

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

THALES ALVES DE MELO FERNANDES

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIBIOFILME DE L-AMINOÁCIDO
OXIDASES ISOLADAS DE PEÇONHAS BOTRÓPICAS CONTRA BACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES**

UBERLÂNDIA

2022

THALES ALVES DE MELO FERNANDES

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIBIOFILME DE L-AMINOÁCIDO
OXIDASES ISOLADAS DE PEÇONHAS BOTRÓPICAS CONTRA BACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como pré-requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina pelo curso de Biomedicina da
Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Profa. Dra. Veridiana de Melo
Rodrigues Ávila

Co-orientadora: Dra. Tássia Rafaella Costa

UBERLÂNDIA

2022

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thales Alves de Melo Fernandes

Potencial antibacteriano e antibiofilme de L-aminoácido oxidases isoladas de peçonhas botrópicas contra bactérias multirresistentes.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina pelo curso de Biomedicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Co-orientadora: Dra. Tássia Rafaella Costa

Data: 08 / 08 / 2022

Banca Examinadora

(Orientadora) Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (Instituto de Biotecnologia)

Dra. Renata Santos Rodrigues

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (Instituto de Biotecnologia)

Dr. Samuel Cota Teixeira

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (Instituto de Ciências Biomédicas)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todos os momentos juntos ao longo desta fase, pelo carinho e confiança, por acreditar em meus objetivos, por terem celebrado minhas conquistas e por terem proporcionado minha educação e graduação em Biomedicina.

Aos meus colegas de curso, com quem convivi dividi os últimos anos, pela amizade e troca de experiências que me permitiram crescer como pessoa.

À Dra. Veridiana, minha orientadora, por ter aberto as portas do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais, pela orientação, ensinamentos e amizade ao longo deste período.

À Dra. Tássia, minha co-orientadora, por todos os ensinamentos, por ter auxiliado no meu crescimento acadêmico e profissional e a sua amizade.

Aos colegas do Laboratório, Lorena, Vitor, Marina, Isabela, Luana, Lucas e todos os outros com quem tive a satisfação em dividir essa etapa, pela ajuda, ensinamentos e companheirismo.

Ao Dr. Carlos Henrique e o grupo do Laboratório de Ensaios Antimicrobianos pela colaboração na execução dos experimentos desenvolvidos neste trabalho.

Ao Dr. Samuel pela orientação e ensinamentos nesta jornada e ao grupo do Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução pela parceria em projetos.

Ao Dr. Nilson pelos ensinamentos na área da Bioinformática e pela parceria no desenvolvimento dos projetos.

As fundações CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFU no auxílio financeiro favorecendo a execução de um bom projeto.

RESUMO

FERNANDES, T. A. M. **Potencial antibacteriano e antibiofilme de L-aminoácido oxidases isoladas de peçonhas botrópicas contra bactérias multirresistentes.** 2022. 61 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

As infecções bacterianas associadas com a formação de biofilme apresentam uma alta mortalidade. No presente trabalho, demonstrou-se a capacidade de duas LAAOs obtidas das peçonhas de *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararacussu* em inibir a formação de biofilme de linhagens multirresistentes de *S. aureus* ATCC BAA44, *E. coli* ATCC BAA198 e isolados clínicos. As proteínas purificadas apresentaram massa molecular de ~ 64,31 kDa e ~ 60,73 kDa e um alta homogeneidade, correspondendo a BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II; além disso, possuem atividade enzimática sobre o substrato L-Leucina de 4.136,683 e 5.205,740 U/mg/min, respectivamente, compartilham uma identidade de 89% e valores de RMSD de 0,105 e 0,078 entre todos os átomos e C α , respectivamente. BmooLAAO-I possui um maior número de motivos glicosilados e densidade de cargas positivas próximas aos sítio de glicosilação em comparação à BjussuLAAO-II, podendo estar correlacionado com a interação com a superfície bacteriana e com a matriz extracelular do biofilme. Sobre as cepas multirresistentes *S. aureus* ATCC BAA44 e *S. aureus* (isolados clínicos), BmooLAAO-I (CIM = 0,12 e 0,24 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) e BjussuLAAO-II (CIM = 0,15 $\mu\text{g/mL}$) controlaram intensamente o crescimento bacteriano, enquanto que, contra as linhagens multirresistentes *E. coli* ATCC BAA198 e *E. coli* (isolados clínicos), BmooLAAO-I (CIM = 15,6 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) e BjussuLAAO-II (CIM = 4,88 e 9,76 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) demandaram doses maiores para controlar o crescimento bacteriano. Tratando-se da ação antibiofilme, BmooLAAO-I (CIMB₅₀ = 0,195 $\mu\text{g/mL}$) e BjussuLAAO-II (CIMB₅₀ = 0,39 $\mu\text{g/mL}$) inibiram a formação de biofilme de *S. aureus* (isolados clínicos) em 88% e 89%, respectivamente. Em paralelo, BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II na concentração de 1,56 $\mu\text{g/mL}$ inibiram 89% e 53% a formação de biofilme de *E. coli* (isolados clínicos). Em análises de microscopia eletrônica de varredura, as CIMs de BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II afetaram morfologia das bactérias, induzindo constrições, ondulações e alongamentos, e o desmantelamento da arquitetura do biofilme. O presente trabalho aponta para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento das infecções bacterianas associadas com a formação de biofilme.

Palavras-chave: Biofilme; Bactérias multirresistentes; Peçonha de serpentes; L-aminoácido oxidases.

ABSTRACT

FERNANDES, T. A. M. **Antibacterial and antibiofilm potential of L-amino acid oxidases isolated from *Bothrops* snake venoms against multiresistant bacteria**. 2022. 61 p. Final paper (Monography) – Institute of Biomedical Sciences, Uberlândia Federal University, Minas Gerais, Brazil.

Bacterial infections associated with biofilm formation present high mortality. In the present work, was demonstrated the ability of two LAAOs obtained from *Bothrops moojeni* and *Bothrops jararacussu* venoms to inhibit biofilm formation of multiresistant lineages of *S. aureus* ATCC BAA44, *E. coli* ATCC BAA198, and clinical isolates. The purified biomolecules presented molecular weight of ~ 64.31 kDa and ~ 60.73 kDa and a high homogeneity, corresponding to BmooLAAO-I and BjussuLAAO-II; furthermore, possess enzymatic activity upon L-Leucine of 4,136.683 e 5,205.740 U/mg/min, respectively, and shares 89% of identity in the primary structure and RMSD values of 0.105 and 0.078 between all atoms and C α , respectively. BmooLAAO-I possesses a higher number of glycosylated motifs and positively charge density close to the glycosylation sites than BjussuLAAO-II, which can be correlated with the interaction with the bacterial surface and the biofilm extracellular matrix. Upon the multiresistant strains *S. aureus* ATCC BAA44 and *S. aureus* (clinical isolates), BmooLAAO-I (MIC = 0.12 and 0.24 μ g/mL, respectively) and BjussuLAAO-II (MIC = 0.15 μ g/mL) control intensively the bacterial growth, while against multiresistant *E. coli* ATCC BAA198 and *E. coli* (clinical isolates), BmooLAAO-I (MIC = 15.6 and 62.5 μ g/mL, respectively) and BjussuLAAO-II (MIC = 4.88 and 9.76 μ g/mL, respectively) showed a lower extent effect. Regarding the antibiofilm action, BmooLAAO-I (MIC₅₀ = 0.195 μ g/mL) and BjussuLAAO-II (MIC₅₀ = 0.39 μ g/mL) inhibited the biofilm formation of *S. aureus* (clinical isolated) in 88% and 89%, respectively. In parallel, BmooLAAO-I and BjussuLAAO-II at concentrations of 1.56 μ g/mL inhibited the biofilm formation by 89% and 53% of *E. coli* (clinical isolated). In the scanning electron microscopy analyses, the MICs of BmooLAAO-I and BjussuLAAO-II affected the bacteria morphology, inducing constrictions, undulations and elongations, and the dismantling of biofilm architecture. The present study points to the development of new strategies for the treatment of bacterial infections.

Key-words: Biofilm; Multiresistant bacteria; Snake venoms; L-amino acid oxidases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Purificação da BmooLAAO-I da peçonha de *Bothrops moojeni*.

Figura 2. Purificação da BjussuLAAO-II da peçonha de *Bothrops jararacussu*.

Figura 3. Sequenciamento da BmooLAAO-I.

Figura 4. Alinhamento múltiplo entre a BmooLAAO-I de *Bothrops moojeni*, BjussuLAAO-II de *Bothrops jararacussu* e CR-LAAO de *Calloselasma rhodostoma*.

Figura 5. Estrutura dos modelos preditos da BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II a partir da CR-LAAO.

Figura 6. Distribuição de cargas na superfície dos modelos preditos da BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II.

Figura 7. Ação antibiofilme da BmooLAAO-I, BjussuLAAO-II e gentamicina contra linhagens bacterianas multirresistentes ATCC BAA44 e isolados clínicos de *S. aureus*.

Figura 8. Ação antibiofilme da BmooLAAO-I, BjussuLAAO-II e gentamicina contra linhagens bacterianas multirresistentes ATCC BAA198 e isolados clínicos de *E. coli*.

Figura 9. Ensaio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *S. aureus*.

Figura 10. Ensaio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *E. coli*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Recuperação proteica das frações purificadas de *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararacussu*.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da BmoLAAO-I e BjussuLAAO-II contra as cepas de bactérias multirresistentes gram-positivas e gram-negativas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3FTXS – *three-finger toxins*

ACN – Acetonitrila

AF – Ácido fórmico

AHL – Acil-homoserina lactona

AIP – Peptídeo autoindutor

BPFs – fatores potencializadores de bradicinina

CGU – Unidade de Glicose Capilar

CLSI – *Clinical & Laboratory Standards Institute*

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CBM – Concentração Bactericida Mínima

DTT – Ditioneitol

ECA – enzima conversora de angiotensina

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

EPS – Substância Extracelular Polimérica

FDR – *False Discovery Rate*

Gbps – proteínas ligantes de glicanos

IAA – Iodoacetamida

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

PIA – Adesina intracelular polissacarídica

PLA₂s – fosfolipases A₂

PMSF – fenilmetilsulfonil flúor

PSM – *Peptide Match Spectrum*

QS – *Quorum sensing*

RMSD – *Root Mean Square Deviation*

SV-LAOs – L-aminoácido oxidases de peçonha de serpentes

SVMPs – metaloproteases de peçonha de serpentes

SVSPs – serinoproteases de peçonha de serpentes

TFA – Ácido trifluoroacético

VRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina

YcgR – Proteína motora de flagelo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Peçonha de serpentes.....	12
1.2. L-aminoácido oxidases de peçonha de serpentes (SV-LAAOs)	13
1.3. Infecções bacterianas por <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	17
1.4. Infecções bacterianas associadas à formação de biofilme.....	18
1.5. Efeitos antibacterianos das SV-LAAOs	20
2. OBJETIVO GERAL.....	21
2.1. Objetivos específicos.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. Obtenção das peçonhas brutas de <i>Bothrops moojeni</i> e <i>Bothrops jararacussu</i>	22
3.2. Purificação	22
3.3. Caracterização bioquímica	23
3.3.1. Dosagem proteica	23
3.3.2. Atividade L-aminoácido oxidase.....	23
3.3.3. SDS-PAGE	24
3.4. Espectrometria de massas	24
3.5. Caracterização estrutural	26
3.6. Ensaio antibacteriano.....	26
3.6.1. Linhagens bacterianas	26
3.6.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	26
3.6.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Biofilme (CIMB ₅₀).....	27
3.7. Análises estatísticas	29
4. RESULTADOS	29
4.1. Isolamento e caracterização bioquímica da BmooLAAO-I e da BjussuLAAO-II.....	29
4.2. Espectrometria de Massas	30

4.3. Caracterização estrutural	35
4.4. Atividade antibacteriana	37
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	47
7. REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. Peçonha de serpentes

A peçonha é uma secreção biológica produzida por células e tecidos especializados e armazenada no lúmen de uma glândula, cuja liberação é induzida pela inoculação durante predação, defesa ou outra interação ecológica. Veneno é o termo usado para se referir a qualquer tipo de substância tóxica, natural ou sintética e liberada ativamente ou passivamente. Em relação à sua composição, a peçonha de serpentes é formada por proteínas, peptídeos, enzimas, cátions inorgânicos, lipídeos, carboidratos, aminoácidos livres e aminas biogênicas. As proteínas e peptídeos compõe até 95% do peso seco da peçonha. A pesquisa biomédica das peçonhas de serpentes é fomentada pelo estudo das propriedades genéticas, bioquímicas e físico-químicas, pelo potencial uso e mecanismos de ação e pela pesquisa de antivenenos, diagnóstico do envenenamento ofídico e métodos terapêuticos (TASOULIS & IBISTER, 2017; WAHEED et al., 2017; MUNAWAR et al., 2018; FRANGIEH et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2022; TAN et al., 2022).

A peçonha de serpentes é constituída de uma mistura de 20 a mais de 100 componentes, cuja maioria são peptídeos e proteínas. A idade, sexo, distribuição geográfica, ambiente e presa são fatores que afetam sua composição. Na maioria das peçonhas de serpentes, as toxinas englobam cerca de 30 famílias, apresentando uma vasta quantidade de isoformas. As peçonhas de serpentes da família Elapidae são formadas principalmente pelas famílias de toxinas as fosfolipases A₂ (PLA₂s), *three-finger toxins* (3FTXs), metaloproteinases (SVMPs), serinoproteases (SVSPs) e L-aminoácido oxidases (SV-LAAOs). As peçonhas de serpentes da família Viperidae são formadas por nove famílias de proteínas, cuja composição majoritária são de PLA₂s, SVMPs e SVSPs, alcançando cerca de 70% de todo proteoma, enquanto as LAAOs, lectinas tipo-C e lectinas tipo-C símile correspondem entre 4 e 7% (TASOULIS & IBISTER, 2017; WAHEED et al., 2017; CASEWEEL et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2022; TAN et al., 2022)

As técnicas ômicas aplicadas ao estudo das peçonhas de serpentes têm proporcionado diversos avanços no entendimento da sua evolução do veneno, classificação de toxinas, patofisiologia, tratamento do envenenamento ofídico e produção de antivenenos. Na proteômica, a complexidade da peçonha é reduzida por meio de métodos como cromatografia, eletroforese e espectrometria de massas (FOX & SERRANO, 2008; ZELANIS et al., 2012; HUANG et al., 2015; ZELANIS et al., 2016; PLA et al., 2017; TASOULIS & IBISTER, 2017; ANDRADE-SILVA et al., 2018; EL-AZIZ et al., 2020; SIMIZO et al., 2020; ALMEIDA et al.,

2021; ANDRADE-SILVA et al., 2021; TAN et al., 2022). A redução da complexidade da peçonha permite a identificação dos componentes, análise de variabilidade na estrutura primária, descoberta de isoformas e de modificações pós-traducionais. A genômica e transcriptômica utilizam o RNA e o DNA extraído da glândula produtora de peçonha para construção de uma biblioteca de cDNA, seguido de seu sequenciamento, anotação funcional e estudo de expressão. As técnicas de sequenciamento de nova geração têm aumentado a concentração de DNA/RNA sequenciado, ampliando a identificação de informações relevantes, como a identificação de genes e transcritos (ALMEIDA et al., 2016; VALENTE et al., 2018; TAN et al., 2022).

A peçonha de serpentes possui uma grande relevância para descoberta de novos fármacos, uma vez que diversas moléculas extraídas possuem aplicação clínica. O Captopril (Capoten®) é um agente anti-hipertensivo desenhado a partir de componentes isolados da peçonha de *Bothrops jararaca* denominados fatores potencializadores de bradicinina (BPFs). O Tirofiban (Agrastat®) é um fármaco não-peptídico antagonista da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, derivado da proteína echistatin da peçonha de *Echis carinatus*, usado para tratamento da doença coronariana aguda e como terapia antitrombótica. A Batroxobin (Reptilase®), uma protease trombina-símile da peçonha de *Bothrops atrox*, e a Moojenin (Defibrase®), uma metaloproteinase desfibrinogenante isolada de *Bothrops moojeni*, são fármacos empregados como agentes anticoagulantes. O Vivostat® é um agente selante composto por serinoprotease trombina-símile de *Crotalus durissus terrificus* e proteínas de adesão que tem sido utilizado em terapias regenerativas (WAHEED et al., 2017; ESTEVÃO-COSTA et al., 2018; EL-AZIZ et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2022).

Em relação às SV-LAOs, recentemente, em um estudo farmacológico da CC-LAO isolada da peçonha de *Cerastes cerastes* *in vitro* e *in vivo*, foi demonstrado que a biomolécula não causa citotoxicidade em órgãos vitais, como apontado pela dosagem de aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), lactado desidrogenase (LDH) e creatinina (ABDELKAFI-KOUBAA et al., 2021).

1.2. L-aminoácido oxidases de peçonha de serpentes (SV-LAOs)

As L-aminoácido oxidases de peçonha de serpentes (EC 1.4.3.2) são flavoenzimas homodiméricas que realizam a desaminação estereoespecífica de um L-aminoácido a um α -cetoácido com a produção concomitante de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e amônia. As SV-LAOs constituem geralmente 0,15 a 5% do conteúdo proteico da peçonha, com algumas

exceções, como a LAAO de *Bungarus caeruleus* e a CR-LAAO de *Calloselasma rhodostoma*, que representam 25% e 30% do total de proteína, respectivamente (BORDON et al., 2015; COSTA et al., 2015). Em razão da presença de LAAOs, que contém o cofator FAD em seu estado oxidado, a peçonha bruta apresenta coloração amarelada (ULLAH, 2020). As LAAOs são glicoproteínas com massa molecular entre 120 e 150 kDa em sua forma dimérica e 50 a 70 kDa em sua forma monomérica (COSTA et al., 2018; ULLAH, 2020). Apesar de em alguns casos apresentarem forma tetramérica e heterotrimérica, as SV-LAAOs estão presentes sobretudo como proteínas homodiméricas em solução e em seu estado ativo (FELICIANO et al., 2017; EL-HAKIM et al., 2015). Em adição, a variação presente na massa molecular está relacionada aos diferentes sítios de glicosilação (COSTA et al., 2018). As SV-LAAOs apresentam uma grande variação quanto ao ponto isoelétrico, 4,4 a 8,1, e possuem maior afinidade a L-aminoácidos hidrofóbicos, devido a especificidade no sítio ativo (BORDON et al., 2015).

A atividade enzimática desta toxina é determinada comumente pelo ensaio de peroxidase de rabanete, onde o H_2O_2 gerado pela reação é consumido pela peroxidase para oxidar o substrato o-fenilenodiamina (OPD), gerando um radical catiônico que é monitorado em um espectrofotômetro entre 380 e 492 nm. Neste ensaio, a L-Leucina é o substrato comumente utilizado (COSTA et al., 2018).

A presença de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), N-etilmaleimida, fenilmetilsulfonilflúor (PMSF), glutationa e 1,10-fenatrolina causam inibição da atividade enzimática da LAAO devido a redução do cofator nestas condições (BORDON et al., 2015). Além disso, cátions bivalentes apresentam modulações positivas ou negativas. LAAOs de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* apresentam significativa redução da atividade enzimática quando exposta aos íons Zn^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} ou Ni^{2+} . A LAAO de *Crotalus adamanteus* é inibida por Mg^{2+} , enquanto as de *Lachesis muta* e *Bothrops brazili* por Zn^{2+} (BORDON et al., 2015; COSTA et al., 2018). A maioria destas enzimas são termolábeis e inativadas por variações de pH, sendo indicado que as SV-LAAOs devem ser armazenadas a 4°C e em tampões com pH neutro para evitar a inativação enzimática (COSTA et al., 2018). A exposição a altas temperaturas causam perturbação nas interações hidrofóbicas e nas pontes de hidrogênio entre as diferentes subunidades da enzima, assim como o congelamento e a liofilização reduzem a atividade enzimática (BORDON et al., 2015; COSTA et al., 2018).

Os bancos de dados UniProt (UNIPROT CONSORTIUM, 2015), NCBI (BENSON et al., 2014) e PDB (BERMAN et al., 2014) apresentam um papel fundamental na análise das

estruturas primárias e terciárias (OJEDA et al., 2017). A análise estrutural de LAAOs obtidas a partir da cristalização e difração de raios X, revelaram, com bastante detalhes, importantes características desta classe de toxina, além do mecanismo de catálise da enzima (PAWELEK et al., 2000; MOUSTAFA et al., 2006; FELICIANO et al. 2017; ULLAH, 2020). As SV-LAAOs possuem em sua forma nativa 485 a 498 resíduos de aminoácidos (ULLAH, 2020). A estrutura primária é bastante conservada (> 84%) nesta classe de toxina e as principais diferenças de resíduos de aminoácidos estão nas regiões de loop, N-terminal e C-terminal. As SV-LAAOs enovelam em três domínios: o domínio de ligação ao FAD, o domínio de ligação ao substrato e o domínio helicoidal (ZHANG et al., 2004; MOUSTAFA et al., 2006; FELICIANO et al. 2017; ULLAH, 2020). A sobreposição estrutural das SV-LAAOs cristalizadas aponta um valor médio de 0,46 Å (ULLAH, 2020). Além disso, os sítios de glicosilação (Asn172 e Asn361) são amplamente conservados. É estimado que a glicosilação represente cerca de 12% da massa molecular das proteínas (ALVES et al., 2008). A glicosilação encontra-se localizada proximamente ao túnel de entrada de O₂ e saída de H₂O₂ e tem sido relacionado a liberação de uma alta concentração de peróxido de hidrogênio em superfícies celulares (SUHR E KIM, 1996; TORII et al., 1997; GEYER et al., 2001; EHARA et al., 2002; ANDE et al., 2006; LEE et al., 2011; ABDELKAFI-KOUBAA et al., 2016; ULLAH et al., 2020). A remoção do motivo glicano tem fortes implicações nas atividades biológicas, uma vez que é apontado como sítio de ancoramento das toxinas às células e importante para sua estabilidade (GEYER et al., 2001; STÁBELI et al., 2004; IZIDORO et al., 2006; CHEN et al., 2012). A predição de interação das SV-LAAOs com a membrana celular aponta que o motivo glicano presente no resíduo de Asn172 e os resíduos presentes nos loops do domínio de ligação ao FAD estão envolvidos nos contatos com a membrana (ULLAH, 2020).

Em relação ao mecanismo de catálise, o sítio ativo é localizado profundamente na enzima e possui uma entrada longa em forma de funil com extensão de 25 Å. A parede deste funil é formada por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos que direcionam o substrato ao sítio ativo. O cofator FAD atua como receptor do hidrido (ânion hidrogênio ou íon hidreto) do carbono- α do substrato ao átomo N5 do anel de isoaloxazina. O resíduo de Arg90 interage com o grupo carboxílico do substrato através de uma ponte salina com o grupo guanidínio, mantendo-o na orientação específica para a catálise. Os resíduos de aminoácidos Phe227, Tyr372 e Trp465 estabilizam a parte isoaloxazina do cofator por meio de interações hidrofóbicas. Os resíduos de Ile374 e Ile430 constituem o sítio hidrofóbico de ligação do substrato e se ligam preferencialmente a aminoácidos com cadeias laterais não polares. Uma

molécula de água conservada próxima a Lys326 e ao cofator (átomo N5 do anel de isoaloxazina) forma a tríade catalítica Lys326-H₂O-N5 e é importante para redução do FAD e produção de peróxido de hidrogênio (PAWELEK et al., 2000; GEYER et al., 2001; MOUSTAFA et al., 2006; ULLAH, 2020).

A reação catalítica pode ser descrita por uma reação de oxidorredução do FAD. Na primeira etapa de redução, o aminoácido protonado na forma zwitteriônica acessa o longo canal em forma de funil. No canal, a His233 e a Arg322 bloqueiam a entrada do substrato à medida que mudam sua conformação devido à forma zwitteriônica. A His233 então remove um próton do grupo α -amino do substrato. Após a desprotonação, o substrato é novamente modificado pela transferência de elétrons do nitrogênio do grupo α -amino para o átomo de carbono- α . Isso torna o substrato mais ativo e leva a transferência do hidreto ao átomo N5 do anel de isoaloxazina, reduzindo o cofator FAD. Na etapa de oxidação, o oxigênio remove os dois elétrons do FAD e, ao mesmo tempo, o oxigênio retira um hidrogênio da molécula água, formando um íon hidrônio e um hidrogênio do FAD, que havia previamente retirado da His223, produzindo o peróxido de hidrogênio. A ponte entre FAD e H₂O₂ é rompida e o peróxido de hidrogênio liberado. A molécula de água próxima a Lys326 providencia o oxigênio ao iminoácido, modificando-o a α -ketoácido e o hidrogênio ao NH₂ convertendo-o em amônia (NH₃) (PAWELEK et al., 2000; GEYER et al., 2001; MOUSTAFA et al. 2006; ULLAH et al, 2020).

A inspeção da acessibilidade da superfície das SV-LAAOs revela a existência de um segundo canal localizado entre os domínios de ligação ao FAD e ao substrato, iniciando próximo ao sítio de ligação do substrato, passando por baixo da hélice α 9 do domínio helicoidal e terminando próximo a região N-terminal no domínio de ligação ao substrato. Este canal possui um carácter hidrofóbico em razão da presença de resíduos hidrofóbicos e partes não polares das cadeias laterais polares. Os resíduos His95 e Arg96 são conservados ou substituídos por equivalentes de Tyr16 e Ile226 em outras SV-LAAOs. Este túnel hidrofóbico, então, serve como entrada para o O₂ ao sítio ativo. As moléculas de água que preenchem o canal, apesar de não terem acesso ao sítio ativo, revelam um link entre o canal do oxigênio e a superfície da cavidade, formando um canal bifurcado. Este segundo canal passa por baixo da hélice α 9 ao lado da cadeia lateral da Lys222 e funciona como saída para H₂O₂. Este canal é formado predominantemente por porções hidrofóbicas e porções alifáticas dos resíduos polares, acolhendo a natureza menos polar do peróxido (PAWELEK et al., 2000; GEYER et al., 2001; MOUSTAFA et al, 2006; FELICIANO et al., 2017; ULLAH et al, 2020).

Na peçonha, o papel das SV-LAAOs encontra-se relacionado a conservação e estabilidade da peçonha nas suas glândulas, devido às propriedades antibacterianas. As SV-LAAOs causam diversos efeitos, incluindo hemólise e hemorragia, formação de edema, inibição ou indução da agregação plaquetária e indução de apoptose. Embora as SV-LAAOs apresentem um papel importante na fisiopatologia do envenenamento ofídico, estas possuem um importante potencial terapêutico graças às ações antibacteriana, antifúngica, antitumoral e antiparasitária (IZIDORO et al., 2014; PALOSCHI et al., 2017). A SV-LAAO estudada no presente trabalho BmooLAAO-I (STABELI et al., 2007) possui ação anti-*Leishmania* spp., anti-*Trypanosoma cruzi*, antibacteriana, ativação da agregação plaquetária, indução de efeitos pró-apoptóticos em linhagens celulares de leucemia mielóide crônica, ativação de neutrófilos e produção de citocinas (FRANÇA et al., 2007; STABELI et al., 2007; BURIN et al., 2020; PEREIRA-CROTT et al., 2020). Já a BjussuLAAO-II também possui ação anti-*Leishmania* spp. e anti-*T. cruzi* e citotoxicidade contra células de carcinoma hepático e adenocarcinoma de mama (CARONE et al., 2017; MACHADO et al., 2019; MACHADO et al., 2019; BARBOSA et al., 2021).

1.3. Infecções bacterianas por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

As doenças infecciosas estão entre as principais complicações associadas a outras patologias, como o câncer. *S. aureus* e membros da família Enterobacteriaceae são os principais organismos virulentos gram-positivos e gram-negativos, respectivamente, encontrados em pacientes acometidos com câncer. Vale ressaltar que estas infecções atingem sobretudo indivíduos imunocomprometidos (WILSON, 2014; RABIN et al, 2015).

A bactéria *S. aureus* é associada a infecções severas, alcançando centenas de milhões de casos por ano (CHEUNG et al., 2021). As internações são preocupantes devido à resistência aos antibióticos convencionais, sobretudo as bactérias *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e vancomicina (VRSA) (LAKHUNDI & ZHANG, 2018; CRAFT et al., 2019; CHEUNG et al., 2021). Em adição, este patógeno possui uma ampla variedade de fatores de virulência, os quais possuem impacto na resposta imune, colonização e toxicidade (CRAFT et al., 2019; CHEUNG et al., 2021). As infecções por *S. aureus* originam usualmente através de colonizações assintomáticas ou durante hospitalização. O estabelecimento da infecção ocorre a partir da evasão da resposta imune e por meio da formação de biofilme. O biofilme pode ser formado na superfície de aparelhos médicos, como cateteres, ou nos tecidos, como nas válvulas cardíacas. O biofilme protege os microrganismos contra condições hostis de temperatura,

limitação de nutrientes, desidratação e contra os antibióticos (IDRESS et al., 2021). Embora o principal foco de infecção seja a pele, este patógeno pode induzir infecções profundas e na corrente sanguínea, cuja principal fonte de bacteremia são as infecções na pele. A presença do patógeno no sangue pode levar a uma resposta inflamatória sistêmica à infecção (seps), causando danos severos aos tecidos e favorecendo o avanço da doença (KWIECINSKI & HORSWULL, 2020). Os impactos clínicos são diversos e incluem colonização de cateter intravascular, infecções epitelial e tecidual, abscesso visceral, endocardite e infecções ósseas, articulares, pulmonares e na corrente sanguínea. Em adição, a maioria das bactérias *S. aureus* é resistente a penicilina pela produção plasmídica de penicilase (WILSON, 2014; MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W., 2017).

As bactérias da família Enterobacteriaceae estão presentes na flora intestinal, na orofaringe e vagina (WILSON, 2014). Os membros mais comuns incluem *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. (WILSON, 2014). A *E. coli* possui uma alta capacidade de acumular genes de resistência contra cefalosporinas, carbapenêmicos, aminoglicosídeos, quinolonas e polimixinas (POIREL et al., 2018). Este microrganismo é causador de graves infecções no trato urinário e na corrente sanguínea (SANTOS et al., 2020; BALLÉN et al., 2022). As bactérias da espécie *E. coli* abrangem 50% das infecções de trato urinário adquiridas nos hospitais (MITTAL et al., 2015). As infecções associadas à formação de biofilme têm um efeito deletério nos implantes artificiais e serve como fonte de infecções recorrentes no trato urinário. O biofilme torna as colônias impermeáveis aos antibióticos, tornando difícil de combater e favorecendo o desenvolvimento de resistência (MITTAL et al., 2015). Além disso, os microrganismos presentes no biofilme são cerca de 1.000 vezes mais resistentes aos antibióticos e possuem mecanismos de evasão contra a resposta imune (BALLÉN et al., 2022).

1.4. Infecções bacterianas associadas à formação de biofilme

O biofilme corresponde a uma comunidade de microrganismos aderidos a uma superfície e embebidas em uma substância extracelular polimérica (EPS). A formação de biofilme é considerada uma das principais causas da alta mortalidade das infecções bacterianas. É estimado que cerca de 65 a 80% de todas as infecções bacterianas são associadas com a formação de biofilme. O conjunto de microrganismos denominado ESKAPE (*Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp.) inclui às principais bactérias formadoras de biofilme responsáveis pela alta

mortalidade nos hospitais. A estrutura do biofilme é formada por uma matriz de exopolissacarídeos, DNA extracelular (eDNA) e proteínas, que é secretada pelos microrganismos e organizada em uma arquitetura com canais aquosos para passagem de água e nutrientes entre as diversas camadas. Os carboidratos manose, galactose e glicose são os mais abundantes, além de existir N-acetilglicosamina, ácido galacturônico, arabinose, fucose e xilose. As proteínas extracelulares desempenham um importante papel na formação do biofilme e em sua estabilização, como as proteínas ligantes de glicanos (Gbps) em *S. mutans* que estabelecem uma ponte entre as bactérias e os exopolissacarídeos, além da proteína associada ao biofilme (bap) em *S. aureus* e *E. coli* envolvida no desenvolvimento do biofilme e no processo infeccioso. Em adição, estão presentes enzimas cujos substratos de proteínas, polissacarídeos e nucleotídeos fornecem nutrientes para as bactérias e são responsáveis pela dispersão. O eDNA é proveniente de células lisadas e ativamente secretado, apresentando um papel crítico na adesão do biofilme à superfície e como mecanismo de resistência aos antibióticos (HØIBY et al., 2010; TOLKER-NILSEN, 2015; RABIN et al., 2015; VENKATESAN et al., 2015; HUGHES & WEBBER, 2016; SHARMA et al., 2016; JAMAL et al., 2017; MOORMEIER & BAYLES, 2017; POZO, 2017; ROY et al., 2018; SINGH et al., 2022).

A formação do biofilme pode ser descrita por três estágios de adesão, maturação e dispersão. A *S. aureus*, por exemplo, possui elementos de superfície capazes de reconhecer proteínas de matriz extracelular, como a nectina, o fibrinogênio e a vitronectina, e estabelecer ligações covalentes com a parede celular do peptidoglicano. Em seguida, outras bactérias são recrutadas e promovem a maturação do biofilme, o qual pode alcançar dezenas de camadas em uma estrutura no formato de torre. O mecanismo pelo qual as bactérias coletivamente regulam a expressão gênica e monitoram a densidade de células é denominado *quórum-sensing* (QS). A produção dos chamados auto-indutores, como a acil-homoserina lactona (AHL), o peptídeo auto indutor (AIP) e a YcgR, medeiam a secreção de exopolissacarídeos, a dispersão do biofilme e a transição de móvel para sésil em *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. A dispersão do biofilme pode ser ocasionada pela escassez de nutrientes, competição ou superpopulação de bactérias, e levar a formação de biofilme em outros focos (HØIBY et al., 2010; RABIN et al., 2015; TOLKER-NIELSEN, 2015; VENKATESAN et al., 2015; SINGH et al., 2022).

A ineficiência dos antibióticos em lidarem com as infecções associadas com a formação de biofilme é uma alarmante crise na saúde pública. Os antibióticos são capazes de suprimir as

bactérias livres, entretanto sua capacidade de eliminar as células embebidas no biofilme é ineficiente. Tem sido apontado que os antibióticos carregados positivamente, como os aminoglicosídeos, são sequestrados próximos a superfície do biofilme e são incapacitados de penetrar em sua estrutura e alcançar os microrganismos, além de que estes fármacos estão sujeitos a inativação por enzimas presentes na estrutura na matriz, como a β -lactamase no caso dos β -lactâmicos. Além disso, um importante mecanismo de resistência é a presença das chamadas bactérias persistentes, que constituem menos de 0,1 % das células e são responsáveis por reestabelecer a população do biofilme após o tratamento com o antibiótico, causando relapso na infecção. Dessa forma, os mecanismos de ação clássicos de inibição da síntese de proteína, RNA, DNA, peptidoglicano e ácido fólico são facilmente evadidos pelos microrganismos, sendo necessárias doses 100 a 1000 vezes mais altas para inibir as bactérias presentes no biofilme (VENKATESAN et al., 2015; HUGHES e WEBBER, 2016; CIOFU et al., 2017; POZO, 2017; ROY et al., 2018; SINGH et al., 2022).

1.5. Efeitos antibacterianos das SV-LAAOs

As infecções bacterianas resistentes têm crescido de forma escalonada e urgido a necessidade pela busca de novos agentes terapêuticos eficientes. Nesse contexto, as biomoléculas extraídas a partir da peçonha de serpentes evocam atenção devido ao seu potencial biotecnológico, como as SV-LAAOs. A ação antibacteriana de uma SV-LAAO foi primeiramente relatada por Skarnes (1970) a partir da peçonha da serpente *Crotalus adamanteus*. Desde então, diversas outras SV-LAAOs demonstraram este efeito, *Cerastes cerastes* (CcLAAO), *Crotalus durissus cascavella* (CascaLA), *Crotalus durissus cumanensis* (CdcLAAO), *Crotalus adamantus*, *Bothrops atrox* (BatroxLAAO), *Bothrops alternatus* (Balt-LAAO), *Bothrops marajoensis* (BmarLAAO), *Bothropoides matogrosensis* (BmLAAO), *Bothrops moojeni* (BmooLAAO-I), *Bothrops pirajai* (BpirLAAO-I), *Bothriechis schlegelii* (BsLAAO), *Daboia russelli siamensis* (DRS-LAAO), *Naja naja oxiana*, *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO), *Ophiophagus hannah* (OH-LAAO) (STÁBELI et al., 2004; SAMY et al., 2006; IZIDORO et al., 2006; TOYAMA et al., 2006; STÁBELI et al., 2007; SAMEL et al., 2008; ; ZHONG et al., 2009; TORRES et al., 2010; LEE et al., 2011; PAIVA et al., 2011; VARGAS et al., 2013; HANNANE-FADILA; FÁTIMA, 2014; MUÑOZ et al., 2014; COSTA et al., 2015).

As infecções bacterianas resistentes estão associadas com a formação de biofilme, o qual limita a reposta imune do hospedeiro e a ação de antibióticos. Dessa forma, o presente

estudo propõe o pela primeira vez a avaliação do potencial antibiofilme das L-aminoácido oxidases previamente isoladas de *Bothrops moojeni*, BmooLAAO-I (STABELI et al., 2007), e *Bothrops jararacussu*, BjussuLAAO-II (CARONE et al., 2017), além de correlacionar suas características estruturais com os efeitos biológicos. A utilização de duas toxinas permite comparar diferentes efeitos funcionais e/ou estruturais, bem como extrair importantes características envolvidas nos mecanismos antibacterianos.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliação do efeito antibiofilme das L-aminoácido oxidases (LAAOs) isoladas das peçonhas de *Bothrops moojeni* (BmooLAAO-I) e *Bothrops jararacussu* (BjussuLAAO-II) sobre cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

2.1. Objetivos específicos

- Isolar as L-aminoácido oxidases das peçonhas de *Bothrops moojeni* (BmooLAAO-I) e de *Bothrops jararacussu* (BjussuLAAO-II);
- Realizar a caracterização bioquímica através da determinação da massa molecular, concentração proteica, perfil eletroforético e estrutura primária das SV-LAAOs isoladas;
- Obter as estruturas tridimensionais das toxinas por meio de análise de modelagem molecular e corroborar suas características estruturais com seus respectivos efeitos antimicrobianos;
- Examinar o efeito antibacteriano por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) induzido pelas toxinas sobre cepas multirresistentes gram-positiva e gram-negativa adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos;
- Avaliar a ação antibiofilme das toxinas contra as linhagens bacterianas por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima de Biofilme (CIMB₅₀) e por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das peçonhas brutas de *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararacussu*

As peçonhas de *B. moojeni* e *B. jararacussu* foram adquiridas a partir de espécimes do Centro de Extração de Toxinas Animais (CETA). Este serpentário possui licença com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente dos Recursos Renovados (IBAMA) nº 2/35/1999/000545-1 na categoria de criação comercial. As peçonhas utilizadas no trabalho encontravam-se armazenadas no Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LaBiTox) em criopreservação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2. Purificação

As SV-LAAOs foram purificadas através de três passos cromatográficos realizados conforme metodologia preconizada (CARONE 2017, BARBOSA 2021), com algumas modificações. Cerca de 200 mg de cada peçonha bruta foram dispersas em 2 mL de tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo NaCl 150 mM, centrifugados a 10.000 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante límpido retirado foi aplicado em uma cromatografia por exclusão molecular na coluna HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR (GE Healthcare Life Science, PE, EUA) previamente equilibrada com tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo NaCl 150 mM. A eluição foi feita com o mesmo tampão sob o fluxo de 12 mL/h a 0,4 MPa em temperatura ambiente e feita a leitura da absorbância a 280 nm em sistema ÄKTAprime plus FPLC (GE Healthcare). As frações coletadas (1,0 mL) foram agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico e realizado ensaio de atividade L-aminoácido oxidase. A fração obtida da exclusão molecular, com atividade LAAO, foi concentrada por ultrafiltração usando Amicon[®] Ultra-15 Centrifugal Filter (MWCO = 30,000) (Millipore, MA, EUA) para mudança do tampão inicial para 20 mM Tris-HCl + 4 M NaCl pH 7.6.

Depois, a fração ativa foi aplicada em uma cromatografia de interação hidrofóbica em HiTrap Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (FF) (GE Healthcare) equilibrada com 10 mM Tris-HCl pH 7,6 contendo 4 M NaCl. Um gradiente linear reverso de NaCl (4 M a 0 M) operado em sistema ÄKTAprime plus FPLC (GE Healthcare) foi utilizado. Frações de 1,0 mL foram coletadas no fluxo de 36 mL/h a 0,4 Mpa em temperatura ambiente. A fração com atividade LAAO foi concentrada por ultrafiltração em Amicon[®] Ultra-15 Centrifugal Filter (MWCO = 30,000) (Millipore) para mudança do tampão para 20 mM Tris-HCl pH 7,4 contendo 0,5 M NaCl, sendo armazenada a 4°C .

Em seguida, a fração ativa obtida na interação hidrofóbica foi aplicada em uma HiTrap Bezamidine High Performance (HP) (GE Healthcare) previamente equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH 7,4 contendo 0,5 M NaCl. A eluição sequencial contendo 20 mM Tris-HCl pH 7,4 + 0,5 M NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,4 + 1,0 M NaCl; e 50mM glicina-HCl pH 3,0, foi realizada sob o fluxo de 36 mL/h a 0,4 Mpa em temperatura ambiente. As frações eluídas com tampão glicina foram neutralizadas com 0,5 mL de 1 M Tris-HCl pH 9,0. Frações de 1,0 mL foram coletadas e submetidas ao teste de atividade. L-aminoácido oxidase. A fração ativa foi concentrada por ultrafiltração usando Amicon[®] Ultra-15 Centrifugal Filter (MWCO = 30,000) (Millipore) para o tampão NH₄HCO₃ 10mM e armazenada a 4°C.

Por fim, a proteína purificada foi submetida em uma coluna de fase reversa C18 (46 x 250 mm, Thermo Scientific), para análise de pureza, previamente equilibrada com 0,1% (v/v) de TFA e eluída sob o fluxo de 1 mL/min usando um gradiente linear de 0,1% de TFA (solvente A) e 70% ACN (solvente B), conforme: 100% solvente A (5 minutos); 0 a 100% solvente B (35 minutos); 100% solvente B (10 minutos); 100% solvente A (10 minutos). Os picos foram monitorados a 280 nm e 465 nm. Os cromatogramas foram plotados usando o software Origin (OriginLab Corporation, MA, EUA).

3.3. Caracterização bioquímica

3.3.1. Dosagem proteica

A concentração proteica foi determinada conforme ensaio de Bradford (1976). A dosagem foi realizada em duplicatas em placas de 96 poços onde cada amostra foi incubada com 150 µL de reagente de Bradford (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) por 10 minutos em temperatura ambiente e a leitura da densidade óptica medida a 595 nm no espectrofotômetro Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific). Paralelamente a dosagem de proteínas, foi construída uma curva padrão de soroalbumina bovina (1 mg/mL) (Thermo Fisher Scientific). A concentração de proteínas em µg/µL foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos na curva padrão.

3.3.2. Atividade L-aminoácido oxidase

A atividade enzimática foi determinada por um ensaio com peroxidase de rabanete, onde o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) gerado pela LAAO, na presença da L-Leucina é reduzido pela peroxidase para oxidar a o-fenildianisidina (ODP), gerando um radical cátion que é detectado no espectrofotômetro à 490 nm (COSTA et al., 2018). A atividade foi determinada em 5 mL da

solução ensaio (L-Leucina 0,1% em Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2), onde foram adicionados 8 µL de peroxidase de rabanete (1 mg/mL), 50 µL de uma solução de ODP (10 mg/mL em metanol) e 2 µg de amostra. Após 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de ácido cítrico 10% (m/v) e realizada a leitura da absorbância. A atividade LAAO foi expressa em U/mg/min, correspondente a quantidade de H₂O₂ (µmol) formada por minuto por mg de proteína. A concentração de H₂O₂ formado foi quantificado através de uma curva padrão de H₂O₂ expressa em nmol/min.

3.3.3. SDS-PAGE

A homogeneidade das amostras foi verificada em gel de poliacrilamida a 12,5 % (m/v) em condições redutoras, na presença de SDS e β-mercaptoetanol, segundo metodologia descrita por Laemmli (1970), com algumas modificações. O sistema de SDS-PAGE descontínuo consistiu em: gel de empilhamento a 3%, contendo Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) e SDS a 0,1% (m/v), mantendo a relação de bis:acrilamida 0,8:30. O gel foi preparado em sistema de eletroforese Hoefer SE 260 Mighty Small II Mini-Vertical (Hoefer Inc, MA, EUA). As amostras foram dispersas em Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, azul de bromofenol 0,01% (m/v), glicerol 10% (v/v) e β-mercaptoetanol 20% (v/v). O tampão do eletrodo contendo Tris 25mM, glicina 192 mM e SDS 0,1% (m/v) (pH 8,3). Após corrida, os géis foram corados em uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (m/v) em água e etanol 1:1 (v/v) e descorados em uma solução de ácido acético 7%. A corrida das frações cromatográficas foi realizada em paralelo com a utilização de marcadores de massa molecular fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), lactalbumina (14,4 kDa) (Cytiva Global Life Sciences Solutions, MA, EUA) e PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder (#26630, Thermo Fischer Scientific).

3.4. Espectrometria de massas

A sequência da SV-LAAO isolada da peçonha de *B. jararacussu* foi previamente determinada em trabalho prévio do nosso grupo (BARBOSA et al. 2021) e corresponde a BjussuLAAO-II.

Com o intuito de ratificar a identidade da SV-LAAO purificada de *B. moojeni* no presente trabalho, 100 µg da toxina liofilizada foi dispersa em 20 µL de 50 mM NH₄HCO₃ pH 7,8 para atingir a concentração de 5 mg/mL. Em seguida, 10 µg foram reduzidos com 2 µL de DTT a 500 mM por 40 minutos a 56°C sob rotação a 650 rpm e alquilados com 3 µL de IAA

por 30 minutos em temperatura ambiente protegido da luz. A reação de alquilação foi interrompida pela adição de 2 μL de DTT a 500 mM por 10 minutos em TA no escuro.

O conteúdo proteico reduzido e alquilado sofreu digestão com tripsina por meio de dois passos consecutivos à 37°C: o primeiro com proporção de 1:50 (tripsina: proteína) incubado overnight a 650 rpm e o segundo realizado com a proporção de 1:100 e incubado por 3 horas. A reação foi interrompida por meio da acidificação do meio com TFA na concentração final de 10%. A amostra digerida foi secada à vácuo e ressuscitado em 20 μL de TFA a 0,1%. A amostra foi finalmente dessalinizada em uma microcoluna C18 ZipTio (Merck Millipore, MA, EUA) e eluída com 20 μL de TFA/ACN (50/50) a 0,1%.

O ensaio de LC-MS/MS foi realizado em um Acquity M-Class UPLC (Waters, MA, EUA) acoplado a um Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) no modo de ionização positivo por nanoelectrospray. Foram utilizadas a pré-coluna Symetry C18 5 μm (180 μm x 20 mm) (Waters) e a coluna analítica HSS T3 C18 1,8 μm (75 μm x 250 μm) (Waters). Os peptídeos digeridos da amostra foram carregados a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ na pré-coluna. A eluição foi feita com um gradiente de 2-90% solução B em 100 minutos (A: água/0.1% AF) e fluxo de 500 nL/min

O método de espectrometria de massas usado foi o TopN-MSMS, onde após scan do MS1, os 12 picos mais intensos do espectro foram selecionados para o MS2. Os seguintes parâmetros foram aplicados para aquisição do MS1: m/z de 400 a 1600; resolução de 70.000 (m/z de 200); AGC de 3×10^6 no tempo máximo de injeção de 200 ms. Os parâmetros usados para aquisição do MS2 foram: janela de isolamento de 2,0 m/z; energia de colisão normalizada (NCE) de 27; resolução de 17.500 (m/z 200); AGC de 1×10^5 no tempo máximo de injeção de 50 ms. Os principais parâmetros para o Q-Exactive foram: voltagem do spray de 2.3 kV; temperatura capilar de 250 °C e S-Lens RF level de 50,0.

A identificação proteica foi feita usando o software Peaks X+ Studio v. 10.5 (MA et al., 2003) contra o banco de dados do NCBI. Os seguintes parâmetros foram usados para busca no banco de dados: oxidação de metionina como modificação variável, carbamidometilação de cisteína como modificação fixa e tripsina como enzima com máximo número de clivagens errôneas igual a 3. O FDR foi de 0,1%, intensidade de mutação iônica de $\geq 5\%$ e peptídeo único ≥ 1 , considerando peptídeos significantes apenas aqueles com $-10 \log P > 20$ usados para detectar as proteínas no banco de dados usando o algoritmo de busca SPIDER (HAN et al., 2005). Estes parâmetros permitem a identificação proteica com um alto grau de confiabilidade e a identificação de modificações pós-traducionais.

3.5. Caracterização estrutural

Com o intuito de analisar a estrutura primária das proteínas isoladas, foi realizado um alinhamento múltiplo através do algoritmo Clustal Omega v. 1.4.2 (SILVERS et al., 2011; 2018). A modelagem molecular das proteínas isoladas foi realizada através do algoritmo do SWISS-MODEL (WATERHOUSE et al., 2018). Em resumo, as sequências proteicas foram usadas pela ferramenta de busca de template e a sequência da CR-LAAO (PAWELEK et al., 2000) (PDB: 1FR8) foi selecionada.

A qualidade dos modelos foi validada através das ferramentas QMEANDisco (STUDER et al., 2020), MolProbity (WILLIAMS et al., 2018), PROCHEK (LASKOWISKI et al., 1993), ERRAT (COLOVOS & YEATES, 1993) e VERIFY3D (LUTHY et al., 1992) no servidor SAVES v. 6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>). A estrutura terciária das proteínas foi analisada usando o software PyMOL v.2.5.2 (Schrödinger, Inc., NY, EUA)

3.6. Ensaio antibacteriano

3.6.1. Linhagens bacterianas

Na avaliação das atividades antibacterianas e antibiofilme, foram utilizadas as linhagens padrão adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC, MD, EUA) *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) ATCC BAA44 e *E. coli* multirresistente ATCC BAA198, além de *S. aureus* (isolado clínico) e *E. coli* (isolado clínico). Os isolados clínicos foram gentilmente fornecidos pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (São Paulo, Brasil) em trabalhos prévios do Laboratório de Testes Antimicrobianos da Universidade Federal de Uberlândia (Minas Gerais, Brasil) e mantidos na coleção de cultura de células sobre criopreservação a -80°C .

3.6.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CIM e a CBM foram determinadas através do método de microdiluição de acordo com protocolos previamente descritos em placas de 96-poços contendo meio Muller Hinton (MH) (CLSI 2012; ASSIS et al., 2022). Inicialmente, 50 μL de meio foram adicionados por poço e então aplicados 50 μL das toxinas isoladas de *B. moojeni* ou *B. jararacussu* (variando de 312,5 a 0,03 $\mu\text{g}/\text{mL}$), seguido imediatamente da adição da suspensão bacteriana contendo a concentração final de 5×10^5 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C seguido da adição de 30 μL de 0,02% de solução de

resazurina para avaliar o crescimento bacteriano. As cores azul e vermelho representam, respectivamente, a ausência e presença de crescimento bacteriano. Antes da adição de resazurina, alíquotas de 10 µL foram transferidas de cada poço para placas contendo ágar Muller Hinton para determinação da CBM. As placas foram incubadas por adicionais 24 horas a 37°C e, então, observada a ausência ou presença de crescimento bacteriano. O antibiótico convencional tetraciclina foi usado como controle positivo do teste em concentrações entre 0,01 e 5,9 µg/mL, e o experimento realizado em triplicata. Em paralelo, foi usado o solubilizante das amostras NH₄HCO₃ 10 mM como adicional controle negativo. Os resultados foram expressos em µg/mL de acordo com as concentrações bacteriostáticas e bactericidas das biomoléculas testadas.

3.6.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Biofilme (CIMB₅₀)

A CIMB₅₀ corresponde a menor concentração capaz de inibir 50% ou mais a formação de biofilme (WEI et al., 2006; CLSI 2012; VIEIRA et al., 2018; ASSIS et al., 2022). A CIMB₅₀ foi determinada por meio da leitura de densidade óptica (OD) de biomassa de biofilme formado em comparação com o controle, incubado apenas com meio de cultura, conforme metodologias previamente descritas (WEI et al., 2006; CLSI, 2012; VIEIRA et al., 2018; ASSIS et al., 2022). Os resultados foram expressos em densidade óptica mensurada a 595 nm e em contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro expressa em log₁₀ UFC/mL. Os testes foram realizados em triplicata e os antibióticos convencionais vancomicina e gentamicina (variando de 0,012 a 5,9 µg/mL) usados como controles positivos para comparar a ação das biomoléculas. A concentração do inóculo e o tempo ótimo de incubação para este ensaio foi determinado através da padronização do crescimento do biofilme (dados não mostrados).

Em resumo, em microplacas de 96-poços contendo meio BHI suplementado com 2% de glicose, diluições seriadas das biomoléculas purificadas (variando de 400 a 0,195 µg/mL) foram realizadas. Inóculo foi preparado a partir de placas de 24 horas de cultura em ágar BHI contendo 2% de glicose, com turbidez equivalente a 0.5 na escala McFarland (1x10⁵ UFC/mL) medida em espectrofotômetro a 625 nm e ajustado para 1x10⁶ UFC/mL. Em seguida, as microplacas foram incubadas por 24 horas a 37°C e os conteúdos dos poços cuidadosamente aspirados, sendo as células não aderidas removidas gentilmente através da lavagem com tampão PBS pH 7,2. Depois, o biofilme formado foi fixado em metanol por 15 minutos, secado em temperatura ambiente e corado com solução de cristal violeta 0,2% por 20 minutos. Após lavagem dos poços com tampão PBS, foi adicionado ácido acético 33% por 30 minutos para

solubilização dos cristais presentes no biofilme e a absorvância dos poços calculada em espectrofotômetro a 595 nm. A determinação da CIMB₅₀ foi feita usando a seguinte equação, onde At₅₉₅ é o valor de absorvância dos poços tratados com as biomoléculas e Ac₅₉₅ incubados com o controle:

$$\text{MICB}_{50} = (1 - \text{At}_{595}/\text{Ac}_{595}) \times 100$$

Com o intuito de determinar o número de microrganismos viáveis no ensaio antibiofilme, placas foram preparadas seguindo a mesma metodologia descrita e, após o período de incubação, o conteúdo de cada poço foi aspirado delicadamente e lavado com tampão PBS para remoção das células não aderidas. Em seguida, 200 µL de meio BHI contendo 2% de glicose foi adicionado aos poços e as placas sonificadas por 30 minutos. Subsequentemente, diluições decimais foram feitas e alíquotas de 50 µL de cada diluição transferidas para placas contendo ágar BHI e incubadas por 24 horas a 37°C. Em seguida, as colônias foram contadas e expressadas na escala log₁₀ UFC/mL.

3.6.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para avaliação das alterações morfológicas provocadas pelas biomoléculas na estrutura celular e do biofilme, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) de acordo com Melo et al. (2017), com modificações. Foi utilizada a concentração inibitória mínima (CIM) e sub-inibitória ($\frac{1}{2}$ CIM) de cada amostra. O ensaio foi realizado em placas de 24 poços contendo discos de policloreto de vinila (PVC) esterilizadas com 9 mm de diâmetro, seguindo as mesmas etapas descritas no subitem anterior para preparação da amostra e inóculo. Após 24 horas de incubação a 37°C, os discos foram fixados em solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2%) em tampão cacodilato de sódio 0,15 M (pH 7,0) por duas horas. Em seguida, os discos foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% durante 2 horas e desidratadas em etanol nas seguintes concentrações: 30%, 50%, 70%, 90% e 100% com intervalos de 20 minutos cada. Posteriormente, as amostras foram submetidas a secagem ao ponto crítico (SPC) utilizando dióxido de carbono líquido no equipamento Leica EM CPD300 (Leica Biosystems, Nußloch, Alemanha), revestidas com ouro (espessura 20 nm) no equipamento Leica EM SCD050 (Leica Biosystems) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura à 20 kV (Zeiss EVO MA10, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

3.7. Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (SD). Os dados foram primeiramente checados para distribuição normal (Gaussiana). Diferenças estatísticas foram comparadas com o controle pelo teste One-way ANOVA e *post-hoc* teste de comparações múltiplas de Tukey's. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism v. 9.0.0 (GraphPad Software, Inc., CA, EUA). Diferenças estatísticas foram consideradas quando $P < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e caracterização bioquímica da BmooLAAO-I e da BjussuLAAO-II

As toxinas foram purificadas com sucesso através dos três passos cromatográficos preconizados de exclusão molecular, interação hidrofóbica e afinidade (Figuras 1 e 2).

Na purificação de ambas SV-LAAOs, a exclusão molecular resultou em três frações (S1, S2 e S3), cujo pico S1 exibiu atividade enzimática e uma alta absorbância (Figuras 1A e 2A). Em adição, o pico S1 da fração de *B. moojeni* (71,7 mg) apresentou duas vezes mais recuperação proteica que a *B. jararacussu* (35 mg) (Tabela 1).

As frações ativas foram submetidas a interação hidrofóbica, obtendo quatro frações para *B. moojeni* (Ph1, Ph2, Ph3 e Ph4) e cinco no fracionamento da *B. jararacussu* (Ph1, Ph2, Ph3, Ph4 e Ph5) (Figuras 1B e 2B, respectivamente). As frações ativas Ph1 eluídas no tampão 10 mM + 4 M NaCl apresentaram atividade LAAO e uma alta absorbância. Além disso, a fração Ph1 de *B. moojeni* (6 mg) obteve um maior rendimento proteico em relação à fração de *B. jararacussu* (4 mg) (Tabela 1).

Os picos Ph1 foram aplicados na coluna de afinidade e coletados dois picos (Bz1 e Bz2) bem separados (Figuras 1C e 2C). O segundo pico de ambos os fracionamentos apresentou atividade enzimática e um formato característico de SV-LAAO botrópica purificada. Além disso, o pico Bz2 de *B. jararacussu* apresentou uma menor absorbância que o de *B. moojeni*, o que é refletido na diferença de conteúdo proteico de 1,36 mg e 2,36 mg, respectivamente (Tabela 1).

O ensaio de SDS-PAGE (12,5%) em condições desnaturantes das frações Bz2 de *B. moojeni* e *B. jararacussu* revelaram bandas únicas de $\sim 64,31$ kDa e $\sim 60,73$ kDa, respectivamente, as quais correspondem às proteínas BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II conforme previamente isoladas (Figuras 1C e 2C, respectivamente) (STABELI et al., 2007; CARONE et al., 2017).

As proteínas purificadas foram submetidas à cromatografia de fase reversa em HPLC para análise adicional de homogeneidade das proteínas purificadas (Figura 1D e 2D). A BmooLAAO-I teve o seu cofator FAD dissociado do protômero, apresentando dois picos homogêneos com leituras de 465 nm e 280 nm, respectivamente (Figura 1D). A BjussuLAAO-II manteve seu cofator FAD associado ao protômero, apresentado um pico único com alta absorvância em ambos os comprimentos de onda de 280 nm e 465 nm (Figura 2D). As proteínas isoladas BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II possuem um alto grau de atividade enzimática sobre o substrato L-Leucina, 4.136,683 e 5.205,740 U/mg/min, respectivamente.

4.2. Espectrometria de Massas

A análise de espectrometria de massas da toxina purificada de *B. moojeni* resultou em 8.896 espectros de massa MS1 e 25.851 espectros de massa MS2. Após aplicação dos parâmetros para filtragem dos espectros, a amostra conteve 994 PSM e 556 sequências peptídicas que deram *match* com a informação do banco de dados do NCBI. Os peptídeos demonstraram ser parte da L-aminoácido oxidase BmooLAAO-I (NCBI:AAR31183.1). Esta isoforma obteve um valor de $-10 \log P$ igual a 603,29 e representa 95% do template com 552 peptídeos cobertos, 1832 *de novo tags* e 102 espectros de massa com modificações pós-traducionais (PTMs), como piro-glu E/Q, acetilação, deaminação, carbamilação, dentre outros, além das modificações variadas esperadas de carbamidometilação e oxidação de metionina (Figura 3). Vale destacar que a presente toxina possui 36 (7.5%) de resíduos de aminoácidos que diferem do template, o que reforça que esta toxina pode ser uma nova isoforma da BmooLAAO-I.

Tabela 1. Recuperação proteica das frações purificadas de *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararacussu*.

Fração	<i>Bothrops moojeni</i>		<i>Bothrops jararacussu</i>	
	Proteína (mg)	%	Proteína (mg)	%
Peçonha	200	100	200	100
S1	71,7	36	35	17,5
Ph1	6	3	4	2
Bz2	2,36	1,18	1,36	0,68

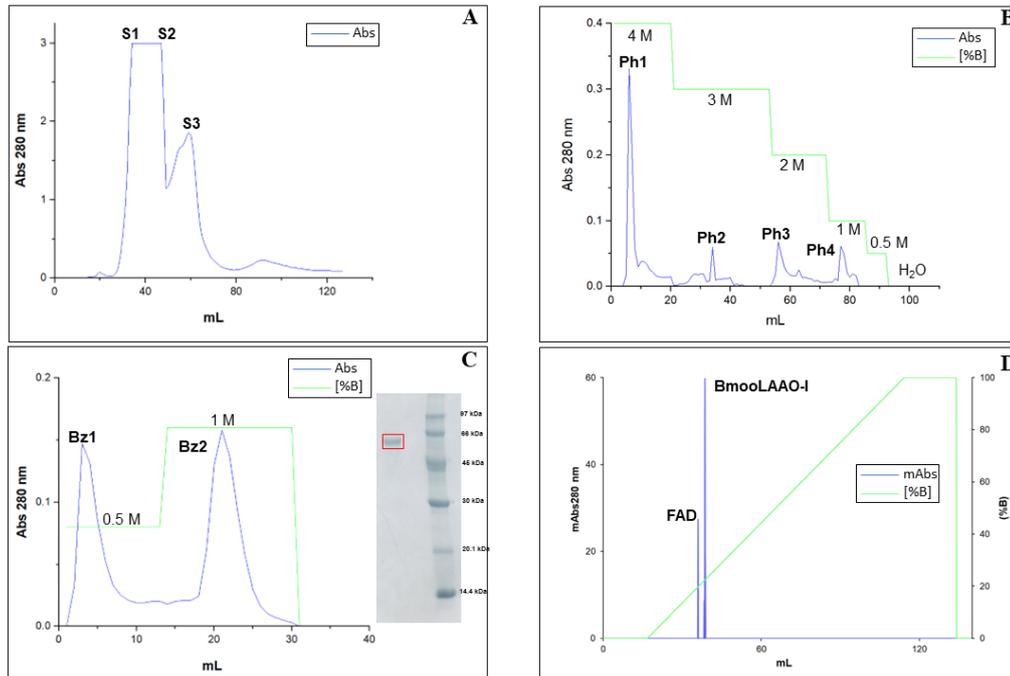


Figura 1. Purificação da BmooLAAO-I da peçonha de *Bothrops moojeni*. **(A)** A peçonha bruta (200 mg) foi diluída em 20 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 150 mM NaCl e fracionada em coluna HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR (GE Healthcare) equilibrada com o mesmo tampão. **(B)** A fração S1 (71,7 mg) foi submetida em coluna HiTrap Phenyl-Sepharose 6 FF (GE Healthcare) equilibrada com 10 mM Tris-HCl pH 7,6 contendo 4 M NaCl e a eluição feita com um gradiente reverso de NaCl (4M a 0 M). **(C)** O pico Ph1 (6 mg) foi aplicado em uma coluna HiTrap Bezamidine HP (GE Healthcare) equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH 7,4 e 0,5 M NaCl combinada com uma eluição sequencial de: 20 mM Tris-HCl pH 7,4 + 0,5 M NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,4 + 1,0 M NaCl; e 50mM glicina-HCl pH 3,0, obtendo o pico ativo Bz2 (2,36 mg). SDS-PAGE (12,5%) em condições desnaturantes corado com Coomassie Brilliant Blue R-350 da BmooLAAO-I (retângulo vermelho) e padrões de massa molecular (GE Healthcare). **(D)** Cromatograma da BmooLAAO-I aplicada em uma coluna C18 operada em HPLC.

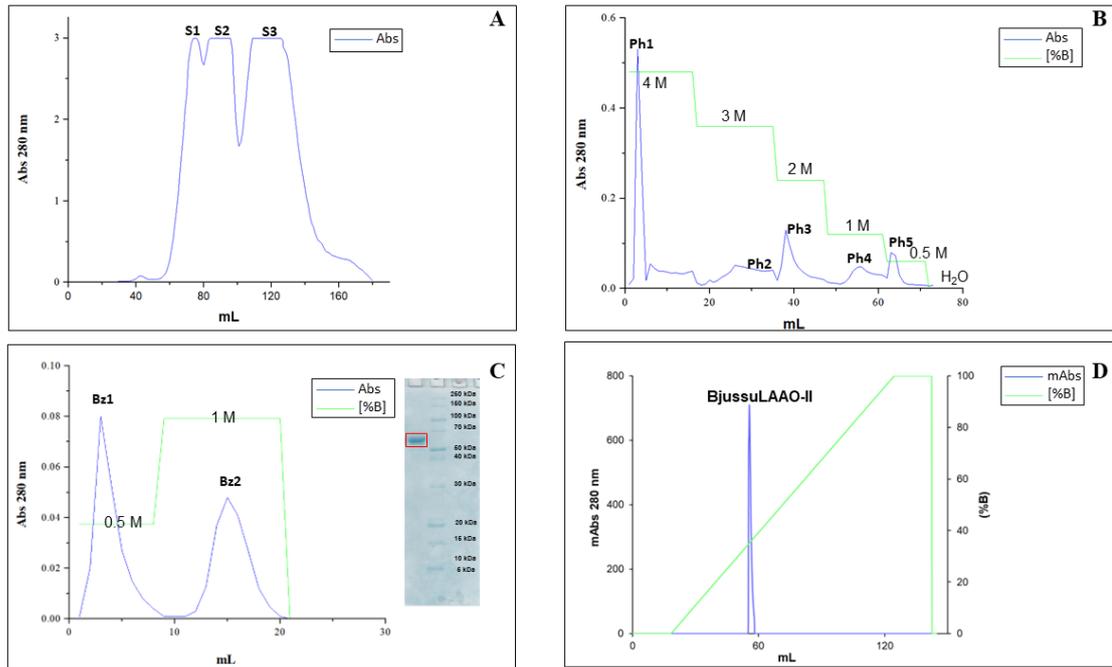


Figura 2. Purificação da BjussuLAAO-II da peçonha de *Bothrops jararacussu*. **(A)** A peçonha bruta (200 mg) foi diluída em 20 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 150 mM NaCl e fracionada em HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR (GE Healthcare) equilibrada com o mesmo tampão. **(B)** A fração S1 (35 mg) foi submetida em coluna HiTrap Phenyl-Sepharose 6 FF (GE Healthcare) equilibrada com 10 mM Tris-HCl pH 7,6 contendo 4 M NaCl e a eluição feita com um gradiente reverso de NaCl (4M a 0 M). **(C)** O pico Ph1 (4 mg) foi aplicado em uma coluna HiTrap Bezamidine HP (GE Healthcare) equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH 7,4 e 0,5 M NaCl combinada com uma eluição sequencial de: 20 mM Tris-HCl pH 7,4 + 0,5 M NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,4 + 1,0 M NaCl; e 50mM glicina-HCl pH 3,0, obtendo o pico ativo Bz2 (1,36 mg). SDS-PAGE (12,5%) em condições desnaturantes corado com Coomassie Brilliant Blue R-350 da BjussuLAAO-II (retângulo vermelho) e padrões de massa molecular (Thermo Fisher Scientific). **(D)** Cromatograma da BjussuLAAO-II aplicada em uma coluna C18 operada em HPLC.

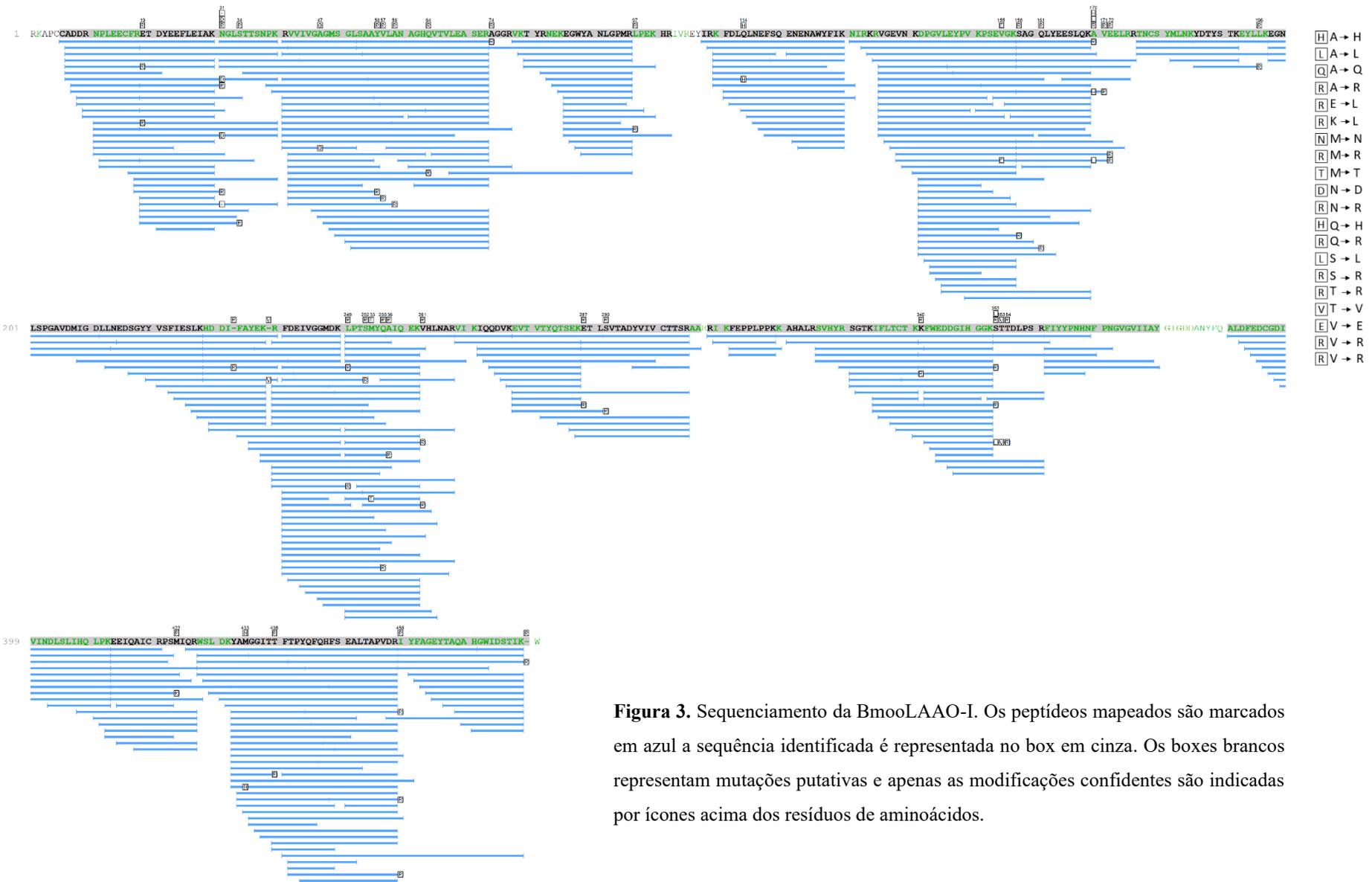


Figura 3. Sequenciamento da BmooLAAO-I. Os peptídeos mapeados são marcados em azul a sequência identificada é representada no box em cinza. Os boxes brancos representam mutações putativas e apenas as modificações confidentes são indicadas por ícones acima dos resíduos de aminoácidos.

4.3. Caracterização estrutural

O alinhamento múltiplo de sequências apontou que a BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II compartilham 89% de identidade na estrutura primária (Figura 4). Além disso, o template CR-LAAO possui uma identidade com a BmooLAAO-I de 81% e BjussuLAAO-II de 83%. Além disso, as proteínas conservam os sítios consenso de glicosilação Asn172 e Asn361 presente em diferentes enzimas cristalizadas (ULLAH et al., 2020).

Os modelos preditos da BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II tiveram uma excelente qualidade estereoquímica. O QMEANDisCo validou os modelos com qualidade de 0,84 e 0,79, respectivamente. O ERRAT indicou uma qualidade geral de 90,5 e 95, respectivamente. O PROCHECK e o MolProbity apontaram uma boa distribuição dos átomos e ângulos torcionais no gráfico de Ramachandran, mostrando que 99,8% e 99,6% dos resíduos da BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II, respectivamente, ocupam regiões permitidas.

A avaliação da estrutura terciária dos modelos revela uma marcante similaridade (Figura 5). As proteínas são organizadas em uma estrutura homodimérica composta pelas cadeias A e B em uma configuração assimétrica. Cada monômero apresenta os três domínios das SV-LAAOs conservados: domínio de ligação ao FAD, domínio de ligação ao substrato e domínio helicoidal. A superposição de todos os átomos e dos $C\alpha$ revelaram um RMSD de 0,105 e 0,078, indicando que estas proteínas possuem um elevado padrão estrutural. Além disso, a BmooLAAO-I possui uma maior superfície que a BjussuLAAO-II, 102.246 \AA^2 e 88.628 \AA^2 , respectivamente. Interessantemente, a distribuição de cargas elétricas mostra que ambas as proteínas possuem uma região marcadamente positiva próxima aos motivo de glicosilação, a qual é mais pronunciada na BmooLAAO-I (36.391 \AA^2) que na BjussuLAAO-II (26.094 \AA^2) (Figura 6).

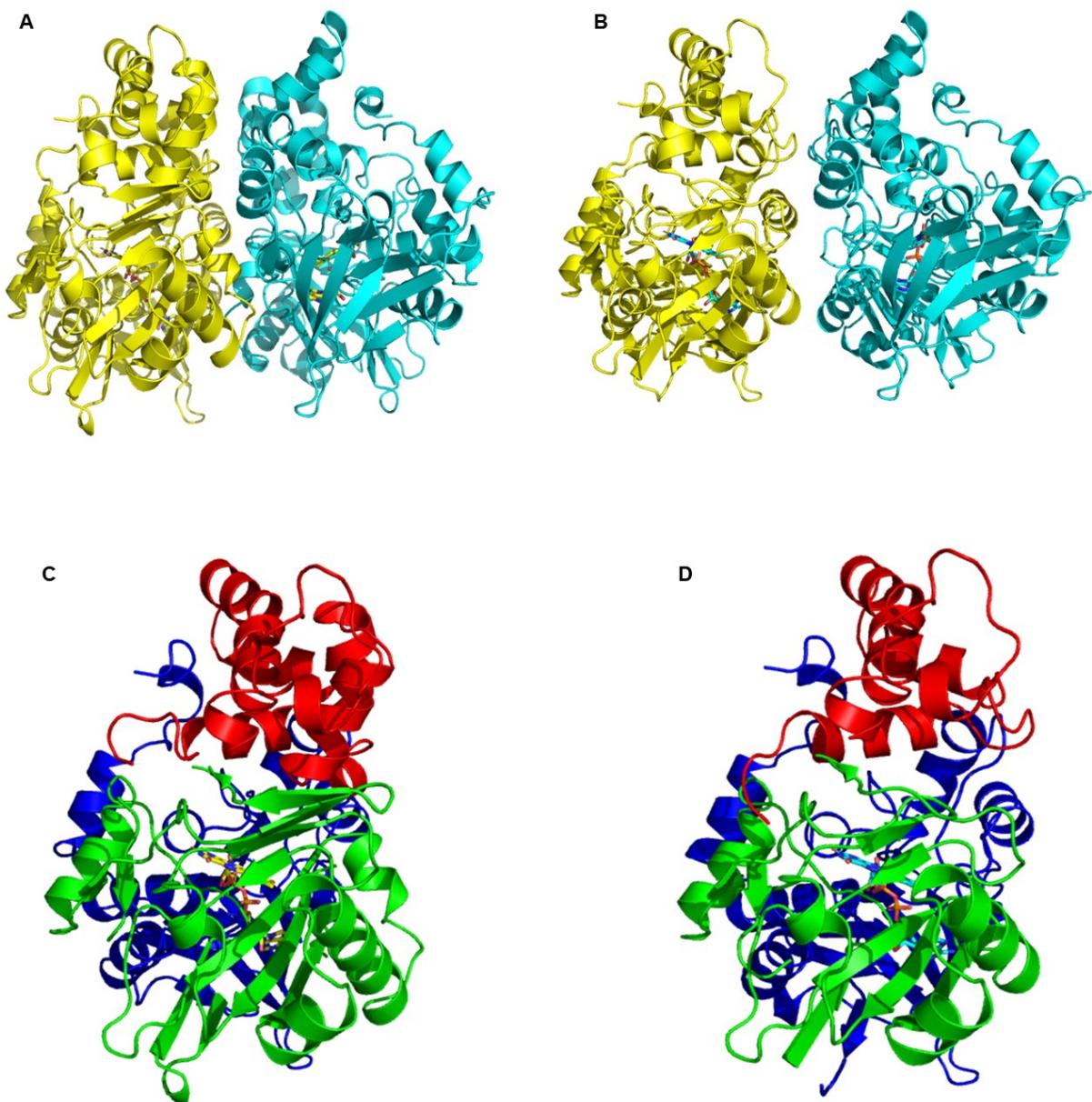


Figura 5. Estrutura dos modelos preditos da BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II a partir da CR-LAAO. **(A)** e **(B)** representação em *cartoon* do dímero da BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II, respectivamente. A cadeia A é colorida em amarelo e a B em ciano. **(C)** e **(D)** Domínios estruturais da BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II, respectivamente. O domínio de ligação ao substrato, o domínio de ligação ao FAD e o domínio helicoidal são marcados respectivamente em verde, azul e vermelho. O FAD é representado na forma de bastões.

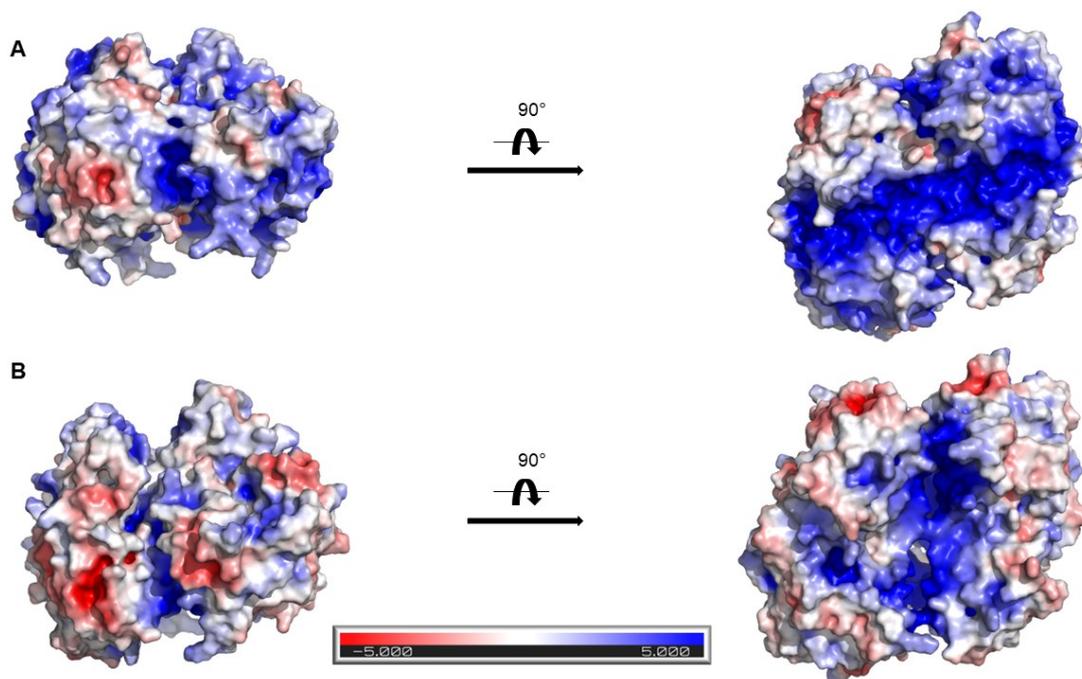


Figura 6. Distribuição de cargas na superfície dos modelos preditos da (A) BmooLAAO-I e (B) BjussuLAAO-II. Em branco, azul e vermelho são marcadas as cargas neutras, positivas e negativas, respectivamente. Os painéis da esquerda correspondem a vista frontal e os da direita a posição inferior.

4.4. Atividade antibacteriana

As cepas bacterianas multirresistentes foram tratadas com diluições seriadas de BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II (variando de 312, 5 a 0,03 $\mu\text{g/mL}$) para avaliação das atividades bacteriostáticas e bactericidas. Em relação aos gram-positivos, as toxinas foram eficientes em controlar o crescimento bacteriano. A BmooLAAO-I apresentou doses bacteriostáticas e bactericidas iguais a 0,12 e 0,24 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus* ATCC BAA44 e isolados clínicos, respectivamente (Tabela 2). Em paralelo, a BjussuLAAO-II obteve valores de CIM e CBM iguais a 0,15 e 0,61 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 2). Já em relação aos gram-negativos, BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II controlaram o crescimento de *E. coli* BAA198 nas doses de 15,6 e 4,88 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, e eliminaram os microrganismos nas concentrações de 62,5 e 4,88 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 2). Os valores de CIM e CBM da BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II sobre *E. coli* (isolado clínico) foram 62,5 e 9,76 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 2). Em resumo, a BmooLAAO-I foi relativamente mais eficiente que a BjussuLAAO-II em eliminar os microrganismos isolados clínicos multirresistentes, enquanto a BjussuLAAO-II teve uma atividade mais proeminente sobre os gram-negativos. Por fim, o controle negativo do solubilizante NH_4HCO_3 10 mM não exerceu atividade (dados não mostrados).

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da BmoLAAO-I e BjussuLAAO-II contra as cepas de bactérias multirresistentes gram-positivas e gram-negativas.

	BmooLAAO-I		BjussuLAAO-II	
	(µg/mL)		(µg/mL)	
	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>S. aureus</i>				
ATCC BAA44	0,12	0,12	0,15	0,61
<i>S. aureus</i>				
Isolado clínico	0,24	0,24	0,15	0,61
<i>E. coli</i>				
ATCC BAA198	15,6	62,5	4,88	4,88
<i>E. coli</i>				
Isolado clínico	62,5	62,5	9,76	9,76

4.5. Ação antibiofilme

A atividade antibiofilme da BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II contra as bactérias multirresistentes foi realizada através da determinação da CIMB₅₀, avaliação da biomassa de biofilme formada e do número de microrganismos viáveis presentes. Em relação a *S. aureus* ATCC BAA44 e isolados clínicos, respectivamente, BmooLAAO-I a 0,195 µg/mL diminuiu a formação de biofilme em 91% e 88% ($P < 0,0001$) e reduziu em -18 e $-14 \log_{10}$ UFC/mL o número de microrganismos (Figuras 7A e B). Em paralelo, BjussuLAAO-II em 0,195 e 0,39 µg/mL, respectivamente, diminuiu o desenvolvimento de biofilme em 50% e 89% ($P < 0,0001$) formado e o número de microrganismos em -6 e $-9 \log_{10}$ UFC/mL o número de bactérias (Figuras 7C e D). Em comparação, o antibiótico vancomicina somente a 0,737 e 1,47 µg/mL, respectivamente, diminuiu em 91% ($P < 0,0001$) a biomassa de biofilme formada e reduziu o número de microrganismos em -15 e $-12 \log_{10}$ UFC/mL (Figuras 7E e F). Em relação a *E. coli* ATCC BAA198 e isolados clínicos, respectivamente, BmoLAAO-I em 100 e 1,56 µg/mL reduziu o biofilme em 65% e 89% ($P < 0,0001$) e diminuiu o número de bactérias em -7 e $-10 \log_{10}$ UFC/mL (Figuras 8A e B). Alternativamente, BjussuLAAO-II a 1,56 µg/mL diminuiu a formação de biofilme em 60% e 53% ($P < 0,0001$) e o número de bactérias em -6 e $-7 \log_{10}$ UFC/mL das linhagens padrão e isolados clínicos, respectivamente (Figuras 8C e D). O antibiótico gentamicina apenas na maior concentração de 5,9 µg/mL reduziu em 70% e 62% ($P < 0,0001$) a biomassa e o número de bactérias em -9 e $-7 \log_{10}$ UFC/mL (Figuras 8E e F).

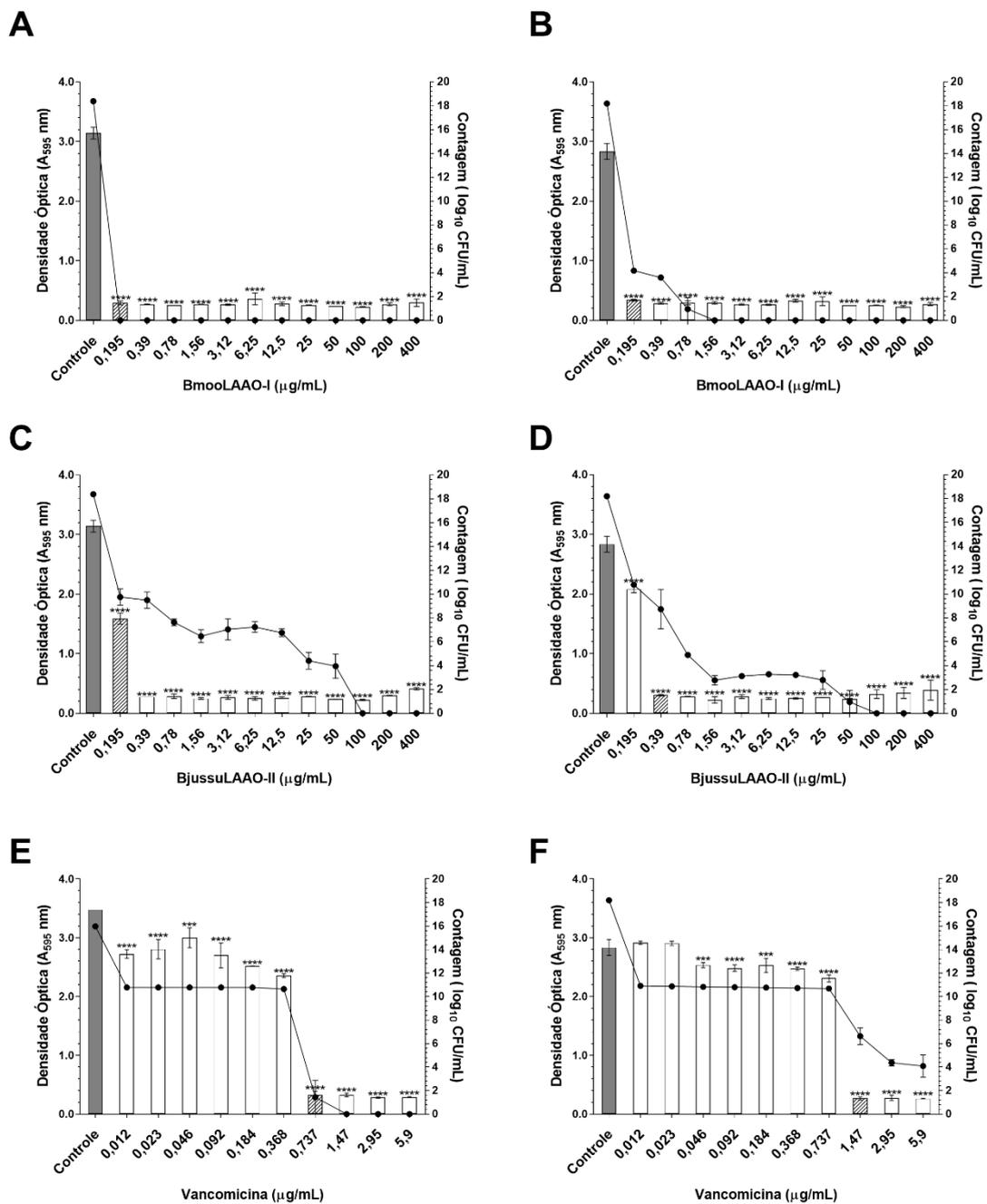


Figura 7. Ação antibiofilme da BmooLAAO-I, BjussuLAAO-II e vancomicina contra linhagens bacterianas multiresistentes ATCCBAA44 e isolados clínicos de *S. aureus*. **(A)**, **(C)** e **(E)** *S. aureus* ATCC BAA44 tratadas com BmooLAAO-I, BjussuLAAO-II e vancomicina, respectivamente. **(B)**, **(D)** e **(F)** *S. aureus* (isolados clínicos) tratada com BmooLAAO-I, BjussuLAAO-II e vancomicina, respectivamente. Os microrganismos foram incubados com diluições seriadas de BmooLAAO-I ou BjussuLAAO-II (variando de 400 a 0,195 µg/mL) por 24 horas. O antibiótico vancomicina (variando de 5,9 a 0,01 µg/mL) foi usada para comparar com o tratamento das biomoléculas. A CIMB₅₀ foi calculada a partir da densidade óptica. Os dados são mostrados como média ± desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. *Comparação entre os tratamentos e o grupo controle (**** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$). As barra hachuradas correspondem aos respectivos valores de CIMB₅₀.

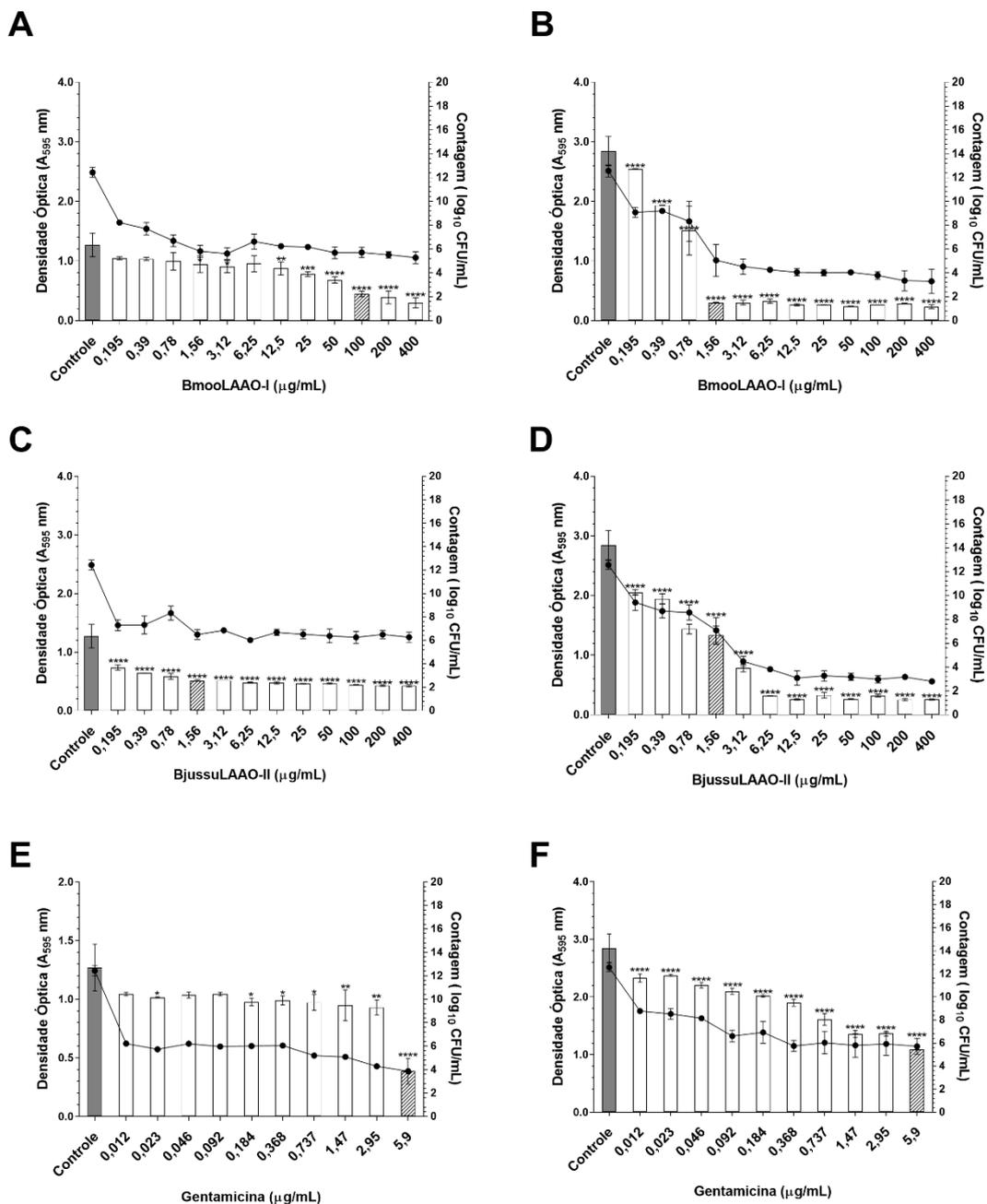


Figura 8. Ação antibiofilme da BmooLAAO-I, BjussuLAAO-II e gentamicina contra linhagens bacterianas multiresistentes ATCC BAA198 e isolados clínicos de *E. coli*. (A), (C) e (E) *E. coli* ATCC BAA44 tratadas com BmooLAAO-I, BjussuLAAO-II e gentamicina, respectivamente. (B), (D) e (F) *E. coli* (isolados clínicos) tratada com BmooLAAO-I, BjussuLAAO-II e vancomicina, respectivamente. Os microrganismos foram incubados com diluições seriadas de BmooLAAO-I ou BjussuLAAO-II (variando de 400 a 0,195 µg/mL) por 24 horas. O antibiótico gentamicina (variando de 5,9 a 0,01 µg/mL) foi usada para comparar com o tratamento das biomoléculas. A CIMB₅₀ foi calculada a partir da densidade óptica. Os dados são mostrados como média ± desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. *Comparação entre os tratamentos e o grupo controle (**** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$). As barra hachuradas correspondem aos respectivos valores de CIMB₅₀.

Com o intuito de corroborar com os resultados prévios, o ensaio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizado para avaliar o impacto da BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II na arquitetura do biofilme e na morfologia das células bacterianas multirresistentes. Brevemente, em relação as linhagens de *S. aureus* ATCC BAA44 e *S. aureus* (isolados clínicos), o tratamento com a concentração inibitória (CIM) de BmooLAAO-I (0,12 e 0,24 µg/mL, respectivamente) e BjussuLAAO-II (0,15 µg/mL) afetou fortemente o formato das células (Figura 9). Além disso, as toxinas reduziram a abundância de matriz e modificaram a arquitetura do biofilme quando comparado com o controle (Figura 9). Em contraste, nas doses sub-inibitórias ($\frac{1}{2}$ CIM) de BmooLAAO-I (0,06 e 0,12 µg/mL, respectivamente) e BjussuLAAO-II (0,075 µg/mL), a substância exopolimérica é mais abundante e o formato das células preservado (Figura 9).

Em relação as linhagens de *E. coli* ATCC BAA198 e *E. coli* (isolados clínicos), os tratamentos com a dose inibitória (CIM) de BmooLAAO-I (15,6 e 62,5 µg/mL, respectivamente) casou ondulações nas células e afetou o aspecto da matriz, com efeitos mais pronunciados, interessante, sobre os patógenos isolados clínicos multirresistentes (Figura 10). Em paralelo, as doses inibitórias (CIM) de BjussuLAAO-II (4,88 e 9,76 µg/mL, respectivamente) intensivamente impactou o formato das bactérias, causando transfigurações e da arquitetura do biofilme (Figura 10). Alternativamente, as doses sub-inibitórias ($\frac{1}{2}$ CIM) de BmooLAAO-I (7,8 e 31,25 µg/mL, respectivamente) e BjussuLAAO-II (2,44 e 4,88 µg/mL, respectivamente) alteraram em menor grau a morfologia das células e o aspecto da matriz se manteve conservado (Figura 10).

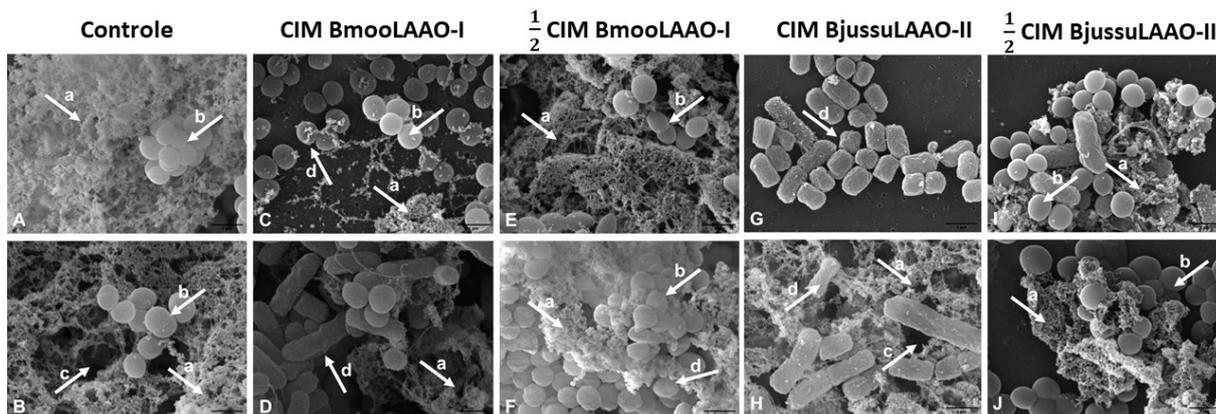


Figura 9. Ensaio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *S. aureus*. Imagens representativas de *S. aureus* ATCC BAA44 (**A**) controle, (**C** e **E**) tratada por 24 horas com inibitórias e sub-inibitórias concentrações de BmooLAAO-I (0,12 e 0,06 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), (**G** e **I**) BjussuLAAO-II (0,15 e 0,075 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Em paralelo, *S. aureus* (isolados clínicos) (**B**) controle, (**D** e **F**) tratada por 24 horas com doses inibitórias e sub-inibitórias de BmooLAAO-I (0,24 e 0,12 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) e (**H** e **J**) BjussuLAAO-II (0,15 e 0,075 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Setas brancas indicam: (a) EPS; (b) integridade celular preservada; (c) canais aquosos; (d) estresse celular. As capturas foram obtidas com magnificação de 40,000 X a 20 kV. O experimento foi realizado em triplicata e campos aleatórios foram examinados. Barra de escala: 1 μm .

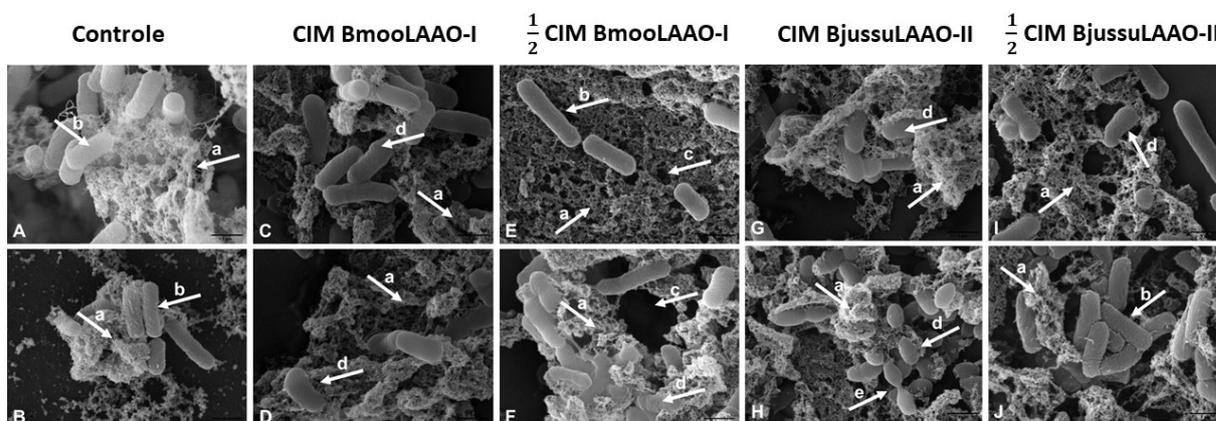


Figura 10. Ensaio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *E. coli*. Imagens representativas de *E. coli* ATCC BAA198 (**A**) controle, (**C** e **E**) tratada por 24 horas com inibitórias e sub-inibitórias concentrações de BmooLAAO-I (15,6 e 7,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), (**G** e **I**) BjussuLAAO-II (4,88 e 2,44 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Em paralelo, *E. coli* (isolados clínicos) (**B**) controle, (**D** e **F**) tratada por 24 horas com doses inibitórias e sub-inibitórias de BmooLAAO-I (62,5 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) e (**H** e **J**) BjussuLAAO-II (9,76 e 4,88 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Setas brancas indicam: (a) EPS; (b) integridade celular preservada; (c) canais aquosos; (d) estresse celular; (e) divisão celular. As capturas foram obtidas com magnificação de 40,000 X a 20 kV. O experimento foi realizado em triplicata e campos aleatórios foram examinados. Barra de escala: 1 μm .

5. DISCUSSÃO

A formação de biofilme representa até 80% de todas as infecções bacterianas e é considerada uma das principais causas de mortalidade nos hospitais (SINGH et al., 2022). *S. aureus* e *E. coli* estão entre as principais espécies bacterianas associadas com a formação de biofilme, causando sérias infecções (SHARMA et al., 2016; IDDESS et al., 2021; BALLÉN et al., 2022). Devido ao crescimento escalonado das infecções bacterianas associadas com a formação de biofilme, existe uma necessidade urgente pela pesquisa de novos e mais efetivos agentes terapêuticos. As biomoléculas extraídas das peçonhas de serpentes evocam atenção devido ao seu potencial biotecnológico (WAHEED et al., 2017; ESTEVÃO-COSTA et al., 2018; EL-AZIZ et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2022). Nesse sentido, o presente estudo avaliou a habilidade de duas LAAOs isoladas das peçonhas de *B. moojeni* e *B. jararacussu* em inibir a formação de biofilme de linhagens multirresistentes de *S. aureus* e *E. coli*.

As peçonhas de *B. moojeni* e *B. jararacussu* possuem duas LAAOs isoladas (FRANÇA et al., 2007; STÁBELI et al., 2007; CARONE et al., 2007; BARBOSA et al., 2021). BmooLAAO-I possui 64,889 kDa e pI igual a 4,7 e BmooLAAO-II 46,6 kDa. Em paralelo, BjussuLAAO-I, determinada por cDNA possui 53,777 kDa e pI de 5,8, enquanto BjussuLAAO-II 60,36 kDa e pI igual a 4,9. BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II foram bioquimicamente caracterizadas e possuem preferência por L-aminoácidos hidrofóbicos, como L-Phe e L-Leu, ampla temperatura (variando de 25 a 75°C) e pH ótimo ~ 7.0 (COSTA et al., 2018). Além disso, estas toxinas apresentam relevantes atividade biológicas, como antimicrobianas, antitumorais, indutoras de agregação plaquetária e imunomoduladoras. (FRANÇA et al., 2007; STÁBELI et al., 2007; CARONE et al., 2007; MACHADO et al., 2019; MACHADO et al., 2019; BURIN et al., 2020; PEREIRA-CROTT et al., 2020; BARBOSA et al., 2021).

No presente estudo, BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II foram isoladas com sucesso por meio de três passos cromatográficos de exclusão molecular, interação hidrofóbica e afinidade. Em geral, esta abordagem tem sido aplicada na purificação de outras SV-LAAOs (PONNUNDURAI et al., 1994; ALVES et al., 2008; SUN et al., 2010; EL-HAKIM et al., 2015; MUKHERJEE et al., 2015; LAZO et al., 2017; TAN et al., 2017). As proteínas purificadas apresentaram alta homogeneidade e migraram como bandas de ~ 64.31 kDa e ~ 60.73 kDa. Além disso, BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II possuem atividade enzimática sobre o substrato L-Leu de 4.136,683 e 5.205,740 U/mg/min, respectivamente.

BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II exibiram um forte efeito bactericida e bacteriostático contra linhagens multirresistentes de *S. aureus* ATCC BAA44, *E. coli* ATCC BAA198 e

isolados clínicos. Interessantemente, as toxinas apresentaram um maior efeito sobre as bactérias gram-positivas do que as gram-negativas. Em concordância com os resultados, MipLAAO, CcLAAO, BsLAAO e CdcLAAO também demonstraram uma ação bacteriostática mais específica sobre os microrganismos gram-positivos (MUNÕZ et al., 2014; HANANE-FADILA & FATIMA, 2014; REY-SUÁREZ et al., 2018). Em adição, BmooLAAO-I previamente estudada exibiu concentração inibitória mínima (CIM) menor sobre *S. aureus* ATCC 25293 do que a *E. coli* ATCC 26648 (STABELI et al., 2007).

Aliado ao efeito sobre as bactérias livres, BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II inibiram fortemente a formação de biofilme de linhagens multirresistentes de *S. aureus* e *E. coli*. Previamente, apenas duas LAAOs foram caracterizadas por possuírem atividade antibiofilme (TONG et al., 2008; DERBY et al., 2018). A LAAO isolada do molusco *Aplysia californica* (Escapin) é capaz de inibir a formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* através, pelo menos em parte, do efeito oxidativo do H₂O₂ sobre o DNA extracelular e intracelular afetando a estabilidade do biofilme e levando a sua desintegração.

O ensaio de microscopia eletrônica de varredura demonstrou que BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II afetam intensamente a morfologia das bactérias, induzindo ondulações, constrições e alongamentos. Em paralelo, corroborando com os resultados, a análise por microscopia eletrônica de transmissão do tratamento da CR-LAAO e CascaLAAO, isoladas da peçonha de *Calloselasma rhodostoma* e *Crotalus durissus cascavella*, também induziram impactos na parede celular de bactérias gram-positivas e modificações na morfologia de microrganismos gram-negativos (TOYAMA et al., 2006; COSTA et al., 2015).

A diferença de efeito sobre as bactérias gram-positivas e gram-negativas pode ser clarificada em função da geração de peróxido de hidrogênio aliado a importantes diferenças composicionais entre estes grupos e por assinaturas estruturais desta classe de toxina.

A atividade antibacteriana de diversas LAAOs foi extensivamente investigada e é creditado em grande parte a geração de peróxido de hidrogênio durante o ciclo catalítico (KASAI et al., 2015). Nas bactérias, os principais agentes antioxidantes das espécies reativas de oxigênio (ROS) são as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (NOURBASKHSH et al., 2022). O H₂O₂ danifica componentes estruturais das bactérias, como proteínas, DNA, lipídios e o peptidoglicano da parede celular, induzindo estresse oxidativo e morte celular (NOURBASKHSH et al., 2022). Os efeitos antimicrobianos de BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II previamente descritos foram dependentes da produção de peróxido de hidrogênio, tendo em vista que a adição de catalase aboliu os efeitos biológicos (FRANÇA et

al., 2007; STÀBELI et al., 2007; CARONE et al., 2017; MACHADO et al., 2019; MACHADO et al., 2019; BARBOSA et al., 2021). Em concordância, outras SV-LAAs tiveram o efeito antibacteriano justificado pela geração de H₂O₂ (HANANE-FADILA & FATIMA, 2014; ZHANG et al., 2004; TOYAMA et al., 2006; VARGAS et al., 2003; MUÑOZ et al., 2014; SAMEL et al., 2008; COSTA et al., 2015; LEE et al., 2011; LAZO et al., 2017; ABDELKAFI-KOUBAA et al., 2021).

A parede celular bacteriana possui um papel especial na vida dos microrganismos, protegendo contra ambientes hostis, modelando o formato das células, providenciando ligantes para adesão celular, fatores de virulência e sítios de ligação para antibióticos (ROHDE, 2019). As bactérias gram-positivas são relativamente porosas e possuem uma parede celular composta de peptidoglicano e ácidos teicóicos (VANTANSEVER et al., 2013). O peptidoglicano é o principal componente e consiste em unidades lineares repetitivas de N-acetilglicosamina (NAG) e N-acetilneuramínico (NAM) conectados por pentapeptídeos (RUDHE, 2019). Os ácidos teicóicos são glicopolímeros que conferem uma carga altamente negativa as paredes celulares dos gram-positivos (RODHE, 2019). A diferença em relação aos gram-negativos se dá pela espessura da camada de peptidoglicano, pelo maior número de unidades conectadas e pela ausência de uma membrana externa (FISCHETTI, 2019; MEGRIAN, 2020). Os gram-negativos possuem uma fina camada de peptidoglicano e uma segunda membrana externamente, composta por lipopolissacarídeos (LPS) que limitam a permeabilidade celular (MEGRIAN 2020; VANTASEVER et al., 2013).

Em relação à estrutura do biofilme, as bactérias gram-positivas e gram-negativas secretam polissacarídeos e proteínas durante a adesão inicial e na maturação (RUHAL & KATERIA, 2021). O DNA extracelular (eDNA) é um importante componente para o desenvolvimento do biofilme e resistência contra antibióticos, em função de sua natureza eletrostática capaz de sequestrar moléculas carregadas positivamente (WILTON et al., 2016). Em *S. aureus*, o principal componente do EPS é a adesina intercelular polissacarídica (PIA) composta por poli-β(1-6)-N-acetilglicosamina (PNAG) que possui uma carga geral negativa e é alvo de motivos positivos (MOORMEIER & BAYLES, 2017; CRAFT et al., 2019; IDRESS et al., 2021). Em paralelo, o biofilme de *E. coli* é formado por três principais exopolissacarídeos, o polímero β(1-6)-N-acetil-D-glicosamina (PGA), celulose e ácido colânico, além de que LPS e polissacarídeos capsulares também podem compor a matriz (SHARMA et al., 2016). O ácido colânico é um polímero de glicose, fucose e ácido glicurônico carregado negativamente (BALLÈN et al., 2022).

Diferentes estudos apontam que os efeitos biológicos das SV-LAAOs são gerados a partir da interação da enzima com a superfície celular e a produção de concentrações localizadas de peróxido de hidrogênio, uma vez que nas doses testadas das proteínas uma baixa concentração de H₂O₂ é produzido (SUR & KIM, 1996; TORII et al., 1997; EHARA et al., 2002; ZHANG et al., 2004; LEE et al., 2011. ABDELKAFI-KOUBAA et al., 2016). Foi verificado por meio de ensaios de fluorescência que a LAAO de *Agkistrodon halys* se liga a superfície de células bacterianas e de leucemia linfocítica de camundongos (SUHR & KIM, 1996; ZHANG et al., 2004). Em adição, foi defendido que a LAAO Apoxin-1 de *Crotalus atrox* induz apoptose de linhagem tumoral por meio do acúmulo de H₂O₂ na membrana plasmática (TORII et al., 1997). Através de ensaios de imunquímicos, verificou-se que a CC-LAAO de *Cerastes cerastes* foi capaz de se ligar a superfícies de células tumorais e bacterianas (ABDELKAFI-KOUBAA et al., 2016). Em paralelo, foi apontado que a LAAO Achacin de *Achatina fulica* Férussac e *Ophiophagus hannah* se ligam a superfícies de bactérias gram-positivas e gram-negativas (EHARA et al., 2002; LEE et al., 2011).

A habilidade de ligação às superfícies celulares e bacterianas pode ser mediado pelo motivo glicano (SUHR E KIM, 1996; TORII et al., 1997; GEYER et al., 2001; EHARA et al., 2002; ANDE et al., 2006; LEE et al., 2011; ABDELKAFI-KOUBAA et al., 2016; ULLAH et al., 2020). As SV-LAAOs possuem uma variável composição de glicanos, apesar de que os resíduos de N-acetilglicosamina, fucose, manose, galactose e ácido siálico estão comumente presentes (COSTA et al., 2018). A CR-LAAO, por exemplo, possui açúcares N-ligados aos resíduos de Asn172 e Asn361 correspondente a quatro N-acetilglicosamina, três manose, duas galactose, dois ácidos neuramínicos e três resíduos de fucose (GEYER et al., 2001). Foi apontado que a interação da CR-LAAO por meio dos motivos glicanos com alvos na superfície celular medeia os efeitos biológicos (GEYER et al., 2001). Somado a isso, em simulação molecular entre SV-LAAOs e superfícies de membranas, foi verificado que estas proteínas interagem por meio dos resíduos presentes no loop do domínio de ligação ao FAD e pelo motivo N-glicosilado (ULLAH et al., 2020). Nas SV-LAAOs, o motivo glicano encontra-se localizado próximo ao túnel de entrada de O₂ e saída de H₂O₂, sendo conectado com a alta concentração de peróxido de hidrogênio gerado a partir do ancoramento às superfícies celulares (SUHR E KIM, 1996; TORII et al., 1997; GEYER et al., 2001; EHARA et al., 2002; ANDE et al., 2006; LEE et al., 2011; ABDELKAFI-KOUBAA et al., 2016; ULLAH et al., 2020).

Estas importantes características contribuem para um melhor entendimento dos efeitos antibacterianos da BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II. Nesse sentido, a diferença de efeito sobre

as bactérias livres gram-positivas e gram-negativas pode ser explicado, pelo menos em parte, em função da favorável interação entre os resíduos de carboidratos com a camada de peptídeo glicano espesso e exposto das gram-positivas. Em adição, a alta concentração de cargas positivas próxima aos sítios de glicosilação pode ter um efeito estabilizante na interação com a densidade de cargas negativas da parede celular das bactérias gram-positivas. BmooLAAO-I e a BjussuLAAO-II foram bioquimicamente caracterizadas e possuem diferentes composições de açúcares e sítios de N-glicosilação (COSTA et al., 2018). BmooLAAO-I apresenta três sítios compostos por 7,58, 7,94 e 8,47 unidades de glicose capilar (CGU), enquanto a BjussuLAAO-II apenas dois sítios 7,78 e 8,31 CGU (COSTA et al., 2018). Além disso, a BmooLAAO-I possui uma maior área carregada positivamente próximo aos sítios de glicosilação do que a BjussuLAAO-II. Estas diferenças fundamentais na estrutura das proteínas podem impactar a força e afinidade de ligação nas superfícies das bactérias, afetando a atividades bacteriostáticas e bactericidas, refletindo em diferentes concentrações bacteriostáticas e bactericidas. Em adição, é importante considerar que as bactérias clinicamente isoladas apresentam mutações que alteraram o grau e a natureza dos açúcares (KIM et al., 2015; HORT et al., 2021), podendo afetar esta interação com a superfície celular.

Em relação aos proeminentes efeitos antibiofilme, os exopolissacarídeos e o eDNA podem estar conectados com os efeitos da BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II sobre a matriz, levando a uma produção localizada de peróxido capaz de induzir estresse oxidativo na comunidade de microrganismos e na estrutura do EPS, inibindo o desenvolvimento do biofilme. A capacidade de eliminar as células persistentes, responsáveis pela alta tolerância aos antibióticos e evasão da resposta imune (BALLÉN et al., 2022), é uma valiosa característica destas biomoléculas na inibição da formação de biofilme por bactérias multirresistentes.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho revelou importantes propriedades antibacterianas e antibiofilme de L-aminoácido oxidases (LAAOs) isoladas das peçonhas das espécies de serpentes *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararacussu* sob cepas bacterianas multirresistentes de *S. aureus* e *E. coli*. As biomoléculas isoladas possuem uma potente ação bacteriostática e bactericida sobre os microrganismos planctônicos. Em adição, as enzimas possuem um proeminente efeito em inibir a formação de biofilme de bactérias multirresistentes. A diferença de efeito entre os gram-positivos e gram-negativos está correlacionado as características estruturais das proteínas e da composição da parede celular bacteriana da substância extracelular do biofilme. Os resíduos de

açúcares e a distribuição de cargas pode favorecer a interação das biomoléculas com as bactérias e com a substância extracelular polimérica. Os resultados do presente estudo apontam para o potencial biotecnológico dos componentes das peçonhas de serpentes e são importantes para o desenvolvimento de novos e mais efetivos agentes contra as infecções bacterianas relacionadas com a formação de biofilme.

7. REFERÊNCIAS

ABDELKAFI-KOUBAA, Z. et al. Interaction of a snake venom L-amino acid oxidase with different cell types of membrane. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 82, pp. 757-764, 2016.

ALMEIDA, D. D. et al. The complete mitochondrial genome of *Bothrops jararaca*. **Mitochondrial DNA**, Part B, vol. 1, n. 1, pp. 907-908, 2016.

ALMEIDA, D. D. et al. Tracking the recruitment and evolution of snake toxins using the evolutionary context provided by the *Bothrops jararaca* genome. **PNAS**, vol. 118, n. 20, 2021.

ALVES, R. M. et al. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, vol. 151, pp. 542-550, 2008.

ANDE, S. R. et al. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, vol. 11, pp. 1439-1451, 2006.

ANDRADE-SILVA, D. et al. Venom Profiling of the Insular Species *Bothrops alcatraz*: Characterization of Proteome, Glycoproteome, and N-Terminome Using Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates. **Journal of Proteome Research**, vol. 10, pp. 1341-1358, 2021.

ASSIS, L. R. et al. Antibacterial Activity of Isobavachalcone (IBC) Is Associated with Membrane Disruption. **Membranes**, vol. 12, n. 269, 2022.

BALLÉN, V. et al. Clinical *Escherichia coli*: From Biofilm Formation to New Antibiofilm Strategies. **Microorganisms**, vol. 10, n. 1103, 2022.

BARBOSA, L. G. et al. A comparative study on the leishmanicidal activity of the L-amino acid oxidases BjuusuLAAO-II and BmoolLAAO-II isolated from Brazilian *Bothrops* snake venoms. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 167, pp. 267-278, 2021.

BORDON, K. C. F. et al. Bordonein-L, a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus terrificus* snake venom: Isolation, preliminary characterization and enzyme stability. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, vol. 21, 2015.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, vol. 72, n. 1-2, pp. 248-254, 1976.

CARONE, S. E. I. et al. A new L-amino acid oxidase from *Bothrops jararacussu* snake venom: Isolation, partial characterization, and assessment of pro-apoptotic and antiprotozoal activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 103, pp. 25-35, 2017.

CASEWELL, N. R. et al. Causes and Consequences of Snake Venom Variation. **Trends Pharmacological Sciences**, vol. 41, n. 8, pp. 570-581, 2020.

CHEUNG, G. Y. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, vol. 12, n. 1, pp. 547-569, 2021.

CIOFU, O. et al. Antibiotic treatment of biofilm infections. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, vol. 125, pp. 304-319, 2017.

CLSI. M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 9 ed. 2012.

COLOVOS, C. & YEATES, T. O. Verification of protein structure: patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, vol.9, pp. 1511-1519, 1993.

COSTA, T. R. et al. Evaluating the microbicidal, antiparasitic and antitumor effects of CR-LAAO from *Calloselasma rhodostoma* venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 80, pp. 489-497, 2015.

COSTA, T. R. Kinetic investigations and stability studies of two *Bothrops* L-amino acid oxidases. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, vol. 24, 2018.

CRAFT, K. M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. **Medicinal Chemical Communications**, vol. 10, n. 1231, 2019.

DERBY, C. D. et al. Molecules and Mechanisms Underlying the Antimicrobial Activity of Escapin, an L-Amino Acid Oxidase from the Ink of *Sea Hares*. **Biological Bulletin**, vol. 235, n. 1, pp. 52-61, 2018.

DU, X. et al. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, vol. 40, pp. 659-665, 2002.

EHARA, T. et al. Antimicrobial action of Achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. **FEBS Letters**, vol. 531, pp. 509-512, 2002.

EL HAKIM, A. E. et al. Heterodimeric L-amino acid oxidase enzymes from Egyptian *Cerastes cerastes* venom: Purification, biochemical characterization and partial amino acid sequencing. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, vol. 13, pp. 165-176, 2015.

EL-AZIZ, A. et al. Advances in venomics: Modern separation techniques and mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2020.

EL-AZIZ, T. M. A. et al. Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving. **Toxins**, vol. 11, n. 564, 2019.

ESTEVIÃO-COSTA, M. et al. Snake venom components in medicine: From the symbolic rod of Asclepius to tangible medical research and application. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, vol. 104, pp. 94-113, 2018.

FELICIANO, P. R. et al. Crystal structure and molecular dynamics studies of L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox*. **Toxicon**, vol. 15, n. 128, pp. 50-59, 2017.

FISCHETTI, V. A. Surface Proteins on Gram-Positive Bacteria. **Microbiology Spectrum**, vol. 7, n. 4, 2019.

FOX, J. W.; SERRANO, M. T. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analysis for complex toxin mixtures. **Proteomics**, vol. 8, pp. 909-920, 2008.

FRANÇA, S. C. et al. Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops* L-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 355, pp. 302-306, 2007.

FRANGIEH, J. et al. Snake Venom Components: Tools and Cures to Target Cardiovascular Diseases. **Molecules**, vol. 26, n. 2223, 2021.

GEYER, A. et al. Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **European Journal of Biochemistry**, vol. 268, pp. 4044-4053, 2001.

GUO, C. et al. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, vol. 60, pp. 302-311, 2012.

GUTIÉRREZ, J. M; RUCAVADO, A. Snake Venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, vol 82, pp. 841-850, 2000.

HAN, Y. et al. SPIDER: SOFTWARE FOR PROTEIN IDENTIFICATION FROM SEQUENCE TAGS WITH DE NOVO SEQUENCING ERROR. **Journal of Bioinformatics and Computational Biology**, vol. 3, n. 3, pp. 697-716, 2005.

HANANE-FADILA, Z.; FATIMA, L. Purification, Characterization and Antibacterial Activity of L-amino Acid Oxidase from *Cerastes cerastes*. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*, vol. 00, n. 00, 2014.

HØIBY, N. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol. 35, pp. 322-332, 2010.

HORT, M. The role of beta-Glycosylated Wall Teichoic Acids in the Reduction of Vancomycin Susceptibility in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. **Microbiology Spectrum**, vol. 9, 2021.

HUANG, H. et al. Cobra venom proteome and glycome determined from individual snakes of *Naja atra* reveal medically important dynamic range and systematic geographic variation. **Journal of Proteomics**, vol. 128, pp. 92-104, 2015.

HUGHES, G.; WEBBER, M. A. Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. **British Journal of Pharmacology**, vol. 174, pp. 2237-2246, 2017.

IDRESS, M. et al. *Staphylococcus aureus* Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, vol. 18, 2021.

IZIDORO, L. F. M. et al. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 14, pp. 7034-7043, 2006.

IZIDORO, L. F. M. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: Trends in pharmacology and biochemistry. **BioMed Research International**, 2014.

JAMAL, M, et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of Chinese Medical Association**, vol. 81, pp. 7-11, 2018.

KASAI, K. et al. Antibacterial properties of L-amino acid oxidase: mechanisms of action and perspectives for therapeutic applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 99, pp. 7837-7857, 2015.

KIM, M. S. et al. Phage-Encoded Colanic Acid-Degrading Enzyme Permits Lytic Phage Infection of a Capsule-Forming Resistant Mutant *Escherichia coli* Strain. **Applied Environmental Microbiology**, vol. 81, pp. 900-909, 2014.

KWIECINSKI, J. M. & HORSWILL, A. R. Staphylococcus aureus bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. *Current Opinion in Microbiology*, vol. 53, pp. 51-60, 2020.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, vol. 227, pp. 680-685, 1970.

LAKHUNDI, S. & ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 31, n. 4, 2018.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHEK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, vol. 26, pp. 283-291, 1993.

LAZO, F. et al. Biochemical, biological and molecular characterization of an L-Amino acid oxidase (LAAO) purified from *Bothrops pictus* Peruvian snake venom. **Toxicon**, vol. 139, pp. 74-86, 2017.

LEE, M. L. et al. Antibacterial Action of a heat stable form of L-amino acid oxidase isolated from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, vol. 153, pp. 237-242, 2011.

LOMONTE, B. et al. The Phospholipase A2 Homologues of Snake Venoms: Biological Activities and Their Possible Adaptative Roles. **Protein & Peptide Letters**, vol. 16, pp. 860-876, 2009.

LU, W. et al. Biochemical, functional and structural characterization of Akbu-LAAO: A novel snake venom L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Biochimie**, vol. 213, pp. 311-320, 2018.

LUTHY, R. et al. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, vol. 6354, pp. 83-95, 1992.

MA, B. et al. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, vol. 17, pp. 2337-2352, 2003.

MACHADO, A. R. T. et al. BjuussLAAO-II induces cytotoxicity and alters DNA methylation of cell-cycle genes in monoculture/co-cultured HepG2 cells. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, vol.25, 2019.

MACHADO, A. R. T. et al. Cytotoxic, genotoxic, and oxidative stress-inducing effect of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararacussu* venom in a co-culture model of HepG2 and HUVEC cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 127, pp. 425-432, 2019.

MADEIRA, F. et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools. **Nucleic Acids Research**, vol. 47, pp. 636-641, 2019.

MARKLAND JR, F. S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, vol. 62, pp. 3-18, 2013.

MEGRAN, D. et al. One or two membranes? Diderm Firmicutes challenge the Gram-positive/Gram-negative divide. **Molecular Microbiology**, vol. 113, pp. 659-671, 2020.

MELO, R. T. Intrinsic and extrinsic aspects on *Campylobacter jejuni* Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, vol. 8, 2017.

MITTAL, S. et al. Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. **Pathogens and Global Health**, vol. 109, n. 1, 2015.

MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. **Molecular Microbiology**, vol. 104, n. 3, pp. 365-376, 2017.

MOUSTAFA, I. M. et al. Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: insight into structure and mechanism. **Journal of Molecular Biology**, vol. 15, pp. 991-1002, 2006.

MUKHERJEE, A. K. et al. Apoptosis induction in human breast cancer (MCF-7) cells by a novel venom L-amino acid oxidase (Rusvinoxidase) is independent of its enzymatic activity and is accompanied by caspase-7 activation and reactive oxygen species production. **Apoptosis**, vol. 20, pp. 1358-1372, 2015.

MUNAWAR, A. et al. Snake Venom Peptides: Tools of Biodiscovery. **Toxins**, vol. 10, n. 474, 2018.

MUÑOZ, L. J. V. et al. Characterization and cDNA sequence of *Bothriechis schlegelii* L-amino acid oxidase with antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 69, pp. 200-207, 2014.

NOURBAKHSH, F. et al. Bacterial biofilms and their resistance mechanisms: a brief look at treatment with natural agents. **Folia Microbiologica**, 2022.

OJEDA, P. G. et al. Computational Studies of Snake Venom Toxins. **Toxins**, vol. 10, n. 8, 2018.

OLIVEIRA, A. L. et al. The chemistry of snake venom and its medicinal potential. **Nature Reviews**. 2022.

PAIVA, R. M. A. et al. Cell cycle arrest evidence, parasiticidal and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochimie**, vol. 9, pp. 941-947, 2011.

PALOSCH, M. V. et al. An Update on Potential Molecular Mechanisms Underlying the Actions of Snake Venom L-amino Acid Oxidases (LAAOs). **Current Medicinal Chemistry**, vol. 25, pp. 2520-2530, 2018.

PAWELEK, P. D. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. **EMBO Journal**, vol. 19, pp. 3204-4215, 2000.

PEREIRA-CROTT, L. S. Bothrops moojeni venom and BmooLAAO-I downmodulate CXCL8/IL-8 and CCL2/MCP-1 production and oxidative burst response, and upregulate CD11b expression in human neutrophils. **International Immunopharmacology**, vol. 80, 2020.

PLA, D. et al. Proteomic analysis of venom variability and ontogeny across the arboreal palm-pitvipers (genus *Bothriechis*). **Journal of Proteomics**, vol. 152, pp. 1-12, 2017.

POIREL, L. et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, vol. 6, n. 4, 2018.

PONNUNDURAI, G. et al. Purification and Properties of the L-Amino Acid Oxidase from Malayan Pit Viper (*Calloselasma rhodostoma*) Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 313, pp. 373-378, 1994.

POZO, J. L. D. Biofilm-related disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, 2017.

RABIN, N. et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, vol. 7, n. 4, pp. 493-512, 2015.

REY-SUÁREZ, P et al. MipLAAO, a new L-amino acid oxidase from the redbellied coral snake *Micrurus mipatitus*. **PeerJ**, vol. 6, 2018.

ROHDE, M. The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. **Microbiology Spectrum**, vol. 7, n. 3, 2019.

ROY, R. et al. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Taylor & Francis**, vol. 9, n. 1, pp. 522-554, 2018.

RUHAL, R. & KATARIA, R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. **Microbiological Research**, vol. 251, 2021.

SAMEL, M. et al. L-Amino acid oxidase from *Naja Naja oxiana* venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, vol. 149, pp. 572-580, 2008.

SAMY, R. P. In vitro antimicrobial activity of natural toxins and animal venoms tested against *Burkholderia pseudomallei*. **BioMed Central Infectious Diseases**, vol. 6, n. 100, 2006.

SANTOS, A. C. M. et al. Virulence Potential of a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strain Belonging to the Emerging Clonal Group ST101-B1 Isolated from Bloodstream Infection. **Microorganisms**, vol. 8, n. 827, 2020.

SHARMA, G. et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 121, pp. 309-319, 2016.

SIEVERS, F. & HIGGINS, D. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. **Protein Science**, vol. 27, pp. 135-145, 2018.

SIMIZO, A. et al. Comparative gender peptidomics of *Bothrops atrox* venoms: are there differences between them? **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, vol. 26, pp. 2-17, 2020.

SINGH, A. et al. Bacterial biofilm infections, their resistance to antibiotics therapy and current treatment strategies. **Biomedical Materials**, vol. 17, 2022.

SKARNES, R. C. L-Amino-acid Oxidase, a Bactericidal System. **Nature**, vol., 225, pp. 1071-1073, 1970.

STÁBELI, R. G. et al. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 41, pp. 132-140, 2007.

STÁBELI, R. G. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 12, pp. 2881-2886, 2004.

STUDER, G. et al. QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. **Bioinformatics**, vol. 36, pp. 1765-1771, 2020.

SUHR, S. & KIM, D. Identification of the Snake Venom Substance That Induces Apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 224, pp. 134-139, 1996.

SUN, M. Z. et al. Biochemical, functional and structural characterization of Akbu-LAAO: A novel snake venom L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Biochimie**, vol. 92, pp. 343-349, 2010.

SUR, S. & KIM, D. Identification of the Snake Venom Substance That Induces Apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 224, pp. 134-135, 1996.

TAN, C. H. Snake Venomics: Fundamentals, Recent updates, and a Look to the Next Decade. **Toxins**, vol. 14, n. 247, 2022.

TAN, K. K. et al. In vitro cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of *Crotalus mitchellii pyrrhus*. **Toxicon**, vol. 139, pp. 20-30, 2017.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. **Toxins**, vol. 9, n. 290, 2017.

TOLKER-NIELSEN, T. Biofilm Development. **Microbiology Spectrum**, vol. 3, n. 2, 2015.

TONG, H. et al. SO-LAAO, a novel L-amino acid oxidase that enables *Streptococcus oligofermentans* to outcompete *Streptococcus mutans* by generating H₂O₂ from peptone. **Journal of Bacteriology**, vol. 190, pp. 4716-4721, 2008.

TORII, S et al. Apoxin I, a Novel Apoptosis-inducing Factor with L-Amino Acid Oxidase Activity Purified from Western Diamondback Rattlesnake Venom. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 272, n. 14, pp. 9539-9542, 1997.

TORRES, A. F. C. et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, vol. 55, pp. 784-804, 2010.

TOYAMA, M. H. et al. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, vol. 47, pp. 26-57, 2006.

ULLAH, A. Structure-Function Studies and Mechanism of Action of Snake Venom L-Amino Acid Oxidases, **Frontiers in Pharmacology**, vol. 11, 2020.

VALENTE, R. H. et al. *Bothrops jararaca* accessory venom gland is an ancillary source of toxins to the snake. **Journal of Proteomics**, vol. 177, pp. 137-147, 2008.

VARGAS, L. D. et al. Cloning and characterization of an antibacterial L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cumanensis* venom. **Toxicon**, vol. 64, pp. 1-11, 2013.

VATANSEVER, F. et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species - bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 37, 2013.

VENKATESAN, N. et al. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. **Future Microbiology**, 2015.

VIEIRA, R. et al. In vitro studies of the antibacterial activity of *Copaifera* spp. oleoresins, sodium hypochlorite, and peracetic acid against clinical and environmental isolates recovered from a hemodialysis unit. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, vol. 7, n. 14. 2018.

VIEIRA, R. G. L. et al. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 7, 2018.

WAHEED, H. et al. Snake Venom: From Deadly toxins to Life-saving Therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 14, pp. 1874-1891-2017.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, vol. 46, pp. 296-303, 2018.

WEI, G. X. et al. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 57, pp. 1100-1109, 2006.

WILLIAMS, C. J. et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Science**, vol. 27, pp. 293-315, 2018.

WILSON, J. W. Bacterial Pathogens. **Infectious Complications in Cancer Patients, Cancer Treatment and Research**, vol. 161, 2014.

WILTON, M. et al. Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 60, pp. 544-553.

WU, H et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, vol. 7, pp. 1-7, 2014.

ZELANIS, A. et al. N-glycome profiling of *Bothrops jararaca*. **Journal of Proteomics**, vol. 75, pp. 774-782, 2012.

ZELANIS, A. et al. Proteomic identification of gender molecular markers in *Bothrops jararaca* venom. **Journal of proteomics**, vol. 139, pp. 26-37, 2016.

ZHANG, H. et al. Hydrogen Peroxide produced by two Amino Acid Oxidases Mediates Antibacterial Actions. **The Journal of Microbiology**, vol. 41, n. 4, pp. 336-339, 2004.

ZHANG, H. et al. Purification, partial characterization, crystallization and structural determination of AHP-LAAO, a novel L-amino-acid oxidase with cell apoptosis-inducing activity from *Agkistrodon halys pallas* venom. **Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography**, vol. 60, pp. 974-977, 2004.

ZHONG, S. et al. Purification and characterization of a new L-amino acid oxidase from *Daboia russelli siamensis* venom. **Toxicon**, vol. 54, pp. 764-771, 2009.