridos no hospital são consideradas hoje como um dos maiores problemas de saúde pública (Cunha Junior, *et al.*, 2007).

A *P. aeruginosa* é principalmente um patógeno nosocomial e se destaca pela freqüência e pela elevada morbi-mortalidade relacionada às suas infecções (Carmeli *et al*, 1999; Martins, 2002). Sua freqüência varia segundo a região, o tipo de hospital, de paciente e mesmo dentro da mesma instituição, segundo a unidade de internação, a doença de base e o tipo de tratamento a que são submetidos, principalmente aquelas terapias que envolvem a imunossupressão induzida ou não (Pitt *et al*, 1997; Jones, 2000; Pollack, 2000; Galles *et al*, 2001).

Em um estudo realizado em um Hospital Universitário Brasileiro, no período de 2005 a 2008 a *P. aeruginosa* multirresistente foi o terceiro patógeno mais frequente encontrado na Unidade de terapia intensiva (Oliveira, 2010). O Programa de Vigilância de Resistência aos Antimicrobianos, denominado SENTRY avaliou 70.067 amostras clínicas provenientes de pacientes internados em hospitais da Ásia, Europa, Estados Unidos, Canadá e América Latina, no período de 1997 a 1999 e demonstrou que 9% dessas amostras eram *P. aeruginosa*. A ocorrência de infecções causadas por *P. aeruginosa* foi maior na América Latina (11,4%) e Ásia (11,4%), quando comparada à Europa (9,3%), Estados Unidos (8,7%) e Canadá (8,6%). O trato respiratório foi o sítio que apresentou a maior prevalência de infecção por *P. aeruginosa* (Pires, *et al*, 2009).

No Brasil, não há um estudo epidemiológico demonstrando a prevalência das infecções hospitalares de acordo com seu agente etiológico, mas tão somente estudos regionais, como o realizado na cidade do Rio de Janeiro, entre 2000 e 2002, no Instituto Nacional do Câncer, que avaliaram 112 bacteremias hospitalares consecutivas de pacientes cirúrgicos oncológicos. Eles observaram que a mortalidade não foi diferente segundo a resistência, mas sim entre as doenças de base do paciente e a origem da bacteremia (Gabe *et al*, 2009). No

Brasil segundo o SENTRY, a *P. aeruginosa* foi a causa mais frequente de infecções do trato respiratório (32%), seguida por infecções do trato urinário, ferida cirúrgica, e o sexto patógeno mais comumente isolado em infecções da corrente sanguínea (7%), como demonstrado em um estudo realizado no período de 1997 a 2001 (Sader *et al.*, 2001).

As infecções causadas por *Acinetobacter* spp. são frequentemente relacionadas com a ocorrência de surtos de infecções hospitalares. Tal microrganismo sobrevive por muito tempo em ambientes secos e inanimados (Takagi *et al.*, 2009). A resistência às condições ambientais adversas, como a dissecação é uma propriedade que pode aumentar sua transmissibilidade e ser característica das amostras relacionadas aos surtos ocorridos no ambiente hospitalar (Jawad *et al.*, 1998).

Dados publicados pelo *National Nosocomial Infections Surveillance System* (NNISS) em pacientes de UTI, mostraram que, em 2003, o *Acinetobacter* spp. foi responsável por 6,9% das pneumonias, 2,4% das bacteriemias, 2,1% das infecções em sítios cirúrgicos e 1,6% das infecções urinárias, enquanto que *Pseudomonas* spp. foi responsável por 18,1%, 3,4%, 9,5% e 16,3% destas infecções respectivamente (Falagas & Kopterides, 2006).

Vários surtos de infecção hospitalar por *A. baumannii* multirresistentes foram descritos, nas Américas, na Europa, na Ásia e na África (Brito, 2010).

Como citado acima, verifica-se no Brasil carência de estudo que demonstre a prevalência das infecções hospitalares em todo o território nacional, segundo o seu agente etiológico. Entretanto, iniciativas isoladas são realizadas em algumas regiões como no sudeste e sul do Brasil. Um estudo realizado na UTI do Hospital Universitário de Londrina, no período de 2003 a 2005, identificou que o *A.*

*baumannii* foi o maior causador de pneumonias associadas à ventilação mecânica (Carneiro; Saridakis, 2008). Já no Hospital Universitário de Maringá, outro estudo realizado no período de 2000 a 2005, identificou aumento significativo de infecções na corrente sanguínea por este mesmo agente. Tal estudo demonstrou que 68,7% das amostras do total de 36 hemoculturas foram positivas para *Acinetobacter* spp. Isolado de pacientes em tratamento na UTI (Laiser *et al.*, 2007).

Estudos demonstraram que pacientes infectados e/ou colonizados podem ser os reservatórios de *A. baumannii*, e que a principal via de transmissão ocorre pelas mãos dos profissionais de saúde (Del Mar Tomas *et al.*, 2005). Os níveis de colonização na pele de profissionais da saúde em ambulatórios podem variar entre 25% a 40%, em relação aos pacientes hospitalizados que podem chegar a 75% (Marchaim *et al.*, 2007).

A suscetibilidade do *A. baumannii* aos antimicrobianos varia consideravelmente entre os países, hospitais e até mesmo entre as unidades de internação de um mesmo hospital, refletindo diferentes modelos de uso de antimicrobianos e situações epidemiológicas (Cisneros & Banõ 2002; Livermore, 2010).

A *K. pneumoniae* e *E. coli* são importantes causas de infecções comunitárias e hospitalares e a prevalência das infecções causadas por estas bactérias, sobretudo aquelas produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL), varia conforme o país, a instituição de saúde e o sítio de isolamento (Tanaka *et al.*, 2007; Pinheiro *et al.*, 2008).

Um estudo realizado na Europa demonstrou que a prevalência de produção de ESBL entre isolados de *Enterobacteriaceae* varia de país para país, sendo que

nos países baixos, menos de 1% de *E. coli* e *K. pneumoniae* são produtoras de ESBL. Na França 40% dos isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL eram resistentes a ceftazidima. No Japão a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos ainda é baixa, onde menos de 0,1% das *E. coli* e 0,3% das *K. pneumoniae* são produtoras de ESBL. Na Ásia, as porcentagens de produção de ESBL em *E. coli* e *K. pneumoniae* variam de 4,8% na Coreia a 8,5% em Taiwan e mais de 12% em Hong Kong. Na Etiópia, um estudo demonstrou que 94,7% das amostras deste patógeno eram resistentes às cefalosporinas e dentre estas, 67% apresentaram altos níveis de resistência a múltiplas drogas (Philippon *et al.*, 1989; Jones, 2000; Bradford, 2001; Marra, 2002).

Na América Latina, a prevalência de amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL é bem maior que a média mundial, que varia entre 20 e 30%. No Brasil, alguns estudos realizados no Hospital São Paulo, hospital escola da Universidade Federal de São Paulo, demonstraram que a prevalência de *K. pneumoniae* produtora de ESBL foi de 39%. Outro estudo constatou-se que 39% das cepas de *K. pneumoniae* isoladas da corrente sanguínea eram produtoras de ESBL. Neste mesmo hospital, Carmo Filho (2003) demonstrou que a prevalência de infecções causadas por *K. pneumoniae* em UTI de pacientes adultos foi de 31% e destas, 69%, eram produtoras de ESBL. Na UTI Neonatal, a prevalência de infecção hospitalar causada pelo mesmo patógeno foi de 53,8% e destas 46,2% eram produtoras de ESBL (Gales *et al.*, 1997; Jones, 2000; Marra, 2002; Carmo Filho, 2003).

Outro estudo realizado em dois hospitais na cidade de Goiânia, com isolados de *K. pneumoniae* identificadas em amostras clínicas sucessivas, demonstrou que 25% dos isolados provenientes de um hospital eram produtores

de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado, enquanto que 66,7% dos isolados provenientes do outro hospital também eram produtores da mesma enzima (Santos *et al*, 2008).

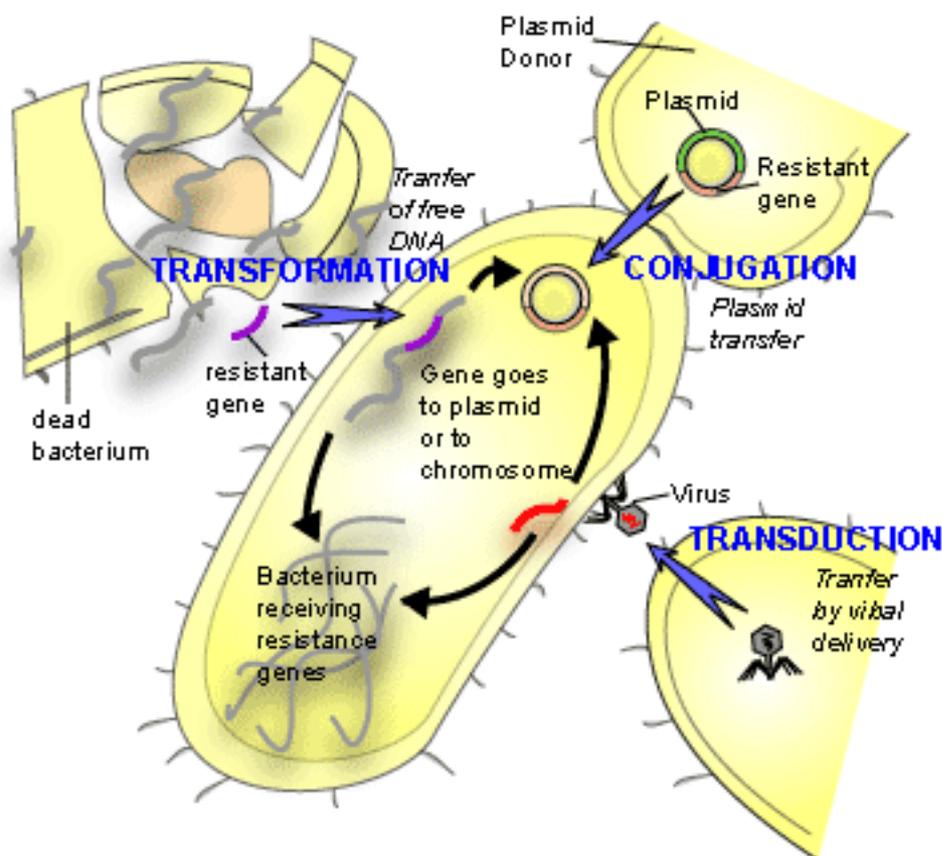
### **3. Mecanismos de Resistência Bacteriana**

#### **3.1. Degradação de $\beta$ -lactâmicos: principal mecanismo de resistência identificado em bactérias Gram-negativas**

Diversas bactérias Gram-negativas possuem genes que codificam enzimas, as quais estão diretamente relacionadas com a resistência desses patógenos aos antimicrobianos. A *K. pneumoniae* é o gênero que produz a maior variedade destas enzimas, o que poderia ser explicado pelo fato destes microrganismos serem bons vetores para plasmídeos ou por permitirem a evolução de genes que codificam ESBL mais rapidamente que outras *Enterobacteriaceae*. Muitos genes de ESBL são localizados em plasmídeos com poucos números de cópias (Livermore, 1995).

A emergência e disseminação de organismos multirresistentes revelam uma variedade de fatores responsáveis pelo aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos. Alguns desses fatores podem ser consequência de mutações em genes de resistência, ampliando seu espectro de atividade. A troca de informações genéticas, por transformação, conjugação e transdução entre os microrganismos permite que os genes de resistência sejam disseminados pelo ambiente e transmitidos para novos hospedeiros, Figura 3. Além disso, as condições no meio ambiente hospitalar e da comunidade levam a uma pressão seletiva, que facilita o desenvolvimento e disseminação de clones bacterianos multirresistentes (Bertoncheli *et al.*, 2008). Os genes que codificam as  $\beta$ -lactamases podem ser cromossômicos ou plasmidiais, e a mobilidade genética pode ser ampliada por meio de transposons, que transportam os respectivos genes dos plasmídeos para os cromossomos. Apesar de mais incomum, o inverso

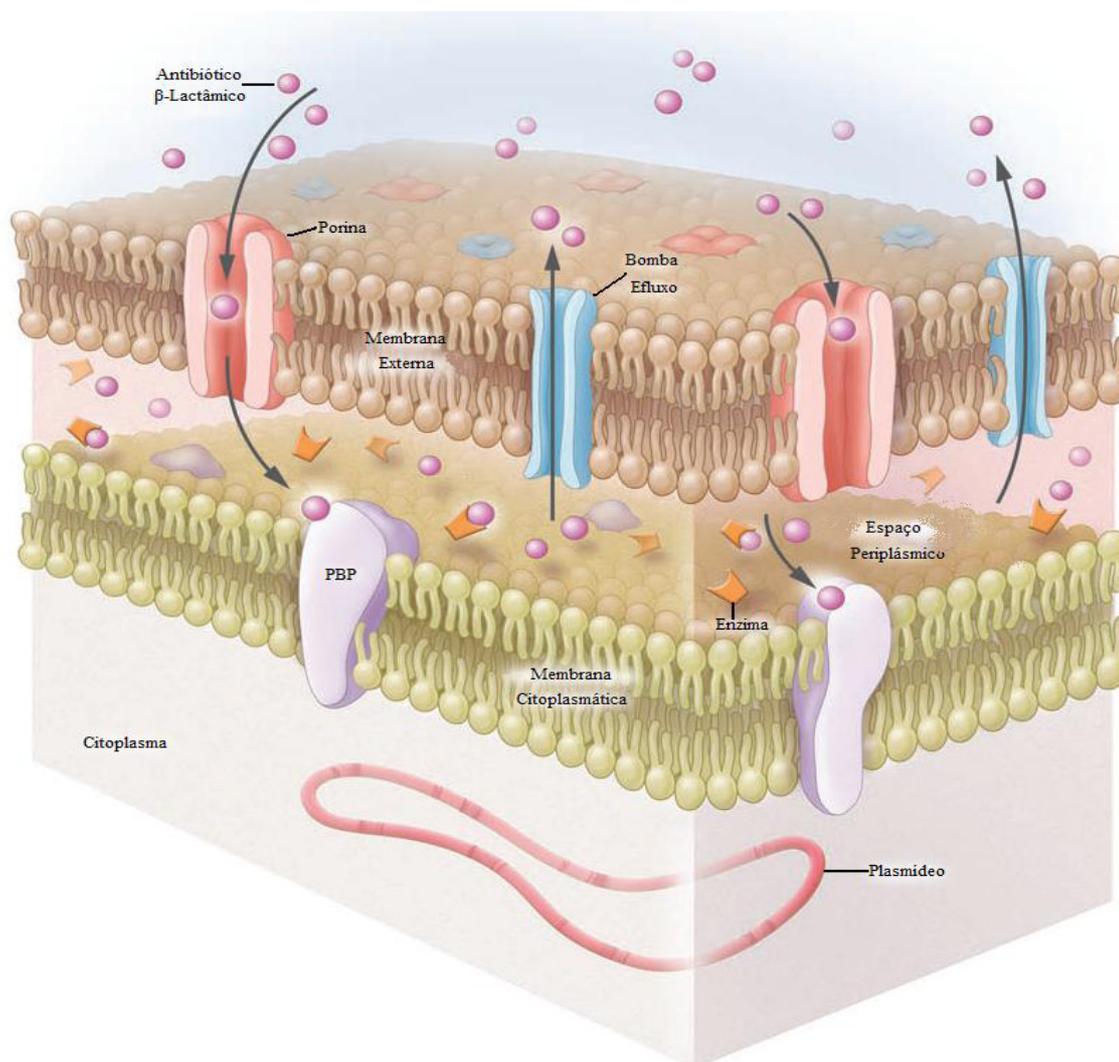
também pode ocorrer; como também pode haver a transferência de material genético entre uma bactéria e outra (intra e inter espécie) por meio de conjugação, transformação ou transdução (figura 3) (Livermore, 1995; Tenover *et al.*, 1995).



**Figura 3.** Transferência de material genético entre bactérias. Localizado em:

[http://www.textbookofbacteriology.net/resantimicrobial\\_3.html](http://www.textbookofbacteriology.net/resantimicrobial_3.html) Acessado em 1 de Agosto de 2010

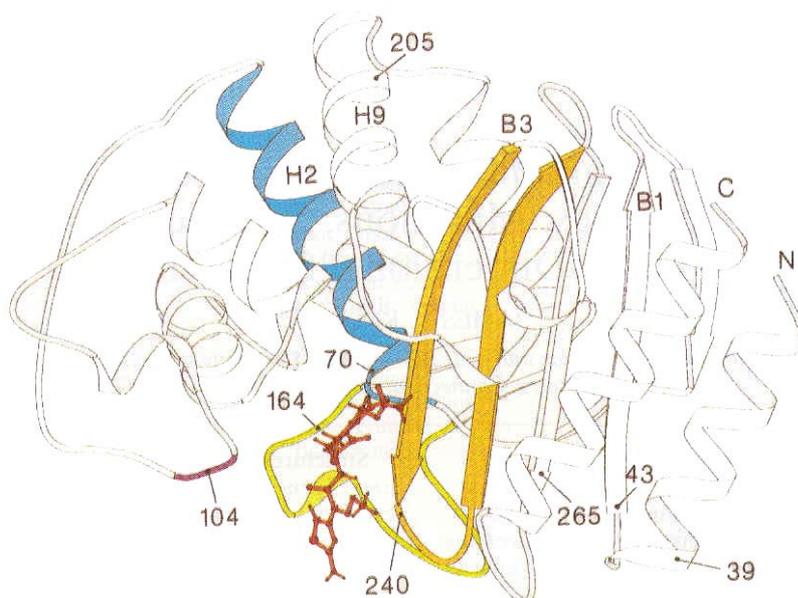
Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos desenvolvidos por bactérias gram negativas são: alteração da permeabilidade de membrana externa pela modificação das porinas; alteração do sítio de ligação dos antimicrobianos; mecanismo ativo de efluxo; e produção de enzimas inativadoras de antimicrobianos (Figura 4).



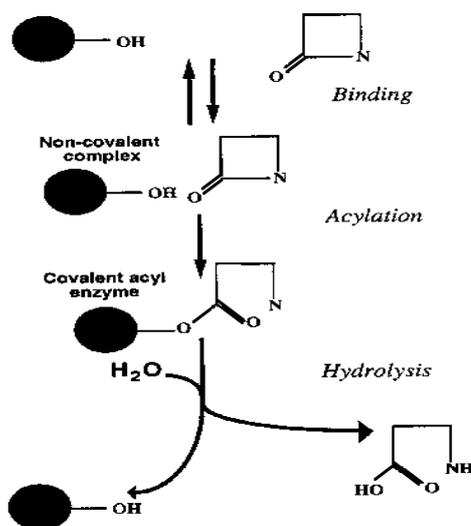
**Figura 4.** Mecanismos de resistência aos antimicrobianos (Munoz-Price & Weinstein 2008).

Estas enzimas, ESBL, são responsáveis pela hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, impossibilitando desta forma a sua atividade antimicrobiana (Figura 5) (Livermore, 1995). As  $\beta$ -lactamases possuem dois mecanismos de ação: o mecanismo zinco dependente que utiliza o zinco como co-fator para atividade enzimática (metalo-betalactamase) e o outro mecanismo que atua via ester de serina (ESBL). A maioria das  $\beta$ -lactamases possui a “via serina” como o

mecanismo principal de ação, ou seja, o anel  $\beta$ -lactâmico é atacado pela hidroxila livre da cadeia lateral do resíduo de serina que ativa o sítio da enzima, produzindo um ester acil covalente. Após a hidrólise do ester, dá-se finalmente a liberação da enzima ativa e o hidrolizado que é a droga inativada (figuras 6) (Bush & Sykes, 1983; Waley, 1987).



**Figura 5.** Estrutura terciária da  $\beta$ -lactamase tipo TEM classe A (Knox, 1995).

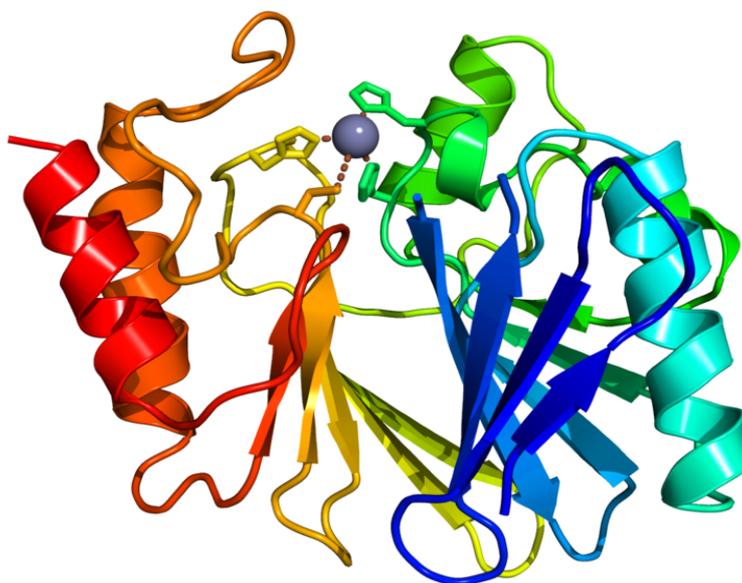


**Figura 6.** Ação da serina de uma  $\beta$ -lactamase (Waley, 1987)

### 3.2. Metalo- $\beta$ -lactamase (M $\beta$ L)

A produção de metalo-enzima por alguns patógenos é motivo de preocupação mundial, pela sua capacidade de degradar os carbapenems (Oliveira, 2007).

A maioria dos genes de MBLs são encontrados em plasmídeos e usualmente apresentam entre 120 e 180 Kb. Entretanto, alguns genes, tais como, *bla* VIM-7 descrito nos Estados Unidos são carregados por um plasmídeo conjugativo de 24 Kb (Toleman *et al.*, 2004). Esta proteína possui no sítio ativo uma molécula de zinco (Figura 7).



**Figura 7.** Estrutura cristalográfica de uma metalo beta-lactamase do *Bacillus cereus*. ([http://www.google.com.br/imgres?imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/14/1BMC.png&imgrefurl=http://commons.wikimedia.org/wiki/File:1BMC.png&usq=\\_\\_he3sbrJZVlZrKfAM7WJEfjMJct0=&h=1080&w=1440&sz=585&hl=pt-BR&start=107&um=1&itbs=1&tbnid=CE6YOjll0bR5tM:&tbnh=113&tbnw=150&prev=/images%3Fq%3Dmetallico%2Bbeta%2Blactamase%26start%3D90%26um%3D1%26hl%3Dpt-BR%26sa%3DN%26ndsp%3D18%26tbs%3Disch:1](http://www.google.com.br/imgres?imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/14/1BMC.png&imgrefurl=http://commons.wikimedia.org/wiki/File:1BMC.png&usq=__he3sbrJZVlZrKfAM7WJEfjMJct0=&h=1080&w=1440&sz=585&hl=pt-BR&start=107&um=1&itbs=1&tbnid=CE6YOjll0bR5tM:&tbnh=113&tbnw=150&prev=/images%3Fq%3Dmetallico%2Bbeta%2Blactamase%26start%3D90%26um%3D1%26hl%3Dpt-BR%26sa%3DN%26ndsp%3D18%26tbs%3Disch:1)) Acesso no dia 12 de julho de 2010

### 3.2.1. IMP

Esta família é muito comum no sul da Ásia, e foi a primeira indicação de MBLs encontrada em *P. aeruginosa* no Japão em 1988. O gene de resistência foi identificado em um plasmídeo conjugativo transferível que poderia ter sido mobilizado de outro isolado de *Pseudomonas* (Watanabe *et al.*, 1991; Osano *et al.*, 1994).

Um estudo realizado no Japão entre 1992 e 1994, identificou a presença do gene *bla* IMP-1 em isolados de *P. aeruginosa* (Senda *et al.*, 1996; Shibata *et al.*, 2003).

O IMP-1 foi encontrado recentemente na Inglaterra em isolados de *A. junnii* e *A. baumannii*. Estudos retrospectivos em isolados resistentes coletados em 1994, em Hong Kong, em 1995, no Canadá, determinaram que a resistência ao carbapenem fosse devida ao IMP-7 e ao IMP-4 em *Acinetobacter* spp. de Hong Kong. IMP-4 também tem sido encontrada na Austrália, em *E. coli*, *K. pneumoniae*, e *P. aeruginosa*, possivelmente, “importado” do sudeste da Ásia (Chu *et al.*, 2001; Gibb *et al.*, 2002; Towner *et al.*, 2002; Tysall *et al.*, 2002; Peleg *et al.*, 2004, Poirel *et al.*, 2004b).

A única informação na literatura científica sobre MBLs do tipo IMP na América tem principalmente, vindo do Brasil, onde existe um sério problema com isolados de *A. baumannii* multiresistentes a diversos antimicrobianos (Gales *et al.*, 2003a).

### 3.2.2. VIM

O segundo grupo dominante das MBL é o de enzimas do tipo VIM (Veronese imipenemase). VIM-1 foi descrito primeiramente em Verona, Itália, de um isolado de *P. aeruginosa*. Este isolado clínico, recuperado em 1997, foi resistente a diversos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo piperacilina, ceftazidima, imipenem, e aztreonam (Lauretti *et al.*, 1999).

Esta enzima é típica da classe B, hidrolisando diversos  $\beta$ -lactâmicos exceto, aztreonam. O gene *blaVIM-1* foi integrado como um gene cassete dentro da classe 1 de integrons. No isolado da *P. aeruginosa*, o gene *blaVIM-1* contendo o integron foi provavelmente localizado no cromossomo bacteriano (Lauretti *et al.*, 1999).

O gene *blaVIM-2* foi primeiramente identificado na França de um isolado de *P. aeruginosa* de uma cultura sanguínea de um paciente em 1996. Este isolado foi resistente a diversos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo ceftazidime, cefepime, e imipenem, mas permaneceu susceptível ao aztreonam (Poirel *et al.*, 2000; Giakkoupi *et al.*, 2003; Scoulica *et al.*, 2004).

### 3.2.3. SPM

Em São Paulo (Brasil) uma cepa de *P. aeruginosa*, isolada em 1997, demonstrou conter um novo gene, designado *blaSPM-1* (São Paulo MBL). O gene *blaSPM-1* é único, pois está imediatamente associado com elementos de regiões comuns e não com transposons ou integrons. Esses elementos comuns diferem significativamente em isolados de *P. aeruginosa* coletados de diferentes áreas do Brasil (Toleman *et al.*, 2002; Poirel *et al.*, 2004a).

O SPM-1, assim como IMP-1 e VIM-1, não hidrolisam ácido clavulânico ou aztreonam, os quais podem atuar como inibidores competitivos. A enzima demonstra um perfil de hidrólise único, e mantém uma cinética constante na presença de  $\beta$ -lactâmicos e inibidores de  $\beta$ -lactamases. A variante SPM-1 difere do grupo das IMP e VIM por apresentar um intervalo de hidrólise maior na presença de penicilina e ampicilina e por exibir uma catálise reduzida para carbenicilinas; mas mesmo assim o grupo das SPM possui a capacidade de hidrolisar ticarcilina (Toleman *et al.*, 2002; Gales *et al.*, 2003b; Murphy *et al.*, 2003).

Pelo exposto é imperativo que sejam identificadas novas moléculas, na natureza, que possuam atividade para inibir o crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo Geral**

Identificar a atividade antibacteriana no veneno da serpente *B. moojeni* em bactérias gram negativas fermentadoras e não fermentadoras de glicose produtoras de diferentes enzimas degradadoras de  $\beta$ -lactâmicos.

### **4.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar a atividade antimicrobiana do veneno bruto da *B. moojeni* sobre bactérias gram-negativas produtoras e não produtoras de metalo- $\beta$ -lactamase e de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado.

- Avaliar os efeitos das diferentes concentrações do veneno bruto de *B. moojeni* sobre bactérias gram-negativas produtoras e não produtoras de metalo- $\beta$ -lactamases e de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Extração de Venenos

Os venenos utilizados para a identificação da atividade antibacteriana foram das serpentes *B. moojeni*, mantidas no serpentário do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas (CEPB), da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Esses venenos foram extraídos por massagem manual da glândula, logo após, foram clarificados por centrifugação a 10.000 rpm durante 15 min, a 4°C, e em seguida, esterilizados por filtração e mantidos sob ultracongelamento a -80°C.

### 5.2. Microrganismos

Os microrganismos utilizados neste estudo foram obtidos da “*American Type Culture Collection*” (ATCC) e do Banco de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia Clínica e Ambiental do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Foram testados os seguintes microrganismos: *A. baumannii* (cepa produtora de metalo- $\beta$ -lactamase portando o gene *bla*<sub>IMP1</sub>); *P. aeruginosa* (ATCC 27853, cepas produtoras de metalo- $\beta$ -lactamase portando o gene IMP1; *P. aeruginosa* portando o gene *bla*<sub>VIM1</sub>; *P. aeruginosa* portando gene *bla*<sub>VIM2</sub>); *E. coli* (ATCC 25922) não produtora de EBLS e (ATCC 35218) produtora de ESBL e *K. pneumoniae* (ATCC 700603) produtora de ESBL.

### 5.3. Ensaio antibacteriano com veneno bruto – disco de difusão

Os microrganismos foram cultivados em ágar MacConckey (Oxoid<sup>®</sup>, Inglaterra). Foram incubados a 37°C, por 24 horas em aerobiose.

Com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril, foram colhidas colônias bacterianas puras da placa de cultura fresca e suspensas em 5 mL de solução salina a 0,9%, homogeneizadas em agitador de tubos (vortex). A turbidez foi ajustada a 0,5 da escala de MacFarland que corresponde a uma suspensão contendo aproximadamente  $2 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Após a homogeneização do inóculo, um swab alginatado estéril foi embebido na solução bacteriana e em seguida comprimido contra a parede do tubo para a remoção do excesso do líquido. Com auxílio do swab, foi feita a inoculação em forma de estrias em três direções na superfície do ágar Mueller-Hinton (Oxoid<sup>®</sup>, Inglaterra) contido na placa de petri (140 x 15 mm). As placas de petri foram deixadas à temperatura ambiente por aproximadamente cinco minutos em câmara de fluxo laminar para permitir que o excesso de umidade na superfície do ágar fosse absorvido. Em seguida, fez-se aplicação dos discos contendo os antimicrobianos e dos discos brancos. Os discos foram retirados do freezer uma hora antes de sua aplicação e deixados à temperatura ambiente. A aplicação foi feita com auxílio de uma pinça estéril e os discos pressionados suavemente contra a superfície do ágar.

Antes da aplicação do veneno bruto e suas diluições, as aliquotas foram esterilizadas por filtração, usando filtro 0,22 µm (Millipore NY, USA) acoplado em seringa de 1 mL. Em seguida aplicou-se sobre os discos em branco, o veneno bruto diluído em diferentes concentrações de proteína (3,32 µg/mL, 6,64 µg/mL, 13,28 µg/mL, 26,56 µg/mL, 53,12 µg/mL, 106,24 µg/mL). Como controle negativo,

foi usado disco contendo solução salina 0,9% e como controle positivo disco de Imipenem a 10 µg (Oxoid®) para bactérias não fermentadoras de glicose e para bactérias fermentadoras de glicose disco de Polimixina B. Após aplicação do veneno sobre os discos, as placas foram incubadas a 37°C, por 18 a 24 horas (CLSI 2008). Foi considerado eluente com atividade antibacteriana aquele que apresentasse qualquer halo de inibição do crescimento bacteriano em torno do disco de difusão. As zonas de inibição foram registradas em mm de diâmetro. Todos os ensaios foram desenvolvidos em duplicata e foi considerada a média dos diâmetros dos respectivos halos de inibição.

#### **5.4. Determinação de proteínas**

A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando-se albumina sérica bovina como padrão (BSA, SIGMA, St, Louis, MO, USA). A determinação do teor protéico foi feita com base em uma curva de calibração. A reação foi conduzida pela adição de 100 µL de amostra e 1mL do reagente de Bradford e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 595 nm.

#### **5.5. Análise Estatística**

Os dados foram analisados utilizando o teste *t*-Student com a finalidade de identificar se as variações no tamanho dos halos de inibição foi significativa, considerando as diferentes concentrações do veneno. Os resultados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$  significante;  $P < 0,01$  muito significante e  $P < 0,001$  extremamente significante.

## 6. RESULTADOS

O estudo utilizando o veneno bruto da Serpente *B. moojeni* diluído em diferentes concentrações demonstrou que o veneno desta serpente possui atividade contra bactérias gram-negativas fermentadoras e não fermentadoras de glicose. O halo de inibição foi decrescente na medida em que a concentração do veneno diminuía e que a diferença entre o tamanho dos halos de inibição entre as diferentes concentrações foram estatisticamente significativas (Tabelas 1 e 2).

Para *A. baumannii*, a maior atividade do veneno bruto ocorreu na concentração de 212,48 µg/mL de proteínas, formando um halo de inibição de 14,0 mm enquanto o menor halo de inibição 10 mm ocorreu na concentração de 3,32 µg/mL. Esta diferença foi muito significativa ( $p < 0,01$ ) (Tabela 1 e Figura 8). Por outro lado para a *P. aeruginosa* ATCC 27853, o maior halo de inibição foi 13 mm para a concentração de proteínas de 212,48 µg/mL e o menor halo foi 10,0 mm na concentração de 3,32 µg/mL. Essa diferença foi muito significativa ( $p < 0,01$ ) (Tabela 1 e Figura 8). Com relação à *P. aeruginosa* produtora da metalo enzima subtipo IMP1, o resultado da atividade do veneno bruto foi o mesmo encontrado para o *A. baumannii* e a diferença dos halos de inibição do crescimento foi muito significativa ( $p < 0,01$ ) (Tabela 1 e Figura 8). Para as *P. aeruginosas* produtoras de metalo-β-lactamase subtipos VIM1 e VIM2, o maior halo de inibição foi de 11,0 mm e de 13,0 mm respectivamente para a concentração de 212,48 µg/mL. Entretanto o diâmetro dos menores halos de inibição entre as duas cepas foram diferentes. Para a cepa produtora de VIM1 foi de 8,0 mm na concentração de proteínas foi de 3,32 µg/mL e para a VIM2 foi de 9,0 mm na concentração de proteínas de 6,64 µg/mL. Para ambas as cepas a diferença entre os tamanhos do

maior e menor halo de inibição foi extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1 e Figura 8). Na concentração de 3,32  $\mu\text{g/mL}$  do veneno bruto, não foi identificada qualquer atividade na inibição do crescimento bacteriano para *P. aeruginosa* VIM2.

Para *P. aeruginosa* produtoras de metalo- $\beta$ -lactamase subtipo SPM, o maior halo de inibição foi 15,0 mm na concentração de proteínas (212,48  $\mu\text{g/mL}$ ) e o menor halo de inibição foi de 10,0 mm na concentração de proteínas (3,32  $\mu\text{g/mL}$ ) esta diferença foi muito significativa ( $p < 0,01$ ) (Tabela 1 e Figura 8). A atividade antibacteriana do veneno bruto da serpente *B. moojeni*, diluído em diferentes concentrações, nos microrganismos fermentadores de glicose só não apresentou atividade na concentração de 3,32  $\mu\text{g/mL}$ , para *P. aeruginosa* produtora de VIM 2 (Tabela 1, Figura 8).

Dentre os microrganismos fermentadores de glicose, as diluições do veneno bruto tiveram maior atividade sobre a *K. pneumoniae* (ATCC 70603) produtora de ESBL do que em *E. coli* (ATCC 35218) também produtoras de ESBL. A atividade do veneno bruto na inibição do crescimento de *K. pneumoniae* gerou um halo de inibição de 28,0 mm na concentração de proteínas de 212,48  $\mu\text{g/mL}$  e o menor halo de inibição de 9,0 mm na concentração de proteínas de 3,32  $\mu\text{g/mL}$ . A diferença no diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano identificado entre a maior e a menor concentração de proteínas foi significativa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2). Em relação a *E. coli* ATCC 36218 produtora de ESBL, a atividade do veneno bruto sobre este patógeno resultou em um halo de inibição do crescimento de 25,0 mm na concentração de proteínas de 212,48  $\mu\text{g/mL}$  e para a menor concentração do veneno bruto (3,32  $\mu\text{g/mL}$ ) o halo de

inibição foi de 8,0 mm. A diferença entre o tamanho do maior halo de inibição e o menor foi muito significativa ( $p < 0,01$ ) (Tabela 2). Quanto a *E. coli* ATCC 25922, não produtora de ESBL o halo de inibição formado foi 28,0 mm resultante da adição do veneno bruto, ou seja na maior concentração de proteínas presentes no veneno (212,48  $\mu\text{g/mL}$ ) e o menor halo de inibição do crescimento bacteriano foi de 7,0 mm na concentração de proteínas de 3,32  $\mu\text{g/mL}$ . A diferença no tamanho dos halos de inibição do crescimento bacteriano entre a maior e menor concentração foi de extrema significância ( $P < 0,001$ ) (Tabela 2 e Figura 9).

### 6.1. Análise dos efeitos antimicrobianos de diferentes concentrações do veneno da Serpente *B. moojeni* para bactérias não fermentadoras de glicose.

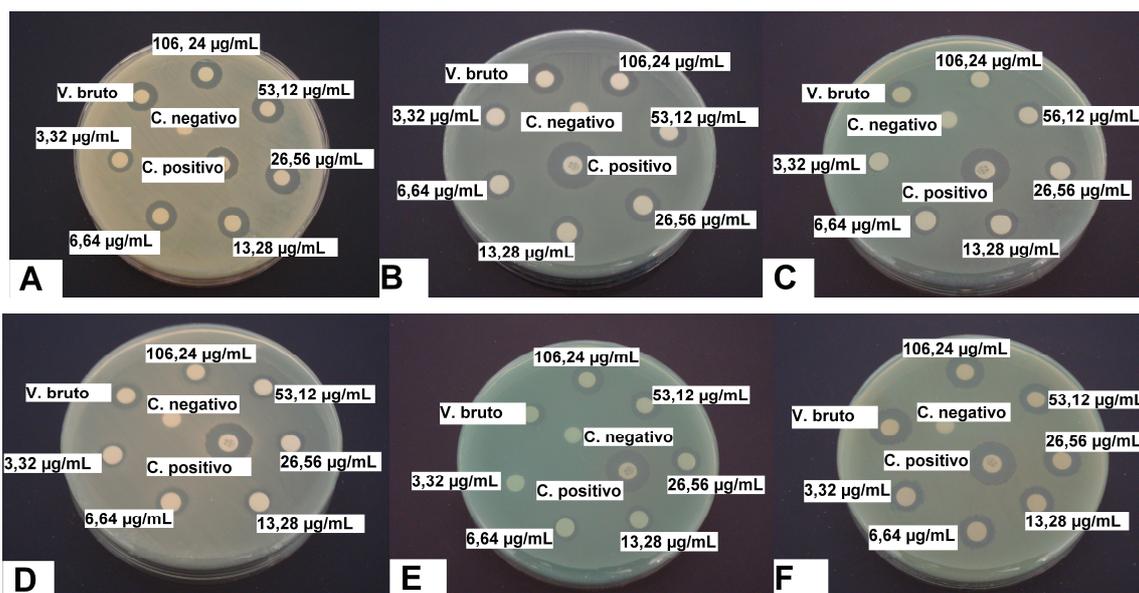


Figura 08. Efeitos antimicrobianos com diferentes concentrações do veneno da Serpente *B. moojeni* contra bactérias não fermentadoras de glicose. A – *Acinetobacter baumannii*; B – *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; C – *P. aeruginosa* IMP1; D – *Pseudomonas aeruginosa* VIM 1; E - *P. aeruginosa* VIM 2; F- *Pseudomonas aeruginosa* SPM; VB-veneno bruto, CN-controle negativo- solução salina 0,9% e CP-controle positivo – Polimixina B 10  $\mu\text{g}$ .

## 6.2. Análise dos efeitos antimicrobianos de diferentes concentrações do veneno da Serpente *B. moojeni* para bactérias fermentadoras de glicose.

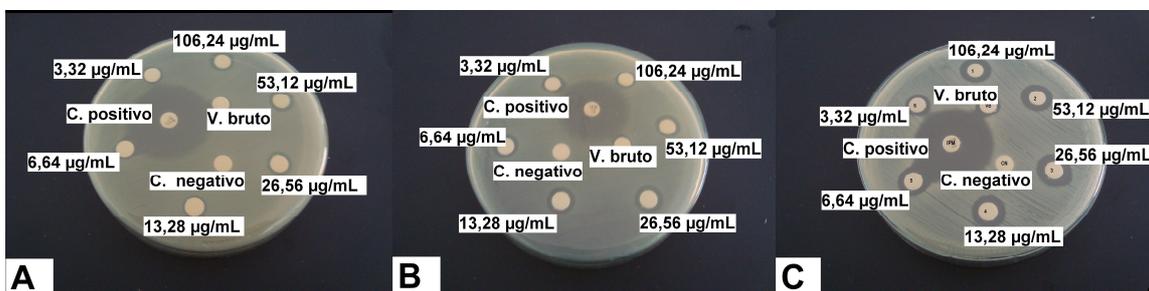


Figura 09. Efeitos antimicrobianos com diferentes concentrações do veneno da Serpente *B. moojeni* contra bactérias fermentadoras de glicose. A – *Escherichia coli* ATCC 25922; B – *Escherichia coli* ATCC 36218; C – *Klebsiella pneumoniae*; VB-veneno bruto, CN- controle negativo – solução salina 0,9% e CP-controle positivo - Imipenem 10 µg.

**Tabela 1.** Atividade antibacteriana do veneno bruto diluído da Serpente *Bothrops moojeni* em diferentes concentrações contra microrganismos fermentadores de glicose.

Diluição do veneno bruto (µg/mL)	Concentração protéica do veneno bruto (µg/mL)	Microrganismos					
		Alos de inibição (mm)					
		<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<i>P. aeruginosa</i> IMP1	<i>P. aeruginosa</i> VIM1	<i>P. aeruginosa</i> VIM2	<i>P. aeruginosa</i> SPM
Veneno Bruto	212,48	14,0**	13,0**	11,0***	11,0***	13,0***	15,0**
1.200	106,24	13,0	13,0	10,0	10,0	11,0	14,0
600	53,12	13,0	12,0	10,0	10,0	11,0	13,0
300	26,56	13,0	11,0	10,0	9,0	10,0	12,0
150	13,28	11,0	10,0	9,0	8,0	9,0	11,0
75	6,64	11,0	10,0	8,0	8,0	9,0	11,0
37,5	3,32	10,00	10,0	8,0	8,0	00	10,0
Controle Negativo	-	-	-	-	-	-	-
Controle Positivo	-	13,0	17,0	16,0	16,0	15,00	16,0

**significante\* P<0,05; muito significante\*\*P<0,01; extremamente significante\*\*\*P<0,001**

**Tabela 2.** Atividade antibacteriana do veneno bruto diluído da Serpente *Bothrops moojeni* em diferentes concentrações contra microrganismos não fermentadores de glicose.

Diluição do veneno bruto (µg/mL)	Concentração protéica do veneno bruto (µg/mL)	Microrganismos		
		Alos de inibição (mm)		
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 36218	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603
Veneno Bruto	212,48	28,0***	25,0**	28,0*
1.200	106,24	10,0	10,0	12,0
600	53,12	9,0	10,0	12,0
300	26,56	8,0	9,0	11,0
150	13,28	7,0	9,0	10,0
75	6,64	7,0	9,0	10,0
37,5	3,32	7,0	8,0	9,0
Controle Negativo	-	-	-	-
Controle Positivo	-	28,0	25,0	28,0

pouco significativo\* P<0,05; significativo\*\* P<0,01; extremamente significativo \*\*\*P<0,001

## 7. DISCUSSÃO

A diversidade da flora e fauna no Brasil e suas diferenças climáticas e geográficas estimulam novas pesquisas em busca de novos fármacos, principalmente de substâncias bioativas extraídas de plantas e animais. Estima-se que 60% das drogas antitumorais e antibacterianas que se encontram no mercado, ou estão em estudo na fase clínica, são de origem natural (Alves 2007).

A atividade biológica do veneno da *B. moojeni* deve-se, principalmente à ação das proteínas, peptídeos e enzimas presentes em sua composição (Cardoso *et al.*, 2003).

Neste estudo observou-se que o veneno bruto da serpente *B. moojeni* possui atividade contra bactérias Gram-negativas fermentadoras (*A. baumannii*, *P. aeruginosa* (ATCC27853), *P. aeruginosa* IMP1, *P. aeruginosa* VIM1, *P. aeruginosa* VIM2, *P. aeruginosa* SPM) e não fermentadoras de glicose (*E. coli* (ATCC25922), *E. coli* (ATCC35218) e *K. pneumoniae* (ATCC 700603). Outro estudo realizado com os venenos das serpentes *B. moojeni* e *B. jararacussu* demonstrou atividade por meio da inibição do crescimento do *Streptococcus mutans* (Stiles *et al.*, 1991). Esta atividade antibacteriana dos constituintes do veneno bruto da *B. moojeni* pode ser devida à atividade de outros componentes do veneno que não seja a catalase como demonstrado em outro estudo que usou o veneno de *B. moojeni* e *B. jararaca*. Com resultado foi verificado que o veneno destas duas serpentes apresentaram comportamentos diferentes vinculados à presença da catalase. Observou-se que a ausência da catalase no veneno total de *B. moojeni* inibe cerca de quatro vezes mais o crescimento de *S. mutans*, do que o veneno de *B. jararacussu* independentemente da presença ou

ausência da catalase (Mosca 2008). Outros estudos demonstraram que a atividade antibacteriana está relacionada com a ação de uma proteína funcional presente no veneno das serpentes observando uma relação dose-efeito e que os mesmo possuem atividade sobre diferentes espécies de bactérias fermentadoras e não fermentadoras (Skarnes 1970, Stiles *et al.* 1991, Yan *et al.* 2000, Lu *et al.* 2002, Stabely *et al.* 2004).

Foi demonstrada também atividade antiparasitária *in vitro* do veneno da serpente *B. moojeni* contra *Leishmania spp.* Segundo os pesquisadores a atividade de inibição de crescimento se deve à ação da enzima L-aminoácido oxidase (LAAO), presente no veneno, que está diretamente relacionada à formação de peróxido de hidrogênio (Tempone *et al.*, 2001). Certamente a inibição do crescimento dos microrganismos estudados pode também ser devido à atividade desta enzima.

De acordo com as características funcionais e estruturais, as proteínas tóxicas presentes nas peçonhas das serpentes do gênero *Bothrops* podem ser divididas em várias classes, tais como: metaloproteinases, serinoproteases, fosfolipases A2, L- aminoácido oxidases (Ramos & Selistre-de-Araújo 2006). Uma das características da L-aminoácido oxidase é sua atividade antimicrobiana, descrita pela primeira vez por Skarnes (1970) com a peçonha da *Crotalus adamanteus*. Recentemente vários estudos têm demonstrado essa ação induzida por diferentes LAAOs isoladas de peçonhas de serpentes tais como *Trimeresurus mucrosquamatus* (Ji-Fu *et al.*;2000), *B. alternatus* (Stábeli *et al.*, 2004) e *B. pirajai* (Izidoro *et al.*, 2006).

O veneno da *B. moojeni* possui maior atividade de LAAO comparada com outras serpentes do mesmo gênero (Tempone *et al.*, 2001).

As LAAOs dos venenos de serpentes são glicoprotéínas ligadas FDA, homodiméricas com massa molecular ao redor de 110 – 150 kDa quando medidas por filtração em gel, em conduções não redutoras e a massa molecular detectada ao redor de 50 a 70 kDa ocorre quando são analisadas por SDS-PAGE em condições redutoras (Samel *et al.*, 2006)

Em 2004, estudo demonstrou que o efeito antibacteriano do veneno de *B. atrox* é devido às fosfolipases que agem de forma direta sobre a membrana celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; enquanto que outro trabalho sugere que a atividade antibacteriana não está, somente, ligada a L-aminoácido oxidase, mas também a outros componentes do veneno (Stiles *et al.*, 1991; Santamaría *et al.*, 2004).

Neste estudo o perfil de suscetibilidade demonstra a diminuição do halo de inibição à medida que diminui a concentração do veneno bruto. Sendo que o veneno foi capaz de inibir o crescimento de *A. baumannii* (ATCC), *P. aeruginosa* (*bla*<sub>IMP1</sub>), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *P. aeruginosa* (*bla*<sub>VIM1</sub>), *P. aeruginosa* (*bla*<sub>VIM2</sub>), e *P. aeruginosa* SPM (Tabela 1 e Figura 8). Também demonstrou atividade para inibir o crescimento de bactérias fermentadoras de glicose como *E. coli* (ATCC 25922), *E. coli* (ATCC 35218) e *K. pneumoniae* (ATCC 700603); cepas produtoras de ESBL o que evidencia seu alto grau de resistência a diferentes classes de  $\beta$ -lactâmicos e ao monobactâmico (Tabela 2 e Figura 9).

Neste trabalho, pode-se sugerir que as proteínas presentes no veneno bruto que inibiram o crescimento dos microrganismos em estudo não foram degradadas pela ação das ESBL produzidas por estas bactérias. Isto indica a possibilidade de ser usado o(s) componente(s) do veneno como potenciais drogas para tratar pacientes com infecções causadas por estes microrganismos

que podem possuir diferentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos em uso na prática clínica.

As L-aminoácido oxidases formam uma família de proteínas com várias atividades biológicas, sendo que os resultados obtidos até o presente momento indicam que o peróxido de hidrogênio liberado pela reação química catalisada pela LAAOs é o metabólico responsável por muitos desses efeitos. Investigações estruturais e funcionais dessas enzimas poderiam contribuir para os avanços na área de toxinologia ou como estratégias na elaboração de novos fármacos nas áreas de biotecnológica.

A LAAO apresenta peculiaridade para cada veneno de serpente, por exemplo, esta enzima purificada do veneno da *C. adamanteus* apresenta inativação reversível, quando congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Curti *et al.*, 1968; Coles *et al.*, 1977) e quando reaquecida novamente a  $37^{\circ}\text{C}$  em pH 5 ela é renaturada e volta a ter atividade (Coles *et al.*, 1977).

Uma L-aminoácido oxidase do veneno de *Agkistrodon halus* foi isolada e testada contra *E. coli* e *S. aureus*, sendo observada inibição bacteriana para ambos os microrganismos (Yan *et al.*, 2000). Já em outro estudo foi isolada uma L-aminoácido oxidase do veneno de *B. alternatus* para testes antibacterianos e houve atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, comprovando que a L-aminoácido oxidase pode estar diretamente relacionada com os efeitos antibacterianos (Stabely *et al.*, 2004). Samel *et al.*, (2006) comprovaram o efeito antibacteriano da enzima L-aminoácido oxidase isolada do veneno de *Naja naja oxiana* contra *E. coli*.

Proteínas do gênero *Bothrops* afetam a hemostasia de diferentes formas, promovendo a hemorragia, hemólise e outros efeitos sobre a circulação do

sistema nervoso (Matsui *et al.*, 2000). Os componentes de venenos mais comuns são metaloproteinases, serinoproteinases, fosfolipases A<sub>2</sub> e miotoxinas. Por outro lado, L-aminoácido oxidases são igualmente expressas em venenos de serpentes e catalisam a deaminação oxidativas de L-aminoácidos, produzindo  $\alpha$ -cetoácido, peróxido de hidrogênio e amônia.

Com base nos estudos obtidos até aqui, podemos considerar as LAAOs dos venenos de serpentes, em particular a LAAO obtida da *B. moojeni*, importantes ferramentas para obtenção de novos agentes terapêuticos, considerando o seu potencial biotecnológico.

Ao final percebemos a necessidade de outros ensaios cromatográficos para a purificação e sequenciamento desta possível molécula com potencial antibacteriano.

## 8. CONCLUSÃO

1. Diferentes concentrações do veneno bruto da serpente *B. moojeni* inibiu o crescimento de bactérias gram-negativas produtoras e não produtoras de metalo- $\beta$ -lactamases e  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado.

2. O tamanho do halo de inibição do crescimento bacteriano diminuiu na medida em que diminuiu a concentração do veneno bruto e conseqüentemente a quantidade de proteínas, demonstrando que o efeito do veneno bruto foi dose dependente.

## 9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abreu, V. A., Dal Belo, C. A., Hernandez-Oliveira, S. S., Borja-Oliveira, C. R., Hyslop, S., Furtado Mde, F., & Rodrigues-Simioni, L. (2007). Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*). *Comparative Biochemistry Physiology A*. 148(1): 142-149.
- Ali, S. A., Stoeva, S., Abbasi, A., Alam, J. M., Kayed, R., Faigle, M., Neumeister, B., & Voelter, W. (2000). Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 384(2): 216-226.
- Aloof-Hirsch, S., A. Vries & A. Berger. (1968). The direct lytic factor of cobra venom: Purification and chemical characterization. *Biochimica Biophysica Acta*, 154 (1): 53-60.
- Alves, R.M. (2007). Isolamento e caracterização bioquímica e funcional da L-aminoácido oxidase do veneno da *Bothrops atrox*. Ribeirão Preto. Dissertação de Mestrado. 110p.
- Andriao-Escarso, S. H., Soares, A. M., Fontes, M. R., Fuly, A. L., Correa, F. M., Rosa, J. C., Greene, L. J., & Giglio, J. R. (2002). Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A(2) from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochemistry and Pharmacology*. 64(4): 723-732.
- Angulo, Y., & Lomonte, B. (2009). Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*. 54(7): 949-957.

- Araújo, F. A. A; SantaLúcia, M.; Cabral, R.F. (2003). Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J.L.C. *et al.* Animais peçonhentos do Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier. 33-61.
- Arni, R. K. & Ward, R. J. (1996). Phospholipase A2- A structural review. *Toxicon*. 34: 827-841.
- Assakura, M. T., Reichl, A. P., Asperti, M. C. A., & Mandelbaum, F. R. (1985). Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). *Toxicon*. 23(4): 691-706.
- Barbosa, P. S., A. M. Martins, A. Havt, D. O. Toyama, J. S. Evangelista, D. P. Ferreira, P. P. Joazeiro, L. O. Beriam, M. H. Toyama, M. C. Fonteles & H. S. Monteiro. (2005). Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. *Toxicon*, 46 (4): 376-386.
- Bergogne-Berezin, E. & Towner, K. J. (1996). *Acinetobacter* spp.as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 9, 148–165.
- Bernardes, C. P., Santos-Filho, N. A., Costa, T. R., Gomes, M. S., Torres, F. S., Costa, J., Borges, M. H., Richardson, M., dos Santos, D. M., de Castro Pimenta, A. M., Homsí-Brandeburgo, M. I., Soares, A. M., & de Oliveira, F. (2008). Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*. 51(4): 574-584.
- Bérnils, R. S. (2010). Brazilian reptiles – List of species. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acessado em 24/06/2010.

- Bertoncheli, Claudia de Mello; Horner, Rosmari. (2008). Uma revisão sobre metalo- $\beta$ -lactamases. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v. 44, n. 4, Available from [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-93322008000400005&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322008000400005&lng=en&nrm=iso). access on 05 July 2010. doi: 10.1590/S1516-93322008000400005.
- Bochner, R., & Struchiner, C. J. (2003). Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. *Cadernos de Saúde Pública*. 19(1): 7-16.
- Bolaños, R. (1984). *Serpientes, Venenos y Ofidismo en Centro América*. San José: Universitária de Costa Rica.
- Bouvet, P. J. M., and P. A. D. Grimont. (1986). Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:228-240.
- Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance treat. *Clinical Microbiology Reviews*. 14: 933-951.
- Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgam quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Braga, M. D., Martins, A. M., Amora, D. N., de Menezes, D. B., Toyama, M. H., Toyama, D. O., Marangoni, S., Alves, C. D., Barbosa, P. S., de Sousa Alves, R., Fonteles, M. C., & Monteiro, H. S. (2008). Purification and biological effects of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon*. 51(2): 199-207.

- Braga, M. D., Martins, A. M., de Menezes, D. B., Barbosa, P. S., Evangelista, J. S., Toyama, M. H., Toyama, D. O., Fonteles, M. C., & Monteiro, H. S. (2007). Purification and biological activity of the thrombin-like substance isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon*. 49(3): 329-338.
- Brito, D. V. D. Oliveira, E. J. Darini. A. L. C. Abdallah, V.O.S, Gontijo-Filho. P. P. (2010). Nosocomial outbreaks due to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Neonatal Intensive Care Unit (NICU) of the Uberlândia Federal University Hospital. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, 2010 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822003000500009&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822003000500009&lng=en&nrm=iso)>. access on 08 July 2010. doi: 10.1590/S1517-83822003000500009.
- Bucarechi, F., Hyslop, S., Mello, S. M., & Vieira, R. J. (2007). Bothrops snakebite on the head: case report and review of the literature. *Ann Trop Med Parasitol*. 101(8): 733-743.
- Bush K & Sikes RB. (1983).  $\beta$ -lactamases inhibitors in perspective. *J Antimicrob Chemother*; 11:97-107.
- Butzke, D., Hurwitz, R., Thiede, B., Goedert, S., & Rudel, T. (2005). Cloning and biochemical characterization of APIT, a new l-amino acid oxidase from *Aplysia punctata*. *Toxicon*. 46(5): 479-489.
- Calgarotto, A. K., Damico, D. C., Ponce-Soto, L. A., Baldasso, P. A., Da Silva, S. L., Souza, G. H., Eberlin, M. N., & Marangoni, S. (2008). Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A(2) BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*. 51(8): 1509-1519.

- Calvete, J. J., Marcinkiewicz, C., & Sanz, L. (2007). Snake venomics of *Bitis gabonica gabonica*. Protein family composition, subunit organization of venom toxins, and characterization of dimeric disintegrins bitisgabonin-1 and bitisgabonin-2. *Journal of Proteome Research*. 6(1): 326-336.
- Campbell, J. A. & Lamar, W. W. (2004). *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Comstock Publishing Associates, Ithaca and London. 1032pp.
- Cardoso.C.; França, F.O.S.; Fan,H.W.; Málaque, C.S.; Haddad Jr, V. (2003) In: Sarvier. *Introdução ao Ofidismo. Animais Peçonhentos no Brasil - Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. São Paulo. Ed. Sarvier.
- Carmeli, Y.; Troillet, N.; Karchmer, A.; Samore, M. H. (1999). Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives Internal Medical*. 159: 1127-1132.
- Carmo Filho, J. R. (2003). *Correlação epidemiológica, microbiológica e clínica das infecções hospitalares em Unidades de Terapia Intensiva causadas por Klebsiella pneumoniae*. Tese Doutorado, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.
- Carneiro, A. S., Ribeiro, O. G., De Franco, M., Cabrera, W. H., Vorraro, F., Siqueira, M., Ibanez, O. M., & Starobinas, N. (2002). Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon*. 40(11): 1571-1579.
- Carneiro M, Saridakis H.O. (2008). Pneumonia associada à ventilação mecânica. *Revista Panamericana Infectologia*.10(2):28-33
- Cavinato, R. A.; Barros, S. F.; Sucupira, M. & Kipbus, T. C. (1994). Caracterização do fator trombina-símile e hemorrágico de *Bothrops atrox*. *Livro de Resumos da IX Reunião da FESBE*: 245.

- Chippaux, J. P., Williams, V., & White, J. (1991). Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*. 29(11): 1279-1303.
- Chu, Y. W.; Afzal-Shah, M.; Houang, E. T.; Palepou, M. I.; Lyon, D. J.; Woodford, N. & Livermore, D. M. (2001). IMP-4, a novel metallo-  $\beta$ -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. Collected in hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 45: 710-714.
- Cisneros, J. M.; Banõ, J. R. (2002). Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin. Microbiol. Infect*, v. 8, n.11, p. 687-693.
- Coles, C.J.; Edmondson, D,E; Singer, T.P. (1997). Reversible in activation of L-amino acid oxidase. Properties of the three confomational forms. *J. Biol. Chem*. V. 252, p. 8035-8039.
- Costa, E. P., Clissa, P. B., Teixeira, C. F., & Moura-da-Silva, A. M. (2002). Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation. *Inflammation*. 26(1): 13-17.
- Costa Torres, A. F., Dantas, R. T., Toyama, M. H., Diz Filho, E., Zara, F. J., Rodrigues de Queiroz, M. G., Pinto Nogueira, N. A., Rosa de Oliveira, M., Toyama, D. O., Monteiro, H. S., & Martins, A. M. (2010). Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A<sub>2</sub> and L-amino acid oxidase. *Toxicon*. 55(4): 795-804.
- Cotte, C. A.; Essenfled-yahr, E. & Lairet, C. (1972). Effects of Crotalus and Bothrops venom on normal and malignant cells cultivated "in vitro". *Toxicon*, 10: 157-161.

- Cunha Junior, G. S.. Prevalência da contaminação bacteriana em concentrados de plaquetas do serviço de hemoterapia de um hospital universitário em Goiânia-GO. *Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia*, São José do Rio Preto, v. 29, n. 4, Dec. 2007 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-84842007000400022&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000400022&lng=en&nrm=iso)>. access on 02 July 2010. doi: 10.1590/S1516-84842007000400022.
- Curti, B; Ronchi, S; Simonetta, P.M. (1992). D- and L-amino acid oxidases. In: mueller, F. *Chemistry and biochemistry of Flavoenzyme*, v.3, CRC Press, Boca Roton, pg 69-94.
- Cury, Y., & Picolo, G. (2006). Animal toxins as analgesics--an overview. *Drug News Perspect.* 19(7): 381-392.
- Daltry, J. C., Wuster, W., & Thorpe, R. S. (1996). Diet and snake venom evolution. *Nature.* 379(6565): 537-540.
- Del Mar TM, Cartelle M, Pertega S, et al. (2005). Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and riskfactors for colonisation and infection. *Clin Microbiol Infect*;11:540-6.
- Du, X. Y., & Clemetson, K. J. (2002). Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon.* 40(6): 659-665.
- Dufton, M. J., Eaker, D., & Hider, R. C. (1983). Conformational properties of phospholipases A<sub>2</sub>. *European Journal of Biochemistry.* 137(3): 537-544.
- Enoch, D.A.; Birkett, C.I.; Ludlam, H.A. Non-fermentative Gram-negative bactéria. *Int J Antimicrob Agents*, v.29 (supl 3), p. S33-41, 2007.

- Faladagas, M. E; Kopterides, P. (2006). Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. *J. Hosp. Infect* 2006; 64: 7-15.
- Faust, A., Niefind, K., Hummel, W., & Schomburg, D. (2007). The structure of a bacterial L-amino acid oxidase from *Rhodococcus opacus* gives new evidence for the hydride mechanism for dehydrogenation. *Journal of Molecular Biology*. 367(1): 234-248.
- Fernandes, C. M., Zamuner, S. R., Zuliani, J. P., Rucavado, A., Gutierrez, J. M., & Teixeira Cde, F. (2006). Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: leukocyte recruitment and release of cytokines. *Toxicon*. 47(5): 549-559.
- Ferreira, L. A., Galle, A., Raida, M., Schrader, M., Lebrun, I., & Habermehl, G. (1998). Isolation: analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BPP-II, BPP-III, and BPP-V) from *Bothrops neuwiedi* venom. *Journal of Protein Chemistry*. 17(3): 285-289.
- Ferreira, S. H. (1965). A Bradykinin-Potentiating Factor (Bpf) Present in the Venom of *Bothrops jararaca*. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*. 24: 163-169.
- Ferreira, S. H.; Bartelt, D. C. & Greene, L. J. (1970). Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*. 9 (13):2583-93.
- Furtado, M. F., M. Maruyama, A. S. Kamiguti & L. C. Antonio. (1991). Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon*, 29 (2): 219-226.

Gabe, C; Almeida, D R.; Siqueira, L O.. Avaliação de eventos infecciosos oportunistas em crianças portadoras de leucemias. *Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia*. (2009) São Paulo, v. 31, n. 2. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-84842009000200007&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000200007&lng=en&nrm=iso)>. access on 04 July 2010. Epub Apr 10, 2009. doi: 10.1590/S1516-84842009005000017.

Gales, A. C.; Reis, A. O. & Jones, R. N. (2001). Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *Journal Clinical Microbiology*. 39: 183-190.

Gales, A. C.; Tognim, M. C.; Reis, A. O.; Jones, R. N. & Sader, H. S. (2003a). Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in a *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*. 45: 77-79.

Gales, A. C., Menezes, L. C.; Silbert, S. & Sader, H. S. (2003b). Dissemination in distinct Brazilian regions of epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 669-702.

Gartner, T. K., SToker, K. & Williams D. C. (1980) Thrombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox*. *Febsletter*. 117(1):13-6.

Giakkoupi, P.; Xanthaki, A.; Kanelopoulou, M.; Vlahaki, A.; Miriagon, V.; Kontou, S.; Papafraggas, E.; Malamou-Lada, H.; Tzouvelekis, L. S.; legakis, N. J. & Vatopoulos, A. C. (2003). Vim-1 metallo-  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *Journal Clinical Microbiology*. 41: 3893-3896.

- Gibb, A. P.; Tribunddharat, C.; Moore, R. A.; Louie, T. J.; Krulicki, W.; Livermore, D. M.; Palepou, M. F. & Woodford, N. (2002). Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new blaIMP allele, blaIMP-7. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 46: 255-258.
- Gillard, G. L. (1980). Medical Microbiology. In: L. D. Sabath. (Org.) *Pseudomonas aeruginosa: The organism, diseases it causes, and their treatment*. Vienna, Hans Huber Publishers. 25-30p.
- Giron, M. E., Salazar, A. M., Aguilar, I., Perez, J. C., Sanchez, E. E., Arocha-Pinango, C. L., Rodriguez-Acosta, A., & Guerrero, B. (2008). Hemorrhagic, coagulant and fibrinolytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. *Comparative Biochemistry and Physiology C*. 147(1): 113-121.
- Glaser, H. R. S. (1948). Bactericidal activity of *Crotalus* venom "in vitro". *American Society of Ichthyologists and Herpetologists*, (4) : 245-247.
- Gomes, V. M., Carvalho, A. O., Da Cunha, M., Keller, M. N., Bloch, C., Jr., Deolindo, P., & Alves, E. W. (2005). Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*. 45(7): 817-827.
- Guillaume, C., Deregnaucourt, C., Clavey, V., & Schrevel, J. (2004). Anti-Plasmodium properties of group IA, IB, IIA and III secreted phospholipases A<sub>2</sub> are serum-dependent. *Toxicon*. 43(3): 311-318.
- Gutierrez, J. M., Escalante, T., & Rucavado, A. (2009). Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*. 54(7): 976-987.

- Gutiérrez, J. M., Ownby, C. L. & Odell, G. V. (1984). Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Experimental and Molecular Pathology*. 40(3): 367-79.
- Gutiérrez, J.M. & Lomonte. B. (1989). Local tissue damage induced by *Bothrops* snakes venoms. A review. *Memorial Instituto Butantan*, 51 : 211-223.
- Gutiérrez, J. M. & Lomonte, B. (1995). Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venom. *Memórias Instituto Butantan*. 33: 1405-1474.
- Harris, J. B. (1991). Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. *In*: H. A. L. (Ed.), *Snake Toxins* (pp. 91-129). Pergamon Press, New York. 476p.
- Hofmann, H. & Bon, C. (1987). Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. *Biochemistry*. 26: 772-780.
- Hogue-Angeletti, R. A.; Wu, H. L. & Schlaepfer, W. W. (1982). Preparative separation and amino acid composition of neurofilament triplet proteins. *Journal of Neurochemistry*. 38: 116-120.
- Hugh, R. & Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *Journal Bacteriology*. 66: 24.
- Iglesias, C. V., Aparicio, R., Rodrigues-Simioni, L., Camargo, E. A., Antunes, E., Marangoni, S., de Oliveira Toyama, D., Beriam, L. O., Monteiro, H. S., & Toyama, M. H. (2005). Effects of morin on snake venom phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). *Toxicon*. 46(7): 751-758.

- Izidoro, L. F., Ribeiro, M. C., Souza, G. R., Sant'Ana, C. D., Hamaguchi, A., Homsí-Brandeburgo, M. I., Goulart, L. R., Beleboni, R. O., Nomizo, A., Sampaio, S. V., Soares, A. M., & Rodrigues, V. M. (2006). Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. *Bioorganic and Medicine Chemistry*. 14(20): 7034-7043.
- Jawad, A., Seifert, H., Snelling, A. M., Heritage, J. & Hawkey, P. M. (1998). Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol* 36, 1938–1941
- Ji-Fu, W; Qin, W; Qiu-Min, L; Hong, T; Yang, J; Wan-Yu, W; Yu-Liang, X. (2000). *Acta Biochim. Biophys. Sinica*, 35 (3), 219-224.
- Jones, R. (2000). Incidência global, tipos e triagem de  $\beta$ -lactamases com espectro ampliado. Resumos do 1º Simpósio ESBL: incidência, importância e soluções. Buenos Aires, Argentina.
- Kaiser, I.; Gutierrez, J.; Plummer, D.; Aird, S. & Odeli, G. (1990). The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Archives Biochemistry and Biophysics*. 278: 319-325.
- Kamiguti, A. S. (2005). Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon*. 45(8): 1041-1049.
- Kamiguti, A. S.; Hay, C. R. M.; Theaskton, R. D. G. & Zuzel, M. (1996). Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom of *Bothrops asper*. *Archives Biochemistry and Biophysics*. 278: 319-325.
- Kamiguti, A. S., Matsunaga, S., Spir, M., Sano-Martins, I. S., & Nahas, L. (1986). Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 19(2): 199-204.

- Kirby, E. P. Niewiarowski, S.; Stocker, K.; Kettner, C.; Shaw, E. & Brudzynski, T. M. (1979). Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. *Biochemistry*. 18: 3564-3570.
- Koh, D. C., Armugam, A., & Jeyaseelan, K. (2006). Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63(24): 3030-3041
- Kommoju, P. R., Macheroux, P., & Ghisla, S. (2007). Molecular cloning, expression and purification of L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. *Protein Expression and Purification*. 52(1): 89-95.
- Koneman, E. W. (2001). *Enterobacteriaceae*. In: E. W. Koneman; S. D. Allen; W. M. Janda; P. C. Schreckenberger; W. C. Winn (Org.) *Textbook and Atlas Colorado*. 5<sup>a</sup> ed. 177-250p.
- Kostiza, T; Meier, J. (1996). Nerve Growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance. *Toxicology*, v. 34, p. 787-806.
- Knox JR. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type  $\beta$ -lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. (1995). *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 39:2593-601.
- Lauretti, L.; Riccio, M. L.; Mazzariol, A.; Cornaglia, G.; Amicosante, G.; Fontana, R. & Rossolini, G. M. (1999). Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-  $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 43: 1584-1590.

- Leiser JJ; Tognim M.C.B, Bedendo J. (2007). Infecções hospitalares em um centro de terapia intensiva de uma hospital de ensino no Norte do Paraná. *Cienc Cuid Saúde*. Abr/Jun;6(2): 181-186.
- Leite, R. S., Franco, W., & Selistre-de-Araujo, H. S. (2007). Effects of the myotoxic Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom on water transport in the toad bladder epithelium: evidence for a role of microtubules and calmodulin. *Toxicology In Vitro*. 21(4): 651-655.
- Livermore, D. M. (1995).  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Rev*. 8: 557–584.
- Livermore, D. M., Woodford, N. (2010). AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 0: dkq218v2-dkq218
- Lomonte, B.; Gutiérrez, J. M.; Furtado, M. F. D.; Otero, R.; Rosso, J. P.; Vargas, O.; Carmona E. & Rovira, M. E. (1990). Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon*. 28(10):1137-1146.
- Lopez-Johnston, J. C., de Bosch, N., Scannone, H., & Rodriguez-Acosta, A. (2007). Inhibition of collagen, and thrombin-induced platelet aggregation by Lansberg's hognose pit viper (*Porthidium lansbergii hutmanni*) venom. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 24(3): 275-282.
- López-Lozano, J. L.; Souza, M. V.; Ricart, C. A. O.; Chávez-Olortegui, C.; Sanchez, E. F.; Muniz, E. G.; Buhrnheim, P. F. & Morhy, L. (2002). Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. *Toxicon*. 40: 997-1006.

- Lu, Q. M., Q. Wei, Y. Jin, J. F. Wei, W. Y. Wang & Y. L. Xiong. (2002). L-amino acid oxidase from *Trimeresurus jerdonii* snake venom: Purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects. *Journal of Natural Toxins*, 11 (4) : 345-352.
- Magaldi, S., Giron, M. E., Aguilar, I., & Rodriguez-Acosta, A. (2002). Antifungal activity of *Crotalus durissus cumanensis* venom. *Mycoses*. 45(1-2): 19-21.
- Mancuso, L. C.; Correa, M. M.; Vieira, C. A.; Cunha, O. A. B.; Lachat, J. J.; Selistre de Araujo, H. S.; Ownby, C. L. & Giglio, J. R. (1995). "Fractionation of Bothrops pirajai snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein." *Toxicon* 33(5): 615-26.
- Maraganore, J. M., Merutka, G., Cho, W., Welches, W., Kezdy, F. J., & Heinrikson, R. L. (1984). A new class of phospholipases A<sub>2</sub> with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. *Journal of Biological Chemistry*. 259(22): 13839.
- Markland, F. S., Jr. (1997). Snake venoms. *Drugs*. 54 Suppl 3: 1-10.
- Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwartz D, et al. (2007). Surveillance cultures and duration of carriage of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 45:1551–5
- Marques, A.R. & Sazima, I. (2003). História Natural das serpentes. In: CARDOSO, J.L.C. *et al.* Animais peçonhentos do Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier. 62-71.

- Marra, A. R. (2002). *Análise dos fatores de risco relacionados à letalidade das infecções da corrente sanguínea hospitalares por Klebsiella pneumoniae*. Dissertação de Mestrado, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo
- Martinez, J.; Martinez, L.; Rosenblueth, M.; Silva J, & Martinez, R. (2004). How are genes sequence analyses modifying bacterial taxonomy. *Internal Microbiology*. 7: 261-8.
- Martins, M.; Araújo, M. S.; Sawaya, R. J.; Nunes, R. (2001). Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of Neotropical pitvipers (*Bothrops*). *Journal of Zoology*. 254, 529-538.
- Martins, S. T. (2002). *Análise de Custos da Internação de Pacientes em Unidades de Terapia Intensiva com Infecções causadas por Pseudomonas aeruginosa e Acinetobacter baumannii multirresistentes* Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Paulo.
- Marunak, S. L., Acosta de Perez, O., Ruíz de Torrent, R. M., Teibler, G. P., Koscinczuk, P., & Sánchez Negrette, M. (1999). Actividades hemorrágica, edematizante, proteolítica y myonecrótica de venenos de viboreznos de *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz). *Acta Physiologica, Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana*. 49: 149-154.
- Matsui T, Fujimura Y, Titani K. (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1477(1-2): 146–156.
- Mebis D. (2001). Toxicity in animals. Trends in evolution?. *Toxicon*. 39: 87-96.
- Meier, J. (1986). Individual and age-dependent variations in the venom of the Fer-the-lance (*Bothrops atrox*). *Toxicon*. 24: 41-46.

- Ménez, A. (1996). Les venins et toxines de serpents. *In*: M. Goyffon & J. Heurtault (Eds.), *La Fonction Venimeuse* (pp. 200-220). Dunod, Paris.
- Menin, L., Perchuc, A., Favreau, P., Perret, F., Michalet, S., Schoni, R., Wilmer, M., & Stocklin, R. (2008). High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in *Bothrops moojeni* snake venom using precursor ion mass spectrometry. *Toxicon*. 51(7): 1288-1302.
- Mosca, R. C. (2008). Inibição do crescimento da microflora oral por venenos de serpentes. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. *Dissertação de Mestrado*. São Paulo.
- Murillo, L. A., Lan, C. Y., Agabian, N. M., Larios, S., & Lomonte, B. (2007). Fungicidal activity of a phospholipase A<sub>2</sub> derived synthetic peptide variant against *Candida albicans*. *Revista Espanhola de Quimioterapia*. 20(3): 330-333.
- Munoz-Price L.S, Weinstein R.A. (2008). *Acinetobacter* infection. *The New Eng J Med*. 358:1271-1281
- Murphy, T. A.; Simm, A. M.; Toleman, M. A.; Jones, R. N. & Walsh, T. R. (2003). Biomechanical characterization of the acquired metallo-β-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 47: 582-587.
- Nair, D. G., B. G. Fry, P. Alewood, P. P. Kumar & R. M. Kini. (2007). Antimicrobial activity of omwaprin, a new member of the waprin family of snake venom proteins. *Biochemical Journal*, 402 (1) : 93-104.
- NCCLS/CLSI. 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, 23 (1): 01-57.

- Nevalainen, T. J., Graham, G. G., & Scott, K. F. (2008). Antibacterial actions of secreted phospholipases A<sub>2</sub>. Review. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1781(1-2): 1-9.
- Nogueira, C.; Sawaya, R. J.; Martins, M. (2003). Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. *Journal of Herpetology*, 37, 653-659.
- Oliveira, F., Rodrigues, V. M., Borges, M. H., Soares, A. M., Hamaguchi, A., Giglio, J. R., & Homsí-Brandeburgo, M. I. (1999). Purification and partial characterization of a new proteolytic enzyme from the venom of *Bothrops moojeni* (CAISSACA). *Biochemistry and Molecular Biology International*. 47(6): 1069-1077.
- Oliveira, R. A. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: caracterização fenotípica e tipagem molecular de amostras isoladas de pacientes com infecção adquirida no ambiente hospitalar. Dissertação de Mestrado, Universidade Católica de Goiás.
- Oliveira, A. C.; Kovner, C. T. Silva, R. S. (2010) Nosocomial Infection in an Intensive Care Unit in a Brazilian University Hospital. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, Ribeirão Preto, v. 18, n. 2. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-11692010000200014&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-11692010000200014&lng=en&nrm=iso)>. access on 08 July 2010. doi: 10.1590/S0104-11692010000200014.
- Osano, E.; Arakawa, Y.; Wacharotayankun, R.; Ohta, M.; Horii, T.; Ito, H.; Yoshimura, F. & Kato, N. (1994). Molecular characterization of a enterobacterial metallo-  $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 38: 71-78.

- Otero, R.; Tobon, G. S.; Gomez, L. F.; Osorio, R.; Valderrama, R.; Hoyos, D.; Urreta, J. E.; Molina, S. & Arboleda, J. J. (1992). Accidente ofidico em Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989-febrero de 1990). *Acta Medica Colombiana*. 17: 229-249.
- Peleg, A. Y.; Franklin, C.; Bell, J. & Spelman, D. W. (2004). Emergence of IMP-4 metallo- $\beta$ -lactamase in a clinical isolate from Australia. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 54: 699-700.
- Philippon, A.; Labia, R. & Jacoby, G. A. (1989). Extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*. 33: 1131-6.
- Pinheiro, S.R; Castro, E.A.R; Pereira, J. A. A. (2008). Análise dos Perfis de Resistência de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isolados de urinoculturas. *Prática Hospitalar*, ano X, n 60. Nov-Dez.
- Pires, E.J.V.C; Silva Júnior, V. V; Lopes, A, C, S; Veras, D. L; Leite, L. E; Maciel, M. A. V. (2009). Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. *Revista brasileira terapia intensiva*, São Paulo, v. 21, n. 4, Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-507X2009000400008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-507X2009000400008&lng=en&nrm=iso)>. access on 03 Aug. 2010. doi: 10.1590/S0103-507X2009000400008.
- Pitt, T. L. & Barth, A. L. (1997). *Pseudomonas aeruginosa* and other medically important *Pseudomonads*. In: A. M Emerson, P. M. Hawkey, S. H. Gillespie (Org.) *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. First edition. London, Scientific Books. 493-517p.
- Podschun, R. & Ullman, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology taxonomy, typing, methods and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(4): 589-603.

- Poirel, L.; Thierry, N. & Delphine, N. (2000). Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid - and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 44:891-897.
- Poirel, L.; Magalhaes, M.; Lopes, M. & Nordmann, P. (2004a). Molecular analysis of metallo-  $\beta$ -lactamase gene blaSPM-1 surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 48: 1406-1409.
- Poirel, L.; Phan, J. N.; Cabanne, L.; Gatus, B. J.; Bell, S. M. & Nordmann, P. (2004b). Carbapenem-hydrolysing metallo-  $\beta$ -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolated in Australia. *Pathology (Philadelphia)*. 36: 366-367.
- Pollack, M. (1995). *Pseudomonas aeruginosa*. In: D. Mandell, J. Benneths, R. Dolin (Org.). *Principles and practice of infections diseases*. (pp.1980–2003). New York, Churchill Livingstone.
- Pollack, M. (2000). *Pseudomonas aeruginosa*. In: G.L. Mandell, J.E. Bennett & R. Dolin (Org.) *Principles and Practice of Infectious Diseases* (pp. 2310–2335).Churchill Livingstone, Philadelphia, PA, USA.
- Radis-Baptista, G.; Moreno, F. B.; Lima Nogueira, L.; Martins, A. M.; Oliveira Toyama D.; Toyama, M. H.; Cavada, B. S.; Azevedo Jr., W. F. & Yamame, T. (2006). Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. *Cell Biochemistry Biophysics*. 44(3):412-423.
- Rajendra, W., Armugam, A., & Jeyaseelan, K. (2004). Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. *Toxicon*. 44(1): 1-17.

- Ramos OH, Selistre-de-Araujo HS. (2006). Snake venom metalloproteases – structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 142(3-4):328-346.
- Reichl, A. P., & Mandelbaum, F. R. (1993). Proteolytic specificity of moojeni protease A isolated from the venom of *Bothrops moojeni*. *Toxicon.* 31(2): 187-194.
- Rucavado, A., Soto, M., Kamiguti, A. S., Theakston, R. D., Fox, J. W., Escalante, T., & Gutierrez, J. M. (2001). Characterization of aspercetin, a platelet aggregating component from the venom of the snake *Bothrops asper* which induces thrombocytopenia and potentiates metalloproteinase-induced hemorrhage. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 85(4): 710-715.
- Rucinski, B., Niewiarowski, S., Holt, J.C., Soszka, T., Knudsen, K.A., (1990). Batroxostatin, an Arg–Gly–Asp-containing paptide from *Bothrops atrox*, is a potent inhibitor of platelet aggregation and cell interaction with fibronectin. *Biochem. Biophys. Acta* 1054 (3), 257–262
- Sader, H. S.; Jones, R. N.; Gales, A. C.; Zocoli, C.; Sampaio, J.; Mendes, R. E. & Pfaller, M. P. (2001). Perfil de Sensibilidade a Antimicrobianos Isoladas do Trato Respiratório Baixo de Pacientes com Pneumonia internados em Hospitais Brasileiros. Resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. *Jornal Brasileiro de Pneumologia.* 27: 59-67.
- Samel, M.; Vija, H.; Ronnholm, G.; Siigur, J.; Kalkkinen, N. y Siigur, E. (2006). Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1764, p.707-14.
- Samel, M., Tonismagi, K., Ronnholm, G., Vija, H., Siigur, J., Kalkkinen, N., & Siigur, E. (2008). L-Amino acid oxidase from *Naja naja oxiana* venom. *Comparative and Biochemistry and Physiology B.* 149(4): 572-580.

- Samy, R. P., Gopalakrishnakone, P., Chow, V. T., & Ho, B. (2008). Viper metalloproteinase (*Agkistrodon halys pallas*) with antimicrobial activity against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Cellular Physiology*. 216(1): 54-68.
- Santamaría, C., S. Larios, Y. Angulo, J. Pizarro-Cerda, J. Gorvel, E. Moreno & B. Lomonte. (2005). Antimicrobial activity of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from crotalid snake venoms and synthetic peptide variants derived from their C-terminal region. *Toxicon*, 45 : 807–815.
- Sano-Martins, I. S.; Santoro, M. L.; Morena, P.; Sousa e Silva, M. C. C.; Tomy, S. C. & Antonio, L. C. (1995). Hematological changes induced by *Bothrops jararaca* venom in dogs. *Brazilian Journal Medical and Biological Research*. 28: 303-312.
- Santos, D. F.; Pimenta, F. C.; Oliveira, R. A.; Montalvão, E. R.; Santos, D. B. & Carmo Filho, J. R. (2008). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in two hospitals in Goiânia/Brazil: detection, prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing. *Brazilian Journal Microbiology*. 39(4): 608-612.
- Santos-Filho, N. A., Silveira, L. B., Oliveira, C. Z., Bernardes, C. P., Menaldo, D. L., Fuly, A. L., Arantes, E. C., Sampaio, S. V., Mamede, C. C., Beletti, M. E., de Oliveira, F., & Soares, A. M. (2008). A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I<sub>2</sub> inductor phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*. 52(8): 908-917.
- Senda, K.; Arakawa, Y.; Ichiyama, S.; Nakashima, K.; Ito, H.; Ohsuka, S.; Shimokata, K.; Kato, N. & Ohta, M. (1996). PCR detection of metallo-  $\beta$ -lactamase gene (bla IMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams. *Journal Clinical Microbiology*. 34: 2909-2913.

- Scoulica, E. V.; Neonakis, I. K.; Gikas, A. I. & Tselentis, Y. J. (2004). Spread of blaVIM-1-producing *E.coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the blaVIM-1 metallo-  $\beta$ -lactamase gene. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*. 48: 167-172.
- Serrano, S. M., Mentele, R., Sampaio, C. A., & Fink, E. (1995). Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. 34(21): 7186-7193.
- Shibata, N.; Doi, Y.; Yamane, K.; Yagi, T.; Kurokawa, H.; Shihayama, K.; kato, H.; Kai, K. & Arakawa, Y. (2003). PCR typing of genetic determinants for metallo-  $\beta$ -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *Journal Clinical Microbiology*. 41: 5407-5413.
- Silva Jr., N. J., & Aird, S. D. (2001). Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology C*. 128: 425-456.
- Skarnes, R. C. (1970). L-amino-acid oxidase, a bactericidal system. *Nature*, 225 (5237) : 1072-1073.
- Soares, A. M., Andriao-Escarso, S. H., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutierrez, J. M., Marangoni, S., Toyama, M. H., Arni, R. K., & Giglio, J. R. (2000). Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 373(1): 7-15.

- Soares, A. M., Marcussi, S., Stabeli, R. G., Franca, S. C., Giglio, J. R., Ward, R. J., & Arantes, E. C. (2003). Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 302(2): 193-200.
- Souto, Renata; Andrade, Arnaldo Feitosa B. de; Uzeda, Milton and Colombo, Ana Paula Vieira. Prevalence of "non-oral" pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Braz. J. Microbiol.* [online]. 2006, vol.37, n.3, pp. 208-215. ISSN 1517-8382. doi: 10.1590/S1517-83822006000300002.
- Stabeli, R. G., S. Marcussi, G. B. Carlos, R. C. L. Pietro, H. S. Selistre-de-Araújo, J. R. Giglio, E. B. Oliveira & A. M Soares. (2004). Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12 : 2881-2886.
- Stabeli, R. G., Amui, S. F., Sant'Ana, C. D., Pires, M. G., Nomizo, A., Monteiro, M. C., Romao, P. R., Guerra-Sa, R., Vieira, C. A., Giglio, J. R., Fontes, M. R., & Soares, A. M. (2006). *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology C*. 142(3-4): 371-381.
- Stabeli, R. G., Sant'Ana, C. D., Ribeiro, P. H., Costa, T. R., Ticli, F. K., Pires, M. G., Nomizo, A., Albuquerque, S., Malta-Neto, N. R., Marins, M., Sampaio, S. V., & Soares, A. M. (2007). Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 41(2): 132-140.

- Stiles, B. G., F. W. Sexton & S. A. Weinstein. (1991). Antibacterial effects of different snake venoms: Purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. *Toxicon*, 29 (9) : 1129-1141.
- Stocker, J. F. & J. R. Traynor. (1986). The action of various venoms on *Escherichia coli*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 61 (5) : 383-388.
- Stocker, K. (1990). Composition of snake venom, p. 33-56. In K. F. Stocker. *Medical Use of Snake Venom Proteins*. CRC Press, Boca Raton. 280 p.
- Takagi, E.H. Lincopan N., Cassettari V.C., Passadore L.F., Mamizuka E.M., Martinez M.B (2009). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak at university hospital. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, v. 40, n. 2, June. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822009000200024&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822009000200024&lng=en&nrm=iso)>. access on 12 July 2010. doi: 10.1590/S1517-83822009000200024.
- Tanaka, I.I.; Viggiani, A. M. F. S; Person, O. C. (2007). Bacteria carried by ants in a hospital environment. *Arq Med ABC*. 32(2):60-3.
- Teixeira, C., Cury, Y., Moreira, V., Picolo, G., & Chaves, F. (2009). Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon*. 54(1): 67-76.
- Tempone, A. G., H. F. Andrade, P. J. Spencer, C. O. Lourenco, J. R. Rogero & N. Nascimento. (2001). *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. With hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280 (3) : 620-624.
- Tennesen, M. (2009). Snakebit. *Scientific American*. 300(4): 27-29.

- Tenover, F. C.; Arbeit, R. D. & Goering, R. V. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal Clinical Microbiology*. 33: 2233-9.
- Toleman, M. A.; Simm, A. M.; Murphy, T. A.; Gales, A. C.; Biedenbach, D. J.; Jones, R. N. & Walsh, T. R. (2002). Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-  $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 50: 673-679.
- Toleman, M. A.; Rolston, K.; Jones, R. N. & Walsh, T. R. (2004). BlaVIM-7, a evolutionary distinct metallo-  $\beta$ -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 48: 329-332.
- Torres, A. F. C.; Dantas, R. T.; Toyama, M. H.; Filho, E. D.; Zara, F.J., Queiroz, M. G. R, Nogueira, N. A. P; Oliveira, M. R; Toyama, D. O; Monteiro, H. S. A; Martins, A. M. C. (2010). Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A<sub>2</sub> and L-amino acid oxidase. *Toxicon* 55. 795-804.
- Towner, K. J.; Gee, T. & Boswell, T. (2002). Na unwanted import to the UK: a carbapenem-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* producing metallo-  $\beta$ -lactamase. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 50: 1092-1093.
- Tysall, L.; Stockdale, M. W.; Chadwick, P. R.; Palepou, M. F.; Towner, K. J.; Livermore, D. M. & Woodford, N. (2002). IMP-1 carbapenemase detected in a *Acinetobacter* clinical isolate from the UK. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 49: 217-218.

- Umed O. 2008. *Klebsiella* infections. Microbiology Gulbarga Univ. Acesso em 04 de julho de 2010. Disponível em: [http://: edicineinstantaccesstotheminds of medicine](http://edicineinstantaccesstotheminds of medicine).
- Visca, P.; Colotti, G.; Serino, L.; Verzili, D.; Orsi, N. & Chiancone, E. (1992). Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. *Applied Environment Microbiology*. 58: 2886-2893.
- Waley, S. G. – An explicit model for bacterial resistance: application to  $\beta$ -lactam antibiotics (1987). *Microbiol Sci* 4:143-6.
- Watanabe, M.; Iyobe, S.; Inoue, M. & Mitsuhashi, S. (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 35: 147-151.
- Yan, X. M., S. Q. Zhang, Q. Chang, P. Liu & J. S. Xu. (2000). Antibacterial and antifungal effects of *Agkistrodon halys pallas*: Purification of its antibacterial protein-lao. *Shih Yen Sheng Wu Hsueh Pao*, 33 (4) : 309-316.
- Zeller A & Maritz, A. (1944). Uber eine neue L-aminosaure Oxidase. *Helvetica Chimica Acta*. 27: 1888-1902.
- Zhang, Y. J., Wang, J. H., Lee, W. H., Wang, Q., Liu, H., Zheng, Y. T., & Zhang, Y. (2003). Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 309(3): 598-604.
- Zhong, S. R., Jin, Y., Wu, J. B., Jia, Y. H., Xu, G. L., Wang, G. C., Xiong, Y. L., & Lu, Q. M. (2009). Purification and characterization of a new L-amino acid oxidase from *Daboia russellii siamensis* venom. *Toxicon*. 54(6): 763-771.