

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALBA FABIOLA COSTA TORRES

Ação Antibacteriana, Antifúngica e Antiparasitária dos Venenos das Serpentes
Bothrops leucurus e *Bothrops marajoensis* e de suas frações Fosfolipase A₂ e
L-Aminoácido Oxidase.

FORTALEZA

2009

ALBA FABIOLA COSTA TORRES

Ação Antibacteriana, Antifúngica e Antiparasitária dos Venenos das Serpentes *Bothrops leucurus* e *Bothrops marajoensis* e de suas frações Fosfolipase A₂ e L-Aminoácido Oxidase.

Dissertação apresentada à
Coordenação do Programa de Pós-
graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade
Federal do Ceará, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria
Costa Martins

FORTALEZA
2009

T643a Torres, Alba Fabiola Costa

Ação Antibacteriana, Antifúngica e Antiparasitária dos Venenos das Serpentes *Bothrops leucurus* e *Bothrops marajoensis* e de suas frações Fosfolipase A₂ e L-Aminoácido Oxidase/ Alba Fabiola Costa Torres. - Fortaleza, 2009.

106 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra Alice Maria Costa Martins
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *B. leucurus*, 2. *B. marajoensis*, 3. fosfolipase A₂, 4. L-aminoácido oxidase 5. atividade antimicrobiana I. Martins, Alice Maria Costa (orient.) II. Título.

CDD 615.1

ALBA FABIOLA COSTA TORRES

Ação Antibacteriana, Antifúngica e Antiparasitária dos Venenos das Serpentes *Bothrops leucurus* e *Bothrops marajoensis* e de suas frações Fosfolipase A₂ e L-Aminoácido Oxidase.

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 08/04/2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins (orientadora)
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas / UFC

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro
Departamento de Farmacologia / UFC

Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas / UFC

Aos meus pais, pelo exemplo de vida, dedicação e carinho.

Aos meus irmãos, pelo companheirismo e constante apoio.

Aos meus amigos, pela força e incentivo que sempre depositaram em mim.

À Max Vinicius, por todo amor e carinho a mim dedicado.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor e carinho que sempre me fortalece. Mesmo distante vocês sempre estiveram presentes em minha mente e coração. Vocês são a razão de tudo que sou e de tudo que me tornarei, em vocês me fortaleço e sei também que vocês se fortalecem com o meu sucesso. O meu amor por vocês é indescritível, sem limites e incondicional.

A Profa. Alice Maria Costa Martins, pela aceitação, dedicação e apoio fundamental durante a realização deste trabalho;

As Profas. Márcia Rosa de Oliveira, Maria de Fátima Oliveira e Nádia Accioly Pinto Nogueira, pela fundamental parceria e colaboração;

Ao Prof. Dr. Marcos Hiraki Toyama e Eduardo Diz Filho, por fornecer os venenos e toxinas, inspiração para a realização deste projeto;

À secretária Raimundinha pelo constante apoio e amizade;

Aos colegas de laboratório e pesquisa Rodrigo, Ramon, Thiala, Kamila, Felipe, Priscila, John, Rosângela, André, Patrícia, Iara, Franciane e Dânia pela constante amizade, apoio e companhia durante a realização deste trabalho;

A todos os professores, colegas de curso e funcionários do Departamento de Análises Clínicas, que direta ou indiretamente me acompanharam na realização deste trabalho.

“Lembrem-se de que a ciência exige que as pessoas se dediquem a ela durante a vida inteira. E se tivessem duas vidas, ainda assim não seria suficiente. A ciência demanda dos indivíduos grande tensão e forte paixão. Sejam apaixonados por suas ciências e por suas pesquisas.”

Ivan Pavlov

RESUMO

Os venenos de serpentes contêm substâncias biologicamente ativas, primariamente consistindo de proteínas (90-95%). Algumas delas apresentam atividade enzimática como as fosfolipases A₂ e L-aminoácido oxidase. O presente estudo verificou a ação dos venenos de *Bothrops leucurus* (BleuVT) e *Bothrops marajoensis* (BmarVT), e suas frações PLA₂ (BleuPLA₂ e BmarPLA₂) e LAAO (BleuLAAO e BmarLAAO) sobre cepas de bactéria, *C. albicans*, *Leishmania sp* e *T. cruzi*, bem com sua toxicidade sobre macrófagos murinos. A susceptibilidade das cepas bacterianas e fúngica foi analisada através do método de difusão em ágar, para determinação do potencial antimicrobiano; e microdiluição em caldo, para determinação da CIM e CLM, com modificações. A atividade antiparasitária foi avaliada através do tratamento das culturas de parasitos com diferentes concentrações dos venenos ou de suas frações. As formas promastigotas de *Leishmania sp.* foram cultivadas, durante 72h, em meio NNN/Schneider a 28°C; e as formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT, durante 5 dias, a 28°C. Os macrófagos foram cultivados em meio RPMI 1640, em presença de diferentes concentrações dos venenos e frações, durante 24h, e submetidos ao ensaio com MTT. Os resultados foram estatisticamente analisados através do teste t ou ANOVA seguida do teste Bonferroni, quando apropriado, com p<0.05. A BmarLAAO foi capaz de inibir o crescimento bacteriano do Gram-negativo *P. aeruginosa*, da levedura *C. albicans* e do Gram-positivo *S. aureus*; e o BleuTV inibiu o crescimento de *S. aureus*, sendo a inibição dose-dependente. A ordem de susceptibilidade dos microorganismos testados com BmarLAAO foi *S. aureus* > *C. albicans* > *P. aeruginosa*. Por outro lado o BmarTV, BmarPLA₂, BleuPLA₂ e BleuLAAO não apresentaram nenhum grau de inibição sobre as cepas em estudo. O potencial inibitório foi mais significativo sobre *S. aureus* apresentando CIM= 50µg/mL e CLM=200µg/mL para BmarLAAO, e CIM=CLM=25µg/mL para BleuTV. Em concentrações maiores que 1.56µg/mL a BmarLAAO foi capaz de inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis*, sendo os valores de IC₅₀, após 72h de cultivo, para *L. amazonensis*, 2.55µg/mL e 2.86 µg/mL para *L. chagasi*. BmarTV e BleuTV também apresentaram significativa inibição sobre o crescimento parasitário, sendo os valores de IC₅₀ 86.56 µg/mL para *L. amazonensis* e 79.02µg/mL para *L. chagasi*, quando tratado com BmarTV; e 5.49µg/mL para *L. amazonensis* e 1.94µg/mL para *L. chagasi*, quando tratado com BleuTV. Os venenos e BmarLAAO mostraram efeito inibitório sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os valores de IC₅₀ para BleuTV, BmarTV e BmarLAAO foram, respectivamente, 1.14µg/mL, 24.19µg/mL e 0.89µg/mL. As frações BmarPLA₂, BleuPLA₂ e BleuLAAO não foram capazes de promover nenhum efeito inibitório sobre os parasitos em estudo. O BmarLAAO, BmarTV e BleuTV apresentaram baixa toxicidade sobre macrófagos nas concentrações estudadas. Em conclusão, os venenos de *B. leucurus* e de *B. marajoensis*, bem como a L-aminoácido oxidase de *Bothrops marajoensis* mostraram ser capazes de interferir no crescimento de diferentes microorganismos como *S.aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *Leishmania sp.* e *T. cruzi*.

Palavras-chave: *B. leucurus*, *B. marajoensis*, fosfolipase A₂, L-aminoácido oxidase, atividade antimicrobiana

ABSTRACT

Snakes venoms contain biologically active substances primarily consisting of proteins (90-95%). Some of these present enzymatic activities, such as phospholipases A₂ and the L-amino acid oxidases. In this study we verify the action of *Bothrops leucurus* (BleuTV) and *Bothrops marajoensis* (BmarTV) venoms, and fractions PLA₂ (BleuPLA₂ and BmarPLA₂) and LAAO (BleuLAAO and BmarLAAO) on strains of bacteria, yeast, *Leishmania sp* and *T. cruzi*. The susceptibility of bacterial and yeast strains was analyzed through disc-diffusion assay, for determination of antimicrobial potential; and the microdilution method, for determination of MIC and MLC, with modifications. The antiparasitic activity was evaluated through the culture treatment of parasites with different concentrations of venoms or their fractions. The forms promastigotes of *Leishmania sp.* had been cultivated, during 72h, in NNN/Schneider media, 28°C; and the forms epimastigotes of *T. cruzi* had been cultivated in LIT media, during 5d, 28°C. The macrophages were cultured in RPMI 1640 media, during 24h, 37°C and 5% of CO₂, with different concentrations of venoms or fractions. After, they were analyzed by MTT method. The results was statistically analyzed with t test or ANOVA followed the Bonferroni's test, when appropriated, with p<0.05. The BmarLAAO was able to inhibit the growth of gram negative *P. aeruginosa*, of yeast *C. albicans* and of gram positive *S. aureus*; and the BleuTV inhibited the growth of *S. aureus*, being the inhibitions dose-dependent. The order of susceptibility of microorganisms tested against BmarLAAO was *S. aureus* > *C. albicans* > *P. aeruginosa*. On the other hand the BmarTV, BmarPLA₂, BleuPLA₂ and BleuLAAO had not provided any degree of inhibition on strains in study. The inhibitory effect was more significant on *S. aureus* presenting CIM= 50µg/mL and CLM=200µg/mL for BmarLAAO, and CIM=CLM=25µg/mL for the BleuTV. In concentrations greater than 1.56µg/mL BmarLAAO was able to inhibit the growth of promastigotes forms of *L. chagasi* and *L. amazonensis*, after 72h of culture. The IC₅₀ values were 2.55µg/mL for *L. amazonensis*, and 2.86 µg/mL for *L. chagasi*. BmarTV and BleuTV also provided significant inhibition of the parasitic growth, with an IC₅₀ value of 86.56 µg/mL for *L. amazonensis* and 79.02 µg/mL for *L. chagasi*, when treated with BmarTV; and 5.49µg/mL for *L. amazonensis* and 1.94µg/mL for *L. chagasi*, when treated with BleuTV. The venoms and BmarLAAO showed inhibitory effect on epimastigotes forms of *T. cruzi*. The IC₅₀ value for BleuTV, BmarTV and BmarLAAO where, respectively 1.14µg/mL, 24.19µg/mL and 0.89µg/mL. This effects presented behavior dose-dependent. The fractions BmarPLA₂, BleuPLA₂ and BleuLAAO had not been capable to promote any inhibition on the growth of these parasites. The BmarLAAO, BmarTV and BleuTV presented low toxicity in studied concentrations. In conclusion, the whole venoms as well as the L-amino acid oxidase from *Bothrops marajoensis* showed to be capable to interfere in the growth of several microorganisms as *S. aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leishmania sp.* and *T. cruzi*.

Key-words: *B. leucurus*, *B. marajoensis*, phospholipase A₂, L-amino acid oxidase, antimicrobial activity.

LISTA DE ABREVIATURAS

PLA₂ – Fosfolipase A₂

vPLA₂ – Fosfolipase A₂ extraída de venenos

svPLA₂ - Fosfolipase A₂ extraída de venenos de serpentes

LAAO – L-aminoácido oxidase

svLAAO – L-aminoácido oxidase extraído de venenos de serpentes

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

FMN – Flavina mononucleotídeo

NNIS – National Nosocomial Infections Surveillance

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

WHO – World Health Organization

LVA – Leishmaniose visceral Americana

BZ – Benzonidazol

NFX – Nifurtimox

CIM – Concentração inibitória mínima

CLM – Concentração letal mínima

PBS – Tampão fosfato salina

LIT –Liver infusion tryptose

SBF – Soro bovino fetal

MTT – 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

CEPA – Comitê de Ética em Pesquisa com Animais

BleuVT – Veneno total de *B. leucurus*

BleuPLA₂ – Fosfolipases A₂ de *B. leucurus*

BleuLAAO – L-aminoácido oxidase de *B. leucurus*

BmarVT – Veneno total de *B. marajoensis*

BmarPLA₂ – Fosfolipase A₂ de *B. marajoensis*

BmarLAAO – L-aminoácido oxidase de *B. marajoensis*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Animais que possuem toxinas de valor biológico.	18
Figura 2: Estrutura tridimensional de vPLA ₂ s pertencentes aos grupos I, II e III.	24
Figura 3: Sequência N-terminal de aminoácidos de svPLA ₂ obtidas do BLAST protein databank (PubMed, MEDLINE).	25
Figura 4: Desidrogenação de L-aminoácidos catalizada pela LAAO.	30
Figura 5: Serpentes do gênero <i>Bothrops</i> .	31
Figura 6: Serpentes do gênero <i>Crotalus</i> .	32
Figura 7: Serpente do gênero <i>Lachesis</i> .	32
Figura 8: Serpentes do gênero <i>Micrurus</i> .	33
Figura 9: Representação esquemática de bactérias resistentes.	39
Figura 10: Leishmaniose visceral (A); Leishmaniose mucocutânea, lesão na mucosa nasal (B); Leishmaniose cutânea difusa, lesões múltiplas ulceradas (C); Leishmaniose cutânea, lesão única com bordos elevados (D).	41
Figura 11: Ciclo de vida de <i>Leishmania sp.</i>	42
Figura 12: Ciclo de vida do <i>Tripanossoma cruzi</i> .	44
Figura 13: Sinal de Romaña.	45
Figura 14: Ensaio de difusão em ágar.	51

Figura 15: Ensaio de microdiluição em caldo.	53
Figura 16: Determinação da CLM a partir do ensaio de microdiluição em caldo.	54
Figura 17: Ensaio para atividade citotóxica sobre formas promastigotas de <i>Leishmania sp.</i>	55
Figura 18: Ensaio para atividade citotóxica sobre formas epimatigostas de <i>T. cruzi.</i>	56
Figura 19: Obtenção de macrófagos peritoneais.	57
Figura 20: Ensaio de toxicidade sobre macrófagos murinos.	58
Figura 21: Ensaio de difusão em ágar do veneno da <i>B. leucurus</i> sobre <i>S. aureus.</i>	61
Figura 22: Ensaio de difusão em ágar da fração L-aminoácido oxidase da <i>B. marajoensis</i> sobre <i>P. aeruginosa</i> (●); <i>C. albicans</i> (■) e <i>S. aureus</i> (▼).	62
Figura 23: Atividade antibacteriana do veneno da <i>B. leucurus</i> e da amicacina, sobre cultura de <i>S. aureus.</i>	63
Figura 24: Atividade antibacteriana da fração L-aminoácido oxidase da <i>B. marajoensis</i> e da amicacina sobre cultura de <i>S. aureus.</i>	63
Figura 25: Atividade leishmanicida de diferentes concentrações do veneno da <i>B. leucurus</i> sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> and <i>L. chagasi.</i>	65
Figura 26: Atividade leishmanicida de diferentes concentrações do veneno de <i>B. marajoensis</i> sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> and <i>L. chagasi.</i>	65

- Figura 27:** Atividade leishmanicida de diferentes concentrações da L-aminoácido oxidase do veneno da *B. marajoensis* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* and *L. chagasi*. 66
- Figura 28:** Ação sobre cepa Y de *T. cruzi*, após 5 dias de cultivo, de diferentes concentrações do veneno de *B. leucurus*. 67
- Figura 29:** Ação sobre cepa Y de *T. cruzi*, após 5 dias de cultivo, de diferentes concentrações do veneno de *B. marajoensis*. 67
- Figura 30:** Ação sobre cepa Y de *T. cruzi*, após 5 dias de cultivo, de diferentes concentrações de L-aminoácido oxidase do veneno da *B. marajoensis*. 68
- Figura 31:** Efeito citotóxico de diferentes concentrações do veneno de *B. leucurus* sobre macrófagos. 69
- Figura 32:** Efeito citotóxico de diferentes concentrações de L-aminoácido oxidase da *B. marajoensis* sobre macrófagos. 70
- Figura 33:** Efeito citotóxico de diferentes concentrações da phospholipase A₂ de *B. marajoensis*, sobre macrófagos. 70
- Figura 34:** Alterações morfológicas em macrófagos após 24h de exposição à BleuTV, em diferentes concentrações. 72
- Figura 35:** Alterações morfológicas em macrófagos após 24h de exposição à BmarPLA₂, BmarTV e BmarLAAO, em diferentes concentrações. 73

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Grupos avaliados no ensaio de difusão em ágar.	51
Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração letal mínima (CL determinadas através do ensaio de microdiluição em caldo.	64
Tabela 2: Valores de IC ₅₀ para formas promastigotas <i>L. amazonensis</i> (L.a.) e <i>L. chagasi</i> (L.c.)	66
Tabela 3: Valores de IC ₅₀ para formas epimastigoas de <i>T. cruzi</i>	68
Tabela 4: Valores de IC ₅₀ para macrófagos	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Composição dos venenos ofídicos	20
1.1.1 Fosfolipases A ₂	23
1.1.2 L-aminoácido oxidases	27
1.2 Serpentes da fauna Brasileira	29
1.2.1 Serpentes do gênero <i>Bothrops</i> e seu potencial antimicrobiano	33
1.3 Infecções bacterianas	36
1.4 Leishmanioses	40
1.5 Doença de Chagas	42
2 OBJETIVOS	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 Venenos e frações	49
3.2 Ensaio para determinação do potencial antimicrobiano	49
3.2.1 Cepas microbianas	49
3.2.2 Potencial antimicrobiano	50
3.2.3 Concentração Inibitória Mínima	52
3.2.4 Concentração Letal Mínima	53
3.3 Ensaio antiparasitários	54
3.3.1 <i>Leishmania sp.</i> e sua manutenção <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	54
3.3.2 Análise da atividade citotóxica sobre formas promastigotas de <i>Leishmania sp.</i>	55
3.3.3 Cultivo das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	56
3.3.4 O efeito citotóxico dos venenos e frações sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	56
3.4 Avaliação da toxicidade sobre macrófagos murinos	57
3.4.1 Obtenção dos macrófagos peritoneais de camundongos Suíços	57
3.4.2 Ensaio de toxicidade	58
3.5 Análise estatística	59
3.6 Comitê de Ética	59

4 RESULTADOS	60
4.1 Atividade antibacteriana e antifúngica	60
4.2 Atividade sobre <i>Leishmania sp.</i>	64
4.3 Atividade sobre cepa Y de <i>T. cruzi</i>	66
4.4 Citotoxicidade sobre macrófagos murinos	68
5 DISCUSSÃO	74
6 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

A busca pelo alívio e cura de doenças através da ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização de produtos naturais, pela humanidade. A natureza sempre despertou no homem o fascínio não apenas pelos recursos oferecidos para alimentação, mas por ser sua principal fonte de descobertas. Assim a procura por respostas para uma infinidade de questionamentos surgidos ao longo do tempo conduziu o homem ao estágio de desenvolvimento no qual se encontra, embora ainda haja muito a ser descoberto (VIEGAS et al., 2006).

A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa com produtos naturais, do conhecimento da relação entre a estrutura química de um determinado composto e suas propriedades biológicas e da inter-relação animais-insetos-plantas. Neste sentido a natureza forneceu muitos modelos moleculares que vêm fundamentando diversos estudos (VIEGAS et al., 2006). Estes modelos têm sido, tradicionalmente, a fonte mais comum na obtenção de drogas, representando mais de 30% do mercado farmacêutico mundial (KIRKPATRICK, 2002). Eles são a principal fonte de agentes terapêuticos inovadores para doenças infecciosas, câncer, desordens lipídicas, imunomodulação (ALTMAN, 2001), além de fornecerem ferramentas para estudos fisiopatológicos e farmacológicos. Sabe-se que as estruturas dos produtos naturais possuem características de grande diversidade química, especificidade bioquímica e propriedades moleculares que os tornam favoráveis como estruturas que conduzem à descoberta de novas drogas (CLARDY; WALSH, 2004).

Dentro deste contexto a conservação dos recursos biológicos do planeta, bem como sua exploração sustentável é tão importante que em vários países do mundo estão sendo criados programas de bioprospecção (busca na natureza por substâncias com potencial farmacêutico), integrando universidades, institutos de pesquisa, museus e a indústria farmacêutica, para descobrir e desenvolver novos fármacos.

O Brasil é um país com características climáticas e geográficas muito variadas, possuindo assim uma ampla diversidade biológica. Desta forma

apresenta-se como um rico ambiente para estudos com produtos naturais, os quais constituem uma fonte importantíssima de novos compostos para serem utilizados na terapêutica. A pesquisa por novos fármacos cresceu bastante nos últimos anos, principalmente a partir de substâncias bioativas extraídas de plantas e animais.

O estudo do potencial terapêutico das toxinas vem cada vez mais conquistando espaço e despertando grandes interesses da comunidade científica. As toxinas naturais vêm chamando a atenção do homem há muito tempo, devido aos seus efeitos biológicos. Elas têm sido utilizadas como ferramenta para elucidar mecanismos fisiológicos, desde que Claude Barnard em 1850 verificou que o veneno utilizado nas pontas das flechas por índios continha tubocurarinas conhecidas durante muito tempo como um alcalóide letal, mas foi o primeiro relaxante muscular, introduzido na prática anestésica (Atracurium® - Wellcome). Desde então vários outros laboratórios farmacêuticos têm se utilizado de toxinas naturais como modelos de moléculas para o desenvolvimento de seus produtos. PALMA et al., 2007; HARVEY et al., 1998).

Pesquisas com toxinas de origem animal têm contribuído muito na compreensão de problemas vasculares, neurológicos, processos inflamatórios, analgesia, processos alérgicos, asma, entre outros. Venenos de invertebrados têm interesse como potencial fonte de substâncias bioativas, como as neurotoxinas, moléculas que têm demonstrado muita utilidade para o entendimento dos eventos de transmissão sináptica e têm contribuído no desenho de novas drogas para o tratamento de distúrbios neurológicos e da dor (MORTARI et al., 2007). Com sua elevada potência e seletividade, as toxinas podem apresentar-se muito úteis em experimentos funcionais (HARVEY et al., 1998).

O Brasil possui uma fonte riquíssima de toxinas animais e de microorganismos. Assim um grande esforço vem sendo aplicado na investigação das atividades biológicas destas, e muito tem sido descoberto. Conceição et al. (2006) identificaram na secreção cutânea da *Phyllomedusa hypocondrialis*, perereca encontrada no Nordeste e Sudeste brasileiro, peptídeos antimicrobianos (PS-7 e DH-1) capazes de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Em estudos posteriores, Conceição et al. (2007) identificaram um peptídeo potenciador de bradicinina (Phypo Xa), com significativa ação hipotensora. Neste sentido o escorpião amarelo *Tityus serrulatus*, comum em grandes cidades, apresenta em seu veneno peptídeos com ação

hipotensora, denominados hipotensinas, as quais também exercem seu efeito através da potencialização da ação da bradicinina (VERANO-BRAGA et al., 2008).

O carrapato estrela (*Amblyomma cajennense*), encontrado em todo Brasil, possui em sua saliva substâncias anticoagulantes (BATISTA et al., 2008), as quais permitem que o sangue flua quando ele vai sugar sua vítima. Batista et al. (2008) identificaram uma molécula que inibe o fator 10 da cascata de coagulação, e que pode vir a ser uma droga anti-trombótica. Outra descoberta é a presença de proteínas, as quais conseguem matar células tumorais *in vitro* (GIRARDI, 2007).

O veneno da taturana *Lonomia obliqua*, encontrada na região Sudeste do Brasil, costuma causar coagulação disseminada podendo levar a uma síndrome hemorrágica. Uma protease ativadora da protrombina (Lopap), isolada do extrato das cerdas da taturana, é capaz de provocar formação de trombos e depleção de fibrinogênio (REIS et al., 2001; FRITZEN et al., 2005). Outros estudos também mostraram que o Lopap interage com alguns receptores de células endoteliais, aumentando a expressão superficial de moléculas de adesão (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2001), além disso o Lopap parece modular moléculas envolvidas na regulação do tônus vascular e inibidores da ação plaquetária como óxido nítrico (NO) e prostaglandina I₂ (PGI₂) (REIS et al., 2001) (Figura 1).



Tityus serrulatus
(Escorpião amarelo)



Phyllomedusa hypochondrialis



Amblyomma cajennense
(Carrapato estrela)



Lonomia obliqua

Figura 1 - Animais que possuem toxinas de valor biológico

Fonte: www.unb.br/ib/zoo; www.friquoletto.com.br; www.fiocruz.br;
www.animalworld.com.br; www.ib.usp.br.

Pesquisas com venenos de serpentes apresentam-se como potencial fonte de futuros agentes terapêuticos e têm contribuído muito na compreensão de mecanismos fisiopatológicos de doenças. Os peptídeos potenciadores de bradicinina, isolados do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, foram os primeiros inibidores naturais da enzima conversora de angiotensina (ECA) (FERREIRA, 1965). Estas substâncias foram utilizadas como protótipo para o desenvolvimento de produtos anti-hipertensivos, como o Captopril® (HARVEY et al., 1998). Atualmente, atenção tem sido voltada para o Evasin (endogenous vasopectidases inhibitor), substância anti-hipertensiva, mais seletiva do que o Captopril, não imunogênica e com ação mais prolongada (IZIQUE, 2001). Do veneno da *Crotalus durissus terrificus*, serpente encontrada no Nordeste, Sudeste e Centro Oeste brasileiro, foi extraída uma substância analgésica mais potente do que a morfina, de longa duração e que não provoca dependência e tolerância (GIRARDI, 2007).

Tendo em vista o potencial biotecnológico de venenos e toxinas, aliado à necessidade de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de processos infecciosos, encontramos um campo de pesquisa promissor a ser explorado. Um dos maiores desafios dos sistemas de saúde atualmente é tratar quadros infecciosos, principalmente devido ao grande problema da resistência dos microorganismos aos agentes comumente utilizados na terapêutica.

Nos últimos 20 anos, um aumento da resistência de bactérias aos antimicrobianos vem sendo relatado, principalmente em áreas de atenção a pacientes graves (FRIDGKIN; GAYNES, 1999; BOUZA et al., 2003). Por exemplo, nos EUA, entre os anos de 1998 a 2003, notou-se um aumento de cerca de 12% na resistência de amostras de *Staphylococcus aureus* à oxacilina, e de *Enterococcus sp.* à vancomicina; entre as enterobactérias, foi observado um aumento de até 47% na resistência às cefalosporinas de terceira geração em amostras de *Klebsiella pneumoniae*. Considerando a *Pseudomonas aeruginosa*, observou-se um aumento de 9% na resistência às quinolonas e de 15% ao imipenem (NOUÉR, 2005).

Fora do ambiente de pacientes graves, também se notou diminuição de sensibilidade aos antimicrobianos. Este fato é preocupante visto que a perda de sensibilidade em curto espaço de tempo não é correspondida à velocidade em que novos antimicrobianos podem ser lançados no mercado, deixando os pacientes expostos a infecções com poucas possibilidades de tratamento. Dentro deste contexto, doenças como leishmanioses e Doença de Chagas, causadas por

Leishmania sp. e *Tripanosoma cruzi*, respectivamente, ganham destaque devido não apenas ao aumento da resistência de seus agentes causadores às drogas clinicamente disponíveis, mas também devido a elevada incidência, alta taxa de mortalidade, e por serem consideradas doenças negligenciadas, as quais afligem preferencial ou exclusivamente países em desenvolvimento e possuem pouco incentivo para a pesquisa, o desenvolvimento tecnológico e a inovação geradora de produtos necessários à saúde das populações desfavorecidas.

Assim, o potencial terapêutico de venenos e toxinas de serpentes frente a agentes infecciosos, incentivou a realização do presente estudo, cujo objetivo foi avaliar o potencial antimicrobiano dos venenos das serpentes *Bothrops leucurus* e *Bothrops marajoensis*, bem como de suas frações fosfolipase A₂ e L-aminoácido oxidase.

1.1 Composição dos venenos ofídicos

O venenos de serpentes contem muitos componentes de valor biológico e/ou biotecnológico. Segundo Calvete et al. (2007), sua caracterização proteômica apresenta potenciais benefícios para a pesquisa básica, diagnóstico clínico e desenvolvimento de novos instrumentos de pesquisa e drogas de potencial uso clínico. Também é relevante para o profundo entendimento da evolução e dos efeitos biológicos dos venenos, e gerar protocolos de imunização para eleger anticorpos específicos para as toxinas com maior especificidade e efetividade do que o sistema convencional.

Assim os venenos de serpentes apresentam-se como uma fonte natural para a pesquisa biológica, uma vez que contem vários componentes que podem apresentar potencial terapêutico. São compostos por substâncias simples e complexas, cuja proporção e características específicas variam entre as diferentes espécies; e apresentam componentes protéicos e não protéicos com diferentes estruturas e atividades bioquímicas específicas (PAL et al., 2002; PORTO et al., 2007). Os componentes protéicos constituem enzimas e proteínas não enzimáticas além de polipeptídeos. Enquanto os componentes não protéicos incluem constituintes orgânicos e não orgânicos (TU, 1996; MATSUI et al., 2000; RAJENDRA et al., 2004).

Os constituintes não orgânicos conhecidos são cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco (FRIEDERICH; TU, 1971). Porém esses elementos não são encontrados em todos os venenos e a quantidade também varia para cada espécie. Alguns estudos sugerem que o cálcio, manganês e o magnésio, por exemplo, são importantes para a estabilização de certas proteínas, enquanto que outros, em particular o zinco, cobre, ferro e cobalto, possivelmente atuam nos mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos, como metaloproteases (BJARNASON; FOX, 1994).

Entre os componentes orgânicos não protéicos encontramos aminoácidos livres e pequenos peptídios, carboidratos, lipídios, principalmente fosfolipídios e aminas biogênicas (VARANDA; GIANINI, 1994).

Cerca de 90-95% do peso seco dos venenos ofídicos tem composição protéica, e são essas proteínas as responsáveis por quase a totalidade dos efeitos biológicos encontrados (BON, 1997). Uma vez que os principais constituintes dos venenos de serpentes são proteínas, é natural que esses venenos contenham vários ânions ou cátions para neutralizarem essas cargas. Alguns metais, especialmente cátions monovalentes, servem para esse propósito (VARANDA; GIANINI, 1994). Estas proteínas podem atuar sozinhas ou sinergicamente, alterando funções fisiológicas. Por exemplo, venenos neurotóxicos bloqueiam a junção neuromuscular, paralisando a atividade respiratória por bloqueio pré ou pós-sináptico da transmissão neuromuscular; os venenos hemocitotóxicos contêm substâncias que interagem com proteínas da hemostase, calicreína ou sistema complemento, causando perda de volume sanguíneo, hipotensão ou coagulação intravasular, conduzindo a desordens hemostáticas sistêmicas, ou ainda podem conter compostos que induzem necrose muscular (STOCKER, 1999; LU et al., 2005).

Os componentes dos venenos parecem ser bastante comuns e relacionados dentro de cada família de serpentes. As neurotoxinas são típicas dos venenos das Hydrophidae e Elapidae, enquanto componentes hemostaticamente ativos são geralmente encontrados nas Viperidae, Crotalidae e Elapidae (TU, 1996; LU et al., 2005).

As principais substâncias protéicas dos venenos são as neurotoxinas, cardiotoxinas, lecitinas, desintegrinas, peptídeos natriuréticos, proteases, fosfolipases, fosfodiesterases, nucleotidases, L-aminoácido oxidase (PAL et al.,

2002). As enzimas dos venenos induzem vários efeitos farmacológicos incluindo neurotóxico, miotóxico, cardiotoxico, hemorrágico, hemolítico, procoagulante e anticoagulante (KINI, 1997; BAILEY; WILCE, 2001).

As proteínas dos venenos de serpentes atuam sobre vários tecidos, órgãos, e sistemas fisiológicos. Um grande número de toxinas protéicas tem sido purificadas e caracterizadas. Estas toxinas, no entanto, pertencem a um pequeno número de superfamílias de proteínas. Por exemplo, um único veneno pode conter várias isoformas de fosfolipase A₂ (PLA₂) (BRAGANÇA; SAMBRAY, 1967; TAKASAKI et al., 1990; OGAWA et al., 1992; KINI, 2003), bem como podem apresentar notável similaridade em suas estruturas primária, secundária e terciária. No entanto, algumas vezes eles diferem entre si no seu alvo biológico e, portanto, em seu efeito farmacológico. Similarmente, outras enzimas bem como as proteínas não enzimáticas também existem em muitas isoformas e podem ser classificadas em famílias protéicas.

Mais de 1000 proteínas tem sido caracterizadas, e estas toxinas protéicas estão agrupadas em famílias bem reconhecidas, por exemplo: 1) inibidores de serina proteinases (incluindo inibidores de proteinases e dendrotoxinas); 2) lectinas; 3) sarafatoxinas; 4) fatores de crescimento nervoso; 5) peptídeos natriurético atrial, 6) peptídeos potenciadores de bradicinina; 7) desintegrinas; entre outros (MCLANE et al., 1998; KINI, 2002; YAMAZAKI et al., 2003a, 2003b). Muitos investigadores também tem encontrado atividades antimicrobianas apresentadas por componentes presentes nos venenos. Peptídeos isolados do veneno da *Naja atra* apresentaram ação inibitória sobre *Mycobacterium tuberculosis* e peptídeos extraídos do veneno da *Bungarus fasciatus* exibem ação contra diferentes cepas de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, entre outros (XIE et al., 2003; WANG et al., 2008).

Os membros de cada família de proteínas tem um padrão molecular semelhante, mas eles exibem múltiplas funções. Então sugere-se que com o processo evolutivo, alguns dos padrões moleculares dos venenos tem sido “selecionados”, e vários sítios funcionais foram gerados por uma evolução acelerada até um padrão molecular comum (TORRES et al., 2003). Segundo Daltry et al. (1996) os componentes dos venenos apresentam uma considerável variação geográfica mesmo dentro de cada espécie de serpente, em uma relação estreita

com sua alimentação, de acordo com observações prévias que os componentes dos venenos extraídos da mesma espécie de serpente podem ser diferentes.

1.1.1 Fosfolipases A₂

As PLA₂s são uma grande superfamília de enzimas encontradas em diversos tecidos de mamíferos e também em venenos de escorpiões, abelhas e serpentes (NICOLAS et al., 1997). Elas catalisam a hidrólise de glicerofosfolípídios na posição *sn-2* da cadeia principal do glicerol, liberando lisofosfolípídios e ácidos graxos (VERHEIJN et al., 1980; KINI, 2003), sendo classificadas baseado em sua fonte, sequência de aminoácidos e características bioquímicas (SIX; DENNIS, 2000; MURAKAMI; KUDO, 2002). Segundo Chakraborti (2003) e Balsinde et al. (2006), elas também podem ser agrupadas em citosólicas (cPLA₂) e secretórias (sPLA₂), baseado na sua localização celular. Estas formas podem também ser subdivididas em dependente e independente de Ca⁺². As PLA₂ independentes de Ca⁺² (iPLA₂), apresentam elevado peso molecular (~85kDa) e são encontradas no citosol (BALSINDE; DENNIS, 1997).

As enzimas fosfolipases podem ser polipeptídeos de cadeia simples, ou misturas de dois a cinco polipeptídeos complementares. As fosfolipases extraídas de venenos (vPLA₂s) são constituídas de 120-135 aminoácidos, contendo várias pontes dissulfeto, e possuem estrutura conservada que as caracteriza como PLA₂ (DAVIDSON; DENNIS, 1990).

Apesar das diferenças na habilidade de induzir efeitos farmacológicos, existem vários resíduos que são bem conservados em todas as vPLA₂s (DAVIDSON; DENNIS, 1990) sendo o nível mínimo de identidade entre as vPLA₂s do mesmo grupo de aproximadamente 30%. Por outro lado, o nível de identidade entre vPLA₂s do mesmo veneno pode ser tão alto quanto 99% (Figura 2 e 3). As diferentes vPLA₂s tem sido classificadas em quatro grupos baseado em suas estruturas primárias (DENNIS, 1994), sendo que as dos venenos de serpentes (svPLA₂) pertencem somente a dois grupos, de acordo com sua estrutura primária e padrão de pontes dissulfeto (BALSINDE et al., 1999; SIX; DENNIS, 2000). As do grupo I são encontradas em elapídeas e hidrofídeas, enquanto que as grupo II estão presente em viperídeas e crotalídeas (ARNI, 1996; TISCHFIELD, 1997; VALENTIN; LAMBEAU, 2000). Todavia algumas pesquisas já conduziram a

descobertas de svPLA₂, tanto secretórias quanto citosólicas, que não se enquadram claramente nestes grupos, tendo sido propostas novas classes para estas (SIX; DENNIS, 2000; MURAKAMI; KUDO, 2004).

A hidrólise de fosfolipídeos pelo grupo I/II de svPLA₂ envolve o par His48/Asp49 no sítio catalítico que ativa uma molécula de água conservada, enquanto inicia um ataque nucleofílico na posição *sn*-2 do substrato (SCOTT et al., 1990).

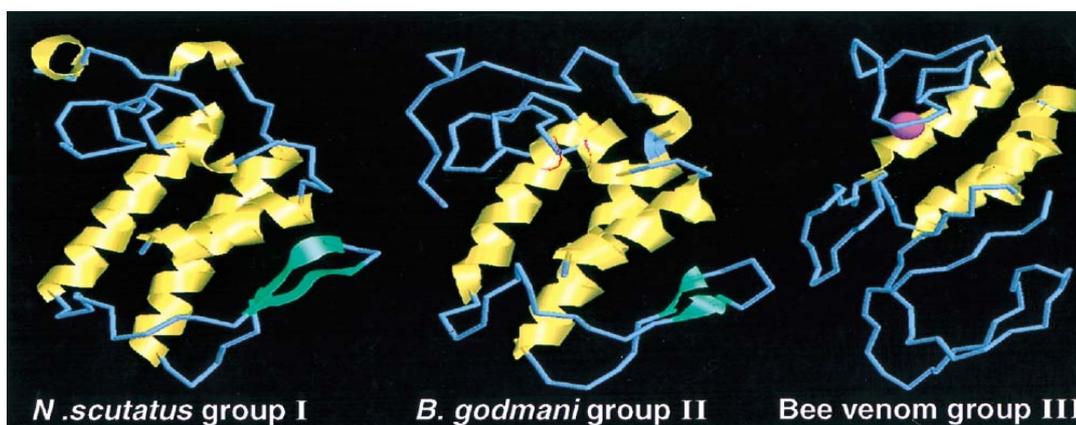


Figura 2 - Estrutura tridimensional de vPLA₂s pertencentes aos grupos I (notexina: *Notechis scutatus*, cataliticamente ativa, grupo IA), II (K-49 miotoxina II: *Bothrops godmani*) e III. Fonte: Valentin e Lambeau (2000)

	1	10	20	30
Bm sPLA ₂	SL	LELGKMILQETGKMP	SKSYGAYGCNCGVLGR...	
PrTx-I	SL	FELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGR...		
PrTx-II	SL	FELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGR...		
BthTx-I	SL	FELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGR...		
Myotoxin II	SL	FELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGR...		
Bnsp-7	SL	FELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGR...		
Bnsp-6	SL	FELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGR...		
MjTX-II	SL	FELGKMILQETGKNPAKSYGVYGCNCGVGGR...		
MjTX-I	SL	VELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGR...		

Figura 3 - Sequencia N-terminal de aminoácidos de svPLA₂ obtidas do BLAST protein databank (PubMed, MEDLINE): PrTx-I e PrTx-II (piratoxin I and II de *Bothrops pirajai*), BthTx-I (botropsitoxin I de *Bothrops jararacussu*), Myotoxin-II (myotoxin II de *Bothrops asper*), Bnsp-7 and Bnsp-6 (homólogos Lys49 PLA₂ miotóxica de *Bothrops neuwiedi pauloensis*), MjTX-I e II (homólogos Lys49 PLA₂ de *Bothrops moojeni*), BmPLA₂ (fosfolipase A₂ de *Bothrops marajoensis*).

Muitos pesquisadores as têm estudado devido as suas propriedades químicas e seus efeitos biológicos. Atualmente são reconhecidos três tipos diferentes de fosfolipases A₂ de venenos de serpentes (svPLA₂): a) as clássicas com ácido aspártico no carbono 49 (Asp49), as quais apresentam atividade catalítica; b) as variantes, contendo lisina no carbono 49 (Lys49); c) as variantes com serina ocupando a posição 49 (Ser49), sendo estas duas últimas com muito baixa ou nenhuma ação catalítica (OWNBY et al., 1999; LOMONTE et al., 2003). O Asp49, como parte do sítio de ligação do cálcio, é crítico para a atividade catalítica.

As PLA₂ cataliticamente ativas estão entre as menores enzimas (~14kDa), são altamente estáveis e apresentam uma região estrutural bem conservada. Além disso, as de venenos (vPLA₂s) podem ser monoméricas, homomultiméricas ou heteromultimérica, podendo um único veneno conter uma variedade de PLA₂s (DAVIDSON; DENNIS, 1990). É uma enzima bastante estável e suporta altas temperaturas, sem perder suas atividades, como é o caso da svPLA₂ do veneno da *Naja naja atra*, que é estável a 90°C por 5 minutos. Os venenos das espécies do gênero *Bothrops*, como *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. atrox*, possuem uma alta

atividade para fosfolipase A₂ (VIDAL; STOPPANI, 1971 apud VARANDA; GIANINI, 1994).

As fosfolipases de venenos de serpentes (svPLA₂) possuem várias bioatividades, como indução da motilidade de células endoteliais, atividade antimicrobiana, anticoagulante, antitumor, inibição da agregação plaquetária, neurotoxicidade pré e pós-sináptica, miotoxicidade, cardiotoxicidade, podendo ainda apresentar efeitos convulsivantes, hipotensivos e pró-inflamatórios (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; OWNBY, 1998; SOARES et al., 1998; OWNBY et al., 1999; SOARES et al., 2003; XU et al., 2007). Portanto, as svPLA₂ podem exibir uma grande variedade de efeitos farmacológicos, interferindo nos processos fisiológicos normais. Atuam, por exemplo, sobre a cascata de eventos inflamatórios conduzindo ao aumento da permeabilidade microvascular e formação de edema, recrutamento de leucócitos para os tecidos, nocicepção e liberação de mediadores inflamatórios que produzem desordens inflamatórias sistêmicas e locais (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; KOH et al., 2006). Estudos relatam que sua habilidade única de atuar sobre um órgão ou tecido específico é por conta da elevada afinidade para se ligar a receptores específicos independentemente de sua atividade catalítica (KINI, 2003).

As svPLA₂ anticoagulantes (principalmente Asp49) têm sido descritas em todos os principais grupos de serpentes. Como as PLA₂ clivam fosfolipídios, foi primeiro sugerido que as svPLA₂ inibiam a coagulação sanguínea destruindo fosfolipídios pró-coagulantes. Algumas svPLA₂ tem uma elevada afinidade por fosfolipídeos aniônicos. Portanto, os efeitos anticoagulantes dessas PLA₂ podem ser devido à sua competição com fatores de coagulação por ligação ao fosfolipídio e não necessariamente à hidrólise lipídica. No entanto, é difícil de estabelecer como ambos os mecanismos podem ser usados em combinação pelas PLA₂s (LU et al., 2005).

Basicamente, o alvo primário das fosfolipases de venenos (vPLA₂s) deve estar localizado fora da célula, e então o seu mecanismo de ação pode envolver: 1) ação catalítica intrínseca da vPLA₂, ou seja, sua habilidade de liberar ácidos graxos e lisofosfolipídios biologicamente ativos das membranas lipídicas; 2) ligação interfacial da fosfolipase na bicamada lipídica que, sem nenhuma hidrólise de fosfolipídio, pode afetar a função celular pela perturbação da membrana; e 3) a ligação das vPLA₂s a proteínas específicas localizadas na superfície da célula.

Também pode ser possível, para a ocorrência do efeito farmacológico, que a ligação a uma proteína e a ação hidrolítica sobre fosfolipídios aconteçam de uma só vez. Na verdade, nem todas as vPLA₂s cataliticamente ativas induzem efeitos tóxicos. Além do mais, existem várias vPLA₂s cataliticamente inativas que podem ter efeitos miotóxicos, cardiotoxicos e citotóxicos (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995).

Kini e Evans (1989) propuseram um modelo para explicar os diferentes efeitos farmacológicos das vPLA₂s. Este modelo é baseado na presença de sítios de ligação específicos na superfície das células alvo que possuem elevada afinidade por vPLA₂s tóxicas, mas não para vPLA₂s não tóxicas. Subsequentemente, para este nível de ligação primária, as vPLA₂s podem induzir um efeito farmacológico por mecanismos dependentes ou independentes da hidrólise fosfolípídica. As vPLA₂s não tóxicas não podem se ligar com alta afinidade à esses sítios, e então não são especificamente direcionadas para as células alvo. Espera-se que essas vPLA₂s sejam tóxicas somente em elevadas doses, ou seja, em concentrações elevadas o suficientes para se ligar a outros sítios celulares ou, não especificamente, hidrolisar fosfolipídios celulares na superfície tanto de células alvo com de células não alvo.

1.1.2 L-aminoácido oxidases

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) são flavoenzimas, usualmente homodiméricas, de caráter ácido, apresentam FAD (flavina adenina dinucleotídeo) ou FMN (flavina mononucleotídeo) como cofator, possuem massa molecular em torno de 110-150kDa (quando avaliadas através de filtração em gel e sob condições não desnaturantes) e catalisam a desaminação estereoespecífica de um substrato L-aminoácido, a um α -cetoácido correspondente, com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia (DU; CLEMETSON, 2002), seguindo a seguinte reação química: $RCHNH_2COOH + O_2 + H_2O \rightarrow RCOCOOH + NH_3 + H_2O_2$ (ALI et al., 2000; TOYAMA et al., 2006). Estas enzimas são amplamente distribuídas em diferentes organismos como bactérias, fungos, algas verdes e serpentes venenosas (DU; CLEMETSON, 2002); e exibem marcada afinidade por aminoácidos hidrofóbicos, incluindo fenilalanina, triptofano, tirosina e leucina (PAWELEK et al., 2000). As LAAOs são as únicas oxidases FAD-dependentes encontradas nos venenos de serpentes e sua toxicidade possivelmente envolve a geração de peróxido de

hidrogênio formado como resultado da reoxidação da redução transitória do cofator flavina pelo oxigênio molecular (Figura 4).

As LAAOs extraídas de venenos de serpentes (svLAAO) podem representar 1-9% do total de proteínas que constituem os venenos de serpentes (ALI et al., 2000; DU; CLEMETSON, 2002), todavia alguns autores relatam que este percentual pode representar cerca de 30% (TAKATSUKA et al., 2001), como ocorre com o veneno da *C. rhodostoma*, (PONNUDURAI et al., 1994). As svLAAOs são usualmente associadas por ligações não covalentes com ponto isoelétrico de cerca 4.4-8.5 (TEMPONE et al., 2001; ZHANG et al., 2003; STÁBELI et al., 2004; TOYAMA et al., 2006). Recentemente, as LAAOs de venenos de serpentes (svLAAO) tem se tornado um interessante instrumento farmacológico, bem como modelo estrutural e molecular para estudos biológicos. Embora pouco seja conhecido sobre suas estruturas primárias e terciárias, a sequência cDNA de duas svLAAO extraídas de *Crotalus atrox* e *Crotalus adamanteus*, foi determinada e um possível sítio de ligação para FAD e sítios de N-glicosilação foram estabelecidos (RAIBEKAS; MASSEY, 1998; TORII et al., 2000). As svLAAO tem apresentado distintas massas moleculares, preferência por substratos, capacidade apoptótica, citotoxicidade, hemólise, efeitos na agregação plaquetária, indução de hemorragia, edema, atividades antibacterianas, leishmanicida, antiviral; efeitos citotóxicos sobre células tumorais (STILES et al., 1991; LI et al., 1994; SUHR; KIM, 1996; AHN et al., 1997; STÁBELI et al., 2004, 2007; IZIDORO et al., 2006; VIEIRA SANTOS et al. 2008; SANT'ANA et al., 2008), sendo estes efeitos possivelmente ou parcialmente devidos à produção de peróxido de hidrogênio (WEI et al., 2002)

Estudos mostraram que as LAAOs apresentam uma característica peculiar e totalmente reversível de inativação induzida tanto pelo congelamento como pelo pH. A inativação ocorre com o congelamento da enzima a temperaturas abaixo de zero (-20°C), com a razão de inativação dependendo do pH e da composição do tampão. Valores de pH acima da neutralidade também conduzem à inativação, sendo que a presença de ânions monovalentes como o cloreto podem prevenir a inativação. O tratamento com calor a um baixo pH (por exemplo, 37°C e pH=5) pode reverter a condição de inativação (CURTI et al., 1968; COLES et al., 1977; MACHEROUX et al., 2001). Elas exibem um típico espectro de absorção, com absorbância máxima entre 465-380 devido a flavina andenina dinucleotídeo (MASSEY; CURTI, 1967). As

svLAAOs devem ser guardadas a 4°C e próximo de um pH neutro para prevenir sua inativação (DU; CLEMETSON, 2002).

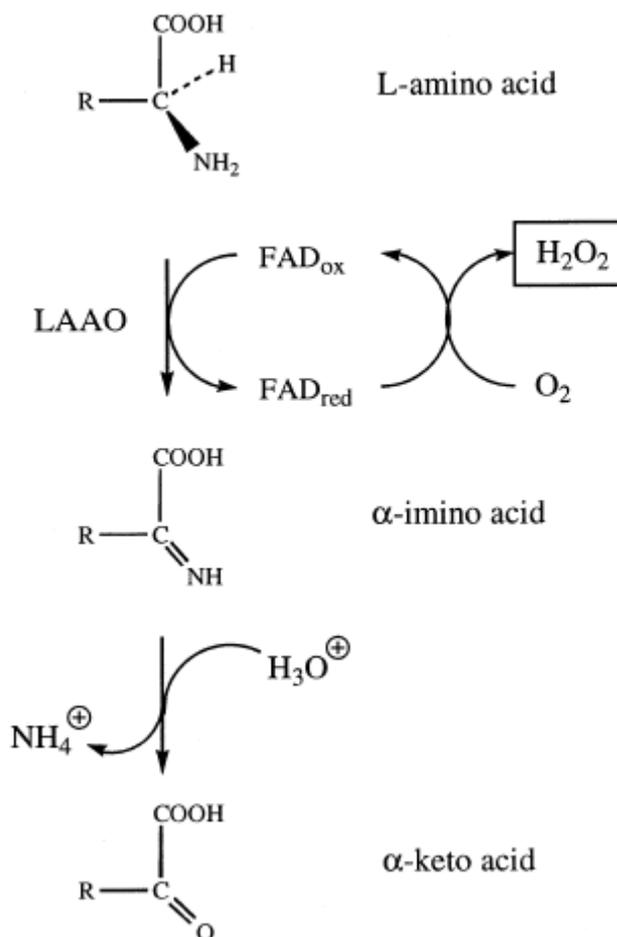


Figura 4 - Desidrogenação de L-aminoácidos catalizada pela LAAO. Os produtos desta reação, os α -iminoácidos, hidrolizam espontaneamente a α -cetoácido e amônia. Os equivalentes redutores derivados da desidrogenação são transferidos ao cofator FAD, que é prontamente oxidado pelo oxigênio molecular formando peróxido de hidrogênio
 Fonte: Macheroux et al. (2001) e Ande et al. (2006)

1.2 Serpentes da fauna Brasileira

Cerca de dois mil tipos de serpentes são conhecidas no mundo, destas, aproximadamente 410 são venenosas e classificados de acordo com suas características morfológicas, compreendendo cinco famílias, a saber: Crotalidae, Viperidae, Elapidae, Hydrophiidae e Colubridae (BARRAVIERA, 1994; MATSUI et al., 2000; DE CASTRO, 2006). Segundo a Organização Mundial de Saúde ocorrem,

no mundo cerca de 5.400.000 acidentes ofídicos/ano, com 125.345 óbitos, correspondente a um taxa de mortalidade de 2,3% (OMS apud CHIPPAUX, 1998). No Brasil, em 2005, foram registrados 28.597 casos de acidentes, sendo a maior incidência registrada na região Norte. No Ceará, neste mesmo ano, ocorreram 802 casos, sendo 535 casos de acidentes botrópicos e 61 casos de acidentes crotálicos (BRASIL, 2005).

Aproximadamente, 256 espécies de serpentes são conhecidas no Brasil; cerca de 69 são consideradas peçonhentas. Estão classificadas em 73 gêneros, em nove famílias (BARRAVIERA, 1995; DE CASTRO, 2006). Destas, apenas duas famílias (*Elapidae* e *Viperidae*) congregam as espécies peçonhentas, ou seja, àquelas que produzem toxinas em glândulas especializadas e têm aparelhos apropriados para inoculá-las. As serpentes peçonhentas no Brasil são agrupadas em quatro gêneros (DE AZEVEDO-MARQUES et al., 2003), quais sejam:

- *Bothrops*: são as jararacas, jararacuços,urutus, etc. e fazem parte da família *Viperidae* (Figura 5). São responsáveis por cerca de 90% dos acidentes em todo o Brasil (BRASIL, 1998; DA SILVA; 2003). Seu veneno possui três atividades principais: 1) proteolítica ou necrosante, determina edema inflamatório na região da picada; 2) coagulante, atua através de uma ou mais ações como trombina símile, ativadora de protrombina e do fator X, promovendo consumo dos fatores de coagulação com conseqüente alteração da coagulação sanguínea; 3) hemorrágica, atuando no endotélio vascular tanto na região da picada como em outros locais, causando desde aumento na permeabilidade até a ruptura levando a sangramento (RIBEIRO et al., 2001; DE AZEVEDO-MARQUES et al., 2003). Distúrbios funcionais permanentes e até mesmo perda do membro acometido podem ocorrer (RIBEIRO; JORGE, 1997; JORGE et al., 1999). O óbito ocorre em casos de envenenamentos graves em pacientes que apresentam insuficiência renal, respiratória e choque (RIBEIRO et al., 1998; BARBOSA et al., 2002).

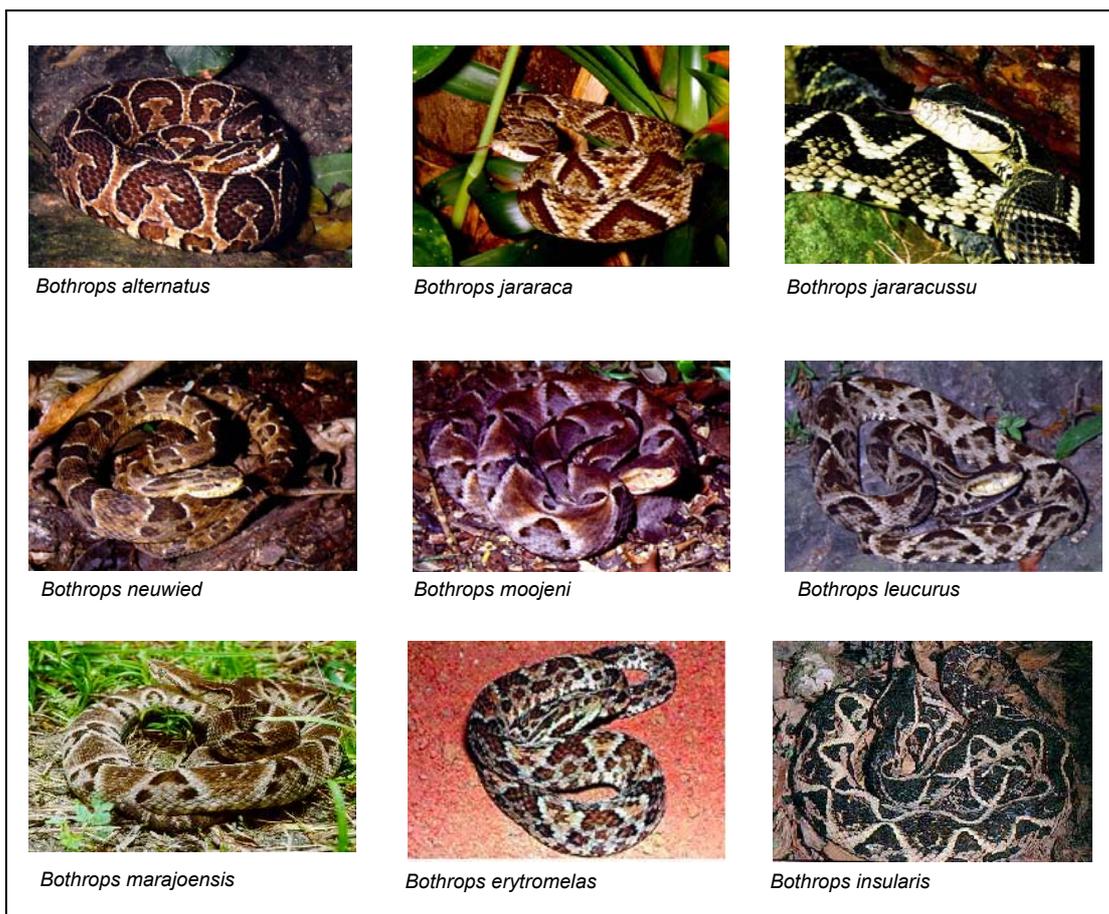


Figura 5 - Serpentes do gênero *Bothrops*

Fonte: <http://www.ivb.rj.gov.br>; www.fmt-am.gov.br e www.static.hsw.com.br

- *Crotalus*: são cascavéis e apresentam como característica um chocalho na ponta de sua cauda (Figura 6). Fazem parte da família Viperidae e encontram-se em segundo lugar em termos de incidência de acidentes (8,94%) (BRASIL, 1998). Seu veneno apresenta ação neurotóxica, miotóxica e coagulante, sendo que a caracterização clínica mais evidente do envenenamento crotálico é decorrente da ação neurotóxica, chamada *faces miastênica*. Neurotoxinas (crotoxina, convulxina, giroxina e crotamina) de ação pré-sináptica, atuando nas terminações nervosas, inibem a liberação de acetilcolina, promovendo paralisias motoras, perturbações circulatórias e respiratórias (DE AZEVEDO-MARQUES et al., 2003). O veneno crotálico também promove ação miotóxica, provocada por fosfolipase A₂ e crotapotina, produzindo lesões de fibras musculares esqueléticas sistemicamente (rabdomiólise), levando à liberação de enzimas e mioglobina para o sangue, as quais são excretadas na urina (SILVEIRA et al., 1992; DE AZEVEDO-MARQUES et al., 2003).

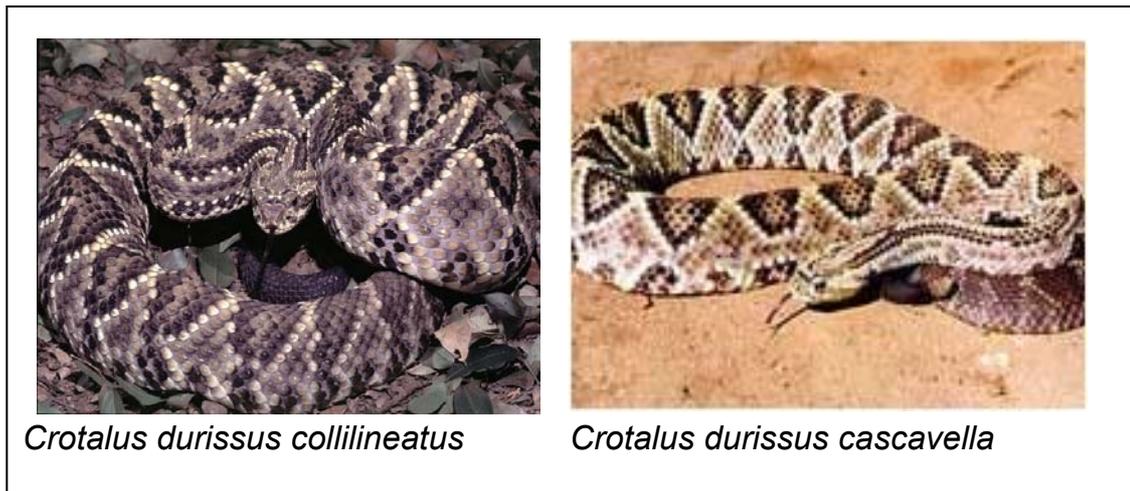


Figura 6 - Serpentes do gênero *Crotalus*

Fonte: www.latoxan.com; www.static.hsw.com.br

- *Lachesis*: são conhecidas como surucucu, apresentando espinhos na região posterior da cauda e também fazem parte da família Viperidae (Figura 7). Os acidentes laquéuticos relatados no Brasil são poucos, representando apenas 2,39% do total de acidentes (BRASIL, 1998). Seu veneno apresenta características semelhantes ao das jararacas, possuindo ação coagulante, necrosante e vasculotóxica (BARRAVIERA, 1994). Esta é a maior serpente venenosa das américas.



Figura 7 - Serpente do gênero *Lachesis*

Fonte: <http://www.ivb.rj.gov.br>

- *Micrurus*: são as corais verdadeiras e fazem parte da família Elapidae (Figura 8). São poucos os casos de envenenamento por estas serpentes em humanos (0,63%) (BRASIL, 1998), porém são acidentes extremamente graves. Seu veneno apresenta ação neurotóxica e miotóxica. As neurotoxinas elapídicas atuam rapidamente na junção mioneural, podendo ser pré-sinápticas ou pós-sinápticas, mostrando ação semelhante ao curare (DE AZEVEDO-MARQUES et al., 2003).

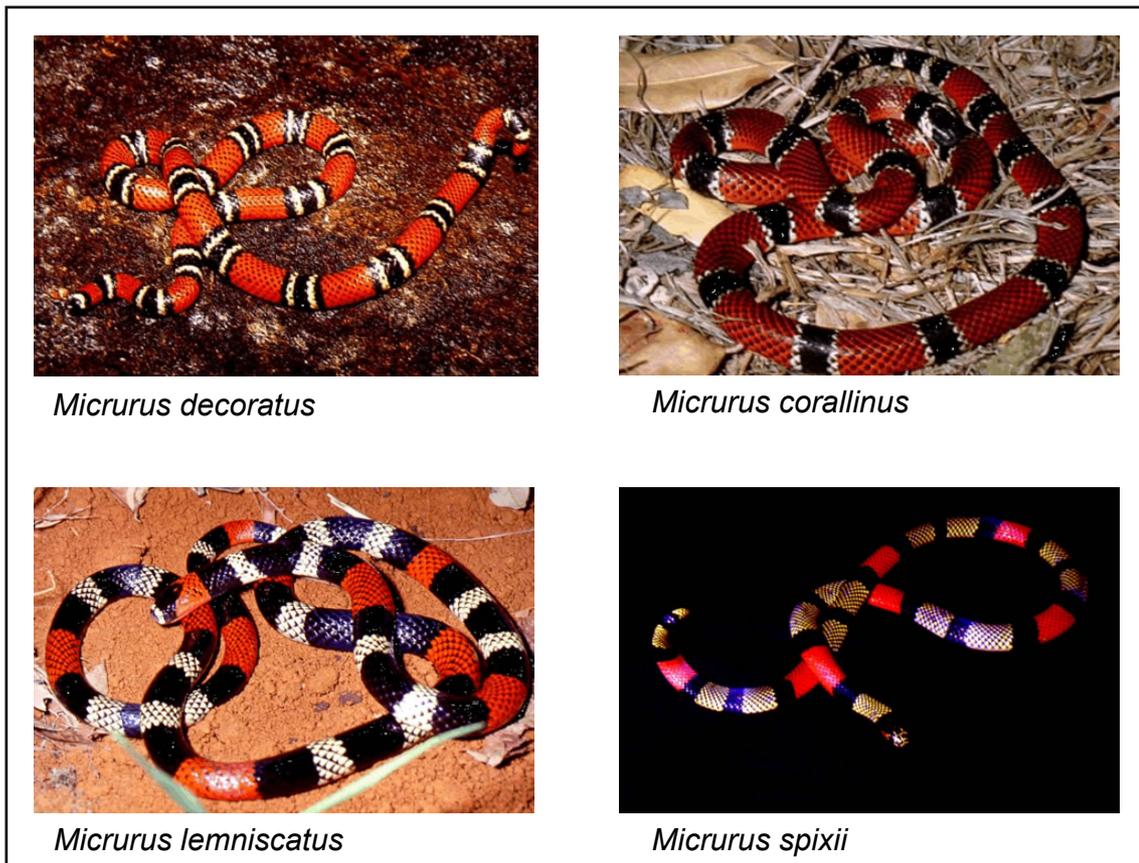


Figura 8 - Serpentes do gênero *Micrurus*

Fonte: <http://www.ivb.rj.gov.br>

1.2.1 Serpentes do gênero *Bothrops* e seu potencial antimicrobiano

No Brasil, o gênero *Bothrops* possui ampla distribuição e corresponde ao grupo de serpentes peçonhentas mais importantes em número de espécies e densidade populacional. O gênero *Bothrops* compreende cerca de 20 espécies no Brasil, ocorrendo em todos os principais ecossistemas (QUEIROZ et al., 2008). As características de envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* são sério

dano muscular, hemorragia, coagulopatia, choque e insuficiência renal aguda, nos casos mais graves (BJARNASON; FOX, 1994; KAMIGUTI et al., 1996; GUTIÉRREZ, 2002; WHITE, 2005). Além disso, acredita-se que este efeito aumenta devido à ação sinérgica de enzimas proteolíticas, como metaloproteases e serina-proteases. A hemorragia ocorre não somente no sítio da picada, mas também sistematicamente, contribuindo para o choque cardiovascular, característico de envenenamento severo (WARRELL, 1995 apud MAZZI et al., 2004).

Na América do Sul, as serpentes do gênero *Bothrops* tem sido bem estudadas devido a sua predominância e importância médica em países como o Brasil, Colômbia, Equador, Venezuela, Bolívia e Peru (HIGUCHI et al., 2007). A composição dos venenos pode exibir variações associadas com a origem geográfica, habitat, variação sazonal, dieta, idade e gênero (MACKESSY et al., 2003; FURTADO et al., 2006). Em estudo com diferentes espécies Queiroz et al. (2008) demonstraram que estas serpentes apresentam potencial letal bastante variado, sendo os venenos das serpentes *B. castelnaudi*, *B. jararaca* e *B. neuwiedi* os mais letais, e os venenos de *B. atrox*, *B. hyoprurus*, *B. brazili* e *B. bilineatus* os menos tóxicos, dentre os estudados .

Várias substâncias têm sido isoladas dos venenos botrópicos, incluindo proteases, como serina e metaloproteases, PLA₂, LAAOs, lecitinas tipo-C (PÁRAMO et al., 1998; OSHIMA-FRANCO et al., 2004; KINI, 2006; FOX et al., 2006; FRANÇA et al., 2007).

A atividade antimicrobiana do veneno de serpentes vem sendo cada vez mais explorada e fornecendo bons resultados. Muitas PLA₂ revelam atividades biológicas, dentre elas ação antimicrobiana. A descoberta de variantes da PLA₂ no veneno de serpentes da família *Viperidae* (MARAGANORE et al., 1984), as quais possuem pouca ou nenhuma atividade catalítica, mas que ainda demonstram comparável toxicidade com os homólogos cataliticamente ativos, apresentam-se como instrumento importante para estudo, uma vez que essas proteínas possuem atividade que interferem no equilíbrio da membrana celular e que não está relacionado com mecanismos enzimáticos. A miotoxina II, uma PLA₂ cataliticamente inativa, encontrada no veneno da *Bothrops asper*, é bactericida para uma variedade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (PÁRAMO et al., 1998). Uma outra miotoxina II (MjTX-II), extraída do veneno da *B. moojeni*, apresentou ação contra *E. coli* e *C. albicans*, além de apresentar efeito antiparasitário sobre *Schistosoma*

mansoni e *Leishmania* ssp. (STÁBELI et al., 2006). Um estudo semelhante realizado com o veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* também evidenciou efeitos antibacterianos (RODRIGUES et al., 2004).

As LAAOs extraídas de venenos botrópicos também têm sido caracterizadas e mostram preferências por substratos, atividades apoptóticas, citotóxicas, hemolítica, atuação na agregação plaquetária, indução de hemorragia e uma variedade de atividades bactericidas. A balt-LAAO-I, uma LAAO, isolada do veneno *B. alternatus*, exibe uma atividade bactericida dose-dependente contra *E. coli* e *S. aureus* (STÁBELI et al., 2004). Izidoro et al. (2006) também verificaram atividade bactericida de uma LAAO (BpirLAAO-I), extraída do veneno de *B. pirajai*, sobre *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

Venenos do gênero *Bothrops* são potentes sobre *S. aureus*. Dentre eles os venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu* apresentam atividades bastante significativas. Estes venenos demonstram um amplo espectro de ação sobre Gram-positivo e Gram-negativo, mas bactérias como *E. coli* e *Enterococcus faecalis*, apresentaram resistência. Tanto o veneno total da *B. jararaca* como sua fração LAAO (BjarLAAO-I) promoveram inibição de formas promatigotas de *L.(L.) amazonensis*, epimatigostas de *T. cruzi*, causando rompimento da membrana e desorganização mitocondrial. Este veneno também apresentou ação antiviral sobre o vírus da Dengue (SANT'ANA et al., 2008; CISCOTTO et al., 2009). Dentro deste contexto outros venenos botrópicos têm apresentado substâncias com potencial antiparasitário. A LAAO do veneno da *B. pirajai* apresenta atividade leishmanicida dose-dependente, onde a *L. brasiliensis* se mostrou o tipo mais susceptível ao efeito (IZIDORO et al., 2006). Do mesmo modo o veneno de *B. moojeni*, bem como a LAAO extraída deste veneno inibiu o crescimento de *Leishmania (L.) amazonensis*, *L.(L.) panamensis* e *L. (L.) chagasi* (TEMPONE et al., 2001), bem como apresentou ação tripanocida (STÁBELI et al., 2007). Neste sentido Gonçalves et al. (2002) verificaram que o veneno de *B. jararaca* é capaz de inibir o crescimento de *Leishmania major* e do *Trypanossoma cruzi*.

A descoberta do potencial antimicrobiano não apenas do veneno de serpentes, mas também do veneno de outros animais, encontra um importante cenário no contexto atual, onde a resistência bacteriana é bastante emergente. Assim novas substâncias, que superem este problema, se fazem cada vez mais necessárias.

1.3 Infecções bacterianas

A diarreia é ainda uma doença muito prevalente e um importante problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento. Doenças diarreicas são a segunda maior causa de morte em crianças com menos de cinco anos de idade. São causados principalmente por microorganismos enteropatogênicos, sendo o principal deles a *Escherichia coli* (DE ANDRADE et al., 1999; FAGUNDES-NETO; SKALETSKY, 2000). A *Salmonella sp.* também está bastante envolvida em casos de diarreia, devido a infecções alimentares. Ela é uma bactéria entérica, responsável por graves intoxicações alimentares, onde se desenvolve quadros de infecção gastrointestinal, tendo como sintomas dores abdominais, febre baixa e vômitos (SHINOHARA et al., 2008). No Rio Grande do Sul, entre 1987-2000, foram investigados 1.298 surtos de doenças transmitidas por alimentos, onde se observou que desde 1993, a salmonelose tem sido a doença transmitida por alimentos de maior ocorrência (RIO GRANDE DO SUL, 2001).

O coeficiente de mortalidade infantil por diarreia no Brasil apresentou um declínio nas últimas décadas. No ano 2000, o coeficiente de mortalidade infantil em Fortaleza, Ceará, foi de 23,3/1000 nascidos vivos e por diarreia foi de 0,95 (FAÇANHA; PINHEIRO, 2005). Embora tenha havido uma diminuição no número de casos, o índice de mortalidade infantil por diarreia ainda permanece alto.

Outro problema são as infecções das vias urinárias, geralmente causadas por bactérias da microbiota intestinal do paciente. Em 85-90% dos casos o agente etiológico é a *Escherichia coli*, seguido por *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Stafilococcus* e *Streptococcus faecalis* (GODOY, 2000; CHAVES, 2003). Em casuísticas de infecções urinárias por leveduras a *Candida albicans* tem sido considerada a espécie mais comumente encontrada, sendo responsável por cerca de 50-70% dos episódios e outras espécies de leveduras não-albicans têm sido relatadas em 8-28% dos casos (KAUFFMAN et al., 2000). A *Candida albicans* também provoca infecções na pele e membranas mucosas, podendo ser causa de infecções hospitalares (infecções nosocomiais) da corrente sanguínea.

A *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* têm sido encontradas em casos de peritonite bacteriana espontânea, definida como infecção do líquido de ascite em pacientes com cirrose (SUCH; RINYON, 1998). Em estudo realizado por De

Almeida et al. (2007) também foi verificada a presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis* neste tipo de infecção. Neste mesmo estudo observou-se a prevalência de *Staphylococcus aureus* metilina-resistente, tendo a resistência deste patógeno às quinolonas e ao sulfametoxazol-trimetoprim evoluindo de 25-50%, no período do estudo. Observou-se também que a ocorrência de *Escherichia coli* resistente às cefalosporinas de 3º geração e às quinolonas aumentou em cerca de 16%.

As infecções hospitalares sempre despertaram a preocupação das equipes de saúde. Em 1996, o sistema NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance), conduzido pelo programa de infecções hospitalares do CDC (Centers for Disease Control and Prevention) nos EUA descreveu a *Pseudomonas aeruginosa* como a principal causa de infecção hospitalar dentre os patógenos relacionados com a pneumonia em Unidade de Terapia Intensiva (RICHARD et al., 1999). A *Pseudomonas aeruginosa* aparece ainda como o quarto agente de infecção de sítio cirúrgico, o quinto de infecções hospitalares em geral e o sexto em infecções da corrente sanguínea (NNIS, 1996). No Brasil, segundo Sader et al. (2001), a situação é a mesma, destacando-se nos casos de pneumonia. O *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa* têm sido relatados como mais frequentes nas bacteremias de origem pulmonar (GUILARDE et al., 2007). Um estudo realizado no Hospital das Clínicas da Escola de Medicina de Ribeirão Preto mostrou que a *Escherichia coli* (26%), *Klebsiella sp.* (15%), *Pseudomonas aeruginosa* (15%) e *Enterococcus sp.* (11%) estão envolvidos em infecção do trato urinário adquiridas em hospitais (NETO et al., 2003). Um outro estudo realizado na Unidade de Queimados do Hospital Regional da Asa Norte, Brasília-DF, no período de 2001-2002, revelou que as principais causadoras de sepse em queimados foram *S. aureus* (46,5%), *Acinetobacter baumannii* (12,1%), *Enterobacter cloacae* (12,1%), *Klebsiella pneumoniae* (8,6%) e *Pseudomonas aeruginosa* (6,9%). Neste estudo também foram verificados casos envolvendo *Candida sp.* (MACEDO et al., 2005).

As infecções da corrente sanguínea no ambiente hospitalar geralmente são indicativas de eventos graves com letalidade atribuída em torno de 35% (ORSI et al., 2002). Guilarde et al. (2007) em estudo realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás verificaram que o patógeno mais frequente em bacteremias é o *Staphylococcus aureus*; para o qual se tem observado elevada incidência de cepas multiresistentes a antibióticos como metilina, oxacilina e

vancomicina (CASSETTARI et al., 2005; MIMICA; MENDES, 2007). A resistência à esses antibióticos é crescente e atinge níveis alarmantes e endêmico ao redor do mundo, principalmente em grandes hospitais (CASSETTARI et al., 2005). O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria do grupo dos cocos Gram-positivos que faz parte da microbiota humana, mas que pode provocar doenças que vão desde uma infecção simples como espinhas e furúnculos, até mais graves, como pneumonia, meningite, endocardites, síndrome de choque tóxico e septicemia. Essa bactéria foi uma das primeiras a serem controladas com a descoberta dos antibióticos, mas, devido a sua enorme capacidade de adaptação e resistência, tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro de infecções hospitalares e comunitárias (DOS SANTOS et al., 2007).

Os principais efeitos dos antibióticos são (i) indução da morte do agente patogênico (efeito bactericida); e/ou (ii) inibição do crescimento microbiano (efeito bacteriostático). Seus alvos são essenciais nos processos biossintéticos dos microorganismos (BROWN, 2004 apud DE LIMA et al., 2005). Dentre eles a inibição da síntese da membrana celular e interferências em ligações nucleotídicas e peptídicas, interferem diretamente na replicação cromossômica e síntese protéica das bactérias (Figura 9). Embora existam antibióticos extremamente efetivos, eles são capazes de induzir resistência nos microorganismos. Segundo Livermore (2007) o processo de resistência a antibióticos é cumulativo e fornece a mais dramática demonstração de seleção Darwiniana, com sérias implicações práticas. Por mais de 50 anos, a resistência bacteriana tem sido o principal fator responsável pelo aumento da morbidade/mortalidade e dos custos para os sistemas de saúde com infecções bacterianas (PARAJE et al., 2004). Os antibióticos são “reconhecidos” por bactérias resistentes ou que adquiriram resistência via mutação ou transferência de DNA. Isto se torna mais grave devido ao fato de que (i) muitos plasmídeos determinam resistência a várias classes de antibióticos e; (ii) algumas mutações restringem a permeabilidade da membrana bacteriana ou regulam bombas de efluxo, comprometendo diversas classes de antibióticos (LEVY, 2002). Assim, tratar as infecções causadas por esses agentes vem se tornando uma tarefa cada vez mais desafiadora.

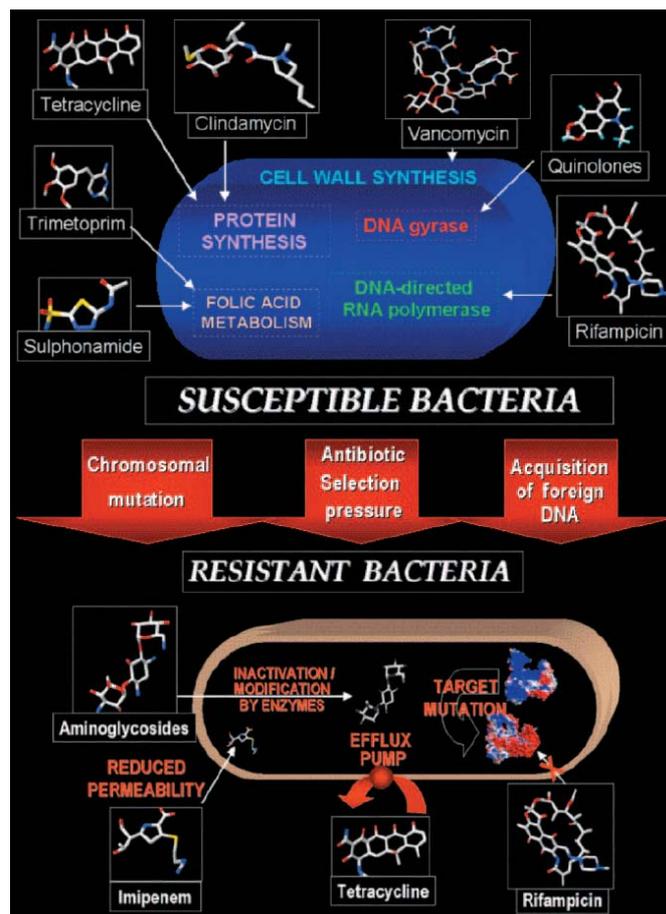


Figura 9 - Representação esquemática de bactérias resistentes
 Fonte: De Lima et al. (2005)

Relatos de redução da susceptibilidade da *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos vêm sendo publicados tanto no Brasil como em outros países, destacando-se a diminuição de susceptibilidade aos antibióticos de maior espectro de ação como os carbapenêmicos e cefalosporinas (LI et al., 2000; RAJA; SINGH, 2007). Figueiredo et al. (2007) observaram elevada prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes, inclusive com significativos níveis de resistência cruzada entre os beta-lactâmicos (carbapenêmicos e piperacilina/tazobactam) e os aminoglicosídeos e quinolonas, refletindo dificuldades nas opções de associação e antimicrobianos para tratamentos combinados.

Apesar dos avanços tecnológicos em relação ao desenvolvimento de drogas com maior potencial antibacteriano, suas características naturais de resistência mantêm os diversos microorganismos em papel de destaque frente às dificuldades terapêuticas. A microbiologia tem contribuído para o entendimento epidemiológico desses eventos ao identificar a origem clonal das bactérias, permitindo correlacionar eventuais fatores, como: colonização e infecção, contaminação ambiental e

mudança no padrão de sensibilidade antimicrobiana. Este último fator é preocupante, visto que a perda de sensibilidade em curto espaço de tempo não é correspondida à velocidade em que novos antimicrobianos podem ser lançados no mercado, deixando os pacientes expostos a infecções com poucas possibilidades de tratamento.

1.4 Leishmanioses

As leishmanioses apresentam incidência importante e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados, crianças desnutridas e pessoas com HIV. Estima-se que as leishmanioses atingem cerca de 12 milhões de pessoas, com 400.000 novos casos/ano. É prevalente em 88 países (WHO, 2004). Tem ampla distribuição ocorrendo na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e nas Américas. Na América Latina, a doença já foi descrita em 12 países, sendo que o Brasil ocupa lugar de destaque, especialmente na região Nordeste (BRASIL, 2004). Mais de 3000 novos casos leishmaniose visceral americana (LVA) são notificados todo ano em cerca de 20 estados brasileiros (BRASIL, 2008). O nordeste representa 70-90% da população parasitada, especialmente Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão, apresentando prevalência de 25 casos/100 mil habitantes. Um estudo realizado no Hospital Albert Sabin, em Fortaleza, CE, revelou que 450 pacientes com confirmação de LVA foram internados no período de 1995-2000, ocorrendo 39 mortes (REY et al., 2005). Somente no primeiro semestre de 2007 foram notificados dez casos de morte por leishmaniose visceral (Calazar) no Ceará (GOMES, 2007). Assim, de acordo com a relevância e morbidade, esta doença foi considerada um importante problema de saúde pela Organização Mundial de Saúde, o que, estatisticamente, foi mostrado por ser a segunda principal parasitose do mundo (RATH et al., 2003).

As leishmanioses apresentam duas variantes: a Leishmaniose tegumentar e a Leishmaniose visceral, também conhecida como Calazar (SÁ, 2006). A Leishmaniose visceral, mais frequentemente causada pela *L. chagasi*, é uma doença febril, de curso prolongado, caracterizada por palidez, emagrecimento, aumento do volume abdominal, hepatoesplenomegalia e edema (WHO, 1982) (Figura 10a). Suas manifestações clínicas refletem o desequilíbrio entre a

multiplicação dos parasitos nas células do sistema fagocítico mononuclear, a resposta imunológica do individuo e o processo inflamatório subjacente. Nos casos mais graves o óbito é determinado por infecções bacterianas e/ou sangramento (BRASIL, 2008). Já a Leishmaniose tegumentar (Figura 10 b, c, d), comumente causada pela *L. amazonensis* e *L. brasiliensis*, é uma doença polimórfica da pele e mucosas com lesões ulcerativas simples ou múltiplas (forma simples cutânea), lesões nodulares (forma difusa) ou lesões mucocutâneas (forma cutânea disseminada), acometendo, principalmente a região da nasofaringe (MAYRINK et al., 2006; LESSA et al., 2007). Quando a destruição dos tecidos é importante, podem ocorrer perfurações do septo nasal e/ou palato (BRASIL, 2008). A droga de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (BALAÑA-FOUCE et al., 1998), com resistência clínica, falhas no tratamento e elevada toxicidade discutidos em vários estudos (BERMAN et al., 1982; ANACLETO et al., 2003; COELHO et al., 2004; FADILI et al., 2005; MAYRINK et al., 2006). As leishmanioses são transmitidas aos seres humanos através da picada por um inseto hematófago fêmea do gênero *Lutzomyia* (MAYRINK et al., 2006).

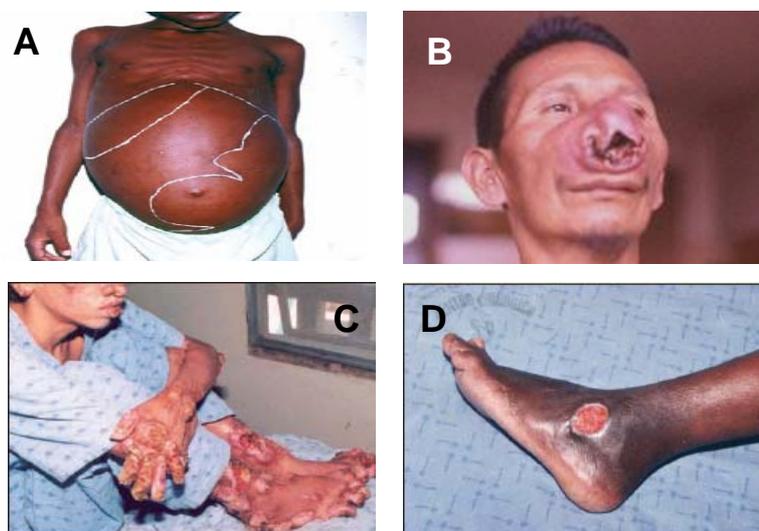


Figura 10 - Leishmaniose visceral (A); Leishmaniose mucocutânea, lesão na mucosa nasal (B); Leishmaniose cutânea difusa, lesões múltiplas ulceradas (C); Leishmaniose cutânea, lesão única com bordos elevados (D)

Fonte: (BRASIL, 2006a, 2006b)

A *Leishmania sp.* apresenta um ciclo de vida heteroxêmico (Figura 11), estando intimamente associados à vida entre vertebrados (mamíferos) e insetos vetores. Estes parasitos apresentam duas formas de vida: (i) promastigota (extracelular) e, (ii) amastigotas (intracelular) (SIQUEIRA, 2000). Eles têm desenvolvido uma variedade de mecanismos adaptativos para viver dentro do hospedeiro vertebrado e evadir-se da resposta imune, como a inibição das moléculas MHC (DE SOUZA LEAO et al., 1995), citocinas pró-inflamatórias (JARDIM et al., 1995) e radicais livres de oxigênio (PASSWELL et al., 1994), e estas ações são relatadas para muitas moléculas da *Leishmania sp.* Estas moléculas, em muitos casos, podem também modificar a resposta inflamatória, através da geração de precursores benéficos ou não benéficos de mediadores inflamatórios, como eicosanóides, para os quais a função na leishmaniose não está clara (PASSERO et al., 2008).

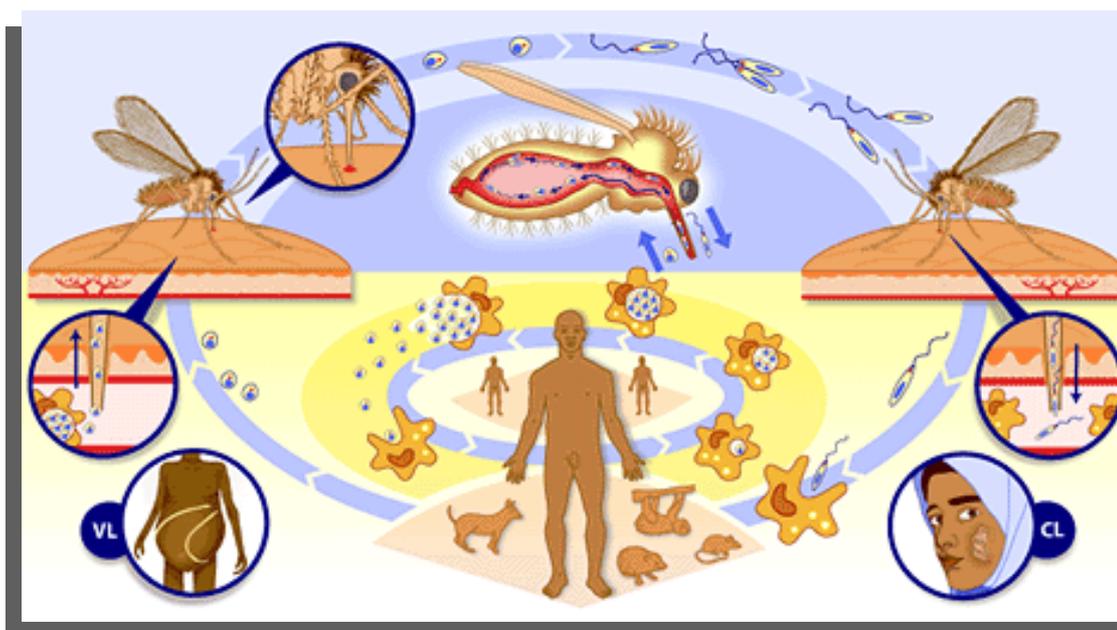


Figura 11 - Ciclo de vida de *Leishmania*
Fonte: (WHO, 2007)

1.5 Doença de Chagas

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 9,8 milhões de pessoas são atingidas pela Doença de Chagas na América Latina e outras 40 milhões ainda permanecem expostas à infecção (WHO, 2003). No Brasil, são cerca de 2-3 milhões de infectados, sendo que morrem aproximadamente 5 mil

por ano (GARCIA et al., 2007). A Região Nordeste (NE) ocupa importância acentuada, tendo sido a segunda em número de infectados e de índices de infestação triatomínica (CASTRO FILHO; SILVEIRA, 1984; FERREIRA et al., 1999). Nesta região já foram identificadas quase 30 espécies ou subespécies de triatomíneos transmissores do *Trypanosoma cruzi*, protozoário hemoflagelado e agente causal da Doença de Chagas, correspondendo a mais da metade daquelas detectadas em todo o país (CARCAVALLO et al., 1997; SILVA et al., 2007). Atualmente é a região mais preocupante e de mais difícil controle em todo o país, uma vez que é a região endêmica com maiores problemas presentes e futuros, além de abrigar focos periurbanos de triatomíneos já detectados nas periferias de várias cidades com destaques, no Ceará, para os municípios de Crateús, Sobral e Independência (DIAS et al., 2000).

O *T. cruzi* é transmitido através dos insetos triatomíneos, sendo estes classificados em mais de cem espécies, responsáveis pela transmissão natural da infecção, intervindo diretamente na sua veiculação no ambiente domiciliar ou participando na manutenção da enzootia chagásica (SCHMUNIS, 1997). As principais espécies vetoras são os insetos *Triatoma infestans*, *Triatoma brazilienses* e *Rhodnius prolixus*. No Nordeste do Brasil, conhece-se cerca de 27 espécies ou subespécies de triatomíneos transmissores do *T. cruzi*, correspondendo a mais da metade daquelas detectadas no Brasil (CARCAVALLO et al., 1997).

O *T. cruzi* possui um ciclo monoxêmico, diferenciando-se em três estágios, epimastigotas no intestino superior do inseto, forma replicativa e não infectante; tripomastigota, presente na porção posterior do intestino, sendo a forma não replicativa e infectante da corrente sanguínea e; amastigota, forma intracelular (ABE et al., 2002a; CESTARI, 2006). A infecção ocorre no momento da picada, quando o inseto defeca no hospedeiro, e o ato de coçar o local, que é estimulado pela substância irritante liberada pelo barbeiro, provoca a inoculação do *T. cruzi* (CESTARI, 2006). Após a infecção, os parasitas são capazes de sobreviver e reproduzir-se em uma variedade de células nucleadas, incluindo macrófagos inativos (SILVA et al., 2007), na forma amastigota. Após vasta reprodução no interior dessas células, os protozoários retomam a forma de tripomastigota e lisam a célula hospedeira, voltando para a circulação. A transmissão ocorre quando um triatomíneo se alimenta de sangue contaminado e pica outro indivíduo, reiniciando o ciclo (CESTARI, 2006) (Figura 12).

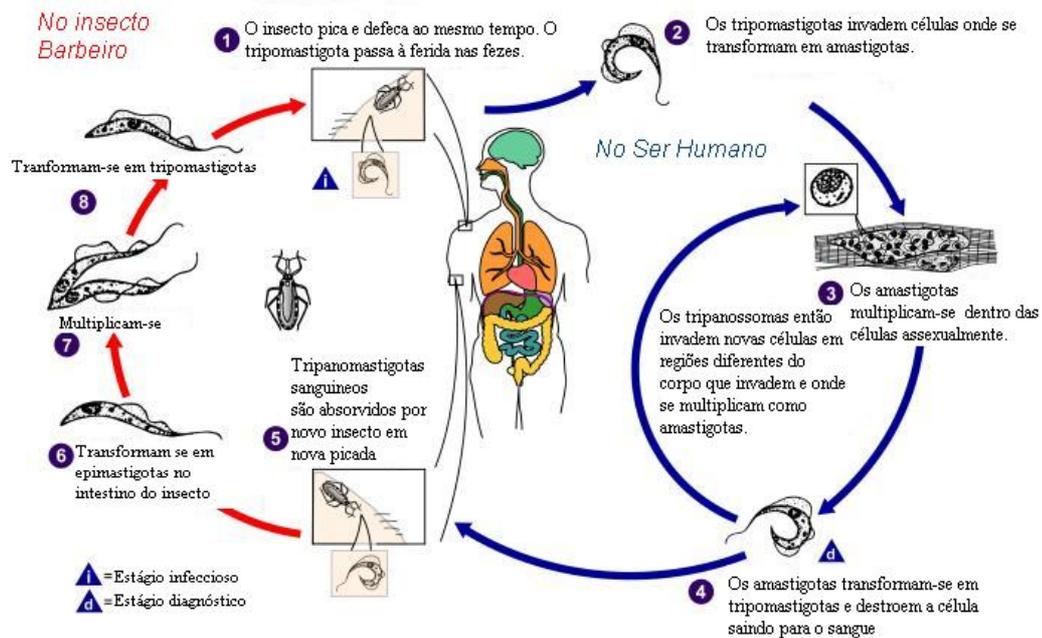


Figura 12 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.
 Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Trypanosoma_cruzi)

Segundo Coura (2007), os principais mecanismos de transmissão da Doença de Chagas são por meio dos vetores (insetos triatomíneos), sangue, por via oral, através da placenta ou no momento do parto, transplante de órgãos, acidentes laboratoriais, contato com animais infectados, por via sexual ou infecção criminalmente induzida por inoculação. Têm ocorrido avanços substanciais no controle da doença, principalmente combatendo o vetor triatomíneo com inseticidas. Apesar disso a Doença de Chagas permanece sendo um problema de saúde pública (FERRAZ et al., 2007).

A Doença de Chagas pode se apresentar em duas fases clínicas definidas. A fase aguda apresenta parasitemia evidente sob observação direta do sangue. Em muitos casos, não há sintomas, mas os casos sintomáticos apresentam sinais no local da infecção, como chagoma de inoculação e sinal de Romaña (Figura 13), febre, adenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite em casos graves. Isso é seguido por uma fase crônica, que em muitos casos apresenta uma forma indeterminada (assintomática e com resultados normais para eletrocardiograma e raio-x de coração, esôfago e cólon), que pode

envolver formas cardíacas, digestivas ou mistas (COURA, 2007). É uma doença crônica, na qual, em estágios avançados, até 30% dos pacientes são conduzidos à morte por disritmias, falha cardíaca congestiva, megaesôfago, megacólon (ABE et al., 2002b).



Figura 13 - Sinal de Romaña

O Nifurtimox (NFX) e o Benzonidazol (BZ), são drogas sintéticas usadas no tratamento da doença de Chagas. Ambas possuem limitada eficácia durante a fase aguda (76%) e crônica (8%) (CANÇADO, 2002). Ambas são derivados tóxicos nitrogenados heterocíclicos usados para o tratamento a longo prazo (ABE et al., 2002b).

A presença de cepas naturalmente resistentes ao BZ e ao NFX pode ser um importante fator que explica o baixo nível de cura apresentado por alguns pacientes com doença de Chagas (FERRAZ et al., 2007). Estas duas drogas mostraram efeitos colaterais importantes e indícios de cura parasitológica em torno de 60% nos casos agudos, porém pouco expressivos nos casos crônicos. Vale ressaltar ainda a necessidade de emprego destas medicações em esquemas posológicos prolongados, durante pelo menos 60 dias (COURA et al., 1997). O benzonidazol apresenta efeitos colaterais graves tais como agranulocitose, púrpura trombocitopênica, depressão da medula óssea, polineuropatias, parestesias e polineurites de nervos periféricos (COURA; CASTRO, 2002). Teixeira et al. (1990, 1994) tem chamado a atenção para o surgimento de linfomas com atividade mutagênica e carcinogênica em animais experimentais tratados com esta medicação. Por outro lado, o alopurinol e os antifúngicos cetoconazol, fluconazol e

itraconazol, em testes clínicos, mostraram resultados pobres, nulos ou controversos para o tratamento da fase crônica da doença de Chagas (APT et al., 1998). Neste sentido, também pouco é conhecido a influência dos parâmetros do hospedeiro relacionado à falha da terapêutica. Um dos maiores fatores que podem interferir na eficácia do tratamento é a resposta imunológica do hospedeiro através da ação cooperativa com a droga (ROMANHA et al., 2002).

Tendo em vista o potencial biotecnológico de venenos e toxinas, aliado à necessidade de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de processos infecto-parasitários, encontramos um campo de pesquisa promissor a ser explorado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antibacteriana, antifúngica, bem como o efeito leishmanicida e tripanocida dos venenos das serpentes *Bothrops leucurus* e *Bothrops marajoensis* e suas frações fosfolipase A₂ e L-amino ácido oxidase.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o potencial antimicrobiano e antiparasitário dos venenos de *B. leucurus* e *B. marajoensis* e suas frações PLA₂ e LAAO sobre cepas de referência depositadas na ATCC;

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos venenos de *B. leucurus* e *B. marajoensis* e suas frações PLA₂ e LAAO sobre as cepas microbianas de referência depositadas na ATCC;

- Determinar a Concentração Letal Mínima (CLM) dos venenos de *B. leucurus* e *B. marajoensis* e suas frações PLA₂ e LAAO sobre as cepas microbianas de referência depositadas na ATCC;

- Avaliar o possível efeito citotóxico dos venenos de *B. leucurus* e *B. marajoensis* e suas frações PLA₂ e LAAO sobre formas promastigotas de *Leishmania sp.*;

- Avaliar o possível efeito citotóxico dos venenos de *B. leucurus* e *B. marajoensis* e suas frações PLA₂ e LAAO sobre formas epimastigotas de *Trypanossoma cruzi*;

- Avaliar a toxicidade dos venenos de *B. leucurus* e *B. marajoensis* e suas frações PLA₂ e LAAO sobre macrófagos murinos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Venenos e frações

Os venenos das serpentes *Bothrops leucurus* e *Bothrops marajoensis*, bem como suas frações fosfolipase A₂ e L-aminoácido oxidase foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Marcos Hiraki Toyama, Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Campus do Litoral Paulista, Unidade de São Vicente. Para a realização dos ensaios foi preparada uma solução stock (2mg/mL) dos venenos ou frações em tampão fosfato salina (PBS), pH 7.4, estéril.

3.2 Ensaio para determinação do potencial antimicrobiano

3.2.1 Cepas microbianas

A atividade antibacteriana dos venenos das serpentes *Bothrops leucurus* e *Bothrops marajoensis* e de suas frações PLA₂ e L-aminoácido oxidase foi analisada sobre quatro cepas (*Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* sorotipo *choleraesuis* ATCC 10708, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P) e a atividade antifúngica foi analisada sobre a levedura *Candida albicans* ATCC 10231. Todas as cepas são provenientes da ATCC e cedidas pela FIOCRUZ. Estas culturas foram estocadas de forma a conservarem inalteradas todas as suas características bioquímicas e perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Foram realizados repiques periódicos para meios de cultura esterilizados e a pureza de cada etapa foi confirmada por microscopia, provas bioquímicas e antibiograma.

3.2.2 Potencial antimicrobiano

O potencial antimicrobiano foi determinado através do método de difusão em ágar, de acordo com recomendações do NCCLS (2003a), com modificações. Culturas microbianas puras provenientes da coleção de microorganismos (item 3.1.1) e mantidas no *LabMicro* em ágar estoque sob refrigeração, foram repicadas para caldo BHI (Infuso de Cérebro e Coração) e incubadas a 35°C até atingirem a fase exponencial de crescimento (5-7h). Após esse período, a densidade microbiana de cada cultura foi ajustada de acordo com a turvação do tubo 0,5 da escala McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL). Com auxílio de *swabs* estéreis, essas suspensões foram semeadas na superfície do ágar Mueller-Hinton (cepas bacterianas) ou ágar Sabouraud-dextrose 2% (cepa de leveduras).

De acordo com a metodologia e para evitar resultados incorretos, a camada de agar na Placa de Petri apresentou de 3-4mm de espessura e foi semeada em três direções, para obtenção de um crescimento confluyente e homogêneo. Após cinco minutos, foram feitos poços no ágar, utilizando-se para isso um perfurador estéril, aos quais aplicou-se diferentes concentrações dos venenos e suas frações (2, 1, 0.5 e 0.25mg/mL), previamente preparados através diluições seriadas em tampão fosfato-salina (PBS) pH 7.4, estéril.

Agentes antimicrobianos de uso comercial foram usados como controles positivos (inibição do crescimento microbiano). Como controle negativo (não inibição do crescimento microbiano) utilizou-se o diluente dos agentes microbianos e das amostras. As placas de cultura foram mantidas por 30 minutos à temperatura ambiente, para facilitar a difusão das amostras no ágar e, em seguida, incubadas a 35°C/18h. Após incubação, realizou-se a leitura dos halos de inibição de crescimento microbiano com auxílio de paquímetro e os valores para esses halos foram obtidos através das médias das medidas, em milímetros, de três experimentos (Figura 14 e Quadro 1).

Quadro 1 - Grupos avaliados no ensaio de difusão em Agar. BleuVT = veneno total de *B. leucurus*; BleuPLA₂= fosfolipase A₂ de *B. leucurus*; BleuLAAO = L-aminoácido oxidase de *B. leucurus*; BmarVT = veneno total de *B. marajoensis*; BmarPLA₂= fosfolipase A₂ de *B. marajoensis*; BmarLAAO = L-aminoácido oxidase de *B. marajoensis*; Ctrl + = controle positivo (amicacina, para bactérias e cetoconazol para *C. albicans*); Ctrl - = controle negativo (PBS)

BleuVT	→ <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>C.albicans</i>
BleuPLA ₂	→ <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>C.albicans</i>
BleuLAAO	→ <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>C.albicans</i>
BmarVT	→ <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>C.albicans</i>
BmarPLA ₂	→ <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>C.albicans</i>
BmarLAAO	→ <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>C.albicans</i>
Ctrl +	→ <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>C.albicans</i>
Ctrl -	→ <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>C.albicans</i>

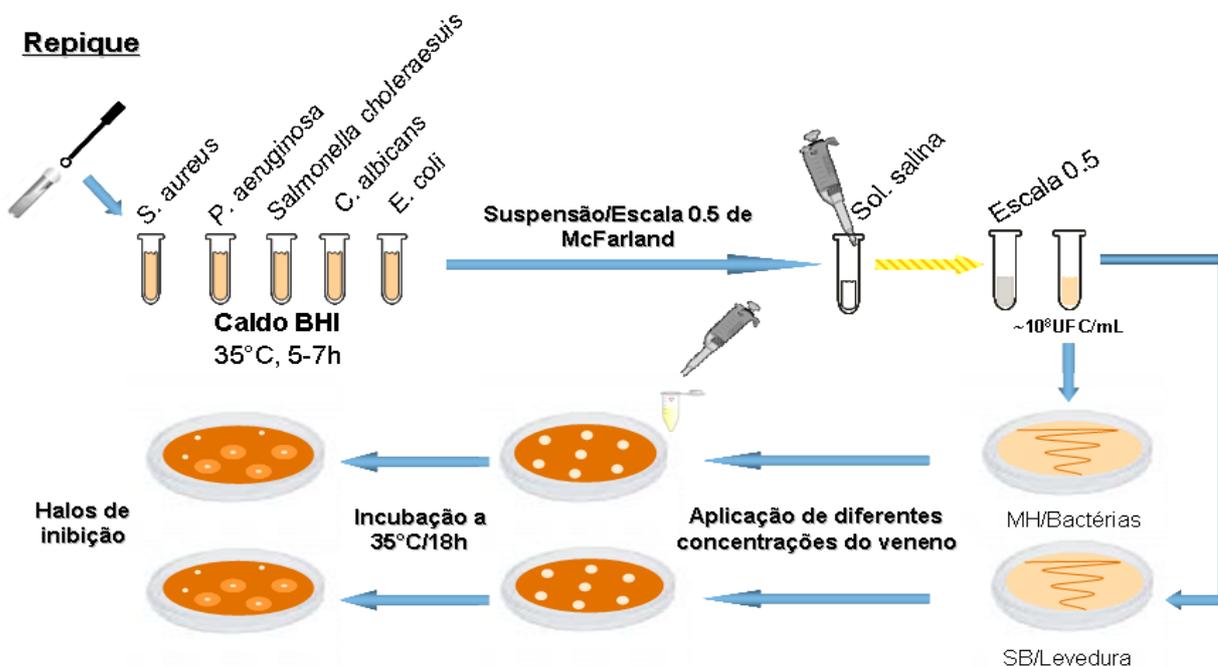


Figura 14 - Ensaio de difusão em ágar

3.2.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os venenos e frações que apresentaram potencial antimicrobiano quando testados pelo método da difusão em meio sólido (item 3.1.2) foram submetidos à determinação da CIM pelo método da Microdiluição em caldo (NCCLS, 2003b). As bactérias e levedura em estudo foram subcultivadas em caldo BHI e Sabouraud-dextrose, respectivamente. Ajustadas de acordo com o tubo 0.5 da escala de McFarland como descrito no item 3.1.2. As culturas microbianas foram diluídas 100x (aproximadamente 10^6 UFC/mL) em caldo BHI (bactérias) ou em caldo Sabouraud-dextrose (levedura). Estas suspensões foram subcultivadas, em placas d 96 poços, (125 μ L/poço) com diferentes concentrações dos venenos ou de suas frações PLA₂ e LAAO (25 μ L/poço) (100, 50, 25, 12.5 e 6.25 μ g/mL), previamente preenchidas (100 μ L/poço) com caldo BHI (bactérias) ou caldo Sabouraud-dextrose (levedura). Poços contendo meio de cultura, tampão PBS estéril (pH 7.4) e inóculo do microorganismo em estudo serviram como controle negativo; sendo o controle positivo poços contendo meio de cultura, um agente antimicrobiano de uso comercial e o inóculo do microorganismo em estudo. As placas foram então incubadas a 35°C/24h e a inibição do crescimento bacteriano foi determinada através da mensuração da absorbância a 490nm. A mais baixa concentração capaz de inibir o crescimento microbiano (ausência de turvação visível) foi considerada como CIM (Figura 15).

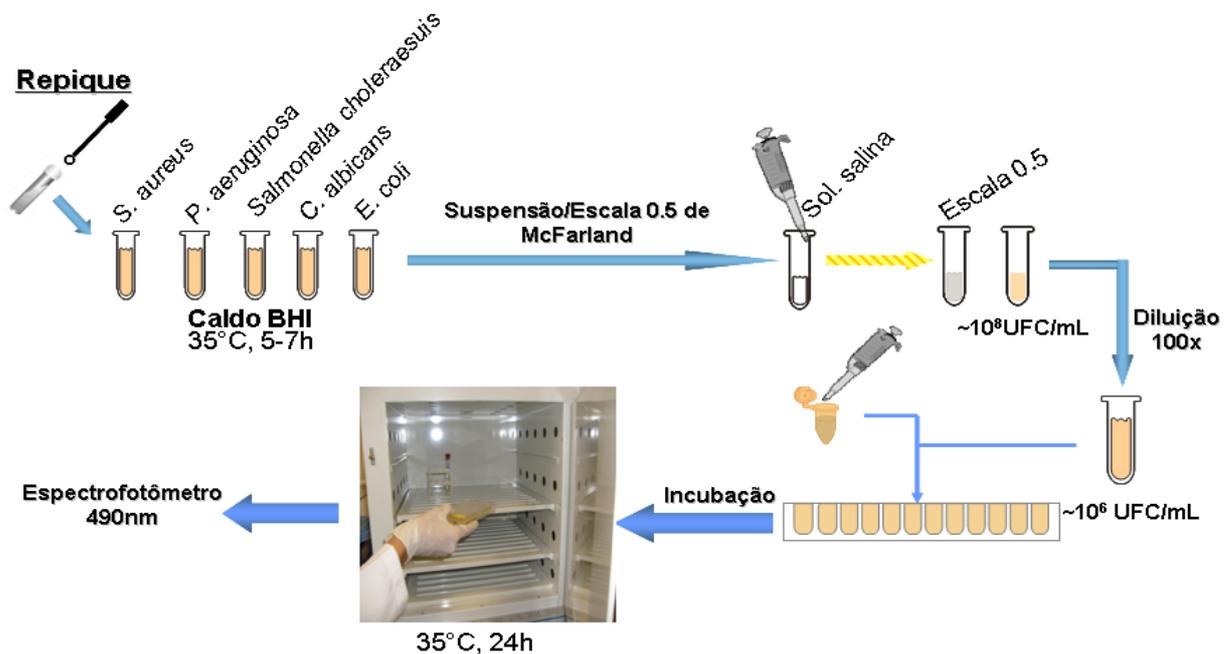


Figura 15 - Ensaio de microdiluição em caldo

3.2.4 Concentração Letal Mínima – CLM

Alíquotas de 25 μ L foram repicadas, de modo asséptico, dos poços usados na determinação da CIM (item 3.1.3) (àqueles que não apresentaram turvação visível) para Agar Plate Count. Após incubação durante 24h a 35°C foi realizada a contagem das colônias crescidas na superfície do meio (Figura 16). A concentração onde se observou um crescimento $\leq 0,1\%$ do inóculo adicionado foi considerada como a CLM, ou seja, a menor concentração de veneno ou fração com ação letal sobre a cepa testada (NCCLS, 2003b).

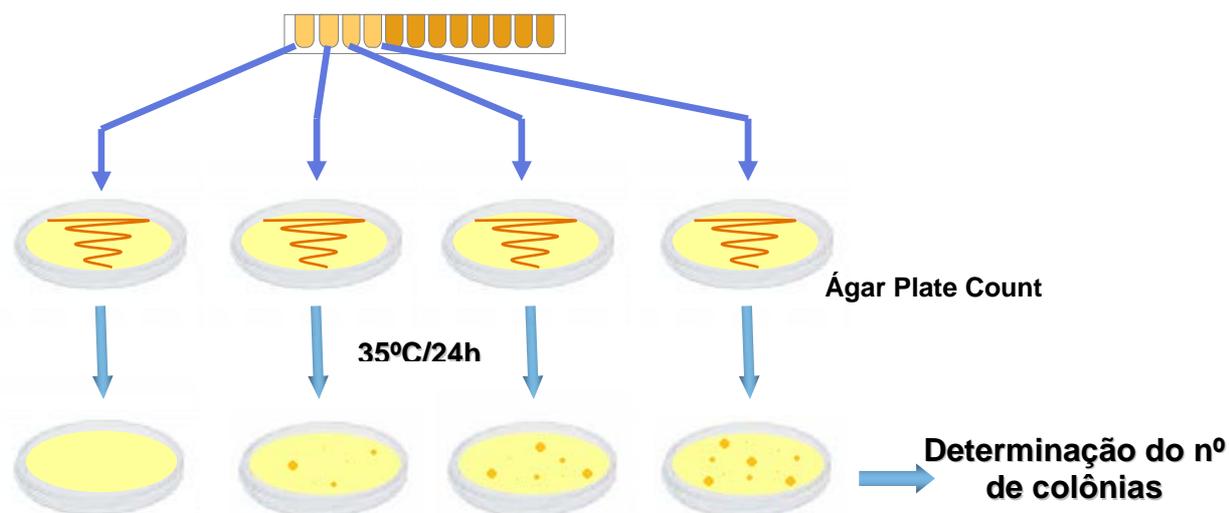


Figura 16 - Determinação da CLM a partir do ensaio de microdiluição em caldo

3.3 Ensaios antiparasitários

3.3.1 *Leishmania sp.* e sua manutenção *in vitro* e *in vivo*

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/IFLA/BR/67/PH8) cedida pela Professora Dra. Maria Norma Melo (Universidade Federal de Minas Gerais) e *Leishmania chagasi* (MCAN/BR/99/JP15) isolada de cão infectado cedido pelo Centro de Zoonoses do Município de João Pessoa – Paraíba. Os parasitas foram cultivados em meio de cultura NNN/SCHNEIDER, incubados a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e repicados semanalmente. Quando necessário, as formas promastigotas foram criopreservadas em freezer -80°C e em nitrogênio líquido no próprio meio acrescido de glicerol na proporção de 10%. A cepa de *Leishmania amazonensis* foi mantida “*in vivo*” em camundongos Suíços no Biotério do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da UFPB inoculados na pata posterior esquerda com formas promastigotas em fase estacionária de crescimento (OLIVEIRA et al., 1999).

3.3.2 Análise da atividade citotóxica sobre formas promastigotas de *Leishmania sp.*

Para a avaliação da atividade leishmanicida sobre as formas promastigotas, os parasitos foram repicados para tubos contendo meio NNN/SCHNEIDER com diferentes concentrações dos venenos ou suas frações, com inóculo inicial de 1×10^6 promastigotas/mL. Paralelamente foi analisado o crescimento do parasito na ausência dos compostos (controle). As formas promastigotas foram incubadas a $26^\circ\text{C}/72\text{h}$. Após este período foram retiradas alíquotas das suspensões, diluídas em solução isotônica (formaldeído, cloreto de sódio, ácido cítrico e água) e quantificadas em câmara de Neubauer. A quantificação foi feita por contagem direta do número de células por campo em microscópio óptico com aumento de 40x. A média de contagem foi utilizada para calcular o número de parasitas contido em 1mL de cultura. Para o cálculo foi utilizada a fórmula: N° de parasitas = média dos quatro quadrantes \times o inverso da diluição da amostra $\times 10^4$ (Figura 17).

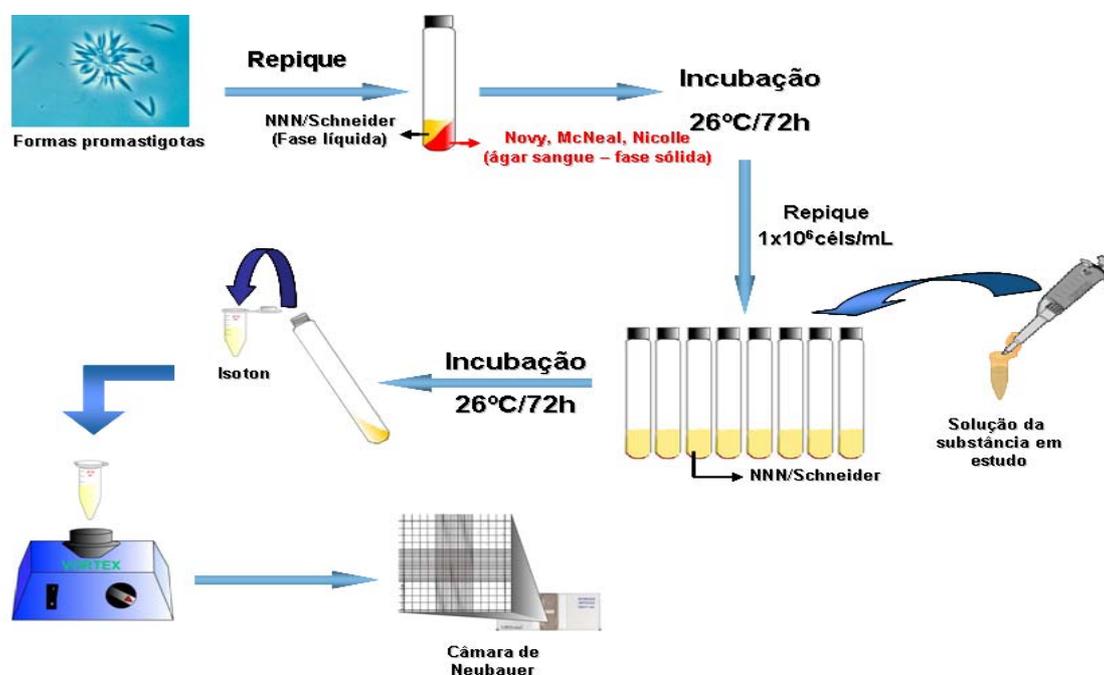


Figura 17 - Ensaio para atividade citotóxica sobre formas promastigotas de *Leishmania sp.*

3.3.3 Cultivo das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (*liver infusion tryptose*) de acordo com o procedimento descrito por Camargo (1964). Os parasitos foram mantidos a 28°C e repicados a cada 5–6 dias quando a concentração de parasitos, na fase logarítmica, atingiu a densidade de 5×10^7 a 10×10^8 parasitos/mL. Os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer, após diluição em formaldeído a 2% (v/v), em PBS.

3.3.4 O efeito citotóxico dos venenos e frações sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Para avaliar a ação tripanocida diferentes concentrações dos venenos ou de suas frações foram incubados em placas de microcultura, com inóculo inicial de 1×10^6 parasitos/poço, em meio LIT (*Liver infusion tryptose*), a 28°C/5 dias. Neste estudo foi tido como controle negativo cultura de parasitos em presença de tampão fosfato salina (PBS) (Figura 18). Após o período de incubação a quantificação foi realizada conforme descrito no item 3.2.2 para *Leishmania sp.*

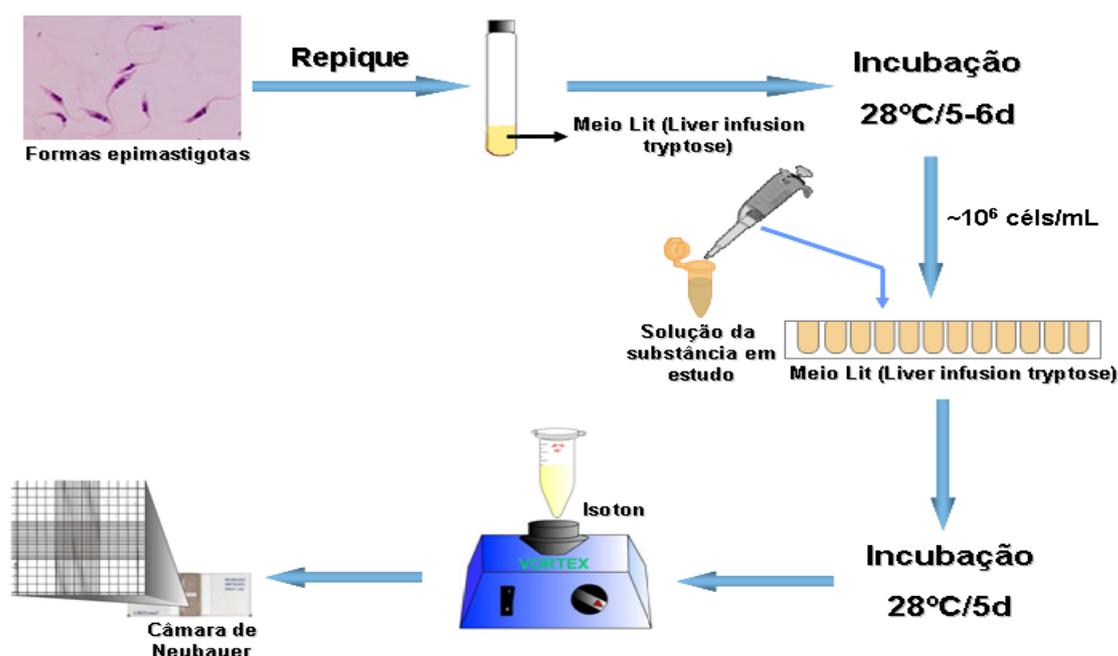


Figura 18 - Ensaio para atividade citotóxica sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*.

3.4 Avaliação da toxicidade sobre macrófagos murinos

3.4.1 Obtenção dos macrófagos peritoneais

Para a coleta dos macrófagos, foram utilizados camundongos suíços, machos com 8 a 10 semanas de idade, provenientes do Biotério Central, Campus do Pici/UFC. Os macrófagos foram extraídos da cavidade peritoneal dos camundongos após tratamento com solução de tioglicolato 4%. As células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado, e então ressuspensas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SBF, e penicilina/estreptomicina. Posteriormente as células foram quantificadas em câmara de Neubauer, na presença do corante azul de Trypan a 0,4% (Figura 19).

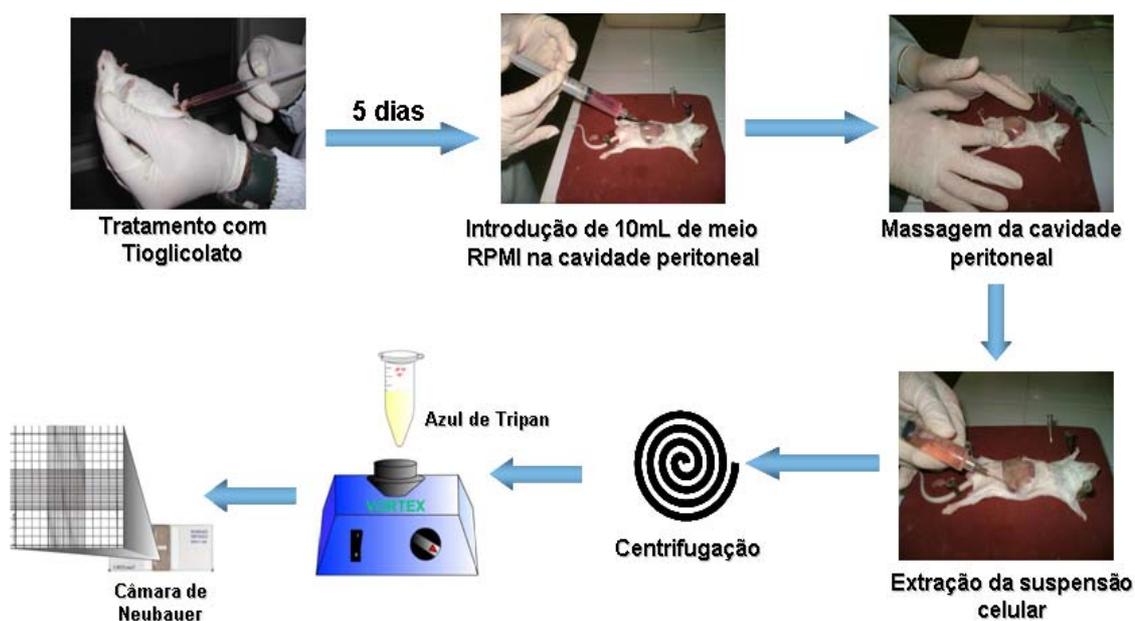


Figura 19 - Obtenção de macrófagos peritoneais

3.4.2 Ensaio de toxicidade

Os macrófagos isolados foram cultivados em placas de microcultura utilizando meio RPMI 1640 enriquecido com 10% de SBF e penicilina/estreptomicina, com diferentes concentrações dos venenos e suas frações. As placas foram incubadas, por 24h, em atmosfera enriquecida com 5% CO₂ e a 37°C. Após esse período as células foram observadas em microscópio óptico invertido, para avaliação da morfologia celular, e em seguida foi realizado o ensaio com 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico (MTT) 2,5mg/mL dissolvido em PBS. Este método baseia-se na atividade metabólica de células viáveis, formando um produto colorido (sal formazan, que é insolúvel em água). Após incubação por 4 horas à 37°C em estufa com 5% de CO₂, o sobrenadante foi removido e então adicionado SDS (10%) em HCL 0,01N para solubilizar os cristais de formazan. As placas foram incubadas por 17h e em seguida realizada a leitura em espectrofotômetro (570nm) (MOSMANN,1983) (Figura 20).

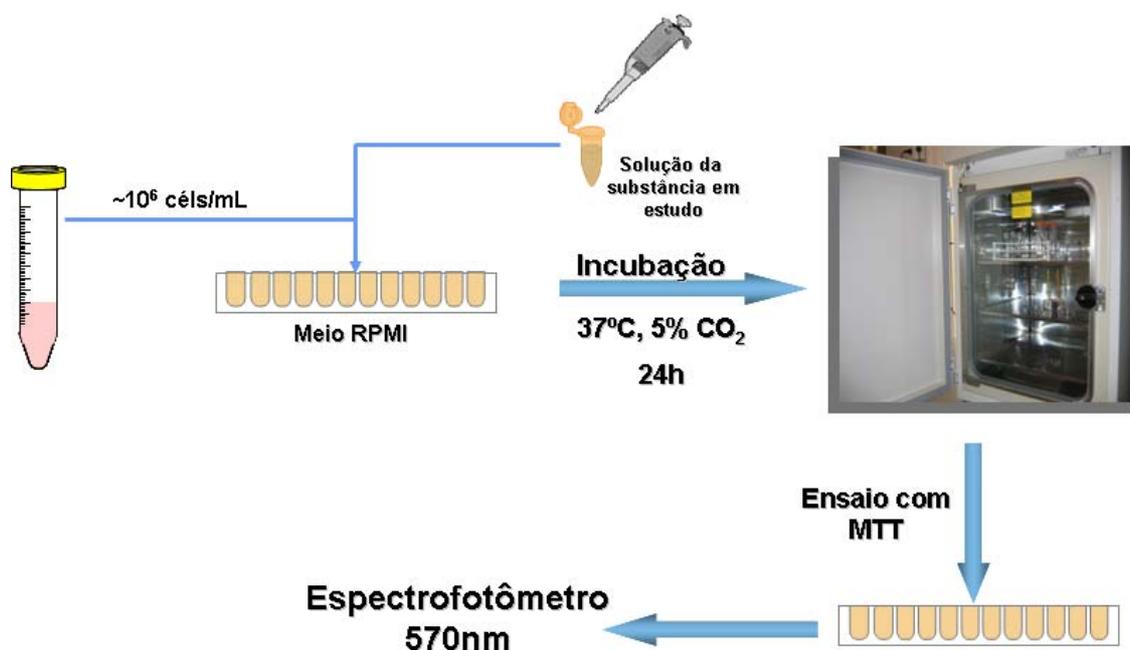


Figura 20 - Ensaio de toxicidade sobre macrófagos murinos

3.5 Análise estatística

Foram realizados três experimentos independentes, em triplicata, para cada ensaio. As médias obtidas em cada experimento foram comparadas utilizando o teste t ou ANOVA, seguido do teste de Bonferroni, quando apropriado, usando o software Prisma GraphPad versão 5.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados para a análise. Para calcular a IC_{50} foi utilizado o modelo probit de análise de regressão.

3.6 Comitê de Ética

Todos os nossos experimentos foram realizados de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, sob o número de protocolo 79/08.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade antibacteriana e antifúngica

A atividade antimicrobiana foi avaliada através da presença da zona de inibição após inoculação em meio sólido, pelo método de difusão em ágar. O veneno total da serpente *B. leucurus* (BleuVT) foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* (Figura 21). A L-aminoácido oxidase do veneno da serpente *B. marajoensis* (BmarLAAO) inibiu o crescimento da *P. aeruginosa* (Gram-negativo), da levedura *C. albicans* e de *S. aureus* (Gram-positivo), sendo estas inibições dose-dependentes (Figura 22). Dentre os microorganismos sensíveis o mais susceptível foi o *S. aureus*. A ordem de susceptibilidade dos microorganismos testados com BmarLAAO foi *S. aureus* > *C. albicans* > *P. aeruginosa*. Por outro lado o veneno total da serpente *B. marajoensis* (BmarVT), as frações fosfolipase A₂ de ambos os venenos (BmarPLA₂, BleuPLA₂) e a fração L-aminoácido oxidase do veneno de *B. leucurus* (BleuLAAO) não apresentaram nenhum grau de inibição sobre as cepas estudadas.

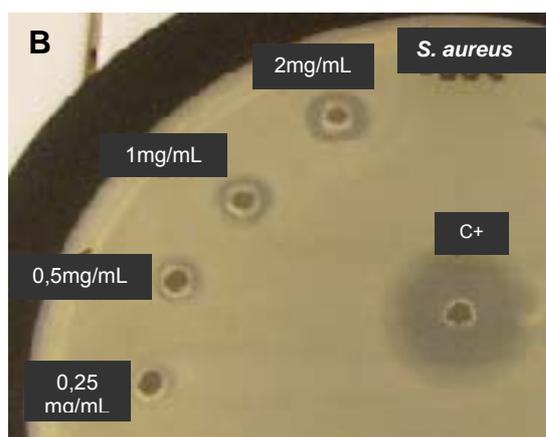
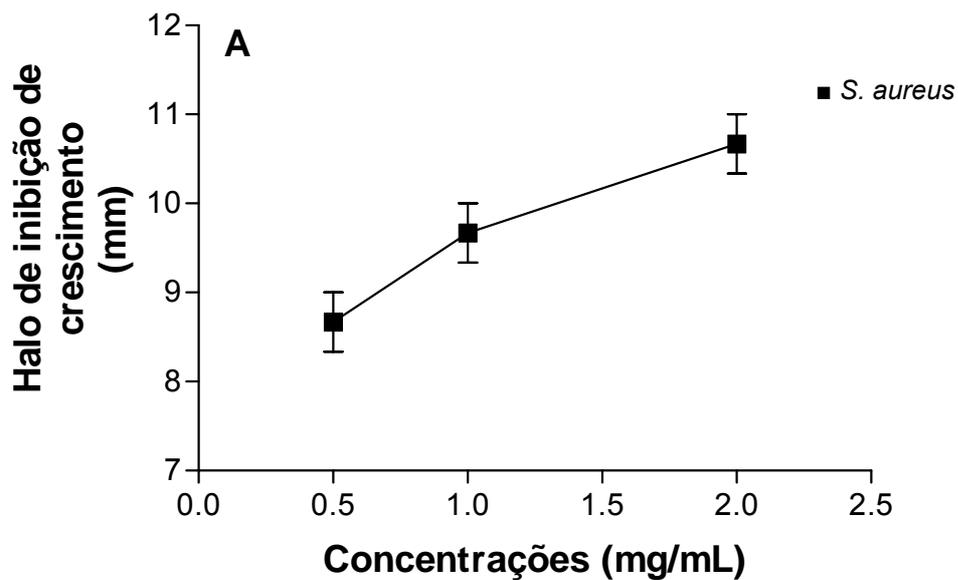


Figura 21 - Ensaio de difusão em ágar do veneno da *B. leucurus* sobre *S. aureus* (A e B). C+ = Controle positivo (amicacina).
Nota: Os valores representam média \pm SEM de três ensaios independentes realizados em triplicata. O halo de inibição é representado em mm, incluindo os 5 mm de diâmetro do poço, após 18h de incubação.

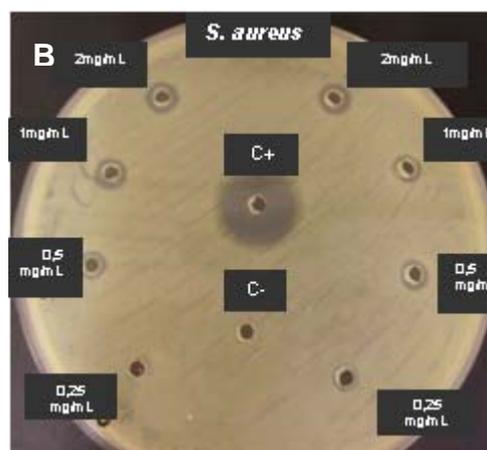
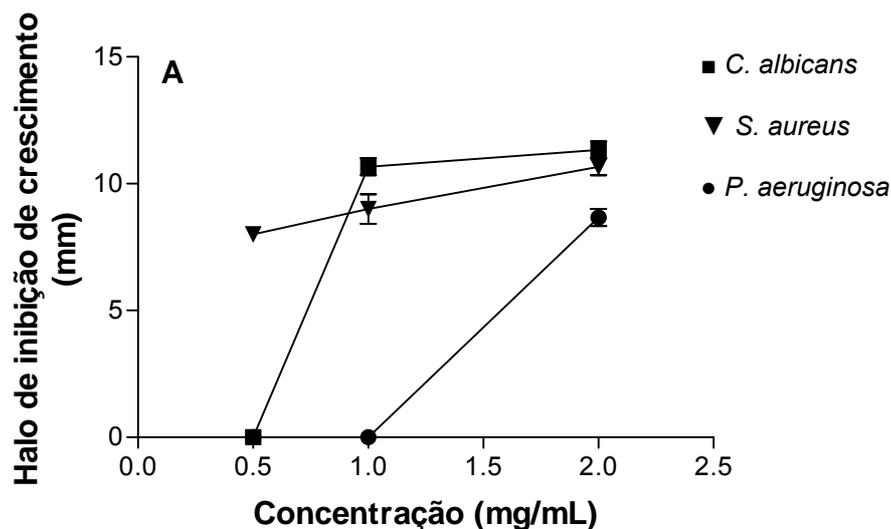


Figura 22 - Ensaio de difusão em agar da fração L-aminoácido oxidase do veneno da *B. marajoensis* sobre *P. aeruginosa* (●); *C. albicans* (■) e *S. aureus* (▼) (A). Ensaio de difusão em Agar da fração L-aminoácido oxidase do veneno da *B. marajoensis* sobre *S. aureus* (B).

Nota: Os valores representam média \pm SEM de três ensaios independentes realizados em triplicata. O halo de inibição é representado em mm, incluindo os 5mm de diâmetro do poço, após 18h de incubação.

O BleuVT e a BmarLAAO, revelaram ser mais promissoras e foram avaliadas para a determinação da CIM (concentração inibitória mínima) e CLM (concentração letal mínima), pelo método de microdiluição em caldo. Nas concentrações estudadas, o efeito inibitório foi mais significativo sobre *S. aureus*, confirmando o resultado do ensaio anterior. Para BleuVT a CIM=CLM=25 μ g/mL (Figura 23) e para BmarLAAO a CIM=50 μ g/mL e CLM= 200 μ g/mL (Figura 24). A amicacina apresentou CIM=25 μ g/mL e CLM=50 μ g/mL (Tabela 1). Nas maiores concentrações (50 e 100 μ g/mL) a ação inibitória da amicacina não apresentou diferença significativa da ação

inibitória de BleuVT e BmarLAAO. Para a *P. aeruginosa* e *C. albicans* não foi possível determinar a CIM e CLM nas concentrações estudadas, sendo estas >200 µg/mL.

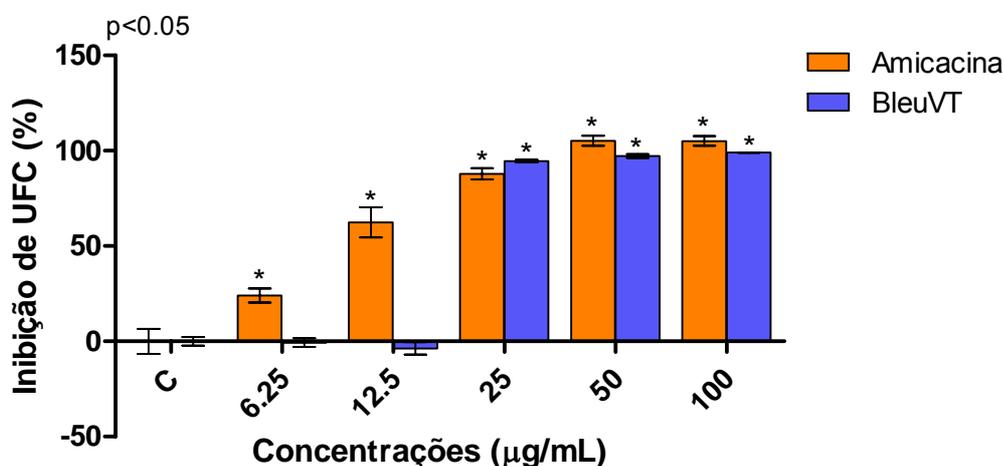


Figura 23 - Perfil de inibição bacteriana do veneno da *B. leucurus* e da amicacina, sobre cultura de *S. aureus*. BleuVT (veneno total de *B. leucurus*) e amicacina (100, 50, 25, 12.5 e 6.25µg/mL).

Nota: Após incubação o crescimento bacteriano foi espectrofotometricamente medido (A490nm). O gráfico apresenta média±SEM (n=3). *p<0.05 comparado com o correspondente grupo controle.

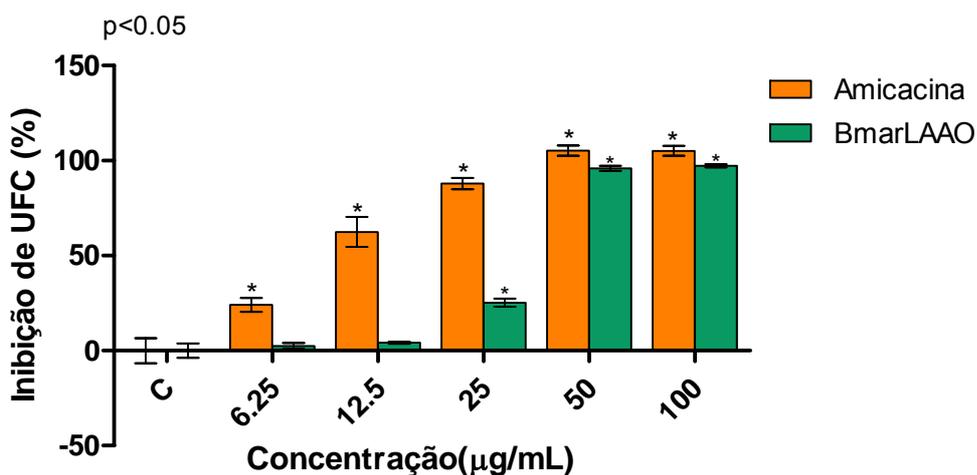


Figura 24 - Perfil de inibição bacteriana da fração L-aminoácido oxidase do veneno da *B. marajoensis* e da amicacina sobre cultura de *S. aureus*. BmarLAAO (L-aminoácido oxidase de *B. marajoensis*) e amicacina (100, 50, 25, 12.5 e 6.25µg/mL).

Nota: Após incubação o crescimento bacteriano foi espectrofotometricamente medido (A490nm). O gráfico apresenta média±SEM (n=3). *p<0.05 comparado com o correspondente grupo controle.

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração letal mínima (CLM) determinadas através do ensaio de microdiluição em caldo. BleuVT = veneno total de *B. leucurus*; BmarLAAO = L-aminoácido oxidase de *B. marajoensis*

Amostras	<i>S. aureus</i>	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CLM ($\mu\text{g/mL}$)
BleuVT	25	25
BmarLAAO	50	200
Amicacina	25	50

4.2 Atividade sobre *Leishmania sp.*

O BleuVT (Figura 25), BmarVT (Figura 26), BmarLAAO (Figura 27) apresentaram efeito inibitório sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, após 72h de cultivo. O BleuVT apresentou valores de $\text{IC}_{50}=5.49\mu\text{g/mL}$ para *L. amazonensis* e $1.94\mu\text{g/mL}$ para *L. chagasi*. O BmarVT apresentou valores de $\text{IC}_{50}=86.56\mu\text{g/mL}$ para *L. amazonensis* e $79.02\mu\text{g/mL}$ para *L. chagasi*, sendo estes valores de $2.55\mu\text{g/mL}$ para *L. amazonensis* e $2.86\mu\text{g/mL}$ para *L. chagasi*, quando em presença de BmarLAAO (Tabela 2). A cepa de *L. chagasi* mostrou-se mais sensível tanto em presença de BleuVT como em presença de BmarVT, tendo o BleuVT apresentado maior capacidade inibitória. Para a BmarLAAO não observou-se diferença significativa de sensibilidade entre as duas cepas em estudo. A BleuPLA₂, BmarPLA₂ e BleuLAAO não foram capazes de promover nenhum efeito inibitório.

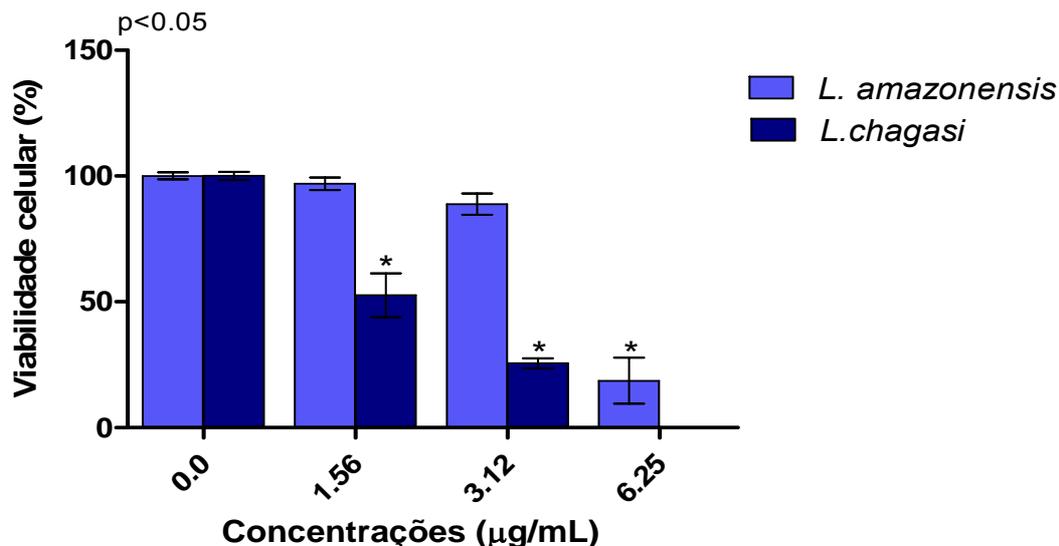


Figura 25 - Atividade leishmanicida de diferentes concentrações do veneno da *B. leucurus* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* and *L. chagasi*.

Nota: A densidade celular inicial foi 1×10^6 células/mL. O gráfico apresenta média \pm SEM (n=3). *p<0.05 comparado com o correspondente grupo controle.

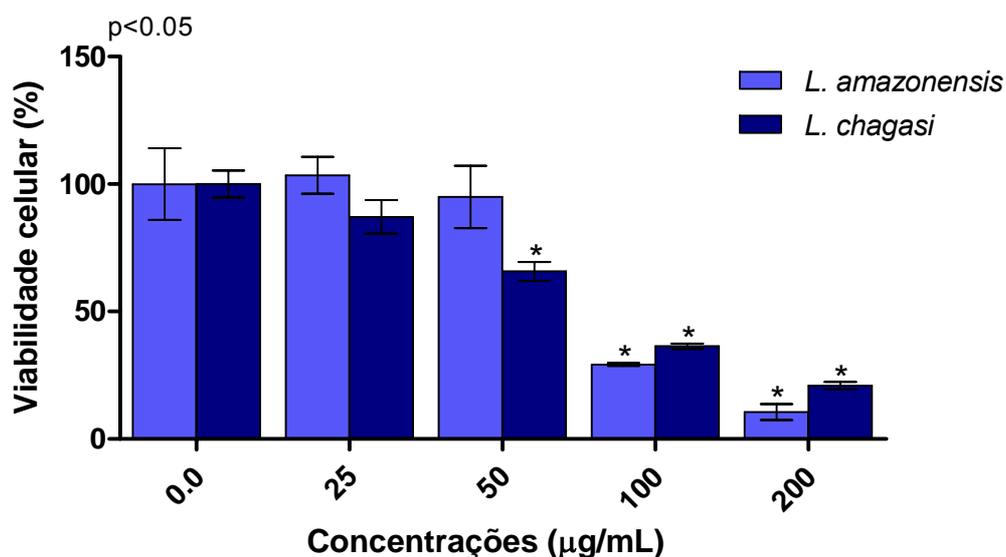


Figura 26 - Atividade leishmanicida de diferentes concentrações do veneno de *B. marajoensis* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* and *L. chagasi*.

Nota: A densidade celular inicial foi 1×10^6 células/mL. O gráfico apresenta média \pm SEM (n=3). *p<0.05 comparado com o correspondente grupo controle.

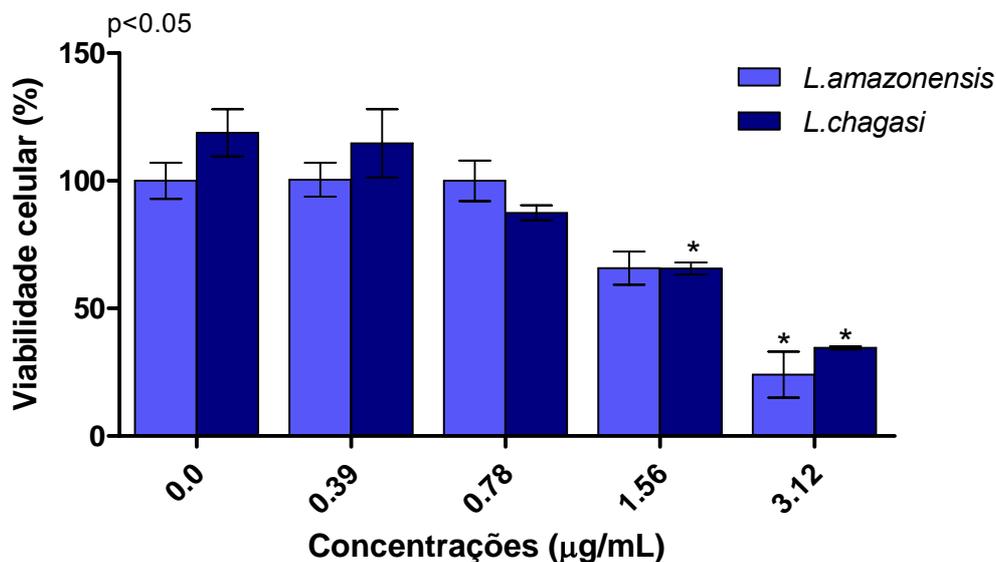


Figura 27 - Atividade leishmanicida de diferentes concentrações da L-aminoácido oxidase do veneno da *B. marajoensis* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* and *L. chagasi*.

Nota: A densidade celular inicial foi 1×10^6 células/mL. O gráfico apresenta média \pm SEM (n=3). * $p < 0.05$ comparado com o correspondente grupo controle.

Tabela 2 - Valores de IC_{50} para formas promastigotas *L. amazonensis* (L.a.) e *L. chagasi* (L.c.) tratadas com veneno de *B. leucurus* (BleuVT), de *B. marajoensis* (BmarVT) ou L-aminoácido oxidase de *B. marajoensis* (BmarLAAO).

Amostras	IC_{50} (µg/mL)	
	<i>L.a.</i>	<i>L.c.</i>
BleuVT	5,49	1,94
BmarVT	86,56	79,02
BmarLAAO	2,55	2,86

4.3 Atividade sobre cepa Y de *T. cruzi*

O BleuVT (Figura 28), BmarVT (Figura 29) e BmarLAAO (Figura 30) apresentaram efeito inibitório sobre formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi*, após 5 dias de cultivo. O valor de IC_{50} para o BleuVT, BmarVT e BmarLAAO foram, respectivamente 1,14µg/mL, 24,19µg/mL e 0,89µg/mL (Tabela 3). Estes efeitos apresentaram comportamento dose-dependente, sendo que a cepa em estudo

mostrou-se mais sensível a BmarLAAO. As frações BleuLAAO, BleuPLA₂ e BmarPLA₂ não apresentaram nenhum grau de inibição.

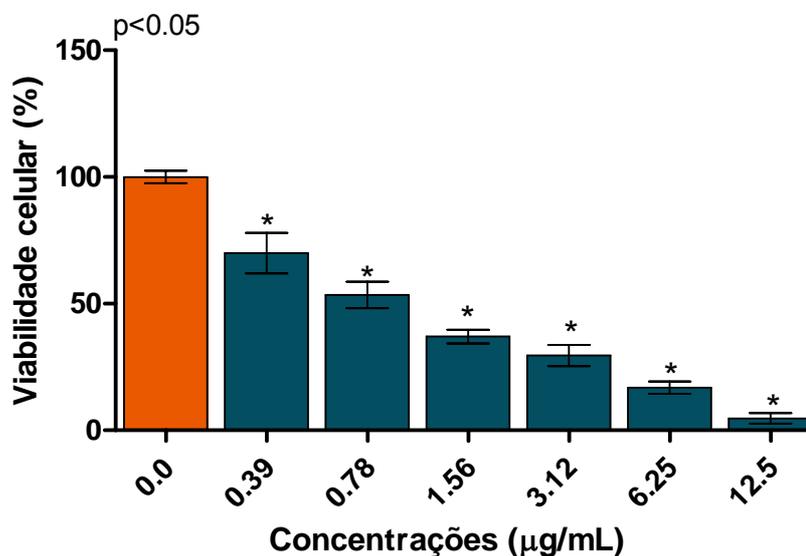


Figura 28 - Ação sobre cepa Y de *T. cruzi*, após 5 dias de cultivo, de diferentes concentrações (12.5-0.39µg/mL) do veneno de *B. leucurus*.

Nota: A densidade celular inicial foi de 1×10^6 céls/mL. O gráfico apresenta média \pm SEM (n=3). * $p < 0.05$ comparado com o correspondente grupo controle.

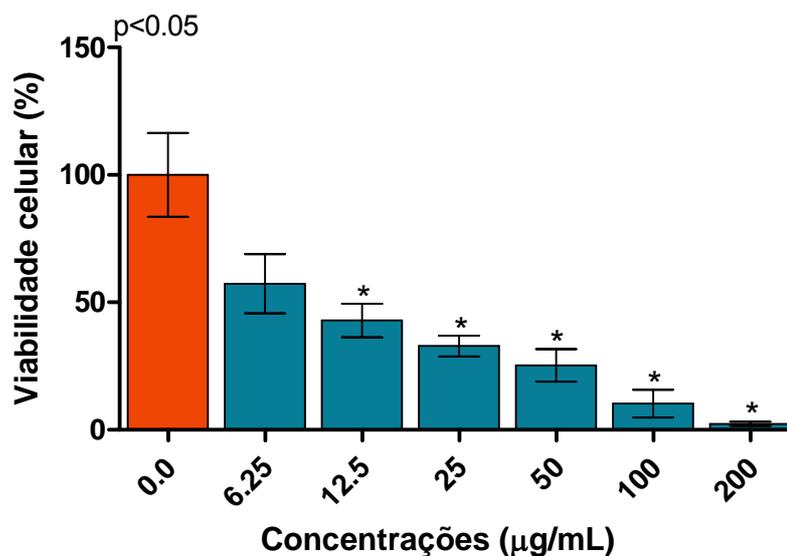


Figura 29 - Ação sobre cepa Y de *T. cruzi*, após 5 dias de cultivo, de diferentes concentrações (200-6.25µg/mL) do veneno de *B. marajoensis*.

Nota: A densidade celular inicial foi de 1×10^6 céls/mL. O gráfico apresenta média \pm SEM (n=3). * $p < 0.05$ comparado com o correspondente grupo controle.

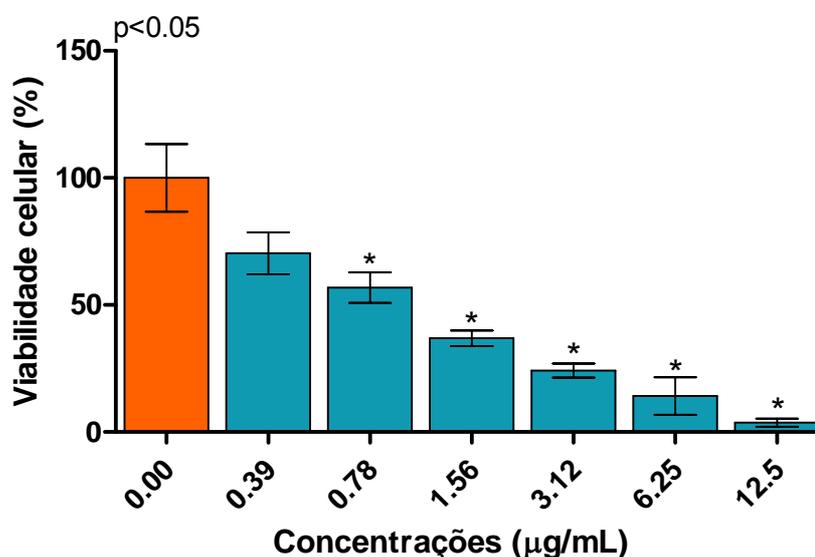


Figura 30 - Ação sobre cepa Y de *T. cruzi*, após 5 dias de cultivo, de diferentes concentrações (12.5-0.39µg/mL) do L-aminoácido oxidase do veneno da *B. marajoensis*. Nota: A densidade celular inicial foi de 1×10^6 céls/mL. O gráfico apresenta média \pm SEM (n=3). * $p < 0.05$ comparado com o correspondente grupo controle.

Tabela 3 - Valores de IC_{50} para formas epimastigoas de *T. cruzi* tratadas com veneno de *B. leucurus* (BleuVT), de *B. marajoensis* (BmarVT) ou L-aminoácido oxidase de *B. marajoensis* (BmarLAAO).

Amostras	<i>T. Cruzi</i> IC_{50} (µg/mL)
BleuVT	1,14
BmarVT	24,19
BmarLAAO	0,89

4.4 Citotoxicidade sobre macrófagos murinos

Nas concentrações estudadas o BleuVT apresentou citotoxicidade significativa na concentração de 200µg/mL (IC_{50} =175.5µg/mL) (Figura 31). O BmarTV apresentou redução na viabilidade celular na concentração de 200µg/mL, todavia não foi significante quando comparado com o controle. A BmarLAAO

apresentou baixa citotoxicidade nas concentrações estudadas (Figura 32). No entanto, a BmarPLA₂ apresentou a maior toxicidade (IC₅₀=32.25µg/mL) (Figura 33), dentre os venenos e frações em estudo (Tabela 4). Nenhum efeito citotóxico foi observado para BleuPLA₂ e BleuLAAO.

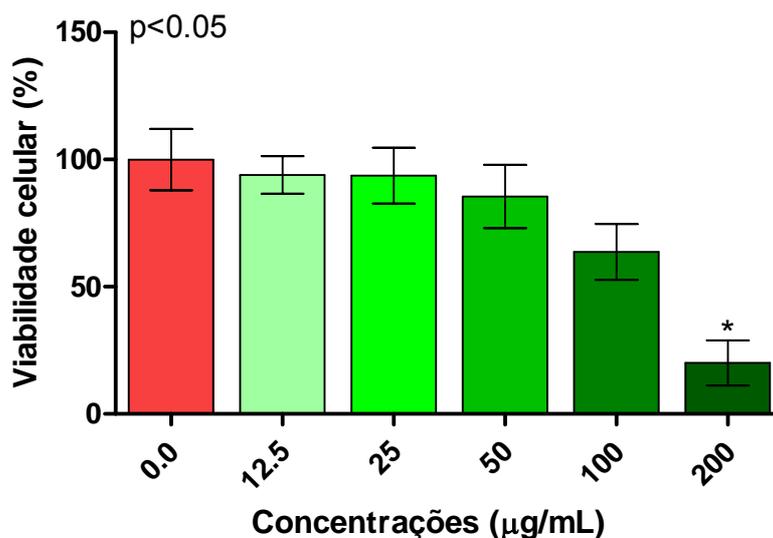


Figura 31 - Efeito citotóxico de diferentes concentrações (200-12.5µg/mL) do veneno da *B. leucurus* sobre macrófagos murinos.

Nota: A densidade celular inicial foi de 1×10^6 células/mL. O gráfico apresenta média \pm SEM (n=3). *p<0.05 comparado com o correspondente grupo controle.

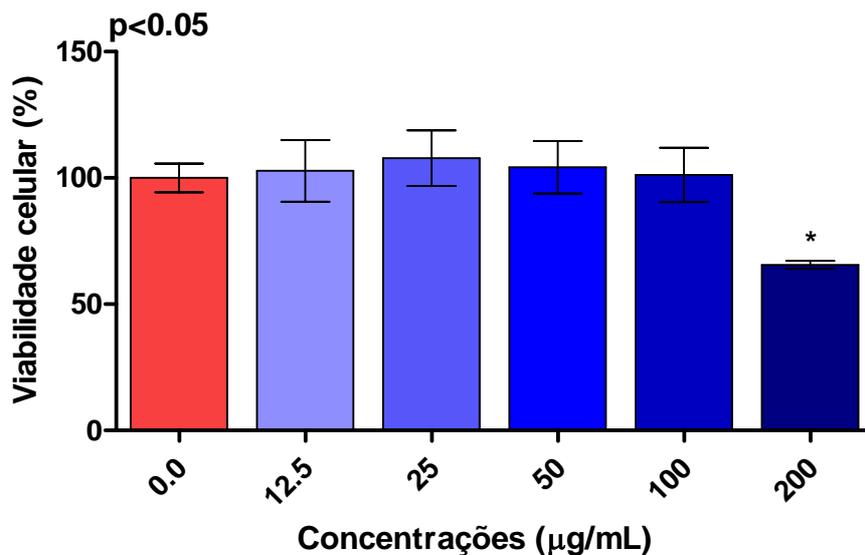


Figura 32 - Efeito citotóxico de diferentes concentrações (200-12.5µg/mL) de L-aminoácido oxidase da *B. marajoensis* sobre macrófagos murinos. Nota: A densidade celular inicial foi de 1×10^6 células/mL. O gráfico apresenta média \pm SEM (n=3). * $p < 0.05$ comparado com o correspondente grupo controle.

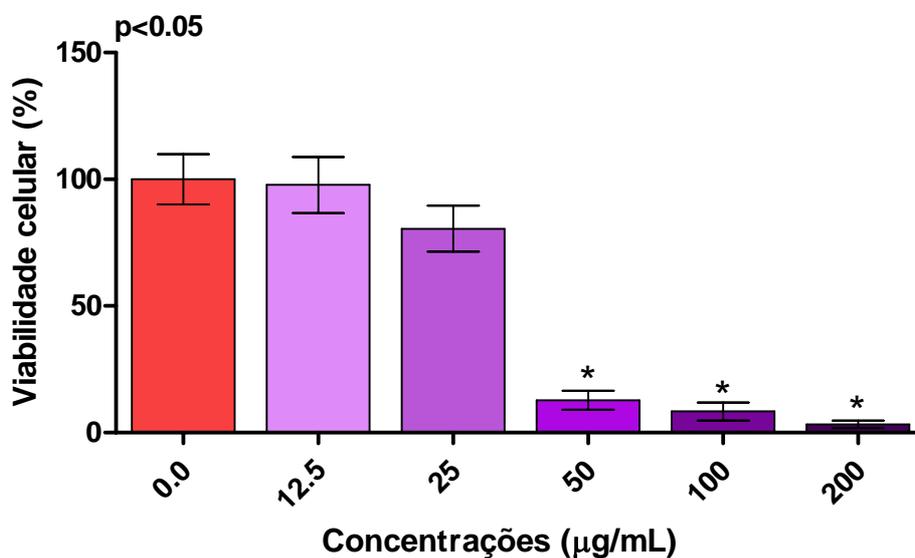


Figura 33 - Efeito citotóxico de diferentes concentrações (200-12.5µg/mL) da fosfolipase A_2 do veneno de *B. marajoensis*, sobre macrófagos murinos. Nota: A densidade celular inicial foi de 1×10^6 células/mL. O gráfico apresenta média \pm SEM (n=3). * $p < 0.05$ comparado com o correspondente grupo controle.

Tabela 4 - Valores de IC₅₀ para macrófagos tratados com veneno total de *B. leucurus* (BleuVT) e fração fosfolipase A₂ de *B. marajoensis* (BmarPLA₂).

Amostras	Macrófagos IC₅₀(µg/mL)
BleuVT	175,5
BmarPLA ₂	32,25

Neste estudo, nas maiores concentrações (200, 100 e 50µg/mL) de BmarLAAO e BmarTV, não foi observado alterações morfológicas significativas (Figuras 35). Enquanto para a BmarPLA₂ (200 e 100µg/mL) e BleuTV (200µg/mL) foi observado severas alterações morfológicas na superfície celular, como rompimento da membrana e significante lise celular quando comparado com o controle (Figura 34 e 35).

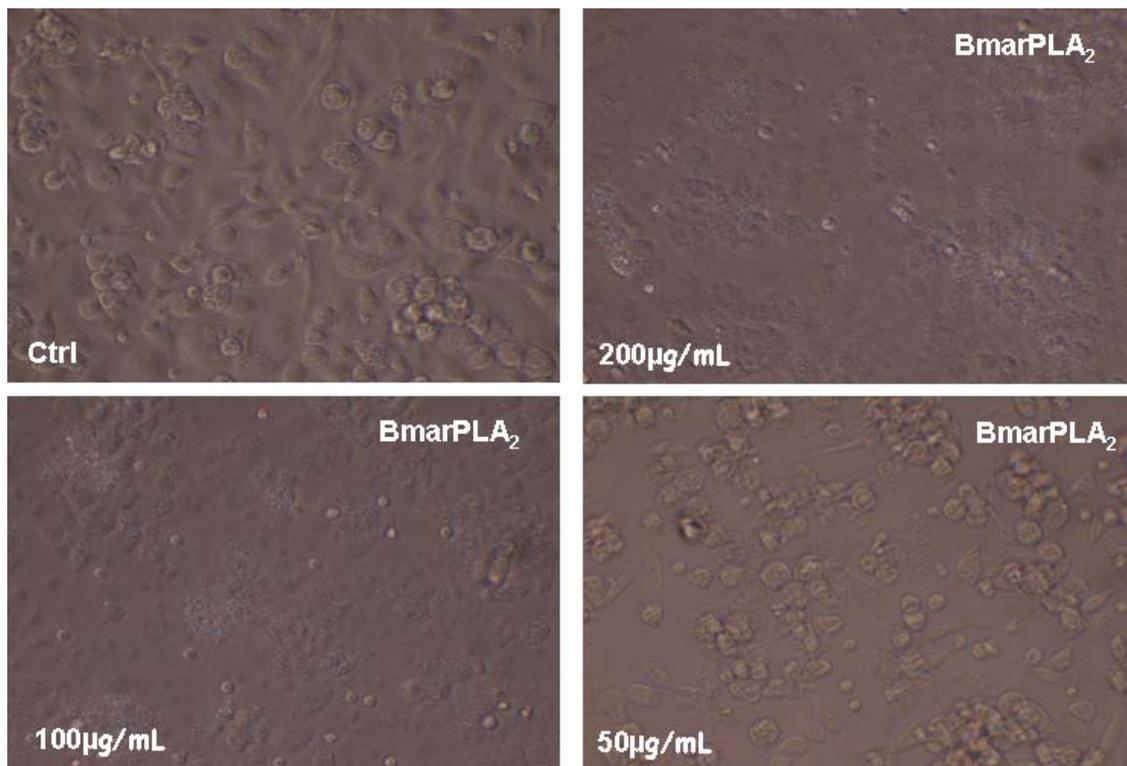


Figura 34 - Alterações morfológicas em macrófagos murinos após 24h de exposição a BleuVT, em diferentes concentrações. Ctrl=macrófagos tratados com PBS, controle negativo. BleuVT = veneno total de *B. leucurus*.

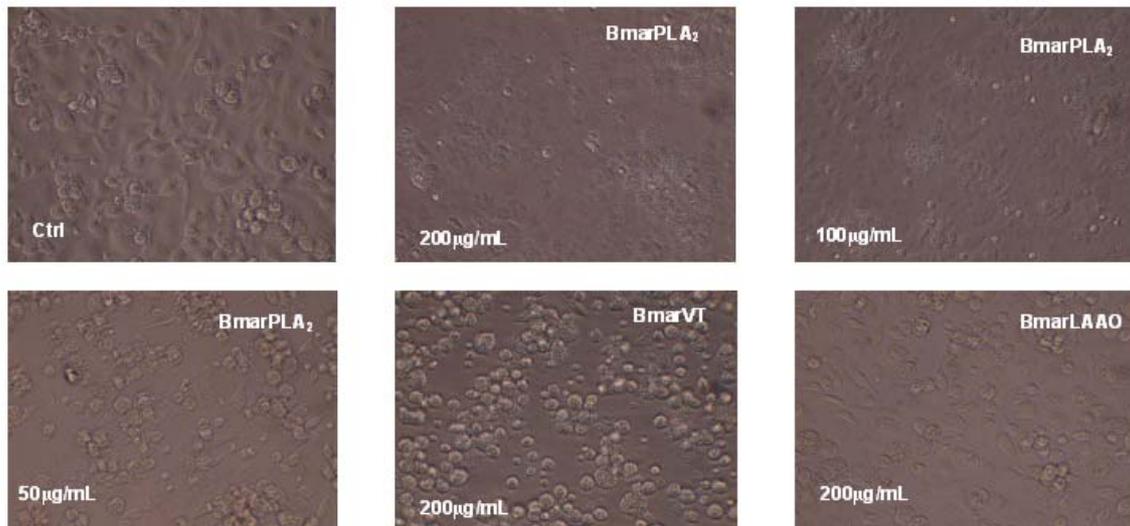


Figura 35 - Alterações morfológicas em macrófagos murinos após 24h de exposição a BmarPLA₂, BmarTV e BmarLAAO, em diferentes concentrações. Ctrl=macrófagos tratados com PBS, controle negativo. BmarTV=veneno total da *B. marajoensis*, BmarLAAO= L-aminoácido oxidase do veneno da *B. marajoensis*, BmarPLA₂= Fosfolipase A₂ do veneno da *B. marajoensis*.

5 DISCUSSÃO

Os venenos de serpentes, sendo uma mistura de várias substâncias, são capazes de promover uma diversidade de eventos biológicos, locais e sistêmicos. Atualmente, muitos estudos visam descobrir a ação de toxinas, bem como, o mecanismo pelos quais estas causam seus efeitos. Para tanto, a ampliação do conhecimento sobre a ação das toxinas de venenos em diversos modelos biológicos busca, na biodiversidade, ferramentas para a construção de fármacos biologicamente ativos e/ou elucidação de mecanismos fisiopatológicos

Alguns estudos têm demonstrado o efeito antimicrobiano dos venenos de serpentes e substâncias isoladas destes. No presente estudo, tanto o BleuVT como a BmarLAAO mostraram significativo efeito antibacteriano sobre *S. aureus*, enquanto que apenas a BmarLAAO apresentou efeito sobre *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Para o BleuVT encontramos que os valores de CIM e CLM são iguais. Segundo Tavares (2007), o valor de CLM deve ser maior em uma ou duas diluições que a CIM. Uma distância muito grande entre esses dois valores demonstra tolerância do microorganismo à droga em questão. Ainda segundo este autor a tolerância não oferece dificuldades terapêuticas para a maioria das infecções em pacientes com imunidade preservada, uma vez que a atividade bacteriostática da droga é suficiente para permitir aos fatores imunitários do indivíduo eliminar o microorganismo.

Efeito antiparasitário sobre *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi* e *Tripanosoma cruzi* foi observado para BleuVT, BmarVT e BmarLAAO. Neste contexto, outros venenos tem apresentado atividade antimicrobiana como os venenos da *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus cascavella* sobre *Xantomonas axonopodis pv. passiflorae* (OLIVEIRA et al., 2002; TOYAMA et al., 2006) e sobre *Leishmania (L.) amazonensis* (PASSERO et al., 2007); e o veneno de *B. jararaca* sobre *Leishmania major*, *Tripanosoma cruzi* (GONÇALVES et al., 2002; DEOLINDO et al., 2005), *Saccharomyces cerevisiae* e *Fusarium oxysparum* (GOMES et al., 2005). Ciscotto et al. (2009), verificaram que venenos do gênero *Bothrops* (*B. jararaca* e *B. jararacussu*) são potentes sobre *Staphylococcus aureus*. Estes venenos apresentam amplo espectro de ação sobre Gram-positivo e Gram-

negativo, mas as bactérias *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, apresentaram resistência.

svLAAO (L-aminoácido oxidase de venenos de serpentes) apresentam ação antimicrobiana sobre diversos microorganismos. Samy et al. (2007) demonstraram efeito antibacteriano de LAAO isolada de *Crotalus adamanteus* e *Bothrops asper* sobre *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis*. Usando o mesmo modelo Stiles et al. (1991) verificaram que a LAAO do veneno da *Pseudechis australis* apresentou inibição do crescimento de *Aeromonas hydrophila*; a de *Trimeresurus jerdonii* mostrou atividade bactericida sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus megaterium* (LU et al., 2002); e a do veneno de *Trimeresurus mucrosquamatus* inibiu o crescimento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus dysenteriae* (WEI et al., 2002).

Dentre as svLAAOs, as extraídas dos venenos do gênero *Bothrops* tem apresentado relevante efeito antimicrobiano. A svLAAO do veneno da *B. pirajai* inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (IZIDORO et al., 2006). A ação bactericida também tem sido descrito para svLAAOs extraída de *B. alternatus* (STÁBELI et al., 2004). Alguns autores têm observado que a ação antimicrobiana das svLAAOs é significativamente diminuído pela ação da catalase (TOYAMA et al., 2006; WEI et al., 2002; STILES et al., 1991; LU et al., 2002), o que sugere a importância do subproduto da ação enzimática, o peróxido de hidrogênio, para a atividade biológica observada. Acredita-se que o peróxido de hidrogênio induza a ruptura da membrana microbiana e conseqüentemente o extravasamento do conteúdo citoplasmático (TOYAMA et al., 2006), embora outros estudos relatem que esta ação possa ocorrer devido a capacidade de ligação da enzima à membrana bacteriana (EHARA et al., 2002).

Quando presente em baixas concentrações o peróxido de hidrogênio pode estar envolvido na regulação de diferentes processos celulares como stress e morte celular programada, enquanto é tóxico a elevadas concentrações (DU; CLEMETSON, 2002). Levando-se em consideração que o peróxido de hidrogênio seja necessário à ação antibacteriana e que o *Staphylococcus aureus* é uma bactéria catalase positiva, sugere-se que a quantidade de peróxido de hidrogênio produzida pela enzima, nas concentrações estudadas, seja suficiente para causar efeito inibitório. Por outro lado as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella sp.*, apesar de serem catalase positivo, são bactérias

Gram-negativas, apresentando portanto diferenças constitucionais em sua parede celular a qual pode impedir a passagem do peróxido através da mesma. Em nossos estudos a BleuLAAO, não apresentou capacidade inibitória sobre nenhum dos microorganismos estudados, o que nos sugere que esta fração não é capaz de produzir peróxido de hidrogênio em quantidades suficientes, nas concentrações estudadas, para observarmos qualquer inibição sobre os microorganismos em estudo ou qualquer efeito citotóxico sobre macrófagos.

A exposição de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi* e *Tripanosoma cruzi* a BleuVT, BmarLAAO e BmarVT resultou em morte parasitária dose-dependente. A *L. chagasi* apresentou-se mais sensível aos venenos em estudo. Todavia quando comparamos a sensibilidade apresentada pelas cepas de *Leishmania sp.* e *T. cruzi*, este mostrou-se mais sensível, sendo que esta susceptibilidade é maior quando em presença de BmarLAAO.

A ação leishmanicida vem sendo devidamente relatada por alguns autores. O veneno da *B. jararaca* mostrou significativa ação sobre *L. major*, causando extensiva vacuolização citoplasmática e aumento do volume mitocondrial, possivelmente devido à intervenção do veneno na cadeia respiratória do parasito diminuindo os níveis de ATP então conduzindo à morte (GONÇALVES et al., 2002). Este veneno também foi capaz de inibir o crescimento de outras cepas de *Leishmania sp.*, bem como o de *T. cruzi* (DEOLINDO et al., 2005; SANT'ANA et al., 2008). Ao contrário dos nossos achados, Sant'ana et al. (2008) verificaram que as espécies de *Leishmania* estudadas apresentaram-se mais sensíveis a svLAAO do veneno de *B. jararaca* do que o *T. cruzi*. As formas epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *Leishmania sp.* apresentaram rompimento da membrana e desorganização mitocondrial. Em nossos estudos foi possível observar que os parasitos perderam sua morfologia característica, apresentado um formato ovalado e perda de flagelo. Ainda segundo Sant'ana et al. (2008) também foi possível demonstrar que formas amastigotas de *Leishmania* não foram inibidas pela LAAO, mesmo em concentrações de 200µg/mL.

A LAAO extraída do veneno de *B. jararacussu* (FRANÇA et al., 2007) também tem mostrado significativa ação sobre *Leishmania sp.* Tempone et al. (2001) demonstraram que o veneno total da *B. moojeni* e sua LAAO apresentaram significativa ação sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. panamensis*, com valores de IC₅₀ em torno de 1µg/mL, onde o peróxido de

hidrogênio gerado foi um forte indutor de apoptose sobre as formas promastigotas, causando stress oxidativo, iniciando desorganização da membrana e citoplasma, conseqüentemente causando a morte celular. De fato o peróxido de hidrogênio é estável e capaz de penetrar livremente a célula, podendo atuar sobre a dupla fita de DNA (SUHR; KIM, 1999). A habilidade do peróxido de hidrogênio de induzir apoptose em formas promastigotas foi relatada e basicamente envolve o balanço entre a produção de radicais livres de oxigênio (ROS) e a habilidade do sistema antioxidante das células em neutralizá-los. Em alguns casos quando o sistema oxidante falha, os ROS atuam sobre o evento apoptótico (BROOKER et al., 2000).

Formas amastigotas de *Leishmania sp.*, apresentam capacidade antioxidante, por conter níveis significativos de catalase e glutathione oxidase (MURRAY; CARTELLI, 1983). Todavia as formas promastigotas demonstram ser deficientes dessas enzimas (PESSATTI et al., 1995). De fato Toyama et al. (2006) demonstraram que a LAAO da *C. d. cascavella*, em pequenas concentrações ($IC_{50}=2,39\mu\text{g}$) produz peróxido de hidrogênio suficiente para inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. donovani*, achados semelhantes ao de Tempone et al. (2001) para a LAAO de *B. moojeni*, e aos nossos, para a BmarLAAO.

As svLAAOs foram reportadas por mostrar citotoxicidade por indução de apoptose ou necrose (ABE et al., 1998; LIU et al., 2002). A BmarLAAO apresentou citotoxicidade significativa apenas com $200\mu\text{g/mL}$, concentração bastante superior àquelas em que se verifica o efeito antiparasitário, todavia próxima à concentração em que se verificou o efeito antibacteriano, embora o percentual de morte nesta concentração tenha sido menor que 40%. Igualmente, para BleuVT, citotoxicidade significativa foi observada apenas na concentração de $200\mu\text{g/mL}$. A apoxina-I, uma LAAO isolada do veneno da *C. Atrox*, induziu apoptose mediada por peróxido de hidrogênio (TORII et al., 1997). No entanto, Suhr e Kim (1999) demonstraram que o mecanismo de indução da apoptose é claramente distinguível do estímulo por peróxido de hidrogênio exógeno, sugerindo que a indução da apoptose não ocorre somente pela ação do peróxido produzido pela reação enzimática. Os detalhes moleculares aos quais os componentes intracelulares estão especificamente associados com a indução da apoptose pela LAAO ainda não estão claros.

Embora as frações PLA_2 não tenham apresentado significativa inibição sobre bactéria, levedura, *Leishmania sp.* ou *T. cruzi* em nosso estudo, muitos autores tem reportado capacidade antibacteriana e antiparasitária de PLA_2 de venenos de

serpentes. As fosfolipases secretórias do grupo IIA são conhecidas por apresentar potente atividade bactericida sobre Gram-positivo. Uma nova fosfolipase do grupo IA, denominada BFPA foi extraída do veneno da *Bungarus fasciatus*, a qual apresentou atividade contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (XU et al., 2007). Páramo et al. (1998) descreveram e caracterizaram o efeito bactericida de uma PLA₂ Lys49, purificada do veneno de *B. asper*, sobre bactérias Gram-positivo e negativo, e mostrou que o peptídeo sintético (115-129) reproduz o efeito da proteína intacta, fornecendo evidências de que seu mecanismo de ação bactericida não está relacionado com sua atividade enzimática. Para algumas fosfolipases tem sido bem descrita sua ação bactericida, desenvolvendo significativa atividade sobre Gram-positivo e negativo. A miotoxina II de *B. jararacussu*, apresentou elevada ação bactericida, causando ruptura da parede celular e da membrana bacteriana de *Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae* (BARBOSA et al., 2005). A PLA₂ purificada do veneno da *C. d. terrificus*, mostrou significativa atividade sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter aerogenes* (SOARES et al., 2001; SAMY et al., 2007).

Ambas PLA₂, enzimaticamente ativas e inativas, têm apresentado ação antibacteriana. A PLA₂ enzimaticamente ativa tem sua ação associada a seu sítio catalítico (OLIVEIRA et al., 2002; BARBOSA et al., 2005) e a inativa tem sua ação associada com a porção C-terminal (LOMONTE et al., 2003; PÁRAMO et al., 1998; SANTAMARÍA et al., 2005). Uma fosfolipase Lys49 miotóxica (BnSP-7) isolada da *B. neuwiedi pauloensis* apresentou ação bactericida sobre *Escherichia coli*. O efeito bactericida da BnSP-7 provavelmente representa o mecanismo do grupo II de svPLA₂, o qual não depende da ação catalítica. Como demonstraram Páramo et al. (1998) para a Lys49 miotoxina II da *B. asper*. Este efeito foi significativamente reduzido após a clivagem do octapeptídeo N-terminal ou após acetilação, sugerindo uma correlação entre o efeito miotóxico e a ação bactericida, provavelmente devido ao fato de que ambas as atividades dependem da habilidade da toxina se ligar e desorganizar membranas. A modificação de somente dois resíduos Tyr de BnSP-7 causou significativa diminuição de seus efeitos tóxicos, então sugerindo participação destes resíduos em sua atividade letal (SOARES et al., 2000).

Assim observamos que as enzimas PLA₂ podem induzir seus efeitos farmacológicos através de mecanismos que são tanto dependentes como independentes de sua ação enzimática. Nos mecanismos que são dependentes da

ação enzimática, tanto a hidrólise de fosfolipídios intactos ou a liberação de produtos como lisofosfolipídios e ácidos graxos podem causar efeitos farmacológicos. A atividade enzimática inerente pode causar danos na membrana e então a mudança no ambiente de ligação protéica, particularmente aquele da proteína alvo. Nos mecanismos que são independentes da atividade enzimática, a ligação a proteínas alvo pode causar efeitos farmacológicos (KINI; EVANS, 1989a). De fato a BmarPLA₂, com fraca capacidade enzimática, foi capaz de produzir efeitos citotóxicos significativos sobre macrófagos, sugerindo sua capacidade de atuação sobre alvos específicos de superfície de membrana.

A miotoxina II, Lys49 PLA₂ do veneno da *B. moojeni*, além de apresentar ação bactericida sobre *E. coli* e *C. albicans*, mostrou efeito antiparasitário sobre *Schistosoma mansoni* e *Leishmania sp.* (STÁBELI et al., 2006). Por outro lado, estudos tem demonstrado que svPLA₂ podem estimular o crescimento de *Leishmania sp.* Passero et al. (2008) demonstraram que svPLA₂, enzimaticamente ativa, isolada da *Crotalus durissus collilineatus* estimula o crescimento de *Leishmania (L.) amazonensis*, possivelmente devido a PLA₂ ser um fator de progressão para a leishmaniose cutânea. Todas as concentrações de PLA₂ usadas neste experimento induziram um aumento no número de amastigotas dentro dos macrófagos. O *T. cruzi*, parasito evolucionariamente relacionado com a *Leishmania sp.*, apresenta diferentes tipos de fosfolipases ligados à membrana celular remodelando o processo de invasão (BRONIA et al., 1999; BERTELLO et al., 2000).

Os venenos de serpentes são usados como ferramentas de novas abordagens terapêuticas, com uma ampla variedade de ações farmacológicas e aplicações biotecnológicas sendo descritas para as substâncias que compõem estes venenos. Assim o isolamento e a caracterização funcional dos componentes dos venenos pode fornecer informações para o seu mecanismo de ação e tornar possível o seu uso como agentes terapêuticos e/ou futuros modelos moleculares.

Os resultados demonstraram que o veneno de *B. leucurus* e *B. marajoensis* contêm substâncias de potencial terapêutico, podendo a BmarLAAO, ser um modelo promissor. Dentro deste contexto, o campo das doenças infecciosas necessita de fundamental atenção, devido tanto ao alarmante crescimento da resistência microbiana aos agentes terapêuticos atualmente disponíveis, como ao fato de que as doenças infecciosas, especialmente as parasitárias, como as leishmanioses e a doença de Chagas, serem comumente classificadas como

doenças negligenciadas, que afetam parte significativa da população brasileira e de outros países em desenvolvimento, e encontram muitas dificuldades de acesso aos tratamentos. Vem a agravar que os tratamentos disponíveis tem limitada efetividade e apresentam elevados níveis de toxicidade.

6 CONCLUSÃO

- O veneno de *B. leucurus* e a L-aminoácido oxidase de *B. marajoensis* apresentaram atividade antimicrobiana significativa sobre *S.aureus*, *Leishmania sp.* e *T. cruzi*. Sendo que as frações de BleuVT não foram capazes de produzir efeitos inibitórios sobre os microorganismos em estudo.
- O BmarVT apresentou significativa ação inibitória sobre *Leishmania sp.* e *T. cruzi*, causando alterações morfológicas em sua estrutura celular.
- A BmarLAAO apresenta-se como uma ferramenta a ser utilizada em estudos posteriores, focados na correlação entre a estrutura e sua ação antimicrobiana. Estes estudos podem fornecer valiosas informações para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas.
- A BmarPLA₂, embora não tenha apresentado efeito inibitório sobre os microorganismos em estudo, apresenta efeito biológico sobre macrófagos. Sendo a BmarPLA₂ uma enzima com baixa ação catalítica, seus efeitos podem ser devido a atuação sobre alvos específicos.
- A BmarLAAO e BleuVT apresentaram citotoxicidade apenas em concentração superior àquela em que se observa os efeitos estudados.
- Os venenos de *B. leucurus* e de *B. marajoensis*, bem como a fração BmarLAAO apresentaram significativa capacidade inibitória sobre microorganismos de importância clínica, apresentando-se como ferramentas de investigação mais detalhada para futuras aplicações em infectologia.

REFERÊNCIAS

- ABE, F.; NAGAFUJI, S.; YAMAUCHI, T.; OKABE, H.; MAKI, J.; HIGO, H.; AKAHANE, H.; AGUILAR, A.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, n. 9, p. 1188-1191, 2002a.
- ABE, F.; YAMAUCHI, T.; NAGAO, T.; KINJO, J.; OKABE, H.; HIGO, H.; AKAHANE, H. Ursolic acid as a trypanocidal constituent in Rosemary. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, n. 11, p. 1485-1487, 2002b.
- ABE, Y.; SHIMOYAMA, Y.; MUNAKATA, H.; ITO, J.; NAGATA, N.; OHTSUKI, K. Characterization of apoptosis-inducing factor in Habu snake venom as a glycyrrhizin (GL)-binding protein potentially inhibited by GL in vitro. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 21, p. 924-927, 1998.
- AHN, M. Y.; LEE, B. M.; KIM, Y. S. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 29, n. 6, p. 911-919, 1997.
- ALI, S. A.; STOEVA, S.; ABBASI, A.; ALAM, J. M.; KAYED, R.; FAIGLE, M.; NEUMEISTER, B.; VOELTER, W. Isolation, structural and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 384, n. 2, p. 216-226, 2000.
- ALTMANN, K. H. Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 5, p. 424-431, 2001.
- ANACLETO, C.; ABDO, M. C. B.; FERREIRA, A., V. B.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; FERNANDES, A. P.; MOREIRA, E. S. A. Structural and functional analysis of an amplification containing a PGPA gene in a glucantime-resistant *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* cell line. **Parasitol. Res.**, v. 90, p. 110-118, 2003.
- ANDE, S. R.; KOMMOJU, P. R.; DRAXL, S.; MURKOVIC, M.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; FERRABDO-MAY, E. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, p. 1439-1451, 2006.
- APT, W.; AGUILERA, X.; ARRIBADA, A.; PEREZ, C.; MIRANDA, C.; SANCHEZ, G.; ZULANTAY, I.; CORTES, P.; RODRIGUEZ, J.; JURI, D. Treatment of chronic Chagas disease with itraconazole and allopurinol. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 133-138, 1998.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A₂ – a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827-841, 1996.

BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. **Emerg Med (Fremantle)**, v. 13, p. 28-36, 2001.

BALANÍA-FOUCE, R.; REGUERRA, R. M.; CUBRÍA, C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmac.**, v. 30, p. 435-443, 1998

BALSINDE, J.; BALBOA, M. A.; INSEL, P. A.; DENNIS, E. A. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 39, p. 175-189, 1999.

BALSINDE, J.; DENNIS, E. A. Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 26, p. 16069-16072, 1997.

BALSINDE, J.; PÉREZ, R.; BALBOA, M. A. Calcium-independent phospholipase A₂ and apoptosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1761, n.11, p. 1344-1350, 2006.

BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; HAVT, A.; TOYAMA, D. O.; EVANGELHISTA, J. S. A. M.; FERREIRA, D. P. P.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; TOYAMA, M. H.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Renal and antibacterial effects induced by miotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 376-386, 2005.

BARBOSA, P. S.; HAVT, A.; FACÓ, P. E.; SOUSA, T. M.; BEZERRA, I. S.; FONTELES, M. C.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MONTEIRO, H. S. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon**, v. 40, n. 10, p. 1427-1435, 2002.

BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do gênero "*Lachesis*". In: BARRAVIERA, B. (Coord.). **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. Cap. 21, p. 297.

BARRAVIERA, B. **Disfunção hepática em pacientes picados por cobras botrópicas e crotálicas em Botucatu**. Botucatu: Departamento de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina de Botucatu, 1995.

BATISTA, I. F. C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FARIA, F.; SIMONS, S. M.; BARROS-BATESTTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; LEÃO, L. I.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari:Ixodidae). **Toxicon**, v. 51, p. 823-834, 2008.

BERMAN, J. D.; CHULAY, J. D.; HENDRICKS, L. D.; OSTER, C. N. Susceptibility of clinically sensitive and resistant *Leishmania* to pentavalent antimony in vitro. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 31, p. 459-465, 1982.

BERTELLO, L. E.; ALVES, M. J.; COLLI, W.; de LEDERKRENER, R. M. Evidence of phospholipases from *Trypanosoma cruzi* active on phosphatidylinositol and inositolphosphoceramide. **Biochem J**, v345, p77-84, 2000.

BJARNSON, J. B.; FOX, W. J. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, v. 62, p. 325-372, 1994.

BON, C. Snake venom & pharmacopoeia. In: BAUCHOT, R. (Ed.). **Snakes a natural history**. New York: Sterling Publishing Co., 1997. p.194-209, 1997.

BOUZA, E.; GARCIA-GARROTE, F.; CERCENADO, E.; MARIN, M.; DIAZ, M. S. *Pseudomonas aeruginosa*: a multicenter study in 136 hospitals in Spain. **Rev. Esp. Quimioter.**, v.16, n.1, p. 41-52, 2003.

BRAGANÇA, B. M.; SAMBRAY, Y. M. Multiple forms of cobra venom phospholipase A₂. **Nature**, v. 216, n. 5121, p. 1210-1211, 1967.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento por animais peçonhentos**. Brasília, DF, 1998.

_____. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana**: diagnóstico clínica e diferencial. Brasília, DF, 2006b.

_____. **Doenças infecciosas e parasitárias**: guia de bolso. 7. ed. Brasília, DF, 2008.

_____. **Manual de recomendação para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção leishmania/HIV**. Brasília, DF, 2004.

_____. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1. ed. Brasília, DF, 2006a.

_____. **Situação atual do ofidismo**. Brasília, DF, 2005. Disponível em <<http://www.portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 19 mar. 2009.

BRONIA, D. H.; PEREIRA, B. M.; LUJAN, H. D.; FRETES, R. E.; FERNANDEZ, A.; PAGLINI, P. A. Ganglioside treatment of acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice promotes long-term survival and parasitological cure. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 93, p. 341-350, 1999.

BROOKER, P. S.; LEVONEN, A. L.; SHIVA, S.; SARTI, P.; DARLEY-USMAR, V. M. Mitochondria: regulator of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 33, n. 6, p. 755-764, 2000.

CALVETE, J. J.; JUARÈZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. 2007. **J. Mass. Spectrom.**, v. 42, n. 11, p. 1405-1414, 2007.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosome liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 6, p. 93-100, 1964.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with Benznidazole. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 44, p. 29-37, 2002.

CARCAVALLO, R. U.; GIRON, I. G.; JURBERG, J.; LENT, H. **Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas América**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, n. 1, p. 70-76, 2005.

CASTRO FILHO, J.; SILVEIRA, A. C. Distribuição da doença de Chagas no Brasil. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, v. 31, p. 85-97, 1984.

CESTARI, I. S. ***Trypanosoma cruzi* e o Sistema Complemento**: mecanismos de ativação e o papel do gene CRIT (Complement C2 Receptor Inhibitor Trispaning) na resistência à lise de cepas de classe I e II. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

CHAKRABORTI, S. Phospholipase A₂ isoforms: a perspective. **Cell Signalling**, v. 15, p. 637-665, 2003.

CHAVES, J. M.; MENEZES, E. A.; MOREIRA, A. A.; CUNHA, F. A.; CARVALHO, T. M. J. P. Perfil de sensibilidade dos antimicrobianos utilizados em infecções urinárias de pacientes do hospital de referência São Lucas da cidade de Crateús – CE. **Infarma**, v. 15, p. 9-10, 2003.

CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bull. World Health Organ.**, v. 76, n. 5, p. 515-524, 1998.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; SCHATTNER, M.; FRITZEN, M.; POZNER, R. G.; REIS, C. V.; LOURENÇO, D.; LAZZARI, M. A. Effects of Lopap on human endothelial cells and platelets. **Haemostasis**, v. 31, p. 257-265, 2001.

CISCOTTO, C. J.; MACHADO de AVILA, R. A.; COELHO, E. A.; OLIVEIRA, J.; DINIZ, C. G.; FARIAS, L. M.; de CARVALHO, M. A.; MARIA, W. S.; SANCHEZ, E. F.; BORGES, A.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 3, p. 330-341, 2009.

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

COELHO, A. C.; TOSI, L. R. O.; COTRIM, P. C. Mapeamento de um gene de *Leishmania major* que confere resistência a pentamidina por deleção e inserção de elementos transposicionais. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 46, p. 109-112, 2004.

COLES, C. J.; EDMONDSON, D. E.; SINGER, T. P. Reversible inactivation of L-amino acid oxidase. Properties of the three conformational forms. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 8035-8039, 1977.

CONCEIÇÃO, K.; KONNO, K.; DE MELO, R. L.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; SCIANI, J. M.; CONCEIÇÃO, I. M.; PREZOTO, B. C.; CAMARGO, A. C. M.; PIMENTA, D. C. Isolation and characterization of a novel bradikinin potentiating peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypocondrialis*. **Peptides**, v. 28, p. 515-523, 2007.

CONCEIÇÃO, K.; KONNO, K.; RICHARDSON, M.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; DAFFRES, S.; CAMARGO, A. C. M.; PIMENTA, D. C. Isolation and biochemical characterization of peptides presenting antimicrobial activity from skin of *Phyllomedusa hypocondrialis*. **Peptides**, v. 27, p. 3092-3099, 2006.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007.

COURA, J. R.; ABREU, L. L.; WILLCOX, H. P. F.; PETANA, W. Estudo comparativo controlado com emprego de benznidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. I. Avaliação preliminar. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, p. 139-144, 1997.

COURA, J. R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 3-24, 2002.

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

DA SILVA, C. J.; JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiology of snakebite in central region of Brazil. **Toxicon**, v. 41, n. 2, p. 251-255, 2003.

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

DAVIDSON, F. F.; DENNIS, E. A. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipases A₂ from snake venom to human secreted forms. **J. Mol. Evol.**, v. 31, p. 228-238, 1990.

DE ALMEIDA, P. R. L.; CAMARGO, N. S.; ARENZ, M.; TOVO, C. V.; GALPERIN, B.; BEHAR, P. Peritonite bacteriana espontânea: impacto das mudanças da microbiologia. **Arq. Gastroenterol.**, v. 44, n. 1, p. 68-72, 2007.

DE ANDRADE, J. A. B.; DE OLIVEIRA, J. O. T.; FAGUNDES-NETO, U. Letalidade em crianças hospitalizadas com diarreia aguda – fatores de risco associados ao óbito. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 45, n. 2, p. 121-127, 1999.

DE AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 36, p. 480-489, 2003.

DE CASTRO, I. Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico, com ênfase na toxicidade renal. **O mundo da saúde**, v. 30, n. 4, p. 644-653, 2006.

DE LIMA, D. C.; ABREU, P. A.; DE FREITAS, C. C.; SANTOS, D. O.; BORGES, R. O.; DOS SANTOS, T. C.; CABRAL, L. M.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Snake venom: any clue for antibiotics and CAM? **Evid. Based Complement Alternat. Med.**, v. 2, n. 1, p. 39-47, Mar. 2005.

DE SOUZA LEAO, S.; LANG, T.; PRINA, E.; HELLIO, R. ANTONIE, J.C. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **J. Cell Sci.**, v. 108, p. 3219-3231, 1995.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 13057-13060, 1994.

DIAS NETO, J. A.; SILVA, L. D. M.; MARTINS, A. C. P.; TIRABOSCHI, R. B.; DOMINGOS, A. L. A.; SUAID, H. J.; TUCCI JÚNIOR, S.; COLOGNA, A. J. Prevalence and bacterial susceptibility of hospital acquired urinary tract infection. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, supl. 5, p. 36-38, 2003.

DIAS, J. C. P.; MACHADO, E. M. M.; FERNANDES, A. L.; VINHAES, M. C. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, p. 13-34, 2000.

DOS SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; DE FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

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

EHARA, T.; KITAJIMA, S.; KANZAWA, N.; TAMIYA, T.; TSUCHIYA, T. Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. **FEBS Lett.**, v. 531, p. 509-512, 2002.

FAÇANHA, M. C.; PINHEIRO, A. C. Comportamento das doenças diarréicas agudas em serviços da saúde de Fortaleza, Ceará, Brasil, entre 1996 e 2001. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 49-54, 2005.

FADILI, K. E.; MESSIER, N.; LEPROHON, P.; ROY, G.; GUIMOND, C.; TRUDEL, N.; SARAVIA, N., G.; PAPADOPOULOU, B.; LÉGARE, D.; OUELLETTE, M. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 5, p. 1988-1993, 2005.

FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. **Rev. Paul. Med.**, v. 118, n. 1, p. 21-29, 2000.

FERRAZ, M. L.; GAZZINELLI, R. T.; ALVES, R. O.; URBINA, J. A.; ROMANHA, A. J. The anti-*trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine modelo of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 4, p. 1359-1364, 2007.

FERREIRA, M. S.; LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Doença de Chagas. In Veronesi R., Focaccia, R. (Ed.). **Tratado de infectologia**. 4. ed, São Paulo: Atheneu, 1999.

FERREIRA, S. H. A. bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 24, p. 163-169, 1965.

FIGUEIREDO, E. A. P. de; RAMOS, H.; MACIEL, M. A. V.; VILAR, M. do C. M.; LOUREIRO, N. G.; PEREIRA, R. G. *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Rev. Bras. Ter. Int.**, v. 19, n. 4, p. 421-427, 2007.

FOX, J. W.; MA, L.; NELSON, K.; SHERMAN, N. E.; SERRANO, S. M. Comparasion of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. **Toxicon**, v. 47, p. 700-714, 2006.

FRANÇA, S. C.; KASHIMA, S.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M.; TICLI, F. K.; PEREIRA, J. O.; ASTOLFI-FILHO, S.; STÁBELI, R. G.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. M.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Molecular approaches for structural characterization of *Bohtrops* L-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 355, p. 302-306, 2007.

FRIDKIN, S. K.; GAYNES, R. P. Antimicrobial resistance in intensive care units. **Clin. Chest Med.**, v. 20, n. 2, p. 303-316, 1999.

FRIEDERICH, C.; TU, A. T. Role of metals in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochem Pharmacol**, v20, p1549-1556, 1971.

FRITZEN, M.; FLORES, M. P. A.; REIS, C. V.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A prothrombin activator (Lopap) modulating inflammation, coagulation and cell survival mechanisms. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 333, p. 517-523, 2005.

FURTADO, M. F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; ROCHA, M. M. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**, v. 48, n. 4, p. 401-410, 2006.

GARCIA, E. A.; BIZO, G. S. J.; MIYAMOTO, C. T.; ARAÚJO, S. M.; GOMES, M. L.; BAHIA, M. T.; TOLEDO, M. J. O. Avaliação de diferentes esquemas de tratamento com benzonidazol na doença de chagas experimental em camundongos. **Arq. Mudi**, v. 11, supl. 1, p. 116, 2007.

GIRARDI, G. Os boticários da fauna brasileira. **O Estado de São Paulo**, 2007.

GODOY, P. Sistema Urinário. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap.16, p. 421-480, 2000.

GOMES, L. Dez pessoas mortas por Calazar em 2007 no Ceará. **Jornal o Povo**. Disponível em: <<http://www.opovo.com.br>>. Acesso em: 19 set. 2007.

GOMES, V. M.; CARVALHO, A. O.; DA CUNHA, M.; KELLER, M. N.; BLOCH Jr. C.; DEOLINDO, P.; ALVES, E. W. Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 45, p. 817-827, 2005.

GONÇALVES, A. R.; SOARES, M. J.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R. A.; ALVES, E. W. Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Parasitol. Res.**, v. 88, p. 598-602, 2002.

GUILARDE, A. O.; TUCHI, M. D.; MARTELLI, C. M. T.; PRIMO, M. G. B.; BATISTA, L. J. de A. Bacteremias em pacientes internados em hospital universitário. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 53, n. 1, p. 34-38, 2007.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. **Rev. Biol. Trop.**, v. 50, p. 377-394, 2002.

HARVEY, A. L.; BRADLEY, K. N.; COCHRAN, S. A.; ROWAN, E. G.; PRATT, J. A.; QUILLFELDT, J. A.; JERUSALINKY, D. A. What can toxins tell us for drug discovery? **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1635-1640, 1998.

HIGUCHI, D. A.; BARBOSA, C. M. V.; BINCOLETTO, C.; CHAGAS, J. R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F.; PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R. C.; PESQUERO, J. L. Purification and partial characterization of two phospholipases A₂ from *Bothrops leucurus* (White-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, p. 319-328, 2007.

IZIDORO, L. F. M.; RIBEIRO, M. C.; SOUZA, G. R. L.; SANT'ANA, C. D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GOULART, L. R.; BELEBONI, R. O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S. V.; SCARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14, n. 20, p. 7034-7043, 2006.

IZIQUÉ, C. Nova arma contra hipertensão arterial. **Rev. Pesq. Fapesp**, 2001. Disponível em: <<http://www.revistapesquisa.fapesp.br>>. Acesso em: 11 set. 2007.

JARDIM, A.; FUNK, V.; CAPRIOLI, R.M.; OLAFSON, R.W. Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. **Biochem. J.**, v. 1, p. 307-313, 1995.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A.; O'CONNELL, J. L. Prognostic factors for amputation in the case of envenoming by snakes of the *Bothrops* genus (Viperidae). **Ann. Trop. Med. Parasit.**, v. 93, p. 401-408, 1999.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Insights into mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, p. 627-642, 1996.

- KAUFFMAN, C. A.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. **Clin. Infect. Dis.**, v. 3, p. 14-18, 2000.
- KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochem. J.**, v. 397, n. 3, p. 377-387, 2006.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.
- KINI, R. M. Molecular moulds with multiple missions: functional sites in three-finger toxins. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, n. 9, p. 815-822, 2002.
- KINI, R. M. **Venom phospholipase A₂ enzymes**: structure, function and mechanism. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1997.
- KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases. **Toxicon**, v. 27, p. 613-635, 1989.
- KIRKPATRICK, P. Antibacterial drugs: stitching together naturally. **Nature Rev. Drug Discov.**, v. 1, p. 748, 2002.
- KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 63, p. 3030-3041, 2006.
- LESSA, M. M.; LESSA, H. A.; CASTRO, T. W. N.; OLIVEIRA, A.; SCHERIFER, A.; MACHADO, P.; CARVALHO, E. M. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 73, n. 6, p. 843-847, 2007.
- LEVY, S. B. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. **J. Appl. Microbiol.**, v. 92, Suppl., p. 65S-71S, 2002.
- LI, X. Z.; ZHANG, L.; POOLE, K. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Antimicrob. Chemoter.**, v. 45, p. 433-436, 2000.
- LI, Z. Y.; YU, T. F.; LIAN, E. C. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon**, v. 32, p. 1349-1358, 1994.
- LIU, J. W.; CHAI, M. Q.; DU, X. Y.; SONG, J. G.; ZHOU, J. C. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halloyi pallas* venom. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v. 34, p. 305-310, 2002.
- LIVERMORE, D. M. Introduction: the challenge of multiresistance. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 29, suppl. 3, p. S1-S7, May 2007.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885-901, 2003.

LU, Q. M.; WEI, Q.; JIN, Y.; WEI, J. F.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L. L-amino acid oxidase from *Trimeresurus jerdonii* snake venom: purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects. **J. Nat. Toxins**, v. 11, n. 4, p. 345-352, 2002.

LU, Q.; CLEMETSON, J.M.; CLEMETSON, K.J. Snake venoms and hemostasis. **J. Thromb. Haemost.**, v. 3, p. 1791-1799, 2005.

MACEDO, J. L. S.; ROSA, S. C.; MACEDO, K. C. S.; CASTRO, C. Fatores de risco da sepse em pacientes queimados. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 32, n. 4, p. 173-177, 2005.

MACHEROUX, P.; SETH, O.; BOLLSCHWEILER, C.; SCHWARZ, M.; KURFURST, M.; AU, L. C.; GHISLA, S. L-amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. Comparative sequence analysis and characterization of active and inactive forms of the enzyme. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, n. 6, p. 1679-1686, 2001.

MACKESSY, S. P.; WILLIAMS, K.; ASHTON, K. G. Ontogenic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus* concolor: a case of venom paedomorphosis? **Copeia**, p. 769-782, 2003.

MARAGANORE, J. M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W. KÉZDY, F. J.; HEINRIKSON, R. L. A new class of phospholipases A₂ with lysine in place of aspartate 49. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 13839-13843, 1984.

MASSEY, V.; CURTI, B. On the reaction mechanism of *Crotalus adamanteus* L-amino acid oxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 242, p. 1259-1264, 1967.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1477, p. 146-156, 2000.

MAYRINK, W.; BOTELHO, A.C.C.; MAGALHÃES, P.A.; BATISTA, S. M.; LIMA, A. de O.; GENARO, O.; da COSTA, C. A.; de MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; CAIAFFA, W. T.; do NASCIMENTO, E.; MACHADO-COELHO, G. L. L. Imunoterapia, imunoquimioterapia no tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 1 p. 14-21, 2006.

MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; STÁBELI, R. G.; FRANCO, J.J.; TICLI, F.K.; CINTRA, A. C.O.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. **Toxicon**, v. 44, p. 215-223, 2004.

MCLANE, M. A.; MARCINKIEWICZ, C.; VIJAY-KUMAR, S.; WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I.; NIEWIAROWSKI, S. Viper venom desintegrins and related molecules. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 219, p. 109-191, 1998.

MIMICA, M. J.; MENDES, C. M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *S. aureus*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 6, p. 399-406, 2007.

MORTARI, M. R.; CUNHA, A. O.; FERREIRA, L. B.; DOS SANTOS, W. F. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. **Pharmacol. Ther.**, v. 114, n. 1, p. 171-183, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1/2, p. 55-63, Dec. 1983.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A₂. **J. Biochem.**, v. 131, n. 3, p. 285-292, 2002.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Secretory phospholipase A₂. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 8, p. 1158-1164, 2004.

MURRAY, H. W.; CARTELLI, D. M. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and independent leishmanicidal activity. **J. Clin. Invest.**, v. 72, n. 1, p. 32-44, 1983.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (NCCLS). **NCCLS M2-A8**: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard. 8th ed. Wayne, PA, 2003a.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (NCCLS). **NCCLS M7-A6**: methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved. 6th ed. Wayne, PA, 2003b.

NATIONAL Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) report, data summary from October 1986-April 1996, issued May 1996. A report from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. **Am. J. Infect. Control.**, v. 24, n. 5, p. 380-388, Oct. 1996.

NICOLAS J. P.; LIN, Y.; LAMBEAU, G.; GHOMASHCHI, F.; LAZDUNSKI, M.; GELB, M. H. Localization of structural elements of bee venom phospholipase A₂ involved in N-type receptor binding and neurotoxicity. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 7173-7181, 1997.

NOUÉR, S. A. **Aspectos clínicos e fatores de risco relacionados com colonização ou infecção por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente**. 2005. 106 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

OGAWA, T.; ODA, N.; NAKASHIMA, K.; SASAKI, H.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; KIHARA, H.; OHNO, M. Unusually high conservation of untranslated sequences in cDNAs for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A₂ isozymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 8557-8561, 1992.

OLIVEIRA, D. G.; TOYAMA, M. H.; NOVELLO, J. C.; BERIAM, L. O. S.; MARANGONI, S. Structural and functional characterization of basic PLA₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **J. Prot. Chem.**, v. 21, n. 3, p. 161-168, 2002.

OLIVEIRA, M. R.; TAFURI, W. L.; NICOLI, J.; VIEIRA, E. C.; MELO, M. N. and VIEIRA, L. Q. Influence of Microbiota in Experimental Cutaneous Leishmaniasis in Swiss Mice. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 42, n. 2, p. 87-94, 1999.

ORSI, G. B.; Di STEFANO, L.; NOAH, N. Hospital-acquired, laboratory-confirmed bloodstream infection: increased hospital stay and direct costs. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 23, n. 4, p. 190-197, 2002.

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G. B.; BELO, C. A. D.; HYSLOP, S.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; DA CRUZ-HOFLING, A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 95, n. 4, p. 175-182, 2004.

OWNBY, C. L. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. **J. Toxicol. Toxins Rev.**, v. 17, p. 213-238, 1998.

OWNBY, C. L.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLECHER, J. F. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v. 37, p. 411-445, 1999.

PAL, S. K.; GOMES, A.; DASGUPTA, S. C.; GOMES, A. Snake venom as therapeutic agents: from toxin to drug development. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 40, n. 2, p. 1353-1358, 2002.

PALMA, M. S.; YAMANE, T.; CAMARGO, A. C. M. **Biodiversidade: preservação e bioprospecção.** Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/biodiversidade/bio13.htm>>. Acesso em : 31 Aug. 2007.

PARAJE, M. G.; ALBESA, I.; ERASO, A. J. Conservation in probiotic preparations of *Lactobacillus* with inhibitory capacity on other species. **N. Microbiol.**, v. 3, p. 229-239, 2004.

PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOCHEA, J. GORVEL, J.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom: synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. **Eur. J. Biochem.**, v. 253, p. 452-461, 1998.

PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; TOYAMA, M. H. The effect of phospholipases A₂ from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. **Parasitol. Res.**, v. 102, p.1025-1033, 2008.

PASSERO, L. F. D.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D.; TOYAMA, M. H. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus ssp.* venoms. **Parasitol. Res.**, v. 101, n. 5, p.1365-1371, 2007.

PASSWELL, J. H.; SHOR, R.; SMOLEN, J.; JAFFE, C. L. Infection of human monocytes by *Leishmania* results in a defective oxidative burst. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 75, p. 277-284, 1994.

PAWELEK, P. D.; CHEAN, J.; COULOMBE, R.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; VRIELINK, A. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. **EMBO J.**, v. 19, n. 16, p. 4204-4215, 2000.

PESSATTI, M.; FONTANA, J. D.; FURTADO, M. F.; GUIMARÃES, M. F.; ZANETTE, L. R.; COSTA, W. T.; BARON, M. Screening of *Bothrops* snake venom for L-amino acid oxidase activity. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 51-52, p. 197-210, Spring 1995.

PONNUDURAI, G.; CHUNG, M. C. M.; TAN, N. H. Purification and properties of L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 313, p. 373-378, 1994.

PORTO, B. N.; TELLI, C. A.; DUTRA, T. P.; ALVES, L. S.; BOZZA, M. T.; FIN, C. A.; THIESEN, F. V.; RENNER, M. F. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata*. **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 270-277, 2007.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C. V.; FURTADO, M. de F. D.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* venom. **Toxicon**, v. 58, n. 8, p. 842-851, 2008.

RAIBEKAS, A. A.; MASSEY, V. Primary structure of the snake venom L-amino acid oxidase shows high homology with the mouse B cell interleukin 4-induced Fig1 protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 248, n. 3, p. 476-478, 1998.

RAJA, N. S.; SINGH, N. N. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 40, p. 45-49, 2007.

RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. **Toxicon**, v. 44, p. 1-17, 2004.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REIS, C. V.; FARSKY, S. H. P.; FERNANDES, B. L.; SANTORO, M. L.; OLIVA, M. L. V.; MARIANO, M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. In vivo characterization of Lopap, prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom. **Thrombosis Res.**, v. 102, p. 437-443, 2001.

REY, L. C.; MARTINS, C. V.; RIBEIRO, H. B. Leishmaniose visceral americana (calazar) em crianças hospitalizadas de área endêmica. **J. Pediatria**, v. 81, n. 1, p. 73-78, 2005.

RIBEIRO, L. A.; ALBUQUERQUE, M. J.; DE CAMPOS, V.A.; KATZ, G.; TAKAOKA, N. Y.; LEBRÃO, M. T.; JORGE, M. T. Óbitos por serpentes peçonhentas no estado de São Paulo: avaliação de 43 casos. 1988/1993. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v. 44, p. 312-318, 1998.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T.; LEBRÃO, M. L. Prognostic factors for local necrosis in *Bothrops jararaca* (Brazilian pit viper) bites. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, p. 630-634, 2001.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M.T. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, p. 475-480, 1997.

RICHARDS, M. J.; EDWARDS, J. R.; CULVER, P. H.; GAYNES, R. P. Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. **Pediatric**, v. 103, p. 39-43, 1999.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual de Saúde. Divisão de vigilância Sanitária. **Relatórios Anuais de DTA**. Porto Alegre, 2001. (Série Histórica).

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

ROMANHA, A. J.; ALVES, R. O.; MURTA, S. M. F.; SILVA, J. S.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: role of endogenous interferon-gama in mediating parasitologic cure. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 823-828, 2002.

SÁ, L. E. M. **Profilaxia da leishmaniose visceral**. 2006. Monografia (Especialização) – UNIDERP/INBRAPE, Campo Grande, 2006.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R. N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian Hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 5, n. 4, p. 200-244, 2001.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; THWIN, M. M.; CHOW, T. K. V.; BOW, H.; YAP, E. H.; THONG, T. W. J. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A₂ enzymes. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, p. 150-159, 2007.

SANT'ANA, C. D.; MENALDO, D. L.; COSTA, T. R.; GODOY, H.; MULLER, V. D. M.; AQUINO, V. H.; ALBUQUERQUE, S.; SAMPAIO, S. V.; MONTEIRO, M. C.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Antiviral and antiparasite properties of an L-amino acid oxidase from the snake *Bothrops jararaca*: cloning and identification of a complete cDNA sequence. **Biochem. Pharmacol.**, v. 76, p. 279-288, 2008.

SANTAMARIA, C.; LARIOS, S.; ÂNGULO, Y.; PIZARRO-CERDA, J.; GORVEL, J.P.; MORENO, E.; LOMONTE, B. Antimicrobial activity of myotoxic phospholipase A₂ from crotalid snake venoms and synthetic peptide variants derived from their C-terminal region. **Toxicon**, v. 45, p. 807-815, 2005.

SCHMUÑIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. **Transfusion**, v. 31, p. 547-557, 1991.

SCOTT, D. L.; OTWINOWSKI, Z.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Crystal structure of bee venom phospholipase A₂ in a complex with a transition state analogue. **Science**, v. 250, p. 1563-1566, 1990.

SHINOHARA, N. K. S.; DE BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; LIMA FILHO, J. L. *Salmonella* spp. Importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Cienc. Saude Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.

SILVA, C. F.; MEUSER, M.B.; DE SOUZA, E. M.; MEIRELLES, M. N.; STEPHENS, C. E.; SOM, P.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. Cellular effects of reversed amidines on *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, p. 3803-3809, 2007.

SILVEIRA, P. V. P.; NISHIOKA, A. S. South America rattlesnake bite in Brazilian teaching hospital. Clinical and epidemiological study of 87 cases, with analysis of factors predictive of renal failure. **Trans. R. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, p. 562-564, 1992.

SIQUEIRA, A. M. Subfilo Mastigophora. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L. **Parasitologia humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 27-30.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, p. 1-19, 2000.

SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 855-868, 2003.

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 378, p. 201-209, 2000.

SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; CECCHINI, A. L.; ARANTES, E. C.; FRANÇA, S. C.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A₂ subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 33, p. 877-888, 2001.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; TOYAMA, M. H.; LOMBARDI, F. R.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 503-514, 1998.

STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT'ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R.; GUERRA-SÁ, R.; VIERA, C. A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R.; SOARES, A. M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49 phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v. 142, n. 3/4, p. 371-381, 2006.

STÁBELI, R. G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; PIETRO, R. C. L. R.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; OLIVEIRA, E. B.; SOARES, A. M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, p. 2881-2886, 2004.

STÁBELI, R. G.; SANT'ANA, C. D.; RIBEIRO, P. H.; COSTA, T. R.; TICLI, F. K.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; ALBUQUERQUE, S.; MALTA-NETO, N. R.; MARINS, M.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 41, p. 132-140, 2007.

STILES, B. G.; SEXTON, F. W.; WEINSTEIN, S. A. Antibacterial effects of different snakes venoms: Purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon**, v. 29, p. 1129-1141, 1991.

STOCKER, K. Use of snake venom proteins in medicine. **Schweiz Med Wochenschr**, v. 129, n. 6, p. 205-216, 1999.

SUCH, J.; RUNYON, B. Spontaneous bacterial peritonitis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 27, p. 669-676, 1998.

SUHR, S. M.; KIM, D. S. Comparison of the apoptotic pathways induced by L-amino acid oxidase and hydrogen peroxide. **J. Biochem.**, v. 125, p. 305-309, 1999.

SUHR, S. M.; KIM, D. S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 224, p. 134-139, 1996.

TAKASAKI, C.; SUZUKI, J.; TAMIYA, N. Purification and properties of several phospholipases A₂ from the venom of Australian king brown snake (*Pseudechis australis*). **Toxicon**, v. 28, n. 3, p. 319-327, 1990.

TAKATSUKA, H.; SAKURAI, Y.; YOSHIOKA, A.; KOKUDO, T.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; MATSUI, T.; TITANI, K.; YAGI, H.; MATSUMOTO, M.; FUJIMURA, Y. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1544, p. 267-277, 2001.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. São Paulo: Atheneu, 2007.

TEIXEIRA, A. R.; CALIXTO, M. A.; TEIXEIRA, M. L. Chagas disease: carcinogenic activity of the antitrypanosomal nitroarenes in mice. **Mutat. Res.**, v. 305, p. 189-196, 1994.

TEIXEIRA, A. R.; CORDOBA, J. C.; SOUTO-MAIOR, I. C.; SOLORZANO, E. Chagas disease: lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 43, p. 146-158, 1990.

TEMPONE, A. G.; ANDRADE, H. F.; SPENCER, P. J.; LOURENÇO, C. O.; ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania spp.* with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 280, p. 620-624, 2001.

TISCHFIELD, J. A. A reassessment of the low molecular weight phospholipase A₂ gene family in mammals. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 28, p. 17247-17250, 1997.

TORII, S.; NAITO, M.; TSURUO, T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 14, p. 9539-9542, 1997.

TORII, S.; YAMANE, K.; MASHIMA, T.; HAGA, N.; YAMAMOTO, K.; FOX, J. W.; NAITO, M.; TSURUO, T. Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. **Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 3197-3205, 2000.

TORRES, A. M.; WONG, H. Y.; DESAI, M.; MOOCHHLA, S.; KUCHEL, P. W.; KINI, R.M. Identification of a novel family of proteins in snake venoms: purification and structural characterization of nawaprin from *Naja nigricollis* snake venom. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 41, p. 40097-40104, 2003.

TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. de O.; PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; TOMOKANE, T. Y.; FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; MARTINS, A. M. C.; MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. S. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 47, p. 47-57, 2006.

TU, A. T. **Overview of snake venom chemistry**. Natural toxins II. [S.I.]: Plenum Press, 1996.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂? **Biochimie**, v. 82, p. 815-831, 2000.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. Bioquímica de venenos de serpentes. In: BARRAVIERA, B. (Coord.). **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. Cap. 14, p. 2005.

VERANO-BRAGA, T.; ROCHA-RESENDE, C.; SILVA, D. M.; IANZER, D.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; BOUGIS, P. E.; DE LIMA, M. E.; SANTOS, R. A. S.; PIMENTA, A. M. C. *Tityus serrulatus* hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 371, p. 515-520, 2008.

VERHEIJ, H. M.; BOFFA, M. C.; ROTHEN, C.; BRYEKERT, M. C.; VERGER, R.; HASS, G. H. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A₂. **Eur. J. Biochem.**, v. 112, p. 25-32, 1980.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA SANTOS, M. M.; SANT'ANA, C. D.; GIGLIO, J. R.; SAMPAIO, S. V.; DA SILVA, R. J.; SOARES, A. M.; et al. Antitumoral effect of na L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 102, p. 533-542, 2008.

WANG, Y.; HONG, J.; LIU, X.; YANG, H.; LIU, R.; WU, J.; WANG, A.; LIN, D.; LAI, R. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. **PLoS ONE**, v. 3, n. 9, p. e3217, Sept. 2008.

WEI, J. F.; WEI, Q.; LU, Q. M.; TAI, H.; JIN, Y.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L. Purification, characterization and biological activity of an L-amino acid oxidase from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v. 35, p. 219-339, 2002.

WHITE, J. Snakes venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, p. 951-967, 2005.
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Focus: Leishmaniasis**. Geneva, 2004.
Disponível em: < <http://www.who.int/tdr/dw/leish2004.htm> >. Acesso em: 8 Mar. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the informal meeting on the chemotherapy of visceral leishmaniasis**. Geneva, 1982.

XIE, J. P.; YUE, J.; XIONG, Y. L.; WANG, W. Y.; YU, S. Q.; WANG, H. H. *In vitro* activities of small peptides from snake venom against clinical isolates of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Inter. J. Antim. Agents**, v. 22, p. 172-174, 2003.

XU, C.; MA, D.; YU, H.; LI, Z.; LIANG, J.; LIN, G.; ZHANG, Y.; LAI, R. A bactericidal homodimeric phospholipases A₂ from *Bungarus fasciatus* venom. **Peptides**, v. 28, p. 969-973, 2007.

YAMAZAKI, Y.; HYODO, F.; MORITA, T. Wide distribution of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms: isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 412, n. 1, p. 133-141, 2003a.

YAMAZAKI, Y.; TAKANI, K.; ATODA, H.; MORITA, T. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 52, p. 51985-51988, 2003b.

ZHANG, Y. I.; WANG, J. H.; LEE, W. H.; WANG, Q.; LIU, H.; ZHENG, Y. T.; ZHANG, Y. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 309, p. 598-604, 2003.