



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

TESE DE DOUTORADO

ISOLAMENTO E PROSPECÇÃO DE EFEITOS BIOLÓGICOS DE PEPTÍDEOS DERIVADOS  
DA ENZIMA L-AMINOÁCIDO OXIDASE DO VENENO DA SERPENTE *CROTALUS*  
*DURISSUS TERRIFICUS*

**Aluno:** Leonardo Melo

**Orientador:** Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta

**Coorientador:** Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

Botucatu  
2025



LEONARDO MELO

**ISOLAMENTO E PROSPECÇÃO DE EFEITOS BIOLÓGICOS DE PEPTÍDEOS  
DERIVADOS DA ENZIMA L-AMINOÁCIDO OXIDASE DO VENENO DA SERPENTE  
*CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do  
título de Doutor em Doenças Tropicais na área de  
conhecimento Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta

**Coorientador:** Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior

Botucatu  
2025

M528i      Melo, Leonardo  
              Isolamento e prospecção de efeitos biológicos de peptídeos  
              derivados da enzima l-amino-oxidase do veneno da serpente *Crotalus*  
              *durissus terrificus* / Leonardo Melo. -- Botucatu, 2025  
              68 p. : il., tabs.

              Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),  
              Faculdade de Medicina, Botucatu  
              Orientadora: Daniel Carvalho Pimenta  
              Coorientadora: Rui Seabra Ferreira Junior

              1. Bioquímica. 2. Toxinologia. 3. Serpentes. 4. Peptídeos. 5.  
              Antimicrobianos. I. Título.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE LEONARDO MELO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS, DA FACULDADE DE MEDICINA.**

Aos 27 dias do mês de agosto do ano de 2025, às 8h, no(a) Via sistemas de videoconferência e outras ferramentas para comunicação a distância, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de LEONARDO MELO, intitulada **Isolamento e prospecção de efeitos biológicos de peptídeos derivados da enzima L-aminoácido oxidase do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus***. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. DANIEL CARVALHO PIMENTA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Laboratório de Bioquímica e Biofísica / Instituto Butantan - São Paulo, Profa. Dra. LAUDICÉIA ALVES DE OLIVEIRA (Participação Virtual) do(a) Shimadzu do Brasil, Profa. Dra. NATALIA GABRIELLY PEREIRA DOS SANTOS (Participação Virtual) do(a) Depto. de Bioquímica / Instituto Butantan - São Paulo, Prof. Dr. ANDREIMAR MARTINS SOARES (Participação Virtual) do(a) Fundação Oswaldo Cruz - Unidade de Rondônia, Prof. Dr. MURILO ÁLISON VIGILATO RODRIGUES (Participação Virtual) do(a) Comissão Nacional de Energia Nuclear / Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão

Prof. Dr. DANIEL CARVALHO PIMENTA

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, que nunca permitiram que eu desistisse dos meus sonhos e sempre me apoiaram, mesmo nas ideias mais malucas.

Ao Felipe, que esteve presente desde o primeiro dia, na entrega dos documentos. Agradeço por toda sua paciência e compreensão nos momentos de estresse, e por toda a ajuda e apoio ao longo desta jornada.

Aos amigos da pós-graduação, aos servidores e técnicos do CEVAP — pessoas por quem tenho enorme carinho — que sempre estiveram por perto, me acolheram e compartilharam comigo todos os momentos, sejam eles fáceis ou difíceis.

Um agradecimento mais que especial ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta, por me acolher como aluno, por todo o suporte, dedicação, entusiasmo, pelos ensinamentos valiosos e por ser, acima de tudo, uma inspiração profissional.

Ao meu coorientador, Rui Seabra, pela parceria, pelas inúmeras oportunidades e por todo o conhecimento generosamente compartilhado.

À Dra. Luciana Curtolo de Barros, pela contribuição fundamental a este trabalho e por sua presença constante nos experimentos, especialmente nos momentos mais desafiadores do desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores do laboratório de Microbiologia do Instituto Butantan, parceiros que colaboraram com grande generosidade e contribuíram de forma significativa para a realização deste trabalho e para minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro concedido ao longo deste doutorado.

Aos meus amigos, e a todos que, de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho, minha mais sincera e eterna gratidão.

E, por fim, agradeço a Deus, por ser sempre aquele em quem posso confiar

## RESUMO

O isolamento e a caracterização de enzimas derivadas de venenos ofídicos têm se mostrado estratégias promissoras na descoberta de novas moléculas bioativas com aplicações farmacológicas, especialmente no combate a infecções causadas por microrganismos multirresistentes. Dentre os componentes do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, destacam-se as L-aminoácido oxidases (LAAOs), reconhecidas por sua atividade catalítica tradicionalmente associada à produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e, conseqüentemente, à indução de estresse oxidativo em microrganismos, o que caracteriza sua ação antimicrobiana. No entanto, evidências recentes sugerem que a ação dessas enzimas pode não se restringir à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mas também envolver mecanismos adicionais, possivelmente mediados por fragmentos peptídicos bioativos (criptídeos) liberados durante processos de clivagem enzimática. Nossos dados experimentais demonstraram que a digestão proteolítica da LAAO consegue gerar peptídeos com propriedades antimicrobianas distintas da enzima original. A enzima, após purificação, foi submetida à digestão enzimática com tripsina, resultando na obtenção de 11 frações peptídicas (L1–L11). A atividade antimicrobiana dessas frações foi avaliada frente a *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Entre as frações analisadas, a fração L9 apresentou o melhor desempenho, exibindo inibição superior a 60% contra *C. albicans* e aproximadamente 30% contra *S. aureus*, além de atividade detectável frente a *E. coli*. Outras frações, como L6 e L8, também demonstraram inibição antifúngica expressiva, superior a 80%, sugerindo um perfil de ação predominantemente antifúngico. Esses achados sugerem que os efeitos antimicrobianos da LAAO não são exclusivamente mediados pela liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mas também por peptídeos bioativos, Criptídeos, gerados por clivagem enzimática. Dessa forma, propomos que, em ambientes biológicos, a LAAO possa sofrer proteólise, liberando peptídeos com funções específicas, incluindo atividade antimicrobiana. Essa hipótese amplia o entendimento sobre o mecanismo de ação das LAAOs e reforça seu potencial como fonte de peptídeos candidatos ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

**Palavras-chaves:** *Crotalus durissus terrificus*; L-amino ácido oxidase; Criptídeos; Peptídeos Antimicrobianos

## ABSTRACT

Isolation and characterization of enzymes derived from snake venoms have proven to be promising strategies for the discovery of new bioactive molecules with pharmacological applications, especially in the fight against infections caused by multidrug-resistant microorganisms. Among the components of *Crotalus durissus terrificus* snake venom, L-amino acid oxidases (LAAOs) stand out. They are recognized for their catalytic activity, traditionally associated with the production of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and, consequently, the induction of oxidative stress in microorganisms, a mechanism that underlies their antimicrobial action. However, recent evidence suggests that the action of these enzymes may not be restricted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, but may also involve additional mechanisms, possibly mediated by bioactive peptide fragments (cryptides) released during enzymatic cleavage processes. Our experimental data demonstrated that the proteolytic digestion of LAAO generated peptides with antimicrobial properties distinct from the original enzyme. The purified enzyme was subjected to enzymatic digestion with trypsin, yielding 11 peptide fractions (L1–L11). The antimicrobial activity of these fractions was assessed against *Candida albicans*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. Among the analyzed fractions, fraction L9 showed the best performance, exhibiting over 60% inhibition against *C. albicans* and approximately 30% against *S. aureus*, in addition to detectable activity against *E. coli*. Other fractions, such as L6 and L8, also demonstrated significant antifungal activity, exceeding 80%, suggesting a predominantly antifungal action profile. These findings suggest that the antimicrobial effects of LAAO are mediated not only by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release, but also by bioactive peptides (cryptides) generated by enzymatic cleavage. We therefore propose that, in biological environments, LAAO may undergo proteolysis, releasing peptides with specific functions, including antimicrobial activity. This hypothesis expands the understanding of the mechanism of action of LAAOs and reinforces their potential as a source of candidate peptides for the development of new therapeutic agents.

**Keywords:** *Crotalus durissus terrificus*; L-amino acid oxidase; Cryptides; Antimicrobial peptides

## SUMÁRIO

<b>1 Revisão de Literatura</b> .....	9
<b>1.1 Venenos Ofídicos</b> .....	9
<b>1.2 L-amino ácido oxidase (LAAO's)</b> .....	9
<b>1.3 L- amino ácido oxidase e suas aplicações biotecnológicas</b> .....	12
<b>1.4 Criptídeos</b> .....	14
<b>1.5 Infecções causadas por microorganismos</b> .....	16
<b>1.5.1 <i>Candida albicans</i></b> .....	16
<b>1.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	17
<b>1.5.3 <i>Echerichia coli</i></b> .....	17
<b>1.6 Peptídeos Antimicrobianos</b> .....	18
<b>2 Justificativa</b> .....	22
<b>3 Objetivos</b> .....	22
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	22
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	22
<b>4 Material e métodos</b> .....	23
<b>4.1 Veneno Ofídico</b> .....	23
<b>4.2 L-aminoácido oxidase, isolamento e purificação por Cromatografia Líquida</b> .....	23
<b>4.3 Atividade enzimática da L-aminoácido oxidase</b> .....	24
<b>4.4 Eletroforese em SDS-PAGE</b> .....	24
<b>4.5 L-aminoácido oxidase, hidrólise e fracionamento de criptídeos em solução por digestão com tripsina</b> .....	25
<b>4.6 Fracionamento por HPLC dos fragmentos</b> .....	26
<b>4.7 Teste Atividade Antimicrobiana</b> .....	26
<b>4.8 Identificação por Espectrometria de Massas</b> .....	27
<b>4.9 Processamento dos dados</b> .....	27
<b>4.10 Análise dos dados</b> .....	27
<b>4.11 Avaliação Estrutural e Funcional dos Peptídeos no Banco de Dados de Peptídeos Antimicrobianos (APD3)</b> .....	28
<b>4.12 Análise da Estrutura Tridimensional e Propriedades Físico-Químicas dos Peptídeos Bioativos</b> .....	28
<b>5 Resultados</b> .....	30

<b>5.1</b>	<b>Quantificação do veneno bruto</b>	30
<b>5.2</b>	<b>Isolamento e purificação da L- aminoácido oxidase, por Cromatografia Líquida</b>	30
<b>5.3</b>	<b>Eletroforese em SDS-PAGE</b>	32
<b>5.4</b>	<b>Cromatografia HPLC</b>	33
<b>5.5</b>	<b>Ação Antimicrobiana da L-amino ácido oxidase</b>	34
<b>5.6</b>	<b>Espectometria de Massas</b>	35
<b>5.7</b>	<b>Avaliação Estrutural e Funcional dos Peptídeos no Banco de Dados de Peptídeos Antimicrobianos (APD3)</b>	37
<b>5.8</b>	<b>Análise da Estrutura Tridimensional e Propriedades Físico-Químicas dos Peptídeos Bioativos</b>	38
<b>6.</b>	<b>Discussão</b>	43
<b>7.</b>	<b>Conclusão</b>	51
<b>8.</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>	52
<b>ANEXOS</b>		64
<b>Anexo 1.</b>	<b>Dispensa de parecer ético</b>	64
<b>Anexo 2.</b>	<b>Curva de calibração com diferentes concentrações de BSA</b>	65
<b>Anexo 3.</b>	<b>Cromatograma da fração L9</b>	65
<b>Anexo 4.</b>	<b>Parâmetros de busca por peptídeos no PEAKS Studio 7.0</b>	65
<b>Anexo 5.</b>	<b>Parâmetros de busca - Espectometria de Massas</b>	66
<b>Anexo 6.</b>	<b>Parâmetros Instrumentais – Espectometria Massas</b>	67
<b>Anexo 7.</b>	<b>Espectro de fragmentação do melhor peptídeo identificado (L9)</b>	67
<b>Anexo 7.</b>	<b>Sequência da L-aminoácido oxidase do veneno de <i>C. d. terrificus</i></b>	67
<b>Anexo 8.</b>	<b>Porcentagem de inibição da atividade antimicrobiana pelas frações de LAAO</b>	68

# 1 REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 Venenos Ofídicos

A produção de toxina por um organismo é um mecanismo notável e complexo resultante da seleção natural. No caso das serpentes peçonhentas, as toxinas servem para auxiliar diversos fatores vitais como captura e digestão de alimentos e também na defesa contra predadores (1,2,3,4).

No Brasil existem aproximadamente 435 espécies de serpentes descritas, das quais 76 são consideradas de interesse médico. Destas 76 espécies, 29 pertencem ao gênero *Bothrops*, 38 ao gênero *Micrurus* e *Leptomicrurus*, 1 ao gênero *Lachesis* e 1 ao gênero *Crotalus* (5).

O gênero *Crotalus* é composto, predominantemente, pela espécie *Crotalus durissus*, a qual, no Brasil, é classificada em 4 subespécies: *Crotalus durissus marajoensis*, *Crotalus durissus ruruima*, *Crotalus durissus durissus* e *Crotalus durissus terrificus* (5). Sendo esta última, uma das subespécies mais encontradas no Brasil, habitando todo cerrado brasileiro (ecorregião de savana tropical) e áreas abertas perturbadas por atividades humanas (6).

Os venenos da família Viperidae, apesar de serem misturas complexas, apresentam proteínas pertencentes a algumas famílias principais, incluindo enzimas, como: serino proteinases, Zn<sup>2+</sup> metaloproteases, fosfolipase grupo II e L-aminoácido oxidases. Além das proteínas sem atividades enzimáticas como por exemplo desintegrina, lectinas tipo C, peptídeos natriuréticos, ohanina, miotoxina, toxinas CRISP, fatores de crescimento do endotélio, cistatina e inibidores de proteases do tipo Kunitz (7).

Dentre as toxinas das serpentes, o veneno da *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*) tem se mostrado de baixa complexidade/variabilidade (8), onde no seu fracionamento por Cromatografia Líquida por Exclusão Molecular evidencia-se 4 principais frações protéicas: Convulxina (9), Giroxina (10), Crotoxina (11) e Crotamina (12). Além desses componentes, o veneno Crotálico também pode apresentar outros componentes como serina e metaloproteases, Lectinas do tipo C, peptídeos vasoativos e L-aminoácido oxidases (13).

## 1.2 L-aminoácido oxidases (LAAO's)

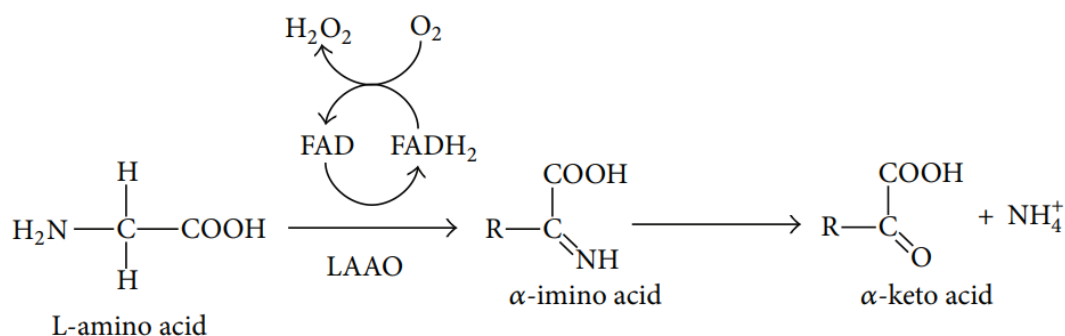
As L-aminoácido oxidases (LAAOs) foram descritas, inicialmente, por Zeller, A. & Maritz., que estudaram o veneno da *Vipera aspis* partindo da observação da grande quantidade de riboflavina que ocorrem nos venenos ofídicos e descobriram uma nova oxidase de aminoácidos no veneno de mais de 30 espécies de serpentes (14).

Além das toxinas de serpentes, essa versátil enzima também está presente em quase todas as toxinas animais, como nos organismos marinhos, insetos, Cyanobacterias, fungos,

algas verdes e, até mesmo, são encontradas em plantas. (15)

Nos venenos ofídicos a LAAO está presente principalmente nos venenos das famílias Crotalidae e Elapidae (16,17). Constituindo cerca de 0,15 a 5% das proteínas dos venenos ofídicos (18). Segundo Eduardo Oliveira. *et al.* 2021 a enzima representa 5,6% do total de proteínas do veneno de *Cdt* agrupado. A coloração amarelada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t*) tem sido associada à maior expressão de LAAO, especialmente em indivíduos mantidos em cativeiro. Análises demonstraram que a enzima está presente em 60–80% dos exemplares de cativeiro, contra apenas 10–12% dos recém-capturados. Além disso, a LAAO representa 5,6% das proteínas totais do veneno de cativeiro, mas apenas 0,7% no de animais selvagens. Esses dados indicam que o cativeiro pode aumentar a expressão dessa toxina, podendo estar associada às condições impostas pela manutenção em cativeiro, como rotina de extração de veneno, e não diretamente ao tempo de cativeiro, dieta ou genética dos animais. (19)

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) são flavoenzimas pertencentes à classe de oxidoreductases que catalisam a oxidação estereoseletiva e a desaminação de L-aminoácidos. O ciclo catalítico da enzima pode ser dividido em duas meia-reações, apresentado na figura 1. A meia-reação de redução inicia-se com a remoção de um próton do carbono- $\alpha$  do substrato pelo resíduo de His223, que atua como uma base. Isso facilita a transferência de um hidreto para o cofator FAD (flavina adenina dinucleotídeo), resultando na oxidação do aminoácido a um iminoácido e na redução do FAD a FADH<sub>2</sub>. O iminoácido formado, sofre hidrólise não enzimática, gerando um  $\alpha$ -cetoácido e amônia. A segunda meia-reação, de oxidação, completa o ciclo catalítico com a reoxidação do FADH<sub>2</sub> pelo oxigênio molecular (O<sub>2</sub>), com a consequente produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



**Figura 1** - Mecanismo da reação química catalisada pelas L-aminoácido oxidases (LAAOs) (21).

As LAAO's dos venenos ofídicos (SV LAAO's) são usualmente glicoproteínas (3-4%) homodiméricas ácidas ou básicas (P.I = 4,4 – 8,5), possuem Flavina Mononucleotídeo (FMN) ou dinucleotídeo flavina adenina (FAD) como cofatores (~2mol de proteína) e glicerol (~3,8 a 4%) (22). Análises cristalográficas da L-aminoácido oxidases (LAAOs), disponíveis em bancos de dados públicos, indicam que essas enzimas compartilham uma estrutura semelhante, caracterizada

por três domínios principais: um domínio responsável pela ligação ao cofator FAD, um domínio de interação com o substrato e um domínio predominantemente formado por  $\alpha$  hélices. As LAAOs de origem animal, particularmente as de venenos de serpentes (SV-LAAOs), apresentam um grau de glicosilação, evidenciado pela presença de cadeias de carboidratos ligadas à proteína. Em geral, esses carboidratos representam entre 3% e 4% da massa total da enzima, embora em alguns casos esse valor possa atingir até 12% da massa molecular (23 -28).

As LAAOs de venenos de serpentes (SV-LAAO) apresentam um cofator com um pigmento chamado Riboflavina, que confere a cor amarela aos venenos (19). Entretanto essa coloração amarelada nos venenos Crotálicos é pouco observada e pode estar presente ou não, em indivíduos da mesma espécie e da mesma região geográfica, como descrito por Lourenço Junior, onde das 93 amostras experimentadas, 10 delas apresentaram coloração amarela, totalizando 14% dos venenos coletados naquela região (8). Além da variação também pode ser notável quando se trata da variabilidade individual dessa enzima, em termos qualitativos e quantitativos para cada indivíduo. Segundo Eduardo Oliveira. *et al.* 2021, a existência de LAAOs pode ser um meio de proteção contra agentes naturais, parasitas e bactérias que possam afetar a integridade do veneno (19).

No veneno crotálico a enzima purificada aumentou a difusão da crototoxina e da fosfolipase (PLA2) nos tecidos de camundongos, potencializando a ação da proteína, evidenciado pela morte dos animais, evidenciando, assim, sua relevância no envenenamento crotálico (13).

As toxinas presentes nos venenos de serpentes peçonhentas, especialmente aquelas pertencentes à família Viperidae, constituem uma importante fonte de L-aminoácido oxidases (LAAOs), enzimas flavoproteicas que têm despertado interesse científico pelas suas diversas atividades biológicas, incluindo efeitos antimicrobianos, antiparasitários, citotóxicos e pró-apoptóticos (23,24). Embora amplamente distribuídas entre as espécies de serpentes peçonhentas, a concentração de LAAO nos venenos pode variar significativamente, sendo considerada relativamente baixa em comparação a outras toxinas majoritárias. De acordo com Izidoro LFM *et al.* (24), a LAAO pode representar entre 1% e 9% da composição total do veneno seco, valor que depende de múltiplos fatores, como a espécie da serpente, idade, dieta e condições ambientais.

A caracterização detalhada dessa enzima em espécies específicas, como no estudo clássico de Macheroux *et al.* (23), que purificou e descreveu as propriedades bioquímicas da LAAO isolada da víbora malaia (*Calloselasma rhodostoma*), demonstrou que, mesmo em quantidades reduzidas, a enzima possui alta atividade catalítica sobre diversos L-aminoácidos e gera peróxido de hidrogênio como subproduto, o qual está diretamente relacionado com sua ação tóxica e antimicrobiana. Esses dados reforçam o valor biotecnológico das LAAOs, mesmo quando presentes em baixa abundância nos venenos ofídicos. Entretanto essa enzima pode ser

encontrada em baixas concentrações nos venenos ofídicos, podendo representar de 1 a 9% do veneno total (24). Segundo Fonseca. *et al* a LAAO isolada de *C.d.cascavella* representa aproximadamente 0,28% do veneno seco (25).

Dentre as LAAOs caracterizadas do veneno de *C. d. terrificus*, destaca-se a Bordonein-L (29), cuja massa molecular foi determinada como 58.702Da por espectrometria de massas (MALDI-TOF). A SDS-PAGE sob condições redutoras revelou uma banda de aproximadamente 56 kDa, enquanto em condições não redutoras o monômero apresentou 53 kDa. Essa enzima correspondeu a 1,8% das proteínas totais do veneno, apresentando 498 resíduos de aminoácidos. Os 39 primeiros resíduos de aminoácidos N-terminais da LAAO isolada de *C.d.terrificus* apresentaram identidade com outras LAAOs de venenos de serpentes, uma vez que a região amino-terminal é altamente conservada (29).

Dentre as subespécies de *Crotalus*, a LAAO purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* também apresentou uma maior atividade enzimática (85,2 U/mg), quando comparada com outras subespécies como *Crotalus durissus cascavella* (28,2 U/mg) e *Crotalus durissus collilineatus* (52,0 U/mg) (29,30).

Apesar da atividade tradicionalmente associada à liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio), estudos demonstram que a digestão proteolítica dessas enzimas pode originar peptídeos bioativos, com atividade antimicrobiana própria (31). Esses fragmentos derivados da clivagem da LAAO expandem significativamente o potencial farmacológico desses compostos, demonstrando eficácia frente a microrganismos resistentes e sugerindo novas aplicações terapêuticas.

### 1.3 L- amino ácido oxidase (LAAO) e suas aplicações biotecnológica

As LAAO's são conhecidas como uma classe de enzimas multifuncionais, considerando sua capacidade de gerar peróxido de hidrogênio e amônia, além de sua participação no metabolismo celular e possíveis efeitos protetores, como, por exemplo, atividades antissépticas e antimicrobianas em diversos organismos (30,32). A utilização dessa enzima em vias metabólicas, juntamente com a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demonstra uma ampla atividade biológica, englobando a indução de apoptose, edema, agregação/inibição plaquetária, atividades hemorrágicas e anticoagulantes. Além disso, apresenta atividade antibacteriana, antiviral e leishmanicida, sendo utilizada como agente terapêutico em algumas condições de doença, como câncer (33,35).

Diversos trabalhos descrevem vários efeitos biológicos e farmacológicos para as L-aminoácido oxidases do veneno de serpentes (LAAO-SV), como por exemplo: Indução de Apoptose (33,36-38), Citotoxicidade (38-40), Indução ou Inibição da Agregação Plaquetária (41), Efeito Hemorrágico (42), Hemólise (43), Edema (44), Efeitos Bactericida (45,48) e Ação

Leishmanicida (49).

Segundo L.G. Barbosa *et al.* (50), atividade leishmanicida da LAAO, do veneno de *B. jararacussu* e *B. moojeni*, demonstrou grande citotoxicidade contra as formas promastigotas de duas espécies de leishmania, onde até mesmo as baixas concentrações de LAAO mostrou resultados promissores. Sugerindo que a ação leishmanicida da LAAO, de ambos os venenos, está atrelada a supressão da proliferação celular e despolarização da membrana mitocondrial das duas espécies de Leishmania testadas, resultante do estresse oxidativo devido ao peróxido de hidrogênio, produto da reação da LAAO (50).

Resultados semelhantes também foram encontrados por Tempone *et al.* (46), observou a atividade leishmanicida da LAAO purificada do veneno de *Bothrops moojeni*, relacionando a atividade da enzima com a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (51). Ahn, M. Y. (1997) também relacionou a liberação do peróxido de hidrogênio com a atividade da LAAO, através de testes da enzima contra linhagens celulares de carcinoma gástrico humano, levando a morte celular (52). Os resultados obtidos por Nikodijević D. D (53) com a LAAO extraída do veneno de *Crotalus adamanteus*, também demonstrou uma citotoxicidade significativa, evidenciada pela inibição da proliferação em todas as linhagens celulares de câncer de cólon examinadas.

Testes microbiológicos também se mostraram promissores para LAAO purificada de venenos ofídicos. Como mostrado por Salama *et al.* (54), indicou que a enzima purificada do veneno da serpente *Cerastes vipera*, exibiu uma alta atividade bactericida contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, particularmente contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Além disso, essa enzima também exibiu uma atividade citotóxica contra a linhagem de células cancerígenas de mama (MCF-7) (55). Torres *et al.* (2010), mostrou que a enzima purificada do veneno de *Bothrops marajoensis* apresentou uma ação antimicrobiana significativa contra microrganismos, como: *S. aureus*, *P. aeruginosae* e *C. Albicans* (56).

DE MELO FERNANDES *et al.* avaliaram a capacidade de duas LAAO's, purificadas dos venenos das serpentes *Bothrops moojeni* (Bmoo-LAAO-I) e *Bothrops jararacussu* (Bjussu-LAAO-II) em controlar o crescimento e prevenir a formação de biofilmes por bactérias clinicamente relevantes. Ambas as enzimas exibiram atividade bacteriostática relevante, suprimindo a formação de biofilmes por isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* em 88% e 89%, respectivamente, e por isolados clínicos de *Escherichia coli* em 89% e 53%. Os resultados de microscopia eletrônica de varredura, desse mesmo estudo, também confirmaram que as toxinas alteram a morfologia bacteriana, aumentando a rugosidade da superfície celular inibindo a formação de biofilme (57).

A LAAO extraída do veneno de *Ceraste ceraste* por K.A Zaineb *et al.* também exibiu atividade antibacteriana relevante contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A inibição contra as cepas foi observada de forma dependente da dose. Nesse mesmo trabalho, os

resultados encontrados foram relacionados tanto através da exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quanto à CC-LAAO, causando fragmentação do DNA em ambas as cepas bacterianas (58).

Resultados mostrados por M.H. Toyama *et al.* concluíram que o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), gerado pela LAAO isolada do veneno de *C. d. cascavella*, é crucial para atividade antibacteriana. As avaliações por microscopia eletrônica das bactérias utilizadas, *Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae* e *Streptococcus mutans*, revelaram modificações estruturais na superfície da membrana provocada por vesiculações (59).

As propriedades antimicrobianas das LAAO's, principalmente do veneno de serpentes, vêm se tornando alvos de vários estudos estruturais, fisiológicos e farmacológicos (11).

Embora bastante estabelecido que essas atividades antimicrobianas da LAAO do veneno de serpentes estejam relacionadas principalmente pela liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerada na reação enzimática (53,59), detalhes como mecanismos moleculares de seus fragmentos derivados que podem contribuir para essa ação ainda não foram totalmente elucidados.

## 1.4 Criptídeos

Dentro de abordagens investigativas no mundo das toxinas, a análise proteômica tem sido utilizada como uma excelente ferramenta para identificação e caracterização de proteínas através do uso de um conjunto de técnicas analíticas capazes de analisar amostras de alta complexidade simultaneamente (60).

Dentro da proteômica, existe um subconjunto de peptídeos, denominados Criptídeos cujas moléculas são geradas a partir da clivagem proteolítica ou outros tipos de fragmentação de proteínas maiores, resultando em peptídeos (criptídeos) e proteínas (cripteínas) biologicamente ativos. (61).

O conceito de criptídeo estabelece que peptídeos bioativos derivados de uma proteína precursora podem exibir efeitos biológicos distintos daqueles da molécula original, tanto em termos de atividade específica quanto no mecanismo de ação subjacente. Um exemplo clássico é a hemoglobina, uma proteína plasmática essencial para o transporte de gases, pode ser processada para liberar peptídeos potenciadores de bradicinina, os quais demonstram propriedades hipotensoras e relaxantes da musculatura lisa, funções notavelmente diferentes do papel primário da hemoglobina.

Esse tipo de clivagem é um processo comum e fundamental para microorganismos cujo metabolismo depende da modificação de produtos primários de tradução, com o objetivo de ativar ou desativar uma proteína ou mesmo produzir peptídeos biologicamente ativos.

Convém salientar a existência de diversas classes de Criptídeos, como representadas no Quadro 1 (62), enquanto fragmentos processados naturalmente ou, alternativamente, como resultado de clivagem proteolítica artificial.

Essas seqüências bioativas ocultas exercem um papel importante na modulação de vários processos biológicos, como por exemplo: angiogênese, respostas imune e inflamatória, crescimento celular e, também, sinalização neuronal. Nesse contexto, o mecanismo proteolítico leva à liberação de cripteínas, desencadeando novas atividades biológicas, sendo um fator importante para aumento da diversidade de proteínas funcionais (63).

<b>Classes de Críptideos</b>
<p><b>Tipo 1:</b> Clivagem proteolítica natural do peptídeo originando um produto com bioatividade nova e não relacionada a peptídeo original.</p>
<p><b>Tipo 2:</b> Clivagem proteolítica natural do peptídeo originando um produto com bioatividade semelhante à molécula parental, podendo apresentar recursos modificados.</p>
<p><b>Tipo 3:</b> Fragmentos de proteína-peptídeo gerados <i>in vitro</i> com novas bioatividades. Esses fragmentos podem ser idênticos ou similares a molécula original e não necessariamente ser gerado em processo natural.</p>

**Quadro 1** - Classificação dos criptídeos (62).

Entretanto, permanece a necessidade de desenvolvimento da maneira mais adequada para identificação desses críptídeos contidos em um polipeptídeo. Algumas possibilidades incluem a prospecção de dados ou acaso. Na prospecção de dados, os pesquisadores utilizam o conhecimento em bioinformática avançada, com ênfase em *softwares* e algoritmos para identificação desses críptídeos. Esse método, porém, acaba sendo limitado, muitas vezes pela falta de informações moleculares em 3D de alguns peptídeos, fazendo com que haja a necessidade de análises por indução (61)

Um caso de sucesso foi descrito por Ueki *et al.* (64), que desenvolveu uma metodologia aplicada para identificar peptídeos ativadores de neutrófilos, prevendo estruturas funcionais com base nas informações de bancos de dados de genoma, cDNA e proteínas.

A técnica ao acaso, por outro lado, pode ajudar nas análises através de varias maneiras, sendo suportada atualmente por análises bioquímicas consideradas mais abrangentes, devido ao desonvolvimento recente nas técnicas bioquímicas de purificação, identificação e síntese. Assim, como exemplo, através da digestão tríptica da b-conglicinina da soja, identificou o criptoide 'soymetide', um criptídeo promotor de fagocitose de neutrófilos (65).

Outro método para a descoberta de novos críptídeos são as análises direcionadas aos efeitos biológicos. Esse foi o caso das hemorfinas, um dos críptídeos mais polivalentes, encontradas através de análises com potencializadores de bradicinina (66). Essas hemorfinas

são peptídeos derivados da hemoglobina, com afinidade por receptores opióides, originalmente isolados de sangue bovino tratado enzimaticamente (67).

Novos estudos conduzidos por Liebmann *et al.* (68), Lantz *et al.* (69) e Piot *et al.* (70) empregaram combinações de ensaios biológicos, enzimologia e espectrometria de massa para identificar, confirmar e determinar as atividades biológicas desses críptídeos. Não obstante, suas possíveis rotas de geração (71), processamento enzimático de peptídeos relacionados (72), identificação de propriedades fisiológicas (73), possíveis implicações clínico-metabólicas (72,74) e caminhos metabólicos (75) têm sido continuamente estudados.

Trabalhos como os de Okubo *et al.* Identificaram fragmentos peptídicos derivados da LAAO de *Bothrops matogrosensis*. (Bm-LAOf1, Bm-LAOf2, Bm-LAOf3). O estudo sugeriu que tanto a LAAO quanto seus peptídeos derivados possuem potencial para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (31)

Tal abordagem justifica não apenas o potencial identificação de novos peptídeos bioativos, mas também pelo avanço que proporciona na compreensão dos mecanismos de ação dos componentes do veneno e de suas respectivas frações.

A exploração desses criptídeos fornece uma nova fonte de drogas peptídicas podendo fornecer modelos para o desenvolvimento de compostos peptidomiméticos (76,77). Esses criptídeos têm chamado a atenção de empresas farmacêuticas na procura de novos agentes terapêuticos ou mais específicos como alternativa aos anticorpos e drogas comerciais (61).

Portanto, essas novas moléculas oferecem uma nova perspectiva no que se refere ao desenvolvimento de novos candidatos ao desenvolvimento de agentes terapêuticos com ampla bioatividade. À medida que novas criptoínas bioativas sejam descobertas e estudadas, o leque de proteínas funcionais com interações úteis na terapêutica de doenças também deve aumentar, proporcionando oportunidades para o desenvolvimento de novos fármacos (64,77).

## **1.5 Infecções por microrganismos**

### **1.5.1 *Candida albicans***

*Candida albicans* é um fungo oportunista que provoca desde infecções superficiais e em mucosas até infecções disseminadas na corrente sanguínea em indivíduos imunocomprometidos, como pacientes portadores do vírus HIV, câncer e transplantados de órgãos. (78)

As Infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida* estão surgindo como um grande problema de saúde, resultando em altas taxas de mortalidade e custos médicos para governos e pacientes hospitalizados. A mortalidade pode ser atribuída ao aumento da ocorrência de candidíase sistêmica invasiva e casos de sepse, especialmente em pacientes

imunocomprometidos (79)

Este fungo oportunista pode ser encontrado na flora oral e conjuntival, bem como nos tratos gastrointestinal e geniturinário. As espécies de *Candida* que normalmente residem em hospedeiros saudáveis incluem *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. Parapsilosis*, *C. Krusei* e *C. albicans*. É frequentemente o terceiro microrganismo mais comumente isolado de infecções na corrente sanguínea em pacientes hospitalizados. (80)

O principal tratamento para esse microrganismos em humanos é o Fluconazol. Entretanto apesar de ser amplamente utilizado no tratamento clínico de infecções por *C. albicans*, o fluconazol possui características que o tornam apenas fungistático contra esse fungo. Portanto, durante um tratamento prolongado de infecções por *C. albicans* com fluconazol, há o potencial de desenvolvimento de resistência ao medicamento por parte do fungo. (81)

### **1.5.2 *Staphylococcus aureus***

A bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* é frequentemente encontrada na prática clínica. Em indivíduos saudáveis, faz parte da microbiota normal da pele sem causar danos aparentes; contudo, situações de imunossupressão ou lesões cutâneas podem favorecer o surgimento de infecções. Essas manifestações variam desde quadros superficiais, como impetigo, foliculite, hordéolo e furúnculos, até complicações mais graves, incluindo endocardite, pielonefrite, pneumonia e sepse (82,83).

O manejo das infecções por *S. aureus* é dificultado pela sua capacidade de adquirir resistência a diferentes classes de antibióticos (84). Um exemplo amplamente estudado é a cepa resistente à meticilina (MRSA), que apresenta resistência às penicilinas, antimicrobianos tradicionalmente empregados no tratamento dessas infecções (86,86). Além disso, essas bactérias podem produzir biofilmes, o que aumenta sua virulência e dificulta o controle terapêutico (87). O MRSA constitui ainda um dos principais agentes etiológicos de infecções hospitalares, cuja transmissão ocorre principalmente pelo contato interpessoal, especialmente pelas mãos (88).

### **1.5.3 *Escherichia coli***

Além da *Staphylococcus aureus*, a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, também é de grande incidência. Grande parte das cepas de *E.coli* habitam o trato gastrointestinal humano e de outros animais de sangue quente, sendo inofensivas, porém alguns sorotipos dessa bactéria podem causar intoxicações alimentares graves através de transmissão oral-fecal (89), além de infecções do trato urinário, através da migração dessas bactérias do ânus para a uretra (90).

Geralmente as infecções por *E.coli* não são graves, porém em pacientes imunodeprimidos e neonatos pode haver complicações, como por exemplo, sepse (91) e meningite (92). O tratamento das infecções causadas por *E.coli* tem sido problemático, pois assim como a *S. aureus*, essa bactéria tem se tornado resistente a um número cada vez maior de antibióticos (93, 94).

Atualmente, os medicamentos disponíveis para algumas doenças negligenciadas, especialmente antibióticos, são limitados em variedade. Além disso, é frequente o desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos a esses fármacos.

*E. coli*, por sua vez, desenvolve resistência por meio da produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs), modificação de porinas e expressão de bombas de efluxo, reduzindo a eficácia de antibióticos como quinolonas e cefalosporinas (95).

As toxinas dos venenos de serpentes têm mostrado resultados promissores no tratamento de várias doenças infecciosas e no controle dos microrganismos causadores. No entanto, muitas dessas toxinas ainda necessitam de estudos mais detalhados para avaliar seu potencial biotecnológico e farmacológico.

Moléculas dos venenos de serpentes já foram previamente estudadas e testadas como possíveis método terapêutico contra infecções bacterianas (96). Estudos demonstram que moléculas dos venenos de *Bothrops sp.* são capazes de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, além de impedir o formação de biofilme (97, 98).

Recentemente, uma revisão demonstrou que o veneno da *Ophiophagus hannah* possui efeito inibitório em cepas de *E. coli* e *S. aureus*, incluindo MRSA. Além disso, foi observado que os efeitos antibióticos dos venenos de serpentes se aplicam a diversas espécies de bactérias. (66).

A exploração de novas moléculas derivadas de toxinas de origem animal e seu potencial farmacológico, visando o desenvolvimento de novas drogas, tem se mostrado promissora para novas pesquisas. Um exemplo de toxina de origem ofídica é a L-aminoácido oxidase (LAAO-SV), essa enzima preenche os critérios descritos, já que estudos prévios realizados com ela, demonstraram seu grande potencial em atividades biológicas.

## 1.6. Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas naturais que existem há muito tempo e foram mantidas ao longo da evolução por sua grande importância na defesa contra microrganismos (99). Esses compostos foram inicialmente descritos nas décadas de 1970 e 1980, com a descoberta da Cecropina em insetos (100) e da Defensina em mamíferos (101), abrindo caminho para o reconhecimento de sua importância como primeira linha de defesa contra patógenos.

Desde então, diversos PAMs naturais foram isolados de bactérias, fungos, plantas, animais e seres humanos, apresentando mecanismos de ação distintos e potencial terapêutico promissor diante do aumento da resistência bacteriana.

Essas moléculas possuem propriedades estruturais diversas, mas compartilham características como carga, hidrofobicidade, composição de aminoácidos, quantidade de aminoácidos e alvo molecular (102). Em uma tentativa de sistematizar esse grupo de moléculas, Wang propôs uma classificação unificada dos PAMs baseada em suas estruturas primárias e modos de ação, dividindo-os em subclasses com base em dados do *Antimicrobial Peptide Database* (APD) (103).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs), em geral, são moléculas curtas, com menos de 100 resíduos de aminoácidos, e apresentam carga líquida positiva, variando de +2 a +13, devido à presença de resíduos básicos como lisina e arginina. Essa carga positiva facilita a interação com as membranas bacterianas, ricas em lipídios aniônicos, permitindo que os PAMs se associem à superfície celular e perturbem a integridade da membrana, culminando na morte da célula alvo. Com base na carga líquida, os PAMs podem ser classificados em peptídeos catiônicos (carga > 0; 88%), neutros (carga = 0; 6%) e aniônicos (carga < 0; 6%) (104).

Embora os peptídeos catiônicos predominem entre os PAMs, peptídeos neutros e aniônicos também podem exibir atividade antimicrobiana, apesar de atuarem por mecanismos distintos. Peptídeos neutros, por exemplo, podem interagir com a bicamada lipídica por meio de forças hidrofóbicas, promovendo a inserção na membrana e sua desorganização estrutural. Além disso, estruturas anfipáticas contribuem para uma orientação favorável desses peptídeos na interface membranar. Já os peptídeos aniônicos podem superar a repulsão eletrostática por meio da formação de pontes de sal mediadas por cátions divalentes, como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , ou por mecanismos alternativos, como a internalização passiva ou a mediação por transportadores específicos, permitindo seu acesso ao interior celular e posterior ação sobre alvos intracelulares (105).

O número de aminoácidos dos PAMs também desempenha um papel crucial em sua atividade. Pesquisas demonstram que peptídeos com menos de 15 resíduos de aminoácidos geralmente exibem atividade antimicrobiana reduzida, enquanto aqueles com 24 ou mais resíduos mostram atividade otimizada. Além disso, a distribuição específica de resíduos carregados ao longo da sequência do peptídeo influencia na sua capacidade de formar poros nas membranas bacterianas, afetando diretamente sua eficácia antimicrobiana (106).

A estrutura e a composição dos PAMs também são fatores determinantes para sua atividade antimicrobiana. A maioria dos PAMs adota conformações anfipáticas, como  $\alpha$ -hélices ou folhas  $\beta$ , que segregam resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos em faces opostas, facilitando a inserção e perturbação das membranas celulares. Estudos realizados por Wang, G indicam que uma atividade antimicrobiana eficaz requer um equilíbrio entre carga positiva e

hidrofobicidade, sendo que cargas líquidas entre +4 e +6 são comuns em PAMs naturais. No entanto, aumentos excessivos na carga positiva podem levar a efeitos citotóxicos indesejados em células hospedeiras. (103 e 107)

Em relação a composição de aminoácidos da grande maioria dos peptídeos antimicrobianos depositados no APD (*Antimicrobial Peptide Database*) são ricos em aminoácidos, como: *Trp* (*Triptofano*), *His* (*Histidina*), *Pro* (*Prolina*), *Arg* (*Arginina*) e ricos em *Gly* (*Glicina*) (103). Por outro lado, os AMPs ricos em *Leu* (*Leucina*), *Ser* (*Serina*), *Lys* (*Lisina*), *Asp* (*Ácido aspártico*) e *Ala* (*Alanina*), são considerados menos populares no banco de dados. A presença de resíduos de prolina também exerce influência significativa sobre suas propriedades estruturais e funcionais. Devido à sua conformação cíclica rígida, a prolina atua como disruptora de  $\alpha$  hélices, promovendo dobras conformacionais e regiões de estrutura desordenada, características que podem favorecer a interação com membranas biológicas ou alvos intracelulares. Peptídeos com alto teor de prolina tendem a apresentar maior flexibilidade estrutural, resistência à proteólise e mecanismos de ação distintos, frequentemente independentes da lise direta da membrana. Em contraste, peptídeos isentos de prolina costumam adotar conformações helicoidais estáveis, associadas à atividade antimicrobiana por permeabilização da bicamada lipídica (103).

Este sistema universal de classificação de peptídeos, proposto por Wang (108), também se baseia nos padrões de ligação covalente dos peptídeos. Categorizando - os em quatro classes, representados na Tabela 1.

Além da classificação estrutural os AMPs também são classificados em duas famílias, dependendo do seu modo de ação e alvo molecular: Peptídeos direcionados à superfície celular, como por exemplo, Nisinas e Temporinas (109, 110) e Peptídeos direcionados intracelularmente (por exemplo, peptídeos ricos em *Pro*) (108). Os peptídeos direcionados à superfície celular, incluindo peptídeos direcionados à membrana e peptídeos não direcionados à membrana, podem ser classificados com base em alvos específicos, como parede celular/carboidratos, lipídios/membranas e proteínas/receptores. Da mesma forma, os AMPs direcionados intracelularmente podem ser classificados com base nas moléculas-alvo específicas (por exemplo, proteínas, DNA e RNA) (103).

**Tabela 1** - Classificação estrutural dos peptídeos antimicrobianos (PAMs) com base no sistema universal proposto por Wang (108).

<b>Classe</b>	<b>Sigla</b>	<b>Descrição Estrutural</b>	<b>Exemplos</b>
Classe I	UCLL	Peptídeos lineares de cadeia única ou dois peptídeos lineares não conectados por ligação covalente	LL-37 (humano), enterocina L50
Classe II	UCSS	Peptídeos com ligação cadeia latera (intra ou entre cadeias peptídicas)	Defensinas (contendo dissulfeto), lantibióticos (com ligação tioéter)
Classe III	UCSB	Cadeias polipeptídicas com ligação da cadeia lateral à estrutura principal	Lassos bacterianos, fusaricidinas
Classe IV	UCBB	Polipeptídeos circulares com ligação peptídica entre os terminais N e C (estrutura a estrutura)	AS-48 (bactérias), ciclotídeos (plantas), teta-defensinas (animais)

A busca por novos PAMs tem se voltado, cada vez mais, à exploração de fontes naturais pouco convencionais, como os venenos animais, que representam reservatórios de moléculas bioativas. Nesse cenário, os criptídeos pequenos fragmentos gerados por clivagem proteolítica de proteínas maiores surgem como candidatos promissores.

A enzima L-aminoácido oxidase (LAO), presente no veneno de *C. d. terrificus*, além de sua atividade clássica relacionada à produção de peróxido de hidrogênio, também pode originar peptídeos bioativos com propriedades distintas e ainda inexploradas (31).

A identificação de novos PAMs com atividade seletiva frente a bactérias e fungos, contribui não apenas para o avanço do conhecimento sobre a diversidade funcional dessa enzima, mas também para a descoberta de novos candidatos terapêuticos frente a resistência antimicrobiana.

## 2 JUSTIFICATIVA

Moléculas bioativas isoladas de venenos ofídicos têm se destacado como fontes promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos. Dentre elas, a enzima L-aminoácido oxidase (LAAO) tem despertado interesse crescente devido à sua gama de atividades biológicas, que são geralmente atribuídas à geração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Estudos ainda escassos apontam que a LAAO pode ser alvo de clivagens proteolíticas, mediadas por proteases presentes no meio biológico, resultando na liberação de fragmentos peptídicos conhecidos como criptídeos. Esses criptídeos quando gerados podem apresentar funções biológicas próprias, distintas e até independentes da enzima intacta, incluindo potenciais efeitos biológicos.

Nesse contexto, levanta-se a hipótese de que parte das atividades atribuídas à LAAO possa não estar relacionada exclusivamente à liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mas também à ação de criptídeos bioativos gerados durante sua degradação. Dessa forma, esta pesquisa tem como objetivo gerar criptídeos por meio da clivagem da LAAO presente no veneno de *Crotalus durissus terrificus* e avaliar sua atividade antimicrobiana.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Analisar a capacidade antimicrobiana de criptídeos derivados da enzima L- aminoácido oxidase (LAAO) do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*.

### 3.2 Objetivos específicos

- Isolar a enzima LAAO por cromatografia líquida de baixa pressão.
- Gerar criptídeos a partir da LAAO por enzima modelo (Trispina).
- Padronizar modelos microbiológicos para *S. aureus*, *E. coli*, *Cândida albicans* frente aos peptídeos crípticos derivados da LAAO.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Veneno Ofídico

O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* utilizado neste trabalho foi gentilmente fornecido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Venenosos (CEVAP). As serpentes são mantidas em cativeiro sob os cuidados da equipe técnica do CEVAP, em condições controladas de bem-estar e manejo. As amostras individuais de veneno foram previamente coletadas e armazenadas em microtubos eppendorff® estéreis, de acordo com a metodologia de extração desenvolvida pela equipe técnica do Laboratório de Extração de Venenos do CEVAP. Após a extração, as amostras de veneno foram reunidas em um pool, que foi então liofilizado, alicotado e armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética responsável pelo Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu (Protocolo CEUA 0520/2023). O veneno utilizado é validado e respeita as boas práticas de produção, manuseio e bem-estar animal (111).

A concentração de proteínas no pool de veneno foi determinada pela técnica descrita por Bradford (112). Para tal, foi utilizado uma curva de calibração por meio de diferentes concentrações da proteína padrão albumina bovina (Sigma-USA) como foi demonstrado no anexo 2. As amostras foram preparadas utilizando 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de 1mg/mL de veneno, com 3,0 mL do reagente de Bradford para cada amostra de veneno. Para o branco foi feito com 100  $\mu\text{L}$  de solução fisiológica 0,95% com adição de 3,0 mL do reagente. As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro a 595 nm (SP-220, Biospectro®).

### 4.2 L-aminoácido oxidase, isolamento e purificação por Cromatografia Líquida

Trezentos (300) mg de veneno liofilizado de *Crotalus durissus terrificus* foram injetados em uma coluna de exclusão molecular Sephacryl TM S-100HR pré-embalada (com diâmetro interno de 16 mm, comprimento de 60 cm e volume de leito de aproximadamente 120 mL), acoplada a um equipamento Akta Explorer 100 AIR® (GE HealthCare Life Science, Uppsala, Suécia). Para este experimento, foi utilizado um tampão de equilíbrio e eluição de Bicarbonato de Amônio 0,3 M, pH 8,0, com uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min, leitura de absorbância a 280 nm. As frações eluídas foram coletadas automaticamente em volumes de 2 mL. Todo o processo foi controlado e monitorado pelo software Unicorn™, sendo o experimento controlado pelo software Unicorn versão 5.1.

Após o primeiro passo cromatográfico as frações com resultado positivo no ensaio enzimático colorimétrico foram submetidas a uma nova cromatografia de Troca Iônica em uma coluna de troca catiônica Tricorn 10/300® (10 mm x 300 mm x 25 mL) (GE Healthcare Life Science, Uppsala, Suécia), preenchida com resina SP - Sepharose, utilizando o equipamento Akta Explorer 100 AIR® (GE Healthcare Life Science, Uppsala, Suécia). Neste processo,

empregaram-se os tampões A (Bicarbonato de Amônio 0,05 M, pH 8,0) e B (Bicarbonato de Amônio 1 M, pH 8,0), com fluxo constante de 0,5 mL/min e coleta de frações de 2 mL.

### 4.3 Atividade enzimática da L-aminoácido oxidase

A atividade da L-aminoácido oxidase (LAAO) foi avaliada após as etapas de cromatográficas utilizando um ensaio colorimétrico acoplado, utilizando peroxidase extraída de rabanete como enzima auxiliar. A reação foi realizada em um volume total de 5 mL, contendo 0,1% m/v de L-leucina dissolvida em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,2). A essa solução, foram adicionados 10 µL de peroxidase (1 mg/mL), 50 µL de o-fenilenodiamina (OPD; 10 mg/mL em metanol) e 20 µL das frações cromatográficas, seguindo o protocolo descrito por Kishimoto T, *et al.* (113).

A LAAO catalisa a desaminação oxidativa da L-leucina, produzindo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por sua vez, serve como substrato para a peroxidase, que oxida o cromógeno OPD, gerando um cátion radical colorido. A formação desse produto colorido foi monitorada visualmente, e a atividade enzimática foi estimada com base na intensidade da coloração obtida após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente e protegida da luz.

### 4.4 Electroforese em SDS-PAGE

Para avaliar o isolamento da proteína, foi realizado um gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS (SDS-PAGE) em um sistema desnaturante e reduzido, conforme a técnica descrita por Laemmli (114).

Para o gel de separação (12,5% m/v de poliacrilamida), foram usadas as seguintes soluções: tampão de separação Tris-HCl pH 8,8; SDS (Sulfato de Dodecil Sódio) (Sigma Chem. Co) 10% m/v, água destilada; acrilamida: Bis 30,0:0,8 (Sigma Chem. Co); persulfato de amônio (Sigma Chem. Co) 10% (v/v) e Temed (N', N', N', N'-tetrametilenodiamina) (Sigma Chem. Co).

Para o gel de empilhamento (4% m/v de poliacrilamida), foram usadas as seguintes soluções: tampão de empilhamento Tris-HCl pH 6,8; SDS (Sulfato de Dodecil Sódio) (Sigma Chem. Co) 10% (m/v); água destilada; acrilamida: Bis 30,0:0,8 (Sigma Chem. Co); persulfato de amônio (Sigma Chem. Co) 10% (v/v) e TEMED (N', N', N', N'-tetrametilenodiamina) (Sigma Chem. Co). O tampão de corrida foi preparado dissolvendo 15 g de Tris e 72 g de glicina em aproximadamente 900 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 50 mL de solução de SDS a 10% (m/v) e o volume final completado para 1 L com água destilada. O pH foi ajustado para 8,3 e a solução estocada a 4°C. Esse tampão foi utilizado para preencher a cuba tanto do cátodo quanto do ânodo.

Uma alíquota de 20 µg da amostra contendo a LAAO foi dissolvida em 20 µL de tampão composto por: β-mercaptoetanol (Sigma Chem. Co); SDS (Sulfato de Dodecil Sódio) (Sigma Chem. Co) 10% m/v; tampão de empilhamento Tris-HCl pH 6,8; glicerol; azul de bromofenol (Sigma Chem. Co); água destilada. A amostra foi aquecida por cinco minutos a 70°C em banho-maria.

A eletroforese foi realizada a uma voltagem constante de 150V, com a amperagem aberta (corrente variável), por 12 minutos. Após o término dessa corrida, a fonte foi programada para uma voltagem de 200V, com a amperagem aberta, por 40 minutos, até que o indicador azul de bromofenol atingisse a parte inferior do gel. Uma vez que a migração das proteínas foi concluída, o sistema foi desligado e o gel foi transferido para um recipiente contendo a solução corante composta por Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma Chem. Co), metanol, água destilada e ácido acético. Este gel foi corado por 40 minutos e, em seguida, descolorido por 40 minutos, com uma solução contendo ácido acético, etanol comercial e água destilada. Essa solução foi trocada periodicamente até que as bandas fossem exibidas.

A massa molecular foi estimado pela comparação com o peso molecular padrão Kaleidoscope (Bio-Rad Co). Em seguida, a concentração de proteínas nas amostras contendo LAAO foi determinada por espectrofotometria de absorvância utilizando o equipamento NanoVue™ (GE Healthcare, modelo 4282, versão V2.0.4). As medições foram realizadas no modo User-defined, com correção automática do caminho óptico e leitura direta de microvolumes. Para cada análise, foi utilizada como branco a solução tampão correspondente àquela em que a enzima estava diluída. A absorvância foi registrada em 280 nm (A280) para estimativa da concentração proteica, com correção em 340 nm (A340) para eliminação de interferências ópticas como turbidez ou contaminantes residuais.

#### **4.5 Hidrólise Enzimática da L-Aminoácido Oxidase e Fracionamento de Criptídeos por Digestão com Tripsina**

Uma alíquota de 50 µg da LAAO foi submetida às etapas de redução e alquilação, utilizando 10 mM de Ditioneitol (DTT) e 45 mM de iodoacetamida (IAA), respectivamente, e em seguida à digestão enzimática em uma solução contendo a enzima tripsina a uma concentração de 20 ng/mL, solubilizada em tampão de bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,8. A hidrólise ocorreu por 18 horas e foi interrompida com a adição de ácido fórmico 1% (v/v) em relação ao volume da amostra. Os digestos tripsínicos contidos na amostra foram liofilizados e armazenados em um congelador a -20°C até o uso (115).

#### 4.6 Fracionamento por HPLC dos fragmentos gerados a partir da digestão enzimática da L-aminoácido oxidase.

O perfil cromatográfico dos fragmentos gerados pela digestão enzimática foi realizado utilizando HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance) em uma coluna C18 de fase reversa (100A, 250 x 10 mm, Phenomenex 250 x 4,6 mm) em um sistema Shimadzu Prominence 20A, com detecção por PDA (Arranjo de Fotodiodos). Foram injetado 500µL (50ug.mL) de amostra e o monitoramento da eluição foi 214 nm. A coluna foi equilibrada com os solventes de corrida (solvente A: 0,1% de TFA (Ácido Trifluoroacético); solvente B: 90% de acetonitrila com 0,1% de TFA). Inicialmente, foi realizada a injeção da amostra aos 0 minutos, seguida pela remoção dos compostos não retidos na coluna até o tempo de 5 minutos. Em seguida, deu-se início ao gradiente linear de aumento da fase orgânica Acetonitrila (ACN), atingindo 100% de ACN aos 35 minutos, fase correspondente à separação dos peptídeos eluídos. O platô de 100% de ACN foi mantido de 35 a 45 minutos para lavagem completa da coluna. Posteriormente, foi realizada a fase de recuperação (flush) até 50 minutos e, então, a fase de reequilíbrio da coluna com fase aquosa até 55 minutos, completando o ciclo cromatográfico.

#### 4.7 Teste Atividade Antimicrobiana (Microdiluição em caldo)

As frações peptídicas obtidas a partir da digestão enzimática da L-aminoácido oxidase (LAAO) foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 10231. Alíquotas de 50 µL de caldo Mueller-Hinton (para as bactérias) ou caldo Sabouraud (para *C. albicans*), contendo inóculos ajustados para aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/mL, foram adicionadas a placas de microtitulação de 96 poços, previamente preparadas com 50 µL das frações peptídicas (L1–L11).

Os ensaios foram realizados conforme as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (116). As placas foram incubadas a 37 °C por 20 horas, e a atividade antimicrobiana foi avaliada por meio da leitura da turbidez das culturas a 595 nm em leitor de microplacas (Multiskan EX, LabSystems). Os resultados foram expressos como percentual de inibição da densidade óptica (DO) em comparação com o controle (cultivo microbiano na ausência das frações).

Os peptídeos obtidos a partir da digestão enzimática foram avaliadas contra *Staphylococcus aureus* American Type Culture Collection (ATCC) 25923, *Escherichia coli* ATCC 25923 e *Candida albicans* ATCC 10231. Alíquotas de 50 µL de caldo Mueller-Hinton (para bactérias) e caldo Sabouraud (para *C. albicans*), com inóculo bacteriano ou fúngico

ajustado para aproximadamente  $10^6$  UFC/mL, foram colocadas em placas de microtitulação de 96 poços contendo 50  $\mu$ L das frações da LAAO, conforme as diretrizes do CLSI. As placas foram incubadas a 37°C por 20 horas, após as quais a turbidez das culturas foi medida em um leitor de microplacas (Multiskan Ex plate reader 144 - LabSystems) a 595 nm. Os resultados foram expressos como percentual de inibição da densidade óptica (DO) em comparação com o controle (microorganismos na ausência de LAAO) e apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (116).

#### 4.8 Identificação por Espectrometria de Massas

A análise dos digestos trípticos (proteômica e peptidômica, baseada em digestão proteica), foi realizada utilizando um sistema nanoLC-ESI-q-TOF. O equipamento consistia em um sistema Dionex Ultimate 3000 RSLnano (Thermo Fisher Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Acclaim PepMap C18 (Dionex, 20 mm  $\times$  75  $\mu$ m, 100 Å) sob condições de eluição em gradiente. O gradiente variou de 5% a 40% da fase móvel B (acetonitrila com 0,1% v/v de ácido fórmico) ao longo de 120 minutos, com uma vazão de 350 nL/min.

A ionização por eletrospray foi realizada a 200 °C. A detecção espectrométrica de massas foi conduzida na faixa de  $m/z$  300–2000 para íons precursores (modo MS) e  $m/z$  50–1600 para íons produto (modo MS/MS). A fragmentação foi realizada por dissociação induzida por colisão (CID) (117).

#### 4.9 Processamento dos dados

Os dados proteômicos e peptidômicos foram processados utilizando o software PEAKS Studio V7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá). Os parâmetros aplicados foram: modificação fixa: carbamidometilação de cisteína; modificação variável: oxidação de metionina; enzima de clivagem: tripsina (utilizada apenas para a análise proteômica); tolerância para íons fragmentados: 0,1 Da; modificações pós-traducionais: máximo de três por peptídeo; taxa de descoberta falsa (FDR):  $\leq$  0,5%. Os dados foram analisados com base no banco de dados Reptile, construído por meio da recuperação de todas as entradas do UniProt associadas ao táxon.

#### 4.10 Análise de dados

A anotação funcional das proteínas foi realizada com o InterPro V102.0, a fim de identificar funções moleculares e biológicas. As sequências de peptídeos de novo foram

identificadas por alinhamento utilizando o BLAST-NCBI. A predição de atividade antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica e antiviral) foi conduzida utilizando ferramentas bioinformáticas especializadas, incluindo o *Antimicrobial Peptide Database* (APD3, UNMC – AMP Database Search).

#### **4.11 Avaliação Estrutural e Funcional dos Peptídeos no Banco de Dados de Peptídeos Antimicrobianos (APD3)**

Para a caracterização dos peptídeos selecionados, foram utilizados os parâmetros preditivos do banco de dados *Antimicrobial Peptide Database 3* (APD3). As análises incluíram a composição de aminoácidos, com ênfase nos resíduos hidrofóbicos, polares e carregados, além da presença de glicina e prolina. Também foram avaliadas a carga líquida em pH fisiológico, o índice de hidropatia GRAVY (118), o índice de hidrofobicidade Wimley-White (associado à interação com membranas) (119) e o índice de Boman (120), que estima o potencial de ligação às proteínas, sendo os valores calculados negativos (exceto para o peptídeo híbrido), mas os sinais "+" e "-" são invertidos, ou seja, um peptídeo mais hidrofóbico tende a ter um índice negativo, enquanto um peptídeo mais hidrofílico tende a ter um índice mais positivo. Parâmetros físico-químicos adicionais, como massa molecular, fórmula molecular e coeficiente de absorção molar, também foram determinados (103, 106, 108).

Além disso, foi realizada uma análise de similaridade por alinhamento global de resíduos, comparando cada peptídeo com as mais de 10.000 sequências cadastradas no APD3. O método considera substituições conservadoras e regiões funcionalmente relevantes, fornecendo como resultado o percentual de identidade com peptídeos previamente descritos com atividade antimicrobiana.

#### **4.12 Análise da Estrutura Tridimensional e Propriedades Físico-Químicas dos Peptídeos Bioativos**

As modelagens preditiva dos peptídeos foram realizadas utilizando a plataforma I-TASSER (121–123), ferramenta amplamente reconhecida por sua precisão em modelagem estrutural, tendo sido classificada como a melhor em várias edições do Critical Assessment of Structure Prediction (CASP7–CASP14). O I-TASSER gera milhares de modelos conformacionais alternativos (decoys) a partir da sequência-alvo e os agrupa com base em similaridade estrutural por meio do algoritmo SPICKER. Os cinco maiores agrupamentos resultam nos Top 5 modelos finais, que representam as estruturas mais recorrentes e estáveis.

A confiabilidade dos modelos gerados foi avaliada por meio do *C-score*, uma métrica que varia de -5 (baixa confiança) a +2 (alta confiança), sendo baseada na significância dos

alinhamentos por threading e na convergência das simulações. Modelos com C-score superior a -1.5 são geralmente considerados confiáveis para análises estruturais.

A visualização e manipulação da estrutura tridimensional da LAAO foram realizadas utilizando a ferramenta *Protein Imager*, disponível em 3D Protein Imaging (<https://3dproteinimaging.com/protein-imager/>), permitindo a inspeção interativa dos modelos gerados. A visualização da localização e conformação dos peptídeos na estrutura da LAAO fornece um contexto fundamental para interpretar os resultados da modelagem *in silico*, contribuindo para uma compreensão mais abrangente da relação com a estrutura espacial dos peptídeos na molécula íntegra e suas susceptibilidade de clivagem (124).

## 5 RESULTADOS

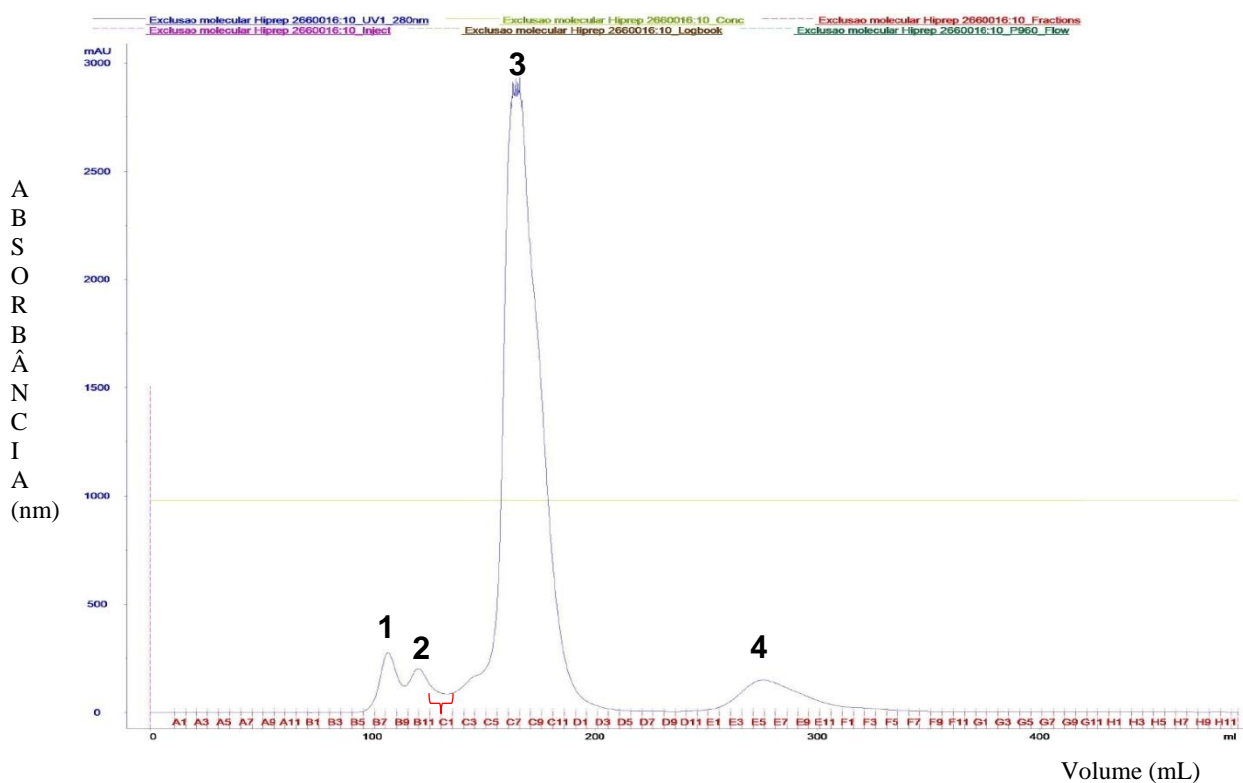
### 5.1 Quantificação protéica do veneno bruto

A concentração de proteínas totais do *pool* de veneno de *C. d. terrificus* foi determinada pelo método de Bradford (112), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão. A quantificação revelou uma concentração de 0,75mg/mL de proteínas totais. Este valor serviu como referência para o cálculo do rendimento final do processo.

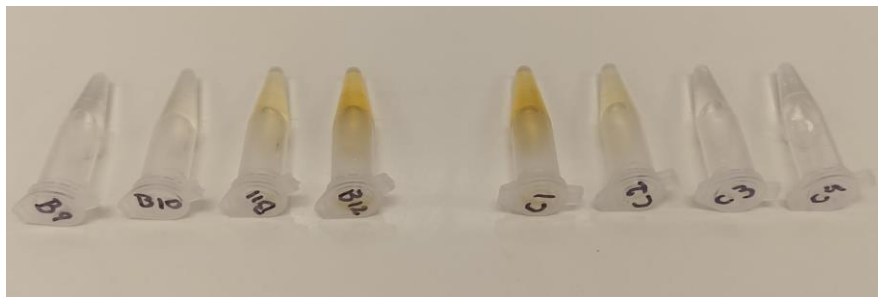
### 5.1 Isolamento e purificação da L-aminoácido oxidase, por Cromatografia Líquida

O primeiro perfil cromatográfico, do veneno bruto, revelou 4 picos de eluição (Figura 2), refletindo a separação dos componentes proteicos do veneno crotálico com base em suas massas moleculares.

A atividade enzimática da LAAO foi avaliada em todas as frações coletadas por meio de ensaio colorimétrico baseado na oxidação de substrato específico. Alterações na coloração do meio reacional foram observadas nas frações correspondentes aos tubos B12 E C1, indicando a presença de LAAO ativa (Figura 3). Essas frações coincidem com o final do pico 2 do cromatograma, sugerindo também que a LAAO está presente em formas de massa molecular intermediária no veneno bruto.

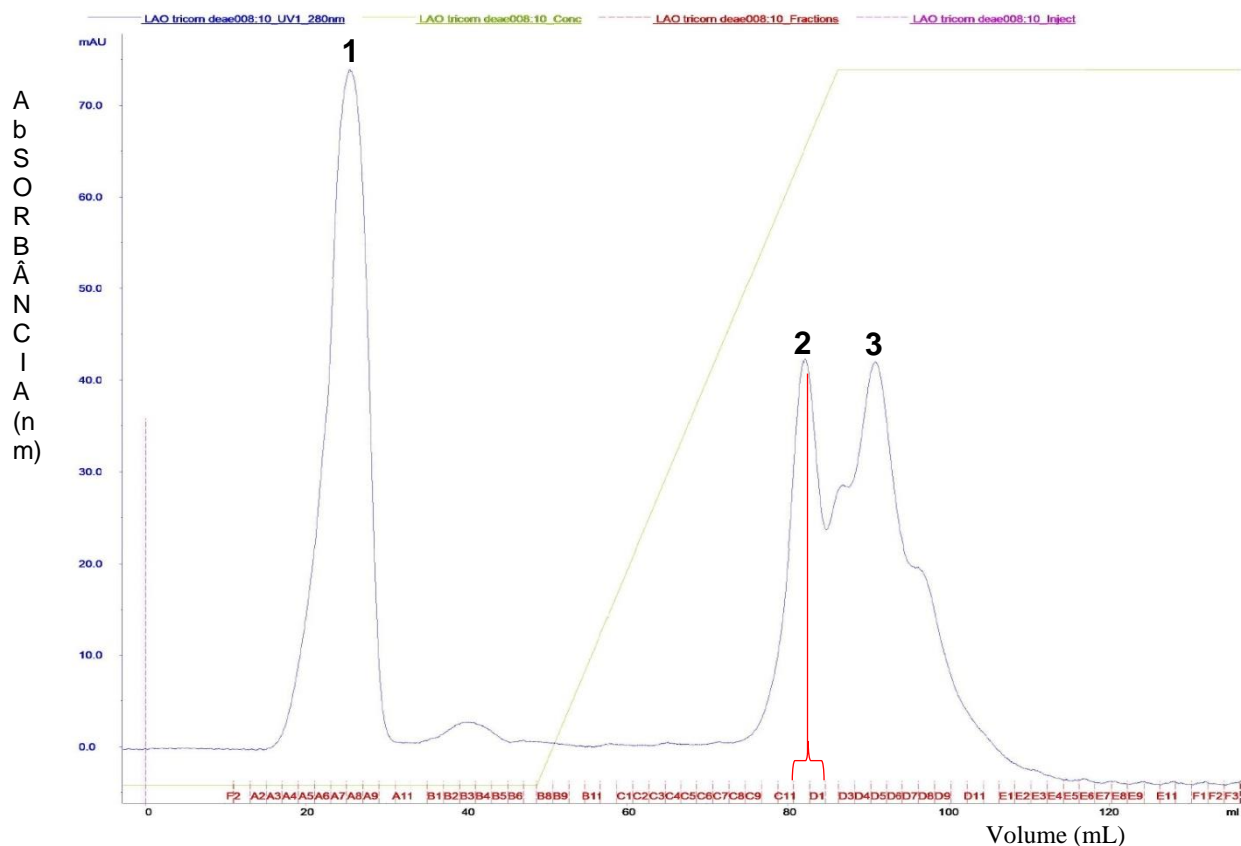


**Figura 2** - Perfil cromatográfico do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* (300 mg) sob condições de fracionamento por exclusão molecular, utilizando a coluna Sephacryl TM S-100HR acoplada ao equipamento Akta Explorer 100 AIR®.



**Figura 3** - Avaliação da atividade enzimática da L-aminoácido oxidase (LAAO) por ensaio colorimétrico acoplado, utilizando peroxidase de rabanete e o-fenilenodiamina (OPD) como cromógeno. Os tubos apresentam intensidades variadas de coloração amarela, proporcionais à formação do produto oxidado da reação catalisada pela peroxidase na presença de  $H_2O_2$  gerado pela LAAO. A intensidade da coloração foi observada visualmente após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente, protegidos da luz, como descrito por Kishimoto *et al.* (113).

As frações com atividade enzimática positiva (frações B12 e C1) foram agrupadas e submetidas à um segundo passo cromatográfico por Troca Iônica, utilizando uma coluna Tricorn 10/300® de troca catiônica. O novo fracionamento resultou em um novo perfil cromatográfico contendo três principais picos (Figura 4). Os picos foram submetidos a ensaios de atividade enzimática, sendo confirmada a presença de LAAO nas frações C12 e D1 (indicadas no colchete vermelho), correspondendo ao final do pico 2.

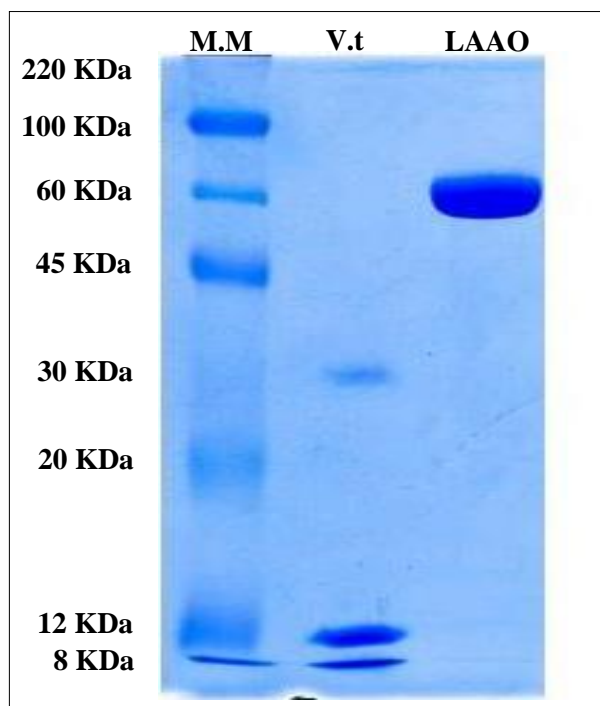


**Figura 4** - Perfil cromatográfico de troca aniônica das frações positivas à atividade LAAO contidas nos picos 1 e 2 oriundas do fracionamento por Troca Iônica. Foi utilizado uma coluna de troca catiônica Tricorn 10/300® (10 mm x 300 mm x 25 mL) (GE Healthcare Life Science, Uppsala, Suécia), preenchida com resina SP - Sepharose, utilizando o equipamento Akta Explorer 100 AIR® (GE Healthcare Life Science, Uppsala, Suécia). A LAAO foi confirmada nas frações C12 e D1, (destacadas pela linha e colchete vermelhos no cromatograma) correspondendo ao pico 2

As frações ativas foram concentradas e analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE a 12,5% para confirmação do isolamento da LAAO e posteriormente utilizadas nas etapas de digestão enzimática, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana dos peptídeos derivados.

### 5.3 Eletroforese em SDS-PAGE

A fração ativa foi analisada por SDS-PAGE sob condições redutoras. A eletroforese revelou uma única banda com massa molecular estimada em aproximadamente 60 kDa (Figura 5), valor compatível com LAAOs do gênero *Crotalus*. Análises adicionais por espectrometria de massas e bioinformática (BLAST, InterProScan) revelaram que a LAAO isolada compartilha identidade parcial com Bordon KCF (29).

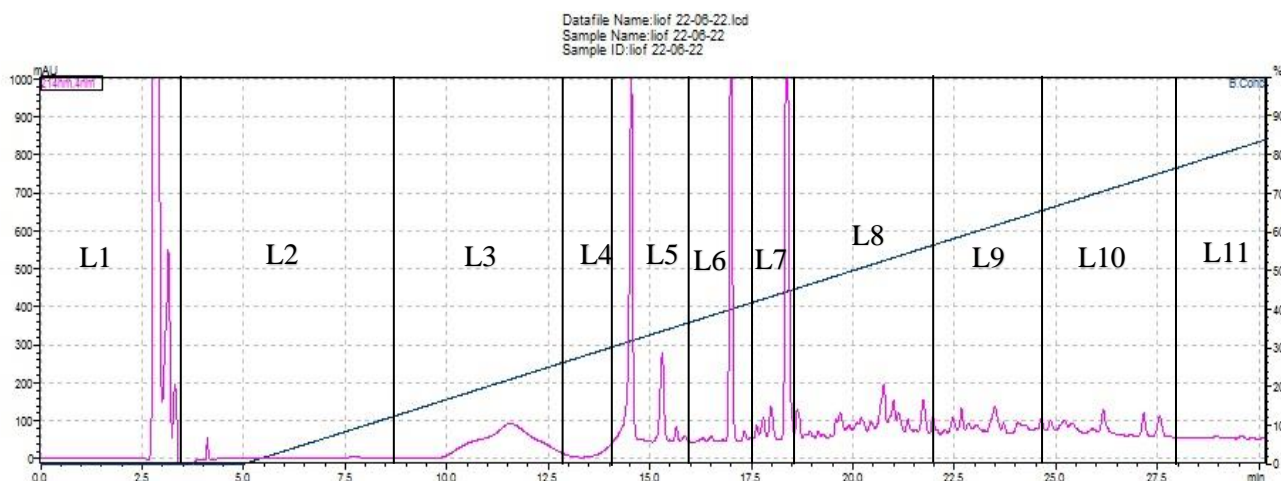


**Figura 5** - Análise eletroforética em SDS-PAGE 12,5% (m/v), sob condições desnaturantes e redutoras, da fração positiva (pico 3) para a atividade de LAAO obtida após a etapa de cromatografia de troca iônica. (MM) Marcador molecular, (V.t.) Veneno total e (LAAO) L-aminoácido oxidase.

A concentração proteica da fração ativa (pico 2) foi determinada por espectrofotometria em 280 nm (NanoVue®), resultando em valor médio de 0,52 mg/mL. A partir de um volume total de 4 mL, essa fração resultou em um rendimento aproximado de 0,95% em relação à proteína total do veneno utilizado (300mg). Essa fração foi selecionada para as etapas posteriores de digestão enzimática, análise dos peptídeos gerados e avaliação de sua atividade antimicrobiana frente a microrganismos modelo.

#### 5.4 Cromatografia HPLC

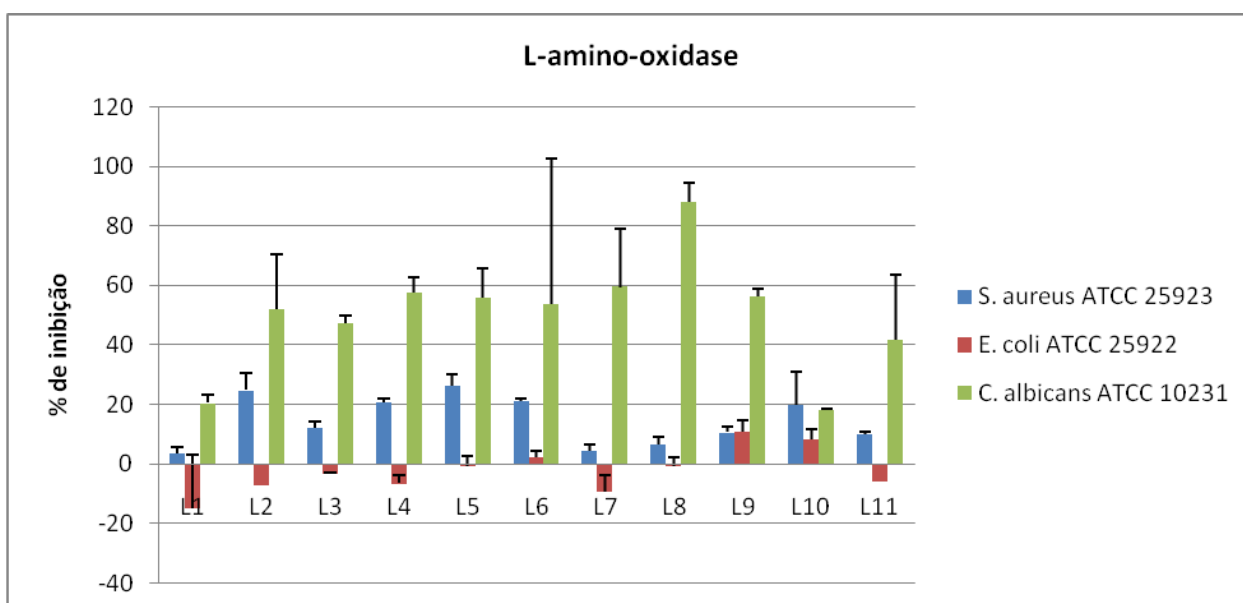
A L-aminoácido oxidase (LAAO) purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi digerida com tripsina. A análise do hidrolisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) revelou mais de 40 picos distintos, agrupados em 11 frações principais (L1–L11) de acordo com os tempos de eluição (Figura 6). As frações foram submetidas à espectrometria de massas e aos ensaios de atividade antimicrobiana..



**Figura 6** - Perfil cromatográfico dos peptídeos gerados pela digestão da L-aminoácido oxidase (LAAO) com tripsina. As linhas verticais indicam as 11 frações coletadas para análise por espectrometria de massas e ensaios de atividade antimicrobiana.

### 5.5 Ação Antimicrobiana da L-aminoácido oxidase

As 11 frações obtidas foram avaliadas quanto à sua atividade antimicrobiana frente a três microrganismos clinicamente relevantes: *S. aureus* ATCC 25923 (Gram-positivo), *E. coli* ATCC 25922 (Gram-negativo) e *C. albicans* ATCC 10231 (levedura). Os resultados dos ensaios de inibição do crescimento microbiano estão apresentados na Figura 7.



**Figura 7** - Atividade antimicrobiana das frações peptídicas L1–L11 frente a *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Destaca-se a fração L9 com inibição expressiva sobre os três microrganismos testados, especialmente *C. albicans* (>60%).

Os resultados obtidos nos testes antimicrobianos sustentam nossa hipótese proposta, na qual frações peptídicas derivadas da LAAO exibem atividade antimicrobiana independente da enzima íntegra, confirmando a hipótese de que criptídeos gerados por clivagem enzimática possuem efeitos biológicos próprios.

As frações L2, L4, L5, L6, L9 e L10 demonstraram inibição moderada do crescimento de *S. aureus*, com percentuais variando entre 20% e 25%, sugerindo atividade dos peptídeos gerados frente a bactérias Gram-positivas. Em contraste, a maioria das frações, L1, L2, L3, L4, L5, L7, L8 e L11, não apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli*, em alguns casos foram observados valores negativos, sugerindo atividade dos peptídeos gerados frente a bactérias Gram-negativas. Apenas as frações L9 e L10 apresentaram inibição superior a 10% contra *E. coli*, sugerindo eficácia limitada frente a bactérias Gram-negativas, o que pode ser atribuído à barreira adicional da membrana externa presente nesse grupo.

De forma notável, a atividade antifúngica foi mais pronunciada que a antibacteriana. A maioria dos peptídeos, as frações L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9 e L11 exibiram inibição significativa do crescimento de *C. albicans*, com destaque para L8, que apresentou valor superior a 80%. Esses resultados reforçam o potencial desses fragmentos derivados da LAAO como candidatos a novos agentes antifúngicos, particularmente relevantes diante do aumento da resistência de leveduras aos antifúngicos convencionais. Os valores numéricos completos (média  $\pm$  desvio padrão) das porcentagens de inibição para cada fração e microrganismo estão disponíveis no Anexo 9.

A fração L9 destacou-se pelo perfil antimicrobiano significativo contra as 3 cepas testadas, inibindo >55% de *C. albicans* e ~10% de *S. aureus* e *E. coli*, sugerindo um espectro de ação ampliado. Esses resultados justificaram a escolha da fração L9 para as análises de espectrometria de massas afim de identificar os peptídeos presentes e elucidar as propriedades estruturais e funcionais associadas à atividade observada.

## 5.6 Espectrometria Massas

A análise por espectrometria de massas revelou a proteína com maior score de identificação como sendo a L-aminoácido oxidase (LAAO), também conhecida como bordoneína-L (26), originária do veneno de *C. d. terrificus* (acesso UniProt: C0HJE7), a massa média da proteína observada foi de aproximadamente 58.919 Da. (Tabela 2). A última sequência destacada (resíduos 401–421) representa dois peptídeos distintos, gerados por clivagem entre lisina (K) e ácido aspártico (D).

**Tabela 2** - Identificação proteômica da fração L9 por espectrometria de massas. Foram identificados seis peptídeos, sendo um deles exclusivo, com 14% de cobertura da sequência total da proteína. O alto valor de score (-10lgP = 121,12) reforça a confiabilidade da identificação.

Protein Group	Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	PTM	Avg. Mass	Description
1	329	<a href="#">COHJE7/OXLA_CRODU</a>	121.12	14	6	1	Y	58919	L-amino acid oxidase bordonein-L OS= <i>Crotalus durissus terrificus</i> OX=8732 PE=1 SV=2

A caracterização peptídica da fração L9, obtida a partir da digestão trípica da LAAO purificada, foi conduzida por espectrometria de massas nanoLC-ESI-q-TOF. Essa abordagem permitiu a identificação de oito peptídeos distintos, analisando suas massas monoisotópicas, razões massa/carga ( $m/z$ ), tempos de retenção, número de espectros e posição na sequência primária da proteína, além da detecção de modificações pós-traducionais, como a oxidação de resíduos de metionina.

Esses peptídeos estão apresentados na Tabela 3, exibindo propriedades compatíveis com peptídeos antimicrobianos clássicos, como predominância de resíduos hidrofóbicos, presença de cargas positivas e resíduos aromáticos, características apresentadas no banco de dados APD3 (<https://aps.unmc.edu/design>). Essas características estão associadas à interação com membranas microbianas e ao potencial de atividade antimicrobiana com desordens estruturais, reforçando a relevância desses fragmentos como candidatos a criptídeos bioativos.

Entre os peptídeos identificados, cinco apresentaram características únicas, destacadas em azul na Tabela 3, configurando-se como potenciais criptídeos de relevância biológica. A presença desses fragmentos fornece evidências de que regiões específicas da LAAO podem estar diretamente associadas à atividade antimicrobiana observada para a fração L9, sugerindo um possível papel estrutural e funcional desses segmentos na interação com microrganismos.

**Tabela 3.** Peptídeos derivados da sequência da fração L9 derivada da LAAO por espectrometria de massas. A análise por nanoLC-ESI-q-TOF revelou um total de oito peptídeos, dos quais cinco tiveram as características únicas (Destacados em azul). Os dados incluem o valor de score (-10lgP), massa monoisotópica, razão massa/carga ( $m/z$ ), tempo de retenção (RT), número de varredura (Scan), número de espectros (#Spec), posição inicial e final na sequência da proteína e as modificações pós-traducionais observadas (oxidação de metionina).

Peptide	Uniq	-10lgP	Mass	ppm	m/z	z	RT	Scan	#Spec	Start	End	PTM
R.ETDYEEFLEIAR.N	Y	55.70	1513.6936	-9.5	757.8469	2	0.27	2204	1	31	42	
K.DWYANLGPM(+15.99)R.L	N	52.42	1237.5549	13.2	619.7929	2	0.24	2135	1	97	106	Oxidation (M)
K.RFDEIVGGMDQLPTSMYEAIK.E	N	51.77	2399.1501	-25.0	800.7040	3	0.28	2216	1	248	268	
K.DWYANLGPMR.L	N	51.19	1221.5601	4.8	611.7902	2	0.25	2131	1	97	106	
Y.GIGDDANFFQALDFK.D	N	46.07	1656.7783	1.5	829.3977	2	0.30	2232	3	391	405	
K.RFDEIVGGM(+15.99)DQLPTSM(+15.99)YEAIK.E	N	45.99	2431.1399	-31.7	811.3615	3	0.25	2224	1	248	268	Oxidation (M)
R.FDEIVGGMDQLPTSMYEAIK.E	N	37.92	2243.0491	-2.0	748.6888	3	0.29	2194	1	249	268	
K.HVVIVGAGM(+15.99)AGL.S	N	17.06	1138.6168	11.1	570.3220	2	0.24	2117	1	53	64	Oxidation (M)
<b>total 8 peptides</b>												

### 5.7 Avaliação Estrutural e Funcional dos Peptídeos no Banco de Dados de Peptídeos Antimicrobianos (APD3)

As cinco sequências de peptídeos destacados em azul foram analisadas individualmente e comparadas com peptídeos antimicrobianos previamente descritos na base de dados APD3. A Tabela 4 resume os principais parâmetros avaliados, como: Peptídeo similar, origem do peptídeo, similaridade (%), atividade do similar, número de resíduos, massa molecular, carga líquida, índices hidropáticos (GRAVY e Wimley-White), índice de ligação a proteínas (Boman Index), % de resíduos hidrofóbicos, resíduos carregados, estrutura prevista e atividade reportada (103).

As informações compiladas descritas na tabela 4, demonstraram que todos os peptídeos analisados apresentam características compatíveis com peptídeos antimicrobianos (PAMs), como presença de resíduos hidrofóbicos organizados para favorecer a formação de estruturas anfipáticas e potencial para interação com membranas biológicas e desordem celular.

A similaridade estrutural e de propriedades com peptídeos ativos contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos reforça a hipótese de que esses fragmentos possuem potencial bioativo e podem representar candidatos promissores a novas terapias antimicrobianas.

**Tabela 4** - Parâmetros físico-químicos dos peptídeos da LAAO de *C. d. terrificus* comparados a peptídeos antimicrobianos do APD3 (125-129), incluindo similaridade, massa, carga, índices hidrofóbicos e estrutura prevista.

Parâmetro	ETDYEEFLEIAR	RFDEIVGGMDQLPSTSMYEAIK	HVVIVGAGMAGL	GIGDDANFFQALDFK	DWYANLGP MR
Peptídeo Similar (APD3)	AP02034 (Coconut)	AP00453 (Brevinin-1SA)	AP01260 (Signiferin 2.1)	AP02487 (Hylain 1)	AP03237 (TR P1-TINF)
Origem do Similar	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Rana sphenoccephala</i>	<i>Crinia riparia</i>	<i>Hyla simplex</i>	<i>Triatoma infestans</i>
Similaridade (%)	41,67%	38,46%	43,75%	41,18%	40%
Número de Resíduos	12	21	12	15	10
Massa Molecular (Da)	1514,6	2400,8	1123,4	1657,8	1222,4
Carga Líquida	-4	-2	+0,25	-2	0
GRAVY	-0,925	-0,27	1,83	-0,127	-0,82
Wimley-White (kcal/mol)	7,49	6,15	-0,35	1,78	-0,49
Boman Index (kcal/mol)	3,24	1,57	-2,17	1,3	1,8
% Hidrofóbicos	33%	38%	58%	47%	40%
Resíduos Carregados	E(4), D(1), R(1)	E(2), D(2), R(1), K(1)	H(1)	D(3), K(1)	D(1), R(1)
Estrutura Secundária Prevista	$\alpha$ -hélice	$\alpha$ -hélice e coil	Regiões Coil	$\alpha$ -hélice	Desordenada
Atividade Reportada	Antimicrobiana predita	AMP predito	AMP com ação por membrana	AMP com ação por membrana	Candidata a AMP
Atividade do Similar (APD3)	Antifúngico, antiviral	Antibacteriano e antifúngico	Anti-Gram+ (baixa anti-Gram-)	Anti-Gram+/Gram-/Candida	Anti-Gram+, antifúngica
Observações	Alta acidez, baixa hidrofobicidade	Hélice anfipática clara	Muito hidrofóbico, sem carga relevante	Hidrofóbico balanceado e estruturalmente compatível	Aromático e balanceado; absorção UV elevada

Em conjunto, os dados obtidos indicam que os peptídeos analisados possuem características físico-químicas compatíveis com a classe dos peptídeos antimicrobianos descritos no banco de dados (APD3), justificando a realização dos ensaios biológicos funcionais para validação de sua atividade frente a microrganismos.

Estes achados indicam que a digestão enzimática da LAAO de *C. d. terrificus* pode gerar peptídeos com atividade antimicrobiana seletiva, com ação frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, reforçando o potencial biotecnológico desses peptídeos.

## 5.8 Análise da Estrutura Tridimensional e Propriedades Físico-Químicas dos Peptídeos Bioativos

A organização estrutural dos peptídeos derivados da LAAO, foi feita através da predição *in silico* de suas estruturas secundária e tridimensional por meio da plataforma I-TASSER (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*).

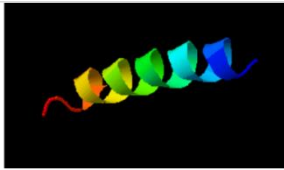
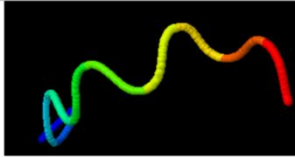
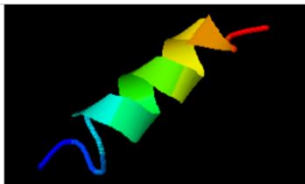
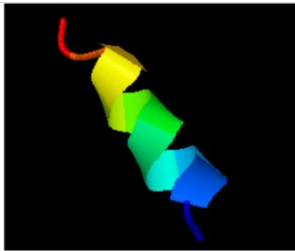
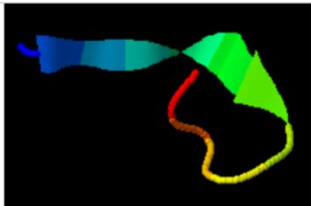
A qualidade dos modelos gerados foi avaliada pelo C-score, métrica que varia de -5 a 2, em que valores mais elevados indicam maior confiabilidade na predição estrutural. Entretanto a ausência de modelos de alta confiança (C-score baixo) pode sugerir que a conformação nativa

dos peptídeos pode ser mais flexível, intrinsecamente desordenada, ou que a sequência carece de homólogos estruturais próximos nos bancos de dados atuais.

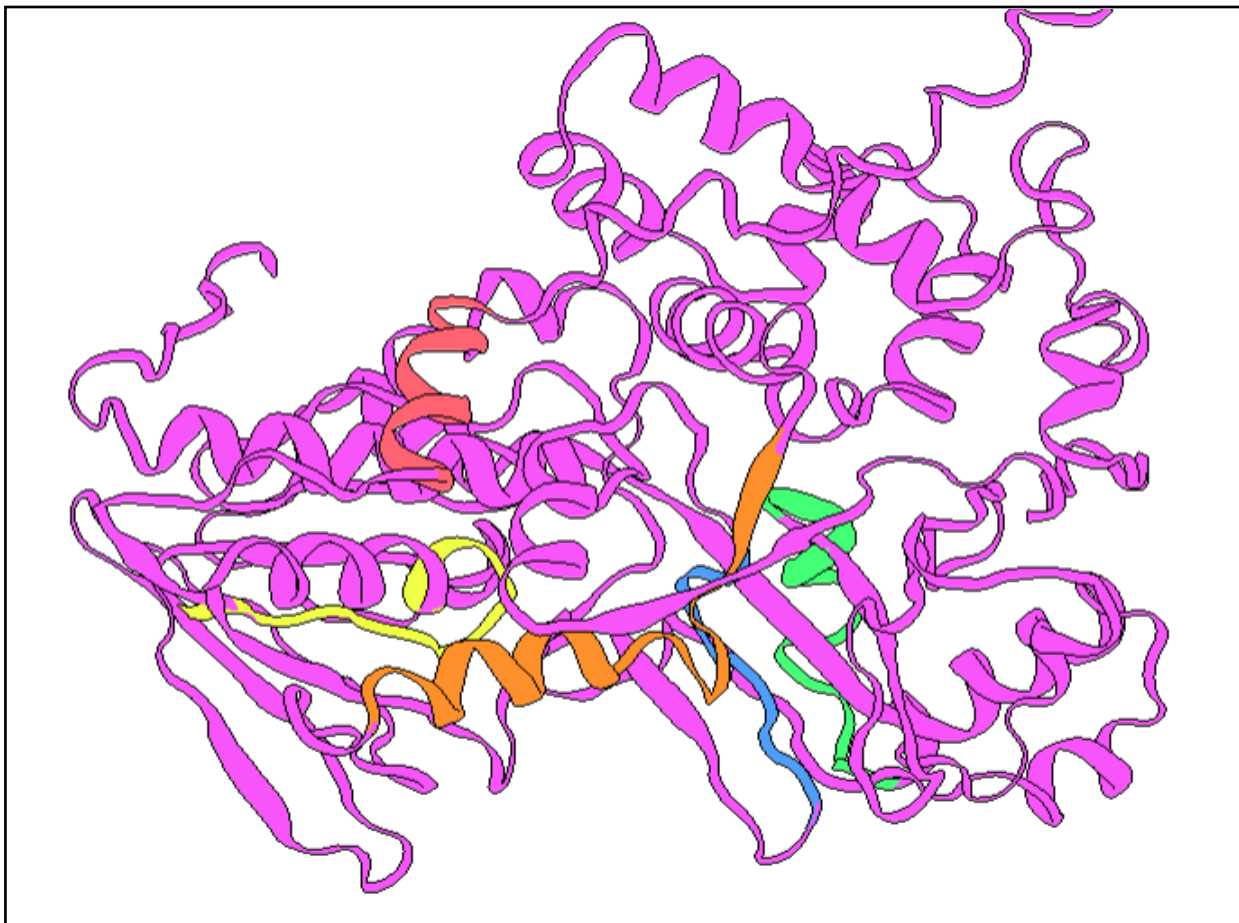
A análise da estrutura secundária permitiu a classificação de cada resíduo como pertencente a uma  $\alpha$ -hélice (H), folha  $\beta$  (S) ou Coil (C), acompanhada de uma pontuação de confiança individual, em escala de 0 a 9.

Os dados obtidos estão resumidos na Figura 7, destacando perfis estruturais distintos entre os peptídeos analisados. Algumas sequências apresentaram regiões helicoidais (bem definidas (ETDYEEFLEIAR), frequentemente associadas à atividade antimicrobiana e à interação com membranas lipídicas, enquanto outras exibiram conformações desordenadas (Coil) (DWYANLGPMR), sugerindo flexibilidade conformacional. Esses resultados oferecem suporte estrutural para a seleção racional de candidatos com potencial bioativo a serem validados experimentalmente.

Para complementar a análise da estrutura tridimensional dos peptídeos prevista pelo I-TASSER, buscou-se visualizar a localização desses segmentos dentro da estrutura da proteína LAAO nativa. A Figura 8 apresenta a estrutura cristalográfica da LAAO, com os peptídeos identificados na fração antimicrobiana destacados em cores. A estrutura tridimensional da LAAO foi visualizada utilizando a ferramenta *Protein Imager do site 3D Protein Imaging* (<https://3dproteinimaging.com/protein-imager/>)

Peptídeo	Estrutura Secundária Predita	Considerações Estruturais e Funcionais	C-score	Estrutura 3D
RFDEIVGGMDQLPTSMYEAIK	Três segmentos helicoidais (resíduos 2–6, 11–13 e 17–23)	Estrutura composta por hélices $\alpha$ intercaladas por regiões desordenadas sugere elevada plasticidade conformacional. Essa organização é compatível com o modo de ação de peptídeos antimicrobianos, favorecendo inserção na bicamada lipídica e reconhecimento dinâmico de alvos moleculares.	-1,16	
DWYANLGPMR	Conformação inteiramente desordenada (bobina aleatória)	A ausência de elementos estruturais regulares (hélices ou folhas $\beta$ ) caracteriza esse peptídeo como estruturalmente desorganizado. A presença de resíduos como glicina e prolina, conhecidos por desestabilizar estruturas secundárias. Tal desordem pode conferir vantagem funcional em interações transitórias ou acesso facilitado a sítios enzimáticos.	-0,61	
GIGDDANFFQALDFK	Região central helicoidal (resíduos 5–12), extremidades desorganizadas	A predição indica uma $\alpha$ hélice contínua na região central, cercada por segmentos em bobina aleatória, resultando em uma topologia estrutural compatível com peptídeos bioativos. Essa conformação híbrida é frequentemente observada em peptídeos antimicrobianos com ação dependente de flexibilidade e capacidade de inserção em membranas.	-0,50	
ETDYEEFLIAR	$\alpha$ Hélice predominante (resíduos 4–11) com flancos desordenados	A conformação helicoidal central bem definida sugere forte propensão à formação de uma $\alpha$ -hélice estável, frequentemente associada à atividade antimicrobiana ou funções de reconhecimento molecular. As regiões terminais desorganizadas podem conferir flexibilidade conformacional, promovendo ajustes estruturais durante a interação com membranas ou ligantes específicos.	+0,07	
HVVIVGAGM AGL	Regiões desordenadas (representadas por 'C' para Coil), intercaladas com uma área central mais estruturada em forma de hélice $\alpha$ (representada por 'H')	As regiões desordenadas nas extremidades da sequência conferem flexibilidade conformacional, o que pode ser vantajoso para funções biológicas que envolvem interações dinâmicas com outros compostos ou com membranas lipídicas, como ocorre em peptídeos antimicrobianos ou proteínas com função de reconhecimento molecular	-0,73	

**Figura 8** - Predição *in silico* do potencial antimicrobiano e modelagem da estrutura secundária de peptídeos de novo utilizando as plataformas I-TASSER. A coluna "C-score" (*Confidence Score*) fornece uma estimativa da qualidade dos modelos estruturais 3D previstos pelo I-TASSER, com valores entre -5 e 2, sendo mais altos indicando maior confiabilidade na representação da conformação do peptídeo.



**Figura 9** - Estrutura cristalográfica da LAAO (visualizada com Protein Imager, 3D Protein Imaging), com os peptídeos identificados na fração antimicrobiana destacados em cores: vermelho (peptídeo ETDYEEFLEIAR), amarelo (peptídeo HVVIVGAGMAGL), verde (peptídeo GIGDDANFFQALDFK), azul (peptídeo DWYANLGPMR) e laranja (peptídeo RFDEIVGGMDQLPTSMYEAIK). A análise da estrutura desses peptídeos na proteína nativa permite a comparação com os modelos tridimensionais previstos por I-TASSER (Figura 7).

A modelagem 3D das sequências peptídicas analisadas foi fundamental para a identificação de características estruturais que podem contribuir tanto para a susceptibilidade à hidrólise dos peptídeos quanto para avaliar sua atividade antimicrobiana e seu comportamento biológico. A estrutura cristalográfica da LAAO foi utilizada para contextualizar a conformação dos peptídeos identificados na fração L9 (Figura 9).

A análise do peptídeo ETDYEEFLEIAR (vermelho na LAAO), com uma predição de " $\alpha$  Hélice" e alto C-score (+0.07) pelo I-TASSER, foi corroborada pela estrutura cristalográfica, que o mostra como uma  $\alpha$  hélice compacta e localizada em uma região acessível da proteína, sugerindo susceptibilidade à hidrólise enzimática mesmo em condições nativas. Em contraste, o peptídeo DWYANLGPMR (azul), predito com um C-score de -0.61, apresenta-se na LAAO como uma alça estendida e predominantemente em conformação de Coil, sendo altamente exposto na superfície proteica e, portanto, propenso à hidrólise. O peptídeo GIGDDANFFQALDFK (verde), com predição de "região central helicoidal e extremidades em Coil (C-score -0.50), exibe na LAAO uma região central mais estruturada com extremidades flexíveis, situando-se em uma alça externa, o que o torna igualmente acessível para clivagem.

O peptídeo RFDEIVGGMDQLPTSMYEAIK (laranja), predito com "três segmentos helicoidais intercalados por regiões Coil e C-score de -1.16, apresenta na estrutura da LAAO uma conformação compatível com essa descrição. Tal arranjo estrutural confere elevada plasticidade conformacional, característica frequentemente associada a peptídeos antimicrobianos. Essa flexibilidade pode favorecer sua inserção em membranas lipídicas e permitir o reconhecimento dinâmico de diferentes alvos moleculares, tornando-o um candidato promissor para estudos funcionais adicionais.

Por fim, o peptídeo HVVIVGAGMAGL (amarelo), predito com regiões Coil intercaladas com uma área central mais estruturada em forma de hélice (C-score -0.73), localizada em uma porção superficial e flexível da proteína, o que facilita sua acessibilidade para hidrólise.

Em suma, a concordância entre as predições computacionais e as estruturas cristalinas indica que, independentemente da estrutura secundária predominante ( $\alpha$ -hélice ou coil), a maioria desses peptídeos localiza-se em regiões da LAAO expostas e acessíveis à hidrólise enzimática, sem necessidade de desnaturação prévia da proteína. Essa característica estrutural pode ser determinante para sua liberação e para o desempenho da atividade antimicrobiana observada.

## 6. DISCUSSÃO

As toxinas presentes no veneno da serpente *C. d. terrificus* têm sido amplamente estudadas por diversos pesquisadores, especialmente quanto sua caracterização, atividades enzimáticas e efeitos citotóxicos (18, 19, 29, 130). Entre essas toxinas, destaca-se a enzima L-aminoácido oxidase (LAAO) (14, 16, 17, 23, 24, 25), conhecida por sua capacidade de induzir efeitos antimicrobiano (30, 32), apoptóticos, citotóxicos (33-36), entre outros efeitos bioóligos, geralmente atribuídos à produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) como subproduto de sua atividade catalítica (23).

Apesar do grande interesse pela enzima, a maioria dos estudos se concentra na enzima íntegra, sendo escassos os trabalhos que investigam fragmentos crípticos derivados de sua sequência primária. Tais fragmentos (criptídeos) são gerados a partir da clivagem proteolítica de proteínas maiores e podem apresentar propriedades farmacológicas próprias, independentes da geração de  $H_2O_2$ . Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano de críptídeos gerados a partir da digestão por tripsina da LAAO do veneno de *C. d. terrificus*.

A purificação da LAAO, oriunda de venenos ofídicos, tem sido realizada por diferentes abordagens metodológicas, amplamente relatadas na literatura (21, 23, 29, 37, 39, 41, 42) como exemplo, a purificação da LAAO resultante do veneno da serpente *Agkistrodon halys pallas* (131), no qual utilizaram quatro etapas cromatográficas, tais como troca aniônica fraca, exclusão molecular, troca aniônica e interação hidrofóbica. Para a espécie *Vipera lebetina*, a LAAO foi isolada utilizando a combinação de três etapas cromatográficas: exclusão molecular, troca iônica e interação hidrofóbica (132).

Para a purificação da LAAO do veneno de *C.d.terrificus*, Bordon KCF (26) utilizou 3 passos cromatográficos: Exclusão Catiônica, Exclusão Molecular e Interação hidrofóbica. No presente trabalho, a purificação foi otimizada para apenas duas etapas (exclusão molecular e troca iônica), o que representa uma melhoria metodológica em relação às estratégias anteriores (29, 131, 132). A LAAO purificada nesse trabalho apresentou uma massa molecular de ~60 kDa, segundo resultados de SDS-PAGE, compatível com os valores relatados para outras LAAOs crotálicas, como a Bordonein-L, que apresentou uma massa molecular 64,5 kDa, estimada por SDS-PAGE sob condições redutoras (29).

De modo geral, as LAAOs estão presentes em baixas concentrações nos venenos ofídicos, variando entre 0,15% a 5% do total de proteínas. Uma exceção notável é o veneno de *Bungarus caeruleus*, no qual a Cr-LAAO pode corresponder a cerca de 25% das proteínas totais. (24)

A LAAO purificada neste trabalho representou 0,92% do total de proteínas obtidas a partir de 300 mg do veneno de *C. d. terrificus*. Em contraste, no estudo de Bordon KCF (13), a

enzima isolada utilizando 1 g do mesmo veneno correspondeu a 0,5% da proteína total. (29) Essa diferença no rendimento possivelmente esta relacionada ao menor número de etapas cromatográficas empregadas neste protocolo, o que possivelmente contribuiu para menores perdas durante o processo de purificação.

Após a obtenção da LAAO isolada, a enzima foi submetida à digestão enzimática com tripsina, gerando peptídeos de interesse bioativo. A escolha da Tripsina se deu pela sua alta especificidade e clivagem em ligações peptídicas apenas no lado carboxila de resíduos de lisina (Lys) ou arginina (Arg), gerando fragmentos curtos (133). Em um contexto real de envenenamento, a LAAO entra em contato com diversas proteases endógenas, como metaloproteases de matriz, serinoproteases tripsina-like proteases lisossômicas liberadas durante a resposta inflamatória, como catepsinas, cuja ação combinada e menos específica pode gerar um perfil mais heterogêneo de criptídeos. Dessa forma, a tripsina representa um modelo inicial para identificação dos fragmentos bioativos, cabendo a estudos futuros avaliar a degradação proteolítica em ambiente fisiológico.

Esse processo de fragmentação está alinhado ao conceito de geração de criptídeos, ou seja, geração de pequenos peptídeos derivados de proteínas maiores e que podem apresentar propriedades biológicas distintas da molécula original (61-63). Além da digestão *in vitro* com proteases, como a tripsina, sugerimos que fragmentações semelhantes ocorram em ambientes biológicos, por ação de proteases endógenas presentes em membranas e tecidos ou no meio onde a enzima exerce sua atividade. Os efeitos antimicrobianos nas frações obtidas nesse estudo reforçam a hipótese de que a clivagem enzimática de toxinas pode originar compostos bioativos com potencial terapêutico.

Quando comparamos os nossos peptideos gerados a partir da clivagem da LAAO de *C.d. terrificus* com os fragmentos sintetizados quimicamente por Okubo BM *et al.* (31), observamos diferenças significativas (Tabela 5a). Os fragmentos derivados da LAAO de *B. matogrosensis* (BmLAO-f1, BmLAO-f2 e BmLAO-f3) demonstraram uma ampla atividade antimicrobiana contra diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os fragmentos peptídicos botrópicos apresentando concentrações inibitórias mínimas (CIM) de 22–64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para BmLAO-f1, 125–256  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para BmLAO-f2 e 110–220  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para BmLAO-f3, em especial o fragmento BmLAO-f1 apresentando a menor concentração inibitória (CIM) entre os derivados peptídicos do veneno de *B. matogrosensis*.

Enquanto os fragmentos de LAAO de *B. matogrosensis* (31) apresentaram ampla ação bactericida contra diferentes cepas testadas os peptídeos derivados da LAAO crotálica desse trabalho demonstraram uma atividade mais seletiva, com efeito predominantemente antifúngico. Entretanto a atividade antifúngica contra *Candida albicans* observada em nossas frações contrasta com os resultados obtidos com a LAAO nativa do veneno de *C. d. cumanensis* (30), no qual não relataram atividade da LAAO contra leveduras.

As diferenças observadas nas atividades dos peptídeos podem ser atribuídas tanto à espécie de origem da LAAO quanto às propriedades bioquímicas intrínsecas dos fragmentos, como carga líquida, hidrofobicidade e estrutura secundária (106). Além disso, fatores experimentais, como o método de obtenção dos diferentes peptídeos, incluindo purificação, liofilização e a protease utilizada, também influenciam diretamente nos resultados. Enquanto os fragmentos BmLAO (31) foram gerados de forma racional, com base em propriedades estruturais previamente conhecidas, os peptídeos analisados neste estudo são produtos naturais da digestão proteolítica da LAAO, o que pode conferir maior diversidade estrutural e funcional.

**Tabela 5** - Propriedades físico-químicas de peptídeos derivados da LAAO de *C.d.terrificus* encontrados neste estudo, em comparação com peptídeos descritos por Okubo BM *et al.* (31) (BmLAO-f). Foram incluídos parâmetros como, hidrofobicidade de Wimley-White (WWIHS), carga líquida, índice de hidrofobicidade (GRAVY), porcentagem de resíduos hidrofóbicos e índice de ligação a proteínas (Boman Index, em kcal/mol).

Peptídeos	WWIHS	Carga Líquida	Hidrofobicidade (%)	GRAVY	Wimley-White (WWIHS)	Boman Index (kcal/mol)
BmLAO-f1 IKFEPPLPPKKAH	5.13	+2.25	31%	-0.92	5,13	1.03
BmLAO-f2 KKFWEDDG	3.49	-1	25%	-2.10	3,49	3.63
BmLAO-f3 IYYPPNHNFN	-0.54	+0.25	18%	-1.25	-0,54	1.54
ETDYEEFLEIAR	7.49	-4	33%	-0.93	7,49	3.24
RFDEIVGGMDQLP TSMYEAIK	6.15	-2	38%	-0.27	6,15	1.57
HVVIVGAGMAGL	-0.35	+0.25	67%	1.83	-0,35	-2.17
GIGDDANFFQALD FK	1.78	-2	47%	-0.13	1,78	1.30
DWYANLGPMR	-0.49	0	40%	-0.82	-0,49	1.80

O conjunto de dados evidencia que, embora as SV- LAAOs sejam fontes promissoras de peptídeos antimicrobianos, o espectro de atividade pode variar significativamente entre espécies e entre os fragmentos derivados, reforçando a necessidade de triagens bioativas específicas para seleção de candidatos terapêuticos com perfis desejáveis.

A análise estrutural preditiva dos peptídeos revelou que os peptídeos derivados com maior atividade antimicrobiana apresentam características marcantes de peptídeos antimicrobianos (AMPs), como estrutura em  $\alpha$ -hélice, distribuição anfipática, hidrofobicidade e carga líquida. Tais características são fundamentais para interação com membranas celulares, favorecendo a ação antimicrobiana mesmo na ausência da atividade oxidativa da LAAO (134, 135). Os peptídeos analisados apresentaram um potencial de inserção em membranas lipídicas, evidenciado pelos índices de GRAVY, valores de carga e similaridade com AMPs depositados no APD3 (128).

A diversidade funcional observada nos peptídeos sugere que a combinação entre sequência e estrutura tridimensional influencia diretamente seu alvo e eficácia (136, 137), o que é

corroborado pela análise comparativa com peptídeos depositados no banco de dados APD3. Um exemplo a similaridade parcial entre fragmentos como HVVIVGAGMAGL e GIGDDANFFQALDFK e peptídeos naturais previamente descritos, como Signiferina, Hylain 1 e Temporinas (137-139).

Em relação à hidrofobicidade, destaca-se o peptídeo HVVIVGAGMAGL, com um GRAVY de +1,83 e 67% de resíduos hidrofóbicos, indicando elevado potencial de interação com membranas biológicas, característica frequentemente associada à atividade antimicrobiana. O índice GRAVY (Grand Average of Hydropathicity) reflete a média da hidrofobicidade dos resíduos de um peptídeo ou proteína, em que valores positivos indicam maior hidrofobicidade e menor solubilidade em água, enquanto valores negativos indicam maior hidrofília e maior solubilidade aquosa. Essa característica favorece a capacidade dos peptídeos de provocar perturbações na membrana, como a formação de poros, resultando em perda de integridade e lise celular (140).

Entre os peptídeos de Okubo (31), nenhum apresentou valores de hidrofobicidade tão elevados; o mais hidrofóbico IKFEPPLPPKKAH, com GRAVY de -0,91 e 31% de hidrofobicidade. Os peptídeos BmLAO-f2 KKFWEEDDG e BmLAO-f3 IYPPNHNFPN também mostram baixos índices hidrofóbicos (GRAVY de -2,10 e -1,25, respectivamente), o que pode influenciar sua seletividade ou restrição de atividade a determinadas classes de microrganismos (141-143).

A análise da carga líquida dos nossos peptídeos indicou um perfil mais ácido, conforme observado nos resultados em ETDYEEFLEIAR, RFDEIVGGMDQLPTSMYEAIK e GIGDDANFFQALDFK (com carga -4, -2 e -2, respectivamente), ao passo que os peptídeos de Okubo BM *et al.* (31) apresentam cargas neutras ou levemente catiônicas. Essa diferença pode impactar a interação com membranas bacterianas, especialmente as bactérias Gram-negativas, cuja superfície é carregada negativamente (143).

Embora tradicionalmente se associe a atividade antimicrobiana à presença de carga positiva, estudos recentes têm evidenciado que peptídeos antimicrobianos aniônicos também apresentam ação significativa (144 – 147).

Peptídeos com carga líquida negativa ou neutra tendem a depender de mecanismos alternativos de interação com a membrana, frequentemente mediados por cátions divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), que formam pontes salinas neutralizando a repulsão eletrostática e permitindo a aproximação à superfície celular (148–150). Além desse mecanismo, a literatura descreve processos por peptídeos aniônicos, grande parte não líticos, ou seja, sem causar lise, que podem explicar a atividade desses peptídeos, incluindo: interação com alvos específicos da parede ou membrana fúngica, como a glucosilceramida, lipídio essencial para o crescimento e a virulência de *C. albicans* (151); internalização e ação intracelular, interferindo em processos vitais e induzindo disfunção mitocondrial ou apoptose (152); e inibição de enzimas envolvidas na

biossíntese da parede celular, como 1,3- $\beta$ -glucano sintase e quitina sintase, comprometendo gradualmente a integridade estrutural e podendo levar à lise osmótica como efeito secundário (153). Esses peptídeos também podem inibir vias metabólicas essenciais, interferir na síntese de DNA, RNA ou proteínas, ou modular a resposta imune do hospedeiro, reforçando seu potencial como candidatos promissores para desenvolvimento de agentes terapêuticos (145–147).

O potencial de ligação às proteínas, estimado pelo índice de Boman, também variou entre os peptídeos, enquanto BmLAO-f2 (KKFWEDDG) apresenta um Boman Index elevado (3,63 kcal/mol), sugerindo um peptídeo hidrofílico e interferindo em processos intracelulares. Nossos peptídeos, como HVVIVGAGMAGL, apresentou índice negativo (-2,17 kcal/mol), o que pode favorecer uma ação na membrana do microrganismo, com menor propensão a interações proteicas específicas. (143).

A presença de resíduos hidrofóbicos em abundância sugere um mecanismo alternativo de interação, possivelmente por inserção nas membranas e desestabilização hidrofóbica (149). O índice de hidrofobicidade de Wimley-White (WWI) (134) fornece uma medida quantitativa desse mecanismo, sendo expresso em kcal/mol. Valores negativos indicam maior hidrofobicidade e propensão de interação com regiões apolares, como o interior da bicamada lipídica, enquanto valores positivos refletem peptídeos mais hidrofílicos, com potencial de interação preferencial em ambientes aquosos ou regiões polares da membrana (150, 151)

No presente estudo (Tabela 6), observou-se que o peptídeo HVVIVGAGMAGL apresentou valor negativo de WWI (-0,35 kcal/mol), o que corroborou com sua tendência a interagir com a porção hidrofóbica da membrana e possivelmente induzir perturbações estruturais. Em contraste, o peptídeo ETDYEEFLTELAR, com WWI de 7,49 kcal/mol, revelou perfil mais hidrofílico, compatível com uma menor afinidade pela região lipídica e possível atuação por outros mecanismos, como interação eletrostática com superfícies carregadas. Valores intermediários, como os observados em IKFEPPLPPKKAH (WWI = -0,92 kcal/mol) e GIGDDANFQLIDFK (WWI = -0,59 kcal/mol), indicam potencial de interação moderada com membranas, o que pode estar associado a seletividade frente a determinados tipos celulares.

A LAAO é uma flavoproteína homodimérica com um cofator de FAD em cada subunidade. Sua estrutura tridimensional é composta por um domínio de ligação ao FAD e um domínio de ligação ao substrato, que juntos formam o sítio ativo da enzima (150). Essa organização estrutural é fundamental para sua função enzimática, mas também determina as regiões das quais podem ser derivados os criptídeos.

Os dados de modelagem 3D demonstraram a presença de regiões helicoidais, Coil e estruturas mistas, permitindo a classificação dos peptídeos nas categorias estruturais estabelecidas por Wang Y. *et al* (136). Adicionalmente, a modelagem estrutural permitiu

identificar a localização dos peptídeos na conformação tridimensional da LAAO. Essa análise corrobora a possibilidade de ação direta sobre membranas microbianas, particularmente via mecanismos de desorganização lipídica ou formação de poros (150, 151).

As análises estruturais preditivas com a sobreposição dos peptídeos bioativos, revelou que as regiões com atividade antimicrobiana não são aleatórias, mas estão localizadas em domínios funcionais da enzima, indicando que os peptídeos ativos derivam tanto de regiões conservadas quanto de regiões mais variáveis da LAAO. Os cinco peptídeos destacados apresentam características associadas à atividade antimicrobiana, como: composição rica em resíduos hidrofóbicos, conformação anfipática prevista e estruturas em  $\alpha$ -hélice, favorecendo a interação com membranas microbianas (136,151). Contudo, observamos que a maioria dos peptídeos analisados são predominantemente de carga negativa. O único peptídeo identificado com carga positiva e elevado índice de hidrofobicidade foi o HVVIVGAGMAGL, cuja estrutura predita, no entanto, sugere uma conformação desordenada, o que pode limitar sua capacidade de interação com bicamadas lipídicas.

O peptídeo ETDYEEFLEIAR destacou-se por apresentar uma organização espacial predominantemente helicoidal, inserido em uma região estruturada e exposta da proteína nativa. Essas observações corroboram os dados obtidos por modelagem *in silico* por meio do I-TASSER (Tabela 5), que atribuiu uma estrutura helicoidal bem definida.

Conformações ricas em  $\alpha$ -hélices, como a observada nesse peptídeo, são frequentemente associadas à interação com membranas biológicas, modulação da atividade de receptores (152), inserção eficiente em bicamadas lipídicas e maior estabilidade em ambientes anfífilos (153, 154). Além disso, sua localização em uma região exposta da proteína favorece a suscetibilidade à clivagem enzimática, mesmo sob condições nativas, o que pode facilitar sua liberação. Notavelmente, mesmo após essa liberação, o peptídeo mantém sua estrutura helicoidal, e conseqüentemente, sua atividade antimicrobiana efetiva, sugerindo que sua estrutura contribui tanto para a estabilidade do peptídeo quanto para sua funcionalidade biológica.

Em contrapartida o peptídeo DWYANLGPMR, apresentou uma estrutura desordenada, estando localizado em uma alça exposta da proteína, configurando uma região flexível e suscetível à clivagem proteolítica. Peptídeos ricos em regiões desordenadas podem apresentar alta mobilidade conformacional e, quando liberados, podem se reorganizar em estruturas bioativas mediante interação com alvos celulares. Essa característica estrutural confere alta flexibilidade conformacional, o que pode ser vantajoso para peptídeos antimicrobianos. A flexibilidade permite que esses peptídeos se adaptem a diferentes superfícies e alvos moleculares, facilitando a interação com variadas composições de membranas microbianas e até com componentes intracelulares. Além disso, muitos peptídeos desordenados adotam conformações mais estruturadas, como  $\alpha$ -hélices, somente após o contato com membranas ou ligantes específicos, contribui para ampliar o espectro de ação antimicrobiana (155)

O peptídeo GIGDDANFFQALDFK revelou uma conformação mista com centro helicoidal e extremidades desordenadas, posicionando-se em uma alça externa, novamente favorecendo sua acessibilidade enzimática e potencial bioatividade.

Comparações com peptídeos bioativos previamente descritos no APD3 demonstram que a combinação de características estruturais, como observadas em RFDEIVGGMDQLPTSMYEAIK, inclui um potencial anfipático, flexibilidade conformacional e capacidade predita de inserção em membranas, justificando sua seleção como um candidato promissor para avaliação experimental. A ausência de carga positiva, embora limitante frente a microrganismos com membranas altamente aniônicas, pode não comprometer sua bioatividade frente a leveduras ou bactérias Gram-positivas, cuja composição de membrana é menos dependente de interações eletrostáticas (156). Dessa forma, a atividade antimicrobiana do peptídeo RFDEIVGGMDQLPTSMYEAIK deve ser validada por meio de ensaios funcionais frente a diferentes tipos de microrganismos, a fim de confirmar sua eficácia e elucidar seu possível mecanismo de ação.

Adicionalmente, o peptídeo HVVIVGAGMAGL, que apresentou o menor C-score entre os analisados (-0,73), exibiu uma estrutura desordenada, também estando localizada em uma região superficial e flexível da LAAO, facilitando sua clivagem. Tal perfil pode ser relevante do ponto de vista funcional, uma vez que a flexibilidade conformacional é um fator importante para a interação de peptídeos antimicrobianos (AMPs) com membranas bacterianas e fúngicas (157, 158).

Nossos resultados fortalecem a hipótese de que a atividade antimicrobiana da LAAO transcende o papel clássico de geração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), abrangendo também a liberação de fragmentos peptídicos bioativos (criptídeos) capazes de modular respostas microbianas de forma seletiva. Tal diversidade de mecanismos amplia o espectro potencial de ação dessa enzima, sugerindo que a LAAO possa atuar como uma fonte multifuncional de moléculas bioativas.

Entretanto, a translação desses peptídeos para aplicações terapêuticas exige a superação de barreiras, incluindo a estabilidade desses criptídeos em meios biológicos, a suscetibilidade à degradação proteolítica e a manutenção da atividade em condições fisiológicas. Abordagens como a incorporação a sistemas nanoestruturados de liberação controlada, conjugação com moléculas carreadoras ou até mesmo a produção recombinante com otimização de sequência podem ser consideradas estratégias promissoras para aumentar a eficácia desses compostos (141, 142).

Assim, os resultados aqui apresentados além de ampliar o entendimento funcional da LAAO do veneno de *C. d. terrificus*, a coloca como uma fonte promissora de criptídeos bioativos ampliando nossa compreensão da evolução dos venenos e da bioprospecção de toxinas.

A LAAO se mostrou capaz de gerar criptídeos bioativos por clivagem proteolítica, revelando uma possível função adaptativa que contribui para a evolução dos venenos. Esse mecanismo permite que fragmentos peptídicos desenvolvam novas funções tóxicas ou defensivas, aumentando sua eficiência biológica, sem a necessidade de expansão genética. Para a bioprospecção de toxinas, esse conceito amplia o repertório de moléculas bioativas com potencial para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos clínicos mais seletivos.

## 6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi realizada a purificação de uma L-aminoácido oxidase (LAAO) do veneno de *C. d. terrificus* por meio de dois passos cromatográficos. A caracterização da enzima, seguida da digestão enzimática com tripsina, resultou na geração de 11 frações da LAAO, que foram então submetidas a testes microbiológicos contra *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*.

Os resultados obtidos indicam que fragmentos gerados a partir da digestão proteolítica da LAAO também podem exibir características associadas a peptídeos bioativos. Esses efeitos não se limitam à produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), tradicionalmente atribuída à atividade biológica da enzima em venenos de serpentes. Tais fragmentos, denominados peptídeos crípticos, são originados por clivagem enzimática de proteínas maiores e podem apresentar propriedades bioativas distintas da proteína precursora.

A avaliação da estrutura e localização das sequências peptídicas obtidas por digestão com tripsina evidenciou fragmentos localizados em regiões expostas da proteína nativa, frequentemente associadas a estruturas flexíveis ou desordenadas. Essas regiões tendem a apresentar maior suscetibilidade à clivagem enzimática e podem estar relacionadas à liberação espontânea de criptídeos bioativos *in vivo*. Além disso, a análise *in silico* sugeriu que alguns desses peptídeos possuem características estruturais favoráveis à interação com membranas, como carga positiva e potencial de anfipaticidade, reforçando sua relevância como candidatos a agentes antimicrobianos.

A identificação desses fragmentos abre caminhos promissores para futuras pesquisas, uma vez que sua eficácia contra patógenos relevantes pode contribuir para o desenvolvimento de novos candidatos terapêuticos. Recomenda-se a realização de estudos adicionais para elucidar os mecanismos de ação desses criptídeos e explorar sua aplicabilidade na medicina, especialmente no combate a infecções bacterianas e fúngicas resistentes a tratamentos convencionais.

## 7 REFERÊNCIAS

- 01- Calvete JJ. Snake venomomics: from the inventory of toxins to biology. *Toxicon*. 2013;75:44–62. doi:10.1016/j.toxicon.2013.03.020.
- 02- Casewell NR, Wüster W, Vonk FJ, Harrison RA, Fry BG. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends Ecol Evol*. 2013;28(4):219–29. doi:10.1016/j.tree.2012.10.020.
- 03- Gibbs HL, Mackessy SP. Functional basis of a molecular adaptation: prey-specific toxic effects of venom from *Sistrurus rattlesnakes*. *Toxicon*. 2009;53(6):672–9. doi:10.1016/j.toxicon.2009.01.038.
- 04- Saviola AJ, Chiszar D, Mackessy SP. Molecular basis for prey relocation in viperid snakes. *BMC Biol*. 2013;11:20. doi:10.1186/1741-7007-11-20.
- 05- Guedes TB, Entiauspe-Neto OM, Costa HC. Lista de répteis do Brasil: atualização de 2022. *Herpetol Bras*. 2023;12(1):56–161. doi:10.5281/zenodo.7829013.
- 06- Duarte MR, Menezes FA. Is the population of *Crotalus durissus* (Serpentes, Viperidae) expanding in Brazil? *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2013;19:30. doi:10.1186/1678-9199-19-30.
- 07- Calvete JJ, Juárez P, Sanz L. Snake venomomics: strategy and applications. *J Mass Spectrom*. 2007;42(11):1405–14. doi:10.1002/jms.1242.
- 08- Lourenço Junior A. Variação sexual, ontogenética e ambiental do veneno de *Crotalus durissus terrificus* da região de Botucatu – São Paulo: caracterização enzimática, bioquímica e farmacológica [dissertação]. Botucatu: UNESP; 2011.
- 09- Prado-Franceschi J, Vital Brazil O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*. 1981;19(5):875–87. doi:10.1016/0041-0101(81)90111-4.
- 10- Hayashi MA, Oliveira EB, Kerkis A, Oliveira V, Pereira A, Radis-Baptista G, et al. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2008;14(4):651–61. doi:10.1590/S1678-91992008000400008.
- 11- Laure CJ. *Crotalus durissus terrificus* Venom: Crotoxin and Inter-Cro. *Mem Inst Butantan*. 1990;52(Supl.):17-19.
- 12- Toyama MH, Marangoni S, Novello JC, Leite GB, Prado-Franceschi J, Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L. Biophysical, histopathological and pharmacological characterization of crotamine isoforms F22 and F32. *Toxicon*. 2003;41(4):493–500. doi:10.1016/S0041-0101(02)00390-2.
- 13- Bordon KCF, Perino MG, Giglio JR, Arantes EC. Isolation, enzymatic characterization and anti-edematogenic activity of the first reported rattlesnake hyaluronidase from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Biochimie*. 2012;94(12):2740–8. doi:10.1016/j.biochi.2012.08.014.
- 14- Zeller A, Maritz A. Über eine neue Laminosäureoxidase. *Helv Chim Acta*. 1944;27:1888–903.

- 15- Du XY, Clemetson KJ. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon*. 2002;40(6):659–65. doi:10.1016/S0041-0101(02)00102-2.
- 16- Nishizawa T, Aldrich CC, Sherman DH. Molecular analysis of the rebeccamycin L-amino acid oxidase from *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243. *J Bacteriol*. 2005;187(6):2084–92. doi:10.1128/JB.187.6.2084-2092.2005.
- 17- Piedras P, Pineda M, Muñoz J, Cárdenas J. Purification and characterization of an L-amino acid oxidase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*. 1992;188(1):13–18. doi:10.1007/BF00198934.
- 18- Zelanis A, Tashima AK, Rocha MM, Furtado MFD, Camargo ACM, Ho PL, et al. Analysis of the venom proteome of *Crotalus durissus terrificus* from southeastern Brazil: Identification of L-amino acid oxidase isoforms and establishment of a reference venom proteome. *J Proteomics*. 2010;73(5):915–27.
- 19- Lima EO, Tasima LJ, Hatakeyama DM, Serino-Silva C, Rodrigues CFB, Galizio NC, et al. Cor do veneno de cobra e L-aminoácido oxidase: uma evidência da plasticidade do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em cativeiro a longo prazo. *Toxicon*. 2021 Apr 15;193:73–83. doi: 10.1016/j.toxicon.2021.01.006. Epub 2021 Jan 27. PMID: 33515573.
- 20- Costa TR, Burin SM, Menaldo DL, de Castro FA, Sampaio SV. Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2014;20:23. doi:10.1186/1678-9199-20-23.
- 21- S. S. Chen, J. Hudspeth Walgate, and J. A. Duerre, “Oxidative deamination of sulfur amino acids by bacterial and snake venom l-amino acid oxidase,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 146, no. 1, pp. 54–63, 1971
- 22- Ali SA, Stoeva S, Abbasi A, Alam JM, Kayed R, Faigle M, Neumeister B, Voelter W. Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Dec 15;384(2):216–26. doi:10.1006/abbi.2000.2130.
- 23- Macheroux P, Seth O, Bollschweiler C, Schwarz M, Kurfürst M, Au LC, et al. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1207(2):235–42.
- 24 - Izidoro LFM, Sobrinho JC, Mendes MM, Costa TR, Grabner AN, Rodrigues VM, et al. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. *Biomed Res Int*. 2014; doi.org/10.1155/2014/196754.
- 25- Fonseca FV. Isolamento e Caracterização de um novo conjunto de serinoproteases com atividade trombina-like e de L-aminoácido oxidase do veneno de *Crotalus durissus cascavella* [dissertação]. Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas; 2006.
- 26- Moustafa IM, Foster S, Lyubimov AY, Vrielink A. Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: insight into structure and mechanism. *J Mol Biol*. 2006;364(5):991-1002. doi:10.1016/j.jmb.2006.09.032.
- 27- Georgieva D, Murakami M, Perbandt M, Arni R, Betzel C. The structure of a native L-amino acid oxidase, the major component of the *Vipera ammodytes ammodytes* venom, reveals dynamic active site and quaternary structure stabilization by divalent ions. *Mol Biosyst*. 2011;7(2):379-384. doi:10.1039/C0MB00101E.

- 28- Zhang H, Teng M, Niu L, Wang Y, Wang Y, Liu Q, 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 Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004;60(Pt 5):974-977. doi:10.1107/S0907444904000046.
- 29- Bordon KCF, Wiezel GA, Cabral H, Arantes EC. Bordonein-L, a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus terrificus* snake venom: isolation, preliminary characterization and enzyme stability. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2015;21:25. doi: 10.1186/s40409-015-0025-8.
- 30- Vargas LJ, Quintana JC, Pereañez JA, Núñez V, Sanz L, Calvete JJ. Cloning and characterization of an antibacterial L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cumaniensis* venom. *Toxicon*. 2013 Mar 15;64:1–11. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.11.027.
- 31- Okubo BM, Silva ON, Migliolo L, Gomes DG, Porto WF, Batista CL, et al. Evaluation of an Antimicrobial L-Amino Acid Oxidase and Peptide Derivatives from *Bothropoides matogrosensis* Pitviper Venom. *PLoS One*. 2012 Mar 16;7(3):e33639. doi:10.1371/journal.pone.0033639.
- 32 - Chen SS, Walgate JH, Duerr JA. Oxidative deamination of sulfur amino acids by bacterial and snake venom L-amino acid oxidase. *J Biol Chem*. 1971;246(15):4722–4728.
- 33- Suhr SM, Kim DS. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;226(2):424–428. doi: 10.1006/bbrc.1996.1155.
- 34- Gonçalves-de-Andrade RM, Rangel R, Furtado MFC, Silva RM, Pinto AF, Lima JTR, et al. Structure–Function Studies and Mechanism of Action of Snake Venom L-Amino Acid Oxidases. *Front Pharmacol*. 2020 Feb 24;11:110. doi: 10.3389/fphar.2020.00110.
- 35- Zhang YJ, Wang JH, Lee WH, Wang Q, Liu H, Zheng YT, et al. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;309(3):598–604. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.08.070.
- 36- Torii S, Naito M, Tsuruo T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western Diamondback Rattlesnake venom. *J Biol Chem*. 1997 Jan 31;272(5):2753-2758. doi: 10.1074/jbc.272.5.2753.
- 37- Masuda S, Araki S, Yamamoto T, Kaji K, Hayashi H. Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Jun 2;237(3):713-717. doi: 10.1006/bbrc.1997.7008.
- 38- Zainal Abidin SA, Rajadurai P, Chowdhury MEH, Rusmili MRA, Othman I, Naidu R. Cytotoxic, anti-proliferative and apoptosis inducing activity of L-amino acid oxidase (LAAO) from Malaysian *Calloselasma rhodostoma* on human colon cancer cells. *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 15;19(6):1711. doi: 10.3390/ijms19061711.
- 39- Souza DHF, Eugenio LM, Fletcher JE, Jiang MS, Garratt RC, Oliva G, Selistre-de-Araujo HS. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. *Biochemistry*. 1999 Jun 1;38(22):6942-6949. doi: 10.1021/bi990438a.
- 40- Ahn MY, Lee BM, Kim YS. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of King Cobra (*Ophiophagus hannah*). *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2007;22(6):623-629. doi: 10.1080/14756360701444256.

- 41- Li ZY, Yu TF, Lian EC-Y. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from King Cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. *Biochem J.* 1994 Jul 15;303(2):571-576. doi: 10.1042/bj3030571.
- 42- Sakurai Y, Shima M, Matsumoto T, Takatsuka H, Nishiya K, Kasuda S, et al. Anticoagulant activity of M-LAO, L-amino acid oxidase purified from *Agkistrodon halys blomhoffii*, through selective inhibition of factor IX. *Thromb Haemost.* 2003 Jul;89(1):124-131. doi: 10.1160/TH02-10-0642.
- 43- Fisher G, Lorenzo N, Abe H, Fujita E, Frey WH, Emory C, Di Fiore MM, D'Aniello A, Free D- and L-amino acids in ventricular cerebrospinal fluid from Alzheimer and normal subjects. *Neurobiol Aging.* 1998 Sep-Oct;19(5):493-498. doi: 10.1016/S0197-4580(98)00062-9.
- 44- Ponte AS, Setúbala SS, Xaviera CV, Lacouth-Silva F, Kayano AM, Pires WL, et al. Effect of L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* snake venom on human neutrophils. *Toxicon.* 2018 Oct;148:121-129. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.07.016.
- 45- Lee ML, Tan NH, Fung SY, Sekaran SD. Antibacterial action of a heat-stable form of L-amino acid oxidase isolated from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Toxicon.* 2010 Nov;56(5):791-799. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.09.029.
- 46- Kasai K, Nakano M, Ohishi M, Nakamura T, Miura T. Antimicrobial properties of L-amino acid oxidase: biochemical features and biomedical applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021 Jul;105(14):5525-5535. doi: 10.1007/s00253-021-11382-w.
- 47- Kitani Y, Kikuchi N, Zhang G, Ishizaki S, Shimakura K, Shiomi K, Nagashima Y. Antibacterial action of L-amino acid oxidase from the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegelii*. *Toxicon.* 2007 Dec;50(6):839-845. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.08.019.
- 48- Torres AFC, Dantas RT, Menezes RRPPB, Toyama MH, Filho ED, Oliveira MF, et al. Antimicrobial activity of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops leucurus* snake venom. *J Venomous Anim Toxins incl Trop Dis.* 2010;16(4):614-622. doi: 10.1590/S1678-91992010000400006.
- 49- Tempone AG, Andrade HF Jr, Spencer PJ, Lourenço CO, Rogero JR, Nascimento N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Feb;45(2):497-503. doi: 10.1128/AAC.45.2.497-503.2001.
- 50- Barbosa LG, Silva GGA, Nascimento FP, Silva SS, Lima MDA, Santos LS, et al. Leishmanicidal activity of L-amino acid oxidase from *Bothrops jararacussu* and *Bothrops moojeni* venoms: Cytotoxic effects on *Leishmania* promastigotes and mitochondrial membrane depolarization. *Toxicon.* 2020 Dec;188:1-9. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.08.002.
- 51- Barbosa LG, Costa TR, Borges IP, Costa MS, Carneiro AC, Borges BC, et al. A comparative study on the leishmanicidal activity of the L-amino acid oxidases BjuLAAO-II and BmooLAAO-II isolated from Brazilian *Bothrops* snake venoms. *Int J Biol Macromol.* 2020 Dec;165:1765-1774. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.146.
- 52- Ahn MY, Lee BM, Kim YS. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Arch Pharm Res.* 1997;20(3):250-6.

- 53- Nikodijević DD, Nikezić AG, Jovankić JV, Cvetković DM, Milutinović MG, Anđelković MZ. L-amino acid oxidase from snake venom: Biotransformation and induction of apoptosis in human colon cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 2021;910:174466.
- 54- Salama WH, Ibrahim NM, El Hakim AE, Bassuiny RI, Mohamed MM, Mousa FM, Ali MM. L-Amino acid oxidase from *Cerastes vipera* snake venom: Isolation, characterization and biological effects on bacteria and tumor cell lines. *Toxicon.* 2018;150:270–9. doi:10.1016/j.toxicon.2018.06.064.
- 55- Abdelkafi-Koubaa Z, ElBini-Dhouib I, Souid S, Jebali J, Doghri R, Srairi-Abid N, et al. Pharmacological investigation of CC-LAAO, an L-amino acid oxidase from *Cerastes cerastes* snake venom. *Toxins (Basel).* 2021;13(12):904. doi:10.3390/toxins13120904.
- 56- Torres AFC, Dantas RT, Toyama MH, Diz Filho E, Zara FJ, Queiroz MGR, et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. *Biochem Pharmacol.* 2010;79(3):447–54.
- 57- Fernandes TAM, Costa TR, Menezes RP, Souza MA, Martins CHG, Nicolau Junior N, et al. *Bothrops* snake venom L-amino acid oxidases impair biofilm formation of clinically relevant bacteria. *Toxicon.* 2024;238:107569. doi:10.1016/j.toxicon.2023.107569.
- 58- Abdelkafi-Koubaa Z, Aissa I, Morjen M, Kharrat N, El Ayeb M, Gargouri Y, et al. Interaction of a snake venom L-amino acid oxidase with different cell types membrane. *Int J Biol Macromol.* 2016;82:952–8. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.09.065.
- 59- Toyama MH, Toyama DO, Passero LFD, Laurenti MD, Corbett CE, Tomokane TY, et al. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon.* 2006;47(8):859–68. doi:10.1016/j.toxicon.2005.09.013.
- 60- Fernandez ML, Broadbent JA, Shooter GK, Malda J, Upton Z. Development of an enhanced proteomic method to detect prognostic and diagnostic markers of healing in chronic wound fluid. *Br J Dermatol.* 2008 Feb;158(2):281-90.
- 61- Pimenta DC, Lebrun I. Cryptides: buried secrets in proteins. *Peptides.* 2007Dec;28(12):2403-10. Epub 2007 Oct 11.
- 62- Autelitano DJ, Rajic A, Smith AI, Berndt MC, Ilag LL, Vadas M. The cryptome: a subset of the proteome, comprising cryptic peptides with distinct bioactivities. *Drug Discovery Today.* 2006 Apr;11(7-8):343-6.
- 63- Ner J, Kotlinska JH, Silberring J. Crypteins--an overlooked piece of peptide systems. *Curr Protein Pept Sci.* 2015;16(3):203-18.
- 64- Ueki N, Someya K, Matsuo Y, Wakamatsu K, Mukai H. Cryptides: functional cryptic peptides hidden in protein structures. *Biopolymers.* 2007;88:190–8.
- 65- Tsuruki T, Kishi K, Takahashi M, Tanaka M, Matsukawa T, Yoshikawa M, et al. An immunostimulating peptide derived from soybean beta-conglycinin, is an fMLP agonist. *FEBS Lett.* 2003;540:206–10.
- 66- Ianzler D, Konno K, Xavier CH, Stocklin R, Santos RA, de Camargo AC, et al. Hemorphin and hemorphin-like peptides isolated from dog pancreas and sheep brain are able to potentiate bradykinin activity in vivo. *Peptides.* 2006;27:2957–66.
- 67- Brantl V, Gramsch C, Lottspeich F, Mertz R, Jaeger KH, Herz A. Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. *Eur J Pharmacol.* 1986;125:309–10.

- 68- Liebmann C, Schrader U, Brantl V. Opioid receptor affinities of the blood-derived tetrapeptides hemorphin and cytochrophin. *Eur J Pharmacol.* 1989;166:523–6.
- 69- Lantz I, Glämsta EL, Talbäck L, Nyberg F. Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity. *FEBS Lett.* 1991;287:39–41.
- 70- Piot JM, Zhao Q, Guillochon D, Ricart G, Thomas D. Isolation and characterization of two opioid peptides from a bovine hemoglobin peptic hydrolysate. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;189:101–10.
- 71- Dagouassat N, Garreau I, Zhao Q, Sannier F, Piot JM. Kinetic of *in vitro* generation of some hemorphins: early release of LVV-hemorphin-7, precursor of VV-hemorphin-7. *Neuropeptides.* 1996;30:1–5.
- 72- Cohen M, Fruitier-Arnaudin I, Sauvan R, Birnbaum D, Piot JM. Serum levels of hemorphin-7 peptides in patients with breast cancer. *Clin Chim Acta.* 2003;337:59–67.
- 73- Zhao Q, Sannier F, Garreau I, Guillochon D, Piot JM. Inhibition and inhibition kinetics of angiotensin converting enzyme activity by hemorphins, isolated from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;204:216–23.
- 74- Fruitier-Arnaudin I, Cohen M, Nervi S, Bordenave S, Sannier F, Piot JM. Reduced level of opioid peptides, hemorphin-7 peptides, in serum of diabetic patients. *Diabetes Care.* 2003;26:2480.
- 75- Fruitier-Arnaudin I, Cohen M, Coitoux C, Piot JM. *In vitro* metabolism of LVV-hemorphin-7 by renal cytosol and purified prolyl endopeptidase. *Peptides.* 2003;24:1201–6.
- 76- Ng JH, Ilag LL. Cryptic protein fragments as an emerging source of peptide drugs. *IDrugs.* 2006 May;9(5):343-6.
- 77- Seidah NG, Chrétien M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilisins generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* 1999;848:45–62.
- 78- Enoch DA, Yang H, Aliyu SH, Micallef C. The changing epidemiology of invasive fungal infections. *Methods Mol Biol.* 2017;1508:17–65.
- 79- Medici N, Poeta M. New insight on the development on fungal vaccines: from immunity to recent challenges. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110:966-973.
- 80- Spampinato C, Leonardi D. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Res Int.* 2013;2013:1-13.
- 81- Lu H, Shrivastava M, Whiteway M, Jiang Y. Candida albicans targets that potentially synergize with fluconazole. *Crit Rev Microbiol.* 2021 May;47(3):323-337. doi: 10.1080/1040841X.2021.1884641. Epub 2021 Feb 15.
- 82- Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jul;28(3):603–61.
- 83- Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Sep;7(9):629–41.

- 84- Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Oct 25;4(1):18033.
- 85- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Jun;44(6):1549–55.
- 86- Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol*. 2008 Aug;8(6):747–63.
- 87- Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*. 2011 Nov-Dec;2(5):445–59.
- 88- Klein EY, Sun L, Smith DL, Laxminarayan R. The changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: a national observational study. *Am J Epidemiol*. 2013 Jun 1;177(7):666–74.
- 89- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Feb;2(2):123–40.
- 90- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jan;11(1):142–201.
- 91- Blanco J, Mora A, Mamani R, López C, Blanco M, Dahbi G, et al. National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131 and O15:H1-D-ST393 in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2011 May;66(9):2011–21.
- 92- Kim KS. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat Rev Neurosci*. 2003 May;4(5):376–85.
- 93- Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jul;28(3):565–91.
- 94- Tängdén T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med*. 2015 Apr;277(5):501–12.
- 95- Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008;8(3):159–166.
- 96- Nunes DC, Sampaio SC, Ricaluca KCT, da Silva TG, Junqueira-de-Azevedo ILM, Fuly AL. Antibacterial activity of venom phospholipases A2: an overview. *Curr Med Chem*. 2020;27(28):4693–712.
- 97- Caldeira CAS, Diniz-Sousa R, Pimenta DC, Santos APA, Teles CBG, Matos NB, et al. Antimicrobial peptidomes of *Bothrops atrox* and *Bothrops jararacussu* snake venoms. *Amino*

Acids. 2021 Oct;53(10):1635–48. doi:10.1007/s00726-021-03055-y.

98- Oguiura N, Sanches L, Duarte PV, Sulca-López MA, Machini MT. Past, Present, and Future of Naturally Occurring Antimicrobials Related to Snake Venoms. *Animals*. 2023;13(4):744. doi:10.3390/ani13040744.

99- Rodríguez AA, Otero-González A, Ghattas M, Ständker L. Discovery, optimization, and clinical application of natural antimicrobial peptides. *Biomedicines*. 2021;9(10):1381. doi:10.3390/biomedicines9101381.

100- Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem*. 1980;106(1):7–16. doi:10.1111/j.1432-1033.1980.tb05991.x.

101- Wu Q, Patočka J, Kuča K. Insect antimicrobial peptides, a mini review. *Toxins (Basel)*. 2018;10(11):461. doi:10.3390/toxins10110461.

102- González García M, San Juan Galán J, Morales Vicente FE, Otero González AJ. Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas. *Rev Cubana Med Trop*. 2017;69(2): e 197.

103- Wang G. Unifying the classification of antimicrobial peptides in the antimicrobial peptide database. *Methods in Enzymology*. 2022;663:1-18.

104- Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016 Dec 27;6:194. doi:10.3389/fcimb.2016.00194.

105- Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*. 2006;24(12):1551-7. doi:10.1038/nbt1267.

106- Wang G. *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies*. 2nd ed. Wallingford, England: CABI; 2017.

107- Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev*. 2003 Mar;55(1):27-55. doi: 10.1124/pr.55.1.2.

108- Wang G. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. *Methods Mol Biol*. 2015;1268:43-66.

109- Li Q, Montalban-Lopez M, Kuipers OP. Increasing the antimicrobial activity of nisin-based lantibiotics against Gram-negative pathogens. *Appl Environ Microbiol*. 2018 May 31;84(12): e00052-18. doi: 10.1128/AEM.00052-18.

110- D'Andrea LD, Romanelli A. Temporins: Multifunctional peptides from frog skin. *Int J Mol Sci*. 2023;24(6):5426. doi:10.3390/ijms24065426.

111- Santos R, Oliveira M, Lima T, Ferreira J. Boas práticas na produção e manejo de venenos animais: aspectos éticos e técnicos. *Rev Bras Toxicol*. 2021;34(2):115–23.

- 112- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- 113- Kishimoto T, Ogawa S, Hayashi K, Murakami Y. Enzymatic assay of L-amino acid oxidase activity using peroxidase-coupled reaction with o-phenylenediamine. *J Biochem.* 2001;130(5):771-4.
- 114- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
- 115- Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 1992;203(1):173-9. doi:10.1016/0003-2697(92)90061-B.
- 116- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.* Approved standard. 9th ed. CLSI document M07-A9. Wayne (PA): CLSI; 2012.
- 117- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996;68(5):850-8. doi:10.1021/ac950914h.
- 118- Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 1982;157(1):105-32. doi:10.1016/0022-2836(82)90515-0.
- 119- Wimley WC, White SH. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol.* 1996 Oct;3(10):842-8. doi:10.1038/nsb1096-842.
- 120- Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med.* 2003 Sep;254(3):197-215. doi:10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x.
- 121- Zheng W, Zhang C, Li Y, Pearce R, Bell EW, Zhang Y. Folding non-homology proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. *Cell Rep Methods.* 2021;1:100014.
- 122- Zhang C, Freddolino PL, Zhang Y. COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein-protein interaction information. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:W291-299.
- 123- Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:W174-W181.
- 124- Tomasello G, Armenia I, Molla G. The Protein Imager: a full-featured online molecular viewer interface with server-side HQ-rendering capabilities. *Bioinformatics.* 2020;36(9):2909-11. doi:10.1093/bioinformatics/btaa009.
- 125- Wang HX, Ng TB. An antifungal peptide from the coconut. *Peptides.* 2005 Dec;26(12):2392-6. doi:10.1016/j.peptides.2005.05.009.

- 126- Conlon JM, Halverson T, Dulka J, Platz JE, Knoop FC. Peptides with antimicrobial activity of the brevinin-1 family isolated from skin secretions of the southern leopard frog, *Rana sphenoccephala*. *J Pept Res*. 1999 Dec;54(6):522–7. doi:10.1034/j.1399-3011.1999.00123.x.
- 127- Maselli VM, Bilusich D, Bowie JH, Tyler MJ. Host-defence skin peptides of the Australian Streambank Froglet *Crinia riparia*: isolation and sequence determination by positive and negative ion electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006;20(5):797–803. doi:10.1002/rcm.2360.
- 128- Wu J, Liu H, Yang H, Yu H, You D, Ma Y, Ye H, Lai R. Proteomic analysis of skin defensive factors of tree frog *Hyla simplex*. *J Proteome Res*. 2011 Sep 2;10(9):4230–40. doi:10.1021/pr200393t.
- 129- Diniz LCL, Alves FL, Miranda A, da Silva PI Jr. Two tachykinin-related peptides with antimicrobial activity isolated from *Triatoma infestans* hemolymph. *Microbiol Insights*. 2020;13:1178636120933635. doi:10.1177/1178636120933635.
- 130- Toyama MH, Toyama DO, Passero LF, Laurenti MD, Corbett CE, Tomokane TY, et al. Isolation of a new isoform of L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* snake venom. *Toxicon*. 2006;47(8):840–8.
- 131- Zhang L, Rao Z, Tang J, Zhan Y, Sun Y, Xiong Y, et al. Purification, characterization and biological activities of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys pallas* venom. *Toxicon*. 2004;44(6):693–700.
- 132- Tõnismägi K, Samel M, Subbi J, Rützel Boudinot S, Rönholm G, Kalkkinen N, et al. L-amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. *Biochimie*. 2006;88(7):515–25.
- 133- Elgendy AS, Al-Ruweidi MK. A literature review on trypsin enzyme. Qatar University; 2016. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/289376015>
- 134- Wimley WC, White SH. Membrane peptide interactions: hydrophobicity rules and the integration of peptide folding and membrane binding. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1286(2):221-233.
- 135- Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002;415(6870):389-395. IGUAL A 137
- 136- Wang Y, Zhang Y, Lee WH, et al. A snake venom-derived antimicrobial peptide with cell-selective toxicity. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008;40(4):285–92. 13
- 137- Maselli VM, Bilusich D, Bowie JH, Tyler MJ. Host-defence skin peptides of the Australian Streambank Froglet *Crinia riparia*: isolation and sequence determination by positive and negative ion electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006;20(5):797–803. doi: 10.1002/rcm.2360. PMID: 16470724.
- 138- Wu J, Liu H, Yang H, Yu H, You D, Ma Y, et al. Proteomic analysis of skin defensive

- factors of tree frog *Hyla simplex*. *J Proteome Res.* 2011 Sep 2;10(9):4230–40. doi: 10.1021/pr200393t. PMID: 21740067.
- 139- Jiang S, Zha Y, Zhao T, Jin X, Zhu R, Wei S, et al. Antimicrobial peptide temporin derivatives inhibit biofilm formation and virulence factor expression of *Streptococcus mutans*. *Front Microbiol.* 2023;14:10562637. PMID: 37822738; PMCID: PMC10562637.
- 140 - Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 1982 May 5;157(1):105–32. doi:10.1016/0022-2836(82)90515-0. PMID: 7108955
- 141 – Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 2002 Jan 24;415(6870):389–95.
- 142 - Hancock REW, Sahl H-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* 2006 Dec;24(12):1551–7.
- 143- Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D1087–93.
- 144 - Lohner K, Blondelle SE. Molecular mechanisms of membrane perturbation by antimicrobial peptides and the use of biophysical studies in the design of novel peptide antibiotics. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2005;8(3):241-56.
- 145- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(3):238-50.
- 146- Schneider T, Sahl HG. Anionic antimicrobial peptides: an emerging class of antibiotics. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1794(7):847-57.
- 147- Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev.* 2003;55(1):27-55.
- 148 - Yeung ATY, Gellatly SL, Hancock REW. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(13):2161-76. doi:10.1007/s00018-011-0710-x.
- 149 - Giuliani A, Pirri G, Nicoletto S. Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sci.* 2007;2(1):1-33. doi:10.2478/s11535-007-0010-5.
- 150- Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, Mackey V, Coy DH, He Q. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res.* 2019;11(7):3919-31. PMID: 31396309; PMCID: PMC6684887.
- 151- Wang L, Wang Y, Huang X, Ma R, Li J, Wang F, Jiao N, Zhang R. Potential metabolic and genetic interaction among viruses, methanogen and methanotrophic archaea, and their syntrophic partners. *ISME Commun.* 2022;2:50. doi:10.1038/s43705-022-00135-2. PMID: 37938729; PMCID: PMC9723712.
- 152- Li J, Koh JJ, Liu S, Lakshminarayanan R, Verma CS, Beuerman RW. Membrane active antimicrobial peptides: Translating mechanistic insights to design. *Front Neurosci.* 2017;11:73. doi:10.3389/fnins.2017.00073. PMID: 28261050; PMCID: PMC5306396.

153- Gray KC, Palacios DS, Dailey I, Endo MM, Uno BE, Wilcock BC, Burke MD. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(7):2234-9. doi:10.1073/pnas.1117280109.

149- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*. 2005 Mar;3(3):238–50.

150- Colon JM. The therapeutic potential of microbial peptides. *Nat Rev Drug Discov*. 2014 May; 13(5):321-37.

151- Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev*. 2003 Mar;55(1):27–55. doi: 10.1124/pr.55.1.2. PMID: 12615953.

152- Wang Z, Wang G. APD: the antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 1;32(Database issue):D590–2.

153- Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol*. 2011 Sep;29(9):464–72. doi:10.1016/j.tibtech.2011.05.001. PMID: 21680034.

154- Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013;6(12):1543–75. doi:10.3390/ph6121543.

155- Uversky VN. Intrinsically disordered proteins and their “mysterious” (meta)physics. *Front Phys*. 2019;7:10. doi:10.3389/fphy.2019.00010.

156- Decker AP, Mechesso AF, Wang G. Expanding the landscape of amino acid-rich antimicrobial peptides: definition, deployment in nature, implications for peptide design and therapeutic potential. *Int J Mol Sci*. 2022;23(21):12874. doi:10.3390/ijms232112874.

157- Melo MN, Ferre R, Castanho MARB. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Mar;7(3):245–50. doi:10.1038/nrmicro2095. PMID: 19219054.

158- Wimley WC, Hristova K. Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. *J Membr Biol*. 2011 Jan;239(1-2):27–34. doi:10.1007/s00232-011-9343-0. PMID: 21225255; PMCID: PMC3166253.

## ANEXOS

## Anexo 1. Dispensa de parecer ético ofício nº 016/2023



## ATESTADO

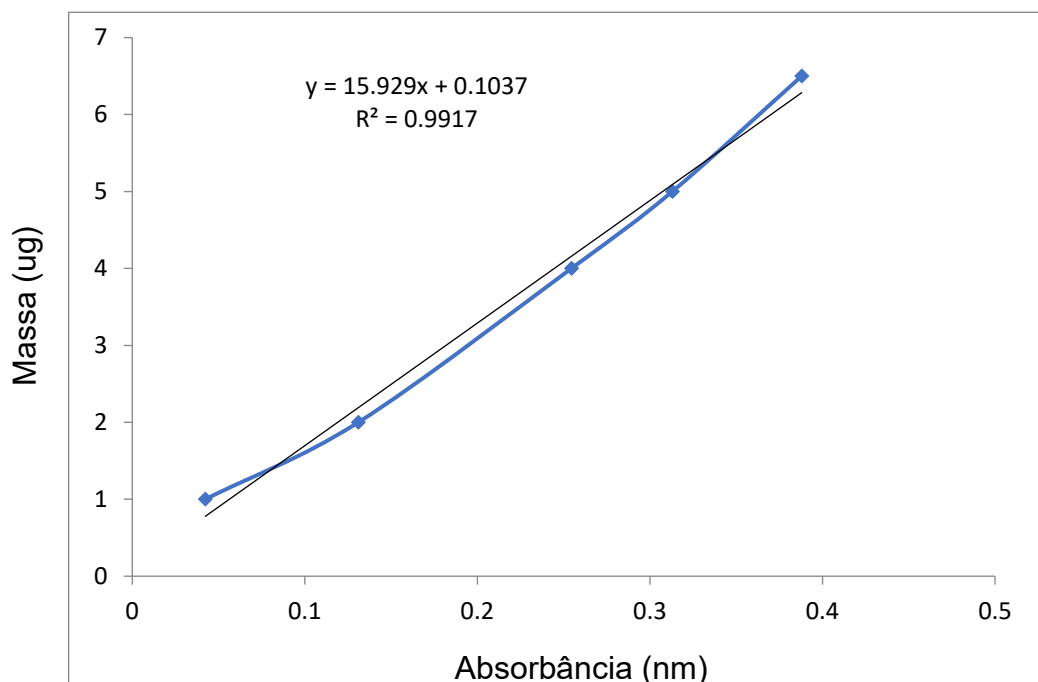
**Atesto** que o Projeto "Isolamento e prospecção de efeitos biológicos de peptídeos derivados da enzima L-amino-oxidase do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*" **Protocolo CEUA 0520/2023**, a ser conduzido por Leonardo Melo, responsável/orientador Daniel Carvalho Pimenta, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

<b>Finalidade</b>	PESQUISA CIENTÍFICA
<b>Vigência do projeto</b>	09/10/2023 a 02/06/2024
<b>Nome Comum / Espécie / Linhagem</b>	//
<b>Raça</b>	
<b>Nº de animais machos</b>	0
<b>Nº de animais fêmeas</b>	0
<b>Nº de animais sexo indefinido</b>	0
<b>Peso médio de animais machos</b>	0
<b>Peso médio de animais fêmeas</b>	0
<b>Peso médio de animais sexo indefinido</b>	0
<b>Idade</b>	ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
<b>Procedência</b>	Centro de Estudo de Veneno e Animais Peçonhentos

**Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 06/10/2023**

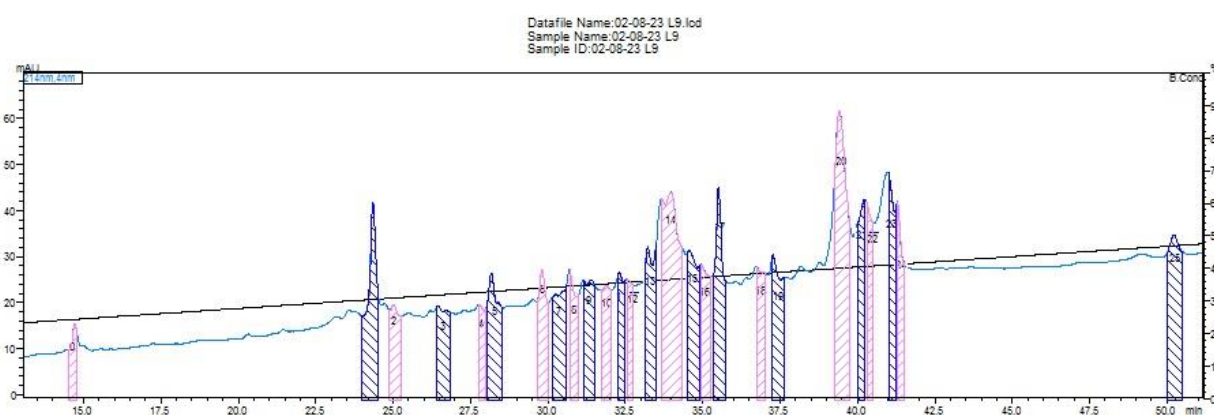
**JULIANY GOMES QUITZAN**  
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

**Anexo 2 – Curva de calibração com diferentes concentrações de BSA. Utilizada para quantificação do veneno bruto de *C.d.terrificus*. Numa absorvância de 595nm.**



**Figura 4:** Curva de calibração utilizando diferentes concentrações da proteína albumina bovina para obtenção da equação da reta para fins de determinar a concentração da LAAO isolada neste estudo após os dois passos cromatográficos utilizados.

**Anexo 3 Cromatograma da fração L9**



**Anexo 4 . Parâmetros de busca por peptídeos no PEAK Studio 7.0**

Parâmetros de busca Espectometria massas
Search Engine Name: PEAKS 7.0
Parent Mass Error Tolerance: 0.1 Da
Fragment Mass Error Tolerance: 0.1 Da
Precursor Mass Search Type: monoisotopic

Enzyme: Trypsin Max Missed Cleavages: 3 Non-specific Cleavage: both Fixed Modifications: Carbamidomethylation: 57.02 Variable Modifications: Oxidation (M): 15.99 Max variable PTM per peptide: 3 Database: Crotalus Taxon: All Searched Entry: 12073 FDR Estimation: Enabled Merge Options: 0.1 min. 0.1 Da Precursor Options: corrected Charge Options: no correction Filter Options: no filter Process: true
---

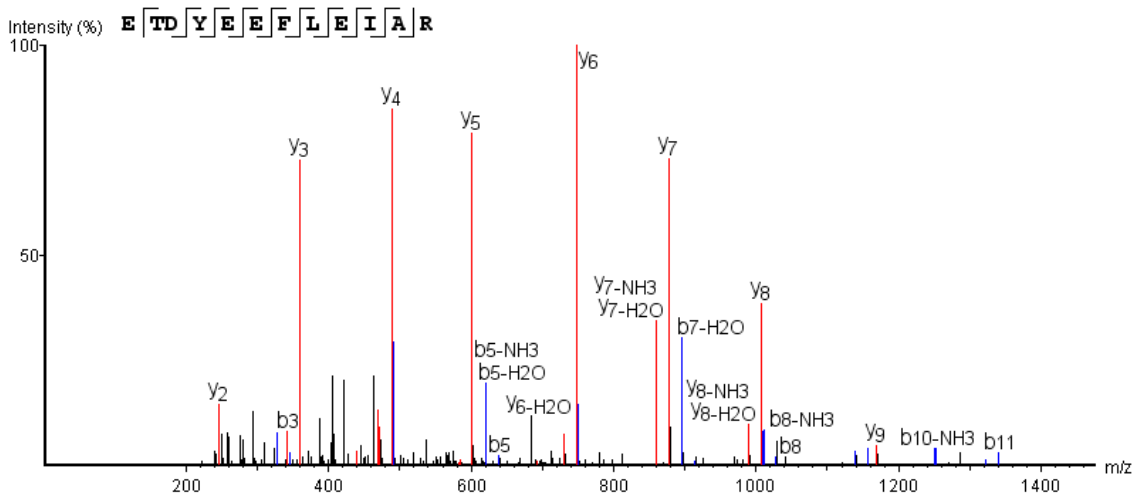
### **Anexo 5. Parâmetros de busca – Espectometria de Massas**

Parâmetros utilizados na busca por peptídeos no software PEAKS Studio 7.0. As tolerâncias de erro para massas de íons precursores e fragmentos foram de 0,1 Da, com busca por massas monoisotópicas e clivagem enzimática específica por tripsina, permitindo até três clivagens perdidas. Foram consideradas modificações fixas (carbamidometilação) e variáveis (oxidação de metionina), com no máximo três modificações por peptídeo. A busca foi realizada contra um banco de dados customizado contendo proteínas de *Crotalus*, com estimativa de taxa de falso positivo (FDR) ativada.

Parâmetros instrumentais Espectometria massas
Fractions: L09.mgf Ion Source: ESI(nano-spray) Fragmentation Mode: CID, CAD(y and b ions) MS Scan Mode: Quadrupole MS/MS Scan Mode: Time of Flight (TOF)

## Anexo 6. Parâmetros Instrumentais – Espectrometria Massas

E parâmetros instrumentais aplicados à aquisição dos dados espectrométricos. A análise foi realizada a partir da fração L09 utilizando ionização por eletrospray em nanoescala (ESI), com modos de fragmentação CID (dissociação induzida por colisão) (íons b e y). A análise de MS foi conduzida em modo quadrupolo e MS/MS por tempo de voo (TOF).



## Anexo 7. Sequência da L-aminoacido oxidase do veneno de *Crotalus d. terrificus*

MNVFFMFSLFLAALGSCAHDRNPLEECFRETDYEEFLEIARNGLTVTSNPKH  
 VVIVGAGMAGLSAAYVLAGAGHQVTVLEASERVGGRVRTYRKKDWYANLGPMRL  
 PTKHRIVREYIRKFGLQLNEFFQENENAWYFIKNIRKRVREVKNPNP GILEYPVKPSEEG  
 KSAAQLYVESLRKVVKELKRTNCKYILDKYDTYSTKEYLLKEGNLSPGAVDMIGDLL  
 NEDSGYYVSFIESLKHDDIFGYEKRFDEIVGGMDQLPTSMYEAIKEKVQVHFNARVIE  
 IQQNDRETKVITYQTSANEMSSVTADYVIVCTTSRAARRIKFEPPLPPKKAHALRSVHY  
 RSGTKIFLTCKRKFWEEDGIRGGKSTTDLPSRFIYPNHNFTSGVGVIIAYGIGDDANF  
 FQALDFKDCADIVINDLSLIHQLPKEDIQTFCRPSMIQRWSLDKYAMGGITTFPTYQFQ  
 HFSEALTAPFKRIYFAGEYTAQFHGWIDSTIKSGLTAARDVNRASENPSGIHLSNDNEF

**Anexo 8. Porcentagem de inibição da atividade antimicrobiana pelas frações de LAAO frente a *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *C. albicans* ATCC 10231. Os dados representam a média  $\pm$  DP dos três experimentos independentes.**

Fragmentos da LAAO	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Média		Desvio Padrão	
L1		6,56	0,41	3,485	2,174353352
L2		16,39	33,2	24,795	5,943232496
L3		15,16	9,43	12,295	2,025860928
L4		22,54	19,26	20,9	1,159655121
L5		31,97	20,9	26,435	3,913836034
L6		22,54	19,67	21,105	1,014698231
L7		7,38	1,64	4,51	2,029396462
L8		3,69	9,84	6,765	2,174353352
L9		8,2	13,11	10,655	1,735947148
L10		4,1	35,66	19,88	11,15814501
L11		8,61	11,07	9,84	0,869741341
	<i>E. coli</i> ATCC 25922				
L1		-27,43	-2,08	-14,755	17,9251569
L2		-7,08	-6,67	-6,875	0,28991378
L3		-2,92	-3,33	-3,125	0,28991378
L4		-4,58	-8,33	-6,455	2,651650429
L5		-3,13	1,87	-0,63	3,535533906
L6		0,83	3,96	2,395	2,213244225
L7		-5,21	-13,33	-9,27	5,741707063
L8		-3,13	1,46	-0,835	3,245620126
L9		13,75	8,12	10,935	3,981011178
L10		10,62	6,04	8,33	3,238549058
L11		-6,04	-5,83	-5,935	0,148492424
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231				
L1		18,6	22,4	20,5	2,687005769
L2		65	39,2	52,1	18,24335495
L3		45,8	49	47,4	2,2627417
L4		54	61,4	57,7	5,232590181
L5		48,8	62,8	55,8	9,899494937
L6		19	88,2	53,6	48,93178926
L7		45,8	73,2	59,5	19,3747258
L8		92,6	83,6	88,1	6,363961031
L9		54,7	58	56,35	2,333452378
L10		18,4	18	18,2	0,282842712
L11		26,6	57,2	41,9	21,6374675