

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

TAMIRIS FERRAREZI

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA TOXINA BRUTA
DE *Crotalus durissus terrificus* SOBRE CEPAS DE
Candida albicans, *Pseudomonas aeruginosa* E
Staphylococcus aureus, UTILIZANDO O MÉTODO
DE KIRBY-BAUER.**

Bauru
2010

TAMIRIS FERRAREZI

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA TOXINA BRUTA
DE *Crotalus durissus terrificus* SOBRE CEPAS DE
Candida albicans, *Pseudomonas aeruginosa* E
Staphylococcus aureus, UTILIZANDO O MÉTODO
DE **KIRBY-BAUER.****

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Centro de Ciências da Saúde como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Farmacêutico, realizado sob orientação da
Profa. Dra. Silvana Torossian Coradi.

BAURU
2010

TAMIRIS FERRAREZI

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA TOXINA BRUTA DE *Crotalus durissus terrificus* SOBRE CEPAS DE *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* E *Staphylococcus aureus*, UTILIZANDO O MÉTODO DE KIRBY-BAUER.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Farmacêutico, realizado sob orientação da Profa. Dra. Silvana Torossian Coradi.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Ms. Daniela Barbosa Nicolielo
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Dra. Silvana Torossian Coradi
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 16 de dezembro de 2010.

Dedico este trabalho aos meus pais, Edson e Cleusa; a minha irmã Tatiani e aos meus avós. Pessoas essenciais em minha vida que sempre estiveram me apoiando e estimulando para que eu conseguisse realizar este sonho e seguir cada vez mais adiante.

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Sagrado Coração, que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da Fundação Veritas.

Ao Laboratório de Biologia, especialmente suas funcionárias Lígia e Fabiane.

Ao amigo José Sergio Possomato Vieira, pela ajuda na tradução.

Ao amigo e Farmacêutico Adolfo Garcia Erustes pela ajuda na realização da parte experimental do trabalho.

Ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), Unesp/Botucatu, pela doação da peçonha de cascavel.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth, por sua ajuda e conselhos.

À Profa. Dra. Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato, pelos conselhos e ajuda na formatação do trabalho.

A todos os professores que colaboraram para minha formação acadêmica, dividindo suas sabedorias e experiências.

A todos que estiveram envolvidos de maneira direta e indireta neste trabalho.

Obrigada a todos!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Silvana Torossian Coradi, minha orientadora, pelo seu incansável e permanente encorajamento, pela disponibilidade em todas as situações, pelo compromisso, empenho e pelas suas sugestões que foram preciosas para a concretização deste projeto.

Para mim, você é a tradução de competência, disciplina e profissionalismo. Muito obrigada por todos os seus ensinamentos, confiança e amizade, pois, contribuíram de forma direta e indireta para minha vida profissional. Muito obrigada, de coração!

“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se transformam em golpes fatais. Mas se você tiver grandes sonhos... seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão oportunidades e seus medos produzirão coragem.”

Augusto Cury. “Nunca desista de seus sonhos”

RESUMO

Com o uso indiscriminado de antimicrobianos e drogas imunossupressoras, doenças causadas por patógenos oportunistas têm tido cada vez mais importância, principalmente agentes como *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, e *Pseudomonas aeruginosa*, que são microrganismos que apresentam grande resistência a antimicrobianos normalmente utilizados, adquirindo especial importância em ambiente hospitalar. Frente ao crescente aumento de resistência destas espécies às drogas disponíveis, a busca de novas alternativas para o tratamento dessas infecções se faz cada vez mais necessária. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* sob o crescimento dos microrganismos citados. A metodologia empregada neste estudo utilizou peçonha bruta e liofilizada de *Crotalus durissus terrificus*, extraída de serpentes mantidas em cativeiro, pelo CEVAP (Unesp, Botucatu), cepa de *Candida albicans* (ATCC 10231), e isolados, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), obtidas de amostras clínicas, no Laboratório de Análises Clínicas (LAC), da Universidade Sagrado Coração, Bauru (SP). O efeito inibitório foi avaliado pelos métodos da difusão em disco e macrodiluição em caldo de cultura. Observou-se inibição do crescimento das cepas e isolados testados, em especial sobre a levedura. Contudo, novos estudos que determinem quais partes constituintes da peçonha exercem efeito inibitório devem ser realizados, e assim determinar seu potencial antimicrobiano.

Palavras-chave: Sensibilidade. Peçonha de *Crotalus durissus terrificus*. *Candida albicans*. *Staphylococcus aureus*. *Pseudomonas aeruginosa*. Concentração Inibitória mínima (CIM).

ABSTRACT

Diseases caused by opportunistic pathogens have become more remarkable due to indiscriminated use of antimicrobial and immunosuppressive drugs, mainly in cases of agents such as *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* which are microorganisms that present great resistance to antimicrobial drugs, and therefore, acquire special importance in hospital environments. The increased resistance of these strains to available drug, has made the search for new treatment alternatives for these infections a pressing necessity. The aim of this paper was to evaluate the function of *Crotalus durissus terrificus* venom on the growth of the cited microorganisms. The methodology applied in this study, used gross and lyophilized venom of *Crotalus durissus terrificus*, extracted from snakes kept in captivity by CEVAP (Unesp, Botucatu), strains of *Candida albicans* (ATCC 10231), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) obtained from clinical specimens in the Laboratório de Análises Clínicas (LAC) of the Universidade Sagrado Coração (USC), Bauru (SP). The inhibitory effect was evaluated by disk diffusion and broth culture macrodilution methods. We observed the inhibition of the analyzed strain growth, mainly the yeasts. Nevertheless, further studies must be conducted to determine which parts of the venom constituents exert effect inhibitory, in order to determine its antimicrobial activity.

Keywords: Sensibility. *Crotalus durissus terrificus* venom. *Candida albicans*. *Staphylococcus aureus*. *Pseudomonas aeruginosa*. Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Halo de inibição para cepa de <i>P. aeruginosa</i>	22
Figura 2. Halo de inibição para cepa de <i>S. aureus</i>	22
Figura 3. Halo de inibição para cepa de <i>C. albicans</i>	23
Figura 4. Comparação do crescimento de leveduras do gênero <i>C. albicans</i> submetidas ao tratamento com peçonha de <i>Crotalus durissus terrificus</i> na concentração de 100 µg/mL comparado com o grupo controle positivo.	23
Figura 5. Relação do número de leveduras do gênero <i>C. albicans</i> avaliados nos diferentes tempos e concentrações da peçonha de <i>Crotalus durissus terrificus</i> .	24
Figura 6. Blastocónídeos e pseudohifa na concentração de 100 µg/mL	24
Figura 7. Blastocónídeos e pseudohifas na concentração de 3,125 µg/mL	24
Figura 8. Pseudohifas no grupo controle positivo	24

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	12
2.0 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2- Objetivo Específico.....	19
3.0 MATERIAL E MÉTODO.....	20
3.1- Microorganismos utilizados.....	20
3.2 Peçonha de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	20
3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	20
4.0 RESULTADO.....	22
5.0 DISCUSSÃO.....	25
6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
7.0 REFERÊNCIAS.....	29

1.0 INTRODUÇÃO

Com o uso indiscriminado de antimicrobianos e drogas imunossupressoras, doenças causadas por patógenos oportunistas têm ganhado cada vez mais destaque, principalmente as causadas por *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* que são microrganismos que apresentam grande resistência a antimicrobianos, adquirindo especial importância, principalmente em ambiente hospitalar.

Fungos do gênero *Candida* são importantes causadores de doenças oportunistas, representados principalmente pelas espécies *albicans*, *glabrata* e *parapsilosis*, em proporções, respectivamente de 77,8%, 16,7% e 5,6% dos casos (ALEIXO NETO et al., 1999).

Candida sp faz parte da biota normal do hospedeiro, sendo encontrado na boca, trato gastrointestinal, pele e vagina (PELCZAR et al., 1996). Estimativas indicam que 25 a 50% dos indivíduos sadios carreguem como biota alguma espécie de *Candida* (MURRAY et al., 2006).

Morfologicamente, leveduras do gênero *Candida* apresentam células ovaladas de 3 a 5 μm de diâmetro, blastoconídeos e pseudohifas. A colônia possui aspecto liso e de cor branca (LACAZ, 1980; MURRAY et al., 2006). O fungo adere as células epiteliais na forma de levedura, e necessita estar na forma de pseudohifa para invadir tecidos mais profundos, o que acontece mediante ação de enzimas líticas (TORTORA et al., 2000; SILVA et al., 2007).

Sendo um patógeno oportunista, se aproveita de quadros clínicos (TRABULSI et al., 2002), em que o sistema imunológico imunodeprimido permite a proliferação da levedura causando a candidíase. A forma mais comum de candidíase é a vulvovaginal, manifestada também mediante estados fisiológicos modificados, como gravidez, modificações no ciclo menstrual e diabetes. Manifesta-se também em situações de antibióticoterapia prolongada, onde bactérias da biota normal são eliminadas, permitindo o livre crescimento do fungo (TORTORA et al., 2000; TRABULSI et al., 2002).

Os sinais e sintomas característicos de candidíase vulvovaginal são prurido e ardor vaginal, principalmente à micção, presença de secreção vaginal branca, espessa e inodora (VAL et al., 2001). Mesmo os sintomas sendo muito

característicos, não é possível realizar apenas diagnóstico clínico, sendo indispensável à realização de cultura da secreção vaginal (ROSA et al., 2004). Ao menos uma vez ao longo da vida, cerca de 75% das mulheres apresentam um episódio de vaginite causada por *Candida* sp, sendo a *C. albicans* responsável por 85% dos casos (TORTORA et al., 2000; VAL et al., 2001).

Manifestações importantes de candidíase são observadas em recém nascidos, diabéticos e portadores de prótese bucal. Nesses ocorre lesão conhecida como estomatite protéica, e o agente mais isolado é *Candida albicans* (BATISTA et al., 1999).

O quadro mais grave causado pela levedura é candidemia, onde o patógeno alcança a corrente sanguínea. Tais episódios são frequentes em imunocomprometidos, que passam por cateterismo (ZEICHNER, 2004) ou transplantados de medula óssea (TRABULSI et al., 2002). De acordo com CELEBI et al. (2007), em um estudo realizado num hospital pediátrico na Turquia, entre 1997 e 2005, o índice de candidemia foi de 5,1 para cada 1000 admissões.

Alguns autores consideram que a intervenção medicamentosa faz-se desnecessária quando o paciente apresenta episódios esporádicos e o agente etiológico é *C. albicans*, contudo se o quadro for recorrente e causado por uma espécie não-*albicans* a intervenção medicamentosa torna-se indispensável (VAL et al., 2001). As drogas mais utilizadas no tratamento das candidíases são anfotericina B e os medicamentos azólicos como fluconazol, cetoconazol e miconazol (BATISTA et al., 1999). Alguns autores, entre eles SANGLARD et al. (1996), acreditam que cepas de *C. albicans* estão criando resistência aos azóis; e que a anfotericina B tem amplo espectro de atuação e é a droga de escolha quando outros fármacos não demonstram atividade (ZEICHNER, 2004).

Assim como leveduras do gênero *Candida*, bactérias são importantes causadoras de doenças, entre elas podemos destacar *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. *S. aureus* faz parte da biota natural do homem, sendo encontrado principalmente na pele e mucosas (PELCZAR et al., 1996). Morfologicamente se apresentam como cocos Gram-positivos agrupados em cachos, metabolismo aeróbio facultativo e prova da catalase positivo (MURRAY et al., 2006).

S. aureus é patogênica tanto em âmbito doméstico quanto hospitalar. Em ambiente doméstico a complicação mais comum é foliculite, podendo evoluir para

furúnculo (TORTORA et al., 2000). Também é a causa mais comum de intoxicações alimentares, devido a ingestão da toxina presente em alimentos contaminados (STAMFORD et al., 2006). Em ambiente hospitalar, é contaminante de feridas pós-operatórias, e pode evoluir para a síndrome do choque tóxico, quando a toxina atinge a corrente sanguínea, é o principal causador de endocardite bacteriana (TORTORA et al., 2000; CARCELLER, 2006). A bactéria apresenta importante resistência aos antimicrobianos, principalmente as cepas hospitalares. CHAMBERS (2001), afirma que 85% dessas cepas são resistentes à penicilina e já estão identificadas. Na tentativa de solucionar esse problema, criou-se a meticilina (TAVARES, 2000; TIEMERSMA et al., 2004). No Brasil, não se utiliza meticilina, mas uma droga similar, a oxaciclina, que também é ineficaz (BUERIS et al., 2005).

Altos níveis de resistência do *S. aureus* foram descritos por HIRAMATSU et al. (1997), que isolaram a primeira cepa com susceptibilidade reduzida à vancomicina no Japão. Posteriormente o Center for Disease Control and Prevention (CDC) de Atlanta, Estados Unidos (CDC, 2002)^a e CDC (2002)^b, publicaram o isolamento de duas cepas totalmente resistentes à vancomicina nos Estados Unidos.

No Brasil, OLIVEIRA et al. (2001)^a, isolaram cinco amostras de *S. aureus* com sensibilidade moderada à vancomicina. Já em outro estudo, OLIVEIRA et al. (2001)^b, mostraram que 49,1% das cepas de um hospital em São Paulo são tolerantes à vancomicina e resistentes à oxaciclina. PALAZZO et al. (2005), isolaram quatro cepas resistentes à vancomicina, contudo não expressavam o gene *van A*, *B* ou *C*.

TIWARI et al. (2006), em estudo realizado na Índia, sugerem que o mecanismo de resistência do *S. aureus* a vancomicina parece estar ligado a alterações na parede celular. Testes de susceptibilidade a antimicrobianos foram realizados com essas cepas, demonstrando que são na sua maioria susceptíveis ao trimetoprim/sulfametoxazol; contudo, são resistentes à eritromicina (SIEVERT et al., 2008; TENOVER et al., 2004; CDC, 2002^a; TENOVER et al., 2006), à clindamicina (SIBERRY et al., 2003), ciprofloxacino e gentamicina.

Pseudomonas aeruginosa se apresentam como bastonetes Gram-negativos, de tamanho médio variando de 1,5 a 5 µm de comprimento e 0,5 a 0,8 µm de diâmetro. São estritamente oxidativas, apresentam prova de catalase positiva e prova de oxidase positiva (GOMES, 2008; MIMS et al., 1999). Normalmente, ficam

distribuídas em pares e são móveis, devido a um flagelo polar, reto ou levemente curvo, possui pili que facilita a aderência às células epiteliais e, algumas cepas possuem cápsula, que são estruturas que inibem a ação de fagocitose (GOMES, 2008; TRABULSI et al., 2005; MIMS et al., 1999). É um microrganismo que tolera uma ampla variedade de temperatura, que varia de 4 a 42°C; é um não fermentador e, para seu metabolismo respiratório utiliza carboidratos com oxigênio como acceptor terminal de elétrons. Embora seja um aeróbio obrigatório, com a utilização de nitrato ou arginina como acceptor de elétrons, ela pode crescer de modo anaeróbio (TORTORA et al., 2000; MURRAY et al., 2006).

Dentre seus componentes estruturais, como enzimas e toxinas que aumentam sua virulência, *P. aeruginosa* possui uma cápsula de polissacarídeo mucóide, que inibe a ação dos antibióticos, como aminoglicosídeo e suprime a atividade dos neutrófilos e linfócitos, se tornando assim mais resistente ao tratamento (MURRAY et al., 2006).

Esse microrganismo é amplamente distribuído na natureza e em ambientes hospitalares úmidos, como flores, pias, banheiros e equipamentos respiratórios ou de diálise (TORTORA et al., 2000; MIMS et al., 1999). São capazes de usar muitos componentes orgânicos como fonte de carbono e nitrogênio, e algumas cepas podem até crescer em água destilada e em antisépticos através do uso de micronutrientes, tais como componentes quaternários de amônio (TRABULSI et al. 2002).

Segundo MIMS et al. (1999), essa bactéria cresce rapidamente em meio de cultura laboratorial, incluindo o meio seletivo de bile; produzem colônias iridescentes irregulares e um odor característico. As cepas produzem pigmentação azul - esverdeado, que é a piocianina, característico desta espécie.

A contaminação por *P. aeruginosa* ocorre em pequena proporção em pessoas normais, dependendo do estado da microbiota, e em alta proporção em pacientes hospitalizados, e as infecções endógenas podem ocorrer em pacientes imunodeprimidos (TORTORA et al., 2000). *P. aeruginosa* infecta praticamente qualquer parte do organismo, desde que encontre as condições predisponentes adequadas. Está associada a ferimentos; provocando infecção na pele, e, é um patógeno importante em pacientes com fibrose cística. Além disso, pode provocar infecções no trato urinário, sepse, osteomelite, endocardite, pneumovagina, otite externa, terapia microbiana imunossupressora, administração prolongada de

antimicrobianos de amplo espectro, á desinfetantes contaminados ou terapêuticos, provocar pneumonia em paciente entubado, e acarreta lesões de membros inferiores importantes em pacientes diabéticos (TORTORA et al., 2000, FUENTEFRÍA et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2007).

Além dessas infecções, *P. aeruginosa* é invasora de córnea lesionada, acarretando opacidade de córnea e úlceras, todos de difícil tratamento. As lesões produzidas são decorrentes da ação da toxina A, proteases alcalina e elastases, onde a elastase destrói a elastina do parênquima pulmonar, sendo considerada como fator de virulência na patogenia da pneumonia induzida ou experimental. A toxina A é uma inibidora da síntese protéica, contribuindo com o desenvolvimento da infecção generalizada especialmente nas queimaduras. *P. aeruginosa* produz exotoxinas protéicas; enterotoxina responsável pela diarreia durante a infecção inicial; uma endotoxina e numerosos produtos extracelulares, tais como proteases e hemolisinas que possuem importância na patogenia. A toxina A e proteases são importantes na produção de edema, do endurecimento, da hemorragia e necrose observada na lesão da pele (GOMES, 2008; MIMS et al., 1999).

Naturalmente resistente a muitos antibióticos, pode sofrer mutações para cepas ainda mais resistentes durante o tratamento, devido á penetração do antibiótico para dentro da bactéria através de poros da membrana externa. Caso as proteínas que formam a parede destes poros se alterem de modo a restringir o fluxo para o interior da bactéria, pode ocorrer simultaneamente resistência á várias classes de antibióticos (FUENTEFRÍA et al., 2008; LACERDA, 2008).

Pseudomonas também produz uma variedade de diferentes β -lactamases que podem inativar muitos antibióticos β -lactâmicos como penicilina, cefaloporinas e carbapenemes. A resistência relativa aos antibióticos que caracteriza as *Pseudomonas* ainda é um problema. Contudo, em anos recentes, vários antibióticos novos foram desenvolvidos, e a quimioterapia para tratar estas infecções não é tão restrita como antes. As fluoroquinolonas e os novos antibióticos β -lactâmicos antipseudomonas são as drogas usuais de escolha, e, a sulfadiazina de prata é muito útil no tratamento das infecções de queimaduras por *Pseudomonas* (MURRAY et al., 2006; TORTORA et al., 2000).

Em uma pesquisa realizada entre 1998 e 2001, nos EUA, avaliando diferentes amostras biológicas de origem hospitalar revelaram que 90% dessas foram sensíveis a amicacina e a associação de piperacilina-tazobactam; 80 a 90% das

cepas foram sensíveis a cefepima, à ceftazidima, à imipenem e a meropenem; 70 a 80% das amostras foram sensíveis a ciprofloxacina, à fentamicina, à levofloxacina e à associação tivarcilina-ácido clavulânico (GOMES, 2008).

Frente ao crescente aumento da resistência de cepas às drogas disponíveis, a busca de novas alternativas para o tratamento de infecções se faz cada vez mais necessárias. Têm se avaliado diversas substâncias, como extratos vegetais, venenos e toxinas. Entre eles o interesse pela peçonha de serpentes, que contém muitos componentes protéicos, incluindo neurotoxinas, cardiotoxinas, miotoxinas, citotoxinas, proteases e nucleases (STILES et al., 1991).

Pesquisas demonstram que várias espécies de serpentes possuem em sua peçonha substâncias antimicrobianas, porém este potencial ainda não foi adequadamente avaliado, caracterizado ou padronizado (BLAYLOCK, 2000).

Diversas espécies de serpentes tiveram a sua peçonha investigada, principalmente as do gênero *Naja* sp.. Essa toxina apresenta que tem atividade inibitória contra Gram-positivos e Gram-negativos (SACHIDANANDA et al., 2007), porém a peçonha de víbora mais promissora foi do gênero *Causus* e *Bitis*, com boa ação contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Escherichia coli* (BLAYLOCK, 2000).

No Brasil, a espécie de maior interesse é a *Crotalus durissus terrificus*, serpentes que recebem a denominação popular de cascavel, em virtude da existência de uma estrutura, na extremidade da cauda, que mimetiza um guizo ou chocalho (origem do latim *cascabus* = guizo ou chocalho) (CARDOSO et al., 2003; FONSECA, 1949). De acordo com ROJAS et al. (2007), é a serpente mais comumente encontrada na região noroeste do Estado de São Paulo, com 34,5% de ocorrência. Estes mesmos autores relataram que os acidentes ofídicos causados pela cascavel chegam a 9,3%, e PINHO et al. (2004), atestaram que no Estado de Goiás são de 20,8%, sendo a serpente mais letal, com 1% de mortes. Os primeiros estudos com a peçonha desta serpente datam de 1903, quando o Doutor Vital Brazil, avaliou o efeito da peçonha diluída em pacientes com Hanseníase, na esperança deste interferir na doença, contudo não obteve sucesso (BRAZIL, 1934).

Estudos recentes reportam o uso da peçonha de subespécies diferentes à cascavel, como a *C. d. cumanensis*, que inibiu o crescimento de leveduras e bolores, principalmente a *C. albicans* e o *Sporothrix schenckii* (MAGALDI et al., 2002), ou a *C. d. cascavella* com atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo maior no primeiro grupo (OLIVEIRA et al., 2003)^c.

Já especificamente com a peçonha da *Crotalus durissus terrificus*, não existem muitos estudos avaliando sua ação antifúngica e antibacteriana. O seu potencial antiparasitário foi demonstrado por SHINOHARA et al. (2006), ao tratar culturas de *Giardia duodenalis*, e observar redução de 82% no crescimento do protozoário.

Devido aos atuais níveis de resistência microbiana às drogas disponíveis e o interesse por novas alternativas terapêuticas, esse estudo pode representar uma nova perspectiva de um possível tratamento com esta peçonha, contudo seus componentes ativos devem ser caracterizados, bem como sua toxicidade.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*.

2.2- Objetivo Específico

– Verificar a atividade inibitória de crescimento da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* sobre cepas de *S. Aureus* e *P. aeruginosa*, pelo método de Kirby-Bauer.

– Verificar a atividade inibitória de crescimento da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* sobre *C. albicans*, pelo método da microdiluição em caldo e pelo método de Kirby-Bauer.

– Comparar os métodos de atividade inibitória da peçonha *Crotalus durissus terrificus* sobre *C. albicans* , pelo método de Kirby-Bauer e microdiluição em caldo.

3.0 MATERIAL E MÉTODO

3.1- Microorganismos utilizados

Foram utilizados neste experimento cepas de *C. albicans* (ATCC 10231), pertencentes à micoteca do Laboratório de Biologia da Universidade do Sagrado Coração (USC) e cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932) identificadas por rotina de parâmetro mundial (SAHN E WASHINGTON^{II}, 1991).

3.2 Peçonha de *Crotalus durissus terrificus*

Foi utilizada a peçonha bruta e liofilizada de *Crotalus durissus terrificus*, extraído de serpentes mantidas em cativeiro no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (Unesp), Campus de Botucatu, Estado de São Paulo.

3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para determinação da atividade antibacteriana e antifúngica foi utilizado o método de *Kirby-Bauer* ou difusão em disco (CLSI, 2006). As cepas selecionadas foram mantidas em ágar BHI (Brain and Hart Infusion), diluídas segundo a escala 0,5 de Mc Farland. Posteriormente foram inoculadas em ágar Mueller-Hinton com *swab* de algodão estéril. Os discos de papéis estéreis de cinco milímetros foram colocados sobre o ágar e embebidos nas diferentes concentrações da peçonha, em proporções de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 e 3.125 µg/mL. Discos de antibióticos foram utilizados como inibidores de crescimento bacteriano nas placas inoculadas com bactérias, e discos embebidos em água deionizada estéril como controle negativo.

Todas as culturas foram incubadas em estufa aquecida a 37° C e as leituras efetuadas após 24 e 48 horas de incubação. A leitura foi realizada medindo-se em milímetros o halo de inibição formado.

Para a avaliação antifúngica da peçonha para *C. albicans*, também foi realizado o método da macrodiluição em caldo, adicionando-se 2,0 mL do meio de cultura RPMI, 100 µL da cepa de *C. albicans* ajustada na escala 0,5 de McFarland e os volumes adequados de peçonha diluída para se obter as concentrações de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 e 3.125 µg/mL. Controles positivos e negativos foram incluídos, sendo o controle negativo, adicionado 100 µL de solução de fluconazol 10 µg/mL (FERRAZZA et al., 2005) e o positivo somente 100 µL de água deionizada estéril. A leitura foi realizada por contagem em Câmara de Neubauer.

Todas as culturas foram incubadas em estufa aquecida a 37° C e as leituras efetuadas após 24 e 48 horas de incubação.

Todo o experimento foi realizado em câmara de fluxo laminar previamente limpa e desinfetada.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.0 RESULTADO

Foi avaliada a concentração inibitória mínima (CIM) da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* pela técnica de difusão em disco para as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e para levedura do gênero *Candida albicans* (ATCC 10231). Para a levedura, a atividade inibitória da toxina foi avaliada também pela técnica de macrodiluição em caldo de cultura.

Todas as análises foram realizadas após 24 e 48 horas de incubação, e a toxina testada em concentrações que variaram de 200 a 3.125 µg/mL.

Para controle positivo, de crescimento das bactérias utilizou-se antimicrobianos Seftriaxona, Sulfazotrin e Fluconazol, revelaram halo de inibição de 24, 39 e 33 mm respectivamente.

Para as bactérias testadas, observou-se inibição de crescimentos nas concentrações de 200 e 100 µg/mL. O halo de inibição foi discreto (7 mm).



Figura 1. Halo de inibição para cepa de *P. aeruginosa*

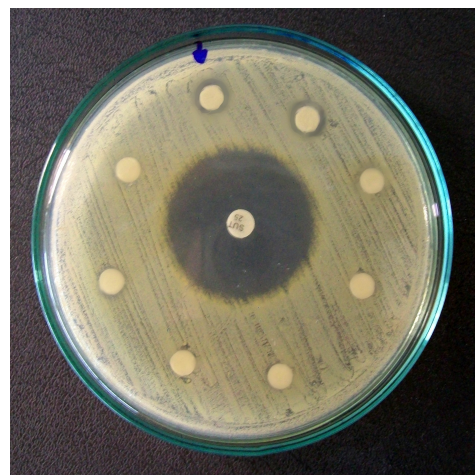


Figura 2. Halo de inibição para cepa de *S. aureus*

Ao se avaliar a atividade inibitória da levedura, pela técnica de *Kirby-Bauer* constatou-se halo de inibição em todas as diluições testadas com diâmetro de 9 mm.

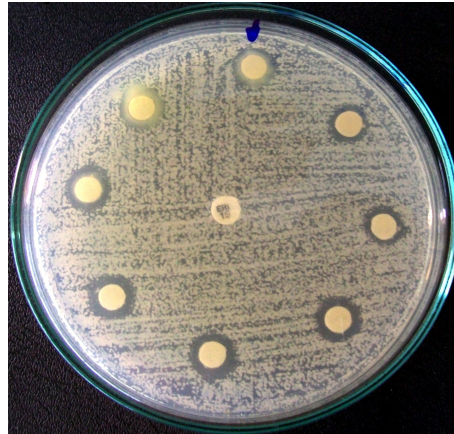


Figura 3. Halo de inibição para cepa de *C. albicans*

Ao se comparar o diâmetro de halo inibitório da peçonha frente aos microrganismos, observou-se maior efeito inibitório da peçonha sobre a levedura.

A avaliação da atividade inibitória pela técnica da macrodiluição revelou que, a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ reduziu em 10,4% o número total de leveduras em relação ao controle positivo nas primeiras 24 horas, em 48 horas de incubação o número de leveduras foi reduzido em 10,9% em relação ao controle positivo (Figura 4). Nas outras concentrações avaliadas não houve diferenças no número de leveduras quando comparadas ao grupo controle (Figura 5).

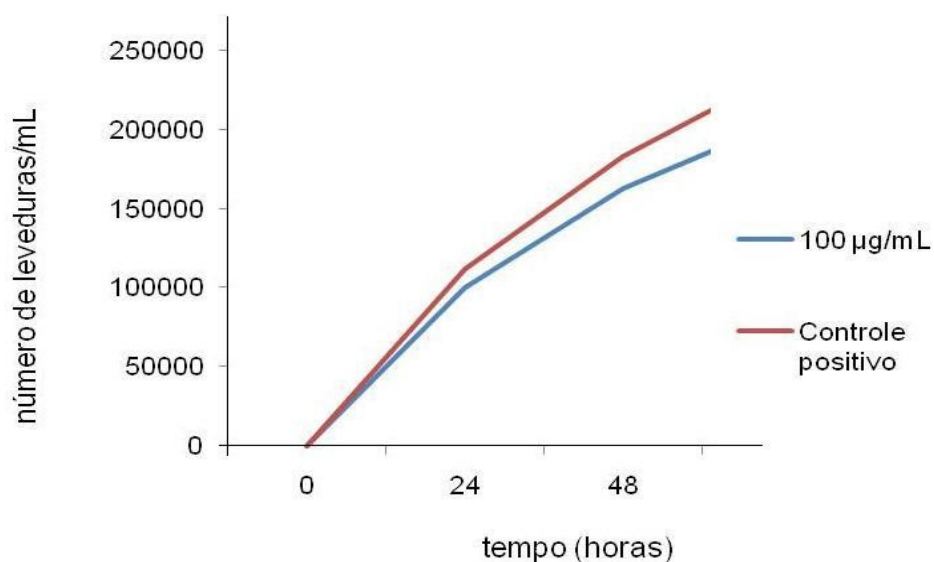


Figura 4. Comparação do crescimento de leveduras do gênero *C. albicans* submetidas ao tratamento com peçonha de *Crotalus durissus terrificus* na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ comparado com o grupo controle positivo.

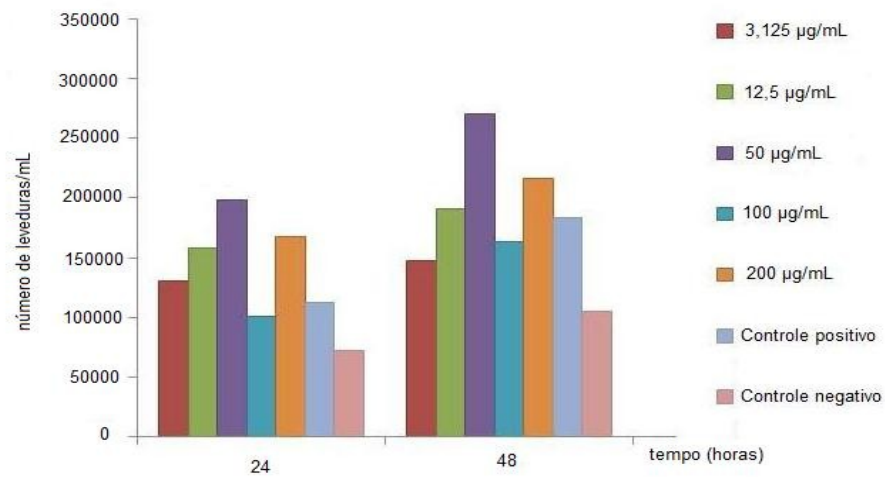


Figura 5. Relação do número de leveduras do gênero *C. albicans* avaliados nos diferentes tempos e concentrações da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*.

Quanto ao aspecto morfológico, nas concentrações de 100 e 3,125 µg/mL da peçonha, o desenvolvimento de blastoconídeos e pseudohifas foi visualmente menor quando comparado ao grupo controle positivo (ver figura 6, 7 e 8).

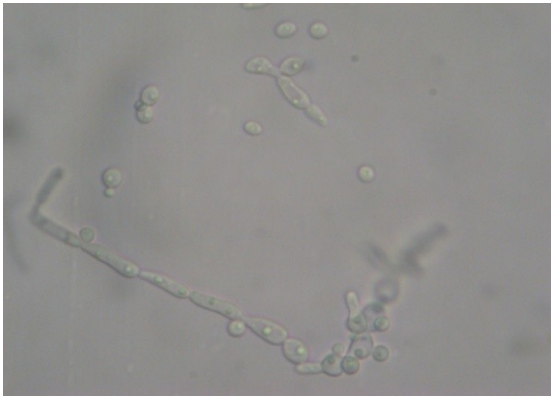


Figura 6. Blastoconídeos e pseudohifa na concentração de 100 µg/mL

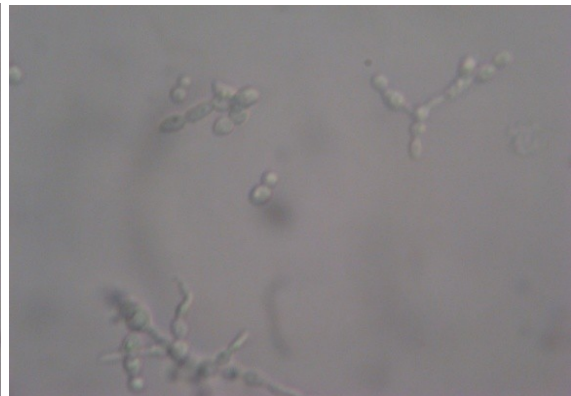


Figura 7. Blastoconídeos e pseudohifas na concentração de 3,125 µg/mL

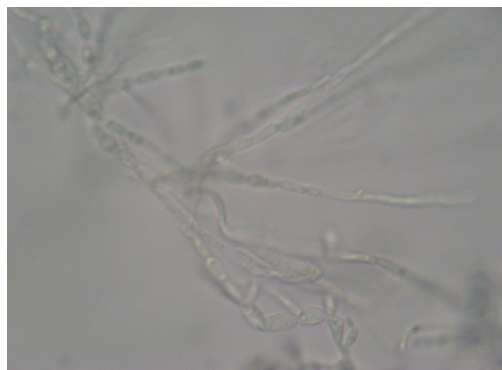


Figura 8. Pseudohifas no grupo controle positivo

5.0 DISCUSSÃO

O uso indiscriminado de antimicrobianos é um dos principais fatores da ocorrência cada vez mais preocupante de resistência dos microrganismos aos medicamentos utilizados. Assim a busca de novos e alternativos antimicrobianos torna-se cada vez mais urgente.

Neste contexto, o uso da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* possa ser uma alternativa, e apesar da grande toxicidade que apresenta, a toxina tem sido utilizada em pesquisas na tentativa de se determinar suas atividades biológicas. Diversos estudos procuram demonstrar sua ação na regeneração de tecidos e sua atividade antimicrobiana (VICENTE et al., 2008; SAMY et al., 2006). A elevada toxicidade da peçonha é atribuída à crotoxina, seu principal componente tóxico (BRAZIL, 1972) a qual contribui com cerca de 80% da letalidade induzida pelo veneno total.

A peçonha da serpente cascavel possui uma grande parte protéica, que é constituída por uma gama de proteínas com ou sem atividades enzimáticas e peptídeo; sendo estas responsáveis pelos efeitos biológicos. (LIMA et al., 2005). A crotoxina é um dos principais constituintes, sendo responsável por atividade antimicrobiana e citotóxica (OLIVEIRA et al., 2003^o ; KOH et al., 2006). Outro componente abundante é a crotacetina, que induz a agregação plaquetária e atividade antimicrobiana (BAPTISTA et al., 2006).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* e as *Pseudomonas* precisam ser constantemente testadas aos antibióticos e quimioterápicos utilizados. Essas bactérias sofrem forte pressão seletiva, já que pela ação das substâncias há inibição das bactérias sensíveis e crescimento das bactérias resistentes que estejam misturadas na população bacteriana (MOURA et al., 1998). A avaliação da atividade inibitória pode ser realizada pelas técnicas de macrodiluição em caldo de cultura ou em difusão em disco (CLSI, 2005)

Neste estudo, utilizando a técnica de difusão em disco, podem-se observar halos de inibição para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, na concentração de 200 µg/mL e 100 µg/mL. De acordo com os parâmetros do CLSI (2005), a cepa de *S. aureus* utilizada é multiresistente aos antimicrobianos normalmente utilizados, mesmo assim, houve a formação de nítido halo de inibição com o uso da peçonha na concentração de 200 µg/mL.

Avaliação da atividade inibitória de um produto ou fármaco sobre cepas e isolados dessas bactérias tem limitações, pois em uma mesma cultura pode haver bactérias sensíveis e resistentes à substância testada (TENOVER et al., 2004). Essa condição pode mascarar o resultado esperado. Mesmo assim, deve-se considerar que o uso de concentrações maiores que 200 µg/mL possam identificar resultados mais promissores em ensaios *in vitro*.

A caracterização e descrição dos componentes ativos da peçonha são de grande importância, pois somente com o isolamento e identificação de cada componente ativo, estudos mais detalhados poderão ser realizados para se determinar qualquer atividade biológica, em especial atividade antimicrobiana. O uso das frações da peçonha pode melhorar atividade antimicrobiana e reduzir a toxicidade do produto. Resultados de experimentos *in vitro* com a peçonha precisam de avaliações de toxicidade com determinação de dose letal mínima e níveis de agressões aos diferentes tecidos e órgãos para que possam ser considerados como possível alternativa terapêutica.

A técnica de imunodifusão em disco pode apresentar diferentes resultados dependendo da quantidade de meio colocado na placa de Petri (CLSI, 2005). Neste estudo utilizou-se 22 mL (7 mm) do meio *Mueller-Hinton* por placa, e essa pode ser a causa do discreto efeito inibitório, pois o preconizado pela técnica é de 4 a 6 mm, embora pequena, essa maior quantidade de meio pode interferir no efeito inibitório da substância.

Muito embora essa metodologia seja preconizada (CLSI, 2005) e aceita pela FDA (Food and Drug Administration) (BARRY & THORNSBERRY, 1991); quando se utiliza o método de difusão vários fatores podem se tornar fontes de erros, tais como composição do meio de cultura, pH do meio, preparação incorreta do meio de cultura, espessura do meio de cultura, densidade do inóculo incorreta, uso de swab com excesso de caldo para inoculação das placas, temperatura e tempo de incubação inadequados, interações entre o antimicrobiano e o meio de cultura, utilização errada da atmosfera de CO₂ quando necessária, leitura prematura, erro na medida das zonas de inibição ou uso de culturas mistas ou contaminadas (SILVA, 1999; BARRY & THORNSBERRY, 1991; OSTROSKY et al., 2008).

O meio *Mueller-Hinton* apresenta elevada quantidade de íons Cálcio e Magnésio. Esses elementos podem modificar a atividade do antimicrobiano. Essas interferências diminuem no uso da técnica de macrodiluição (CLSI, 2006) do meio

RPMI que possui discreta quantidade de íons, favorecendo verificação mais confiável do efeito antimicrobiano das substâncias testadas (MOURA, 1998). Mesmo assim neste experimento observou-se melhor efeito inibitório da peçonha pelo método de disco com inibição em todas as concentrações avaliadas, quando comparado a técnica da macrodiluição.

Ao se avaliar efeito inibitório de crescimento para a levedura *C. albicans* pela técnica de macrodiluição foi possível verificar diminuição do número de leveduras e redução na formação de pseudohifas. Considerando bactérias, a redução no crescimento indica efeito inibitório da substância, mas, para leveduras a redução ou não formação de pseudohifas pode sinalizar efeito satisfatório.

A macrodiluição em caldo é considerada técnica de escolha, dependendo do microrganismo avaliado, mas também apresenta problemas e desvantagens como a dificuldade de se detectar contaminantes, por exigir muito tempo e trabalho e por gerar grande volume de resíduos. (SAHN E WASHINGTON^{II}, 1991; ZGODA & PORTER, 2001).

O da técnica de difusão em disco é de leitura fácil e quantificação, uma vez que o halo inibitório é medido em milímetros. Embora deva-se considerar as limitações dessa técnica, seu uso se justifica pela facilidade de execução, menor custo e por estar inserido na rotina de laboratórios clínicos de pequenos e médio porte, o que pode facilitar a utilização do protocolo na rotina de diagnóstico. Apresentadas as vantagens e dificuldades das duas técnicas seria necessário amplo estudo que pudesse permitir nível de comparação entre elas, de modo que as duas metodologias pudessem ser igualmente utilizadas por diferentes laboratórios.

A atividade antimicrobiana parece ser dose-dependente, e se faz necessário verificar a ampla faixa de concentração da peçonha pura e suas diversas frações. Essas frações precisam ser isoladas e identificadas, para posterior avaliação em diferentes metodologias.

6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A utilização da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* pode ser uma alternativa de uso como inibidor de crescimento de bactérias e fungos.
- Antes de considerar a possibilidade da utilização da peçonha como inibidor de crescimento de microrganismos, se faz necessário determinar qual fração do produto bruto tem essa atividade, bem como sua toxicidade nas dosagens indicadas.
- O uso da técnica de *Kirby-Bauer* deve obedecer rigidamente o protocolo proposto para que os resultados obtidos possam servir de parâmetros confiáveis ao se avaliar efeito antimicrobiano de diferentes substâncias.
- Para avaliar efeito inibitório sobre fungos, a técnica de macrodiluição oferece a vantagem de permitir verificar inibição ou diminuição na formação de pseudohifas, indispensável ao se determinar infecção ou doença pela levedura.

7.0 REFERÊNCIAS

ALEIXO NETO, A.; HAMDAN, J.S.; SOUZA, R. C. Prevalência de *Candida* na flora vaginal de mulheres atendidas num serviço de planejamento familiar. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.21, n. 8, p. 441-445, 1999.

BAPTISTA, G. R. et al. Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 44, p. 412-423, 2006.

BARRY, A. L., THORNSBERRY, C., 1991. **Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures**. In: Balows A, Hauser WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shamody HJ 1991. *Manual of clinical microbiology*. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1117-112.

BATISTA, J. M.; BIRMAN, E. G.; CURY, A. E. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protéica. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 13, n. 4, p. 343-348, 1999.

BLAYLOCK, R. S. M. Antibacterial properties of KwaZulu natal snake venoms. **Toxicon**, v. 38, n. 11, p. 1529-1534, 2000.

BRAZIL, V. Do emprego da peçonha na terapêutica. **Biologia Medica**, v. 1, n. 2, p. 50-62, 1934.

BRAZIL, V.-. Neurotoxins from South American rattlesnake. *J. Formosan.Med. Assoc.*, v. 71, n. p. 394-396, 1972.

BUERIS, V. et al. Oral incidence of *Staphylococcus aureus* and antimicrobials agents resistance. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 4, n. 12, p. 676-679, 2005.

CARCELLER, A. Endocardite infecciosa. **An. Pediatr.**, v. 1, n. 1, p. 3-8, 2006.

CARDOSO, J.L.C.; FRANCA, F.O.; WEN, F.H.; MALAQUE, C.M.S.;HADDAD, V. As cascavéis. 2003. *Animais peçonhentos no Brasil, biologia, clínica e terapêutica dos acidente*. pp. 52-53. São Paulo.

CELEBI, C. et al. Nosocomial candidaemia in children: results of a 9-year study. **Mycoses**, v. 51, p. 248-257, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin - United States. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 51, n. 26, p. 565-567, 2002.^a

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* - Pennsylvania, 2002. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 51, n. 40, p. 902, 2002.^b

CHAMBERS, H. F. The Changing Epidemiology of *Staphylococcus aureus*?. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 178-182, 2001.

CLINICAL and LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15° Suplemento Informativo. Norma Aprovada. Documento M100-F15. v.25, n. 1, 2005.

CLINICAL and LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard. Document M2-A9. 9. ed., v.26, n.1, 2006.

FERRAZZA, M. H. S. H. et al. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 27, n. 2, p. 58 – 63, 2005.

FIGUEIREDO, E. A. P. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Frequency of resistance to Multiple Drugs and Cross-Resistance between Antimicrobials in Recife/PE. **Rev. Bras. de Terapia Intensiva.**, v. 19, n. 4, p. 421 – 427, 2007.

FONSECA, F. *Animais Peçonhentos*. 1949. pp. 35-40. São Paulo.

FUENTEFRIA, D. B. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Rev. Soc. Brasileira de Medicina Tropical**. V. set – out, p. 470 – 473, 2008.

GOMES, J. P. **Microbiologia médica**. 2. ed. São Paulo: LABACVET, 2008.

HIRAMATSU, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, p. 135-136, 1997.

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.

KONEMAN, E. W. et al. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5. ed. New York: Lippincott, 1997

LACAZ, C. S.. **Candidíases**. São Paulo: EPU: Edusp, 1980. p. 113-120.

LACERDA, D. A. de. Con-infecção *Pseudomonas aeruginosa* e dermatofito. **Revista Aprendendo por imagem: Hospital Israelita Albert Einstein**. V. 6, n. 1, p. 97 – 98, 2008.

LIMA, D. C. et al. Snake venom: any clue for antibiotics and CAM? **Oxford University Press.**, v. 2, n. 1, p. 39-47, 2005.

MAGALDI, S. et al. Antifungal activity of *Crotalus durissus cumanensis* venom. **Mycoses**, v. 45, n. 1-2, p. 19-21, 2002.

MIMS, S. C. et al. **Microbiologia médica**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1999.

MOURA, R. A. et al. **Técnicas de Laboratório**, 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

OLIVEIRA, G. A. et al. Avaliação da tolerância à vancomicina em 395 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 37, n. 4, p. 239-246, 2001.^b

OLIVEIRA, G. A. et al. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 22, n. 7, p. 443-448, 2001.^a

OLIVEIRA, D. G. et al. Structural and biological characterization of a crotapotin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 42, n. 1, p. 53-62, 2003.^c

OSTROSKY, E. A. e al. Método para avaliação da atividades antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, n. 2, p. 301-307, Abr/Jun 2008.

PALAZZO, I. C. V.; ARAUJO, M. L. C.; DARINI, A. L. C. First report of vancomycin-resistant Staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 179-185, 2005.

PELCZAR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, v. 2, 1996.

PINHO, F. M. O.; OLIVEIRA, E. S.; FALEIROS, F. Acidente ofídico no Estado de Goiás. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 50, n. 1, p. 93 – 96, 2004.

ROJAS, C. A.; GONÇALVES, M. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Epidemiologia dos acidentes ofídicos na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 8, n. 3, p. 193 – 204, 2007.

ROSA, M. I.; RUMEL, D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n. 1, p. 65-70, 2004.

SACHIDANANDA, M. K.; MURARI, S. K.; CHANNE, G. D. Characterization of an antibacterial peptide from Indian cobra (*Naja naja*) venom. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v. 13, n. 2, p. 446 – 461, 2007.

SAHN, D. F., WASHINGTON^{II}, J. A.. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. In: Balows, A.; Hauser, W.J.; Hermann, K.L.; Isenberg, H.D.; Shamody, H.J. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1105-1116, 1991.

SAMY, R. P. et al. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A₂ enzyme. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 650-659, 2006.

SANGLARD, D. et al. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 10, p. 2300-2305, 1996.

SHINOHARA, L. et al. *In vitro* effects of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* venoms on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Parasitology Research**, v. 98, p. 339-344, 2006.

SIBERRY, G. K. et al. Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance in vitro. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, p. 1257-1260, 2003.

SIEVERT, D. M. et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002–2006. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 5, p. 668-674, 2008.

SILVA, C. H. P. M.; **Bacteriologia: Um Texto Ilustrado**, Ed. Eventos: Teresópolis, 1999.

STILES, B. G.; SEXTON, F. W.; WEINSTEIN, S. A. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon**, v. 29, n. 1, p. 1129 – 1141, 1991.

STAMFORD, T. L. M. et al. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus spp.* isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.1, 2006.

SILVA, J. O.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. Atividade enzimática, produção de *slime* e sensibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida sp.* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 354-355, 2007.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TENOVER, F. C. et al. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 108-118, 2006.

TENOVER, F. C. et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 275-280, 2004.

TIEMERSMA, E. W. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 9, p. 1627-1634, 2004.

TIWARI, H. K.; SEN, M. R. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, n. 156, oct. 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed . Porto Alegre: Artmed, 2000.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

VAL, I. C. C.; ALMEIDA FILHO, G. L. Abordagem atual da candidíase vulvovaginal. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 13, n. 4, p. 3-5, 2001.

VICENTE, E. J. D. et al. Recuperação funcional do nervo ciático reparado pela cola de fibrina. **HU Revista**, v. 34, n. 1, p. 9-12, 2008.

ZEICHNER, L. O. Prophylaxis and treatment of invasive candidiasis in the intensive care setting. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 23, p. 739-744, 2004.

ZGODA, J. R., PORTER, J. R.. **A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi.** *Pharm Biol* 39: 221-225, 2001.