

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL VENENO DE LA  
SERPIENTE *Bothrops asper* (VIPERIDAE).**

**FABIÁN ANDRÉS HURTADO ERAZO**

**Trabajo de grado para optar por el título de Biólogo**

**Director**

**JIMMY ALEXANDER GUERRERO VARGAS  
M. Sc. Biología Animal**

**Codirector**

**JOSÉ BELTRÁN VIDAL  
M. Sc. Recursos Hidrobiológicos**

**Asesora**

**FABIOLA EUGENIA GONZÁLEZ  
Bacterióloga**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2011**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL VENENO DE LA  
SERPIENTE *Bothrops asper* (VIPERIDAE).**

**FABIÁN ANDRÉS HURTADO ERAZO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2011**

Nota de Aceptación

---

---

---

---

---

Director \_\_\_\_\_

M. Sc. Jimmy Alexander Guerrero

Jurado \_\_\_\_\_

MD. Santiago Ayerbe

Jurado \_\_\_\_\_

M. Sc. Andrés Torres

Fecha de Sustentación: Popayán 10 de Febrero de 2011

A la memoria de mi padre, a mi madre y  
Hermanos por su apoyo incondicional

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad del Cauca por mi formación como profesional, a los profesores del Departamento de Biología, quienes me ayudaron en esta labor.

A los Laboratorios de Microbiología, Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Salud, al Laboratorio de Biología de la Facultad de Educación y a sus funcionarios, por el compromiso con el que me facilitaron las practicas dentro de los laboratorios.

Al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC) y al Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas (GIHT), por acogerme como integrante y facilitarme la consecución del veneno de *B. asper* con el cual se realizó esta investigación.

También quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a mi madre Irma Erazo, a mis hermanos y a mi familia por el cariño, el apoyo y la confianza que siempre me han brindado.

A Liliana Caldas, Fabiola González y Gloria Ávila, docentes de la Facultad de Ciencias de la Salud, quienes contribuyeron enormemente en el desarrollo de este trabajo.

Al profesor Jimmy Guerrero por sus enseñanzas, consejos, paciencia y dedicación para dirigir mi trabajo de grado.

Al profesor José Beltrán por sus valiosas enseñanzas, experiencias y consejos.

Al doctor Santiago Ayerbe por ser mi maestro y orientarme por el camino de la Toxinología, por sus valiosas enseñanzas, experiencias y consejos.

A Eliana Portilla por su cariño, confianza y apoyo en los buenos y malos momentos.

A mi amiga Beatriz Sarmiento por la inmensa colaboración que me ofreció en manejo estadístico de los datos y por brindarme su valiosa amistad.

A mis amigos Harry Morales, Royer Coral, Frenyeline Jara, César Bravo, Yudi Fernández y Julián Cortés por el apoyo y los buenos momentos que compartimos durante la carrera.

A todas aquellas personas que de una u otra forma se hicieron participes por su constante ayuda y apoyo.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	13
1. JUSTIFICACIÓN	15
2. ANTECEDENTES	17
3. MARCO TEÓRICO	20
3.1. GENERALIDADES DE <i>Bothrops asper</i> (GARMAN 1884)	20
3.1.1 Clasificación taxonómica	20
3.1.2 Nombres comunes	20
3.1.3 Descripción	21
3.1.4 Distribución geográfica	22
3.1.5 Hábitat	22
3.1.6 Alimentación	23
3.1.7 Reproducción	23
3.1.8 Veneno	23
3.2. GENERALIDADES DE LOS MICROORGANISMOS EVALUADOS	24
3.2.1 Bacterias	24
3.2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	24
3.2.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	25
3.2.1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
3.2.2 Hongos	27

3.2.2.1	<i>Candida albicans</i>	27
3.2.2.2	<i>Candida krusei</i>	28
3.2.2.3	<i>Cryptococcus neoformans</i>	29
4.	OBJETIVOS	30
4.1.	OBJETIVO GENERAL	30
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1.	EXTRACCIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL VENENO	31
5.2.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	31
5.3.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	33
5.4.	DISEÑO EXPERIMENTAL	35
5.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
6.	RESULTADOS	37
6.1.	ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	37
6.1.1	Cepa <i>Escherichia coli</i>	37
6.1.2	Cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
6.1.3	Cepa <i>Staphylococcus aureus</i>	42
6.2.	ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	45
6.2.1	Cepa <i>Candida albicans</i>	45
6.2.2	Cepa <i>Candida krusei</i>	48
6.2.3	Cepa <i>Cryptococcus neoformans</i>	51
7.	DISCUSIÓN	55

8.	CONCLUSIONES	61
9.	RECOMENDACIONES	62
10.	LITERATURA CITADA	63

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1:</b> Fotografía de <i>Bothrops asper</i> .	<b>21</b>
<b>Figura 2:</b> Distribución de <i>B. asper</i> en Colombia.	<b>22</b>
<b>Figura 3:</b> <i>E. coli</i> en tinción de Gram de preparaciones de sedimento de orina: Gram negativos. Diagnóstico clínico: cistitis aguda.	<b>25</b>
<b>Figura 4:</b> Cultivo puro de <i>S. aureus</i> en agar sangre frecuentemente usado como cultivo enriquecido. Patógeno bacteriano aislado de humano.	<b>26</b>
<b>Figura 5:</b> Colonias de <i>P. aeruginosa</i> en agar Cetrimide.	<b>27</b>
<b>Figura 6:</b> <i>C. albicans</i> en candidiasis del tracto respiratorio.	<b>28</b>
<b>Figura 7:</b> Exploración de electromicrografías de aislamientos orales de cepas de <i>C. krusei</i> .	<b>29</b>
<b>Figura 8:</b> Cultivo de <i>C. neoformans</i> sobre agar sabouraud: colonias blanquecinas, crema.	<b>29</b>
<b>Figura 9:</b> Distribución de cada cepa y los controles en la placa de ELISA con sus respectivas repeticiones.	<b>35</b>
<b>Figura 10:</b> Promedio de crecimiento de <i>E. coli</i> con su respectivo error estándar, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> y los controles.	<b>38</b>
<b>Figura 11:</b> Correlación entre el crecimiento de <i>E. coli</i> y las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> .	<b>39</b>
<b>Figura 12:</b> Promedio de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> con su respectivo error estándar, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> y los controles.	<b>41</b>
<b>Figura 13:</b> Correlación entre el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> y las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> .	<b>42</b>

<b>Figura 14:</b>	Promedio de crecimiento de <i>S. aureus</i> con su respectivo error estándar, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> y los controles.	<b>44</b>
<b>Figura 15:</b>	Correlación entre el crecimiento de <i>S. aureus</i> y las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> .	<b>45</b>
<b>Figura 16:</b>	Promedio de crecimiento de <i>C. albicans</i> con su respectivo error estándar, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> y los controles.	<b>47</b>
<b>Figura 17:</b>	Correlación entre el crecimiento de <i>C. albicans</i> y las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> .	<b>48</b>
<b>Figura 18:</b>	Promedio de crecimiento de <i>C. krusei</i> con su respectivo error estándar, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> y los controles.	<b>50</b>
<b>Figura 19:</b>	Correlación entre el crecimiento de <i>C. krusei</i> y las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> .	<b>51</b>
<b>Figura 20:</b>	Promedio de crecimiento de <i>C. neoformans</i> con su respectivo error estándar, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> y los controles.	<b>53</b>
<b>Figura 21:</b>	Correlación entre el crecimiento de <i>C. neoformans</i> y las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> .	<b>54</b>

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1:</b> Promedio de crecimiento de <i>E. coli</i> con sus respectivas medidas de variabilidad, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> y los controles.	<b>37</b>
<b>Tabla 2:</b> Promedio de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> con sus respectivas medidas de variabilidad, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> y los controles.	<b>40</b>
<b>Tabla 3:</b> Promedio de crecimiento de <i>S. aureus</i> con sus respectivas medidas de variabilidad, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> y los controles.	<b>43</b>
<b>Tabla 4:</b> Promedio de crecimiento de <i>C. albicans</i> con sus respectivas medidas de variabilidad, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> y los controles.	<b>46</b>
<b>Tabla 5:</b> Promedio de crecimiento de <i>C. krusei</i> con sus respectivas medidas de variabilidad, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> y los controles.	<b>49</b>
<b>Tabla 6:</b> Promedio de crecimiento de <i>C. neoformans</i> con sus respectivas medidas de variabilidad, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de <i>B. asper</i> y los controles.	<b>52</b>

## RESUMEN

La importancia de la investigación de la serpiente *Bothrops asper* (Garman 1884) se debe a que se distribuye ampliamente en el continente americano comprendiendo los países que van desde el nordeste de México hasta las vertientes y tierras bajas de la región del Pacífico de Ecuador (Cisneros, 2001); Además habita en la extensa región del Chocó biogeográfico Colombiano y debido al gran volumen de veneno que produce constituye una buena fuente biológica de especial interés en la búsqueda de moléculas con principios activos de utilidad médica (Ayerbe, 2000; 2009; Ayerbe y Latorre 2009). El descubrimiento de los antibióticos ha tenido un efecto muy importante en la medicina moderna ya que han facilitado a los médicos la capacidad de curar o controlar muchas infecciones producidas por microorganismos que amenazan la vida. Sin embargo, la efectividad de estos agentes antimicrobianos se está volviendo cada vez más limitada (Escobar *et al.*, 2008), creando la necesidad de buscar nuevas moléculas con actividad antimicrobiana. Debido a esto, se estudio el veneno total de la serpiente *B. asper* con el objetivo de evaluar su actividad antimicrobiana en diferentes concentraciones (0,0078125, 0,015625, 0,03125, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 y 1 mg/mL) frente a cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*; y fúngicas de *Candida albicans*, *C. krusei* y *Cryptococcus neoformans*. Por medio de antibiogramas en microdilución se estableció la concentración mínima inhibitoria (CIM) para cada una de las cepas de estudio siguiendo las normas del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). El análisis de los datos se realizó mediante la prueba no paramétrica de *Kruskal-Wallis* complementada con la prueba *U* de *Mann Whitney* para comparación por parejas y se identificó el tipo de asociación entre las concentraciones de veneno estudiadas y el crecimiento de cada una de las cepas microbianas. Se determinó la CIM, como la mínima concentración de veneno que inhibe el 50% del crecimiento microbiano; para *E. coli* en 0,5 mg/mL, *P. aeruginosa* en 0,125 mg/mL, *S. aureus* en 1 mg/mL, *C. albicans* en 0.0625 mg/mL, *C. krusei* en 0,125 mg/mL y *C. neoformans* en 0,125 mg/mL. Los resultados obtenidos sugieren que el veneno de esta serpiente muestra influencia en la inhibición del crecimiento de las bacterias y hongos evaluados.

**Palabras clave:** Actividad antimicrobiana, antibiograma, *Bothrops asper*, veneno.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad se conocen cerca de 3000 especies de serpientes a nivel mundial. En Colombia se han reportado cerca de 225 especies, de las cuales 40 (17,7%) son venenosas y capaces de causar muerte en seres humanos (Patiño, 2002; Charry, 2005). De la Familia Viperidæ, las diferentes especies del género *Bothrops* (Crotalinae) son responsables de la mayoría de los envenenamientos por mordeduras en Latinoamérica (Costa y Fan, 1995; Alves *et al.*, 2003). En Colombia las serpientes venenosas pertenecen a los géneros *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* y *Porthidium* de la Familia Viperidæ y *Micrurus* y *Pelamis* de la Familia Elapidæ. Los accidentes con envenenamiento son causados especialmente por especies de los géneros *Bothrops* (90%), *Bothriechis*, *Crotalus* y *Micrurus*, entre otros (10%) (Patiño, 2002; Ayerbe, 2009; Ayerbe y Latorre, 2009).

Además estas serpientes poseen un tipo de veneno que se caracteriza por producir efecto isquémico secundario a coagulación intravascular o a síndrome compartimental, que en accidentes ofídicos más graves puede provocar la amputación de miembros engangrenados; esta infección se debe principalmente a que las serpientes presentan en su cavidad oral muchos microorganismos que infectan el sitio de la mordedura, los cuales sin un control adecuado pueden llegar a diseminarse produciendo infecciones muy graves (Henaó *et al.*, 2005). La importancia de la investigación de la serpiente *Bothrops asper* (Garman 1884) se debe a que se distribuye ampliamente en el continente americano comprendiendo los países que van desde el nordeste de México hasta las vertientes y tierras bajas de la región del Pacífico de Ecuador (Cisneros, 2001); además habita en el Chocó biogeográfico Colombiano y debido al gran volumen de veneno que produce constituye una buena fuente biológica de especial interés en la búsqueda de moléculas con principios activos de utilidad médica (Ayerbe, 2000; Ayerbe y Latorre, 2009).

Por otra parte las bacterias y los hongos son responsables de una gran variedad de infecciones; que de no tener un cuidado apropiado pueden llegar a ser mortales, como neumonías, meningitis, peritonitis, dermatofitosis, histoplasmosis, coccidiosis, etc. No obstante, el descubrimiento de los antibióticos ha tenido un efecto muy importante en la medicina moderna ya que éstos han facilitado la curación y/o control de muchas infecciones producidas por microorganismos que amenazan la vida. Sin embargo, la efectividad de estos agentes antimicrobianos

se está volviendo cada vez más limitada (Escobar *et al.*, 2008), debido a su uso inadecuado, generando mutaciones genéticas tanto bacterianas como fúngicas, que han permitido el desarrollo cada vez más frecuente de cepas de microorganismos resistentes a los antibióticos, los cuales mediante mecanismos genéticos transmiten estos genes de resistencia de un organismo a su descendencia, lo que imposibilita a los antibióticos realizar su normal efecto antimicrobiano (Crespo, 2002). Esta problemática mundial ha conducido a la necesidad de buscar nuevas fuentes biológicas de principios antimicrobianos, convirtiéndose este en uno de los puntos de partida de la aplicación biotecnológica de la toxínología ya que en el veneno de muchos animales es posible encontrar moléculas útiles al ser humano (Guerrero *et al.*, 2008).

En este estudio se proyectó determinar si el veneno total de *B. asper* tiene propiedades antimicrobianas en bacterias y hongos, en ensayos *in vitro*, y de esta manera contribuir al conocimiento de los venenos de serpientes para su posible aprovechamiento, no solo como bases fundamentales para la creación de antivenenos, sino también como agentes antimicrobianos en beneficio de la humanidad.

## 1. JUSTIFICACIÓN

Debido a que los organismos microbianos tienen un genoma que muta a gran velocidad, presentan una gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones y gran resistencia a los diferentes antibióticos actuales; surge la necesidad de encontrar nuevas alternativas moleculares y genéticas capaces de hacer frente a esta problemática, evitando con ella la proliferación de muchas enfermedades como: infecciones urinarias, bacteriemias, infecciones de heridas quirúrgicas y no quirúrgicas producidas por *Escherichia coli*; neumonías, bacteriemias, sepsis sobre infecciones en pacientes quemados y con fibrosis quística por especies del género *Pseudomonas*; criptococosis producidas por el hongo *Cryptococcus neoformans* y las candidiasis causada por hongos del género *Candida*. Una de estas alternativas que se está empezando a estudiar es la utilización de las toxinas y los compuestos de los venenos producidos por diferentes animales (escorpiones, arañas, ranas y serpientes) con el fin de evaluar, si tienen una actividad antimicrobiana efectiva, y con esto potenciar futuras investigaciones, principalmente en el empleo de estos compuestos para su posible uso terapéutico. Colombia debido a su megadiversidad biológica, tiene un elevado número de organismos productores de diferentes compuestos bioactivos, en los que es posible encontrar moléculas con aplicaciones biotecnológicas en el campo de la farmacología y el control biológico de insectos, lo que motiva a la sociedad científica colombiana para fortalecer esta línea de investigación (Guerrero *et al.*, 2008). Sin embargo, existe un desconocimiento de las posibles utilidades que los venenos de serpientes pueden presentar como potenciales usos farmacológicos o antimicrobianos.

Los antibióticos representan un gran éxito de la medicina, ayudando en la curación, control de las enfermedades infecciosas y salvando millones de vidas; reducen las enfermedades infecciosas previenen, curan y detienen su transmisión. La aparición cada vez más frecuente y diversa de la resistencia a nivel microbiano, ya sea por el aumento en el número de pacientes inmunodeficientes debido a la epidemia de SIDA, el uso de drogas anticancerígenas, así como los regímenes inmunosupresores en los pacientes sometidos a transplante de órganos; impacta fuertemente a la población, a los hospitales y a los servicios de salud del país y del mundo; acarreando consecuencias importantes en términos de morbilidad, mortalidad y millonarias pérdidas no sólo humanas sino económicas. Debido a esto, estudios en busca de nuevas estrategias, tratamientos y medicamentos antibacterianos y antifúngicos, son de vital importancia para controlar esta problemática (Crespo, 2002; Murillo y Lan, 2007). Potenciando con esto las

investigaciones con las toxinas de origen natural, ya que existe la posibilidad de extracción, a partir del veneno, de nuevos péptidos con capacidad antibacteriana, por ejemplo, los péptidos antibióticos (Cuesta *et al.*, 2008).

Recientemente las toxinas de origen animal han causado un gran interés investigativo por su efectividad en la alteración de los sistemas fisiológicos de sus víctimas. Así como en Colombia en cualquier región del mundo habitan muchas especies, tanto de vertebrados como invertebrados, que producen buena cantidad de toxinas; estos productos metabólicos son producidos ya sea como mecanismo de defensa química o de alimentación. En los últimos años los venenos de serpientes están siendo purificados para estudiar sus posibles usos, y en muchos de estos se han encontrado que algunas enzimas poseen propiedades antimicrobianas, pues gracias a su variada composición, todas las enzimas de los venenos de serpientes conservan un potencial uso práctico, terapéutico y la posibilidad de extracción de nuevas moléculas con capacidad antibacteriana (Cuesta, 2008); como lo demostró Stiles *et al.* (1991), investigando varios géneros de serpientes procedentes de América, Asia, África y Australia. En Colombia existe poca documentación acerca de los posibles usos de los venenos y de su efecto en los microorganismos; por esto tiene absoluta importancia el estudio del veneno de *B. asper* para establecer si tiene actividad antimicrobiana y encontrar un posible aprovechamiento de este recurso; pues esta especie es encontrada con frecuencia en el suroccidente colombiano habitando en diversas regiones, por lo que es relativamente fácil encontrarla en el departamento del Cauca y debido al gran volumen de veneno que produce constituye una buena fuente biológica (Ayerbe, 2000).

Los resultados de esta investigación permitirán establecer si el veneno de esta serpiente es una posible herramienta para ayudar a resolver algunos problemas de salud producidos por las infecciones causadas por los microorganismos, y representan un aporte al conocimiento sobre el aprovechamiento de los venenos de serpiente en beneficio de la humanidad; pues, aunque la actividad bactericida del veneno de serpientes está siendo estudiada en países vecinos como Perú y Brasil, la posible actividad fungicida no se ha abordado a fondo, dejando con este estudio la base para seguir las investigaciones con los venenos frente a bacterias y hongos y encontrar un uso tanto farmacológico, como desinfectante de lugares en donde se producen y manipulan alimentos, medicamentos y material quirúrgico; debido a que muchas de las infecciones microbianas se desarrollan por una inefectiva esterilización de estos lugares o de sus herramientas de trabajo. Además, conlleva a que se realicen procesos de uso, manejo y conservación de estos organismos considerados en muchos casos como peligrosos (Guerrero *et al.*, 2008).

## 2. ANTECEDENTES

Se evaluaron varios venenos de serpientes para determinar su efecto antibacteriano contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los venenos más activos fueron los de elápidos asiáticos y africanos, como *Notechis scutatus*, *Naja naja atra*, *N. nigricollis*, *N. haje haje* y *Pseudechis australis* así como cascabeles norteamericanas del género *Crotalus*. Reportando, por medio de ensayos de dilución en placa, que la actividad antibacteriana solo se registra en venenos amarillos y las fracciones de alto peso molecular (mayores a 100 kDa); concluyendo que este efecto en los venenos de elápidos examinados es debido a la enzima L-aminoácido oxidasa (LAO) (Stiles *et al.*, 1991).

Estudiando el veneno de *Bothrops alternatus* de la región Nordeste de Argentina para determinar el efecto bactericida sobre cepas de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y Gram negativas como *E. coli* en ensayos *in vitro*, se realizaron dos tipos de ensayos: Método de Dilución en placa y Método de McGeachie. Concluyendo que el veneno de esta serpiente posee actividad bactericida sobre *S. aureus* y *E. coli* (Bustillo *et al.*, 2005).

Por medio de los métodos de cilindro en placa y en disco; y la utilización del veneno de *Lachesis muta* de la Amazonia peruana se estudió la enzima L-aminoácido oxidasa (LAO) purificada y su actividad antibacteriana, con cultivos de *S. aureus* y *Vibrio cholerae*. Los ensayos con cultivos bacterianos mostraron la potencia de LAO para inhibir el crecimiento, tanto por el método de cilindro en placa como en disco, donde se concluyó que se trata de una proteína antibacteriana que afecta a microorganismos Gram positivos y Gram negativos (Cisneros *et al.*, 2006).

Posteriormente, se evaluaron las propiedades antimicrobianas de un grupo de venenos de serpientes contra dos cepas de bacterias Gram negativas de *Burkholderia pseudomallei* mediante el ensayo de difusión en disco para pruebas de sensibilidad *in vitro*. Encontrando que Los venenos de *Crotalus adamanteus*, *Daboia russelli russelli*, *Agkistrodon halys*, *P. australis*, *Bungarus candidus* y *Pseudechis guttata* tienen una potente actividad antibacteriana contra las bacterias Gram negativas (Perumal *et al.*, 2006). Purificando una nueva L-aminoácido oxidasa referida como BpirLAAO-I del veneno de *Bothrops pirajai*, por ensayos de dilución en caldo se estableció que induce actividad citotóxica contra *E. coli*, *P.*

*aeruginosa* y *Leishmania* sp. Concluyendo que BpirLAAO-I es una proteína multifuncional con prometedoras aplicaciones biotecnológicas y médicas (Izidoro *et al.*, 2006).

Aislando la flavoproteína L- aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*, se pudo establecer su actividad sobre cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas como: *S. aureus*, *Streptococcus faecalis*, *V. cholerae* y *E. coli*. El efecto antibacteriano se evidenció utilizando la técnica de Grove tanto del veneno crudo como de la L- aminoácido oxidasa purificada; y se obtuvo como resultado que las bacterias Gram positivas son más susceptibles que las Gram negativas (Lazo *et al.*, 2007). Asimismo, por medio de la utilización de la *pEM-2*, una variante de péptido sintético derivada de la miotoxina II, presente en el veneno de la serpiente *B. asper* del sur de México, se determinó que este péptido muestra una acción antimicrobiana de amplio espectro, en ausencia de actividad hemolítica y actividad fungicida contra *C. albicans*, mediante ensayos de recuento en placas (Murillo y Lan, 2007).

El veneno de *Pseudonaja* [*Oxyuranus*] *microlepidotus* se estudió, aislando y caracterizando una proteína llamada omwaprín, la cual fue evaluada en ensayos de difusión radial contra cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas; mostrando actividad antibacteriana dosis dependiente contra *Bacillus megaterium* y *Staphylococcus warneri* y no mostró tal efecto contra *B. thuringiensis*, *S. aureus* y *Streptomyces clavuligerus* (Nair *et al.*, 2007). Así mismo, del veneno de la serpiente *N. naja* se aisló un péptido (NAP) con potente actividad antibacteriana contra cepas bacterianas Gram negativas y Gram positivas como *E. coli*, *P. aeruginosa* y *V. cholerae*, y *S. aureus*, *S. faecalis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *Bacillus subtilis*, respectivamente; mostrando una actividad más potente contra bacterias Gram negativas; la actividad antibacteriana se determinó por medio de ensayos de susceptibilidad en microdilución (Sachidananda *et al.*, 2007).

Los venenos de serpientes como *Calloselasma* [*Agkistrodon*] *rhodostoma*, *B. jararaca*, *B. atrox* y *L. muta* fueron probados contra 10 cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas; revelando que el veneno de *L. muta* no mostró actividad antibacteriana. El veneno de *C. rhodostoma* no fue significativamente efectivo contra *S. aureus* y *E. coli*; sin embargo, fue capaz de inhibir significativamente el crecimiento de *S. faecalis* y *S. epidermidis*. El veneno *B. atrox* también mostró un perfil antibacteriano contra *S. faecalis* y *S. epidermidis*, a

diferencia del veneno de *B. jararaca*, que actúa sólo contra *S. aureus* (Ferreira *et al.*, 2008).

Del veneno producido por la serpiente *A. halys* se purificó una Fosfolipasa A<sub>2</sub>, la enzima se nombró AgkTx-II y su actividad antibacteriana se evaluada por ensayos de susceptibilidad de dilución en caldo. AgkTx-II ejerció una potente actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis* y *B. pseudomallei*. AgkTx - II causó alteraciones morfológicas evidentes en sus superficies celulares, indicando un mecanismo de muerte basado en la permeabilización y daño de la membrana bacteriana (Perumal *et al.*, 2008).

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. GENERALIDADES DE *Bothrops asper* (Garman 1884)

##### 3.1.1 Clasificación taxonómica

La serpiente *B. asper*, pertenece a la clase Reptilia, al orden Squamata, suborden Serpentes, familia Viperidæ y a la subfamilia Crotalinæ. La etimología del epíteto específico de esta especie se deriva del latín *asper*, que significa "áspero" o "duro". Se desconoce la motivación de Garman para selección de este nombre, pero tal vez se refiere a las escamas dorsales o quizás se trata de una alusión a la percepción de la naturaleza de la serpiente (Campbell y Lamar, 2004).

Las serpientes de la familia Viperidæ son las más diversificadas y con las especies potencialmente más peligrosas en el continente americano ya que todas son venenosas. Esta familia se caracteriza por presentar un tronco macizo y ancho, y cola corta con relación al cuerpo; las escamas de la región dorsal son típicamente quilladas, una cabeza triangular, los ojos grandes con una pupila en forma elíptica y su aparato venenífero alcanza el mayor desarrollo y por tanto son las mayores productoras de veneno, con colmillos que son muy grandes (Patiño, 2002). Incluye tres subfamilias, Azemiopinæ, Crotalinæ y Viperinæ. La subfamilia Crotalinæ cuenta con 28 géneros de los que se destacan *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*, por su tamaño y rápida respuesta al sentirse agredidas. El género *Bothrops* cuenta con 37 especies de las cuales en Colombia se registran: *B. asper*, *B. atrox*, *B. ayerbei*, *B. brazili*, *B. microphthalmus*, *B. punctatus*, *B. rhombeatus* y *B. xanthogrammus* (Henaó *et al.*, 2005; Capdevielle, 2009; Pineda *et al.*, 2002; Ayerbe *et al.*, 2007; Folleco, 2010).

##### 3.1.2 Nombres comunes

La serpiente *B. asper* es conocida como: Fer-de-Lance en francés o Lancehead en inglés por su cabeza en forma de lanza. En América Central se le llama terciopelo por el aspecto de sus escamas y barba amarilla, por su parte ventral de color crema; en Colombia se le llama equis negra por sus figuras y coloración en el dorso, en la costa Atlántica la llaman boquidorá, taya equis y rabiseca por su cola corta (Campbell y Lamar, 2004; Uri, 2005; Folleco, 2010).

### 3.1.3 Descripción

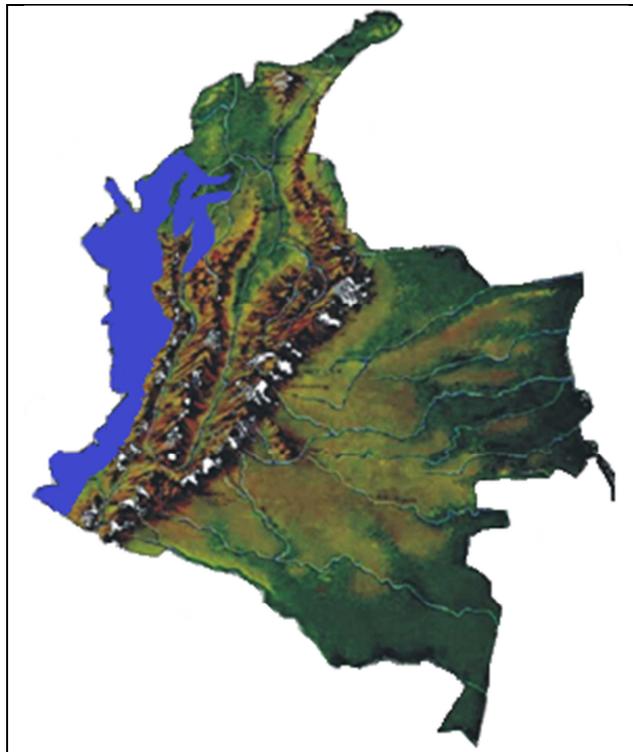
*B. asper* es una serpiente de talla grande, moderadamente delgada. El macho es un poco más pequeño que la hembra donde el promedio de longitud en adultos es de 120 -180 cm, pero es posible una talla ligeramente superior a 250 cm; el cuerpo tiene una forma ligeramente triangular y pueden llegar a pesar hasta 6 kg (Campbell y Lamar, 2004). Tiene un dorso con escamas quilladas que consiste de una matriz de 18 a 25 figuras triangulares de color oscuro (negro a café), con bordes claros (gris a crema) a los lados del cuerpo, que desde una vista superior forman una figura semejante a una equis (Fig. 1); este patrón de colores sirve de camuflaje entre hojas caídas. La cabeza es grande en forma triangular y está bien diferenciada del cuerpo; los ojos son medianos con la pupila de forma elíptica y en posición vertical; presentan una banda postocular de color negro que se extiende hasta el ángulo de la boca. También poseen un órgano sensorial; la Fosa termorreceptora alojada en una cavidad situada entre el orificio nasal y el ojo; este órgano capta las radiaciones infrarrojas del calor emitido por animales homeotermos en un radio de hasta 14 pulgadas, permitiendo la localización exacta de la presa. El aparato venenoso está formado por la glándula venenosa, el colmillo inyector curvo que puede alcanzar hasta 2 cm y los músculos que rodean la glándula venenosa y es una de las mayores productoras de veneno (Campbell y Lamar, 2004; Patiño, 2002).



**Figura 1.** Fotografía de *Bothrops asper*. © CIBUC. Cortesía: Santiago Ayerbe, MD.

### 3.1.4 Distribución geográfica

Su distribución en América es muy amplia pues abarca Centro América y el Noroeste de Colombia, Ecuador y Perú. En Colombia se distribuye en la zona del Chocó biogeográfico (Fig. 2); en el departamento del Cauca en los municipios de Guapi, Timbiquí y López de Micay lo mismo que al oeste de los municipios de Argelia y El Tambo; en un rango altitudinal desde el nivel del mar hasta los 1800 m (Folleco, 2010).



**Figura 2.** Distribución de *B. asper* en Colombia. Modificado de: Folleco, 2010.

### 3.1.5 Hábitat

Esta serpiente se puede encontrar en una variedad de hábitats que pueden ser zonas cálidas y húmedas, pero es principalmente una especie del bosque húmedo tropical y bosque tropical, y es común a lo largo de los bordes de las sabanas. También se puede encontrar en algunas regiones secas de bosque tropical caducifolio, pero es menos común en estos bosques que en regiones húmedas; parece limitarse a la proximidad de los ríos u otros cuerpos de agua, con hábitos

principalmente crepusculares y nocturnos; aunque los juveniles son activos también durante el día. Se refugian en el día en la hojarasca, raíces o en cuevas de animales (Campbell y Lamar, 2004; Murillo *et al.*, 2004).

### **3.1.6 Alimentación**

En estado adulto se alimenta de mamíferos pequeños y aves; y los juveniles se alimentan de lagartijas, ranas, e invertebrados utilizando la cola de color amarillo para atraerlos; muerde con sus colmillos retráctiles solenoglifos con los que inyecta el veneno (Murillo *et al.*, 2004).

### **3.1.7 Reproducción**

Los machos dejan de comer generalmente durante un tiempo después del comienzo del ciclo reproductivo, mientras que las hembras a los pocos meses de quedar en gestación. El apareamiento se produce en distintas épocas del año; la gestación dura generalmente de 180 a 240 días y las crías nacen vivas (pseudovivípara) presentando una talla de 21 a 37 cm. y un peso de 3 a 20.5 gr. El promedio de las camadas es 30, pero puede parir hasta 80 viboreznos. Las hembras están sexualmente maduras a los 95 cm y los machos a los 110 a 120 cm (Murillo *et al.*, 2004; Bolaños, 1984).

### **3.1.8 Veneno**

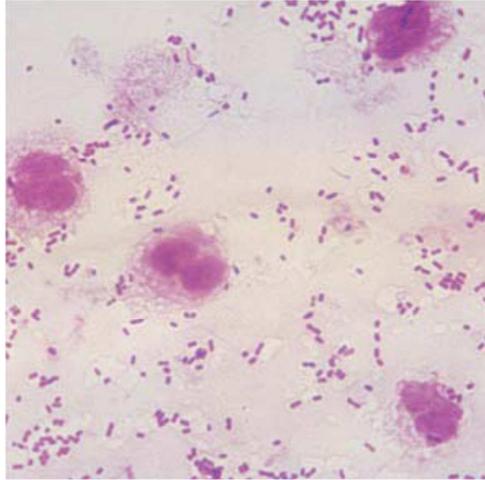
El veneno producido por las serpientes de la familia Viperidæ es una secreción compleja compuesta por toxinas y enzimas inyectadas a las víctimas por un sistema de inoculación formado por los colmillos que según su posición se clasifica el tipo de dentadura en solenoglifa. Dentro de estas toxinas se encuentran las Fosfolipasas A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>), las cuales constituyen una familia de proteínas con un diverso espectro de efectos farmacológicos que incluyen: neurotoxicidad, miotoxicidad, citotoxicidad, nefrotoxicidad, acción anticoagulante, y efectos inflamotogénicos. De éstas, la miotoxicidad se caracteriza por el daño de las fibras musculares (mionecrosis), cuyos efectos pueden producir desde la pérdida de tejido hasta la amputación de extremidades; otras toxinas son las hemorraginas, hidrolasas y proteasas (Otero, 1994; Patiño, 2002; Araya, 2004). Las enzimas del veneno que inoculan son entre 15 y 20 diferentes, muy comunes en la subfamilia Crotalinæ y actúan causando cambios en la permeabilidad de los eritrocitos, de la membrana celular y fibras musculares, consumen plaquetas y fibrinógeno y destruyen por necrosis los tejidos afectados (Luna, 2007). Este no sólo es uno de

los venenos más complejos, en comparación con los de los venenos de otras familias, sino también contienen las proteínas de mayor peso molecular (Pirela *et al.*, 2006). El cuadro clínico manifestado resulta de la combinación de los diferentes efectos producidos por los componentes. Los efectos locales son: dolor inmediato muy severo y persistente; en el curso de pocas horas edema progresivo que constituye el efecto más común en envenenamientos por los vipéridos, equimosis, y hemorragias en el sitio de la mordedura como consecuencia de la acción de las hemorraginas, sobre los vasos sanguíneos, las cuales son metaloproteasas dependientes de zinc. Generales: náuseas, vómito, diarrea, sudoración, epistaxis, hemoptisis, hematuria; los síntomas se presentan antes de seis horas, la hematuria es más tardía, insuficiencia renal aguda en los primeros días y síndrome de defibrinación. Sistémicos, cuando el veneno pasa a la sangre produce hemorragia, hipotensión, alteraciones en la coagulación, nefrotoxicidad y trombocitopenia (Otero, 1994; Gutiérrez, 2002; Patiño, 2002; Araya, 2004). Además, el veneno de esta serpiente ha llegado a ser considerado como uno de los más importantes por su influencia en la patología humana debido a su poder tóxico (Ángel, 1983).

## **3.2. GENERALIDADES DE LOS MICROORGANISMOS EVALUADOS**

### **3.2.1 Bacterias:**

**3.2.1.1 *Escherichia coli*.** Es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae del orden Enterobacteriales. Tiene forma de bacilo, es anaeróbica facultativa, y se moviliza por flagelos que rodean todo su cuerpo (peritricos); no forma esporas y su hábitat natural es el tracto intestinal de los mamíferos (Fig. 3). Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo; además produce vitaminas B y K. La especie comprende varios grupos que se establecen según su actividad. Las especies de *E. coli* oportunistas producen infecciones sólo si abandonan el colon. Otros grupos producen hasta el 90% de las diarreas infantiles en países en vía de desarrollo y la denominada diarrea del viajero. Algunas cepas de *E. coli* producen infecciones gastrointestinales. *E. coli* es un organismo adecuado para la investigación por su crecimiento rápido y porque su cultivo es sencillo (Kayser *et al.*, 2005).



**Figura 3.** *E. coli* en tinción de Gram de preparaciones de sedimento de orina: Gram negativos. Diagnósis clínicá: cistitis aguda. Fuente: Kayser *et al.*, 2005.

**3.2.1.2 *Staphylococcus aureus*.** Es una bacteria Gram positiva, de la familia Staphylococcaceae. Tiene forma de coco y crece agrupada en racimos. Es aerobia y anaerobia facultativa, por lo que puede crecer tanto en una atmósfera con oxígeno y también sin el mismo, no presenta movilidad ni forma cápsula, crece a temperaturas entre 6° 48°C pero su temperatura óptima es a 37°C y las colonias presentan pigmentos amarillos (Fig. 4). Suele formar parte de la microflora humana normal encontrándose en la piel y fosas nasales de las personas sanas. Causa gran variedad de infecciones, desde infecciones menores de la piel y abscesos cutáneos hasta enfermedades que pueden poner en peligro la vida como neumonía, meningitis, endocarditis y síndrome del shock tóxico (SST). *S. aureus* produce varias enzimas que contribuyen a su virulencia y su propagación tales como coagulasa, es una proteína que produce polimerización de la fibrina alterando su ingestión por las células fagocíticas, también forma una exotoxina con propiedades hemolíticas y necrosantes de la piel que suele ser la causa de lesiones supuradas que se observan en el organismo humano. El principal grupo de riesgo son pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos (Brooks *et al.*, 2005; Kayser *et al.*, 2005).



**Figura 4.** Cultivo puro de *S. aureus* en agar Sangre frecuentemente usado como cultivo enriquecido. Patógeno bacteriano aislado de humano. Fuente: Kayser *et al.*, 2005.

**3.2.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*.** Es una bacteria Gram negativa, de la familia Pseudomonadaceae. Es aerobia, con motilidad unipolar. Se puede aislar de muestras de suelo, aguas prístinas y contaminadas, así como de plantas y animales. Crece bien a temperaturas entre 36° 42°C (Fig. 5). Esta bacteria es un patógeno oportunista en humanos inmunocomprometidos. Infecta el tracto pulmonar, el urinario, tejidos, heridas, y también causa otras infecciones de sangre (Callicó *et al.*, 2004). *P. aeruginosa* produce varias sustancias y enzimas extracelulares, que aumentan la colonización e infección de los tejidos del huésped, las cuales incluyen elastasas, proteasas, dos hemolisinas, una Fosfolipasa C termolábil y un glucolípido termoestable y otras enzimas que hacen de este microorganismo la bacteria de mayor importancia clínica. Es una bacteria letal si se considera que 34% de la mortalidad por bacteremia ha sido atribuida a ella. También constituye un serio problema en las instituciones de salud, causando cuadros muy graves que incluyen bacteriemia, endocarditis, neumonía, meningitis, infecciones del tracto genitourinario y otras (Batlle *et al.*, 2005; Crespo, 2002; Brooks *et al.*, 2005; Kayser *et al.*, 2005).



**Figura 5.** Colonias de *P. aeruginosa* en agar Cetrimide. Fuente: Callicó *et al.*, 2004.

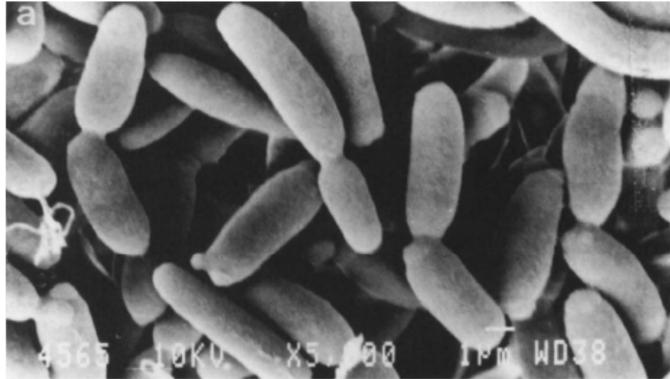
### 3.2.2. Hongos:

**3.2.2.1 *Candida albicans*.** Es una especie de levadura de la familia Saccharomycetaceae y clínicamente, la más significativa del género, causante de numerosas infecciones fúngicas en humanos y en animales, especialmente en pacientes con inmunosupresión. Normalmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina (Fig. 6). Está envuelta en un rol relevante en la digestión de los azúcares mediante un proceso de fermentación. La infección más común es la candidiasis oral por dentaduras postizas y es más frecuente en pacientes con SIDA. *C. albicans* puede producir el 70% de todas las infecciones humanas causadas por este género como infecciones superficiales que afectan a piel, uñas y mucosas; el restante 30% por otras especies entre ellas *C. krusei*. Otras especies de *Candida* de interés en patología humana son: *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (Kayser *et al.*, 2005).



**Figura 6.** *C. albicans* en candidiasis del tracto respiratorio. Fuente: Kayser *et al.*, 2005.

**3.2.2.2 *Candida krusei*.** Es una levadura de la familia Saccharomycetaceae y es un importante patógeno humano. Crece hasta una temperatura máxima entre 43 - 45 °C y sólo pueden crecer en medios libres de vit aminas; también se cultiva en medios que contienen lactosa y es capaz de producir acetoina. *C. krusei* asimila y fermenta la glucosa de algunos carbohidratos. Las colonias son como un mate o una superficie áspera de color amarillo blanquecino, esta característica, junto con su apariencia en la microscopía de "arroz de grano largo", ayuda a la identificación definitiva de la especie (Fig. 7). En comparación con las especies de *Candida* de importancia médica; *C. krusei* se ha aislado de una gran variedad de hábitats naturales, como la atmósfera, frutas, aguas residuales, suelo, alimentos (incluidos los productos lácteos y cárnicos, azúcar y jarabe de base de productos), los vinos y cerveza. Por lo tanto, se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y es considerado como un saprófito facultativo. En general, *C. krusei* es considerada como un comensal transitorio en el hombre y se ha aislado con poca frecuencia de las superficies mucosas de grupos de distintos pacientes y como un habitante de la mucosa en individuos sanos (Samaranayake y Samaranayake, 1994).



**Figura 7.** Exploración de electromicrografías de aislamientos orales de cepas de *C. krusei*. Fuente: Samaranayake y Samaranayake, 1994.

**3.2.2.3 *Cryptococcus neoformans*.** Es un hongo perteneciente a la familia Cryptococcaceae. Tiene forma de levadura esférica, ovoide y a veces de forma alargada. Crece a 37 °C y presentan una cápsula mucopolisacárida. Es considerado el patógeno humano más importante del género, porque produce la criptococosis que es una infección sistémica o micosis profunda que puede afectar al ser humano y a diversos animales (Fig. 8). Esta micosis se puede presentar en personas sanas, pero afecta sobre todo a pacientes con algún grado de inmunodepresión o con enfermedades debilitantes. Pero la infección por VIH es la causa predisponente en alrededor del 80 - 90% de los casos de criptococosis (Baró, 2002; Pachón *et al.*, 2006).



**Figura 8.** Cultivo de *C. neoformans* sobre agar Sabouraud: colonias blanquecinas, crema. Fuente: Kayser *et al.*, 2005.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Determinar la actividad antimicrobiana del veneno de la serpiente *Bothrops asper* (Viperidæ).

### 4.2. Objetivos específicos

- Determinar la actividad antibacteriana del veneno de *B. asper* frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Determinar la actividad antifúngica del veneno de *B. asper* frente a cepas de levaduras de *Candida albicans*, *C. krusei* y *Cryptococcus neoformans*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Extracción y almacenamiento del veneno

- Fuente: El veneno se obtuvo de ejemplares adultos de *B. asper*, que se mantienen en cautiverio en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC).

- Extracción del Veneno: se realizó en el laboratorio del CIBUC, mediante extracción manual inmovilizando la serpiente con un gancho de la parte posterior de la cabeza. Luego, se presionó la cabeza con el dedo índice, y se sujetó de la parte del cuello con el dedo pulgar y corazón; para inducirla a que muerda en un embudo de vidrio forrado con papel parafilm y así permitir descargar el veneno en tubos Eppendorf estériles de 1,5 mL. A continuación las muestras se centrifugaron a 15000 rpm, a 8 °C durante 15 minutos (centrífuga marca: Labnet, HERMLEZ 233MK-2). Se recuperó el sobrenadante, esto con el fin de limpiar el veneno de sangre e impurezas y que el sobrenadante solo contenga proteínas. Posteriormente las muestras se liofilizaron (liofilizador LABCONCO) para almacenarlas a una temperatura de -20°C hasta el momento de realizar las respectivas pruebas antimicrobianas.

### 5.2. Determinación de la actividad antibacteriana

El procedimiento se realizó de acuerdo al Instituto de Estándares Clínicos y de laboratorio (CLSI), antes NATIONAL COMMITTEE FOR MEDICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) en la norma de Métodos de Dilución para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana para bacterias; Norma aprobada, 2005.

#### Procedimiento para Microdilución en Caldo

Preparación del inóculo: En el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca, se preparó una suspensión de bacterias partiendo de un cultivo de 24 horas de las especies *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, de estos se retiró una

pequeña parte de las colonias de bacterias con un asa de alambre estéril y se transfirió a un tubo con solución salina (0.9%). Estas suspensiones bacterianas se homogenizan con un vortex y se ajustaron a una concentración de 0.5 McFarland ( $1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$ ) utilizando el Densimat; de las cuales se tomaron 250  $\mu\text{L}$  con la ayuda de una micropipeta y se llevaron a un tubo de cultivo que contenía 5 mL de agua destilada estéril con el fin de obtener una dilución 1:20; esta última dilución fue la utilizada en las pruebas antimicrobianas, con agitación constante para mantener la suspensión y así la concentración final de bacterias en cada celdilla sea  $5 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$ .

Preparación del veneno: se pesaron 2 mg de veneno liofilizado de *B. asper* en una balanza analítica, se diluyeron en 1 mL de agua destilada desionizada estéril en un tubo Falcon y se vortearizó.

Procedimiento en las bandejas de microdilución (placas de ELISA): Todo este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la misma universidad, bajo una cabina de bioseguridad LABCONCO. Antes de la inoculación las placas de ELISA, las puntas y las micropipetas deben estar estériles y dentro de 15 minutos de ajustado el inóculo al estándar 0,5 McFarland se llevó a cabo todo el procedimiento para no afectar la concentración de microorganismos y por consiguiente los resultados de la prueba. Primero se agregaron 100  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo infusión cerebro-corazón a los pocillos o celdillas de la placa con la ayuda de una micropipeta; luego en el primer pocillo se agregaron 100  $\mu\text{L}$  del veneno a una concentración de 2 mg/mL y se homogeneizó; de este pocillo se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se llevan al pocillo siguiente donde también se homogeneiza y se toman de nuevo 100  $\mu\text{L}$  para descargarlos en el pocillo siguiente y se continúa así hasta el octavo pocillo; de este último pocillo se toman 100  $\mu\text{L}$  y se descartan; de modo que las celdillas queden con un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ . Las concentraciones de veneno en cada celdilla son: 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL, 0,03125 mg/mL, 0,015625 mg/mL y 0,0078125 mg/mL; teniendo en cuenta que se realizaban diluciones 1:2 de una celdilla a otra. En el control negativo se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada desionizada estéril, que se mezclan con el medio de cultivo y se toman 100  $\mu\text{L}$  para ser descartados; como control positivo se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la sustancia antimicrobiana conocida (antibiótico) a una concentración de 2 mg/mL, para que en la celdilla quede a 1 mg/mL, que fue Trimethoprim-Sulfamethoxazole para *E. coli* y *S. aureus* y Cloramfenicol para *P. aeruginosa* y como control de esterilidad o blanco unas celdillas quedaron con solo 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo. Por último se inoculan 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana en

cada uno de los pocillos. Para evitar la deshidratación de las celdillas, cada placa se selló con papel parafilm garantizando un buen cierre.

Incubación: Las bandejas de microdilución se incubaron a 36 °C por 16 a 24 horas sin apilar más de cuatro placas para mantener la misma temperatura de incubación en todos los cultivos.

Determinación de los puntos finales de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM): La CIM es la concentración más baja de veneno que inhibe el 50% o la mitad del crecimiento de los microorganismos (*in vitro*) en los pocillos de microdilución. La CIM se determinó por medio de una estadística descriptiva donde se tomaron los promedios de los controles negativos de la lectura a 620 nanómetros (nm) realizada por el lector ELISA Thermo Electron Corporation Multiskan EX, que es una medida de absorbancia cuyas unidades son densidades ópticas (DO).

### **5.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA**

El procedimiento se realizó de acuerdo al Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), en la norma de Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos, siguiendo el procedimiento de EUCAST-AFST 2003, basado en el método de referencia M27-A.

#### **Procedimiento para Microdilución en Caldo**

Preparación del inóculo: En el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud se realizó este procedimiento, partiendo de un cultivo puro de 24 horas en SDA de las especies fúngicas *C. albicans*, *C. krusei* y *C. neoformans* aisladas de pacientes, del cual con la ayuda de un asa de alambre estéril se hace una suspensión en solución salina (0.9%), la cual se ajustó hasta llegar a una concentración de 0.5 McFarland ( $1 \text{ a } 2 \times 10^8$  UFC/ml) con el Densimat. De estas suspensiones se tomaron 250  $\mu\text{L}$  con la ayuda de una micropipeta y se llevaron a un tubo de cultivo que contenía 5 mL agua destilada estéril con el fin de obtener una dilución 1:20; esta última dilución fue la utilizada en las pruebas antimicrobianas, con agitación constante para mantener la suspensión y así la concentración final de hongos en cada celdilla sea  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

Preparación del veneno: se pesaron 2 mg de veneno liofilizado de *B. asper* en una balanza analítica, se diluyeron en 1 mL de agua destilada desionizada estéril en un tubo Falcon y se vortearizó.

Procedimiento en las bandejas de microdilución (placas de ELISA): Todo este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Salud, bajo una cabina de bioseguridad LABCONCO. Antes de la inoculación las placas de ELISA, las puntas y las micropipetas deben estar estériles y dentro de 15 minutos de que el inóculo ha sido ajustado al estándar 0,5 McFarland se llevó a cabo todo el procedimiento para no afectar la concentración de microorganismos y por consiguiente los resultados de la prueba. Primero se agregaron 100  $\mu$ L del medio de cultivo ATB Fungus 2 a los pocillos o celdillas de la placa con la ayuda de una micropipeta; luego en el primer pocillo se agregaron 100  $\mu$ L del veneno a una concentración de 2 mg/mL y se homogenizó; de este pocillo se tomaron 100  $\mu$ L y se llevan al pocillo siguiente donde también se homogeneiza y se toman de nuevo 100  $\mu$ L para descargarlos en el pocillo siguiente y se continúa así hasta el octavo pocillo; de este último pocillo se toman 100  $\mu$ L y se descartan; de modo que las celdillas queden con un volumen final de 100  $\mu$ L. Las concentraciones de veneno en cada celdilla son: 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL, 0,03125 mg/mL, 0,015625 mg/mL y 0,0078125 mg/mL; teniendo en cuenta que se realizaban diluciones 1:2 de una celdilla a otra. En el control negativo o control de crecimiento se agregaron 100  $\mu$ L de agua destilada desionizada estéril, que se mezclan con el medio de cultivo y se toman 100  $\mu$ L para ser descartados; como control positivo se agregaron 100  $\mu$ L de la sustancia antimicrobiana conocida (antimicótico) a una concentración de 2 mg/mL, para que la celdilla quede a 1mg/mL, que fue Amfotericina para las tres especies de hongos y como control de esterilidad o blanco unas celdillas quedaron con solo 100  $\mu$ L de medio de cultivo. Por último se inoculan 10  $\mu$ L de la suspensión fúngica en cada uno de los pocillos. Para evitar la deshidratación de las celdillas, cada placa se selló con papel parafilm garantizando un buen cierre.

Incubación: Las bandejas de microdilución se incubaron a 36 °C por 16 a 24 horas sin apilar más de cuatro cajas para mantener la misma temperatura de incubación en todos los cultivos.

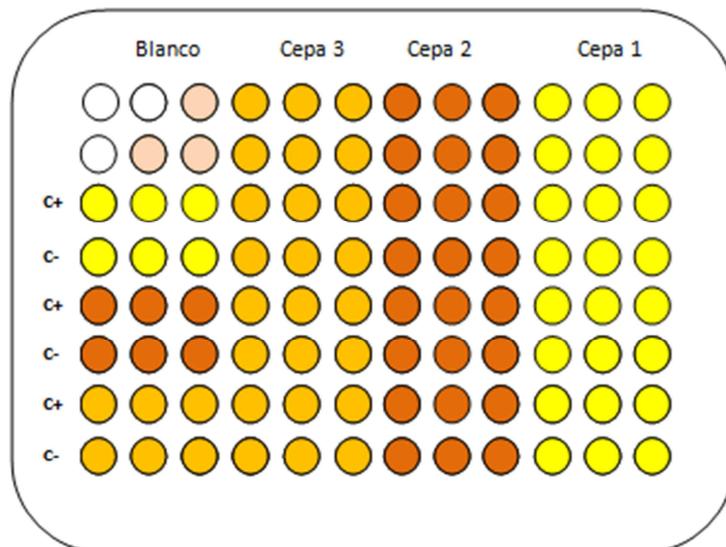
Determinación de los puntos finales de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM): La CIM es la concentración más baja de veneno que inhibe el 50% o la mitad del crecimiento de los microorganismos (*in vitro*) en los pocillos de microdilución. La

CIM se determinó por medio de una estadística descriptiva donde se tomaron los promedios de los controles negativos de la lectura a 620 nanómetros (nm) realizada por el lector ELISA Thermo Electron Corporation Multiskan EX.

#### 5.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento se realizó con diseño de bloques, en el cual las repeticiones del experimento fue cada bloque (cada especie microbiana en la placa de ELISA); donde se evaluaron todas las concentraciones de veneno por triplicado.

A continuación se ilustra (Fig. 9) el diseño experimental de cada una de las pruebas antimicrobianas realizadas, donde el tamaño de la muestra equivale al número total de pozos sembrados en cada placa de ELISA, incluyendo las respectivas repeticiones, que fueron en total 3 para cada cepa de bacterias y hongos. La unidad experimental es cada pozo. Como variable dependiente se consideró la lectura de crecimiento arrojada por el lector de ELISA en Densidades Ópticas (DO) y como variable independiente las diferentes concentraciones de veneno de *B. asper* en miligramos/mililitro (mg/mL).



**Figura 9.** Distribución de cada cepa y los controles en la placa de ELISA con sus respectivas repeticiones.

## 5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de crecimiento microbiano (bacterias y hongos) no se acomodaron a la distribución normal (*Shapiro-Wilk*;  $p=0,303$  y  $p=0,082$  respectivamente) ni a la homogeneidad de varianzas (*Levene*;  $p=0,000$ ). Por lo tanto el análisis se realizó mediante prueba no paramétrica *Kruskal Wallis* complementada con prueba *U* de *Mann Whitney* para comparación por parejas. El análisis estadístico se desarrolló con el Software Statistical Package to Social Scientific (spss) versión 11.5, con un nivel máximo de significancia de  $p<0,05$ .

Además, se identificó el tipo de asociación entre las concentraciones del veneno codificadas en orden ascendente así: 1: 0 mg/mL o control negativo; 2: 0,0078125 mg/mL; 3: 0,015625 mg/mL; 4: 0,03125 mg/mL; 5: 0,0625 mg/mL; 6: 0,125 mg/mL; 7: 0,25 mg/mL; 8: 0,5 mg/mL; 9: 1,0 mg/mL; 10: Antibiótico o control positivo a una concentración de 1 mg/mL; y el crecimiento de cada una de las cepas de estudio.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

#### 6.1.1 Cepa *Escherichia coli*

Se estableció el valor de la concentración mínima inhibitoria (CIM) para la especie *E. coli*, teniendo en cuenta que la CIM es la mínima concentración de veneno de *B. asper* que inhibe el 50% o más de las bacterias a evaluar; para esta especie en particular se determinó la CIM en 0,5 mg/mL, debido a que esta presentó un promedio de crecimiento (0.14 DO) menor a la mitad del promedio de crecimiento del control negativo (ver Tabla 1).

**Tabla 1. Promedio de crecimiento de *E. coli* con sus respectivas medidas de variabilidad, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de *B. asper* y los controles.**

Concentración de veneno (mg/mL)	Promedio de Crecimiento <i>E. coli</i> (DO) ± Error Estándar (n*)	Desviación Estándar
0,000 (Control negativo)	0,76 ± 0,04 (9) Y	0,13
0,0078125	0,73 ± 0,03 (9) Y	0,1
0,015625	0,68 ± 0,02 (9) Y	0,06
0,03125	0,73 ± 0,03 (9) Y	0,11
0,0625	0,67 ± 0,00 (9) XY	0,01
0,125	0,66 ± 0,01 (9) XY	0,04
0,25	0,52 ± 0,08 (9) XY	0,24
0,5	0,14 ± 0,05 (9) X**	0,16
1	0,06 ± 0,00 (9) XY**	0
1 Antibiótico (Control positivo)	0,07 ± 0,00 (9) X	0
p= 0,000***		

\*. Tamaño de muestra (repeticiones).

X. Concentración (es) que difieren significativamente respecto al control negativo.

Y. Concentración (es) que difieren significativamente respecto al control positivo.

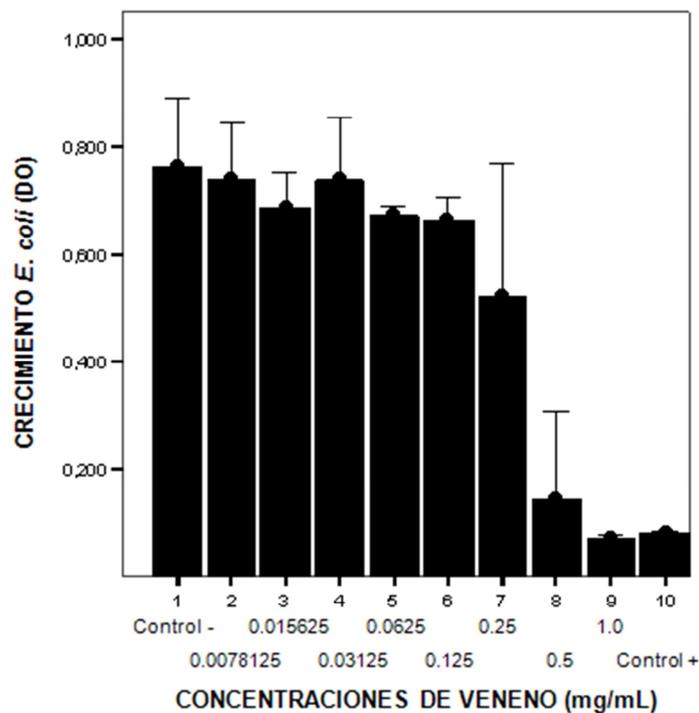
\*\* . Concentración (es) que más difieren respecto al control negativo.

\*\*\*. Nivel de significancia para comparar las concentraciones de veneno, calculado mediante la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis* complementada con prueba de comparaciones múltiples *U* de *Mann Whitney*.

Mediante comparaciones múltiples se determinó que las concentraciones de veneno que difieren significativamente respecto al control negativo fueron las de 0,0625 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL y 1,0 mg/mL; de estas las que más difieren estadísticamente del control negativo, con una significancia de  $p=0,000$ , son las concentraciones de 0,5 mg/mL y 1,0 mg/mL de veneno (ver Tabla 1).

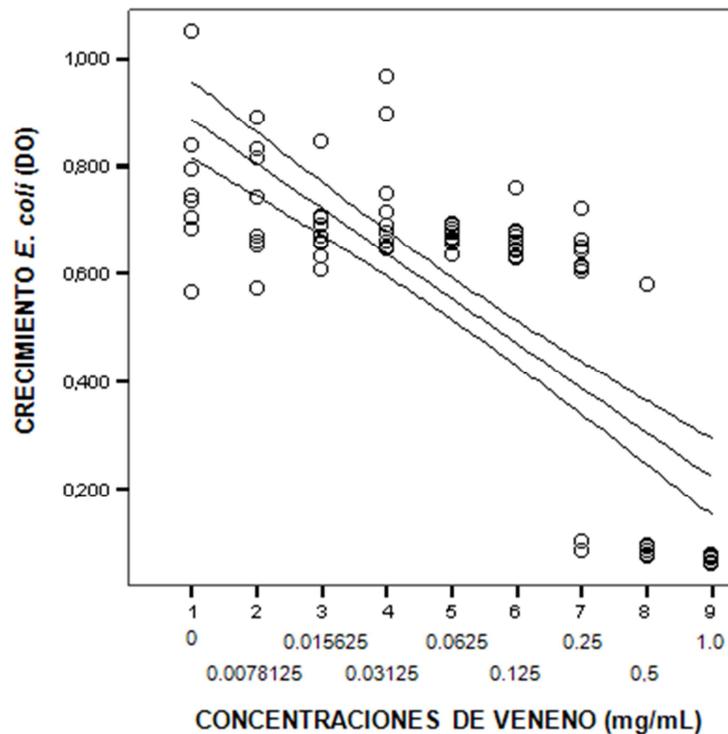
La concentración que presentó un mayor promedio de crecimiento (0.76 DO) de *E. coli* fue la de 0 mg/mL (control negativo) y la que presentó un menor promedio de crecimiento (0.06 DO) fue la concentración de 1 mg/mL de veneno. El antibiótico utilizado como control positivo, que para este caso fue Trimethoprim-Sulfamethoxazole a una concentración de 1 mg/mL, presentó un promedio de crecimiento (0,07 DO) similar al de la concentración más alta de veneno. Por lo tanto se infiere que la concentración de veneno que mejor inhibe el crecimiento de *E. coli* es la de 1 mg/mL (Fig. 10).

**Figura 10. Promedio de crecimiento de *E. coli* con su respectivo error estándar, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de *B. asper* y los controles.**



Con base en el análisis de correlación y regresión lineal simple, se identificó asociación lineal negativa o relación inversamente proporcional entre el crecimiento de *E. coli* y la concentración de veneno ( $R = -0,754$ ,  $P = 0,000$ ) habiendo una disminución del crecimiento de bacterias a medida que se incrementa la concentración de veneno. El coeficiente de determinación ( $R^2 = 0,60$ ) indica que la variabilidad del crecimiento de bacterias depende en un 60% de la concentración de veneno. La curva de asociación lineal que confirma tal correlación dosis-efecto se muestra en la Figura 11.

**Figura 11. Correlación entre el crecimiento de *E. coli* y las concentraciones de veneno de *B. asper*.**



### 6.1.2 Cepa *Pseudomonas aeruginosa*

El valor de la CIM para crecimiento de *P. aeruginosa* se estableció en 0,125 mg/mL de veneno debido a que esta concentración presentó un promedio de crecimiento (0.46 DO) menor al de la mitad del promedio de crecimiento del control negativo (ver Tabla 2).

**Tabla 2. Promedio de crecimiento de *P. aeruginosa* con sus respectivas medidas de variabilidad, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de *B. asper* y los controles.**

Concentración de Veneno (mg/mL)	Promedio de crecimiento <i>P. aeruginosa</i> (DO) ± Error Estándar (n*)	Desviación Estándar
0,000 (Control negativo)	1,13 ± 0,05 (9) Y	0,15
0,0078125	0,87 ± 0,04 (9) XY	0,13
0,015625	0,77 ± 0,01 (9) XY**	0,03
0,03125	0,87 ± 0,06 (9) XY	0,19
0,0625	0,70 ± 0,03 (9) XY**	0,09
0,125	0,46 ± 0,08 (9) XY**	0,26
0,25	0,26 ± 0,08 (9) XY**	0,25
0,5	0,08 ± 0,00 (9) XY**	0
1	0,06 ± 0,00 (9) X**	0
1 Antibiótico (Control positivo)	0,07 ± 0,00 (9) X	0
p= 0,000***		

\*. Tamaño de muestra (repeticiones).

X. Concentración (es) que difieren significativamente respecto al control negativo.

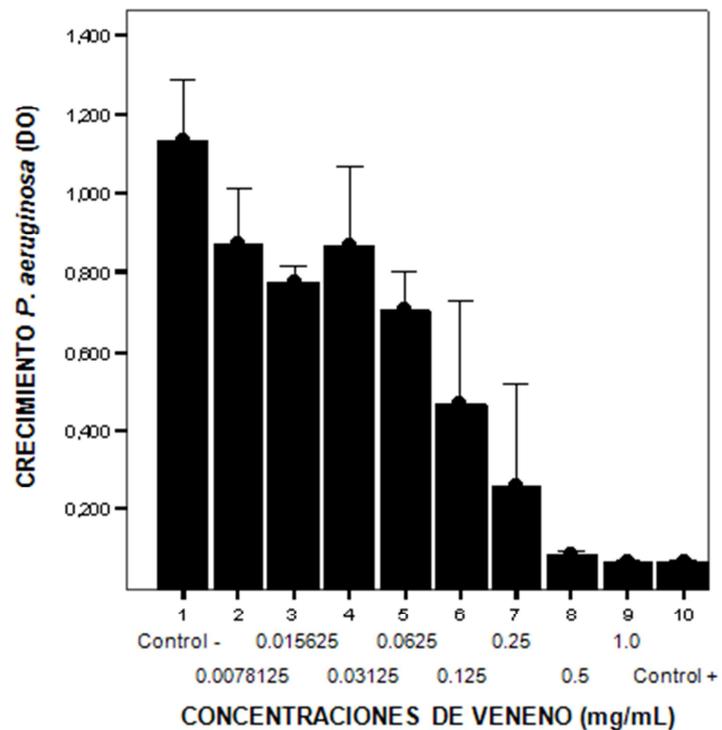
Y. Concentración (es) que difieren significativamente respecto al control positivo.

\*\* . Concentración (es) que más difieren respecto al control negativo.

\*\*\*. Nivel de significancia para comparar las concentraciones de veneno, calculado mediante la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis* complementada con prueba de comparaciones múltiples *U* de *Mann Whitney*.

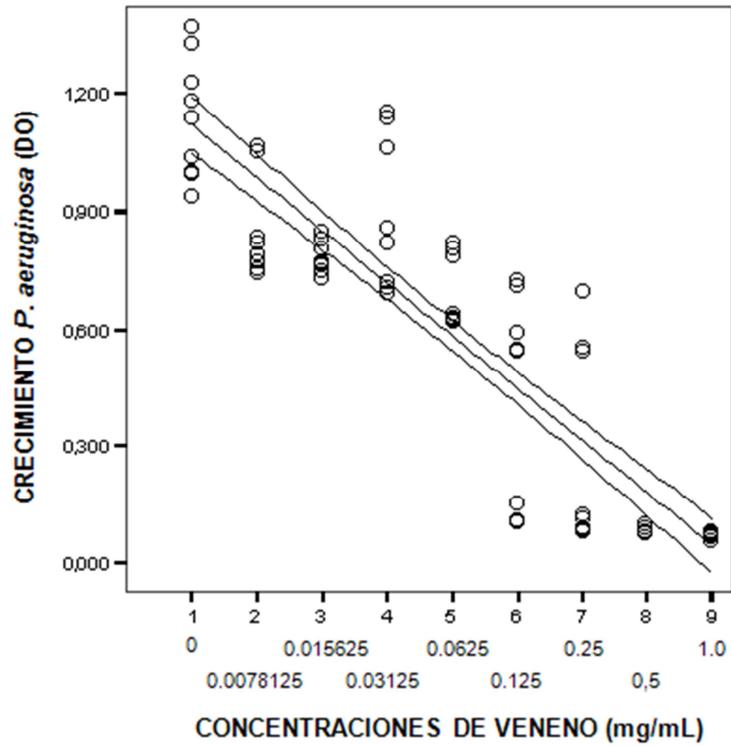
Se encontró que todas las concentraciones de veneno evaluadas difieren significativamente respecto del control negativo, siendo la concentración de veneno de 1 mg/mL la que presenta más diferencia (p=0,000), evidenciado en promedio de crecimiento de 0,06 DO menor al reportado por el control negativo (1,13 DO); de igual manera esta concentración no difiere significativamente del (p=0,376) control positivo (Cloramfenicol). Por lo tanto se puede inferir que esta concentración de veneno presentó mejor efecto antibacteriano para *P. aeruginosa*, y que el efecto inhibitorio inducido por esta concentración es similar al inducido por el antibiótico (Fig. 12).

Figura 12. Promedio de crecimiento de *P. aeruginosa* con su respectivo error estándar, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de *B. asper* y los controles.



Con base en el análisis de correlación y regresión lineal simple, se identificó asociación lineal negativa o relación inversamente proporcional entre el crecimiento de *P. aeruginosa* y la concentración de veneno ( $R = -0,912$ ,  $P = 0,000$ ) presentándose una disminución del crecimiento de bacterias a medida que se incrementa la concentración de veneno. El coeficiente de determinación ( $R^2 = 0,80$ ) indica que la variabilidad del crecimiento de bacterias depende en un 80% de la concentración de veneno. La curva de asociación lineal que confirma tal asociación se muestra en la Figura 13.

Figura 13. Correlación entre el crecimiento de *P. aeruginosa* y las concentraciones de veneno de *B. asper*.



### 6.1.3 Cepa *Staphylococcus aureus*

Se determinó la CIM de veneno de *B. asper* para el crecimiento de *S. aureus* en 1 mg/mL, ya que esta concentración mostró un promedio de crecimiento de 0.25 DO, menor a la mitad del promedio de crecimiento del control negativo (ver Tabla 3).

**Tabla 3. Promedio de crecimiento de *S. aureus* con sus respectivas medidas de variabilidad, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de *B. asper* y los controles.**

Concentración de Veneno (mg/mL)	Promedio de crecimiento <i>S. aureus</i> (DO) ± Error Estándar (n*)	Desviación Estándar
0,000 (Control negativo)	0,59 ± 0,02 (9) Y	0,06
0,0078125	0,47 ± 0,03(9) XY	0,09
0,015625	0,48 ± 0,03 (9) XY	0,11
0,03125	0,46 ± 0,03 (9) XY	0,1
0,0625	0,52 ± 0,04 (9) Y	0,12
0,125	0,47 ± 0,03 (9) XY	0,1
0,25	0,39 ± 0,03 (9) XY	0,1
0,5	0,38 ± 0,02 (9) XY	0,08
1	0,25 ± 0,02 (9) X**	0,06
1 Antibiótico (Control positivo)	0,21 ± 0,01 (9) X	0,04
p= 0,000***		

\*. Tamaño de muestra (repeticiones).

X. Concentración (es) que difieren significativamente respecto al control negativo.

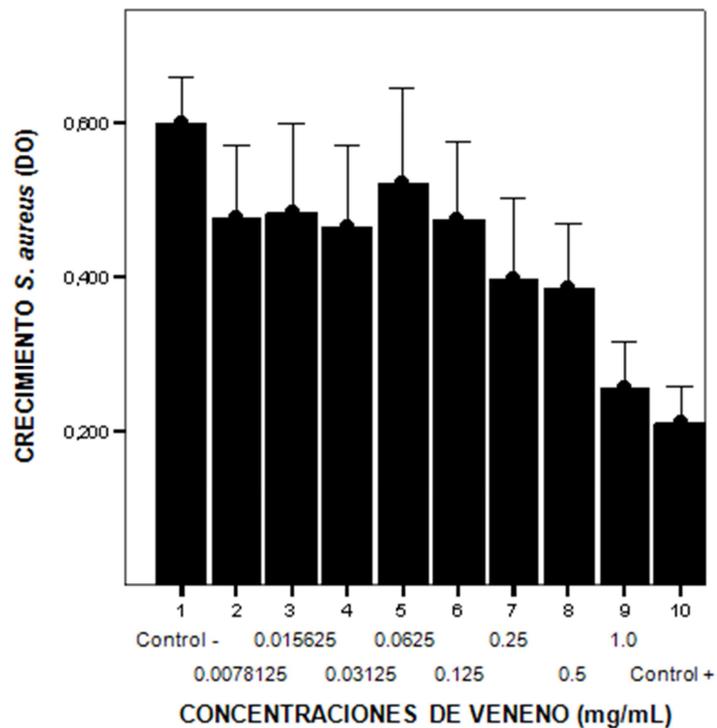
Y. Concentración (es) que difieren significativamente respecto al control positivo.

\*\*. Concentración (es) que más difieren respecto al control negativo.

\*\*\*. Nivel de significancia para comparar las concentraciones de veneno, calculado mediante la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis* complementada con prueba de comparaciones múltiples *U de Mann Whitney*.

Se determinó una diferencia significativa ( $p=0,000$ ) entre las concentraciones de veneno estudiadas. Se evidenció que hay mayor promedio de crecimiento (0,59 DO) de *S. aureus* en el control negativo y menor crecimiento en la concentración de 1 mg/mL (0,25 DO) similar al promedio de crecimiento reportado por control positivo (Trimethoprim-Sulfamethoxazole) (0,21 DO). Estableciendo así que la concentración que más difiere significativamente ( $p=0,000$ ) del control negativo fue la de 1 mg/mL y que el control positivo presenta diferencia significativa con todas las concentraciones evaluadas exceptuando la concentración de 1 mg/mL de veneno ( $p=0,170$ ) confirmando el mejor porcentaje de inhibición a esta concentración de veneno (Fig. 14).

Figura 14. Promedio de crecimiento de *S. aureus* con su respectivo error estándar, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de *B. asper* y los controles.



Con base en el análisis de correlación y regresión lineal simple, se identificó asociación lineal negativa o relación inversamente proporcional entre el crecimiento de *S. aureus* y la concentración de veneno ( $R = -0,608$ ,  $P = 0,000$ ) habiendo una disminución del crecimiento de bacterias a medida que se incrementa la concentración de veneno. El coeficiente de determinación ( $R^2 = 0,36$ ) indica que la variabilidad del crecimiento de bacterias depende en un 36% de la concentración de veneno. La curva de asociación lineal que confirma tal asociación se muestra en la Figura 15.



**Tabla 4. Promedio de crecimiento de *C. albicans* con sus respectivas medidas de variabilidad, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de *B. asper* y los controles.**

Concentración de veneno (mg/mL)	Promedio de Crecimiento <i>C. albicans</i> (DO) ± Error Estándar (n*)	Desviación Estándar
0,000 (control negativo)	0,74 ± 0,12 (9) Y	0,36
0,0078125	0,50 ± 0,12 (9) Y	0,37
0,015625	0,48 ± 0,10 (9) Y	0,31
0,03125	0,47 ± 0,11 (9) Y	0,35
0,0625	0,28 ± 0,05 (9) XY	0,17
0,125	0,28 ± 0,06 (9) XY	0,2
0,25	0,18 ± 0,02 (9) XY**	0,08
0,5	0,25 ± 0,01 (9) XY	0,04
1	0,24 ± 0,00 (9) XY	0,01
1 Antibiótico (control positivo)	0,07 ± 0,00 (9) X	0
p= 0,000***		

\*. Tamaño de muestra (repeticiones).

X. Concentración (es) que difieren significativamente respecto al control negativo.

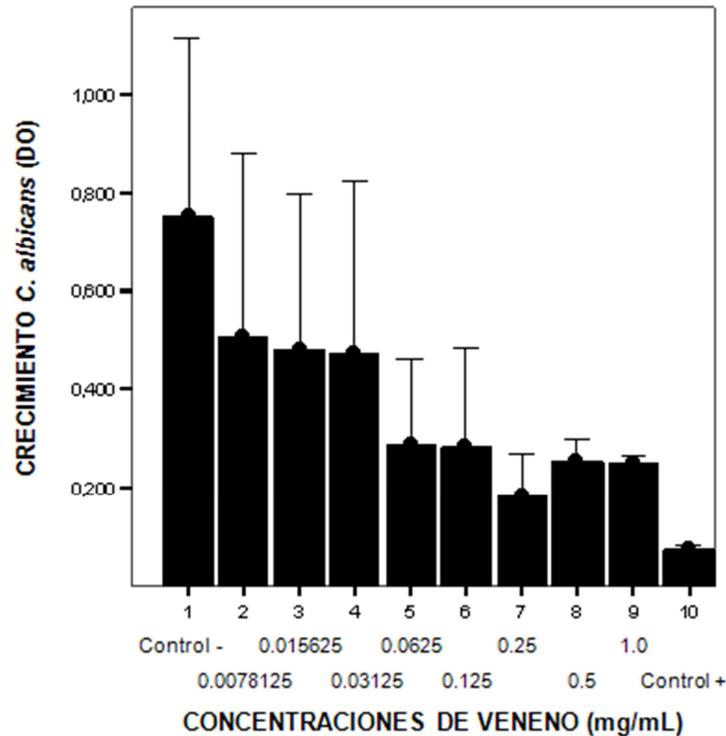
Y. Concentración (es) que difieren significativamente respecto al control positivo.

\*\* . Concentración (es) que más difieren respecto al control negativo.

\*\*\*. Nivel de significancia para comparar las concentraciones de veneno, calculado mediante la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis* complementada con prueba de comparaciones múltiples *U de Mann Whitney*.

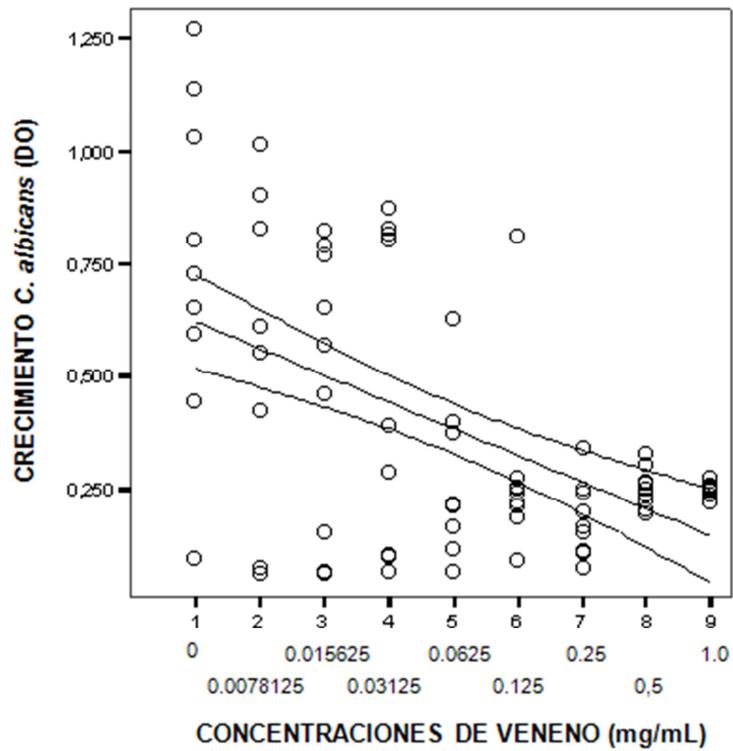
Por medio de comparaciones múltiples se comprobó que las concentraciones que difieren significativamente del control negativo fueron las de 0,0625 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL; la que más difiere estadísticamente del control negativo, con una significancia de p=0,000, es la concentración de 0,25 mg/mL, reportando el menor promedio de crecimiento (0,18 DO) de todas las concentraciones evaluadas e indicando que esta concentración tiene mayor inhibición para *C. albicans*; aunque presentó una diferencia significativa estadísticamente con el antibiótico (Amfotericina) utilizado (Figura 16).

Figura 16. Promedio de crecimiento de *C. albicans* con su respectivo error estándar, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de *B. asper* y los controles.



Con base en el análisis de correlación y regresión lineal simple, se identificó asociación lineal negativa o relación inversamente proporcional entre el crecimiento de *C. albicans* y la concentración de veneno ( $R = -0,352$ ,  $P = 0,001$ ) presentándose una disminución del crecimiento de hongos a medida que se incrementa la concentración de veneno. El coeficiente de determinación ( $R^2 = 0,27$ ) indica que la variabilidad del crecimiento de hongos depende en un 27% de la concentración de veneno. La curva de asociación lineal que confirma tal correlación dosis-efecto se muestra en la Figura 17.

Figura 17. Correlación entre el crecimiento de *C. albicans* y las concentraciones de veneno de *B. asper*.



### 6.2.2 Cepa *Candida krusei*

El valor de la CIM para crecimiento de *C. krusei* se estableció en 0,125 mg/mL de veneno debido a que esta concentración presentó un promedio de crecimiento (0.19 DO) menor a la mitad del promedio de crecimiento del control negativo (ver Tabla 5).

**Tabla 5. Promedio de crecimiento de *C. krusei* con sus respectivas medidas de variabilidad, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de *B. asper* y los controles.**

Concentración de veneno (mg/mL)	Promedio de Crecimiento <i>C. krusei</i> (DO) ± Error Estándar (n*)	Desviación Estándar
0,000 (Control negativo)	0,55 ± 0,11 (9) Y	0,35
0,0078125	0,67 ± 0,04 (9) Y	0,13
0,015625	0,58 ± 0,12 (9) Y	0,36
0,03125	0,41 ± 0,11 (9) Y	0,34
0,0625	0,35 ± 0,09 (9) Y	0,29
0,125	0,19 ± 0,04 (9) Y	0,12
0,25	0,16 ± 0,01 (9) Y	0,03
0,5	0,20 ± 0,02 (9) Y	0,07
1	0,21 ± 0,00 (9) Y	0,01
1 Antibiótico (Control positivo)	0,07 ± 0,00 (9) X	0
p= 0,000***		

\*. Tamaño de muestra (repeticiones).

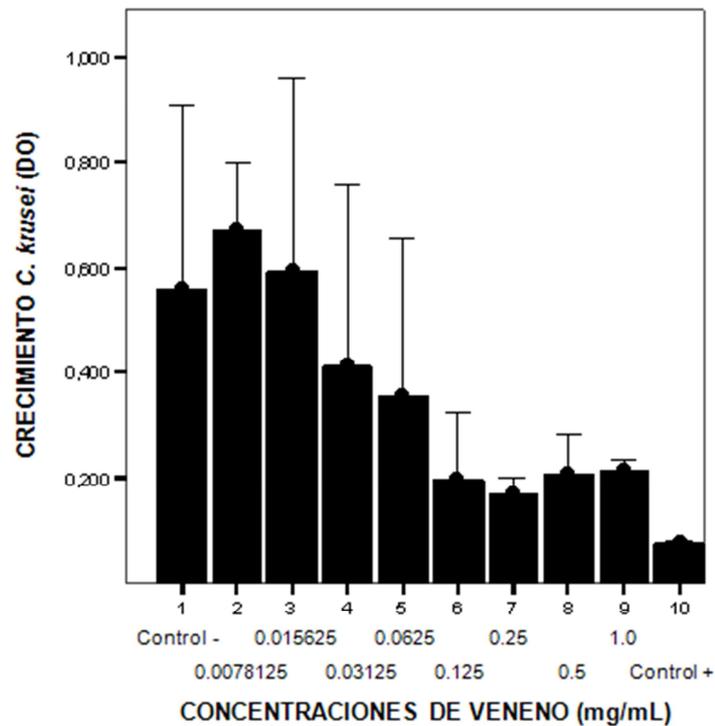
X. Concentración (es) que difieren significativamente respecto al control negativo.

Y. Concentración (es) que difieren significativamente respecto al control positivo.

\*\*\*. Nivel de significancia para comparar las concentraciones de veneno, calculado mediante la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis* complementada con prueba de comparaciones múltiples *U* de *Mann Whitney*.

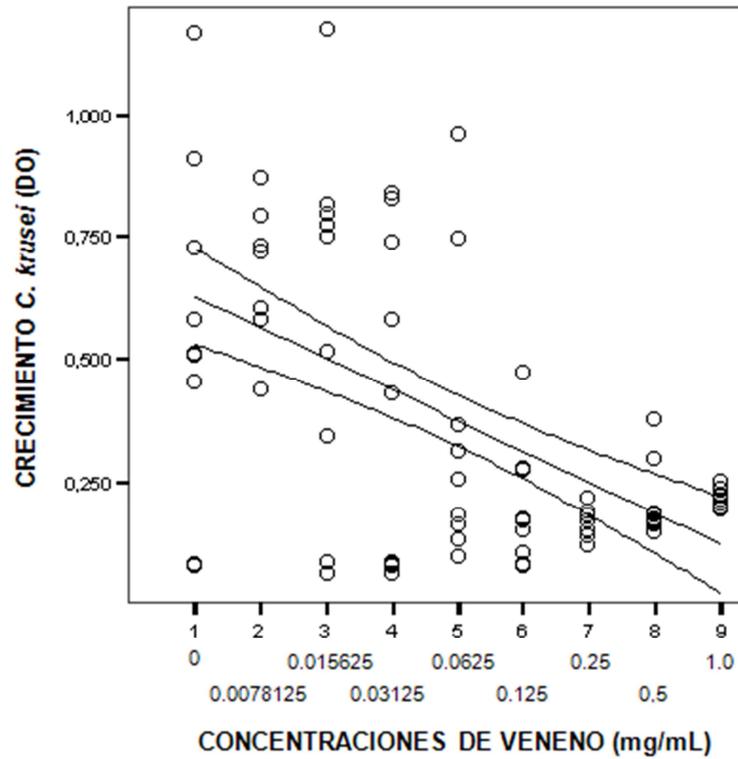
La concentración que presentó un mayor promedio de crecimiento (0,67 DO) de *C. krusei* fue la de 0,0078125 mg/mL superior al promedio (0,55 DO) del control negativo y la que mostró un menor promedio (0,16 DO) fue la de 0,25 mg/mL, por lo que se deduce que fue la concentración que mostró el mejor efecto antifúngico para *C. krusei*; sin embargo, ésta difiere estadísticamente del control positivo (Amfotericina) (Fig. 18).

Figura 18. Promedio de crecimiento de *C. krusei* con su respectivo error estándar, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de *B. asper* y los controles.



Con base en el análisis de correlación y regresión lineal simple, se identificó asociación lineal negativa o relación inversamente proporcional entre el crecimiento de *C. krusei* y la concentración de veneno ( $R = -0,421$ ,  $P = 0,000$ ) habiendo una disminución del crecimiento de hongos a medida que se incrementa la concentración de veneno. El coeficiente de determinación ( $R^2 = 0,32$ ) indica que la variabilidad del crecimiento de hongos depende en un 32% de la concentración de veneno. La curva de asociación lineal que confirma tal correlación dosis-efecto se muestra en la Figura 19.

Figura 19. Correlación entre el crecimiento de *C. krusei* y las concentraciones de veneno de *B. asper*.



### 6.2.3 Cepa *Cryptococcus neoformans*

La CIM para la especie *C. neoformans* se determinó en 0,125 mg/mL, pues para esta concentración se obtuvo un promedio de crecimiento equivalente al 50% del promedio del control negativo (ver Tabla 6).

**Tabla 6. Promedio de crecimiento de *C. neoformans* con sus respectivas medidas de variabilidad, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de *B. asper* y los controles.**

Concentración de veneno (mg/mL)	Promedio de Crecimiento <i>C. neoformans</i> (DO) ± Error Estándar (n*)	Desviación Estándar
0,000 (Control negativo)	0,42 ± 0,09 (9) Y	0,27
0,0078125	0,43 ± 0,08 (9) Y	0,25
0,015625	0,48 ± 0,07 (9) Y	0,22
0,03125	0,32 ± 0,07 (9) Y	0,23
0,0625	0,27 ± 0,06 (9) Y	0,18
0,125	0,21 ± 0,02 (9) Y	0,08
0,25	0,28 ± 0,07 (9) Y	0,22
0,5	0,37 ± 0,02 (9) Y	0,07
1	0,32 ± 0,01 (9) Y	0,03
1 Antibiótico (Control positivo)	0,07 ± 0,00 (9) X	0
p= 0,001***		

\*. Tamaño de muestra (repeticiones).

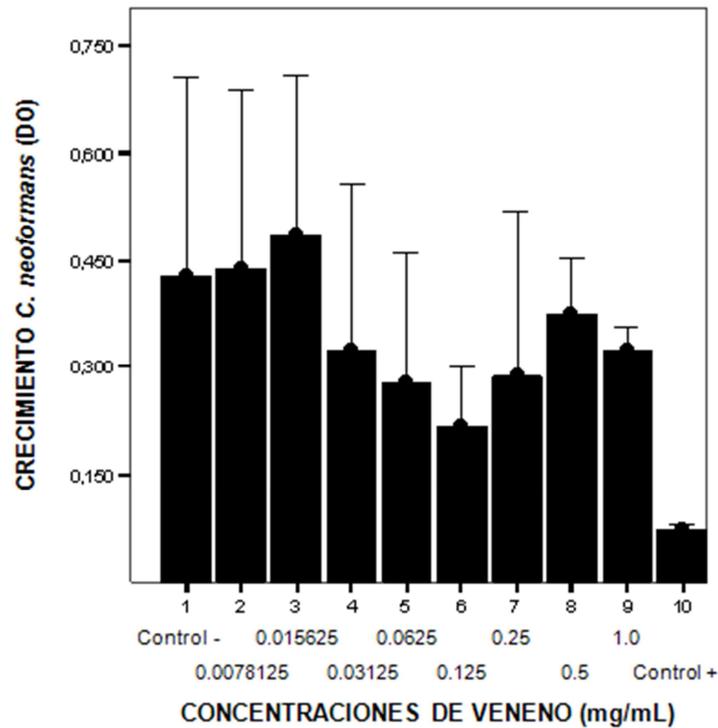
X. Concentración (es) que difieren significativamente respecto al control negativo.

Y. Concentración (es) que difieren significativamente respecto al control positivo.

\*\*\*. Nivel de significancia para comparar las concentraciones de veneno, calculado mediante la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis* complementada con prueba de comparaciones múltiples *U* de *Mann Whitney*.

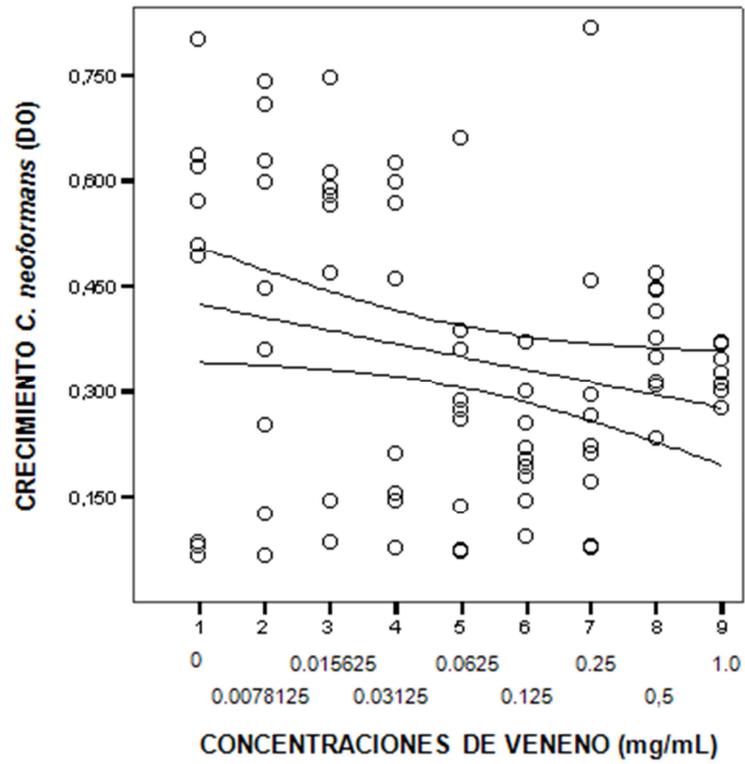
Se determinó una diferencia significativa ( $p=0,001$ ) entre las concentraciones de veneno estudiadas. Sin embargo, ninguna de las concentraciones presentó una diferencia estadísticamente significativa con el control negativo, por lo que todas las concentraciones difieren estadísticamente del antibiótico (Amfotericina). Además se encontró que la concentración de 0,015625 mg/mL obtuvo un mayor promedio de crecimiento de *C. neoformans* que el control negativo y la de concentración de 0,125 el menor promedio de crecimiento entre todas las evaluadas (Fig. 20).

Figura 20. Promedio de crecimiento de *C. neoformans* con su respectivo error estándar, obtenidos para cada una de las concentraciones de veneno de *B. asper* y los controles.



Con base en el análisis de correlación y regresión lineal simple, no se observó asociación lineal negativa o positiva entre el crecimiento de *C. neoformans* y la concentración de veneno ( $R = -0,170$ ,  $P = 0,128$ ), mostrando que un aumento o disminución en la concentración de veneno no afecta significativamente el crecimiento de *C. neoformans*. El coeficiente de determinación ( $R^2 = 0,06$ ) indica que la variabilidad del crecimiento de hongos depende en un 6% de la concentración de veneno. La curva de asociación lineal que confirma tal correlación dosis-efecto se muestra en la Figura 21.

Figura 21. Correlación entre el crecimiento de *C. neoformans* y las concentraciones de veneno de *B. asper*.



## 7. DISCUSIÓN

En este estudio el veneno crudo de *B. asper* mostró un efecto antibacteriano sobre cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*; y un efecto antifúngico frente a cepas de levaduras como *C. albicans*, *C. krusei* y *C. neoformans*. Estableciendo una CIM para las cepas bacterianas en 0,5, 0,125 y 1,0 mg/mL respectivamente (Tablas 1, 2, 3); y una CIM para las levaduras en 0,0625 y 0,125 mg/mL respectivamente (Tablas 4, 5, 6). La actividad antibacteriana fue más efectiva contra las bacterias Gram negativas que con la Gram positiva, siendo la cepa más sensible *P. aeruginosa*. La actividad antifúngica fue más efectiva contra *C. albicans*.

La inhibición del crecimiento de *E. coli* por diferentes concentraciones de veneno de *B. asper*, mostró que a partir de la concentración de 0,5 mg/mL hay una marcada disminución en el crecimiento de esta bacteria (Fig. 10), llegando alcanzar la inhibición del Trimethoprim-Sulfamethoxazole, y por tanto la mejor, con la concentración de 1 mg/mL. La mínima concentración de veneno que realmente inhibe el 50% del crecimiento de *E. coli* estaría entre la de 0,25 - 0,5 mg/mL. Además se identificó por el coeficiente de correlación de Spearman, una marcada asociación lineal negativa ( $R = -0,754$ ,  $P = 0,000$ ), confirmando la actividad antibacteriana, donde ésta depende en un 60% de la concentración del veneno con una disminución significativa en el crecimiento de esta cepa (Fig. 11). Otros autores, por diferentes métodos, han reportado para esta misma bacteria concentraciones inhibitorias mayores como de 1,25 mg/mL con el veneno crudo de serpientes del género *Bothrops* (Bustillo *et al.*, 2005); también se ha reportado que venenos totales de serpientes como *L. muta* y *C. rhodostoma* no tienen un efecto antibacteriano significativo contra *E. coli* (Ferreira *et al.*, 2008), al igual que los venenos de *D. r. russelli*, *E. carinatus*, *B. gabonica rhinoceros* y *B. arietans* (Perumal *et al.*, 2007); lo que indica una mayor efectividad con el veneno de *B. asper*. También, en algunos estudios realizados aislando las L-aminoácido oxidasas (LAO) de venenos de otras serpientes se ha encontrado efecto contra el crecimiento de esta bacteria, como con LAO de *B. atrox* a 12  $\mu$ g (Lazo *et al.*, 2007) y LAO de *B. pirajai* a 4 mg/mL (Izidoro *et al.*, 2006); sin embargo, no fue susceptible a AgkTx-II, Fosfolisa A<sub>2</sub> aislada del veneno de *A. halys* (Perumal *et al.*, 2008), a NAP péptido obtenido del veneno de *N. naja* (Sachidananda *et al.*, 2007), ni a concentraciones de 5.6 mg/mL de Onwaprin, péptido obtenido de *P. microlepidotus* (Nair *et al.*, 2007).

La efectividad en la inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa* aumentó en las concentraciones más altas de veneno (0,125 a 1 mg/mL); sin embargo, solo la de 1 mg/mL no presentó diferencia significativa con el Cloramfenicol, estableciendo mayor actividad a esta concentración (Fig. 12). Conjuntamente, se pudo establecer que el crecimiento de *P. aeruginosa* depende en un 80% de la concentración de veneno, mostrando una fuerte correlación negativa ( $R = -0,912$ ,  $P = 0,000$ ) y por tanto la mayor susceptibilidad al veneno de todas las bacterias evaluadas (Fig. 13). En otros estudios se evidenció que los venenos totales de *B. atrox*, *B. jararaca*, *L. muta* y *C. rhodostoma* no inhiben significativamente el crecimiento de *P. aeruginosa* (Ferreira *et al.*, 2008), similares resultados se obtuvieron con los venenos de *D. r. russelli*, *E. carinatus*, *B. g. rhinoceros* y *B. arietans* (Perumal *et al.*, 2007); esta diferencia tal vez se deba, en el caso de las serpientes del género *Bothrops*, no solo a que son especies diferentes, sino también a los métodos utilizados y a los patrones de significancia establecidos. Así mismo, se obtuvo que con 4 mg/mL de LAO de *B. pirajai* afecta el crecimiento de esta bacteria (Izidoro *et al.*, 2006), mientras que con AgkTx-II y NAP no mostró susceptibilidad (Perumal *et al.*, 2008; Sachidananda *et al.*, 2007), mostrando mayor efectividad con el veneno total de *B. asper*.

En el caso de *S. aureus*, la actividad antibacteriana se notó principalmente en la concentración de 1 mg/mL, donde se ve una drástica reducción en la lectura; presentando un efecto de inhibición similar al Trimethoprim-Sulfamethoxazole (Fig. 14). También, se identificó una moderada asociación lineal negativa ( $R = -0,608$ ,  $P = 0,000$ ), donde la variabilidad del crecimiento de esta cepa bacteriana depende en un 36% de la concentración de veneno (Fig. 15); siendo *S. aureus* la bacteria más resistente de las tres evaluadas. En la literatura se ha reportado que el veneno de *B. alternatus* a concentraciones de 2,5 mg/mL inhibe el 80% del crecimiento de esta bacteria, mientras que en nuestros resultados, con el veneno de *B. asper* a concentraciones de 1 mg/mL se inhibió más del 50% del crecimiento (Bustillo *et al.*, 2005). Igualmente, se informó que el veneno de *B. jararaca* tiene un significativo efecto contra *S. aureus* revelando una concentración mínima inhibitoria del crecimiento visible a 13 µg/mL; posteriormente, los venenos de cuatro viperidos (*D. r. russelli*, *E. carinatus*, *B. g. rhinoceros* y *B. arietans*) y dos elápidos (*P. australis*, *N. n. naja*) actúan especialmente contra *S. aureus* (Perumal *et al.*, 2007). Mientras que los venenos de *B. atrox*, *L. muta* y *C. rhodostoma* no mostraron una inhibición significativa (Ferreira *et al.*, 2008). También, en algunos estudios se ha reportado una inhibición significativa con 3.1 µg de LAO de *L. muta* (Cisneros *et al.*, 2006), con 3 µg de LAO de *B. atrox* (Lazo *et al.*, 2007), con 100 µg/disc con AgkTx-II (Perumal *et al.*, 2008) y con dosis mayores de 300µg/ml de

NAP (Sachidananda *et al.*, 2007); sin embargo fue resistente a 5.6 mg/mL de Onwaprin (Nair *et al.*, 2007).

En la inhibición del crecimiento de *C. albicans*, se pudo observar que a partir de la concentración de 0,0625 mg/mL hay una significativa disminución del crecimiento. Sin embargo, se presentó un menor promedio de crecimiento, por tanto mayor diferencia significativa con el control negativo, en la concentración de 0,25 mg/mL; sin conseguir una inhibición similar a la Amfotericina (Tabla 4; Fig. 16); tal vez esto se deba a que a esta concentración es más efectiva la cantidad de veneno para inhibir el crecimiento que a concentraciones mayores o menores. Además, se notó una baja asociación lineal negativa ( $R = -0,352$ ,  $P = 0,001$ ), donde la inhibición del crecimiento depende en un 27% de la concentración de veneno (Fig. 17). En otros estudios se informó que con una variante de péptido sintético derivada de la miotoxina II, un homólogo de la Fosfolipasa A<sub>2</sub>, presente en el veneno de la serpiente *B. asper* del sur de México, nombrado *pEM-2*; se inhibía completamente el crecimiento de *C. albicans* a concentraciones de 10 mg/L (Murillo y Lan, 2007); así mismo, con una fracción (Pep5Bj) aislada del veneno de *B. jararaca* en una concentración de 8 µg/mL se inhibió el crecimiento de esta levadura (Gomes *et al.*, 2005).

La efectividad en la inhibición del crecimiento de *C. krusei* aumentó en las concentraciones más altas de veneno (0,125 a 1 mg/mL), siendo la de 0,25 mg/mL la más efectiva (0,16 DO), presentando diferencia significativa con la Amfotericina (Tabla 5; Fig. 18); por lo que se recomienda más estudios en donde se tengan en cuenta concentraciones más cercanas entre 0,125 y 0,25 mg/mL. Igualmente, se identificó una baja asociación lineal negativa ( $R = -0,421$ ,  $P = 0,000$ ), donde el crecimiento de esta depende en un 32% de la concentración de veneno (Fig. 19). En un estudio se reportó que concentraciones más altas de 10 mg/L de una variante de péptido sintético (*pEM-2*) derivada del veneno de *B. asper* del sur de México, inhibieron totalmente el crecimiento de *C. krusei* y otras especies de *Candida* (Murillo y Lan, 2007).

La actividad antifúngica del veneno contra *C. neoformans* reveló que existe una diferencia significativa entre las concentraciones evaluadas (Tabla 6); sin embargo, aunque fue posible establecer una CIM de 0,125 mg/mL para esta cepa, ninguna de las concentraciones obtuvo diferencia significativa respecto al control

negativo y tampoco se determinó correlación significativa entre la variabilidad del crecimiento y las diferentes concentraciones del veneno evaluadas ( $R = -0,170$ ,  $P = 0,128$ ) (Fig. 21). Por esto la CIM reportada para *C. neoformans* está basada en el promedio de crecimiento el cual fue de 50% del control negativo, siendo evidente un leve descenso del crecimiento cuando se inoculó el veneno, por lo que hay que realizar nuevas y mejores evaluaciones en este caso, pues se debe tener en cuenta que pueden haber varias moléculas en el veneno que actúen con los mismos receptores, los cuales pueden ser bloqueados, en este caso por péptidos que no poseen suficiente actividad contra este hongo, lo que impide un marcado efecto antifúngico; además no se encontraron informes de la inhibición para esta especie con venenos de serpiente.

En la literatura se ha reportado que algunas moléculas purificadas de los venenos de varias serpientes poseen actividad antimicrobiana a concentraciones tan bajas como  $10 \mu\text{g/mL}$ , lo que lleva a pensar que estas moléculas tienen un mejor efecto inhibitorio contra los microorganismos cuando actúan por separado. Uno de estos casos son las L-aminoácido oxidasas (LAOs), enzima a la que se debe el color amarillo en algunos venenos; la cual se ha evaluado por medio de diferentes métodos determinando que poseen actividad antimicrobiana y antiparasitaria (Cisneros *et al.*, 2006; Izidoro *et al.*, 2006; Lazo *et al.*, 2007). Las LAOs catalizan la desaminación oxidativa de los L-aminoácidos y producen un cetoácido, amoníaco y peróxido de hidrógeno. Por lo que la acción antibacteriana de LAO es atribuida al peróxido de hidrógeno, ya que su acción fuertemente oxidante, en altas concentraciones, causa inestabilidad a nivel de membrana celular lesionándolas y causa escisiones en los ácidos nucleicos. Considerando a la glándula venenosa, una estructura modificada para producir diferentes proteínas, una de ellas podría estar encargada de la acción antimicrobiana cuando la serpiente se alimenta, sobre todo si consideramos que estos ofidios ingieren mamíferos vivos y sin una previa masticación (Cisneros *et al.*, 2006; Lazo *et al.*, 2007). Además, es llamativo que a pesar de la intensa contaminación de su cavidad oral con una amplia variedad de microorganismos patógenos, la mordedura de serpiente y posterior intoxicación es un proceso asociado con una baja incidencia de infección bacteriana indicando la presencia de moléculas con este tipo de actividad en los venenos, que podrían proteger a las serpientes durante su alimentación (Trabi *et al.*, 2001; Bustillo *et al.*, 2005; Cuesta *et al.*, 2008).

A la fecha no se conoce con precisión el mecanismo de acción de la enzima LAO, pero esta hipótesis donde se le atribuye el efecto inhibitorio al peróxido de

hidrógeno se probó cuando la LAO de *B. atrox* se preincubó con peroxidasa dando lugar a una pérdida de la inhibición y por tanto de la actividad de LAO sobre *S. aureus* y *V. cholerae*; esto podría deberse al hecho de que la peroxidasa actuaría sobre el peróxido de hidrógeno descomponiéndolo en agua y oxígeno (Lazo *et al.*, 2007). Adicionalmente es necesario resaltar que en este estudio, de las bacterias utilizadas *S. aureus* fue la más resistente lo que se debería a que produce la enzima catalasa en concentraciones suficientes para contrarrestar la actividad bactericida producida por el peróxido de hidrógeno a consecuencia de la actividad de LAO.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, también se ha reportado actividad antimicrobiana de otros péptidos aislados de los venenos de diferentes serpientes como Omwaprin, NAP y AgkTx-II; este último es una Fosfolipasa A<sub>2</sub>, enzima que actúa sobre los fosfolípidos de membrana hidrolizándolos, purificada de *A. halys*, donde su potencia antimicrobiana fue confirmada por estudios de ultraestructura, mostrando que las bacterias (*S. aureus*, *P. vulgaris* y *P. mirabilis*) tratadas con AgkTx-II tenían cambios morfológicos pronunciados con una superficie significativamente arrugada y áspera; la mayoría de células parecían haber perdido la integridad de la membrana bacteriana; también aparecieron residuos celulares y materiales fibrosos posiblemente por la fuga y lisis celular (Nair *et al.*, 2007; Sachidananda *et al.*, 2007; Perumal *et al.*, 2008). Algunos autores explican el mecanismo de acción de la mayoría de estos péptidos antimicrobianos, afirmando que al ser catiónicos ejercen su efecto antibacteriano y antifúngico interactuando con las membranas, ya sea, mediante el efecto de las cargas positivas con los lípidos aniónicos de las membranas (Las membranas bacterianas son organizadas de manera que la cara exterior de la bicapa, está compuesta por muchos fosfolípidos cargados negativamente), mediante la desestabilización a través del desplazamiento de lípidos debido al drástico cambio de la carga neta del sistema o en ciertos casos por la entrada del péptido a la célula formando poros (Zaslhoff, 2002; Sachidananda *et al.*, 2007; Perumal *et al.*, 2008).

Nuestros resultados demuestran que el veneno de *B. asper* posee una potente actividad antimicrobiana; sin embargo, esta puede ser más efectiva, y se puede inferir que este veneno podría utilizarse contra otros microorganismos con una eficiencia significativa. Por lo tanto, son necesarios otros estudios donde se fraccione el veneno de *B. asper* para evaluar sus moléculas y determinar cual posee mayor actividad antimicrobiana o si el mejor efecto inhibitorio existe por la

interacción sinérgica de las moléculas del veneno; al mismo tiempo, este tipo de investigaciones podrían incentivar planes de conservación con las serpientes ya que son muy repudiadas por las personas en general (Guerrero *et al.*, 2008).

## 8. CONCLUSIONES

El veneno total de de *B. asper* posee actividad antibacteriana frente a cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* y actividad antifúngica frente a *C. albicans*, *C. krusei* y *C. neoformans*. Además, se infiere que la acción antimicrobiana se debe a las L-aminoácido oxidasas y Fosfolipasas A<sub>2</sub> presentes en el veneno.

Se determinaron las Concentraciones mínimas inhibitorias en 0,5, 0,125 y 1,0 mg/mL para las bacterias *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* respectivamente; y en 0,0625 y 0,125 mg/mL para *C. albicans*, *C. krusei* y *C. neoformans* respectivamente.

El veneno de *B. asper* inhibe mejor el crecimiento de bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa* y *E. coli*; así como también el de *C. albicans*. Además, los microorganismos que fueron menos susceptibles son *S. aureus*, *C. krusei* y *C. neoformans*.

Dado su efecto antimicrobiano *in vitro* el uso de este producto natural podría considerarse como una alternativa viable y económica para controlar muchas infecciones producidas por los microorganismos evaluados y sobre todo en los que se encontró mayor efecto inhibitorio.

Los resultados mostraron que la actividad antimicrobiana del veneno de *B. asper* varía dependiendo del microorganismo evaluado, por lo cual para potenciar su uso terapéutico se deben realizar más estudios con diferentes microorganismos de importancia clínica.

## 9. RECOMENDACIONES

Es conveniente continuar la investigación acerca del veneno de *B. asper* y su potencial para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos para determinar que molécula tiene mejor efecto antimicrobiano, y si este se potencia cuando actúa sola o si se ve un mayor efecto con el veneno total.

Realizar más estudios del veneno evaluando concentraciones más cercanas y con otros microorganismos. De igual forma, evaluar venenos de diferentes especies y de distintas procedencias determinando su actividad antimicrobiana.

Es necesario controlar adecuadamente los tiempos de inoculación de los microorganismos, para no sobrepasar los treinta minutos en los cuales la cantidad de microorganismos no se afecta. Así como también el tiempo de incubación para realizar las lecturas en un periodo similar entre los bloques.

Sería interesante evaluar otras propiedades biológicas de los venenos de serpiente con posibles fines terapéuticos. Además de realizar experimentos para determinar su posible modo de acción contra bacterias y hongos.

Es evidente la necesidad de evaluar el veneno de *B. asper* contra microorganismos en pruebas adicionales con métodos diferentes como dilución en placa y en caldo, cilindro en placa, difusión en disco, entre otros; y comparar los resultados en cuanto a su eficacia o similitud.

## 10. LITERATURA CITADA

- ALVES ARAUJO, F.A.; SANTALÚCIA, M. & FERNÁNDEZ CABRAL, R. Epidemiología dos accidentes por animales peconhentos. 2003. p. 6-12. En: COSTA CARDOSO, J.L.; DE SIQUEIRA FRANCA, F.O.; WEN, F.H.; SANT'ANA MÁLAQUE, C.M. & HAADAD, V. Animais peconhentos no Brasil. Biología, clínica e terapéutica dos acidentes. Sarvier, FAPESP, Sao Paulo, Brasil.
- ÁNGEL, R. Serpientes de Colombia: Guía práctica para su clasificación y tratamiento del envenenamiento causado por sus mordeduras. En: Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. Vol. 36, No. 1 (1983); p. 11-130.
- ARAYA CASTILLO, C. Evaluación de la actividad citotóxica de dos péptidos catiónicos, sintetizados a partir de toxinas ofídicas de *Bothrops asper* y *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, sobre células eucarióticas normales y cancerosas. Cartago, 2004, 68 p. Trabajo de grado (Bachiller en Ingeniería en Biotecnología). Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología.
- AYERBE GONZÁLEZ, S. Ofidismo en el departamento del Cauca, Colombia: epidemiología, etiología, clínica y complicaciones. En: Revista Facultad Ciencias de la Salud universidad del Cauca. Vol. 2, N°4 (2000); p. 21-27.
- AYERBE GONZÁLEZ, S. Ofidismo en Colombia. Enfoque, diagnóstico y tratamiento. Cap. 87. Pp: 1143-1167. En: Ordóñez, C. A.; Ferrada, R. y Buitrago, R. (Eds.). Cuidado Intensivo y Trauma, 2ª. Edición. Editorial Distribuna, Bogotá D.C. ISBN 978-958-8379-14-2. 1278 pp.
- AYERBE GONZÁLEZ, S.; ARRIETA GUEVARA, F. M.; CHANTRÉ ORTÍZ, C. A.; CORAL PLAZA, E. R. y GUERRERO VARGAS, J. A. Catálogo de los reptiles presentes en las colecciones de referencia y exhibición del Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca. Popayán: Taller Editorial Universidad del Cauca, 2007, p. 3-5.
- AYERBE, S. y LATORRE, J. P. Manual para la prevención y mejoramiento en la atención del paciente con accidente ofídico. República de Colombia, gobernación del departamento del Cauca, Secretaría Departamental de Salud. ISBN: 978-958-44-5272-6. Editorial López, Popayán, 2009, 60 p.
- BARÓ TOMÁS, M. T. Epidemiología de la criptococosis en España. Caracterización de los aislados de *Cryptococcus neoformans*. Barcelona, 2002,

115p. Tesis doctoral (Doctora en Ciencias Biológicas). Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de genètica i microbiologia.

- BATLLE ALMODOVAR, M.; DICKINSON, F.; PEREZ MONRAZ, M.; TAMARGO, I. y SIMILIS, A. Meningitis bacteriana y *Pseudomonas aeruginosa*: a propósito de un caso. En: Rev Cubana Med Trop Vol. 57, N° 3 (2005).
- BOLAÑOS, R. Serpientes, venenos, y ofidismo en Centroamérica. San José: Editorial Universidad de Costa Rica, 1984, p. 136.
- BROOKS, F. G.; BUTEL, S. J. y MORSE, A. S. Microbiología médica: de Jawetz, Melnick y Adelberg. 18 ed. Mexico: Manual Moderno, 2005. p. 219-224, 257-259.
- BUSTILLO, S.; MERINO, L.; LEIVA, L.; BAL DE KIER JOFFÉ, E. y GORODNER, J. O. Actividad bactericida del veneno de *Bothrops alternatus* del Nordeste de Argentina. En: *Comunicaciones científicas y tecnológicas Argentina*. 2005. Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.
- CALLICÓ, A.; CEDRÉ, B.; SIFONTES, S.; TORRES, V.; PINO, Y.; CALLÍS, A. H. y ESNARD, S. C. Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. En: VacciMonitor. Vol. 13, N° 3 (2004); p. 1-9.
- CAMPBELL, J. A. y LAMAR, W. W. The venomous reptiles of the western hemisphere. 2ª edición. Ithaca-London: Cornell University Press, 2004, p. 371-376.
- CAPDEVIELLE, R. A. Enciclopedia virtual de las serpientes [En línea]. Enlace: <http://www.serpientes-snakes.com.ar/index.htm>. Fecha de visita: 02/03/09.
- CHARRY RESTREPO, H. Epidemiología del accidente ofídico en Colombia. 2005. [En línea]. Manizales, Caldas. Colombia. Enlace: [www.scribd.com/doc/.../Ofidismo-Epidemiologia-del-Accidente-Ofidico-en-Colombia-Hector-Charry-Restrepo](http://www.scribd.com/doc/.../Ofidismo-Epidemiologia-del-Accidente-Ofidico-en-Colombia-Hector-Charry-Restrepo). Fecha de visita: 20/02/09.
- CISNEROS-HEREDIA, D. F. Lista anotada de las serpientes de la familia Viperidae en Ecuador: *Bothrops asper*. 2004. [En línea]. Laboratorio de Anfibios & Reptiles, Universidad San Francisco de Quito. Enlace: [http://www.geocities.com/dfch\\_diegoc/Viperidae/Bothrops\\_asper.htm](http://www.geocities.com/dfch_diegoc/Viperidae/Bothrops_asper.htm). Fecha de visita: 27/02/09.

- CISNEROS, Y.; LAZO, F.; GUTIÉRREZ, S. y YARLEQUÉ, A. Características bioquímicas de una proteína antibacteriana aislada del veneno de *Lachesis muta* "Shushupe". En: Revista Sociedad Química Perú. Vol. 72, Nº 4 (2006); p. 187-196.
- COSTA CARDOSO, J.L. y FAN, H.W. Snakebites in South America. 1995. p. 261-329. En: MEIER, J. & WHITE, J. Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. CRC, Boca Raton, Florida, EEUU.
- CRESPO, M. La lectura interpretativa del antibiograma: una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. En: Colombia Médica. Vol. 33, Nº 4 (2002); p. 179-193.
- CUESTA J.; PEÑA, L. y ZULUAGA, A. ¿Es necesaria la profilaxis antibiótica en la ofidiotoxicosis? En: Asociación Colombiana de Infectología. Vol. 12, Nº 1 (2008); p. 54-63.
- ESCOBAR, E.; FLORES, L. y RIVERA, C. Péptidos antibacterianos de los venenos de *Hadruidoidea mauryi* y *Centruroides margaritatus*. En: Revista peruana de Biología. Lima, Perú. Nº 15 (julio. 2008); p. 139-142.
- FERREIRA, B.; SANTOS, D.; DOS SANTOS, A. L.; RODRIGUES, C.; DE FREITAS, C.; CABRAL, L. M. and CASTRO, H. C. Comparative analysis of Viperidae venoms antibacterial profile: a short communication for proteomics. En: eCAM. Vol. 10, Nº 1093 (julio. 2008); p. 1-4.
- FOLLECO, A. J. Taxonomía del Complejo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidæ) en el Sudoeste de Colombia. Revalidación de la especie *Bothrops rhombeatus* (García 1896) y descripción de una nueva especie. En: Novedades Colombianas, Vol. 10, Nº 1 (2010); p. 33-69.
- GOMES, V.M.; CARVALHO, A.O.; CUNHA, M. D.; KELLER, M.N.; BLOCH, C.; DEOLINDO, C. y ALVES, E.W. Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. En: Toxicon. Vol. 45 (2005); p. 817–827.
- GUERRERO VARGAS, J.; DA SILVA LIBÉRIO, M.; DE SOUZA CASTRO, M. Aplicación biotecnológica de la toxínología: la importancia del veneno de escorpiones y la secreción cutánea de anuros. En: Revista Innovación y Ciencia. Vol. 15, Nº 2 (2008); p. 16-25.

- GUTIERREZ, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigación en América Latina. En: Revista Biología Tropical. Vol. 50, N° 2 (2002); p. 17.
- HENAO, E.; LATORRE, J. P.; MUÑOZ, C.; CALDAS, L.; DELGADO, S. y AYERBE, S. Caracterización de la flora bacteriana patógena, presente en la cavidad bucal de víboras en el serpentario del Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca. En: Revista Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Cauca. Popayán, Colombia. Vol. 7, N° 1 (dic.-ene. 2005).
- IZIDORO L. F.; RIBEIRO M. C.; SOUZA G. R.; SANT'ANA C. D.; HAMAGUCHI A.; HOMSI-BRANDEBURGO M. I.; *et al.* Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. En: Bioorg Med Chem. Vol. 14 (2006); p. 7034–7043.
- KAYSER, F. H.; BIENZ, K. A.; ECKERT, J. y ZINKERNAGEL, R.. Medical Microbiology. Thieme Stuttgart-New York: Appl, Wemding, 2005, p. 362-364.
- LAZO, F.; MÁLAGA, O.; YARLEQUÉ, A.; SEVERINO, R. y GUTIERREZ, S. Actividad antimicrobiana de una flavoproteína aislada del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* ("Jergón"). En: Sociedad Química Perú. Vol. 73, N° 4 (2007); p. 197-207.
- LUNA-BAUZA, Manuel Emiliano. Bases para el tratamiento por intoxicación por veneno de serpiente. En: Revista de la Facultad de Medicina UNAM. Veracruz, México. Vol. 50, N° 5 (sep.-oct. 2007); p. 199-203.
- MURILLO, L.; LAN, C.-Y.; AGABIAN, N.; LARIOS, S. and LOMONTE, B. Fungicidal activity of a Phospholipase A<sub>2</sub> - derived synthetic peptide variant against *Candida albicans*. En: Rev. Española de Quimioterapia. Vol. 20, N° 3 (Septiembre 2007); p. 330-333.
- MURILLO MORENO, F. J.; RENGIFO MOSQUERA, J. T. y JIMÉNEZ ORTEGA, A. Caracterización taxonómica de la fauna de ofidios venenosos la cuenca del río Cabí, Chocó – Colombia. En: Biodiversidad. Chocó. N° 20 (feb.-jun. 2004); p. 33-38.
- NAIR, D. G.; FRY, B. G.; ALEWOOD, P.; KUMAR, P. P. y KINI M, R. Antimicrobial activity of omwaprin, a new member of the waprin family of snake venom proteins. En: Biochem. J. N° 402, (2007); p. 93–104.

- OJEDA, U. Serpientes venenosas: Las incomprendidas víboras, parte I. Las serpientes venenosas (México). 2005. [En línea]. Enlace: <http://www.citologica.org/uriojeda/default.asp?id=35&Fd=2>. Fecha de visita: 18/02/2009.
- OTERO, R. Manual de diagnóstico y tratamiento del accidente ofídico. Universidad de Antioquia. Medellín-Colombia: Yuluka, 1994. P. 9-19.
- PACHÓN, J.; CISNEROS, J.; COLLADO, A.; LOMAS, J.; LOZANO, F.; PARRA, J. y RIVERO, R. Tratamiento de las enfermedades fúngicas invasoras. En: *Emferm Infec Microbiol Clin*. Vol. 24, N° 4 (2006); p. 254-263.
- PATIÑO, B. S. Serpientes venenosas. En: *Boletín Geas*. Santa Fe de Bogotá. Vol. 3, N° 5 (ene.-jul. 2002); p. 37-42.
- PERUMAL, S.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; HO, B. y CHOW, V. Purification, characterization and bactericidal activities of basic Phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Agkistrodon halys* (Chinese pallas). En: *Biochimie*. Vol. 90 (2008); p. 1372-1388.
- PERUMAL, S.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; THWIN, M.; CHOW, V.; HO, B.; YAP, E.H. y THONG, T. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. En: *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 102 (2007); p. 650-659.
- PERUMAL, S.; PACHIAPPAN, A.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; THWIN, M.; HIAN, Y.; CHOW, V.; BOW, H. y WENG, J. T. In vitro antimicrobial activity of natural toxins and animal venoms tested against *Burkholderia pseudomallei*. En: *BMC Infectious Diseases*. Singapore. Vol. 6, N° 100 (jan.-jun. 2006); p. 1-16.
- PINEDA, D.; GHOTME, K.; ALDECO, M. E. y MONTOYA, P. Accidentes ofídicos en Yopal y Leticia, Colombia, 1996-1997. En: *Biomédica*. Bogotá. Vol. 22, N° 1 (jul.-dic. 2002); p. 14-21.
- PIRELA DE LAS SALAS, R. C.; LÓPEZ-JONSTHON, J. C. y HERNÁNDEZ RANGEL, J. L. Caracterización toxinológica del veneno total de la serpiente de cascabel *Crotalus durissus cumanensis* (Viperidæ), presente en la localidad de Porshoure, Guajira Venezolana. En: *Revista Científica FCV-LUZ*. Maracaibo, Venezuela. Vol. 16, N° 3 (feb. 2006); p. 232-238.

- SACHIDANANDA, M. K.; MURARI, S. K.; CHANNE, G. D. Characterization of an antibacterial peptide from indian cobra (*Naja naja*) venom. En: J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. Vol. 13, N°2 (2007); p. 446-461.
- SAMARANAYAKE, Y. H. y SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. En: J. Med. Microbiol. Vol. 41 (1994); p. 295-310.
- STILES, B.G.; SEXTON, F.W. & WEINSTEIN S.A. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australia king brown or mulga snake) venom. En: Toxicon. N° 29, (1991); p. 1129-1141.
- TRABI, M.; SCHIRRA, H.J. y CRAIK, D.J. Three-dimensional structure of RTD-1, a cyclic antimicrobial defensin from *Rhesus macaque* leukocytes. En: Biochemistry. N° 40, (2001); p. 4211-4221.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organism. En: Nature. N° 415 (2002); p. 389-395.