



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA VIDA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS ANTIMICROBIANAS NA
PEÇONHA DE *Bothrops alternatus***

SAMARA BORGES DE OLIVEIRA

Goiânia, dezembro de 2023

Samara Borges de Oliveira

**IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS ANTIMICROBIANAS NA
PEÇONHA DE *Bothrops alternatus***

Monografia apresentada à Escola de Ciências Médicas e da Vida para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Matheus Godoy Pires

Coorientadora: Dra. Marta Regina Magalhães

Goiânia, dezembro de 2023

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA VIDA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BANCA EXAMINADORA DA MONOGRAFIA

Aluna: Samara Borges de Oliveira

Orientador: Dr. Matheus Godoy Pires

Coorientadora: Dra. Marta Regina Magalhães

Membros:

1. Dr. Matheus Godoy Pires

2. Dra. Marta Regina Magalhães

3. Me. Rodrigo Mariano da Silva

Goiânia, dezembro de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste curso.

A meus pais, pela oportunidade dessa formação, e todo auxílio que me foi dado durante esses anos, todos os conselhos, idas na faculdade, apresentações e estágios.

Aos professores, por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual guiaram o meu aprendizado, a todos os experimentos e aulas práticas que eu sempre amei. Obrigada ao prof. Matheus por me apresentar a toxinologia e principalmente a Marta por me auxiliar e me ensinar todos esses anos, faça sol ou faça chuva, ela não desistiu de mim e às professoras Me. Juliana de Oliveira Rosa Lopes pela cessão das cepas bacterianas testadas e Me. Valéria Ribeiro Maitan, pela orientação na incubação e para a realização dos ensaios antimicrobianos.

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa enriquecendo o meu processo de aprendizado.

RESUMO

A diversidade de funções biológicas, bioquímicas e farmacológicas das peçonhas ofídicas demonstram a presença de componentes adquiridos ao longo de sua evolução. Dentre estes, destacam-se os componentes proteicos, como proteinases hemorrágicas, fosfolipases do tipo A2 (PLA2) e L-aminoacidooxidases, presentes nas peçonhas de serpentes, que têm potencial farmacológico. Nesse trabalho, frações do veneno de *Bothrops alternatus* foram isoladas e testadas contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente representando organismos gram-negativos e gram-positivos. Os resultados obtidos descartam potencial antimicrobiano contra esses organismos da maioria das frações obtidas, com exceção de uma fração de alto peso molecular sobre o organismo gram-positivo *S. aureus*, que apresenta efeito dose-dependente. Estudos complementares devem ser efetuados para a identificação, caracterização estrutural e funcional da fração com efeitos promissores.

Palavras-chave: Bioprospecção, antimicrobiano, *Bothrops*.

ABSTRACT

The diversity of biological, biochemical and pharmacological functions of snake venoms demonstrates the presence of components acquired throughout their evolution. Among these, protein components stand out, such as hemorrhagic proteinases, type A2 phospholipases (PLA2) and L-aminoacidooxidases present in snake venoms, which have pharmacological potential. In this work, fractions of *Bothrops alternatus* venom were isolated and tested against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively representing gram-negative and gram-positive organisms. The results obtained rule out the antimicrobial potential against these organisms in most of the fractions obtained, with the exception of a high molecular weight fraction on the gram-positive organism *S. aureus*, which presents a dose-dependent effect. Additional studies must be carried out to identify, and to obtain full structural and functional characterization of the fraction with promising effects.

Key words: Bioprospection, antimicrobial, *Bothrops*.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Mapeamento das frações testadas nas placas de teste	7
Figura 2 - Expressão gráfica parcial do fracionamento do veneno total de <i>Bothrops alternatus</i>	9
Tabela 1 : Amostras preparadas a partir do fracionamento do veneno total de <i>Bothrops alternatus</i>	10
Figura 3 - O veneno total em concentração nativa de <i>Bothrops alternatus</i> demonstra intensa atividade antimicrobiana sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (a), porém atividade desprezível sobre <i>Escherichia coli</i> .(b).....	10
Figura 4 - Placa de teste de atividade antimicrobiana sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , demonstrando halo de inibição nos discos XVII e XVIII, duplicatas da amostra H em concentração de 10 mg/ml	11
Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrando a pureza da fração obtida (trilhas com banda única), em contraste com o veneno total de <i>Bothrops alternatus</i>	12

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A serpente <i>Bothrops alternatus</i>	1
1.2. Peçonha de serpentes	1
1.3. Biotecnologia e utilização de venenos em fármacos	2
1.4. Infecções bacterianas e antibióticos	3
1.5. Potencial antimicrobiano das peçonhas	3
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo geral	5
2.2. Objetivos específicos	5
3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	6
3.1. Obtenção das peçonhas brutas de <i>Bothrops alternatus</i>	6
3.2. Fracionamento por HPLC	6
3.3. Ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana	6
<u>3.3.1. Linhagens bacterianas</u>	6
<u>3.3.2. Atividade antimicrobiana</u>	7
3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamina (SDS-PAGE)	8
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
5. CONCLUSÕES	14
6. REFERÊNCIAS	16

1. INTRODUÇÃO

1.1. A serpente *Bothrops alternatus*

Bothrops alternatus, conhecido popularmente como urutu, urutu-cruzeiro, cruzeiro e cruzeira, é uma serpente da família Viperidae, a mesma da jararaca, cascavel e surucucu, que ocorre no Sudeste, Centro-Oeste e no Sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina. Possui aparelho inoculador, como os demais Viperidae, do tipo solenóglifa, isto é, com as presas inoculadoras de veneno protráteis, canaliculadas, em maxilares muito móveis para a condução do veneno produzido nas glândulas. Ágil nos botes e muito peçonhenta, a urutu chama a atenção pelo padrão que lhe adorna a pele: manchas em forma de ferradura dispõem-se em sequência sob o fundo castanho-escuro do dorso, enquanto a parte inferior de seu corpo é esbranquiçada ou creme.

1.2. Peçonha de serpentes

A diversidade de funções biológicas, bioquímicas e farmacológicas das peçonhas ofídicas é consequência da presença da adaptação e seleção de componentes durante sua evolução biológica, gerando uma mistura heterogênea de substâncias de natureza proteica e não-proteica eficaz para a captura de alimento conforme as diferentes estratégias de predação das serpentes peçonhentas, e tóxica o suficiente para, colateralmente, contribuir para suas estratégias de defesa contra a predação. Essas peçonhas são produzidas por células e tecidos especializados e armazenada no lúmen de uma glândula, e sua liberação é efetuada através de um aparelho inoculador coevolutive desenvolvido a partir da adaptação do aparato mordedor composto por musculatura, esqueleto suspensório e dentição, e utilizada por ocasião de predação ou defesa (KOH et al., 2006).

Quanto à sua composição, a peçonha das serpentes é formada por proteínas, peptídeos, enzimas, cátions inorgânicos, lipídeos, carboidratos, aminoácidos livres e aminas biogênicas, sendo que as proteínas e peptídeos compõe até 95% do peso seco da peçonha. Dentre os componentes proteicos, destacam-se os componentes enzimáticos como proteinases hemorrágicas (TAN e PONNUDURAI, 1991; de ROODT et al., 2003), fosfolipases do tipo A₂ (PLA₂) (ABREU et al. 2007; FONTES et

al., 1999; OLIVEIRA et al., 2009; SOARES et al. 2000), L-aminoácido-oxidases (CISCOTTO, 2009; IZIDORO, 2006; STÁBELI, 2007; TONISIMAGI, 2006), entre outras.

1.3. Biotecnologia e utilização de venenos em fármacos

A pesquisa biomédica das peçonhas de serpentes é fomentada pelo estudo das propriedades genéticas, bioquímicas e físico-químicas, pelo potencial uso e mecanismos de ação e pela pesquisa de antivenenos, diagnóstico do envenenamento ofídico e métodos terapêuticos (TASOULIS e IBISTER, 2017; WAHEED et al., 2017; MUNAWAR et al., 2018; FRANGIEH et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2022; TAN et al., 2022).

As propriedades das moléculas presentes nas peçonhas e venenos animais fazem com que estes se tornem potenciais candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças que não respondem às terapias disponíveis. Os primeiros estudos que identificaram moléculas com importantes atividades farmacológicas, foram realizados por (ROCHA e SILVA et al., 1949), que notaram que a bradicinina, um peptídeo hipotensor, era produzido quando a peçonha de *Bothrops jararaca* era injetada na circulação sanguínea de mamíferos. Mais tarde, descobriu-se que esta injeção não só gerava bradicinina, mas também aumentava muito o seu efeito hipotensor através da formação de peptídeos potenciadores de bradicinina (FERREIRA; 1965).

Este estudo não só levou à descoberta de moléculas endógenas essenciais associadas ao equilíbrio da pressão arterial, como também permitiu a identificação da enzima conversora da angiotensina como um alvo para uma droga de tratamento da hipertensão humana, desenvolvendo-se então, o Captopril, o primeiro inibidor do sítio ativo da enzima conversora da angiotensina. Recentemente, um novo peptídeo antihipertensivo foi isolado também da peçonha de *Bothrops jararaca*, o qual seria bastante promissor no tratamento da pré-eclâmpsia (BENEDETTI et al., 2011).

Atualmente, além dos peptídeos potenciadores de bradicinina, pesquisas demonstram uma grande diversidade funcional e estrutural de componentes das peçonhas ofídicas, com várias aplicações biotecnológicas tais como analgésicos (RAJENDRA et al., 2004, CURY & PICOLO; 2006); antiinflamatórios (SOARES et al., 2003); antimicrobianos (ANDREU, 1998; RODRIGUES et al. 2004; GOMES 2005;

SANTAMARIA et al. 2005; TONISMAGI et al. 2006; NAIR et al. 2007); antitumorais (MORA et al. 2005; GEBRIM et al. 2009; CARVALHO et al. 2001).

1.4. Infecções bacterianas e antibióticos

Antibióticos são substâncias com capacidade de interagir com microorganismos que causam infecções, inibindo ou anulando seu crescimento e apresentam diferentes propriedades químicas, físicas e farmacológicas. A síntese de diversos antimicrobianos contribuiu para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes, entretanto, nos dias atuais, algumas bactérias se tornaram mais resistentes aos agentes antimicrobianos padrões como resultado de mudanças cromossômicas, ou pela troca de material genético via plasmídios ou transposons (LIVERMORE, 1995). Essa resistência gera consequências graves para a saúde pública em todo mundo, por isso o interesse em investigar e produzir novas substâncias com atividade contra esses microorganismos vem aumentando (GOODMAN & GILMAN, 1996).

As infecções causadas por bactérias multirresistentes, na maioria das vezes, estão associadas com infecções adquiridas no ambiente hospitalar, gerando grande impacto socioeconômico devido ao prolongamento do período de hospitalização, ao aumento da morbidade e mortalidade, aos custos decorrentes do maior número de exames subsidiários, ao uso de medicamentos coadjuvantes e à necessidade de antibióticos mais potentes, mais tóxicos e mais caros. Tal situação pode ser agravada pelo fato de as bactérias multirresistentes expressarem mais de um mecanismo de resistência, o que limita as opções terapêuticas e agrava o quadro clínico (TRAVERS & BARZA; 2002, MARRA et al. 2006, SANTOS et al. 2008).

1.5. Potencial antimicrobiano das peçonhas

Vários estudos demonstram o potencial antimicrobiano das peçonhas de serpentes neotropicais, sendo que as peçonhas de serpentes das famílias Elapidae e Viperidae são as mais ativas, especialmente as do gênero *Bothrops* (STÁBELI et al, 2006).

Duas fosfolipases isoladas do veneno de *Bothrops asper*, agem de forma direta tanto em bactérias Gram-positivas como Gram-negativas, sendo que um dos homólogos de Lys49 é cataliticamente inativo, mostrando que a atividade catalítica é

independente da atividade bactericida (PÁRAMO et al. 1998). As fosfolipases A2 lys-49 de *Bothrops brazili* (MTX-I e II) apresentaram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Candida albicans* (COSTA et al. 2008).

No caso das fosfolipases A2, os resultados obtidos sugerem uma atividade biológica independente da atividade catalítica e indicam ainda que a composição de aminoácidos, bem como as cargas positivas e hidrofóbicas da região C-terminal estejam envolvidas no processo de danificação de membranas Ca^{+2} independente. Todavia os detalhes sobre esses mecanismos ainda não foram completamente desvendados (ARAGÃO, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar, na peçonha de *Bothrops alternatus*, moléculas com possível atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

2.2. Objetivos específicos:

- Fracionar a peçonha de *Bothrops alternatus* por meio de cromatografia líquida de alta eficiência.
- Identificar atividade antimicrobiana nas frações obtidas pelo fracionamento.
- Avaliar, por eletroforese em gel de poliacrilamida, o grupo ao qual pertence a molécula com atividade antimicrobiana.

3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1. Obtenção das peçonhas brutas de *Bothrops alternatus*

A extração da peçonha foi realizada em espécimes mantidos em cativeiro no Núcleo Regional de Ofiologia de Goiânia (NUROG), situado no Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas (CEPB) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO), através de massagem manual das glândulas. Após a coleta, a peçonha foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos para a remoção de detritos particulados, o sobrenadante foi coletado, liofilizado e mantido sob congelamento a -20°C até o momento do uso.

3.2. Fracionamento por HPLC

A peçonha bruta de *Bothrops alternatus* foi fracionada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (RP-HPLC) C18 semi-preparativa (Vydac 218TP1010, 10 x 250 mm) em um cromatógrafo Shimadzu. A fase móvel de adsorção e eluição consistiram em solução aquosa de TFA 0,1% e acetonitrilo tamponado com TFA 0,1% (v/v). Para cada cromatografia, 5 mg da peçonha bruta foi ressuspensa em 200 µL de fase móvel aquosa e centrifugada a 10.000 rpm por 10 min. A coluna foi previamente equilibrada com 5% do solvente B e a eluição foi realizada aplicando-se um gradiente linear de 5 a 70% de solvente B em 65 min., com fluxo de 1mL/min em temperatura ambiente e monitoramento simultâneo em 216 e 280 nm. As frações cromatográficas eluídas foram coletadas em coletor automático. Após coletadas, as amostras cromatográficas foram secas sob vácuo em Speed-Vac e armazenadas a -20°C.

3.3. Ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana

3.3.1. Linhagens bacterianas

Na avaliação das atividades antibacterianas, a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922), e a Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), foram gentilmente obtidas com a professora Juliana de Oliveira Rosa Lopes da escola de ciências Médicas e da vida da PUC Goiás. E mantidas na geladeira em torno de 1,7° para conservação, até a utilização.

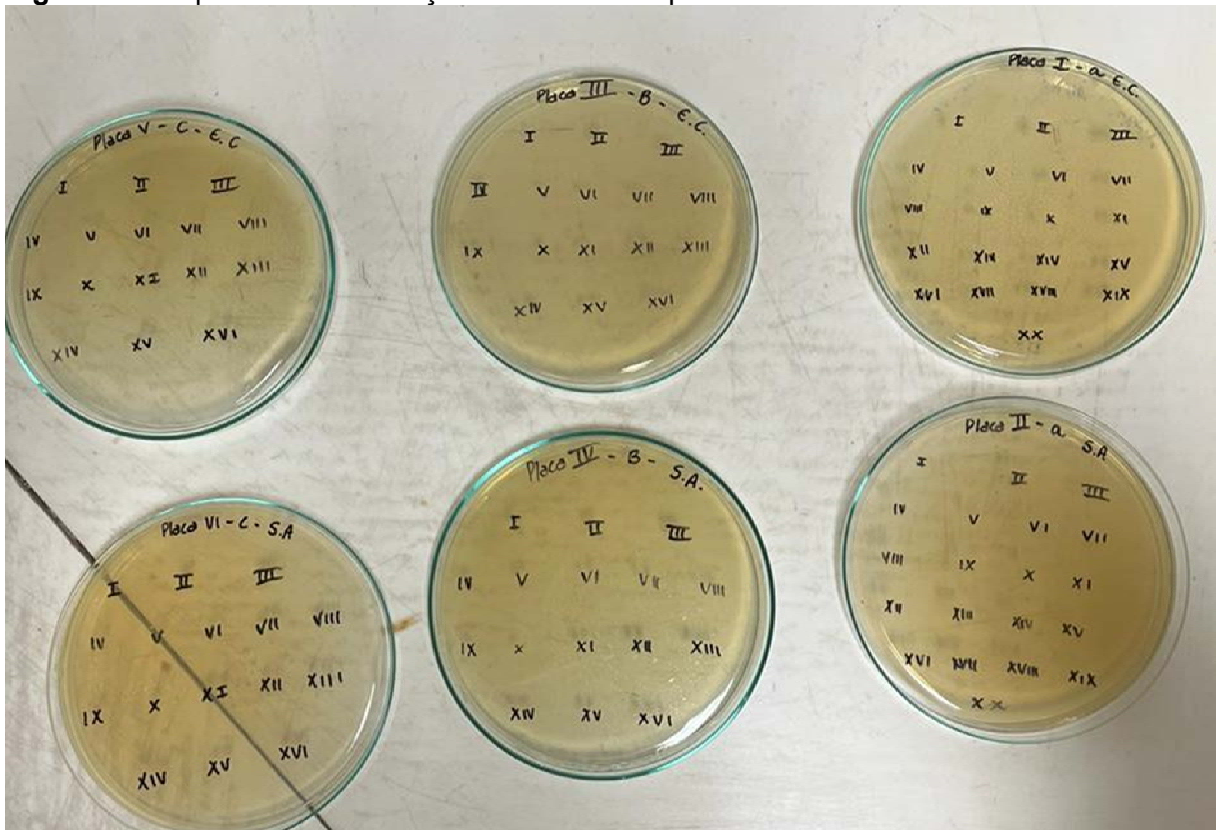
3.3.2. Atividade antimicrobiana

Para ativação das bactérias, preparou-se 6 tubos com 30mL do meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) cultivamos as bactérias 3 tubos com *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e 3 tubos com *Escherichia coli* (ATCC 25922), após cultivo, foram mantidas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°. Foi utilizado a escala de Mac Faland para obter um ajuste da turvação. Seis placas de petri (três para cada organismo cultivado) foram preparadas com meio de cultura Mueller-Hilton.

Discos contendo solução salina e veneno total em concentração de 10mg/ml foram produzidos como controle negativo e positivo, respectivamente. Para cada amostra, foram produzidos discos nas concentrações de 2,5 mg/ml, 5 mg/ml e 10 mg/ml de cada fração obtida.

Foram mapeados os discos nas placas com solução salina (controle), as frações do veneno, o veneno total diluído a 10mg/L e o veneno total na concentração nativa (Figura 1). Após o plaqueamento, inoculação, mapeamento e aplicação dos discos, incubação em estufa a 37° por 24 horas.

Figura 1 - Mapeamento das frações testadas nas placas de teste.



A inibição do crescimento bacteriano nos ensaios realizados foi determinada pela leitura do halo formado ao redor de cada disco, evidência direta da ação microbicida de cada fração testada. Para validação, cada teste foi efetuado em duplicata.

3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamina (SDS-PAGE)

O padrão eletroforético das frações obtidas foi avaliada em gel de poliacrilamida a 12 % em condições redutoras, segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). O gel de empilhamento a 3%, continha Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) e SDS a 0,1% (m/v), mantendo a relação de bis:acrilamida 0,8:30. O gel foi preparado em sistema de eletroforese Hoefer SE 260 Mighty Small II Mini-Vertical (Hoefer Inc, MA, EUA). As amostras foram dispersas em Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, azul de bromofenol 0,01% (m/v), glicerol 10% (v/v) e β -mercaptoetanol 20% (v/v). O tampão do eletrodo contendo Tris 25mM, glicina 192 mM e SDS 0,1% (m/v) (pH 8,3). Após corrida, os géis foram corados em uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (m/v) e descorados em uma solução de ácido acético 7%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento do veneno total de *Bothrops alternatus* pelo protocolo utilizado no item 3.2 gerou 23 tubos com 2 mL de fração (Figura 1), dos quais foram selecionados oito picos contendo maiores quantidades de proteína para serem analisados. Desta forma, foram geradas oito amostras para os testes de ação antimicrobiana, identificadas como A, B, C, D, E, F, G e H, conforme descrito na Tabela 1.

Figura 2 – Expressão gráfica parcial do fracionamento do veneno total de *Bothrops alternatus*. Em vermelho e verde, são demonstrados os tubos coletados.

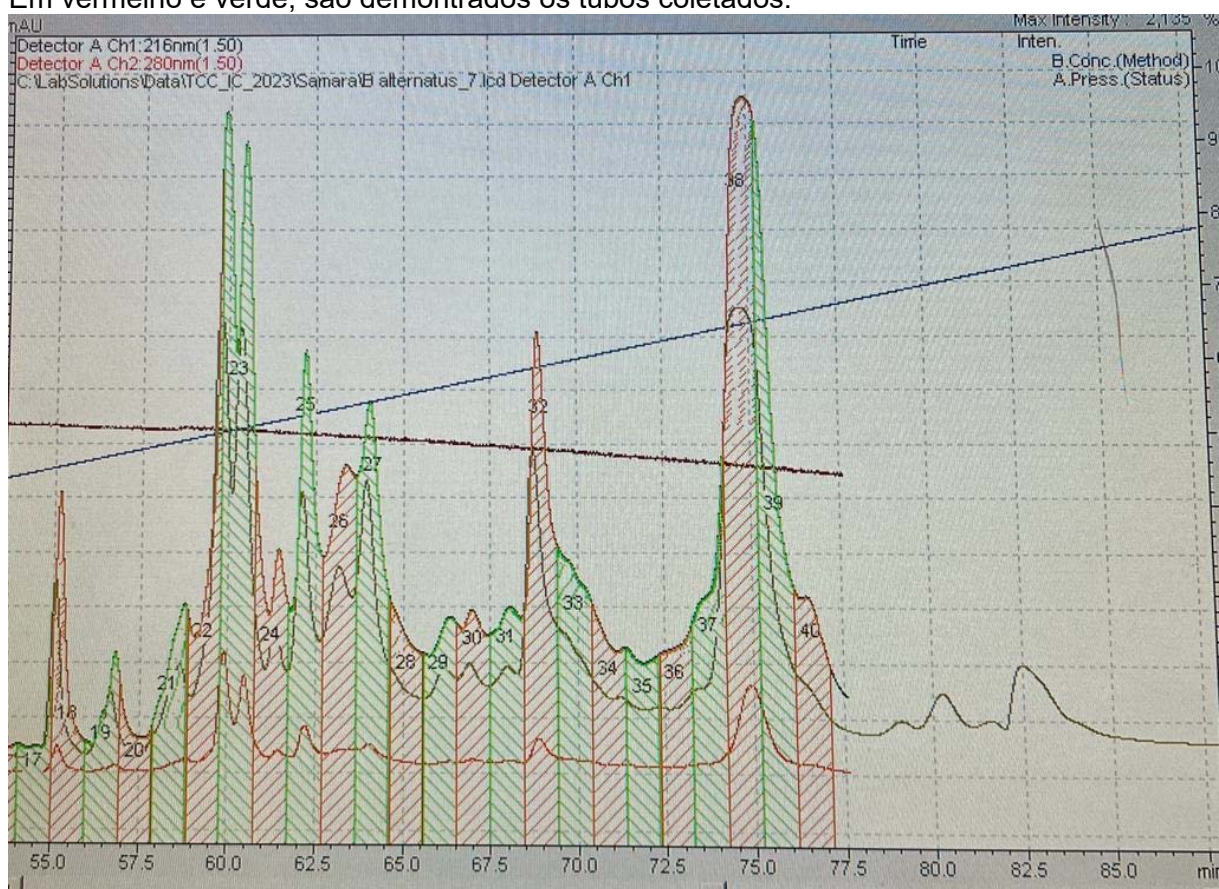


Tabela 1: Amostras preparadas a partir do fracionamento do veneno total de *Bothrops alternatus*.

Amostra	Conteúdo
A	Tubos 0, 1 e 2*
B	Tubos 22 e 23
C	Tubos 26 e 27
D	Tubos 32 e 33
E	Tubos 37, 38 e 39
F	Tubos 43 e 44*
G	Tubos 46 e 47*
H	Tubos 54 e 55*

* Tubos não ilustrados na Figura 1

Após os testes antimicrobianos, somente a amostra H e a peçonha bruta demonstraram atividade sobre o gram-positivo *Staphylococcus aureus*, na concentração de 10mg/ml. Concentrações de 2,5 mg/ml e 5 mg/ml da mesma amostra não apresentaram atividade antimicrobiana sobre este organismo, e nenhuma amostra, em quaisquer concentrações, demonstrou atividade antimicrobiana sobre o gram-negativo *Escherichia coli*, como ilustrados nas Figuras 3 e 4.

Figura 3 - O veneno total em concentração nativa de *Bothrops alternatus* demonstra intensa atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* (a), porém atividade desprezível sobre *Escherichia coli*.

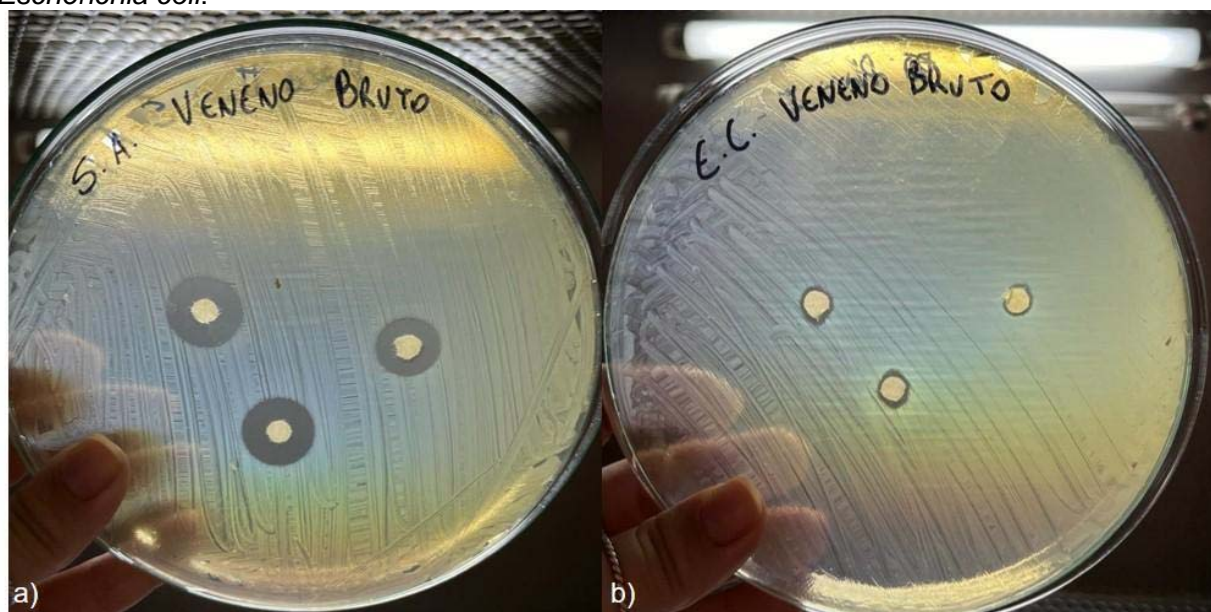
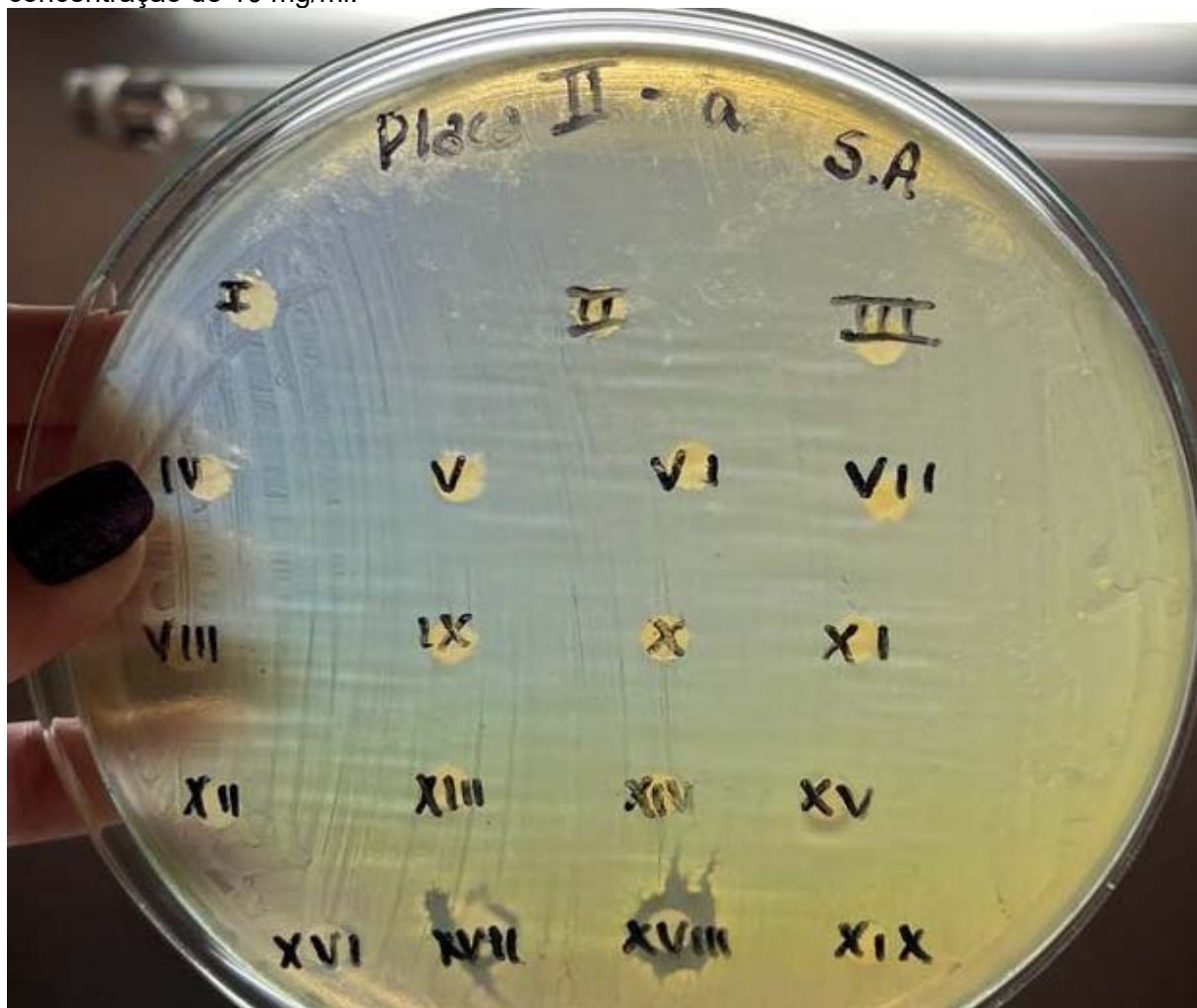
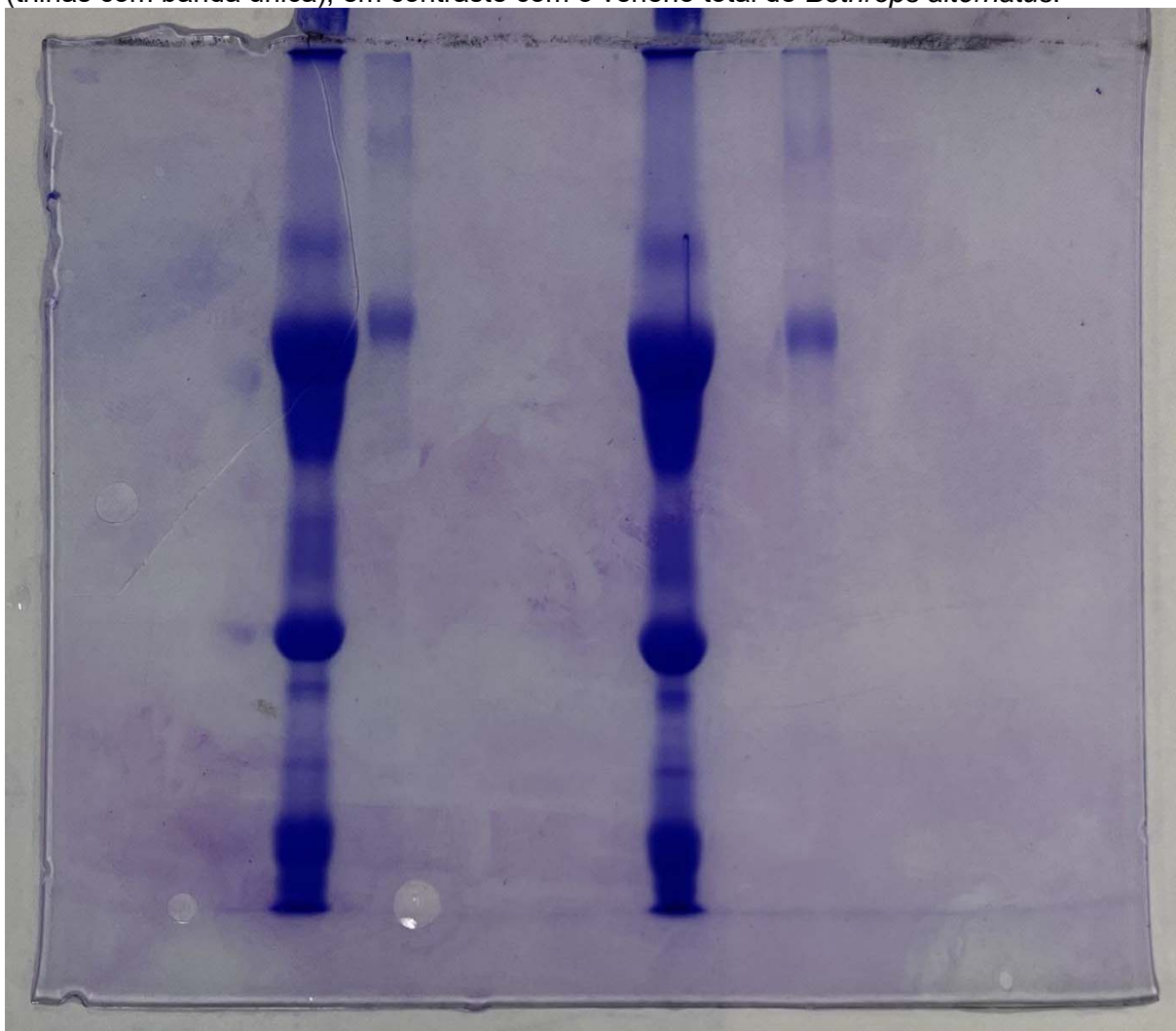


Figura 4 - Placa de teste de atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, demonstrando halo de inibição nos discos XVII e XVIII, duplicatas da amostra H em concentração de 10 mg/ml.



A eletroforese em gel de poliacrilamida da amostra H, que apresentou atividade antimicrobiana, revela que a amostra é composta por um único componente, de natureza peptídica, e que corresponde à massa aproximada de uma das substâncias de maior massa presentes no agrupamento de maior concentração do veneno de *Bothrops alternatus* (Figura 5).

Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrando a pureza da fração obtida (trilhas com banda única), em contraste com o veneno total de *Bothrops alternatus*.



A diversidade de funções biológicas, bioquímicas e farmacológicas presentes nas peçonhas ofídicas é um campo fascinante de estudo que revela a complexidade e a adaptação evolutiva desses organismos. Entre os componentes notáveis estão as proteinases hemorrágicas, fosfolipases do tipo A2 (PLA2) e L-aminoacidooxidases, todos presentes nas peçonhas de serpentes. Esses componentes têm despertado interesse devido ao seu potencial farmacológico, sendo alvos de pesquisas que buscam compreender suas propriedades e aplicações terapêuticas

No âmbito deste trabalho, a peçonha da serpente *Bothrops alternatus* foi analisada, com foco na investigação das propriedades antimicrobianas de suas frações. Escolher organismos representativos como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, que pertencem aos grupos de bactérias gram-negativas e gram-positivas, respectivamente, permite avaliar a amplitude de ação das frações isoladas.

Os resultados obtidos indicam que a maioria das frações testadas não apresentou potencial antimicrobiano contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Esse achado destaca a complexidade da interação entre os componentes do veneno e os diferentes tipos de microorganismos. No entanto, é importante observar que a fração que apresentou atividade antimicrobiana trata-se de uma molécula com alta massa molecular, uma vez que aparece na região do gel correspondente às altas massas. Com esse resultado podemos sugerir que essa molécula possa pertencer à classe das L-aminoácidooxidase.

As L-aminoácidooxidases (LAAOs, EC 1.4.3.2) são flavoenzimas que catalisam a desaminação oxidativa estereoespecífica de uma ampla gama de L-aminoácidos para formar α -cetoácidos correspondentes, H_2O_2 e amônia por meio de um intermediário aminoácido. LAAOs estão amplamente distribuídos nas famílias de cobras peçonhentas das famílias Viperidae, Crotalidae e Elapidae. As LAAOs dos venenos ofídicos são geralmente glicoproteínas homodiméricas de ligação a FAD-(Flavin Adenine Dinucleotídeo) ou FMN-(Flavin Mononucleotídeo) com uma massa molecular na faixa de 110-150 kDa. Eles são encontrados em altas concentrações e são responsáveis pela cor amarela da peçonha e contribuem para a toxicidade através do estresse oxidativo decorrente da produção de H_2O_2 (CISCOTTO et al., 2009).

Alguns estudos descrevem atividade antimicrobiana, leshimanicida, antiparasitária para a LAAO. Barbosa et al fizeram uma comparação entre as

atividades leshimanicida das peçonhas de *B. moojeni* e *B. jararacussu* (BARBOSA et al, 2021). LAZO et al (2017) testaram a atividade antimicrobiana da LAAO presente na peçonha de *B. pictus*, e seus resultados corroboram com os aqui demonstrados, ou seja, a molécula é ativa sobre o crescimento de *S. aureus* e inativa sobre o crescimento de *E. coli*.

A descoberta desse efeito específico ressalta a importância de explorar mais a fundo as propriedades dessa fração promissora. Estudos adicionais são necessários para identificar e caracterizar estrutural e funcionalmente essa fração, a fim de compreender os mecanismos subjacentes ao seu efeito antimicrobiano.

Além disso, a análise da evolução desses componentes proteicos pode fornecer insights sobre como as serpentes desenvolveram essas adaptações ao longo do tempo. Compreender a origem e a função evolutiva desses componentes pode não apenas enriquecer nosso conhecimento sobre a biologia das serpentes, mas também abrir portas para aplicações terapêuticas inovadoras.

5 CONCLUSÕES

A amostra H presente no veneno de *Bothrops alternatus* possui ação antimicrobiana sobre a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus*. A ineficácia sobre *Escherichia coli*, portanto, pode estar ligada às características estruturais e da composição da parede celular bacteriana, o que corrobora com Costa et al. (2018).

Adicionalmente, o fato do efeito ser obtido em uma concentração de 10mg/ml mas não em concentrações menores pode ser indicativo de um mecanismo do tipo dose-dependente.

Ademais, a fração com potencial antimicrobiano apresenta-se numa faixa de peso molecular que corresponde à região mais pesada de uma banda muito intensa do veneno total de *Bothrops alternatus*, que pode ou não ser composta de diversas substâncias.

Desta forma, os resultados promissores do presente trabalho indicam que estudos mais aprofundados são necessários para uma completa caracterização estrutural e funcional da substância presente na amostra H, bem como a expansão

destes testes sobre outras espécies bacterianas gram-positivas para verificação de seu espectro de ação.

O resultado do presente estudo aponta para o potencial biotecnológico dos componentes das peçonhas das serpentes e pode ser importante para o desenvolvimento de novos e mais efetivos agentes contra as infecções bacterianas.

6. REFERÊNCIAS

- ABREU, V. A., DAL BELO, C. A., HERNANDES-OLIVEIRA, S. S., BORJA-OLIVEIRA, C. R., HYSLOP, S., FURTADO, M. de F. D., & RODRIGUES-SIMIONI, L. (2007). Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, 148(1 SPEC. ISS.). <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.03.030>
- ARAGÃO, E. A. **Efeito bactericida de Fosfolipases A2-Lys49: o papel da região C-terminal na atividade de Bothropstoxina-I em membranas biológicas e artificiais.** 2005. 118 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- BARBOSA, L, G, COSTA, T, R; BORGES I, P, et al. **“A Comparative Study on the Leishmanicidal Activity of the L-Amino Acid Oxidases BjussuLAAO-II and BmooLAAO-II Isolated from Brazilian Bothrops Snake Venoms.”** International Journal of Biological Macromolecules, vol. 167, Jan. 2021, pp. 267–278, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.146>. Accessed 22 Nov. 2022.
- BENEDETTI, G., MORAIS, K. L. P., GUERREIRO, J. R., de OLIVEIRA, E. F., et al. *Bothrops jararaca* peptide with anti-hypertensive action normalizes endothelium dysfunction involved in physiopathology of Preeclampsia. **PLoS ONE**, 6(8), 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023680>
- CISCOTTO P., MACHADO DE AVILA, R. A., COELHO, E. A. F., et al. **“Antigenic, Microbicidal and Antiparasitic Properties of an L-Amino Acid Oxidase Isolated from Bothrops Jararaca Snake Venom.”** *Toxicon*, vol. 53, no.3, Mar. 2009, pp. 330–341, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.004>. Accessed 5 Dec. 2021.
- DENMEADE, SAMUEL R., and JOHN T. ISAACS. **“Programmed Cell Death (Apoptosis) and Cancer Chemotherapy.”** *Cancer Control*, vol. 3, no. 4, July 1996, pp. 303–309, <https://doi.org/10.1177/107327489600300401>. Accessed 21 Oct. 2019.
- FERREIRA SH, ROCHA E SILVA M. **Potentiation of bradykinin by dimercaptopropanol (bal) and other inhibitors of its destroying enzyme in plasma.** *Biochem Pharmacol.* 1962 Dec;11:1123–1128.
- GEBRIM, L. C., MARCUSSI, S., MENALDO, D. et al. **“Antitumor Effects of Snake Venom Chemically Modified Lys49 Phospholipase A2-like BthTX-I and a Synthetic Peptide Derived from Its C-Terminal Region.”** *Biologicals*, vol. 37,

no. 4, Aug. 2009, pp. 222–229, <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.01.010>. Accessed 17 Dec. 2021.

GOODMAN, I. S., & GILMAN. “The Pharmacological Basis of Therapeutics.” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 9, no. 6, 1 Nov. 1966, pp. 982–982, <https://doi.org/10.1021/jm00324a062>. Accessed 14 Dec. 2023.

Hahn W. C, WEINBERG R. A. **Modelling the molecular circuitry of cancer.** Nat Rev Cancer. 2002 May;2(5):331-41. doi: 10.1038/nrc795. PMID: 12044009.

Koh, D. C. I., et al. “Snake Venom Components and Their Applications in Biomedicine.” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 63, no. 24, 13 Nov. 2006, pp. 3030–3041, [link.springer.com/article/10.1007/s00018-006-6315-0](https://doi.org/10.1007/s00018-006-6315-0), <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6315-0>.

LAZO, F; VIVAS-RUIZ, D, E; SANDOVAL, G, A et al. “**Biochemical, Biological and Molecular Characterization of an L-Amino Acid Oxidase (LAAO) Purified from Bothrops Pictus Peruvian Snake Venom.**” *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, vol. 139, 1 Dec. 2017, pp. 74–86, pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29024770/, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.001>. Accessed 3 Dec. 2022

MORA R; VALVERDE B; DÍAZ C; et al. “**A Lys49 Phospholipase A2 Homologue from Bothrops Asper Snake Venom Induces Proliferation, Apoptosis and Necrosis in a Lymphoblastoid Cell Line.**” *Toxicon*, vol. 45, no. 5, Apr. 2005, pp. 651–660, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.01.008>. Accessed 5 Dec. 2021.

RAJENDRA, W., ARMUGAM, A., & JEYASEELAN, K. “**Toxins in Anti-Nociception and Anti-Inflammation.**” *Toxicon*, vol. 44, no. 1, July 2004, pp. 1–17, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.04.014>. Accessed 3 Mar. 2023.

ROCHA E SILVA, M., BERALDO, W. T., & ROSENFELD, G. “**BRADYKININ, a HYPOTENSIVE and SMOOTH MUSCLE STIMULATING FACTOR RELEASED from PLASMA GLOBULIN by SNAKE VENOMS and by TRYPSIN.**” *American Journal of Physiology-Legacy Content*, vol. 156, no. 2, 1 Feb. 1949, pp. 261–273, <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1949.156.2.261>. Accessed 6 July 2021.

SOARES, A. M., & GIGLIO, J. R. “**Chemical Modifications of Phospholipases A2 from Snake Venoms: Effects on Catalytic and Pharmacological Properties.**” *Toxicon*, vol.42,no.8,1Dec.2003,pp.855–868,www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004101010300326X, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.004>. Accessed 18 July 2021.

STÁBELI R.G, SANT'ANA C. D, RIBEIRO PH “**Cytotoxic L-Amino Acid Oxidase from Bothrops Moojeni: Biochemical and Functional Characterization.**”

International Journal of Biological Macromolecules, vol. 41, no. 2, July 2007, pp. 132–140, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.01.006>.

- TAN N. H., & PONNUDURAI, G. “**A Comparative Study of the Biological Properties of Some Venoms of Snakes of the Genus Bothrops (American Lance-Headed Viper).**” *Comparative Biochemistry and Physiology. B. Comparative Biochemistry*, vol. 100, no. 2, 1 Jan. 1991, pp. 361–365, [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(91\)90387-s](https://doi.org/10.1016/0305-0491(91)90387-s). Accessed 14 Dec. 2023.
- TASOULIS, T., & ISBISTER, G. K. “**A Review and Database of Snake Venom Proteomes.**” *Toxins*, vol. 9, no. 9, 18 Sept. 2017, p. 290, <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>.
- TÕNISMÄGI, K., SAMEL, M., TRUMMAL, et al “**L-Amino Acid Oxidase from Vipera Lebetina Venom: Isolation, Characterization, Effects on Platelets and Bacteria.**” *Toxicon*, vol. 48, no. 2, Aug. 2006, pp. 227–237, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.05.004>.
- TRAVERS, K., & MICHAEL, B. “**Morbidity of Infections Caused by Antimicrobial-Resistant Bacteria.**” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 34, no. s3, June 2002, pp. S131–S134, academic.oup.com/cid/article/34/Supplement_3/S131/292902, <https://doi.org/10.1086/340251>. Accessed 13 Nov. 2019.
- WIEZEL, G. A. **venoma da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus* e a caracterização de um inibidor recombinante de fosfolipase A2: um possível adjuvante na terapia do envenenamento.** 2021. 196f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

RESOLUÇÃO n°038/2020 – CEPE

ANEXO I APÊNDICE ao TCC

Termo de autorização de publicação de produção acadêmica

A estudante Samara Borges de Oliveira, do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, matrícula 20181005000345, telefone: (62) 99910-4580, e-mail samarabiopuc@gmail.com, na qualidade de titular dos direitos autorais, em consonância com a Lei n° 9.610/98 (Lei dos Direitos do autor), autoriza a Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás) a disponibilizar o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado Identificação de moléculas antimicrobianas na peçonha de *Bothrops alternatus*, gratuitamente, sem ressarcimento dos direitos autorais, por 5 (cinco) anos, conforme permissões do documento, em meio eletrônico, na rede mundial de computadores, no formato especificado (Texto (PDF); Imagem (GIF ou JPEG); Som (WAVE, MPEG, AIFF, SND); Vídeo (MPEG, MWV, AVI, QT); outros, específicos da área; para fins de leitura e/ou impressão pela internet, a título de divulgação da produção científica gerada nos cursos de graduação da PUC Goiás.

Goiânia, 15 de dezembro de 2022.



Samara Borges de Oliveira



Matheus Godoy Pires