



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterização funcional e estrutural de peptídeos
antimicrobianos sintéticos Grammistinas hibridizados com
motivos de ligação metálica ATCUN**

Aluno: Gabriel Gonçalves de Freitas

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Brasília/DF
2024



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Caracterização funcional e estrutural de peptídeos antimicrobianos sintéticos Grammistinas hibridizados com motivos de ligação metálica ATCUN

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular).

Aluno: Gabriel Gonçalves de Freitas

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Brasília/DF
2024



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Gabriel Gonçalves de Freitas

Caracterização funcional e estrutural dos peptídeos antimicrobianos sintéticos Grammistinas hibridizados com motivos ligação metálica ATCUN

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Mariana S. Castro

Presidente

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

Membro Titular

Universidade Católica de Brasília

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Membro Titular

UNESP - Araraquara

Prof. Dr. Lucas Silva de Oliveira

Membro Titular

Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter sido minha força e amparo nas horas difíceis.

Aos meus pais Laercio dos Reis de Freitas e Maria Gonçalves de Freitas, aos meus irmãos Daniel Gonçalves de Freitas e Miguel Gonçalves de Freitas e, em especial, minha avó Maria Therezinha Duarte de Freitas, que sempre me apoiaram durante minha formação acadêmica, e nunca me deixaram desistir.

À Profa. Dra. Mariana S. Castro por garantir os recursos materiais e infra-estrutura para a realização do presente trabalho.

Ao doutor Carlos José Correia de Santana, pelos ensinamentos e ajuda inestimável durante a realização do presente trabalho.

Aos alunos e colegas de pesquisa João Martins Barbosa, Keven Wender Rodrigues Macedo, Jéssica Oliveira de Souza, Jessica Schneider de Castro, Isadora Alves Vasconcelos, Brunna de Oliveira Silva pela ajuda e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Aos alunos e colegas do laboratório de anatomia Bruna Toscano de Carvalho, Gabriela Hirata e Silva, Isabela Farias de Oliveira, Welington de Araújo Coelho, Paula Fernanda de Araújo por ajudarem na instrumentação e montagem do equipamento para realização das fotos dos ensaios.

Às alunas do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas Isabella Sousa Luz e Raquel Takaya, pelo auxílio e desenvolvimento com o ensaio de neutrófilos.

Aos professores Dr. Ricardo Bentes de Azevedo e Dr. Wagner Fontes pelo auxílio e disponibilidade do equipamento para os ensaios de neutrófilos.

Ao Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand pelo auxílio e disponibilização do laboratório, durante a síntese das minhas amostras e dos meus colegas.

À Profa. Dra. Sônia Nair Bão e também a suas alunas pela realização da microscopia eletrônica de varredura.

À Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas e à Dra. Izadora Cristina Moreira de Oliveira, pela ajuda com as análises de dicróismo circular.

A todos os colegas do Laboratórios de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP) e aos colegas do Laboratório de Toxinologia (LTx), pelo incentivo e motivação durante os tempos difíceis.

À CAPES pelo auxílio financeiro com a concessão da bolsa de estudo.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram, apoiaram ou motivaram, meus mais sinceros agradecimentos, muito obrigado.

APOIO FINANCEIRO

A tese de doutorado intitulada “Caracterização funcional e estrutural de peptídeos antimicrobianos sintéticos Grammistinas hibridizados com motivos de ligação metálica ATCUN” desenvolvida por Gabriel Gonçalves de Freitas, sob a orientação da Profa. Dra. Mariana S. Castro teve o apoio financeiro do CNPq, da FAPDF, da CAPES (por meio da concessão de bolsa de estudos – doutorado), da FINEP (CTINFRA) e da FUB-UnB.

RESUMO

O aumento do número de microrganismos patogênicos multirresistentes é atribuído ao uso errôneo de antibióticos comerciais, sendo essencial buscar e desenvolver novas drogas antimicrobianas. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm despertado interesse devido às suas propriedades promissoras como alternativas aos antibióticos convencionais, atuando diretamente nas membranas bacterianas ou em alvos intracelulares. Apesar das vantagens, aspectos físico-químicos dos PAMs podem limitar suas aplicações terapêuticas. Estratégias de desenho racional podem ser empregadas para otimizar esses peptídeos e gerar agentes antimicrobianos mais potentes e seguros. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo propor, sintetizar, purificar e caracterizar química e biologicamente dois novos peptídeos análogos de Grammistinas modificados com o motivo ATCUN e comparar seu ganho de potência com os peptídeos selvagens. A síntese dos peptídeos foi realizada em fase sólida empregando-se química Fmoc, seguida de purificação por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR). Por meio de estudos conformacionais *in vitro* e *in silico*, foi possível observar que os peptídeos apresentam estrutura em alfa-hélice na presença de SDS 35 mM e TFE 50%, com ausência de face hidrofóbica e carga líquida +2. Os peptídeos demonstraram ser bastante efetivos na inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e sua variante resistente com valores de CIM variando entre 4 μM e 16 μM , para ambos os peptídeos. Dos peptídeos análogos sintetizados, apenas um apresentou ganho de potência na presença de Cu^{+2} que foi o peptídeo ATCUN-Pp2a, onde bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes apresentaram valores de CIM mais baixos para o mesmo peptídeo sem a presença de Cu^{+2} . Análises por microscopia de varredura eletrônica demonstraram que os peptídeos antimicrobianos estudados afetam a membrana da bactéria *S. aureus* ATCC 25923, ocasionando aberturas, rugosidades, formação de fragmentos e, em alguns casos, destruição completa de membrana. Os peptídeos apresentaram uma moderada atividade hemolítica, onde apenas o peptídeo ATCUN-Pp2a apresentou hemólise acima de 50% na dose de 16 μM . Os peptídeos também demonstraram atividade citotóxica sobre linhagens tumorais como HeLa e MCF-7, bem como sobre a linhagem não-tumoral HaCaT, com valores de IC_{50} variando entre 10,74 μM e 51,52 μM . Os ensaios de citometria de fluxo demonstraram que os neutrófilos, quando na presença dos peptídeos, não produziram espécies reativas de oxigênio, no entanto, apenas um dos peptídeos demonstrou uma diferença significativa ($p < 0,05$) nesse ensaio. De maneira geral, os peptídeos não estimularam ação migratória sobre os neutrófilos, porém GsD-Wild Type demonstrou uma sutil atividade migratória quando comparada ao controle negativo. Os peptídeos GsD-Wild Type, Pp2a-Wild Type e ATCUN-GsD interferiram com a capacidade quimioatraente do fMLP. Em resumo, os peptídeos estudados possuem atividade contra certas bactérias, especialmente as resistentes, e têm efeitos bactericidas e imunomoduladores em neutrófilos. Eles podem influenciar os estágios iniciais da infecção e afetar certos tipos de câncer, mas também podem ser citotóxicos para células não-tumorais.

Palavras-chave: Análogos sintéticos, Biofísica computacional, Desenho racional, Grammistinas, Peptídeos antimicrobianos.

ABSTRACT

The increase in the number of multidrug-resistant pathogenic microorganisms is attributed to the erroneous use of commercial antibiotics, making it essential to search for and develop new antimicrobial drugs. Antimicrobial peptides (AMPs) have aroused interest due to their promising properties as alternatives to conventional antibiotics, acting directly on bacterial membranes or intracellular targets. Despite the advantages, physical-chemical aspects of AMPs may limit their therapeutic applications. Rational design strategies can be used to optimize these peptides and generate more potent and safer antimicrobial agents. Thus, the present study aimed to propose, synthesize, purify and chemically and biologically characterize two new peptide analogues of Grammistins modified with the ATCUN motif and compare their gain in potency with wild-type peptides. Peptide synthesis was carried out in solid phase using Fmoc chemistry, followed by purification by reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC-RP). *In vitro* and *in silico* conformational studies showed that the peptides have an alpha-helical structure in the presence of 35 mM SDS and 50% TFE, without a hydrophobic face and net charge +2. The peptides proved to be very effective in inhibiting the growth of the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* and its resistant variant with MIC values ranging between 4 μ M and 16 μ M for both peptides. Of the analogous peptides synthesized, only one showed a gain in potency in the presence of Cu^{+2} , which was the ATCUN-Pp2a peptide, where Gram-negative bacteria such as resistant *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* showed lower MIC values for the same peptide without the presence of Cu^{+2} . Scanning electron microscopy analyzes demonstrated that the antimicrobial peptides studied affect the membrane of the bacteria *S. aureus* ATCC 25923, causing openings, roughness, formation of fragments and, in some cases, complete destruction of the membrane. The peptides showed moderate hemolytic activity, where only the ATCUN-Pp2a peptide showed hemolysis above 50% at a dose of 16 μ M. The peptides also demonstrated cytotoxic activity on tumor cell lines such as HeLa and MCF 7, as well as on the non-tumor cell line HaCaT, with IC_{50} values ranging between 10.74 μ M and 51.52 μ M. Flow cytometry assays demonstrated that neutrophils, when in the presence of the peptides, did not produce reactive oxygen species, however, only one of the peptides demonstrated a significant difference ($p < 0.05$) in this assay. In general, the peptides did not stimulate migratory action on neutrophils, however GsD-Wild Type demonstrated a subtle migratory activity when compared to the negative control. The peptides GsD-Wild Type, Pp2a-Wild Type and ATCUN-GsD interfered with the chemoattractant capacity of fMLP. In summary, the studied peptides exhibit activity against certain bacteria, especially resistant ones, and have bactericidal and immunomodulatory effects on neutrophils. They can influence the early stages of infection and affect certain types of cancer, but they can also be cytotoxic to non-tumor cells.

Keywords: Synthetic analogues, Computational biophysics, Rational design, Grammistins, Antimicrobial peptides.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Problemática sobre resistência microbiana.....	16
1.2. Mecanismos de resistência antimicrobiana	18
1.3. Visão geral sobre peptídeos antimicrobianos (PAMs)	22
1.4. Principais características dos mecanismos de ação dos PAMs	26
1.5. Mecanismos de ação – Relação estrutura-atividade	28
1.6. Desenho racional e otimização da atividade antimicrobiana dos PAMs.....	30
1.7. Principais características da modificação ATCUN	34
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVO GERAL E METAS ESTABELECIDAS	37
3.1. Objetivo geral	37
3.2. Metas estabelecidas	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. Desenho racional dos análogos de Grammistinas	38
4.2. Síntese química dos peptídeos antimicrobianos	38
4.3. Purificação dos peptídeos antimicrobianos	39
4.4. Análises por espectrometria de massas	39
4.5. Quantificação dos peptídeos.....	40
4.6. Determinação da atividade antimicrobiana dos peptídeos sobre bactérias patogênicas.....	40
4.7. Determinação da atividade antimicrobiana dos peptídeos sobre leveduras patogênicas.....	42
4.8. Determinação da atividade bactericida dos peptídeos em meio ágar.....	42
4.9. Determinação da atividade hemolítica dos peptídeos	43
4.10. Análise por dicroísmo circular dos peptídeos antimicrobianos	43

4.11. Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	44
4.12. Determinação da atividade antiproliferativa sobre células tumorais	45
4.13. Análise de ativação de neutrófilos por citometria de fluxo	46
4.14. Determinação de quimiotaxia de neutrófilos em tempo real	46
4.15. Análises Computacionais	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1. Síntese química manual dos peptídeos antimicrobianos análogos.....	48
5.2. Purificação dos peptídeos análogos sintetizados manualmente e análises por espectrometria de massas	49
5.3. Avaliação estrutural por simulação computacional e por difração circular	51
5.4. Avaliação dos efeitos antimicrobianos e determinação do modo de ação sobre membranas bacterianas	54
5.5. Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	58
5.6. Determinação da atividade hemolítica	61
5.7. Determinação da atividade antiproliferativa via MTT.....	61
5.8. Determinação da ação ativadora de neutrófilos via produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	63
5.9. Determinação da atividade migratória de neutrófilos via RTCA	64
6. DISCUSSÃO GERAL.....	66
7. CONCLUSÃO	72
8. PERSPECTIVAS	74
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
10. ANEXOS - PROJETOS COMPLEMENTARES DESENVOLVIDOS DURANTE O DOUTORADO	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A resistência antimicrobiana é um desafio transfronteiriço que é impulsionado por fatores clínicos, biológicos, sociais, políticos, econômicos e ambientais e afeta não apenas os seres humanos, mas também os animais e ecossistemas domésticos e não domésticos (Vikesland <i>et al.</i> , 2019)	17
Figura 2. Mortes atribuídas à resistência antimicrobiana comparadas a outras causas de mortes (estimativa para 2050) (O'Neill, 2014)	18
Figura 3. Visão geral dos mecanismos moleculares de resistência aos antibióticos (Derby <i>et al.</i> , 2023)	19
Figura 4. Modelos de mecanismos de ação antibacterianos de peptídeos antimicrobianos (Zhang <i>et al.</i> , 2021)	23
Figura 5. Resumo das funções imunomoduladoras exibidas pelos peptídeos antimicrobianos (Mookherjee <i>et al.</i> , 2020)	24
Figura 6. Diversidade de características biofísicas e estruturais dos peptídeos antimicrobianos (Hancock <i>et al.</i> , 2021).....	25
Figura 7. Modelos esquemáticos dos principais mecanismos de ação propostos dos PAMs nas membranas celulares de bactérias (Carmo <i>et al.</i> , 2022)	28
Figura 8. Tipos de conformações observadas em PAMs A) Folhas- β (taquiplesina), B) α -hélice (magainina), C) Estendida (indolicidina), e D) Volta (thantina). As pontes de dissulfeto estão indicadas em amarelo (Powers & Hancock, 2003).....	30
Figura 9. Representação gráfica da busca e desenvolvimento de PAMs farmacologicamente ativos (Santos <i>et al.</i> , 2021).....	31
Figura 10. Representação esquemática de conjugados ATCUN-PAM ligado a um íon Cu^{+2} , a fita verde representa o domínio PAM (imagem modificada) (Libardo <i>et al.</i> , 2015b).....	34
Figura 11. Ilustração dos efeitos sobre membranas biológicas ocasionada por EROs (Wang <i>et al.</i> , 2017)	35
Figura 12. Imagem ilustrativa dos grupos testados. (A) grupo correspondente aos peptídeos selvagens e análogos sem suplementação de Cu^{+2} , (B) grupo correspondente apenas aos análogos com suplementação de Cu^{2+}	41
Figura 13. Imagem ilustrativa da metodologia utilizada. Foram utilizadas as doses correspondente ao 1x, 2x e 4x do CBM de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	43
Figura 14. Ilustração dos grupos testados. (A) grupo correspondente aos peptídeos selvagens e análogos sem suplementação de Cu^{2+} , (B) grupo correspondente aos análogos incubados com Cu^{2+} e aos análogos que tiveram suplementação de Cu^{2+} no meio	

Mueller-Hinton e PBS 10 mM	45
Figura 15. Perfil cromatográfico típico da purificação do peptídeo análogo ATCUN-Pp2a, empregando-se coluna semi-preparativa de fase reversa C18 (Vydac, 218TP510, C18 - 25 cm x 10 mm x 5 µm) com fluxo de 1 mL/min e detecção ao UV em 216 nm e 280 nm. Na parte superior (inserto), observa-se o componente principal com massa molecular monoisotópica protonada [M+H] ⁺ de 1798,28 Daltons e os adutos de sódio e potássio correspondente ao +22 e +38, respectivamente. A análise foi realizada em equipamento modelo AutoFlex II, (Bruker, Alemanha), aplicando-se 1 µL de matriz HCCA a 20 mg/mL.....	50
Figura 16. Perfil cromatográfico típico da purificação do peptídeo análogo ATCUN-Pp2a, empregando-se coluna semi-preparativa de fase reversa C18 (Vydac, 218TP510, C18 - 25 cm x 10 mm x 5µm) com fluxo de 1 mL/min e detecção ao UV em 216 nm e 280 nm. Na parte superior(inserto), observa-se o componente principal com massa molecular monoisotópica protonada [M+H] ⁺ de 1894,35 Daltons e os adutos de sódio e potássio correspondente ao +22 e +38, respectivamente. A análise foi realizada em equipamento modelo AutoFlex II, (Bruker, Alemanha), aplicando-se 1 µL de matriz HCCA a 20 mg/mL.....	51
Figura 17. Projeções em roda helicoidal (Schiffer-Edmundson) dos peptídeos Grammistinas selvagens e seus análogos	52
Figura 18. Comparação de modelos teóricos tridimensionais dos peptídeos gerados pelo site PEP-Fold 4. Em cima de cada estrutura está a porcentagem da sequência estrutural proposta pelo site SOPMA. Em azul, a região mais eletronegativa (N-terminal) e, em vermelho, a região eletropositiva (C-terminal).....	53
Figura 19. Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (190 a 260 nm) dos peptídeos selvagens e seus análogos. Os peptídeos GsD-Wild Type (A) e ATCUN-GsD (B) em água (linha preta), SDS (linha vermelha) e TFE (linha azul) a 25 °C. Os peptídeos Pp2a-Wild Type (C) e ATCUN-Pp2a (D), demonstraram perfis de espectro dicróico semelhantes.....	54
Figura 20. Micrografia de varredura eletrônica para avaliação das condições da membrana da bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 25923: (A) controle negativo (PBS 10 mM); as imagens (B) e (C), representam os efeitos da incubação da bactéria com os peptídeos selvagem Pp2a e GsD, respectivamente, as imagens (D) e (E) representam os efeitos da incubação da bactéria com os análogos sem a presença de cobre. As setas verdes indicam <i>debris</i> celulares, as vermelhas alterações nas superfícies, como rugosidade e aberturas, as brancas indicam destruição e junção de membrana.....	59

Figura 21. Micrografia de varredura eletrônica para avaliação das condições da membrana da bactéria *S. aureus* ATCC 25923, após a incubação dos peptídeos análogos na presença de cobre tipo (II). As imagens (A) e (B) correspondem aos peptídeos análogos que apenas foram incubados por 30 minutos à 37 °C. As imagens (C) e (D) correspondem às condições com suplementação no meio Mueller-Hinton e ao PBS, com a incubação por 30 minutos à 37 °C. As setas verdes indicam *debris* celulares, as vermelhas alterações na superfícies como rugosidade e aberturas e as brancas indicam destruição e junção de membrana 60

Figura 22. Atividade hemolítica (%) sobre eritrócitos humanos tratados com os peptídeos após 60 minutos de incubação. Pode-se observar que os peptídeos selvagens e seus análogos demonstram elevada atividade hemolítica, com valores de IC₅₀ correspondendo a doses acima de 32 µM 61

Figura 23. Determinação do efeito antiproliferativo dos peptídeos selvagens e análogos sobre as linhagens tumorais HeLa e MCF-7 e sobre uma linhagem epitelial não-tumoral, HaCaT. Os gráficos (A), (C) e (E), correspondem aos efeitos dos peptídeos Pp2a-Wild type (linha preta) e ATCUN-Pp2a (linha vermelha). Já os gráficos (B), (D) e (F), correspondem aos peptídeos GsD-Wild Type (linha preta) e ATCUN-GsD (linha vermelha)..... 62

Figura 24. Histograma de densidade das populações de neutrófilos e avaliação de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). (A), (B) e (C) representam testes independentes (replicatas) para produção de EROs. O fMLP representado pela cor ciano corresponde ao controle positivo. Em (D) evidencia-se que o peptídeo análogo ATCUN-GsD apresenta uma diferença significativa em relação ao controle negativo.. 63

Figura 25. A análise de quimiotaxia em tempo real demonstrou que a condição peptídeo+neutrófilo apresenta efeito quimiotático, podendo atuar como um co-ativador de fMLP, figuras (A), (C) e (D). As figuras (A) e (D) demonstram uma diferença significativa do fMLP isolado, atuando com maior intensidade, diferentemente da figura (B) que apresentou atividade quimiotático superior apenas ao peptídeo isolado e inferior ao controle fMLP 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peptídeos selecionados para avaliação funcional	48
Tabela 2. Parâmetros físico-químicos dos peptídeos antimicrobianos selvagens e seus dois análogos	49
Tabela 3. Conteúdo de estrutura em α -hélice dos peptídeos em água, SDS e TFE	54
Tabela 4. Atividade antimicrobiana em μ M dos peptídeos sintéticos (comparação entre o tipo selvagem e análogos, CIM/CBM)	56
Tabela 5. Atividade antimicrobiana em μ M dos peptídeos sintéticos (comparação entre o tipo selvagem e análogos, CIM/CBM)	57

SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

PAMs	Peptídeos antimicrobianos
LTA	Ácido lipoteicóico
SMH	Modelo de Shai-Matsuzaki-Huang
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Associated Laser Desorption Ionization – Time of Flight</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
CMI	Concentração inibitória mínima
IC₅₀	Concentração inibitória 50%
mA	Miliamper
TFA	Ácido trifluoracético
DC	Dicroísmo circular
Fmoc	Fluorenilmetoxycarbonila
DCM	Diclorometano
DMF	Dimetilformamida
KCN	Cianeto de potássio
HBTU	1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurôniohexafluorofosfato
DIPEA	N,N'-diisopropiletilamina
TIS	Triisopropilsilano
nm	Nanômetro
μM	Micromolar
μL	Microlitro
mmol	Milimolar
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CFU	Unidade formadora de colônia

APD3	<i>Antimicrobial Peptide Database</i>
Da	Daltons
HCCA	Ácido alfa-ciano-4-hidroxinâmico
GRAVY	Índice médio de hidropaticidade
TFE	Trifluoroetanol
SDS	Dodecil sulfato de sódio
tBu	t-Butila
Boc	t-Butiloxicarbonila
Trt	Tritila
fMLP	N-Formilmetionil-leucil-fenilalanina
EROs	Espécies Reativas de oxigênio
BAPNA	N-α-benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida
pNA	p-Nitroanilina
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
RTCA	Analisador de células em tempo real
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido

TABELA DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Abreviatura	Símbolo
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Cisteína	Cys	C
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

1. INTRODUÇÃO

1.1. Problemática sobre resistência microbiana

Durante séculos, os microorganismos e seus metabólitos foram explorados para os mais diversos tipos de aplicações úteis, como alimentação, rações, laticínios, fermentação entre outras áreas (Adrio & Demain, 2014; Tamang *et al.*, 2016). No entanto, ao mesmo tempo que os microorganismos são nossos “aliados”, também são nossos piores inimigos. Desde a descoberta do primeiro antibiótico por Alexander Fleming em 1928, a penicilina G ou a Benzilpenicilina, inúmeras vidas puderam ser salvas contra os mais diversos tipos de infecções por meio da administração deste antibiótico, principalmente durante a Segunda Guerra Mundial, após sua industrialização (Gaynes, 2017). Apesar da descoberta da penicilina G ser considerada um marco histórico para a medicina, Alexander Fleming desde o início alertou para o risco de as bactérias virem a exibir resistência contra as terapias antibacterianas (Canzani & Aldeek, 2017).

Numerosos antibióticos foram identificados, desenvolvidos e empregados clinicamente para tratamentos de infecções após a descoberta de Fleming. O acesso aos antibióticos foi consideravelmente facilitado com o surgimento de novos antibióticos, mais baratos e eficientes, tendo sido usados para tratar os tipos de infecções mais frequentes e corriqueiros, das quais muitas não eram bacterianas (D’Costa *et al.*, 2011; Subramaniam & Girish, 2020). O uso inadequado de antibióticos tem resultado na seleção de cepas de microorganismos cada vez mais resistentes a esses fármacos. Tais microorganismos resistentes a múltiplas drogas (MDR) têm sido um grande problema para a saúde pública moderna (Medina & Pieper, 2016; Pérez-Rodríguez & Mercanoglu Taban, 2019), principalmente para as infecções bacteriana que até então eram de fácil tratamento. Muitos dos aspectos de microorganismos MDRs também estão relacionados a fatores socioeconômicos altamente interligados (**Figura 1**), tais como: políticas públicas, densidade populacional, infraestrutura e saneamento básico (Vikesland *et al.*, 2019). Estima-se que os MDRs foram diretamente responsáveis por aproximadamente 1,27 milhão de mortes globais em 2019 (Murray *et al.*, 2022).

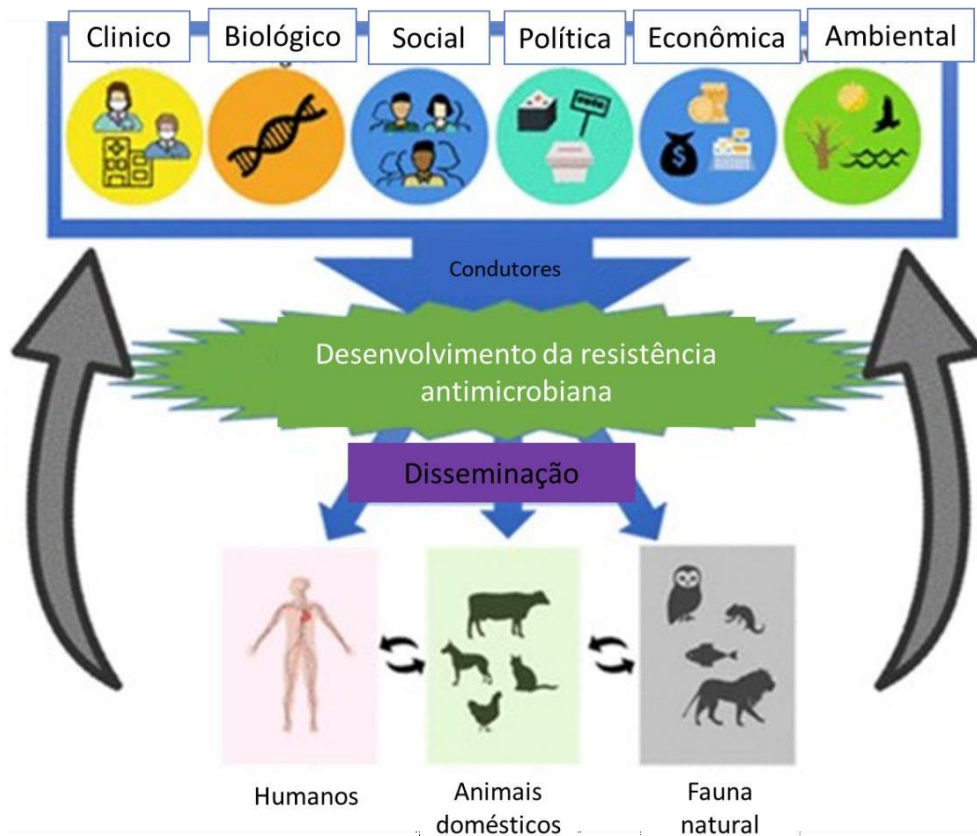


Figura 1. A resistência antimicrobiana é um desafio transfronteiriço que é impulsionado por fatores clínicos, biológicos, sociais, políticos, econômicos e ambientais e afeta não apenas os seres humanos, mas também os animais e ecossistemas domésticos e não domésticos (Vikesland *et al.*, 2019).

De acordo com estudos recentes, poderão ocorrer aproximadamente 4.150.000 mortes na África devido a microorganismos MDR até 2050, além de 4.730.000 mortes na Ásia (O'Neill, 2014), estando elevado número de mortes está diretamente relacionado a questões socioeconômicas e sanitárias. Também poderá ocorrer mais de 300.000 mortes ligadas a microorganismos MDR no continente americano, bem como na Europa. Até 2050, o número de mortes anuais devido a infecções bacterianas resistentes a uma vasta gama de antibióticos ultrapassará os 10 milhões, superando o número de mortes por câncer (**Figura 2**) (Murray *et al.*, 2022; O'Neill, 2014).

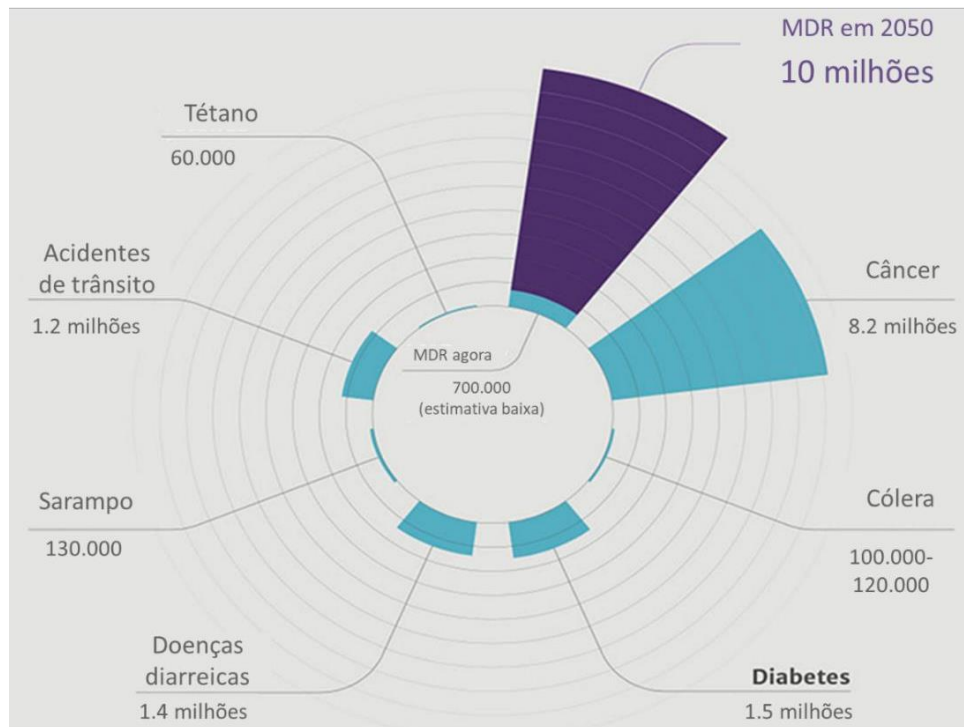


Figura 2. Mortes atribuídas à resistência antimicrobiana comparadas a outras causas de mortes (estimativa para 2050) (O’Neill, 2014).

1.2. Mecanismos de resistência antimicrobiana

Atualmente existem 10 classes principais de antibióticos utilizados comercialmente e, apesar de grande parte serem de origem sintéticas, a maioria corresponde a produtos metabólicos de origem bacteriana e fúngica que tem como principal função a proteção contra micróbios adjacentes (Vikesland *et al.*, 2019). As classes de antibióticos atuam de maneiras diferentes, porém com mecanismos bem definidos sobre a fisiologia bacteriana, inativando estruturas ou processos metabólicos (McCarter, 2017), como: a) inibindo a síntese proteica (tetraciclinas e aminoglicosídeos); b) alterando a síntese da parede celular (beta-lactâmicos e glicopeptídicos); c) interferindo na replicação de DNA e integridade bacteriana (fluoroquinolonas); d) interrompendo a biossíntese de folato (sulfonamidas) e e) deteriorando a integridade da membrana celular (lipopeptídeos) (Crofts *et al.*, 2017).

As bactérias empregam uma variedade de mecanismos de resistência, sendo alguns “intrínsecos”, derivados dos genes que as bactérias utilizam para sobreviver à exposição aos antibióticos, e outros são “adquiridos”, através do ganho de novo material genético que proporciona sua capacidade de sobrevivência (Darby *et al.*, 2023). Geralmente, a resistência microbiana está relacionada a codificação gênica, que pode

ocorrer através de uma variedade de mecanismos, tais como a superexpressão ou duplicação de genes já existentes, mutações pontuais ou aquisição de genes totalmente novos através da transferência horizontal de genes (THG), por meio das conjunções bacterianas ou absorção plasmidial (Boolchandani *et al.*, 2019).

A inibição dos antibióticos é mediada por enzimas que modificam ou degradam os grupos funcionais da molécula, tornando-a ineficaz (De Pascale & Wright, 2010). Já as enzimas modificadoras transferem grupos funcionais para o antibiótico, o que impede a ligação da molécula ao alvo (Wright, 2005). Outro fator importante nos mecanismos moleculares que trabalham em conjunto para aumentar o papel da resistência, são as bombas de efluxo que facilitam e exportam os antibióticos para fora das células bacterianas para reduzir a concentração intracelular (Webber, 2003), além da regulação negativa das proteínas transmembranares, como as porinas, que permitem o transporte passivo de vários compostos, como os antibióticos (Fernández & Hancock, 2012). Sabe-se que determinadas linhagens exibem mais de um tipo de resistência microbiana, conduzindo à emergência de microorganismos MDR (**Figura 3**) (Darby *et al.*, 2023).

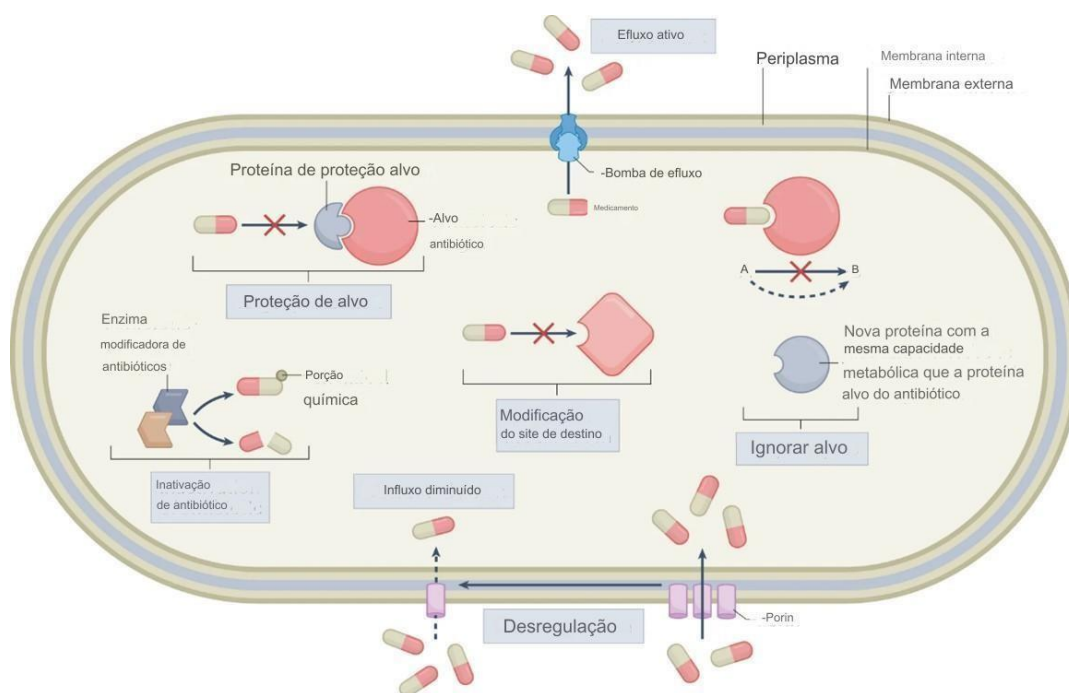


Figura 3. Visão geral dos mecanismos moleculares de resistência aos antibióticos (Darby *et al.*, 2023).

A principal classe de antibióticos pertence ao grupo dos β -lactâmicos, na qual se encontra a penicilina, as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenêmicos. Estes antibióticos possuem um anel β -lactâmico característico em sua estrutura principal e

atuam na inibição da biossíntese das paredes celulares de bactérias Gram-positivas (Uddin *et al.*, 2021), interagindo especificadamente com a D- alanil-D-alanina carboxipeptidase transpeptidase, gerando a DD-peptidase (Therrien & Levesque, 2000), o que eventualmente leva à morte devido à pressão osmótica. No entanto, algumas bactérias, como as *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., produzem enzimas que destroem esses anéis, através da hidrólise das ligações éster e amida (Bush & Bradford, 2016; Uddin *et al.*, 2021). Na bactéria *Staphylococcus aureus*, o gene BlaZ está localizado em uma parte transponível do plasmídeo. Por meio da transmissão horizontal de genes, o gene é facilmente móvel para as células vizinhas devido à sua localização (Boolchandani *et al.*, 2019; Olsen *et al.*, 2006).

Os aminoglicosídeos são uma das classes de antibióticos potentes que com um amplo espectro de ação atuam promovendo inibição da síntese proteica. Esses antibióticos se ligam com alta afinidade ao sítio A do RNA ribossômico 16S do ribossomo 30S (Aradi *et al.*, 2020). Essa classe de antibiótico atua principalmente em bactérias Gram-negativas aeróbicas da família Enterobacteriaceae, que incluem *E. coli*, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae* e *E. aerogenes*, *Proteus* spp., e *Morganella* spp. (Krause *et al.*, 2016). No entanto, também podem atuar de modo sinérgico contra alguns grupos de bactérias Gram-positivas. Os aminoglicosídeos necessitam da ação de transporte ativo de elétrons para sua absorção, o que não se faz presente em certos grupos de bactérias anaeróbicas (Zgurskaya *et al.*, 2021). Existem diversos mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos, um dos mais complexos ocorre através da sua inativação por meio de enzimas modificadoras (Bush & Bradford, 2016; Neu & Gootz, 1996). A resistência também pode ser ocasionada por mutações do sítio A do ribossomo (Wilson, 2014), por modificações lipídicas adquiridas que causam a repulsão dos antibióticos e impedem sua permeabilidade (Tsodikova & Labby, 2016) e por expulsão ativa dos antibióticos para fora da célula via bombas de efluxo (Fernández & Hancock, 2012).

As fluoroquinolonas ou quinolonas são uma classe de antibióticos com amplo espectro de ação, elas inibem a replicação e transcrição do DNA bacterianos, tendo como alvo as seguintes enzimas: as topoisomerasas bacterianas do tipo II, a DNA girase e a DNA topoisomerase IV (Hooper & Jacoby, 2016). A quebra da fita de DNA desencadeia resposta de reparo de DNA e, na medida em que o reparo é incompleto, geram atividade bactericida das quinolonas (Fief *et al.*, 2019). As quinolonas são bem ativas contra bactérias aeróbicas Gram-positivas, como as *Streptococcus pneumoniae* e *S. viridans*,

Enterococcus faecalis e *Listeria monocytogenes*, incluindo as bactérias Gram-negativas, como as *Neisseria meningitidis* e *N. gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Brar *et al.*, 2020). A resistência envolvendo as quinolonas está relacionada as alterações pontuais de aminoácidos do complexo girase e topoisomerase IV, comumente localizadas na região N-terminal de GyrA (resíduos 67 a 106 para numeração de *E. coli*) ou ParC (resíduos 63 a 102), que estão próximos das tirosinas do sítio ativo de ambas enzimas (Avalos *et al.*, 2015). Outro mecanismo de resistência inclui a regulação positiva das bombas de efluxo, que reduzem a absorção do antibiótico e resistência mediada por plasmídeos (Hooper & Jacoby, 2015).

Como último recurso para tratar infecções graves relacionadas a bactérias Gram-positivas, a vancomicina é um antibiótico glicopeptídico tricíclico catiônico produzido naturalmente pela Actinobacteria *Amycolatopsis orientalis*. Durante muito tempo, pensou-se que fosse o último medicamento a ser utilizado no tratamento clínico de linhagens de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (Bartoletti *et al.*, 2018). O modo de ação dos antibióticos glicopeptídicos são únicos, atuando na inibição do segundo estágio da síntese da parede celular das bactérias suscetíveis (Wu & Boger, 2020), ligando-se a porção C-terminal d-Ala-d-Ala do Lípido II, que está relacionada à maturação da camada de peptidoglicanos (Stogios & Savchenko, 2020). Esta inibição compromete a integridade do envelope celular, levando ao estresse osmótico e à ruptura celular, isto devido à obstrução e inativação da glicosiltransferase e da transpeptidase das proteínas de ligação à penicilina (PBPs), no entanto, também há evidências de que a vancomicina inibe seletivamente a síntese do ácido ribonucleico (Hu *et al.*, 2016).

A bactéria *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) é uma linhagem rara, multirresistente e de interesse para saúde pública (Walters *et al.*, 2015). Esta linhagem surge quando genes de resistência à vancomicina, como operon *vanA*, codifica enzimas que modificam ou eliminam o sítio de ligação da vancomicina, este gene VRE pode ser transferido para outras cepas de *S. aureus* (Zhuo *et al.*, 2013). O gene *vanA* é frequentemente encontrado no transposon Tn1546 transmitido por via plasmideal. Esse grupo de genes podem ser transferido de *E. faecalis*, que é resistente à vancomicina, para *S. aureus* e produzir linhagens VRSA (Alonso *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2016).

Os macrolídeos são uma classe de compostos hidrofílicos caracterizados por um anel lactona macrocíclico que pode variar entre 12, 14, 15 ou 16 átomos de carbono,

ligados a resíduos de um açúcar desoxi neutro ou resíduos de amino açúcar, além de possuírem uma cadeia lateral acíclica variável (Lenz *et al.*, 2021; Majdanik, 2021). Esse grupo de antibióticos macrolídeos são toxinas produzidas por uma diversidade de bactérias e esponjas marinhas, dentre outras espécies. Tais moléculas atuam como biomiméticos para proteínas naturais de ligação de actina, afetando sua polimerização, enquanto outras toxinas afetam diferentes componentes do citoesqueleto (Zhang *et al.*, 2021). Geralmente, esse grupo de antibióticos são bastante ativos contra bactérias Gram-positivas, como os *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Diplococcus*, e exibem atividade limitada contra Gram-negativas, tais como *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *N. meningitidis* (Arsic *et al.*, 2018; Janas & Przybylski, 2019; Myers & Clark, 2021). Além disso, também são muito ativos contra vários tipos de micoplasmas, embora existam algumas diferenças na suscetibilidade entre macrólidos de 14 e 16 aminoácidos (Janas & Przybylski, 2019). Os macrolídeos oligopeptídeos com 5 a 11 aminoácidos, normalmente inibem a síntese de proteínas, atuando na saída do túnel do peptídeo nascente do ribossomo 50S bacteriano (Jednačak *et al.*, 2020; Jelić & Antolović, 2016), ligando-se diretamente no túnel à medida que a inibição contínua, os tRNAs livres são consumidos e a tradução é interrompida. Um dos principais mecanismos de resistência está relacionado com as modificações ribossomais bacterianas, mediada pela enzima metilase de resistência adenil-N-metiltransferase eritromicina (Erm), que modifica a estrutura 23S rRNA (Feßler *et al.*, 2018). Outro fator de resistência é a inativação enzimática associada aos genes *ereA* e *ereB*, que hidrolisam os macrolídeos de 14 e 15 resíduos de aminoácidos e causam a inativação da eritromicina (Majdanik, 2021). Os transposons, plasmídeos e ilhas genômicas contêm genes de resistência aos macrolídeos, que podem ser simplesmente transferidos horizontalmente entre linhagens e espécies diferentes (Feßler *et al.*, 2018).

1.3. Visão geral sobre peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) podem ser amplamente encontrados na natureza, pois essas moléculas fazem parte da primeira linha de defesa do sistema imune inato de vários grupos de animais e plantas (Wang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021). Os PAMs são moléculas que podem variar desde seu tamanho quanto sua sequência, carga líquida, hidrofobicidade, estrutura tridimensional e principalmente seu espectro de ação (Li *et al.*, 2021), fazendo com que suas características únicas possam atuar de maneira microbocida eliminando determinados grupos de microorganismos, ou microbiostático

inibindo o crescimento/proliferação de microrganismo (León-Buitimea *et al.*, 2020). Os PAMs demonstram uma alta seletividade por células microbianas devido à composição lipídica de suas membranas lipopolissacarídeos (LPS) presentes em bactérias Gram-negativas e ácidos teicóicos presentes em bactérias Gram-positivas (Mookherjee *et al.*, 2020), no entanto, em alguns casos, podem atuar interferindo na síntese proteica e no núcleo celular de alguns patógenos (**Figura 4**), por isso são bastante promissores para o desenvolvimento de novas drogas antivirais, antifúngicas, antiparasitária, especialmente antibacterianas (Kapil & Sharma, 2021; Sadredinamin *et al.*, 2016).

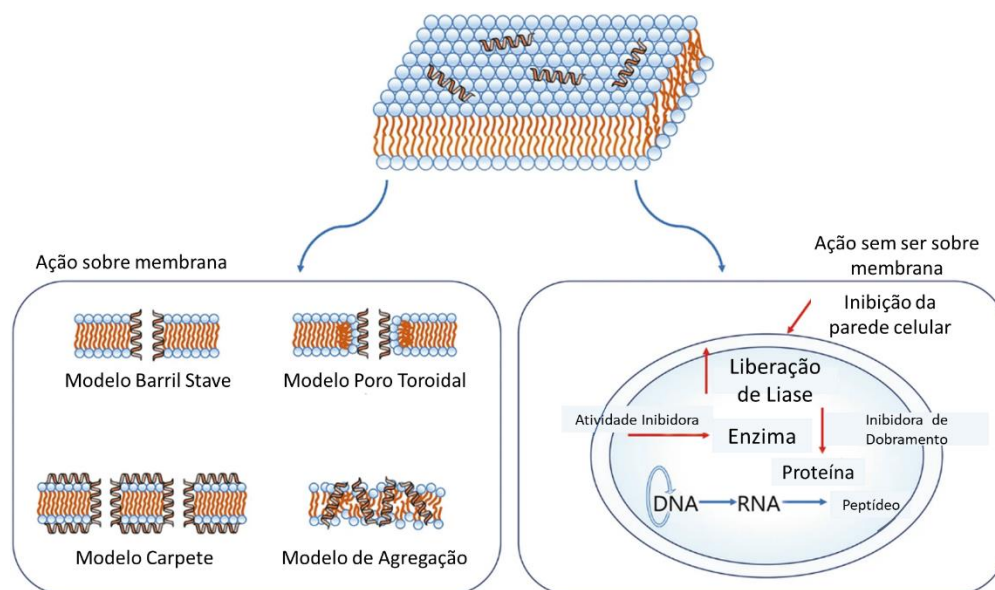


Figura 4. Modelos de mecanismos de ação antibacterianos de peptídeos antimicrobianos. (ZHANG *et al.*, 2021).

Apesar dos peptídeos antimicrobianos serem capazes de promover sua atividade sobre as membranas bacterianas, ou até mesmo atuarem de maneira específica sobre a síntese proteica e expressão gênica, alguns peptídeos antimicrobianos podem atuar de maneira indireta sobre o sistema imune inato dos seres vivos, desempenhando um papel fundamental na imunidade local e/ou sistêmica, juntamente com outras proteínas imunológicas (Khine *et al.*, 2006). Por exemplo, os PAMs podem atuar por uma série de mecanismos, como quimiotaxia de células de defesa, modulação da resposta das células hospedeira sobre TLR (receptor Toll-Like), estimulação da angiogênese, ativação e diferenciação de leucócitos/monócitos, além de atuarem na modulação da expressão de citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias (**Figura 5**) (Mookherjee *et al.*, 2020; Zhang & Gallo, 2016). Essas moléculas desempenham fator crucial para a resposta imune contra

infecções bacterianas, podendo atuar como sinalizadoras que regulam o sistema imune (Guryanova & Ovchinnikova, 2022).

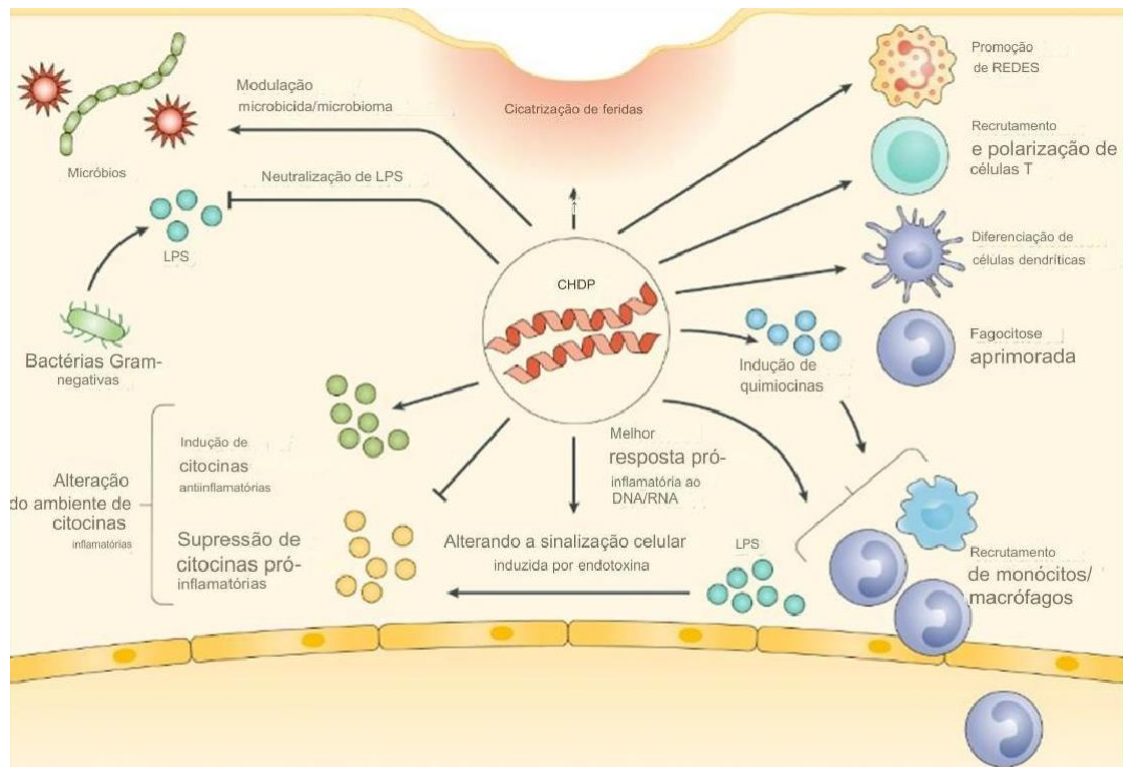


Figura 5. Resumo das funções imunomoduladoras exibidas pelos peptídeos antimicrobianos (Mookherjee *et al.*, 2020).

Os PAMs apresentam um comprimento relativamente curto com cerca de 10 a 50 resíduos de aminoácidos, e são caracterizados por uma carga líquida positiva, ou seja, são moléculas catiônicas que geralmente apresentam carga de +2 a +9 em pH 7,0. Também apresentam uma alta quantidade de resíduos hidrofóbicos (~50%) (**Figura 6**) (Hancock *et al.*, 2021). Tais aspectos físico-químicos estão intimamente ligados à sua atividade biológica e modo de ação, sendo que tais aspectos serão discutidos mais à frente. Embora em menor quantidade ao demais peptídeos, pode-se encontrar peptídeos aniônicos, com cargas líquidas de -1 a -7 em invertebrados, vertebrados e plantas, que quando ricos em ácidos aspártico ou glutâmico atuam em complexos com Zn^{2+} (Dennison *et al.*, 2018; Travkova *et al.*, 2017).

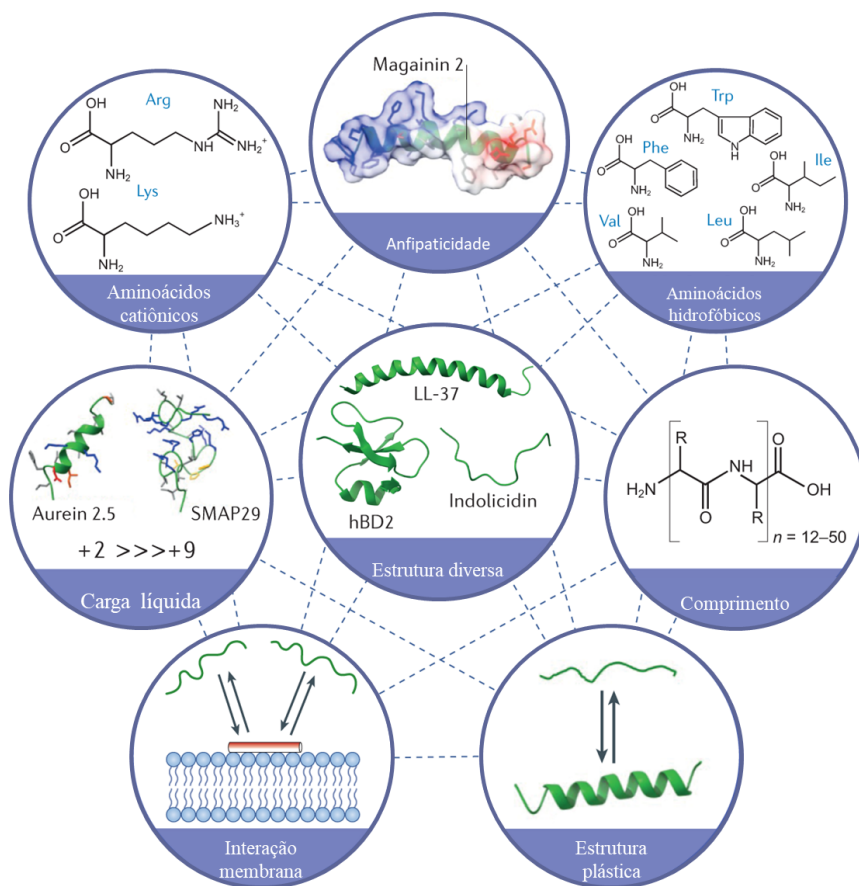


Figura 6. Diversidade de características biofísicas e estruturais dos peptídeos antimicrobianos (Hancock *et al.*, 2021).

Os grandes repositórios de dados atuais nos permitem obter dados detalhados, bem como, gerenciar as principais informações relacionadas ao PAMs sejam eles naturais, sintéticos, patenteados ou de uso clínico. Esses dados nos proporcionam um avanço acelerado na descoberta de novos PAMs (Shi *et al.*, 2022). Informações como estruturas primárias e tridimensionais, propriedades físico-químicas e atividade biológica podem ser obtidas pelos mais diversos bancos de dados, assim como pela consulta de literatura pertinente. Devido à necessidade de anotações sistemáticas, vários bancos de dados PAMs foram propostos, cada um com seu propósito específico (Shi *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2016b).

Um dos maiores banco de dados sobre PAMs é o **Antimicrobial Peptide Database** (APD3), inclui um total de 3.940 peptídeos antimicrobianos catalogados manualmente, sendo distribuídos em peptídeos sintéticos e naturais (Wang *et al.*, 2016b). Entre os PAMs naturais com atividade conhecida, mais de 1.079 peptídeos ativos foram

descritos em anfíbios, 146 peptídeos em peixes, 373 peptídeos identificados em mamíferos, 679 encontrados em artrópodes, 52 peptídeos em répteis e 47 em pássaros. Outro banco de dados bem conhecido é o **Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides** (DBAASP). Este banco de dados é voltado para os estudos da estrutura-atividade, sejam eles sintéticos ou naturais, e as informações nele contidas nos oferecem acesso rápido a modelos estruturais e de dinâmica molecular (Pirtskhalava *et al.*, 2016). Como já foi dito, existem bancos de dados públicos mais específicos e especializados em determinados tipos de atividade e informação dos PAMs, dentre os quais se encontram: o **Database of Anticancer Peptides and Proteins** (CancerPPD) que fornecem informação sobre PAMs com atividade anticancerígena (Tyagi *et al.*, 2015), o **Database of Hemolytic and Non-hemolytic Peptides** (Hemolytik) centrado em peptídeos com ação hemolítica e não-hemolítica validados experimentalmente (Gautam *et al.*, 2014), também existe o **Database of FDA Approved Therapeutic Peptides and Proteins** (THPdb) que abrange informações sobre peptídeos em fase de avaliação terapêutica (Usmani *et al.*, 2017), e também o **Anti Tubercular Peptide Database** (AntiTbPdb) voltado para peptídeos com ação antituberculose e antimicobacterianos (Usmani *et al.*, 2018).

1.4. Principais características dos mecanismos de ação dos PAMs

Os peptídeos antimicrobianos (também conhecidos como peptídeos de defesa do hospedeiro, ou HDPs), são componentes importantes do sistema de defesa inato (Zaslhoff, 2019), sendo expressos em mastócitos, monócitos e neutrófilos (Broden *et al.*, 2016). Os PAMs apresentam sequências curtas de aminoácidos, principalmente com menos de 100 resíduos de comprimento. Não têm motivos conservados, mas são diferenciados pela composição dos aminoácidos constituintes, pela presença de resíduos catiônicos e pela alta proporção de resíduos hidrofóbicos (Bobone & Stella, 2019). Os efeitos microbicidas e a forma como atuam sobre a membrana celular dos patógenos estão relacionadas às suas propriedades físico-químicas (Savini *et al.*, 2020) que, por meio de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, transições conformacionais e equilíbrios de automontagem modulam a afinidade de ligação à membrana provocando perturbações da membrana bacteriana, resultando na formação de poros e desestabilização de membranas biológicas (Travkova *et al.*, 2017). No entanto, certos PAMs podem apresentar diferentes modos de ação, dependendo do tipo de organismo estudados (**Figura 7**) (Carmo *et al.*, 2022; Wei *et al.*, 2016).

Os modos de interação dos PAMs com as membranas bacterianas já foram estudados por diversas técnicas, incluindo dicroísmo circular (Bürck *et al.*, 2016), ressonância magnética nuclear (Harmouche *et al.*, 2017), e cristalografia de raios X (Song *et al.*, 2013). Foi demonstrado que as primeiras interações desestabilizam o envelope bacteriano, sendo que, em seguida interagem eletrostaticamente com a porção aniônica da membrana (Piotrowska *et al.*, 2017). Nesta fase, a composição das membranas demonstra influenciar na sensibilidade dos PAMs, no entanto, eles interagem em locais específicos expostos na superfície celular.

O modelo poro toroidal é um modelo de dois estágios em que a interação peptídeo/membrana ocorre devido ao alinhamento paralelo dos PAMs com a membrana celular de maneira inativa. Após aderir à membrana e aumentar a contração na região, os limiares de peptídeo/membrana aumentam e os PAMs se infiltram na membrana bacteriana (Travkova *et al.*, 2017). Posteriormente, os PAMs passam do estado inativo para o estado funcional e estimulam a dobra da monocamada lipídica. Os peptídeos inseridos provocam a formação de regiões de fenda irreversível na face hidrofóbica da membrana (Kumar *et al.*, 2018). Esta instabilidade causada pelo poro permite a entrada de PAMs no folheto interno da membrana. Dependendo da concentração e composição fosfolipídica das membranas, os PAMs passam do modo inativo para o modo funcional (Benfield & Henriques, 2020).

O modelo de *barril-stave* consiste no acúmulo de PAMs monoméricos lineares sobre membrana, seguida de mudanças conformacionais e agregação, que formam estruturas multiméricas com a inserção vertical na membrana (Davenport *et al.*, 1991). A agregação força as regiões hidrofóbicas dos PAMs para o centro hidrofóbico das membranas, evitando a exposição das regiões hidrofílicas dos PAMs, formando um canal iônico permeável (Matsuzaki, 2019), que podem ocasionar a morte por meio da pressão osmótica (Zhang *et al.*, 2021). Esse modelo recebe essa denominação devido à formação do poro, onde há a organização de ripas semelhantes a um barril, que podem ser variáveis em seu tamanho e menores que os poros toroidais (Bechinger & Gorr, 2017).

No modelo de *carpet-like* (Tapete), os PAMs se ligam à membrana citoplasmática aniônica através das interações eletrostáticas, forçando uma curvatura entre os peptídeos e lipídeos, e formando um complexo peptídeos/membrana que adsorve a interface da membrana (Hazam *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2015), em um mecanismo semelhante a ação

de detergentes levando à formação de micelas/vesículas (Wang *et al.*, 2016a). Os PAMs, em altas concentrações, aglomeram-se e cobrem determinadas regiões da membrana bacteriana, causando a formação de micelas e rupturas na membrana semelhantes aos surfactantes, induzindo a lise total ou parcial da membrana celular resultando na morte bacteriana (Park *et al.*, 2024).

O modelo Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) envolve a formação do carpete e de poros através da adesão dos peptídeos na membrana bacteriana, enquanto a formação dos poros leva os peptídeos e interagirem com alvos intracelulares (Vishnepolsky *et al.*, 2019). Acredita-se que este modelo representa o tipo de interação da maioria dos PAMs, levando os pesquisadores a acreditar na importância do modelo SMH é o fato de que nesse modelo a entrada de peptídeos dentro da célula alvo é contemplada (Luo & Song, 2021; Sekiya *et al.*, 2018).

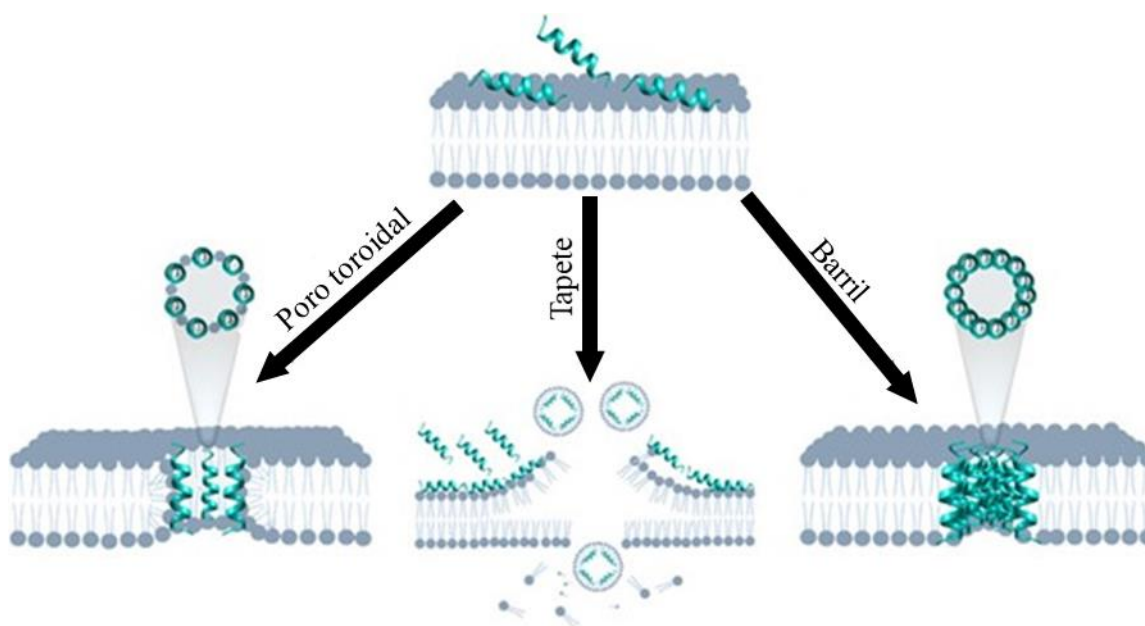


Figura 7. Modelos esquemáticos dos principais mecanismos de ação propostos dos PAMs nas membranas celulares de bactérias (Carmo *et al.*, 2022).

1.5. Mecanismos de ação – Relação estrutura-atividade

A classificação dos PAMs está relacionada com suas características físico-químicas, principalmente sua conformação estrutural, tipo de atividade bactericida, e sua carga líquida total. Em relação a parte estrutural, existe atualmente quatro classes bem definidas: a) conformação do tipo α -helicoidal, b) folhas- β , que apresentam grampo β e uma combinação de hélice α e folhas- β , c) não-estruturados, que não possuem nem hélice α nem folhas- β , e d) peptídeos cíclicos (**Figura 8**) (Lyu *et al.*, 2023; Powers & Hancock,

2003). Existem também duas classes relacionadas com a carga eletrostática líquida, sendo que a maioria dos PAMs são classificados como catiônicos, com alguns poucos PAMs aniônicos. O modo de atividade divide os PAMs em duas classes distintas, os que atuam apenas contra membranas de bactérias e células cancerígenas, mas não são letais para células saudáveis de mamíferos, e os que são tóxicos para bactérias, células cancerígenas e células normais de mamíferos (Park & Hahm, 2005).

Acredita-se que a maioria dos PAMs apresentem conformação não estruturada ou estendida antes das interações eletrostáticas com as células alvo (Ciurac *et al.*, 2019; Sani & Separovic, 2016), porém, outros PAMs podem apresentar conformações específicas devido a ligações intramoleculares, como as ligações dissulfetos. Após a interação com as membranas bacterianas, os peptídeos podem sofrer modificações conformacionais, como α -hélices ou estruturas que atuem na atividade antimicrobiana (Powers & Hancock, 2003). Os PAMs que demonstram estruturas secundárias menos definidas são frequentemente menos ativos em comparação aos demais (Park & Hahm, 2005). Exemplos de peptídeos α -helicoidais incluem magaininas, temporinas e melitinas, que sofrem mudanças conformacionais de não estruturados em solução aquosa para α -hélices anfipáticas quando em contato com membrana (Lombardi *et al.*, 2019). Os PAMs folhas- β já se encontram ativos em solução, devido à estruturação rígida estabilizada por ligações de dissulfetos, como as defensinas. Esse grupo por possuírem estruturas mais estáveis não sofrem alterações conformacionais após a interação com a membrana fosfolipídica (Lopez *et al.*, 2001). Os peptídeos antimicrobianos que não são estruturados ou estendidos ativos na membrana podem ser translocados para o espaço intracelular ou podem adotar uma dobra anfipática dentro das membranas para causar ruptura. As atividades desses PAMs geralmente envolvem alvos intracelulares através de motivações específicas de aminoácidos, como PAMs ricos em prolina de insetos ou peptídeos ricos em triptofano e arginina, como a indolicidina (Le *et al.*, 2017).

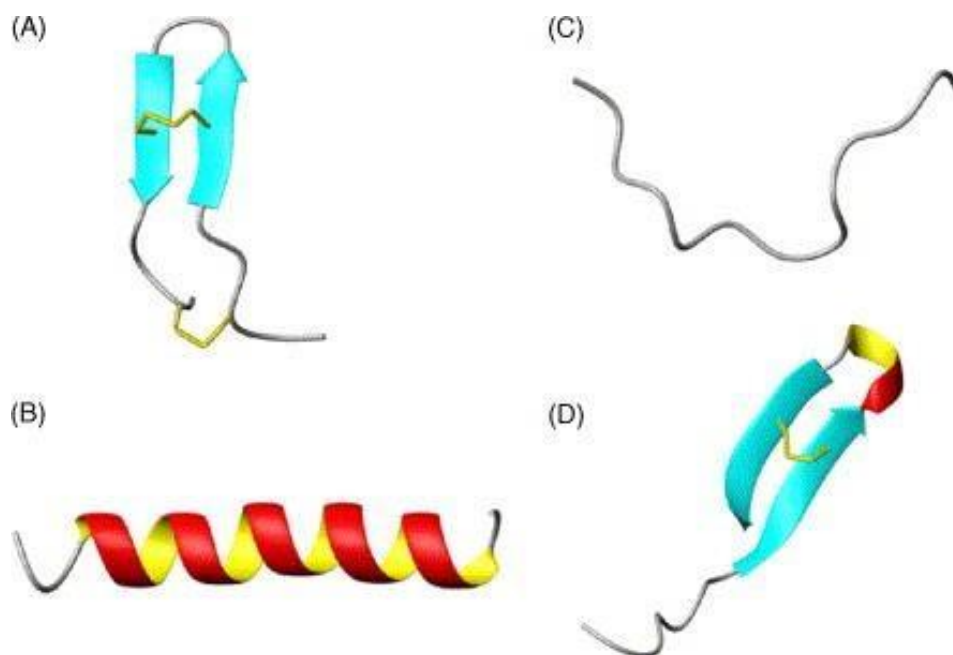


Figura 8. Tipos de conformações observadas em PAMs A) Folhas- β (taquiplesina), B) α -hélice (magainina), C) Estendida (indolicidina), e D) Volta (thantina). As pontes de dissulfeto estão indicadas em amarelo (Powers & Hancock, 2003).

1.6. Desenho racional e otimização da atividade antimicrobiana dos PAMs

Devido ao seu mecanismo único de ruptura de membrana, os peptídeos antimicrobianos ao longo de gerações evoluíram para se tornarem mais efetivos na defesa imunológica de seus hospedeiros (Pearson *et al.*, 2016). No entanto, os PAMs naturais apresentam uma diversidade de problemas, que dificultam sua aplicação farmacológica e clínica (Puentes *et al.*, 2020), tais como: alta citotoxicidade, instabilidade em pH extremos, baixa meia-vida, degradação por proteases e a falta de seletividade para linhagens específicas (Tan *et al.*, 2021). Ainda assim, a aplicação clínica dos PAMs naturais é um grande desafio para a medicina moderna devido aos aspectos biofísicos negativos que eles apresentam (**Figura 9**). As estratégias de otimização visam melhorar as propriedades biológicas e químicas desses PAMs para sua utilização e aplicação comercial (Luong *et al.*, 2020).



Figura 9. Representação gráfica da busca e desenvolvimento de PAMs farmacologicamente ativos (Santos *et al.*, 2021).

O desenho baseado em estrutura, também conhecido como design racional de peptídeos visa melhorar as propriedades físico-químicas de peptídeos naturais, potencializando os efeitos desejados e diminuindo os efeitos adversos, tais como baixa especificidade e atividade hemolítica, por exemplo. O desenho racional é uma técnica fundamental no desenvolvimento de novos antibióticos e medicamentos, relacionados com a remodelação da estrutura secundária (Mishra *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2021). As principais estratégias envolvidas no desenho racional são os desenhos baseados em modelos naturais (*template*), os métodos físico-químicos e os baseados em métodos *de novo*, que criam novos peptídeos ou melhoram os existentes (Fjell *et al.*, 2012).

O método de desenho baseado em modelo visa adicionar seletividade e/ou aumentar a atividade de uma sequência peptídica conhecida, incluindo, retirando ou trocando aminoácidos, até mesmo alterando sua posição. Normalmente, este método tende a reduzir a extensão dos PAMs (Puentes *et al.*, 2020), mas também permite identificar possíveis PAMs de sequências inativas. Este modelo também aborda as mudanças nas propriedades de carga líquida, hidrofobicidade e extensão da cadeia peptídica.

O método de desenho racional baseado em parâmetros físico-químico é utilizado para gerar peptídeos análogos com diferentes características físico-químicas dos peptídeos conhecidos. Para representar as características desejadas dos peptídeos, este modelo normalmente é fundamentado em simulações computacionais baseadas em perturbações de energia livre e simulação de dinâmica molecular (Puentes *et al.*, 2020; Vilas Boas *et al.*, 2019).

O método *de novo* cria peptídeos novos baseados em padrões e sequências, ou até nas frequências de aminoácidos presentes em peptídeos mais ativos. Esta estratégia se fundamenta na detecção de padrões da sequência por meio de análises computacionais (*in silico*), como os modelos quantitativos de relação estrutura/atividade (QSAR - Quantitative Structure/Activity Relationships). Dessa forma, essas informações são utilizadas no desenvolvimento de modelos linguísticos e métodos de previsão para a identificação de novos PAMs (Martins & Ferreira, 2013; Puentes *et al.*, 2020).

A baixa biodisponibilidade é um fator extremamente limitante para o desenvolvimento e a comercialização de medicamentos derivados de PAMs, principalmente os de administração oral e sistêmica (Han *et al.*, 2021; Mahlapuu *et al.*, 2016). Para diminuir os possíveis danos ao hospedeiro, grande parte dos PAMs são rapidamente degradados por proteases e peptidases, o que torna a sua administração oral e venosa uma barreira considerável (Han *et al.*, 2021). De modo geral, a administração oral dos PAMs sofre com as degradações enzimáticas e a baixa penetração na mucosa intestinal. Da mesma maneira, a administração venosa dos PAMs leva rapidamente a degradações por enzimas proteolíticas do sangue, sendo removidos da circulação pelo fígado e rins limitando sua administração sistêmica (Chen & Lu, 2020; Han *et al.*, 2021). O desenvolvimento de medicamentos baseados em PAMs ativos é particularmente difícil devido à sua farmacodinâmica e labilidade *in vivo* (Li *et al.*, 2021).

Atualmente existe abordagens que podem ser usadas para melhorar a atividade, a estabilidade e a eficácia no uso dos PAMs. Estas alterações envolvem processos de ciclização, modificações das cadeias laterais e terminais, incorporações de aminoácidos incomuns, formulações com nanopartículas, miméticos de peptídeos bioativos (peptidomiméticos), onde se utiliza o esqueleto estrutural de sequências conhecidas. Também existe as glicosilações de cadeias laterais, PEGuilações de cadeias laterais, onde se insere polietilenoglicol e peptídeos dendrímeros (Fjell *et al.*, 2012; Haney *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2021; Torres *et al.*, 2019).

Um método bem conhecido para aumentar a estabilidade dos PAMs em soro é a ciclização de cadeias laterais (-SS-) ou terminais (-CO-NH-). A ciclização reduz o contato entre o sítio de ligação das proteases e o peptídeo através do impedimento estérico, além de melhorar a seletividade dos peptídeos (Chen & Jiang, 2023; He *et al.*, 2022). A restrição produzida pela ciclização torna a cadeia peptídica mais estável estruturalmente, melhorando sua afinidade de ligação ao alvo, reduzindo as ligações nãoespecíficas (Zhao

et al., 2022). A construção de peptídeos cíclicos pode ser alcançada por interações dissulfetos, ou induzidas por interações tioéster de cisteínas, lactonas e lactamas, ligações duplas e triplas por olefinas de fechamento de anel (Bechtler & Lamers, 2021; He *et al.*, 2022). No entanto, a indução de ciclização é extremamente problemática devido aos erros que podem ocorrer durante a síntese dos PAMs, ligações errôneas dos resíduos de Cys-Cys ou formação de isômeros cis/trans quando empregadoo método de fechamento de anel (Liu *et al.*, 2017).

A incorporação de aminoácidos incomuns é utilizada para aumentar a atividade ou seletividade e a estabilidade dos peptídeos antimicrobianos. A maioria dos aminoácidos possuem um ou dois átomos assimétricos, portanto, podem formar duas formas distintas enantioméricas (L- e D-), que podem apresentar diferentes atividades biológicas (Han *et al.*, 2021). Os peptídeos contendo L-aminoácidos são suscetíveis a proteases, diferentemente daqueles com D-aminoácidos que, devido à alteração estereoquímica, torna-se irreconhecível às enzimas proteolíticas (Chen & Jiang, 2023). Os peptídeos contendo D-aminoácidos possuem a mesma atividade dos L por apresentarem a mesma estrutura helicoidal e anfipaticidade (Jia *et al.*, 2017), tendo como exceção a incorporação de um único D-aminoácido no meio da estrutura o interrompendo a estrutura helicoidal (Dash & Bhattacharjya, 2021).

A glicosilação consiste na conjugação covalente de um açúcar à estrutura dos PAMs, promovendo alterações na conformação e em suas propriedades químicas, física e biológicas (Dwivedi *et al.*, 2019). A glicosilação aumenta as funcionalidades dos peptídeos e aumenta sua diversidade estrutural. Foi demonstrado que a adição de um único glicano melhora as propriedades antimicrobianas e imunomoduladoras, ao mesmo tempo que afeta suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (Bednarska *et al.*, 2017; Bellavita *et al.*, 2023). A glicosilação aumenta a hidrofiliidade e a biodisponibilidade dos PAMs e induz conformações específicas que interferem na sua atividade, além de aumentar sua resistência à proteólise. A glicosilação de PAMs não necessariamente gera um peptídeo antimicrobiano potente e eficaz e pode até, por vezes, levar a uma perda de atividade ou funcionalidade (Li *et al.*, 2021), devido à possibilidade de reduzir tanto a hidrofobicidade quanto a carga positiva dos PAMs, interferindo na interação com a membrana bacteriana. O desenvolvimento de peptídeos glicosilados envolve uma ligação covalente de glicanos à cadeia lateral específica dos resíduos de aminoácidos presentes na sequência peptídica, podendo ser composta por N-glicosilação,

O-glicosilação, C-glicosilação e S-glicosilação (Li *et al.*, 2021).

Em comparação com seus homólogos lineares, a multimerização de peptídeos naturais ou modificados tem sido utilizada para resolver algumas limitações e criar compostos mais ativos e com maior biocompatibilidade (Han *et al.*, 2021; Matthyssen *et al.*, 2022). Nos caso dos PAMs, essa estratégia é adotada para aumentar sua atividade antimicrobiana e reduzir sua toxicidade, no entanto, os efeitos sobre a desestabilização da membrana é reduzida na sua formação de dímero (Huan *et al.*, 2020; Häffner & Malmsten, 2018). Os PAMs diméricos ocorrem naturalmente nos sistemas biológicos e apresentam certas vantagens antimicrobianas em relação às forma lineares. Na natureza normalmente ocorrem duas estruturas únicas e independentes heterodiméricas (cadeia A e cadeia B), que se formam através de ligações de dissulfetos das cadeias terminais (Batista *et al.*, 2001; Matthyssen *et al.*, 2022).

1.7. Principais características da modificação ATCUN

O motivo de ligação ATCUN (Amino Terminal Cobre e Níquel) é uma pequena sequência tripeptídica que tem uma alta afinidade quelante para íons de Cu^{2+} e Ni^{2+} , o que provoca a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente em contato com outras biomoléculas, como DNA, proteínas e lipídios (Agbale *et al.*, 2019), além de também perturbarem as vias metabólicas centrais, ocasionando a morte celular (Libardo *et al.*, 2015b). Sabe-se que alguns peptídeos antimicrobianos, como as histatinas e indolicidina (**Figura 10**) (Libardo *et al.*, 2014; Melino *et al.*, 2014), possuem essa sequência nativa em suas estruturas primárias (Bouraguba *et al.*, 2020) e, que de alguma maneira, interagem com o cobre do ambiente tendo sua atividade modulada (Bouraguba *et al.*, 2020).

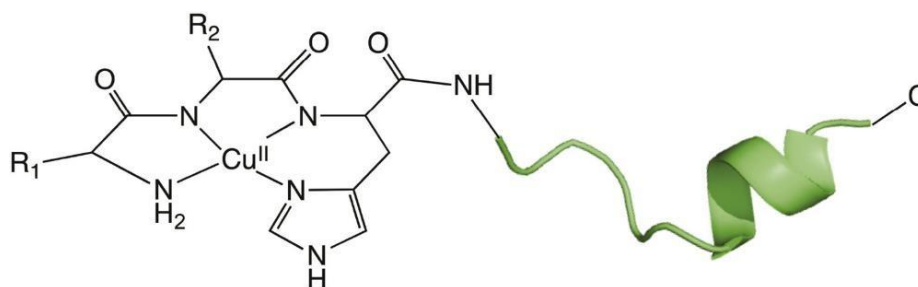


Figura 10. Representação esquemática de conjugados ATCUN-PAM ligado a um íon Cu^{2+} , a fita verde representa o domínio PAM (imagem modificada) (Libardo *et al.*, 2015b).

O motivo ATCUN interage com os íons Cu^{2+} e Ni^{2+} de maneira quelante na região N-terminal, através da interação do radical imidazol da histidina, com outras duas amidas principais (Neupane *et al.*, 2014), contribuindo para a alta estabilidade termodinâmica dos complexo metálico (Libardo *et al.*, 2015b). A sequência com maior interação corresponde ao motivo de três resíduos Xxx-Zzz-His, onde X e Z podem ser qualquer aminoácido, com exceção da prolina, sendo esse tipo de ligação com Cu^{2+} é extremamente forte em pH 7,4 (Bouraguba *et al.*, 2020; Chen & Lan, 2020), alternando seu estado de oxidação (Cu^{2+} e Cu^{3+}). A sequência mais utilizada na incorporação de peptídeos sintéticos é a estrutura tripeptídica GGH-PAM e VIH-PAM, pois apresentam eficiência para formação EROs (Libardo *et al.*, 2014). Os EROs retiram os átomos de hidrogênios dos lipídeos da membrana e formam novos radicais, sendo que a abstração de hidrogênio da cadeia acil insaturada induz a ocorrência na cadeia de maneira que propaga para outros lipídeos presentes da bicamada (Wang *et al.*, 2017). Durante esse único evento de formação de peróxidos lipídicos, pode ocorrer uma grande variedade de reações químicas, incluindo a ciclização, rearranjo e clivagem das cadeias acil insaturadas (**Figura 11**) (Wang *et al.*, 2017).

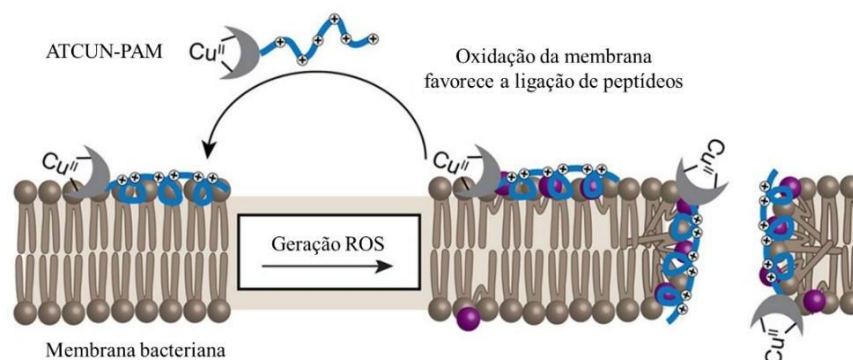


Figura 11. Ilustração dos efeitos sobre membranas biológicas ocasionada por EROs (Wang *et al.*, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

O uso indiscriminado e o fácil acesso aos antibióticos convencionais até então comercialmente disponíveis tem promovido a seleção de linhagens microbianas cada vez mais resistentes, tornando este um dos maiores desafios da medicina moderna, principalmente devido ao fato dos patógenos multirresistentes estarem relacionados com a perda da eficácia de pelo menos três classes de antibióticos, tornando seu tratamento caro, difícil e demorado (Murray *et al.*, 2022). Outro fator agravante está relacionado com o papel desempenhado pelas grandes empresas farmacêuticas que deixam de produzir agentes antimicrobianos, devido à perda da eficácia em poucos anos, voltando seu foco para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças crônicas que apresentam uma maior demanda no mercado.

Pesquisadores de várias universidades tem buscado encontrar ou desenvolver substâncias com as mais diversas atividades antibióticas que, de alguma maneira, possam atuar como novos medicamentos, substituindo ou até auxiliando as drogas existentes contra a seleção de microorganismos multirresistentes. Dentre os candidatos promissores a uma nova classe de antibióticos, encontram-se os peptídeos antimicrobianos que apresentam a capacidade de eliminar rapidamente um amplo espectro de patógenos como parasitas, fungos e bactérias. Tais peptídeos também induzem a seleção de mecanismos de resistência por parte dos microorganismos com maior dificuldade, pois suas características biofísicas os fazem atuarem de maneira distinta dos demais antibióticos. No entanto, os peptídeos antimicrobianos podem apresentar efeitos negativos dificultando sua comercialização como uma fonte alternativa de antibióticos, sendo necessário a utilização de estratégia de desenho racional para otimizar e adaptar sua ação antimicrobiana, eliminando suas ações adversas.

Diante deste cenário, o grupo de pesquisa em Toxinologia da Universidade de Brasília vem se dedicando à busca de novos peptídeos antimicrobianos, principalmente aqueles presentes na secreção de anfíbios e peixes, bem como toxinas de escorpiões e serpentes, visando o desenvolvimento de novos fármacos com potencial terapêutico e o presente trabalho está inserido dentro desse contexto.

3. OBJETIVO GERAL E METAS ESTABELECIDAS

3.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo propor, sintetizar, purificar e caracterizar química e biologicamente dois novos peptídeos análogos de Grammistinas modificados com o motivo ATCUN e comparar seu ganho de potência com os peptídeos selvagens.

3.2. Metas estabelecidas

- Propor, sintetizar por síntese química Fmoc e purificar análogos de Grammistinas;
- Determinar as características físico-químicas, bem como estruturais dos peptídeos produzidos por análises de modelagem 3D e por dicroísmo circular;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos produzidos sobre microorganismos patogênicos;
- Verificar se os peptídeos atuam como agentes bactericidas ou bacteriostáticos em meio sólido;
- Realizar uma comparação entre os peptídeos selvagens e seus análogos, na presença ou na ausência de Cu^{2+} ;
- Avaliar os efeitos dos peptídeos sobre a membrana da bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 empregando microscopia eletrônica de varredura;
- Determinar a atividade citotóxica e antiproliferativa dos peptídeos antimicrobianos sobre linhagens tumorais HeLa (ATCC CCL-2) e MCF-7 (ATCC HTB-22) e sobre uma linhagem epitelial não-tumoral HaCaT (CVCL-0038);
- Determinar a atividade hemolítica dos peptídeos antimicrobianos sintetizados;
- Determinar se os peptídeos atuam como ativadores de neutrófilos;
- Determinar os efeitos sobre a atividade migratória de neutrófilos e a ação quimiotática dos peptídeos sintetizados via RTCA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho racional dos análogos de Grammistinas

Os peptídeos modelos para a elaboração dos análogos propostos no presente trabalho foram dois peptídeos antimicrobianos isolados da secreção de peixes da família Serranidae, ambas moléculas pertencentes ao grupo denominado Gramminstin, mais especificadamente Pp2a (*Pogonoperca punctata*) e GsD (*Grammistes sexlineatus*). Esses peptídeos apresentam 13 resíduos de aminoácidos cada um e possuem massas de 1447.99 Da para a moléculas Pp2a e 1544.95 Da para a molécula GsD, ambos foram identificados por (Shiomi et al., 2000; Shiomi et al., 2001). Uma das características importantes destes peptídeos é sua carga líquida baixa e ausência de face hidrofóbica, que diferem completamente dos peptídeos até então estudados, sempre apresentando carga líquida elevada e uma face hidrofóbica delimitada e marcante. Os dois análogos foram idealizados acrescentando-se apenas três resíduos específicos que resultam na modificação e estruturação da região amino-terminal, denominada motivo de ligação amino terminal Cu (II) e Ni (II) ou simplesmente ATCUN. Os três resíduos selecionados foram V al, Ile e His por demonstrarem maior interação com Cu^{2+} , ou seja, os análogos resultantes apresentam 16 resíduos de aminoácidos no total. Apesar do acréscimo dos resíduos, optou-se por manter sua carga líquida e a ausência de face hidrofóbica, características estas que os tornam interessantes modelos de estudo.

4.2. Síntese química dos peptídeos antimicrobianos

A síntese foi realizada em uma concentração de 0,15 mmol.L⁻¹. Inicialmente, 0,468 mg de resina Fmoc-Phe-Wang (0,32 mmol/g) (Sigma-ALDRICH) foi pesado e a resina inchada com diclorometano (DCM). A resina já imersa em diclorometano foi submetida à agitação constante por 30 min, conforme o protocolo postulado por (Chan & White, 2000). Após o término da preparação da resina, a mesma foi lavada três vezes com dimetilformamida (DMF) e diclorometano. O aminoácido acoplado à resina apresenta o seu N-terminal protegido pelo grupo de proteção lateral Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonil). Para realizar a desproteção da cadeia lateral foram realizados dois ciclos de desproteção utilizando 4-metilpiperdina e DMF (1:4), cada ciclo com duração de 15 min e sob agitação constante. Ao término da reação de desproteção, a resina foi lavada três vezes com DMF e DMC, ficando o resíduo de aminoácido fixado à resina com seu N-terminal livre para um novo acoplamento. Para se avaliar a efetividade da desproteção foi realizado o teste de Kaiser, que consiste em avaliar qualitativamente se a

resina apresenta um N-terminal livre. Nesse teste são usadas três soluções: 5% de ninidrina em etanol (m/v), 80% de fenol em etanol (m/v) e KCN em piridina (2 ml de KCN 0,001 M em 98 mL de piridina). Grãos da resina foram coletados e imersos em gotas das soluções e, posteriormente, aquecidos a 120 °C. Após o procedimento, a coloração resultante azul escuro confirma a desproteção da porção N-terminal. Para a acoplamento dos aminoácidos foram utilizados os reagentes de acoplamento HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 – tetrametilurôniohexafluorofosfato) e DIPEA (N,N'-diisopropiletilamina). As quantidades dos aminoácidos a serem adicionados sequencialmente foram pesadas ao equivalente de 0,15 mmol de resina. O reagente HBTU foi pesado (227,6 mg) e acrescentado ao meio de reação. Para a solubilização dos reagentes foi acrescentado ao meio 2 mL de DMF e, em seguida, 139 µL de DIPEA. Para cada acoplamento foi necessário um tempo de reação de 1 h sob agitação constante. Após cada acoplamento, o teste de Kaiser foi novamente realizado para verificação da efetividade da desproteção. Para a clivagem do peptídeo antimicrobiano da resina foi utilizado 9,5 ml TFA (ácido trifluoroacético), 250 µL TIS (triisopropilsilano) e 250 µL H₂O resultando na proporção 9,5/0,25/0,25 (v/v). A resina foi solubilizada nessa solução durante 1 h e 30 min. Em seguida, as amostras foram filtradas e evaporadas em argônio, resumo no fluxograma.

4.3. Purificação dos peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos sintetizados foram purificados por cromatografia líquida de fase reversa. Alíquotas (50 mg) foram dissolvidas em 1 mL de TFA 0,1% (v/v) e centrifugadas a 13.000 x g durante 5 min. O sobrenadante (200 µL) foi coletado e injetado em coluna semi-preparativa de fase reversa C18 (Vydac, 218TP510, C18 - 25 cm x 10 mm x 5µm), com fluxo de 1 mL/min. A eluição foi realizada empregando-se gradiente de 0-45% com TFA 0,10% (v/v) em acetonitrila por 10 min e um platô com 45% de acetonitrila com TFA 0,10% (v/v) por mais 10 minutos. A eluição dos peptídeos foi monitorada por ultravioleta (UV) em 216 e 280 nm, e as frações foram manualmente coletadas em tubos falcon de 15 mL, em seguida, secas a vácuo e armazenadas a -20°C.

4.4. Análises por espectrometria de massas

As frações cromatográficas resultantes da purificação dos sintéticos, foram analisados por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF em equipamento modelo AutoFlex II, (Bruker, Alemanha). As amostras foram ressuspendidas em TFA a 0,10% (v/v) em acetonitrila 50% (v/v) e 1 µL das amostras foram aplicadas em placa de aço

inoxidável seguido da aplicação de 1 µL de matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (20 mg/mL). A matriz foi diluída em TFA a 0,10% (v/v) em acetonitrila 50% (v/v). As amostras foram analisadas no modo refletido positivo, sendo a faixa m/z analisada de 1000 a 5000. A calibração foi realizada com o padrão Peptide Calibration Standard II, contendo os seguintes peptídeos: Bradicinina(1-7)_[M+H]+_mono (757,399 Da), Angiotensina_I_[M+H]+_mono (1.046,5418 Da), Angiotensina_II_[M+H]+_mono (1.296,6848 Da), Substância_P_[M+H]+_mono (1.347,7354 Da), Bombesina[M+H]+_mono (1.619,8223 Da), ACTH_clip(1-17)_[M+H]+_mono (2.093,0862 Da), ACTH_clip(18-39)_[M+H]+_mono (2.465,1983 Da) e somatostatina(28)_[M+H]+_mono (3.147,4710 Da).

4.5. Quantificação dos peptídeos

Os peptídeos purificados foram dosados em espectrofotômetro (UV-M51, Bel Photonics, Brasil) com leituras nos comprimentos de onda de 205, 215 e 225 nm (Aitken & Learmonth, 2009) de acordo com a metodologia de (Murphy & Kies, 1960). As concentrações dos peptídeos em µg/mL foi estimada empregando-se as equações descritas abaixo:

$$\text{Concentração A} = \frac{\text{Abs}(205\text{nm}) \times 1000}{31} \text{ eq(1)}$$

$$\text{Concentração B} = 144 \times [\text{Abs}(215\text{nm}) - (225\text{nm})] \text{ eq(2)}$$

$$\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = \frac{\text{Concentração A} + \text{Concentração B}}{2} \times 2 \text{ eq(3)}$$

4.6. Determinação da atividade antimicrobiana dos peptídeos sobre bactérias patogênicas

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos peptídeos sintéticos selvagens GsD e Pp2a, e os peptídeos modificados ATCUN-GsD e ATCUN-Pp2a, foram utilizados os dois tipos de Gram, sendo que as Gram-negativas foram (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, e isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes PA-MDR, *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* CAPB053, *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapinêmicos CRAB). E para as bactérias Gram-positivas foram (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e isolado clínico de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina MRSA). Foram inoculados 200 µL das linhagens selecionadas em 6,8 mL de

meio líquido Mueller-Hinton e incubados, sob agitação constante, durante 24 h a 37 °C. Após o período de incubação, foram realizadas leituras a 625 nm em espectrofotômetro (UV-VIS SPECTROPHOTOMETER UV-MS1), para avaliação da densidade óptica. As suspensões foram diluídas e ajustadas entre 0,08-0,1 de absorbância. Em seguida, os inóculos foram diluídos na proporção de 1:200 equivalente a 5×10^5 CFU/mL para todas as bactérias testadas (adaptada da norma CLSI, 2005). Para avaliação dos valores de CIM foram empregadas alíquotas de 50 μ L (concentração inicial: 256 μ M) previamente filtradas em filtros de 0,22 μ m (Millex GV, Millipore, Merck). As amostras foram diluídas em série e incubadas com 50 μ L da suspensão de bactéria (preparadas como descrito acima), durante um período de 24h a 37 °C, os controles para inibição de crescimento e crescimento pleno foram formaldeído 0,8% (v/v) e água Milli-Q, respectivamente. Após a incubação, foi feita a leitura do crescimento bacteriano a 620 nm em leitora de microplacas Multiskan FC Thermo Scientific, San Jose, CA). Para avaliar a interação do cobre tipo (II) com os peptídeos análogos, foram realizadas modificações metodológicas, sendo que os peptídeos análogos foram incubados à 37°C durante 30 minutos com CuSO_4 a 25 μ M como descrito por (Libardo *et al.*, 2015a), onde o meio líquido Mueller-Hinton foi enriquecido com 25 μ M com CuSO_4 e as amostras foram diluídas em água Milli-Q também com 25 μ M com CuSO_4 .

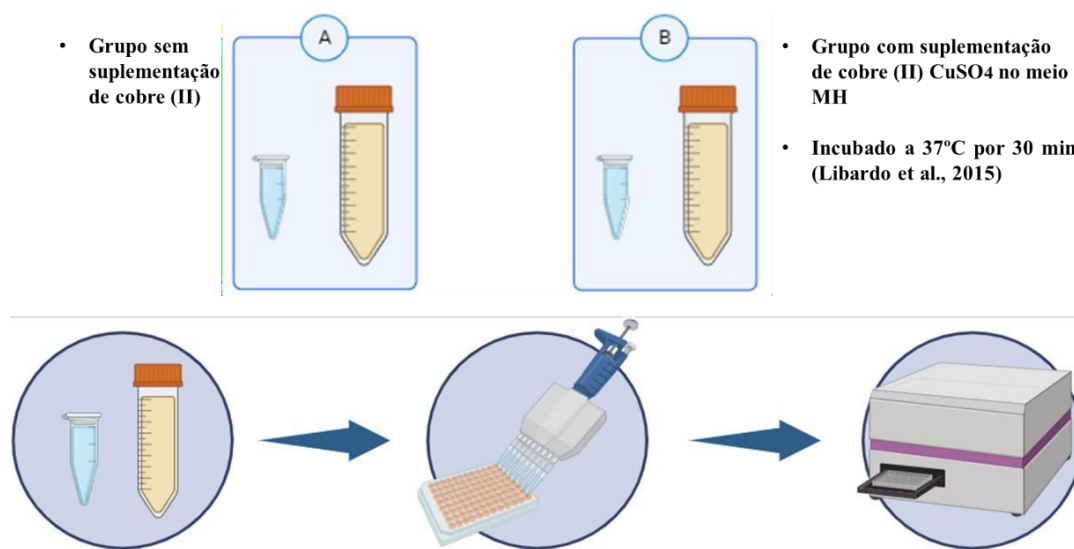


Figura 12. Imagem ilustrativa dos grupos testados. (A) grupo correspondente aos peptídeos selvagens e análogos sem suplementação de Cu^{2+} , (B) grupo correspondente apenas aos análogos com suplementação de Cu^{2+} .

4.7. Determinação da atividade antimicrobiana dos peptídeos sobre leveduras patogênicas

Para os testes antifúngicos foi utilizada a levedura *Candida albicans* ATCC 14053. Aliquotas de 200 µL da suspensão fúngica foi ressuspensa em 6,8 mL de meio BHI (Brain Heart Infusion) e mantida sob agitação constante durante 24 h a 37 °C em tubo de 15 mL. Após a incubação, foi realizada a leitura da densidade óptica a 620 nm e ajustada para 0,08 – 0,1. Em seguida, a suspensão foi diluída em meio BHI na proporção de 1:2000 (adaptado da norma CLSI, 2005). Aliquotas de 50 µL (na concentração inicial: 256 µM) foram filtradas em filtros de 0,22 µm (Millex GV, Millipore, Merck), diluídas em série e misturadas com 50 µL da suspensão fúngica contendo aproximadamente 5×10^2 CFUs em poços de placas de 96 poços. Em seguida, a placa foi incubada por 24 h a 37 °C. Após o período de incubação, as placas foram lidas a 620 nm em leitora de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA). Os controles para inibição de crescimento e crescimento pleno foram formaldeído 0,8% (v/v) e água Milli-Q incubados com a suspensão de *Candida albicans*.

Para avaliar a interação do cobre tipo (II) com os peptídeos análogos foram realizadas modificações, sendo que os peptídeos foram incubados à 37°C durante 30 minutos com CuSO₄ a 25µM em água Milli-Q como descrito por (Libardo *et al.*, 2015a), o meio líquido Mueller-Hinton foi enriquecido com 25µM de CuSO₄ a 25µM. Em seguida, foi se utilizado as mesmas metodologias já descritas no item 4.5. logo acima.

4.8. Determinação da atividade bactericida dos peptídeos em meio ágar

Para avaliar se os peptídeos antimicrobianos agiam como bactericidas ou bacteriostáticas foram realizados ensaios de concentração bactericida mínima, os inóculos foram semeados com o auxílio da alça bacteriológica, onde um poço da triplicata foi semeado na placa de petri (**Figura 13**). Foram semeadas as doses referentes aos MBC de cada peptídeo e também duas concentrações acima ou abaixo quando necessárias, ou seja, a dose CBM, 2x CBM e 4x CBM em placas de petri descartáveis contendo meio ágar Mueller-Hinton. Após 24 h a 37 °C o número de colônias formadas foi contado para as três doses testadas. Os valores só foram considerados CBM quando comparados com controle positivo e apresentando uma redução de 99,9%.

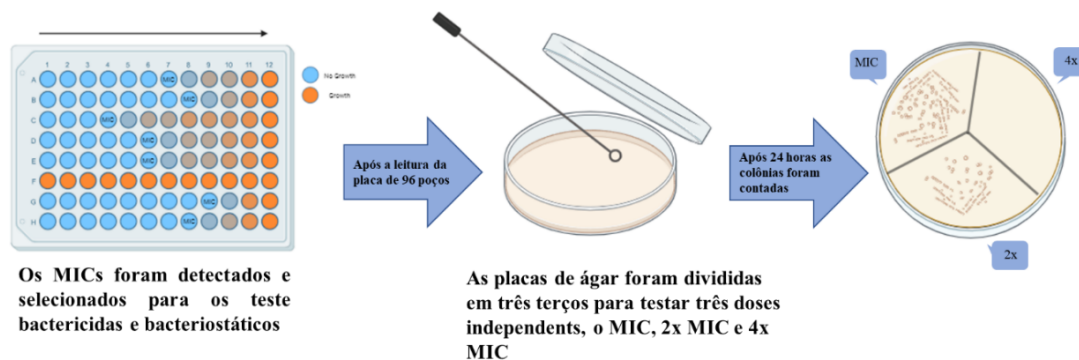


Figura 13. Imagem ilustrativa da metodologia utilizada. Foram utilizadas as doses correspondente ao 1x, 2x e 4x do CBM de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4.9. Determinação da atividade hemolítica dos peptídeos

Para o ensaio para avaliação da atividade hemolítica foi empregado o método descrito por (Onuma *et al.*, 1999), com modificações. Eritrócitos humanos do tipo O, oriundo de um doador saudável foi centrifugado e lavado quatro vezes com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 contendo NaCl 150 mM (tampão-salina) para remoção total de plasma. Em seguida, foi preparada uma suspensão a 1% (v/v) de eritrócitos. Alíquotas de 100 µL dos peptídeos foram ressuspensas em tampão-salina na concentração inicial de 256 µM e diluídos em série em placas de 96 poços de fundo U. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foi misturada às amostras e as placas foram incubadas por 60 min à temperatura de 37 °C. Após a incubação, as placas foram centrifugadas a 2.000 x g por 3 min. Alíquotas de 100 µL de cada sobrenadante foram transferidas para os poços de uma placa de 96 poços de fundo chato (Kasvi, Brasil) e foi realizada leitura espectrofotométrica a 405 nm em leitora de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA). Utilizou-se 100 µL da suspensão de eritrócitos a 1% (v/v) incubada com 100 µL de Triton X-100 1% (v/v) como referência de 100% de hemólise e 100 µL de suspensão de eritrócitos a 1% (v/v) incubada com 100 µL de tampão-salina como referência de 0% de hemólise.

$$\text{Hemolítico (\%)} = \frac{(A405_{\text{peptídeo}} - A405_{\text{tampão}})}{(A405_{\text{triton}} - A405_{\text{tampão}})} \times 100$$

4.10. Análise por dicroísmo circular dos peptídeos antimicrobianos

A análise de estruturas secundárias foi estimada por dicroísmo circular (DC), utilizando-se o espectropolarímetro Jasco, modelo J-815 (Jasco instrumentos, Japão) equipado com sistema de controle de temperatura Peltier, conectado à uma bomba de água

(Instrumentos analíticos, Japão). Os espectros dicróicos foram obtidos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm, na faixa de comprimento de onda distantes da luz UV (190 – 260 nm) com intervalos de 0,2 nm, taxa de escaneamento de 100 nm/min, tempo de resposta de 0,5 segundos e largura da banda de 0,85 nm, na temperatura de 25 °C. Os resultados foram analisados no software Spectra Manager II.

Os peptídeos sintéticos Pp2a e GsD (Wild Type) e modificados (ATCUN) foram analisados na concentração de 50 µM, na presença de água, de Trifluoroetanol (TFE) a 50% (v/v) e em dodecil sulfato de sódio (SDS) 35 mM (m/v). Os espectros foram obtidos a partir da média de cinco leituras consecutivas e a subtração dos valores do sinal dicróico do espectro do solvente, foi realizada sem a presença do peptídeo, utilizado como branco. As elipticidades (mdeg) obtidas no ensaio foram convertidas em elipticidade molar ($[\theta]$) (graus.cm².dmol⁻¹) baseada na massa molecular média calculada por resíduo de 115 Da, segundo a equação 1:

$$[\theta] = \frac{(115 \times \alpha)}{(10 \times C \times l)} \quad eq(1)$$

Onde, α é o sinal dicróico em mdeg, C é a concentração da amostra (mg. mL⁻¹) e l é o trajeto óptico (cm) da cubeta utilizada. No entanto, a estrutura secundária em α -hélice foi estimado considerando os valores de elipticidade molar (graus.cm².dmol⁻¹) em λ_{222} nm com base na equação 2 (Corrêa & Ramos, 2009), onde $[\theta]_{222}$ é a elipticidade residual molar em 222 nm (em graus.cm².dmol⁻¹), fH é a helicidade fracionária (em %).

$$fH = \frac{([\theta]_{222} - 3,000)}{(-36,000 - 3,000)} \quad eq(2)$$

4.11. Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para visualização das alterações morfológicas em *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi utilizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Após o período de crescimento, as bactérias foram centrifugadas à 13.000 rpm por 10 min e lavadas com PBS 10 mM (pH 7.5) e ressuspensas para um OD = 0.3, e incubadas com os peptídeos por 1 h e 30 min, usando os valores correspondentes ao CBM. Ao término do tempo de incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e centrifugadas a 13.000 rpm por 5 min. Os pellets foram fixados com Karnovsky 0,1% overnight, em seguida lavados com tampão e desidratados gradualmente em acetona. Depois foram secas em ponto crítico e

metalizadas com ouro, as amostras foram observadas usando JEOL JSM-7001F scanning electron microscope (Jeol Ltd., Akishima, Tokyo, Japan).

Para visualizar a atividade antimicrobiana na presença do cobre tipo (II) sobre a membrana de *S. aureus* ATCC 25923 foi realizado dois ensaios isolados, onde o primeiro teria apenas a incubação dos análogos com CuSO_4 à 37°C durante 30 minutos no shake, e o segundo teria o meio Mueller-Hinton e o tampão PBS 10 mM suplementado com CuSO_4 à $25\ \mu\text{M}$, além de uma pré-incubação como proposto por (Libardo *et al.*, 2015a).

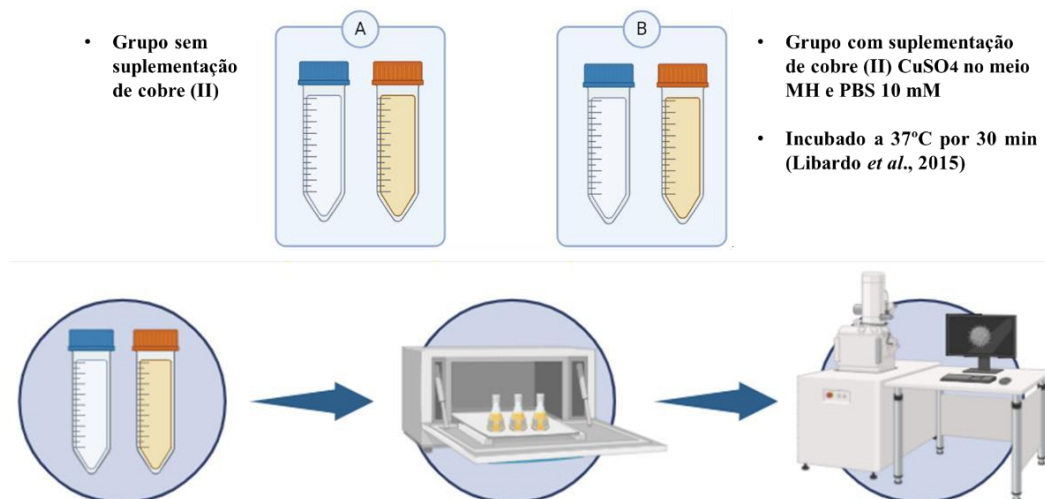


Figura 14. Ilustração dos grupos testados. (A) grupo correspondente aos peptídeos selvagens e análogos sem suplementação de Cu^{2+} , (B) grupo correspondente aos análogos incubados com Cu^{2+} e aos análogos que tiveram suplementação de Cu^{2+} no meio Mueller-Hinton e PBS 10 mM.

4.12. Determinação da atividade antiproliferativa sobre células tumorais

Para a avaliação da atividade antiproliferativa foram utilizadas as linhagens celulares de carcinoma mamário humano MCF-7 (ATCC HTB-22) e carcinoma cervical imortalizadas HeLa (ATCC CCL-2), bem como queratinócito normal adulto HaCaT (CVCL_0038). As células foram cultivadas utilizando o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) com suplementação de 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, ambas linhagens foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Para manutenção das garrafas de cultura celular, os meios eram trocados a cada 48 horas até atingirem um estado de confluências para realização dos experimentos.

Após o período de incubação as células foram adicionadas em placas de 96 poços com uma densidade de 10×10^3 células/poço em seguidas incubadas overnight. Para o ensaio de atividade antiproliferativa foi-se utilizado alíquotas de $50\ \mu\text{L}$ (na concentração inicial: $256\ \mu\text{M}$) as amostras foram filtradas em filtros de $0,22\ \mu\text{m}$ (Millex GV, Millipore, Merck), diluídas em série e misturadas com DMEM 2X. Em seguida, as células foram

incubadas por 24 h a 37 °C, após o período de tratamento as células foram novamente incubadas por 3 horas com 15 µL de MTT (5 mg/mL em PBS, pH 7,4) com 135 µL de meio DMEM 1X completo para formação de cristais de formazam. Os cristais de formazam foram solubilizados em 100 µL de DMSO e as placas foram lidas a 595 nm em leitora de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA).

4.13. Análise de ativação de neutrófilos por citometria de fluxo

Para realização dos testes de citometria de neutrófilos as amostras foram ressuspensas em 100 vezes o volume do CIM, no caso foram escolhidos os CIMs de 8 µM para os peptídeos selvagens e 4 µM para os modificados. As células foram separadas por gradiente de densidade de Percoll com concentrações de 60% e 70%, em seguida foram lavadas 2 vezes para retirada do Percoll da amostra e hemólise para retirada das hemácias residuais. As células foram ajustadas para 6.667 cell/µL e alíquotas contendo 91 µL foram separadas para análise de citometria, em seguida foi adicionada 0,91 µL de solução contendo fMLP (N-Formilmetionil-leucil-fenilalanina), após a adição os tubos foram incubados por 1 h à 37 °C. Ao término da incubação as amostras foram centrifugadas 1.600 rpm por 5 min à 19 °C, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas duas vezes com 500 µL de PBS gelado. As amostras foram observadas com equipamento BD FACSVerse™ Cell Analyzer (BD Biosciences), os parâmetros escolhidos foram 10.000 eventos com flow rate médio, os canais escolhidos FSC 240, SSC 340 e FITC 260, inicialmente foi escolhido um gráfico de densidade para escolher a melhor range de células, e as amostras foram analisadas com gráfico de histograma.

4.14. Determinação de quimiotaxia de neutrófilos em tempo real

Os ensaios de detecção da quimiotaxia de neutrófilos foi realizado utilizando-se o sistema de análise celular em tempo real (RTCA) que detecta a diminuição da impedância, para a realização deste ensaio foi utilizado o equipamento xCELLigence RTCA-DP (ACEA Biosciences Inc.) acoplado nas placas de invasão e migração celular (CIM-Plate 16; ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA). Para a obtenção dos neutrófilos foi-se utilizado a mesma metodologia já supracitado no item 4.13., para determinação da migração dos neutrófilos foi padronizado a dose 16 µM para todos os peptídeos testados, como quimiotático positivo foi utilizado fMLP (N-Formilmetionil-leucil-fenilalanina) e para controle negativo foi utilizado HBSS (Hank's Balanced Salt Solution).

A placa foi montada com a câmara inferior contendo 160 μL de amostra, fMLP 100 nM (controle positivo) e HBSS (controle negativo) todo ensaio foi realizado em duplicata. Em seguida, a câmara superior foi travada com a parte inferior onde foi acrescentado 25 μL de HBSS em todos os poços, e incubada a temperatura ambiente por 60 minutos, antes dos neutrófilos serem adicionados, após o período de incubação alíquotas de 60 μL de células contendo 6.667 cell/ μL suspensas foram adicionadas na parte superior da placa. A análise foi programada para medição do índice celular a cada 60 segundos durante 3 horas, as aquisições dos dados de índice celular (IC) foram obtidas e analisadas com auxílio do software xCELLigence RTCA (ACEA Biociências). Ao término das análises as placas foram lavadas com PBS três vezes seguidas de duas lavagens com água Milli-Q, após a lavagens foram adicionadas 100 μL de solução de Tripsina-EDTA (tripsina 0,25%, EDTA 0,53 mM), e incubadas em temperatura ambiente por 40 minutos e lavadas com água Milli-Q para reutilização. Para a análise dos dados foi-se utilizado o teste de t student, para comparação entre os grupos utilizando-se a diferença significativa ($p < 0,05$).

4.15. Análises Computacionais

A predição da estrutura secundária e as características físico-químicas foram determinadas via métodos computacionais e análises de bioinformática. A estrutura secundária dos peptídeos foi predita com o servidor online SOPMA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr>), em seguida modeladas com a utilização do servidor online PEP-FOLD 4 (<http://moby2.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD4>), e visualizadas com auxílio do software PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC). Para a determinação da roda helicoidal foram utilizados os métodos de Schiffer-Edmundson no Heliquest (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) e o NetWheels (<http://lbqp.unb.br/NetWheels/>), respectivamente. Os parâmetros peptídicos, dentre eles massa molecular teórica, carga líquida, pI, face hidrofóbica, hidrofobicidade, além da grande média de hidropaticidade (GRAVY) foram calculadas pelo Heliquest (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) e ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>).

5. RESULTADOS

5.1. Síntese química manual dos peptídeos antimicrobianos análogos

Os peptídeos modelos para a elaboração dos análogos produzidos no presente estudos foram dois peptídeos antimicrobianos isolados da secreção de peixes da família Serranidae, ambas pertencentes ao grupo denominado Grammistina, mais especificadamente os peptídeos Pp2a (isolado da espécie *Pogonoperca punctata*) e GsD (isolado da espécie *Grammistes sexlineatus*). Esses peptídeos apresentam 13 resíduos de aminoácidos cada um e possuem massas moleculares de 1447,99 Da para o peptídeo Pp2a e 1544,95 Da para o peptídeo GsD, ambos identificados por (Shiomi *et al.*, 2000; Shiomi *et al.*, 2001). Uma das características importantes destes peptídeos é sua carga líquida baixa e ausência de face hidrofóbica, que diferem completamente dos peptídeos antimicrobianos até então estudados, sempre apresentando carga líquida positiva elevada e uma face hidrofóbica delimitada e marcante.

Os dois análogos foram idealizados acrescentando-se apenas três resíduos específicos na região amino-terminal, denominado motivo de ligação amino terminal Cu (II) e Ni (II) ou simplesmente ATCUN. Os três resíduos de aminoácidos selecionados e inseridos foram Val, Ile e His por demonstrarem maior interação com cobre do tipo II, ou seja, os análogos extensão da cadeia peptídica com 16 resíduos de aminoácidos no total, mantendo a carga líquida e ausência de face hidrofóbica, características esta que os tornam interessantes alvo de estudo (**Tabela 1**).

Tabela 1. Peptídeos selecionados para avaliação funcional.

Peptídeos	Sequência	Número de resíduos	Massa Molecular (M+H) ⁺
Pp2a-Wild Type	FIGGIISLIKKLF	13	1447.99
ATCUN-Pp2a	VIH FIGGIISLIKKLF	16	1798.22
GsD-Wild Type	FIGGIISFFKRLF	13	1544.95
ATCUN-GsD	VIH FIGGIISFFKRLF	16	1893.14

As modificações propostas estão marcadas em vermelho.

A síntese foi realizada manualmente em fase sólida, utilizando-se a resina Wang (0,32 mmol/g), com o resíduo de Phe previamente acoplado Fmoc-Phe-Wang. Após a síntese dos peptídeos análogos, foi realizada uma etapa de clivagem para remoção dos peptídeos da resina. A solução contendo as amostras foram filtradas para remoção da resina, além de contaminantes como, por exemplo, os reagentes que atuam com antioxidantes além dos protetores de cadeias laterais tBu (t-butila), Boc

(t-butiloxicarbonila) e trt (trítala).

Durante o processo de purificação, os perfis cromatográficos não demonstraram a presença de fragmentos peptídicos, uma vez que houve a presença de apenas uma fração abundante. No entanto, foram observados alguns compostos utilizados durante a etapa de clivagem, além dos subprodutos oriundos da síntese, o que é esperado para este procedimento. Foram realizadas análises por espectrometria de massas para confirmação da qualidade dos peptídeos sintéticos purificados, por meio da comparação das massas moleculares obtidas experimentalmente com as massas moleculares teóricas esperadas para cada um dos peptídeos produzidos. Em posse de todos os dados poderemos levantar todos os aspectos físico-químicos, tais como face-hidrofóbica, a carga líquida e valor de Gravy (**Tabela 2**).

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos dos peptídeos antimicrobianos selvagens e seus dois análogos.

Peptídeos	Massa Cal. (Da)	Massa Obs. (Da)	Carga líquida	Face hidrofóbica	Hidrofobicidade <H>	GRAVY
Pp2a-Wild Type	1447,92	1447,99	+2	Nenhum	0,935	1,677
GsD-Wild Type	1534,89	1544,95	+2	Nenhum	0,940	1,423
ATCUN-Pp2a	1797,13	1798,22	+2	Nenhum	0,961	1,706
ATCUN-GsD	1893,10	1893,14	+2	Nenhum	0,957	1,500

5.2. Purificação dos peptídeos análogos sintetizados manualmente e análises por espectrometria de massas

A síntese dos peptídeos análogos foi realizada em fase sólida, utilizando-se a metodologia HBTU/DIPEA devido a sua alta eficiência para os acoplamentos do tipo Wang-resina. A etapa de purificação foi realizada com o auxílio de cromatografia líquida de fase reversa, sendo considerado o pico de maior intensidade o componente principal do estudo, e para determinação de seu grau de pureza e a confirmação da qualidade dos produtos produzidos na síntese, foi realizado uma comparação das massas moleculares obtidas experimentalmente com as massas moleculares teóricas esperadas para cada um

dos peptídeos, via análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF. Ambos os peptídeos sintetizados apresentam 76.9% de identidade entre eles, com apenas três alterações em toda sequência, onde Pp2a apresenta em sua composição os resíduos de Leu e Ile nas posições 8 e 9 respectivamente. Já o peptídeo GsD apresenta duas Phe nas mesmas posições e no resíduo 11 as alterações são marcadas pela troca da Lys no Pp2a por Arg em GsD. O acréscimo da região N-terminal que está relacionada com a modificação dos análogos, ainda mantém a alta taxa de identidade entre eles, com 81.2% de identidade. Apesar de disto, as características hidrofóbicas se mantiveram, o que faz com que ambos tenham a propriedade de eluírem na mesma porcentagem da fase móvel orgânica da cromatografia líquida (**Figura 15 e 16**), as corridas cromatográficas tiveram uma diferença de tempo de retenção, no entanto, eluíram com 45% de acetonitrila.

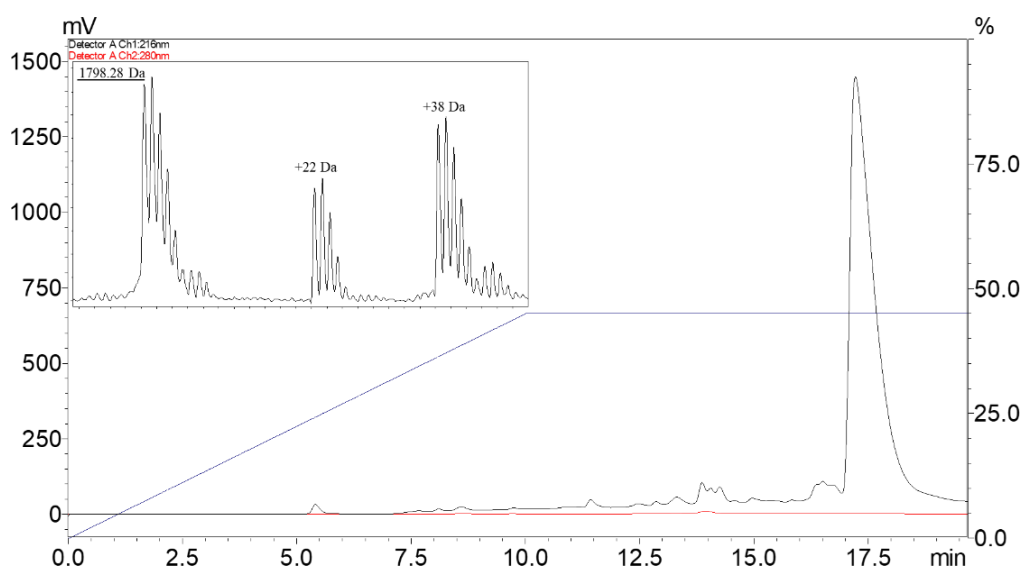


Figura 15. Perfil cromatográfico típico da purificação do peptídeo análogo ATCUN-Pp2a, empregando-se coluna semi-preparativa de fase reversa C18 (Vydac, 218TP510, C18 - 25 cm x 10 mm x 5 μ m) com fluxo de 1 mL/min e detecção ao UV em 216 nm e 280 nm. Na parte superior (inserto), observa-se o componente principal com massa molecular monoisotópica protonada $[M+H]^+$ de 1798,28 Daltons e os adutos de sódio e potássio correspondente ao +22 e +38, respectivamente. A análise foi realizada em equipamento modelo AutoFlex II, (Bruker, Alemanha), aplicando-se 1 μ L de matriz HCCA a 20 mg/mL.

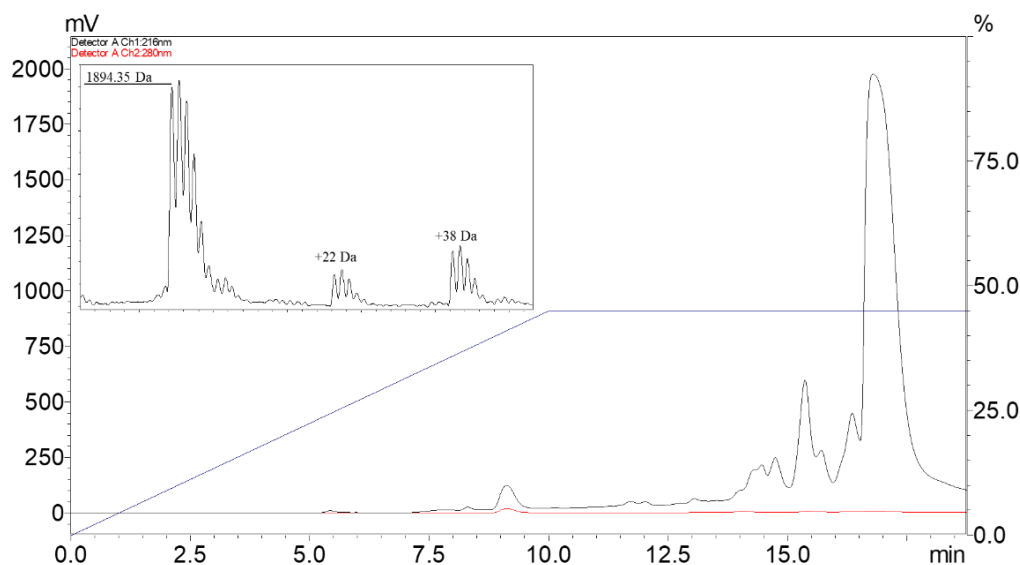


Figura 16. Perfil cromatográfico típico da purificação do peptídeo análogo ATCUN-Pp2a, empregando-se coluna semi-preparativa de fase reversa C18 (Vydac, 218TP510, C18 - 25 cm x 10 mm x 5 μ m) com fluxo de 1 mL/min e detecção ao UV em 216 nm e 280 nm. Na parte superior (inserto), observa-se o componente principal com massa molecular monoisotópica protonada $[M+H]^+$ de 1894,35 Daltons e os adutos de sódio e potássio correspondente ao +22 e +38, respectivamente. A análise foi realizada em equipamento modelo AutoFlex II, (Bruker, Alemanha), aplicando-se 1 μ L de matriz HCCA a 20 mg/mL.

5.3. Avaliação estrutural por simulação computacional e por dicroísmo circular

As análises das projeções em roda helicoidal permitiram avaliar que os peptídeos antimicrobianos selvagens e seus análogos apresentam tendência a adotar conformação em α -hélice não anfipática, pois não apresentam face hidrofóbica. Todos os peptídeos apresentaram carga líquida +2 (**Figura 17**). Uma das características da Grammistinas reside no fato de apresentarem em sua composição uma grande quantidade de resíduos apolares, o que pode estar relacionada com a seletividade do meio aquoso no qual se encontram naturalmente, já que são moléculas de origem de ambiente marinho, isoladas da secreção de peixes.

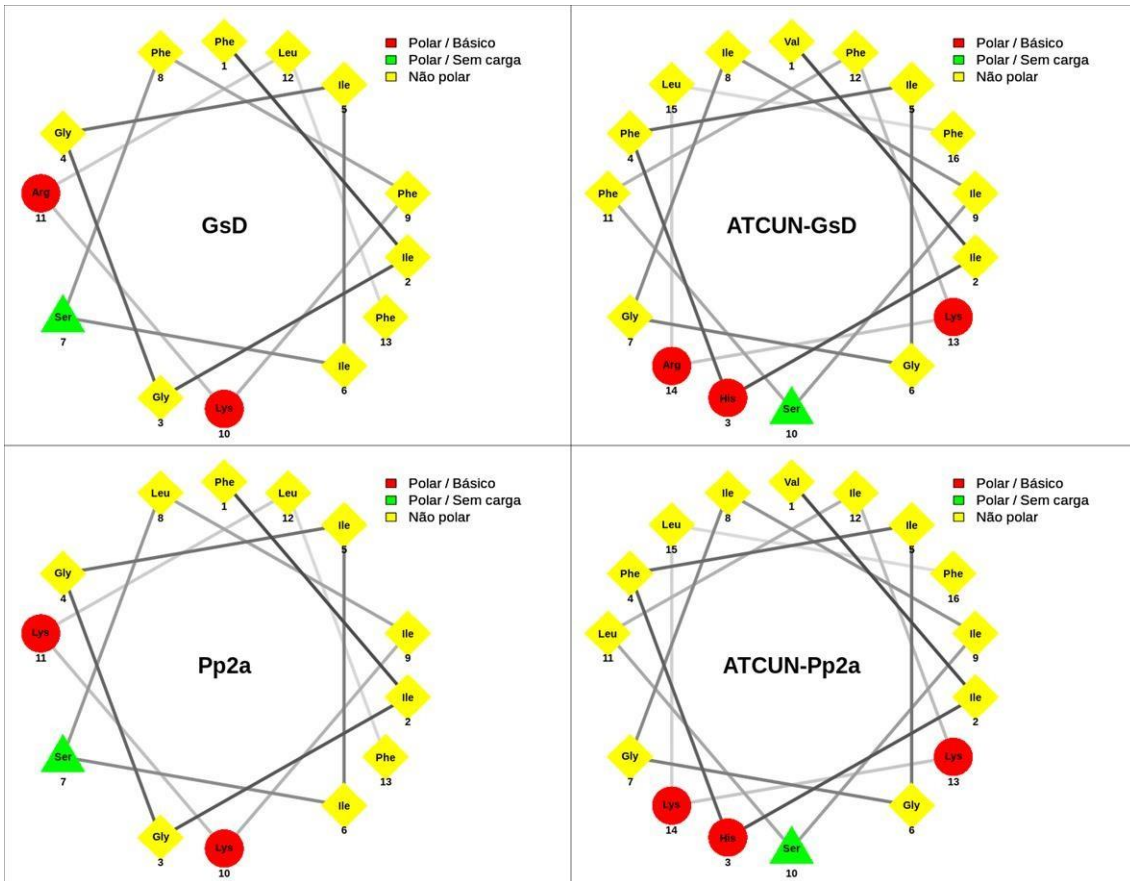


Figura 17. Projeções em roda helicoidal (Schiffer-Edmundson) dos peptídeos Grammistinas selvagens e seus análogos.

A predição das estruturas secundárias foi realizada via análises computacionais, com o auxílio dos servidores online SOPMA e PEP-Fold 4. O servidor SOPMA foi utilizado para determinar a estruturação secundária via clusterização com outras sequências semelhantes, diferentemente do PEP-FOLD 4 que foi utilizado para realizar uma estruturação via abordagem *de novo* que visa prever as estruturas a partir de suas sequências de aminoácidos. A predição realizada pelo SOPMA demonstra que todos os peptídeos possuem estrutura 100% aleatória, no entanto, quando se avalia sequências resíduo por resíduo observa-se uma tendência à formação de estruturas em α -hélices (**Figura 18**).

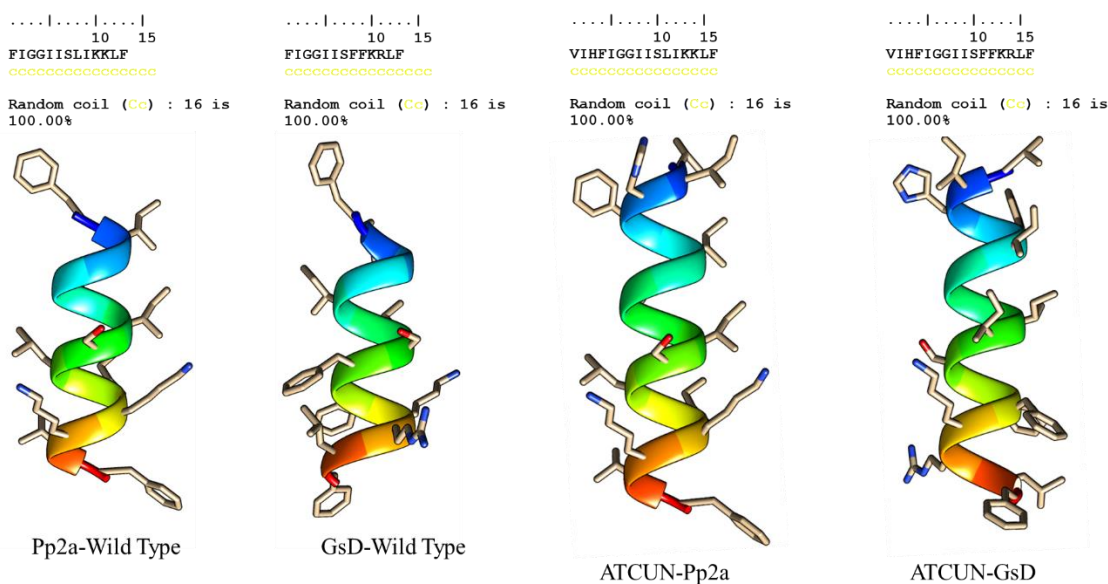


Figura 18. Comparação de modelos teóricos tridimensionais dos peptídeos gerados pelo site PEP-Fold 4. Em cima de cada estrutura está a porcentagem da sequência estrutural proposta pelo site SOPMA. Em azul, a região mais eletronegativa (N-terminal) e, em vermelho, a região eletropositiva (C-terminal).

As análises experimentais por dicroísmo circular permitiram investigar os elementos de estrutura secundária presentes nos peptídeos em estudo. Os espectros dicróicos permitem observar que todas as amostras adotam conformação em α -hélice quando na presença de SDS e/ou TFE 50%. No entanto, quando diluído em água Milli-Q, sua estruturação torna-se desordenada. Essas características similares podem estar relacionadas com suas estruturas primárias semelhantes.

Os perfis dicroísmos em água mostraram banda dicróica negativa entre 198 e 205 nm, indicando que estes peptídeos apresentam estrutura desordenada em solução aquosa. Entretanto, os espectros dicróicos dos peptídeos em SDS e TFE 50% apresentam uma banda dicróica positiva ~195 nm e bandas negativas em 208 e 222 nm, indicando que a presença destes reagentes induz a estruturação destes peptídeos, ocasionado a adoção de conformação em α -hélice (**Tabela 3**). O SDS e o TFE apresentaram o mesmo potencial de indução da formação de α -hélices para os peptídeos selvagens GsD-Wild Type e Pp2a-Wild Type, bem como para o análogo ATCUN-GsD, no entanto, diferentemente dos outros peptídeos, no peptídeo análogo ATCUN-Pp2a, o SDS induziu maior estruturação em α -hélices, quando comparado ao TFE 50% (**Figura 19**).

Tabela 3. Conteúdo de estrutura em α -hélice dos peptídeos em água, SDS e TFE.

Solução	Pp2a-Wild Type (%)	ATCUN-Pp2a (%)	GsD-Wild Type (%)	ATCUN-GsD (%)
H ₂ O	18,79	15,81	14,78	13,59
SDS (35 mM)	38,27	46,22	25,72	27,47
TFE (50%)	39,23	38,84	28,43	29,45

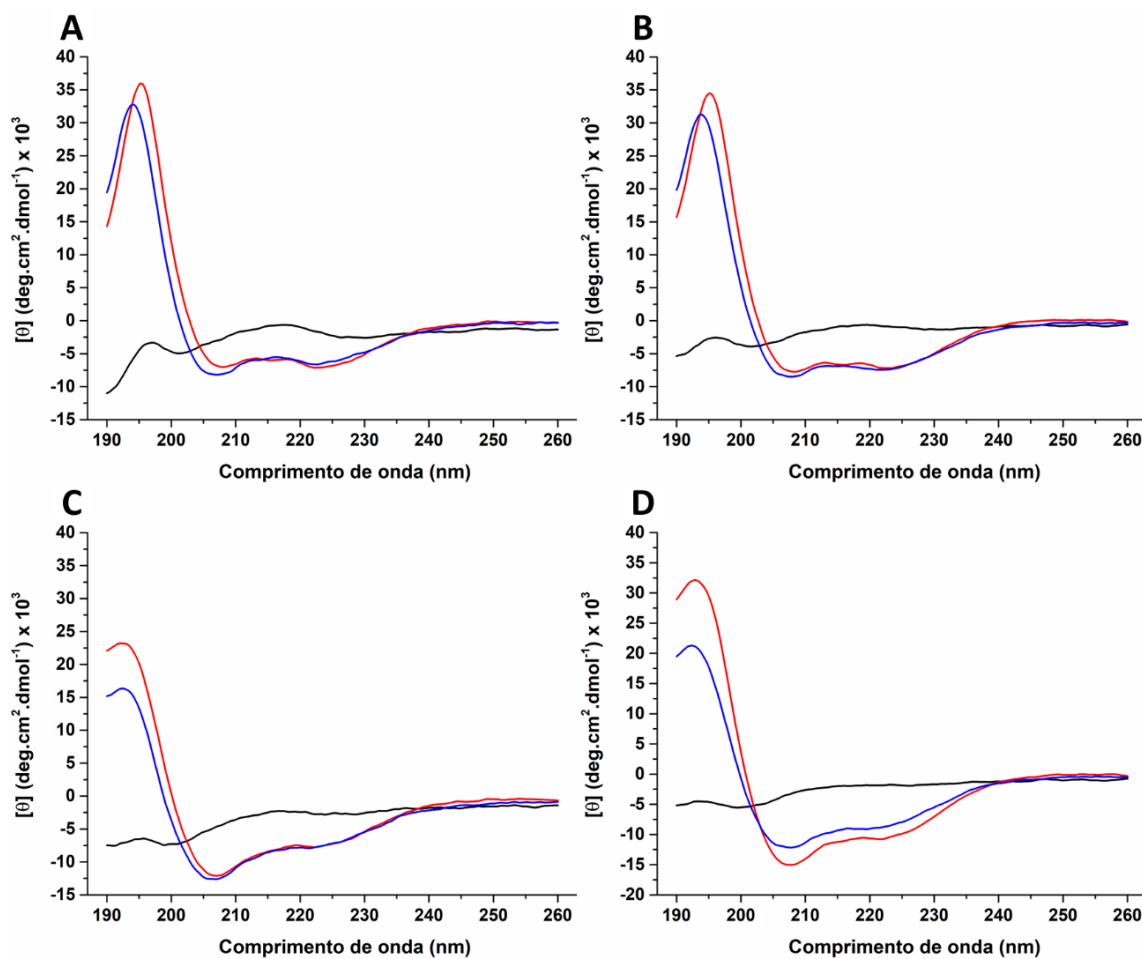


Figura 19. Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (190 a 260 nm) dos peptídeos selvagens e seus análogos. Os peptídeos GsD-Wild Type (A) e ATCUN-GsD (B) em água (linha preta), SDS (linha vermelha) e TFE (linha azul) a 25 °C. Os peptídeos Pp2a-Wild Type (C) e ATCUN-Pp2a (D), demonstraram perfis de espectro dicrótico semelhantes.

5.4. Avaliação dos efeitos antimicrobianos e determinação do modo de ação sobre membranas bacterianas

Os ensaios antimicrobianos foram realizados contra oito espécies bacterianas divididas em Gram-positivas e Gram-negativa, além de uma espécie de levedura. Os experimentos tiveram como objetivo avaliar o ganho de potência dos análogos com ou

sem cobre tipo II em comparação ao selvagem. Para os experimentos com cobre foi-se utilizado CuSO_4 (Sulfato de cobre) como doador de íons.

As amostras GsD-Wild Type e ATCUN-GsD sem cobre demonstraram maior atividade do que ATCUN-GsD na presença de cobre, tanto para as linhagens comuns quanto para as linhagens resistentes. As bactérias Gram-negativas comuns (*E. coli* e *K. pneumoniae*) exibiram uma inibição de crescimento com valores de CIM iguais a $16 \mu\text{M}$, diferentemente do seu CBM que demonstrou uma variação entre 64 e $32 \mu\text{M}$. Já os análogos não demonstraram atividade significativa na maior dose testadas. As bactérias resistentes de isolados clínicos, tais como *P. aeruginosa* resistente a múltipla drogas e *K. pneumoniae* resistente a carbapenemase, não sofreram inibição de crescimento quando tratadas com os peptídeos antimicrobianos em suas maiores doses. No entanto, a linhagem resistente a carbapenêmicos de *Acinetobacter baumannii* demonstrou uma inibição de crescimento com doses variando entre 4 e $8 \mu\text{M}$, para os peptídeos GsD-Wild Type e ATCUN-GsD, porém para os análogos na presença de cobre, a dose subiu de 8 para $64 \mu\text{M}$. Mais estudos devem ser realizados para determinar o efeito.

As bactérias Gram-positivas apresentaram uma variação nas doses efetivas que inibiram seu crescimento, por exemplo, para as linhagens de *S. aureus* sensíveis e resistente a meticilina, as doses foram de $8 \mu\text{M}$ para os peptídeos GsD-Wild Type e ATCUN-GsD com cobre, porém, sem a presença de cobre, os valores de CIM obtidos foram mais potentes em $4 \mu\text{M}$. Para a bactéria *S. epidermidis* sensível as doses variaram, porém o peptídeo análogo na presença de cobre apresentou um valor de CIM $4 \mu\text{M}$, em comparação à condição sem cobre onde o valor de CIM foi $>128 \mu\text{M}$. O CBM dos peptídeos exibiu ganho de potência em comparação ao selvagem, onde o análogo com ou sem cobre apresentou valores de CIM de $16 \mu\text{M}$. No caso da levedura *C. albicans*, não houve demonstração de diminuição do crescimento, mesmo nas concentrações mais altas, bem como o seu CBM (**Tabela 4**).

Tabela 4. Atividade antimicrobiana em μM dos peptídeos sintéticos (comparação entre o tipo selvagem análogos, CIM/CBM).

Microorganismos Patogênicos	GsD-Wild Type	ATCUN-GsD sem CuSO4	ATCUN-GsD com CuSO4
Bactéria gram-negativa			
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	16/64	>128/ND	>128/ND
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	16/32	>128/>128	>128/ND
<i>P. aeruginosa</i> resistente à múltipla drogas (PA-MDR)*#	128	>128	>128
<i>K. pneumoniae</i> resistente a carbapenêmicos (KPC CAPB053)*#	>128	>128	>128
<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenêmicos (CRAB)*#	4	8	64
Bactéria gram-positiva			
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	8/32	4/16	8/16
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	32/32	>128/128	4/8
<i>S. aureus</i> resistente à meticilina (MRSA)*#	4	4	8
Levedura			
<i>C. albicans</i> (ATCC 14053)	>128/>128	>128/>128	128/128

*Isolado clínico; # CBM não realizado

O peptídeo ATCUN-Pp2a, na presença de cobre, demonstrou um ganho de potência significativo em comparação ao peptídeo selvagem e ao análogo sem cobre. As bactérias *E. coli* e *K. pneumoniae*, em ambas condições demonstraram inibição de crescimento bacteriano com valores de CIM 32 e 16, respectivamente. O peptídeo selvagem Pp2a-Wild Type não demonstrou atividade na maior dose testada para ambas as bactérias, porém o análogo sem cobre demonstrou uma inibição com CIM de 64 μM . A linhagem resistente de *P. aeruginosa* também mostrou uma melhor sensibilidade para o análogo com cobre. O peptídeo exibiu um valor de CIM 64 μM , enquanto os outros dois não mostraram atividade em doses altas. Para as Gram-negativas, a que demonstrou maior resistência aos peptídeos foi *K. pneumoniae* resistente a carbapenemase, onde os peptídeos Pp2a-Wild Type e ATCUN-Pp2a, com ou sem cobre, não demonstraram inibição em 128 μM , diferentemente da bactéria resistente a carbapenêmicos *Acinetobacter baumannii* que demonstrou maior seletividade para o selvagem e o análogo sem cobre, ambos com CIM de 8 μM .

Os peptídeos Pp2a-Wild Type e ATCUN-Pp2a apresentaram maior seletividade para bactérias Gram-positivos do que para as Gram-negativas. As linhagens de *S. aureus* sensível e resistente à metilina exibiram valores CIM de 8 μ M, sendo o único valor discrepante um CIM 16 μ M para a condição do análogo com cobre. Estudos adicionais precisam ser realizados para se determinar a causa dessa variação. Outra linhagem sensível que demonstrou ganho de sensibilidade quando exposta ao peptídeo análogo com ou sem cobre em comparação ao tipo selvagem, a bactéria *S. epidermidis* que apresentou valores de CIM de 16 e 4 μ M para ATCUN-Pp2a nas condições sem e com cobre, respectivamente. Os peptídeos Pp2a-Wild Type e ATCUN-Pp2a não exibiram atividade sobre a levedura *C. albicans*, independente da dosagem ou condição (**Tabela 5**).

Tabela 5. Atividade antimicrobiana em μ M dos peptídeos sintéticos (comparação entre o tipo selvagem e análogos, CIM/CBM).

Microorganismos Patogênicos	Pp2a-Wild-Type	ATCUN-Pp2a sem CuSO4	ATCUN-Pp2a com CuSO4
Bactéria gram-negativa			
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	>128/ND	>128/ND	32/64
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	128/128	64/64	16/32
<i>P. aeruginosa</i> resistente à múltipla drogas (PA-MDR)*#	>128	>128	64
<i>K. pneumoniae</i> resistente a carbapenêmicos (KPC CAPB053)*#	>128	>128	>128
<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenêmicos (CRAB)*#	8	8	64
Bactéria gram-positiva			
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	8/16	8/8	16/16
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	>128/>128	16/64	4/16
<i>S. aureus</i> resistente à metilina (MRSA)*#	8	8	8
Levedura			
<i>C. albicans</i> (ATCC 14053)	>128/>128	>128/>128	128/128

*Isolado clínico; # CBM não realizado

5.5. Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para avaliar a integridade e morfologia de membrana externa de *S. aureus* ATCC 25923 foi empregada microscopia eletrônica de varredura. Para viés de comparação foi utilizado PB S 10 mM (pH 7,5) como controle negativo, representado pela (**Figura 20A**), onde podemos observar que a membrana externa de *S. aureus* apresenta uma superfície lisa e sem presença de *debris* celulares, com a delimitação estrutural da membrana bem definida. No entanto, após o tratamento de 1 h e 30 min na concentração 1x do CBM, pode-se observar que os peptídeos selvagens e análogos ocasionaram alterações leves e/ou abruptas na superfície das bactérias. As bactérias testadas apresentaram encolhimento, rugosidade, formação de *debris* e danos estruturais graves, que estão relacionados à destruição completa da bactéria.

Na (**Figura 20B**) que representa a condição de incubação de *S. aureus* com o peptídeo Pp2a-Wild Type na concentração de 16 μM (equivalente ao CBM), pode-se observar formação de *debris* celulares, bem como rugosidade na membrana de alguns aglomerados de bactérias. Também se observa a formação de uma abertura na membrana de *S. aureus*, que está relacionada à sua degradação, além de uma junção entre as membranas de aglomerados bacterianos. Na (**Figura 20D**) que apresenta a incubação da bactéria com o peptídeo sintético ATCUN-Pp2a na concentração de 8 μM (equivalente ao CBM) sem Cu^{2+} , pode-se observar a presença de estruturas filamentosas que podem estar relacionadas com a formação de biofilme ou restos de meio Mueller-Hinton, porém também se observa uma redução no tamanho das bactérias e perfurações na superfície da membrana, apesar do aglomerado parecer intacto. Na (**Figura 20C**) que representa a condição de incubação de *S. aureus* com o peptídeo GsD-Wild Type na concentração de 32 μM (equivalente ao CBM), pode-se observar a presença de estruturas filamentosas e rugosidade na superfície da membrana de *S. aureus*. Para o peptídeo ATCUN-GsD sem Cu^{2+} na concentração de 16 μM (equivalente à CBM), representada pela (**Figura 20E**), pode-se observar formação de aberturas na membrana do aglomerado bacteriano e *debris* celulares. Também se observa observar a junção das membranas e a deformação completa da membrana bacteriana, que pode estar relacionada com a morte celular.

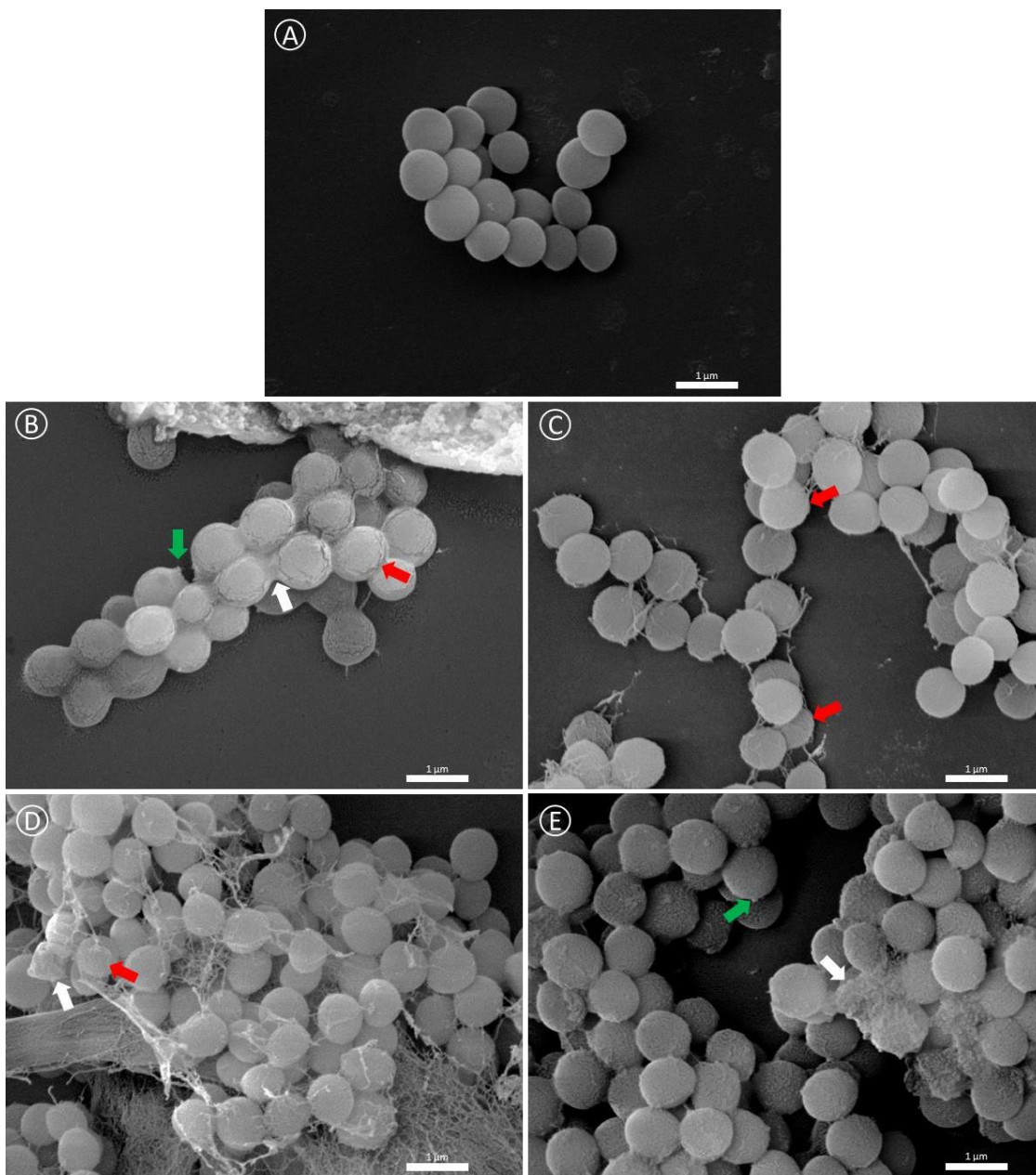


Figura 20. Micrografia de varredura eletrônica para avaliação das condições da membrana da bactéria *S. aureus* ATCC 25923: (A) controle negativo (PBS 10 mM); as imagens (B) e (C), representam os efeitos da incubação da bactéria com os peptídeos selvagem Pp2a e GsD, respectivamente, as imagens (D) e (E) representam os efeitos da incubação da bactéria com os análogos sem a presença de cobre. As setas verdes indicam *debris* celulares, as vermelhas alterações nas superfícies, como rugosidade e aberturas, as brancas indicam destruição e junção de membrana.

Os efeitos sobre a bactéria *S. aureus* do peptídeo sintético ATCUN-Pp2a com Cu^{2+} na concentração de $16 \mu\text{M}$ estão evidenciados na (**Figura 21A**), onde pode-se observar a presença de *debris*, formação de uma abertura na superfície da membrana, diminuição do tamanho da célula e, principalmente, rugosidades nas superfícies do aglomerado. No

entanto, não foi possível se determinar quais efeitos foram ocasionados pela presença de EROs.

Na (**Figura 21C**), que representa a condição de incubação de *S. aureus* com o peptídeo sintético ATCUN-Pp2a com Cu^{2+} na concentração de $16 \mu\text{M}$, pode-se observar que a suplementação com sulfato de cobre tipo (II) ao meio Mueller-Hinton durante a incubação, bem como a diluição do peptídeo análogo em PBS com sulfato de cobre, resultou em um maior aparecimento de *debris* celulares, diminuição do tamanho das células e junção de membrana. Já com a incubação do peptídeo ATCUN-GsD com Cu^{2+} foi observada diminuição no tamanho das células, rugosidade da superfície e formação de *debris* celulares. Também foi possível observar a destruição completa da membrana bacteriana, porém novamente não foi possível determinar se a causa de tais efeitos foi a produção de EROs (**Figura 21C**). Com a incubação do peptídeo ATCUN-GsD com Cu^{2+} e suplementação do meio, na concentração de $16 \mu\text{M}$ (equivalente ao CBM), foi possível observar a destruição completa de membrana, formação de *debris* e rugosidade da superfície de *S. aureus* (**Figura 21D**).

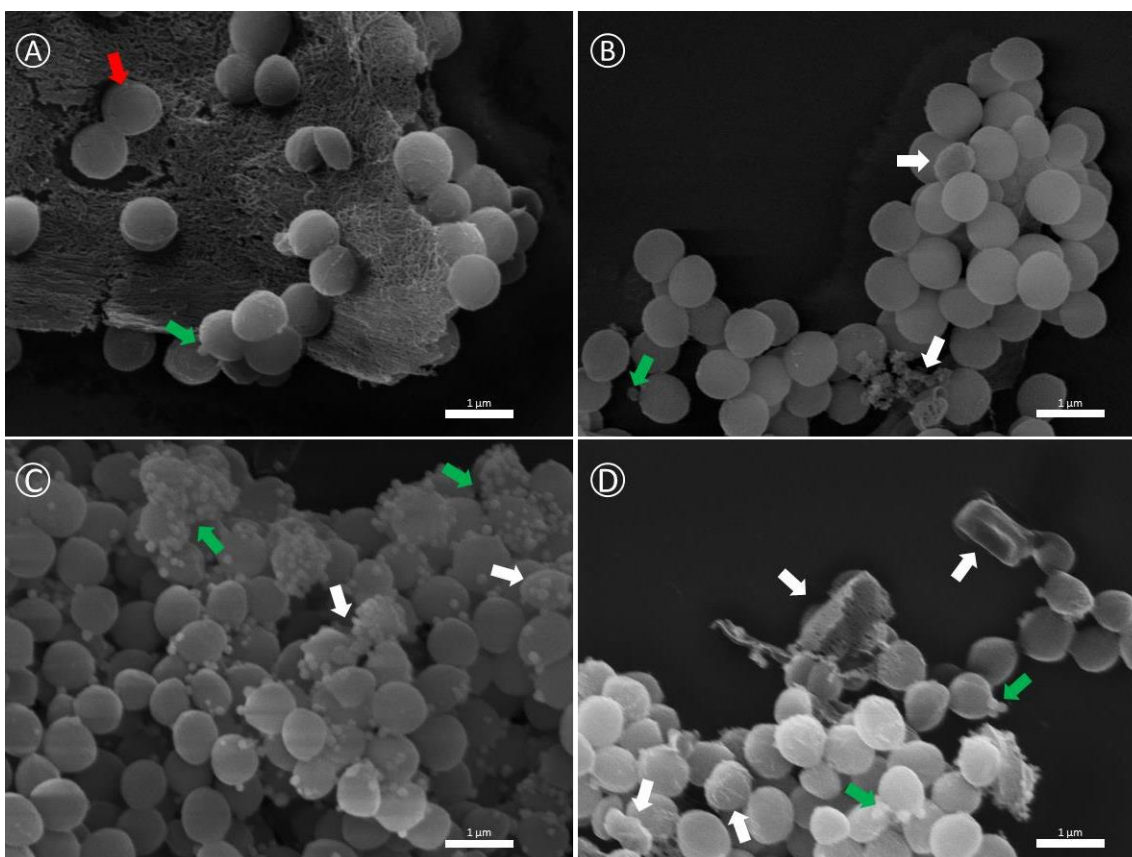


Figura 21. Micrografia de varredura eletrônica para avaliação das condições da membrana da bactéria *S. aureus* ATCC 25923, após a incubação dos peptídeos análogos na presença de cobre tipo (II). As imagens (A) e (B) correspondem aos peptídeos análogos que apenas foram incubados por 30 minutos à 37°C . As imagens (C) e (D) correspondem às condições com suplementação no

meio Mueller-Hinton e ao PBS, com a incubação por 30 minutos à 37 °C. As setas verdes indicam *debris* celulares, as vermelhas alterações na superfícies como rugosidade e aberturas e as brancas indicam destruição e junção de membrana.

5.6. Determinação da atividade hemolítica

Em relação à capacidade de lisar eritrócitos humanos, todos os peptídeos antimicrobianos estudados não demonstraram atividade hemolítica elevada, como excessão do peptídeo ATCUN-Pp2a que apresentou mais de 50% na dose de 16 μ M. Os peptídeos Pp2a-Wild Type e ATCUN-Pp2a demonstraram maior capacidade hemolítica GsD-WildType e ATCUN-GsD, entretanto, para as doses de tratamento (entre 16 e 4 μ M), para as bactérias sensíveis não se observou atividade hemolítica elevada (**Figura 22**).

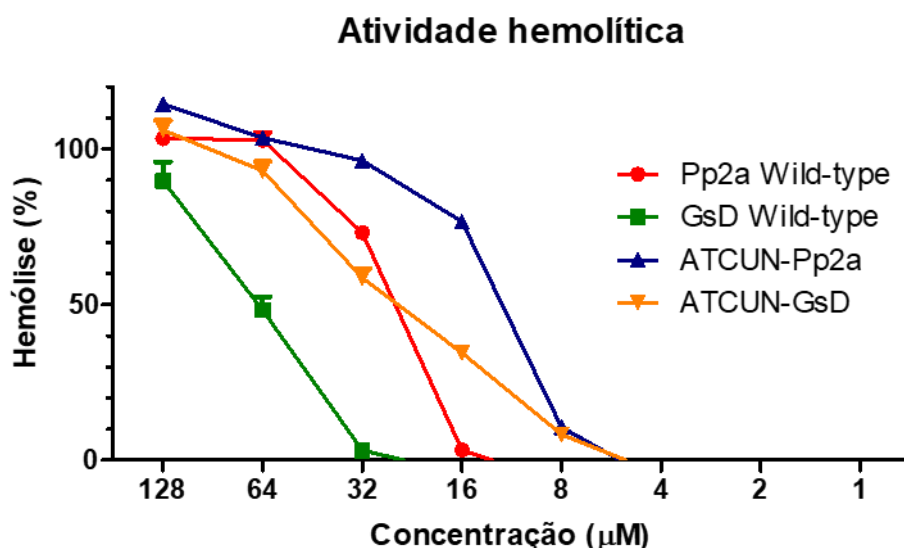


Figura 22. Atividade hemolítica (%) sobre eritrócitos humanos tratados com os peptídeos após 60 minutos de incubação. Pode-se observar que os peptídeos selvagens e seus análogos demonstram elevada atividade hemolítica, com valores de IC_{50} correspondendo a doses acima de 32 μ M.

5.7. Determinação da atividade antiproliferativa via MTT

Para determinação da atividade antiproliferativa sobre as linhagens celulares de câncer MCF-7 (ATCC HTB-22) e HeLa (ATCC CCL-2), bem como sobre a linhagem não-tumoral HaCaT (CVCL_0038), foi utilizado o ensaio de viabilidade celular por incubação com MTT, conforme descrito por (Mosmann, 1983). Neste método, o desenvolvimento de cristais de formazam ocorre com a metabolização do MTT, sendo possível a sua quantificação espectrofotometricamente. O peptídeo ATCUN-GsD demonstrou ganho de potência, quando comparado ao peptídeo selvagem, exibindo

valores de IC_{50} menores para todas as células testadas: 13,41 μ M, 20,32 μ M e 10,74 μ M, para as células HeLa, MCF-7 e HaCaT, respectivamente (**Figura 23B, 23D e 23F, linha vermelha**), o peptídeo antimicrobiano GsD-Wild Type demonstrou valores de IC_{50} de 28,52 μ M, 51,52 μ M e 21,69 μ M, para as linhagens de HeLa, MCF-7 e HaCaT, respectivamente (**Figura 23B, 23D e 23F, linha preta**). O peptídeo antimicrobiano ATCUN-Pp2a teve um leve ganho de potência apenas sobre a linhagem de câncer mamário MCF-7 com valor de IC_{50} de 19,06 μ M, quando comparado ao peptídeo selvagem Pp2a-Wild Type com valor de IC_{50} de 36,59 μ M (**Figura 23C**). Para as linhagens celulares HeLa e HaCaT, pode se observar que o análogo ATCUN- Pp2a demonstrou uma menor atividade, com valores de IC_{50} de 37,27 μ M e 17,54 μ M, respectivamente para estas linhagens, já o peptídeo Pp2a-Wild Type demonstrou uma maior atividade, com valores de IC_{50} de 28,94 μ M e 15,75 μ M (**Figura 23A e 23E**).

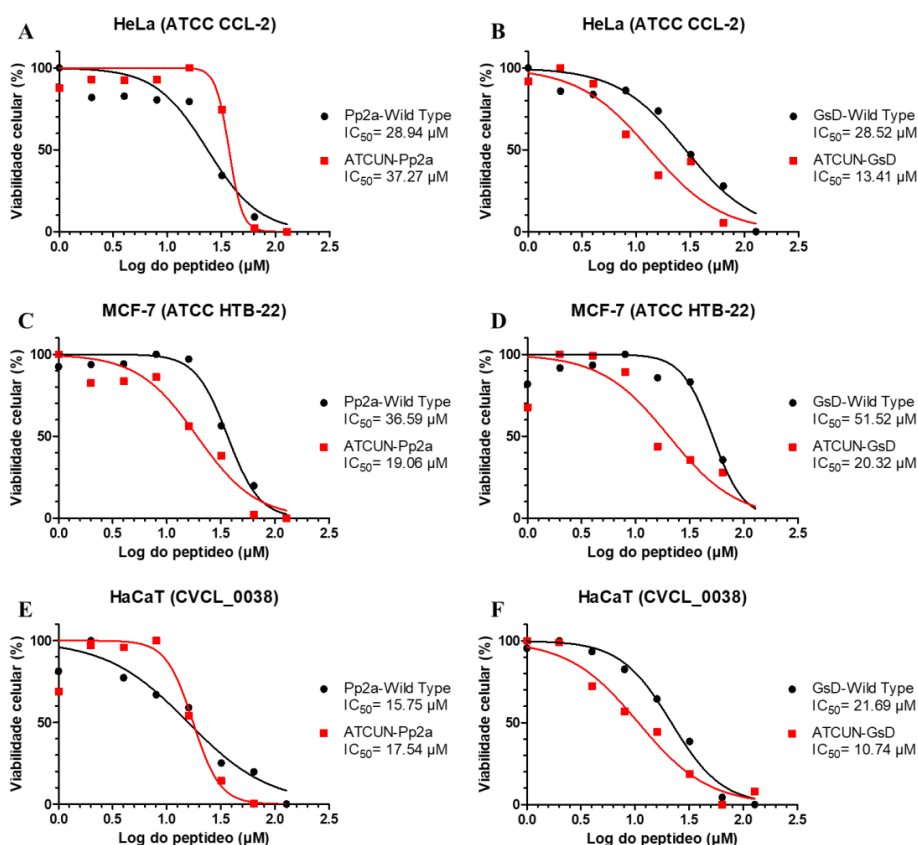


Figura 23. Determinação do efeito antiproliferativo dos peptídeos selvagens e análogos sobre as linhagens tumorais HeLa e MCF-7 e sobre uma linhagem epitelial não-tumoral, HaCaT. Os gráficos (A), (C) e (E), correspondem aos efeitos dos peptídeos Pp2a-Wild type (linha preta) e ATCUN-Pp2a (linha vermelha). Já os gráficos (B), (D) e (F), correspondem aos peptídeos GsD-Wild Type (linha preta) e ATCUN-GsD (linha vermelha).

5.8. Determinação da ação ativadora de neutrófilos via produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para avaliar se os peptídeos estudados induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em neutrófilos, foi empregada citometria de fluxo com um total de 10.000 eventos com *flow rate* médio. O ensaio foi realizado após o tratamento dos neutrófilos com os peptídeos por 1 hora, onde os peptídeos análogos foram testados na concentração de 4 μM e os peptídeos selvagens foram testados nas concentrações de 8 μM , utilizando-se como referência o valor do CIM de *S. aureus* resistente à metilicina. Pode-se observar que os peptídeos selvagens e seus análogos não induziram a produção de EROs (**Figura 24A, B e C**) neste teste em específico, apesar de que se observou, uma diferença significativa entre o peptídeo ATCUN-GsD e o controle negativo (**Figura 24D**). Também deve-se ressaltar que os peptídeos modificados com ATCUN não tiveram uma pré-incubação com CuSO_4 , o que está relacionado com a formação de EROs em membranas bacterianas.

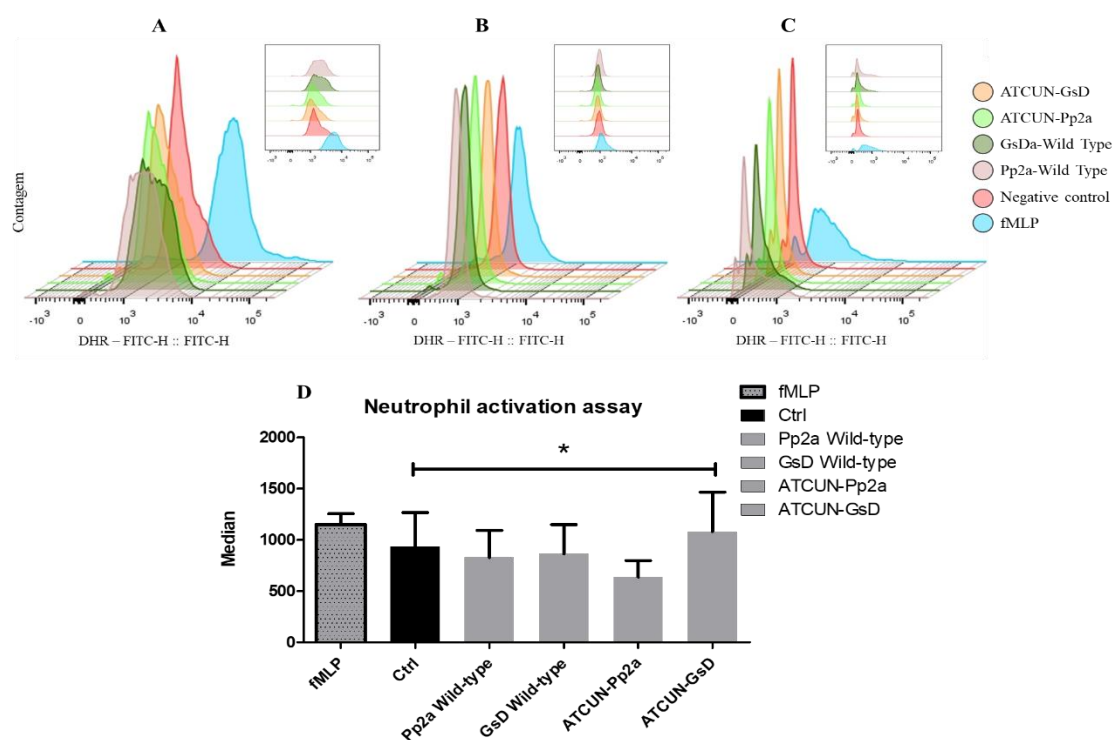


Figura 24. Histograma de densidade das populações de neutrófilos e avaliação de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). (A), (B) e (C) representam testes independentes (replicatas) para produção de EROs. O fMLP representado pela cor ciano corresponde ao controle positivo. Em (D) evidencia-se que o peptídeo análogo ATCUN-GsD apresenta uma diferença significativa em relação ao controle negativo.

5.9. Determinação da atividade migratória de neutrófilos via RTCA

Para os ensaios de quimiotaxia de neutrófilos foi empregado o sistema de RTCA (*Real Time Cell Analyzer*), com placa de invasão celular e migração, como descrito por (Cano *et al.*, 2016). O ensaio é baseado na aplicação de uma corrente elétrica baixa entre dois eletrodos e quando ocorre a migração das células da parte superior para a parte inferior, devido a atração do quimioatraente, as células se acumulam na película de ouro ocasionando o isolamento da corrente elétrica, podendo assim se determinar a impedância global induzidas pelo depósito de células em tempo real como o índice celular (IC) (Cano *et al.*, 2016; Xi *et al.*, 2008).

Os ensaios foram realizados em duas condições diferentes para cada amostra, sempre na concentração de 16 μM . A primeira condição apresentava o peptídeo antimicrobiano na câmara inferior e apenas neutrófilos na câmara superior, para avaliar a ação quimiotática dos peptídeos estudados. Já a segunda condição apresentava fMLP na câmara inferior e neutrófilos com peptídeos na câmara superior, para avaliação da eficácia de inibição ou dupla ativação por parte das amostras sobre os neutrófilos. O peptídeo antimicrobiano Pp2a-Wild Type demonstrou ser menos quimiotático quando na condição de isolado na câmara inferior, isto quando comparado ao fMLP, no entanto, na condição peptídeo célula demonstrou maior quimiotaxia o fMLP, evidenciando-se uma diferença significativa após 1 hora e 50 minutos de incubação (**Figura 25A**). O peptídeo análogo ATCUN-Pp2a demonstrou uma perda na atividade quimiotática para ambas as condições testadas, tendo como diferença significativa apenas para a segunda condição quando comparada ao controle (**Figura 25B**).

O peptídeo GsD-Wild Type isolado demonstrou uma ação quimiotática similar ao fMLP, este peptídeo também apresentou uma diferença significativa quando comparada a segunda condição ao controle, porém também foi possível observar que ele demonstrou uma diferença significativa quando comparadas ambas as condições entre os 20 a 60 minutos (**Figura 25C**). O peptídeo análogo ATCUN-GsD demonstrou uma atividade quimiotática maior do que o fMLP, sendo possível observar duas regiões com maior diferença significativa, onde a primeira demonstrou uma diferença entre ambas as condições testadas durante todas as fases de teste, já a segunda demonstrou uma diferença entre a segunda condição e o controle (**Figura 25C**).

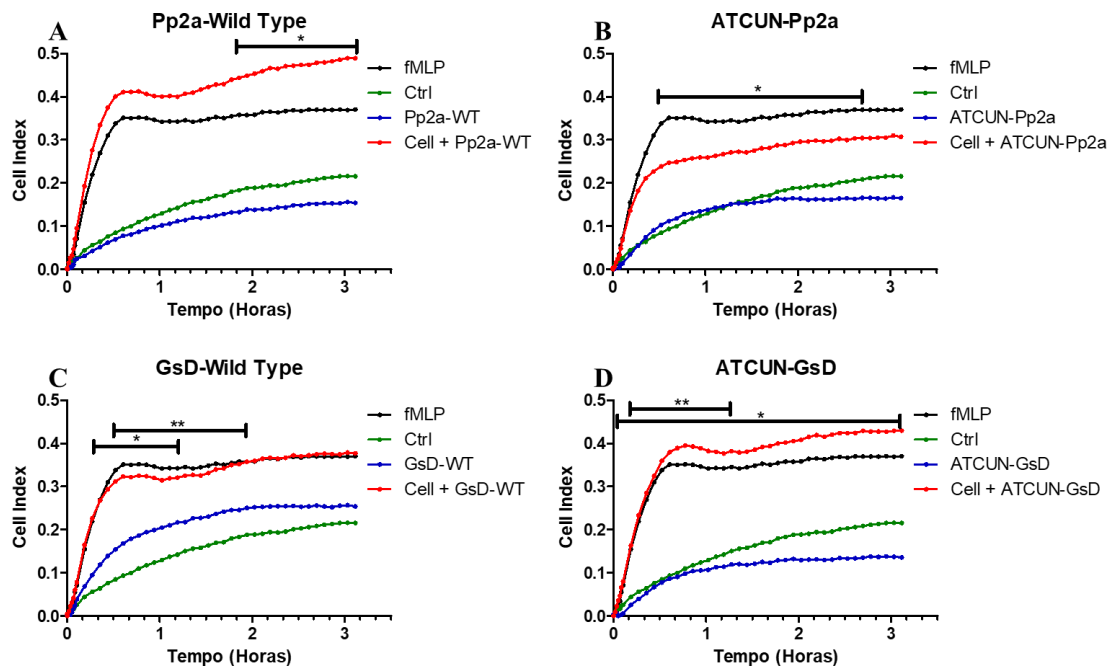


Figura 25. A análise de quimiotaxia em tempo real demonstrou que a condição peptídeo+neutrófilo apresenta efeito quimiotático, podendo atuar como um co-ativador de fMLP, figuras (A), (C) e (D). As figuras (A) e (D) demonstram uma diferença significativa do fMLP isolado, atuando com maior intensidade, diferentemente da figura (B) que apresentou atividade quimiotático superior apenas ao peptídeo isolado e inferior ao controle fMLP.

6. DISCUSSÃO GERAL

Os peptídeos modelos para a elaboração dos análogos propostos neste trabalho, foram dois peptídeos pertencentes ao grupo das Grammistinas, conhecidos como Pp2a isolado da secreção do peixe-sabão (*Pogonoperca punctata*) e GsD oriundo da secreção do peixe-sabão dourado (*Grammistes sexlineatus*). Essas moléculas apresentam massas moleculares de 1447,99 Da e 1544,95 Da, respectivamente, sendo que ambos apresentam 13 resíduos de aminoácidos. Os dois análogos foram idealizados levando-se em consideração as características principais dos selvagens como extensão da cadeia peptídica, ausência de face hidrofóbica e carga líquida baixa, sendo que os análogos ganharam um acréscimo de três resíduos (Val, Ile e His) relacionados com ação quelante de cobre tipo II.

Uma das principais características físicas relacionadas com as atividades antimicrobianas dos PAMs é a capacidade dessas moléculas adotarem conformação em α -hélice (Huang *et al.*, 2015). Os quatro peptídeos sintéticos mantiveram a mesma conformação em α -hélice, sem alterações das principais características selecionadas na descrição dos selvagens, outros peptídeos antimicrobianos propostos com o acréscimo do motivo ATCUN, como RTH-Anoplin e LKH-Anoplin, exibiram propriedades estruturais semelhantes aos peptídeos selvagens (Libardo *et al.*, 2015a). Estruturalmente, o agrupamento ATCUN não promove grandes diferenças, independente da sequência proposta, como demonstrado por (Libardo *et al.*, 2014), onde foi observado que a sequência final na região N-terminal DAH, GGH e VIH não desestabiliza a conformação em α -hélice.

O peptídeo análogo ATCUN-Pp2a demonstrou ganho de atividade quando comparado à versão selvagem, no entanto, apenas sobre linhagens bacterianas específicas como em *E. coli* (ATCC 25922), onde os valores de CIM foram $>128 \mu\text{M}$ para $32 \mu\text{M}$; em *K. pneumoniae* (ATCC 13883) com variação de >128 para $16 \mu\text{M}$; sobre *P. aeuriginosa* (PA-MDR) de $>128 \mu\text{M}$ para $64 \mu\text{M}$ e, principalmente, em *S. epidermidis* (ATCC 12228) onde foi observado um salto de $>128 \mu\text{M}$ para $4 \mu\text{M}$. Já o peptídeo ATCUN-GsD demonstrou ganho de potência apenas sobre a bactéria *S. epidermidis* (ATCC 12228) onde os valores de CIM foram de $32 \mu\text{M}$ para $4 \mu\text{M}$. Esse mesmo efeito foi documentado por (Libardo *et al.*, 2015a) com os análogos da Anoplin. Foi observado que a versão RTH-Anoplin, na presença de cobre, apresentava uma diminuição significativa do CIM em *B. subtilis* e *E. coli*, demonstrando uma variação de $16 \mu\text{M}$ e $32 \mu\text{M}$

para 4 μM e 8 μM , respectivamente.

Em outro trabalho (Libardo *et al.*, 2014) também demonstraram redução no valor do CIM sobre as mesma bactérias, no entanto, utilizando os peptídeos PAP e *sh*-buforina com mais de um tipo de N-terminal ATCUN. A versão GGH-PAP mostrou diminuição significativa para *B. subtilis* e *E. coli* com CIM de 0,06 μM , sendo que a versão “normal” apresentou 0,5 μM e 1 μM , respectivamente. O mesmo foi observado para a versão VIH-*sh*-buforina com a diminuição de 8 μM e 32 μM para 1 e 4 μM das mesmas bactérias. Também foi observado que, em alguns casos, a adição do motivo ATCUN resultou em perda de atividade sobre determinadas bactérias bacterianas Gram-negativas como *E. coli* (ATCC 25922) e *K. pneumoniae* (ATCC 13883). O peptídeo antimicrobiano GsD-Wild Type que demonstrou CIM igual a 16 μM , enquanto seu análogo exibiu valores de CIM acima de 128 μM .

O mesmo foi observado para o peptídeo ATCUN-Pp2a, onde este na presença de Cu^{+2} apresentou um valor de CIM de 16 μM , enquanto o selvagem demonstrou CIM igual a 8 μM . Esse efeito foi observado por (Agbale *et al.*, 2019), onde o peptídeo cetropina 1.1 com a modificação ATCUN reduziu a atividade antimicrobiana em 3 vezes para bactérias Gram-positivas e negativas, independente da presença de Cu^{+2} ou sequências escolhidas de ATCUN. (Alexander *et al.*, 2017) também documentaram uma perda de atividade para os peptídeos Ovispirin-3 com modificações ATCUN, mas sem as sequências C-terminal final original de seus peptídeos. Apesar dos peptídeos manterem a produção de EROs houve uma diminuição dos níveis de conformação em α -hélice resultando em perda de atividade antimicrobiana.

Nos ensaios antifúngicos foi observado que mesmo as maiores doses testadas não surtiram efeito inibitório sobre *Candida albicans* (ATCC 14053). Tal falta de atividade pode estar relacionada com estresse ambiental ou estresse proporcionado pela presença das amostras, que ocasiona a inibição de síntese de β -1,3-glucano que causa maior produção de quitina, reduzindo a efetividade dos PAMs (Hsu *et al.*, 2021).

As modificações morfológicas observadas na bactéria *S. aureus* demonstram que as alterações nas sequências dos PAMs são fatores importantes para seu mecanismo de ação. Durante os tratamentos com e sem Cu^{+2} foram observadas alterações leves e bruscas sobre a membrana. As bactérias que foram incubadas com PBS 10 mM apresentaram morfologia lisa e intactas, diferentemente do peptídeos análogos sem Cu^{+2} ATCUN-Pp2a e ATCUN-GsD, que demonstraram leve produção de *debris* provenientes da ação sobre

a membrana. O mesmo efeito foi observado por (Ma *et al.*, 2020), onde o peptídeo OVTP12 demonstrou pouca formação de *debris* celulares em *S. aureus*, mas formação de poros em *E. coli*, com tratamento de 1 hora na faixa de concentração do CIM. Ao se estudar o peptídeo melittin (Zhong *et al.*, 2020) observaram efeitos diferentes sobre as bactérias *E. coli* (ATCC 25922) onde houve formação de poros, e em *S. aureus* (ATCC 25923) onde a formação de *debris* celulares foi predominante, seguida de diminuição estrutural. Em um caso específico, foi observada uma junção da membrana de *S. aureus*, como o produzido por Pp2a-Wild Type, o mesmo foi observado por (Naskar *et al.*, 2020), em um preparo de nano-antibiótico denominado AZE3.

Os peptídeos análogos ATCUN-Pp2a e ATCUN-GsD, incubados com 25 μ M de CuSO_4 por 30 minutos à 37 °C, demonstraram as mesmas características para o modo de atuação sobre a membrana de *S. aureus*. Uma das hipóteses levantadas é de que a ação quelante de Cu^{2+} dos análogos é perdida conforme é feita a diluição com a solução de bactérias, diminuindo a disponibilidade de cobre. No entanto, quando suplementamos a solução Mueller-Hinton e PBS com 25 μ M de CuSO_4 para manter a disponibilidade de cobre ao longo do experimento, bem como na condição de pré-incubação dos análogos como já citado acima, observamos uma alteração drástica sobre a membrana de *S. aureus*, com alta formações de *debris*, diminuição do tamanho celular e destruição completa das bactérias. Essas alterações foram observadas por (Farkas *et al.*, 2017) em *S. enterica* tratada com o peptídeo NCR247 durante 5 minutos da mesma maneira que com *Salmonella*, porém com 2 horas de tratamento. (Zhu *et al.*, 2015) observaram as mesmas características em tratamentos de 1 hora realizados com valores de CIMs correspondentes, onde os peptídeos PRW4, PRW4-d e PRW4-R demonstraram alta formação de *debris* e destruição da membrana de *S. aureus* (ATCC 25923).

Vários estudos já foram publicados demonstrando a relação da carga líquida elevada dos PAMs com a ação citolítica em eritrócitos de mamíferos (Zhong *et al.*, 2024), como, por exemplo, o estudo publicado por (Ifrah *et al.*, 2005) demonstrando que o aumento da carga positiva de anoplina resulta não só em um aumento de atividade antimicrobiana como simultaneamente aumenta a ação hemolítica. No trabalho de (Libardo *et al.*, 2015b) também foi possível observar que a presença do motivo N-terminal ATCUN proporciona um aumento de ação hemolítica em comparação ao selvagem. Tal efeito observado neste trabalho, onde o peptídeo ATCUN-Pp2a demonstrou mais de 50% de hemólise na concentração 16 μ M, diferentemente do peptídeo selvagem que demonstrou mais de 50% de hemólise apenas na concentração de 32 μ M. Já para os

peptídeos ATCUNGsD e GsD-Wild Type as diferenças na capacidade hemolítica também foram perceptíveis já que para na concentração de 64 μM , o análogo demonstrou quase 90% de hemólise e o selvagem 45%. Em contrapartida, (Shin *et al.*, 2023) demonstraram que a ação hemolítica de KFH-Pa1a, um análogo da lycotoxin, apresentou atividade hemolítica inferior a 5% em todas as concentrações testadas sobre eritrócitos bovino.

Já no trabalho de (Agbale *et al.*, 2019) foram as versões selvagens que demonstraram ser mais hemolíticas do que seus análogos, onde CM15 apresentou 40% de hemólise e a amostra citropinal.1 demonstrou 16,5%, sendo que os análogos GGH-CM15 e VIH-CM15 demonstram menos de 30% de hemólise e o peptídeos GGH-citropinal.1 e VIH-citropinal.1 demonstraram 0,2% de hemólise. Curiosamente, o peptídeo antimicrobiano GsD, que no trabalho de (Sugiyama *et al.*, 2005) está descrito como Pp1, demonstrou ser mais hemolítico do que relatado neste trabalho, onde ele observou que o selvagem GsD demonstra 79 HU/mg, onde cada unidade corresponde a 50% de indução de hemólise, como descrito no trabalho. (Shiomi *et al.*, 2001) realizaram o mesmo ensaio envolvendo outras Grammistinas, dentre as quais o peptídeo Pp2a, no entanto, eles apenas descreveram que houve atividade hemolítica, sem exibirem os dados quantitativos.

Duas características que tornam os PAMs promissoras na eliminação de células tumorais é sua carga líquida positiva e anfipaticidade estrutural. Durante o processo de transformação, várias moléculas aniônicas são superexpressas em células tumorais como sulfatos de heparina, mucinas e proteínas O-glicosiladas, levando a um aumento geral da carga negativa da superfície dessas células, propiciando uma maior interação eletrostática com PAMs (Baxter *et al.*, 2017).

Peptídeos antimicrobianos de peixes geralmente apresentam grande atividade citotóxica sobre células tumorais e não-tumorais, pois suas cargas líquidas são bem elevadas em comparação a outros PAMs. Os peptídeos avaliados no presente estudo não possuem carga líquida elevada e demonstraram alto potencial para as células tumorais estudadas, tais como HeLa (ATCC CCL-2) e MCF-7 (ATCC HTB-22), onde os valores de IC_{50} variaram entre 13 μM e 51 μM .

Pesquisadores como (Comert *et al.*, 2021) mostraram que os peptídeos selvagens de peixes piscidin P1 e P3, que naturalmente são quelantes de Cu^{2+} , apresentaram efeitos citotóxicos sobre linhagens tumorais HT1080 (ATCC CCL-121) fibrossarcoma humano, A549 (ATCC CCL-185) câncer de pulmão humano e MDA-MB-231 (ATCC HTB-26)

adenocarcinoma mamário, porém apenas em doses elevadas.

Pardaxin, é um peptídeo oriundo do peixe marinho *Pardachirus marmoratus*, que demonstrou inibição da HT1080 tratadas e indução de morte em células HeLa (Huang *et al.*, 2011). A ação antitumoral do peptídeo epinecidin-1 também foi avaliada, tendo sido observada inibição significativa com dose de 2 µg/mL para as células A549 e HT 1080. Sobre outras linhagens celulares (como HepG2, células de carcinoma hepatocelular humano; U9307, linfoma humano; NIH3T3, células de fibroblasto de camundongo e RAW264.7, macrófagos de camundongo de um tumor induzido pelo vírus da leucemia) também houve atividade inibitória, porém apenas em dose altas (Lin *et al.*, 2009).

Os PAMs são caracterizados como moléculas multifacetárias que demonstram mais do que ação antimicrobiana, algumas de suas funções mais estudadas estão relacionadas com a ação inflamatória, reparo de feridas e regulação imunológicas (Williams *et al.*, 2012a), uma das classes de peptídeos mais estudados e as defensins- α e β de humanos, que exibem propriedades quimiotáticas para monócitos, células T, células dendríticas e mastócitos (Dürr & Peschel, 2002; Lehrer & Ganz, 2002). As amostras de grammistinas selvagens e análogas com exceção da amostra ATCUN-Pp2a, demonstraram maior ação quimiotático quando incubadas com neutrófilos na concentração de 16 µM, já a amostra GsD-Wild Type foi o único peptídeo a 16 µM que demonstrou uma leve quimiotaxia, porém não sendo comparável ao fMLP.

(Kim *et al.*, 2018) observaram que os peptídeos selvagens piscidin P1 e P3 possui ação quimiotática com neutrófilos de camundongos, para corroborar esses dados o grupo realizou um estudo com citometria de fluxo para verificar a expressão de Fpr1 e Fpr2 na superfície de neutrófilos, onde foi possível observar que os peptídeos regulam negativamente a expressão de Fpr2, que induz a quimiotaxia. Naturalmente, as piscidin possuem o motivo de ligação ATCUN, o que fez (Kim *et al.*, 2018) observar que quando ocorre a interação com Cu^{2+} há uma menor ação quimiotática, porém sem saber a causa deste fato. Outro estudo realizado por (Park *et al.*, 2016) demonstrou que os peptídeos scolopendrasin III e V, isolados da peçonha de *Scolopendra subspinipes mutilans* estimula a migração de neutrófilos através de Fpr1 *in vitro* ou *in vivo*, ambos peptídeos demonstram ser agonistas seletivos de Fpr1, outro estudo citado por (Park *et al.*, 2016) demonstra que derivados peptídeos se ligam ao Fpr1 de leucócito resultando na sua ativação, o que pode ser o caso de scolopendrasin III e V.

No estudo de (Williams *et al.*, 2012b) foi possível observar que o peptídeo

sintético conhecido por KSLW que originalmente foi identificado a partir de combinações de repositórios e bibliotecas, demonstra ação quimiotática com neutrófilos humanos, sendo todo o processo realizado por RTCA semelhante ao deste trabalho, o decapeptídeo KSLW demonstrou uma resposta de 90% na concentração de 10 μ M, onde os neutrófilos migraram da câmara superior para a inferior.

A citometria de fluxo foi utilizada para determinar se os peptídeos selvagens e seus análogos estimulavam a produção de EROs após a incubação. Para as amostras apresentadas neste estudos apenas a peptídeo ATCUN-GsD apresentou diferença significativa ao controle negativo, no entanto, para esse ensaio em específico não foi possível observar a produção de EROs, além do fato que os peptídeos não foram pré-incubados com CuSO_4 , que está relacionada com a produção de EROs em membranas biológicas. O estudo realizado (Dong *et al.*, 2021) demonstrou que as células RAW264.7 tratadas com LPS mais 10 $\mu\text{g/mL}$ do peptídeo CC34 apresentam uma menor produção de EROs do que apenas as tratados com LPS (Lipopolissacarídeo) uma endotoxina presente na membrana de bactérias gram-negativas. Por outro lado, (Alalwani *et al.*, 2010) observou que a cathelicidin LL-37, um peptídeo ativo na corrente sanguínea de humanos, não só aumenta a produção de EROs, mas também a captação de neutrófilos. (Cho & Lee, 2011) realizaram um estudo para determinar a produção de EROs sobre a levedura *Candida albicans*, eles observaram que após a incubação com arenicin-1 um peptídeo derivado dos celomócitos do verme marinho *Arenicola marina*, as leveduras apresentaram um aumento da produção de EROs intracelular em 29,99% em comparação aos não tratados. O mesmo foi observado por (Hwang *et al.*, 2011) com o peptídeo Papiliocin isolado da borboleta *Papilio xuthus*, eles observaram que *C. albicans* teve um aumento significativo de EROs intracelular após a incubação com a Papiliocin, onde também foi possível observar que a maioria foi convertida em radicais hidroxila oxidantes fortes, que é um fator crucial no envelhecimento e apoptótica de leveduras. Para os peptídeos da secreção de peixe, a pardaxin se destaca devido ao grande tipo de atividade a qual ela demonstra, (Huang *et al.*, 2011) demonstrou que as células HT-1080 tratadas com 15 $\mu\text{g/mL}$ de pardaxin durante 4 horas demonstram um aumento significativo da produção de EROs em comparação aos não tratados, assim eles inferiram que a produção de EROs está relacionada com a ação apoptótica sobre HT-1080, devido à ativação da via mitocondrial intrínseca dependente de EROs.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo, foram caracterizadas as propriedades biológicas de quatro peptídeos sintéticos, sendo dois peptídeos selvagens pertencentes ao grupo das Grammistinas, denominados Pp2a (*Pogonoperca punctata*) e GsD (*Grammistes sexlineatus*), e dois análogos com acréscimo de motivos de ligação amino terminal Cu (II) e Ni (II), sendo denominados ATCUN-Pp2a e ATCUN-GsD.

Em relação ao presente trabalho, podemos concluir que:

✓ Os análogos praticamente mantiveram suas características biofísicas semelhantes aos peptídeos selvagens, principalmente carga líquida, ausência de face hidrofóbica e grau de hidropaticidade (GRAVY);

✓ Os peptídeos selvagens e seus análogos apresentaram tendência a adotar conformação α -hélices não anfipáticas *in silico*;

✓ Em estudos *in vitro*, os peptídeos analisados apresentaram estruturas desordenadas em solução aquosa (Milli-Q), vindo a adotar conformação em α -hélice na presença de membrano-miméticos SDS e do solvente TFE 50%;

✓ Os peptídeos antimicrobianos selvagens e seus análogos tiveram maior seletividade por bactérias Gram-positivas;

✓ Alguns análogos apresentaram ganho de potência na presença de Cu^{+2} para bactérias específicas;

✓ O peptídeo GsD-Wild Type demonstrou maior ação antimicrobiana para as bactérias Gram-negativas *E. coli* e *K. pneumoniae* com valor de CIM de 16 μM ;

✓ Seus análogos (na presença ou não de Cu^{+2}) não tiveram atividade significativa;

✓ O peptídeo GsD-Wild Type demonstrou maior atividade antimicrobiana para *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos com valor de CIM de 4 μM , sendo que seus análogos exibiram leve perda de atividade;

✓ Os peptídeos GsD-Wild Type e ATCUN-GsD demonstraram ação antimicrobiana com doses mais baixas variando entre 4 μM e 8 μM para as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. aureus* resistente à meticilina;

✓ O peptídeo ATCUN-GsD demonstrou ganho significativo de potência quando na presença Cu^{+2} , para a bactéria *S. epidermidis*;

✓ O peptídeo ATCUN-Pp2a, diferentemente dos demais, apresentou ganho de potência considerável para as bactérias Gram-negativas como *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* resistente a múltiplas drogas, como valores de CIM variando entre 16 μM

e 64 μM , sendo que a versão selvagem apresentou valor de CIM acima de 128 μM ;

✓ O peptídeo Pp2a-Wild Type e seu análogo ATCUN-Pp2a (na presença ou não de Cu^{+2}) apresentaram valores de CIM variando entre de 8 a 16 μM para a bactéria *S. aureus*;

✓ Os peptídeos estudados não demonstraram a atividade sobre a levedura *C. albicans*;

✓ Todos os peptídeos estudados demonstram ação deletéria sobre a membrana da bactéria Gram-positiva *S. aureus* produzindo rugosidades ou encolhimento em casos “leves”, e formação de *debris* e danos estruturais graves na membrana, levando à morte das células;

✓ A disponibilidade de Cu^{+2} parece ter efeito positivo sobre a atividade antimicrobiana dos peptídeos;

✓ A maior parte dos peptídeos estudados não exibiu alta atividade hemolítica;

✓ O ensaio de viabilidade celular com MTT indicou atividade citotóxica dos peptídeos sobre linhagens tumorais com valores de IC_{50} variando entre 13,41 μM a 51, 52 μM ;

✓ Os peptídeos também demonstraram efeitos deletérios sobre a linhagem não-tumoral de queratinócito HaCaT, com valores de IC_{50} variando 10,74 μM a 21,69 μM ;

✓ Para os ensaios de ativação de neutrófilos, foi observado que os peptídeos selvagens não demonstraram capacidade de ativação de neutrófilos na dose de 8 μM (valor do CIM para *S. aureus* resistente à metilina);

✓ Diferente dos demais, o peptídeo ATCUN-GsD apresentou uma diferença significativa em relação ao controle negativo, na dose de 4 μM (valor do CIM para *S. aureus* resistente à metilina);

✓ De maneira geral, os peptídeos não estimularam ação migratória sobre os neutrófilos, porém GsD-Wild Type demonstrou uma “leve” atividade migratória quando comparada ao controle negativo;

✓ Os peptídeos GsD-Wild Type, Pp2a-Wild Type e ATCUN-GsD interferiram com a capacidade quimioatraente do fMLP.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas futuras deste trabalho, pode-se destacar:

1. Avaliar as doses bactericidas (CBM) sobre isolados clínicos de bactérias resistentes;
2. Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio sobre as membranas das bactérias com a utilização de estudos oximétricos e/ou ensaios colorimétricos;
3. Avaliar o potencial terapêutico dos peptídeos antimicrobianos estudados em comparação aos antibióticos disponíveis;
4. Avaliar os possíveis efeitos combinado dos peptídeos selvagens e análogos, utilizando-se dois ou mais antibióticos comerciais;
5. Realizar ensaios de inibição e/ou degradação de biofilme formados com as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*;
6. Determinar se os peptídeos antimicrobianos estudados apresentam ação cicatrizante sobre linhagens de queratinócitos não-tumorais;
7. Avaliar o potencial antiparasitário dos peptídeos estudados no presente trabalho sobre protozoários de interesse médico e veterinário, como *Leishmania* sp., *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*;
8. Avaliar o potencial antiviral dos peptídeos estudados no presente trabalho sobre arbovírus emergentes como os vírus da febre chikungunya, da febre amarela, da dengue e Zika vírus.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adrio, J., & Demain, A. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, *4*(1), 117–139. <https://doi.org/10.3390/biom4010117>.

Agbale, C. M., Sarfo, J. K., Galyuon, I. K., Juliano, S. A., Silva, G. G. O., Buccini, D. F., Cardoso, M. H., Torres, M. D. T., Angeles-Boza, A. M., de la Fuente-Nunez, C., & Franco, O. L. (2019). Antimicrobial and antibiofilm activities of helical antimicrobial peptide sequences incorporating metal-binding motifs. *Biochemistry*, *58*(36), 3802–3812. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00440>.

Aitken, A., & Learmonth, M. (1996). Protein determination by UV absorption. *The protein protocols handbook* (pp. 3–6).

Alalwani, S. M., Sierigk, J., Herr, C., Pinkenburg, O., Gallo, R., Vogelmeier, C., & Bals, R. (2010). The antimicrobial peptide LL-37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils. *European Journal of Immunology*, *40*(4), 1118–1126. <https://doi.org/10.1002/eji.200939275>.

Alexander, J. L., Yu, Z., & Cowan, J. A. (2017). Amino terminal copper and nickel binding motif derivatives of ovispirin-3 display increased antimicrobial activity via lipid oxidation. *Journal of Medicinal Chemistry*, *60*(24), 10047–10055. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01117>.

Almeida-Santos, A. C., Novais, C., Peixe, L., & Freitas, A. R. (2021). *Enterococcus spp.* as a producer and target of bacteriocins: a double-edged sword in the antimicrobial resistance crisis context. *Antibiotics*, *10*(10), 1215. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101215>.

Aradi, K., Di Giorgio, A., & Duca, M. (2020). Aminoglycoside conjugation for RNA targeting: antimicrobials and beyond. *Chemistry – A European Journal*, *26*(54), 12273–12309. <https://doi.org/10.1002/chem.202002258>.

Arsic, B., Barber, J., Čikoš, A., Mladenovic, M., Stankovic, N., & Novak, P. (2018). 16-membered macrolide antibiotics: a review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *51*(3), 283–298. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.05.020>.

Alonso, S., A., Top, J., Corander, J., Willems, R. J. L., & Schürch, A. C. (2021). Mode and dynamics of vanA-type vancomycin resistance dissemination in Dutch hospitals. *Genome Medicine*, *13*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00825-3>.

Avalos, E., Catanzaro, D., Catanzaro, A., Ganiats, T., Brodine, S., Alcaraz, J., & Rodwell, T. (2015). Frequency and geographic distribution of gyrA and gyrB mutations associated with fluoroquinolone resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review. *PLOS ONE*, *10*(3), e0120470.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120470>.

Bartoletti, M., Giannella, M., Tedeschi, S., & Viale, P. (2018). Multidrug-resistant bacterial infections in solid organ transplant candidates and recipients. *Infectious Disease Clinics of North America*, 32(3), 551–580. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.04.004>.

Batista, C. V. F., Scaloni, A., Rigden, D. J., Silva, L. R., Rodrigues Romero, A., Dukor, R., Sebben, A., Talamo, F., & Bloch, C. (2001). A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta*. *FEBS Letters*, 494(1–2), 85–89. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02324-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02324-9).

Baxter, A. A., Lay, F. T., Poon, I. K. H., Kvensakul, M., & Hulett, M. D. (2017). Tumor cell membrane-targeting cationic antimicrobial peptides: novel insights into mechanisms of action and therapeutic prospects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(20), 3809–3825. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2604-z>.

Bechinger, B., & Gorr, S.-U. (2017). Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance. *Journal of Dental Research*, 96(3), 254–260. <https://doi.org/10.1177/0022034516679973>.

Bechtler, C., & Lamers, C. (2021). Macrocyclization strategies for cyclic peptides and peptidomimetics. *RSC Medicinal Chemistry*, 12(8), 1325–1351. <https://doi.org/10.1039/D1MD00083G>.

Bednarska, N. G., Wren, B. W., & Willcocks, S. J. (2017). The importance of the glycosylation of antimicrobial peptides: natural and synthetic approaches. *Drug Discovery Today*, 22(6), 919–926. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.02.001>.

Bellavita, R., Braccia, S., Galdiero, S., & Falanga, A. (2023). Glycosylation and lipidation strategies: Approaches for improving antimicrobial peptide efficacy. *Pharmaceuticals*, 16(3), 439. <https://doi.org/10.3390/ph16030439>.

Benfield, A. H., & Henriques, S. T. (2020). Mode-of-action of antimicrobial peptides: membrane disruption vs. intracellular mechanisms. *Frontiers in Medical Technology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmedt.2020.610997>.

Bobone, S., & Stella, L. (2019). Selectivity of antimicrobial peptides: a complex interplay of multiple equilibria (pp. 175–214). https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_11.

Boolchandani, M., D'Souza, A. W., & Dantas, G. (2019). Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0108-4>.

Bouraguba, M., Glattard, E., Naudé, M., Pelletier, R., Aisenbrey, C., Bechinger, B., Raibaut, L., Lebrun, V., & Faller, P. (2020). Copper-binding motifs Xxx-His or Xxx-Zzz-His (ATCUN) linked to an antimicrobial peptide: Cu-binding, antimicrobial activity and

ROS production. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 213, 111255. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111255>.

Brar, R. K., Jyoti, U., Patil, R. K., & Patil, H. C. (2020). Fluoroquinolone antibiotics: An overview. *Adesh University Journal of Medical Sciences & Research*, 2, 26. https://doi.org/10.25259/AUJMSR_12_2020.

Brogden, K. A., Bates, A. M., & Fischer, C. L. (2016). Antimicrobial peptides in host defense: Functions beyond antimicrobial activity. *Antimicrobial Peptides: role in human health and disease* (pp. 129–146). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24199-9_9.

Buitimea, A. L., Garza-Cárdenas, C. R., Garza-Cervantes, J. A., Lerma-Escalera, J. A., & Morones-Ramírez, J. R. (2020). The demand for new antibiotics: antimicrobial peptides, nanoparticles, and combinatorial therapies as future strategies in antibacterial agent design. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01669>.

Bürck, J., Wadhvani, P., Fanghänel, S., & Ulrich, A. S. (2016). Oriented circular dichroism: a method to characterize membrane-active peptides in oriented lipid bilayers. *Accounts of Chemical Research*, 49(2), 184–192. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00346>.

Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8), a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>.

Carmo, B. A., Parente, A. M. S., Souza, E. S., Silva-Junior, A. A., Araújo, R. M., & Fernandes-Pedrosa, M. F. (2022). Antimicrobial peptide analogs from scorpions: Modifications and structure-activity. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.887763>.

Cano, P. M., Vargas, A., & Lavoie, J. P. (2016). A real-time assay for neutrophil chemotaxis. *Biotechniques*, 60(5), 245–251. <https://doi.org/10.2144/000114416>.

Canzani, D., & Aldeek, F. (2017). Penicillin G's function, metabolites, allergy, and resistance. *Journal of Nutrition and Human Health*, 01(01). <https://doi.org/10.35841/nutrition-human-health.1.1.28-40>.

Chen, C. H., & Lu, T. K. (2020). Development and challenges of antimicrobial peptides for therapeutic applications. *Antibiotics*, 9(1), 24. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010024>.

Chen, N., & Jiang, C. (2023). Antimicrobial peptides: Structure, mechanism, and modification. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 255, 115377. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115377>.

Chen, R.-C., & Lan, C.-Y. (2020). Human antimicrobial peptide hepcidin 25-induced apoptosis in *Candida albicans*. *Microorganisms*, 8(4), 585. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040585>.

Cho, J., & Lee, D. G. (2011). The antimicrobial peptide arenicin-1 promotes generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1810(12), 1246–1251. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.08.011>.

Ciumac, D., Gong, H., Hu, X., & Lu, J. R. (2019). Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *Journal of colloid and interface science*, 537, 163–185. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.103>.

Comert, F., Heinrich, F., Chowdhury, A., Schoeneck, M., Darling, C., Anderson, K. W., Libardo, M. D. J., Angeles-Boza, A. M., Silin, V., Cotten, M. L., & Mihailescu, M. (2021). Copper-binding anticancer peptides from the piscidin family: an expanded mechanism that encompasses physical and chemical bilayer disruption. *Scientific Reports*, 11(1), 12620. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91670-w>.

Corrêa, D. H. A., & Ramos, C. H. I. (2009). The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African Journal of Biochemistry Research*, 3(5), 164–173. ISSN 1996-0778.

Crofts, T. S., Gasparini, A. J., & Dantas, G. (2017). Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 422–434. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.28>.

Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., & Blair, J. M. A. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*, 21(5), 280–295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>.

Dash, R., & Bhattacharjya, S. (2021). Thanatin: an emerging host defense antimicrobial peptide with multiple modes of action. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1522. <https://doi.org/10.3390/ijms22041522>.

Davenport, A., Shallcross, T. M., Crabtree, J. E., Davison, A. M., Will, E. J., & Heatley, R. V. (1991). Prevalence of *Helicobacter pylori* in patients with end-stage renal failure and renal transplant recipients. *Nephron*, 59(4), 597–601. <https://doi.org/10.1159/000186650>.

D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>.

De Pascale, G., & Wright, G. D. (2010). Antibiotic resistance by enzyme inactivation: from mechanisms to solutions. *ChemBioChem*, 11(10), 1325–1334.

<https://doi.org/10.1002/cbic.201000067>.

Dennison, S. R., Harris, F., Mura, M., & Phoenix, D. A. (2018). An atlas of anionic antimicrobial peptides from amphibians. *Current Protein & Peptide Science*, *19*(8), 823–838. <https://doi.org/10.2174/1389203719666180226155035>.

Dong, L., Yang, H., Wang, Z., Jiang, N., & Zhang, A. (2021). Antimicrobial peptide CC34 attenuates intestinal inflammation via downregulation of the NF- κ B signaling pathway. *3 Biotech*, *11*(9), 397. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02948-9>.

Dürr, M., & Peschel, A. (2002). Chemokines meet defensins: the merging concepts of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. *Infection and Immunity*, *70*(12), 6515–6517. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6515-6517.2002>.

Dwivedi, R., Aggarwal, P., Bhavesh, N. S., & Kaur, K. J. (2019). Design of therapeutically improved analogue of the antimicrobial peptide, indolicidin, using a glycosylation strategy. *Amino Acids*, *51*(10–12), 1443–1460. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02779-2>.

Farkas, A., Maróti, G., Kereszt, A., & Kondorosi, É. (2017). Comparative analysis of the bacterial membrane disruption effect of two natural plant antimicrobial peptides. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00051>.

Fernández, L., & Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *25*(4), 661–681. <https://doi.org/10.1128/CMR.00043-12>.

Feßler, A. T., Wang, Y., Wu, C., & Schwarz, S. (2018). Mobile macrolide resistance genes in staphylococci. *Plasmid*, *99*, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.05.001>.

Fief, C. A., Hoang, K. G., Phipps, S. D., Wallace, J. L., & Deweese, J. E. (2019). Examining the impact of antimicrobial fluoroquinolones on human DNA topoisomerase II α and II β . *ACS Omega*, *4*(2), 4049–4055. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03428>.

Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E. W., & Schneider, G. (2012). Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*, *11*(1), 37–51. <https://doi.org/10.1038/nrd3591>.

Gautam, A., Chaudhary, K., Singh, S., Joshi, A., Anand, P., Tuknait, A., Mathur, D., Varshney, G. C., & Raghava, G. P. S. (2014). Hemolytik: a database of experimentally determined hemolytic and non-hemolytic peptides. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D444–D449. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1008>.

Gaynes, R. (2017). The discovery of penicillin-new Insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging Infectious Diseases*, *23*(5), 849–853. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161556>.

- Guryanova, S. V., & Ovchinnikova, T. V. (2022). Immunomodulatory and allergenic properties of antimicrobial peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2499. <https://doi.org/10.3390/ijms23052499>.
- Häffner, S., M., & Malmsten, M. (2018). Influence of self-assembly on the performance of antimicrobial peptides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 38, 56–79. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2018.09.002>.
- Han, Y., Zhang, M., Lai, R., & Zhang, Z. (2021). Chemical modifications to increase the therapeutic potential of antimicrobial peptides. *Peptides*, 146, 170666. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170666>.
- Hancock, R. E. W., Alford, M. A., & Haney, E. F. (2021). Antibiofilm activity of host defence peptides: complexity provides opportunities. *Nature Reviews Microbiology*, 19(12), 786–797. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00585-w>.
- Haney, E. F., Mansour, S. C., & Hancock, R. E. (2017). Antimicrobial peptides: an introduction. *Antimicrobial peptides: methods and protocols*, 3(22). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6737-7_1.
- Harmouche, N., Aisenbrey, C., Porcelli, F., Xia, Y., Nelson, S. E. D., Chen, X., Raya, J., Vermeer, L., Aparicio, C., Veglia, G., Gorr, S.-U., & Bechinger, B. (2017). Solution and solid-state nuclear magnetic resonance structural investigations of the antimicrobial designer peptide GL13K in membranes. *Biochemistry*, 56(32), 4269–4278. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00526>.
- Hazam, P. K., Goyal, R., & Ramakrishnan, V. (2019). Peptide based antimicrobials: Design strategies and therapeutic potential. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 142, 10(22). <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.08.006>.
- He, T., Qu, R., & Zhang, J. (2022). Current synthetic chemistry towards cyclic antimicrobial peptides. *Journal of Peptide Science*, 28(6). <https://doi.org/10.1002/psc.3387>.
- Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354(1), 12–31. <https://doi.org/10.1111/nyas.12830>.
- Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2016). Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(9), a025320. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025320>.
- Hsu, C.-M., Liao, Y.-L., Chang, C.-K., & Lan, C.-Y. (2021). Candida albicans Sfp1 is involved in the cell wall and endoplasmic reticulum stress responses induced by human antimicrobial peptide LL-37. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10633. <https://doi.org/10.3390/ijms221910633>.

- Hu, Q., Peng, H., & Rao, X. (2016). Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01601>.
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>.
- Huang, T.-C., Lee, J.-F., & Chen, J.-Y. (2011). Pardaxin, an antimicrobial peptide, triggers caspase-dependent and ROS-mediated apoptosis in HT-1080 cells. *Marine Drugs*, 9(10), 1995–2009. <https://doi.org/10.3390/md9101995>.
- Huang, Y., Feng, Q., Yan, Q., Hao, X., & Chen, Y. (2015). Alpha-helical cationic anticancer peptides: a promising candidate for novel anticancer drugs. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 15(1), 73–81. <https://doi.org/10.2174/1389557514666141107120954>.
- Hwang, B., Hwang, J.-S., Lee, J., Kim, J.-K., Kim, S. R., Kim, Y., & Lee, D. G. (2011). Induction of yeast apoptosis by an antimicrobial peptide, Papiliocin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 408(1), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.125>.
- Ifrah, D., Doisy, X., Ryge, T. S., & Hansen, P. R. (2005). Structure-activity relationship study of anoplin. *Journal of Peptide Science*, 11(2), 113–121. <https://doi.org/10.1002/psc.598>.
- Janas, A., & Przybylski, P. (2019). 14- and 15-Membered lactone macrolides and their analogues and hybrids: Structure, molecular mechanism of action and biological activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 182, 111662. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111662>.
- Jednačak, T., Mikulandra, I., & Novak, P. (2020). Advanced methods for studying structure and interactions of macrolide antibiotics. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7799. <https://doi.org/10.3390/ijms21207799>.
- Jelić, D., & Antolović, R. (2016). From erythromycin to azithromycin and new potential ribosome-binding antimicrobials. *Antibiotics*, 5(3), 29. <https://doi.org/10.3390/antibiotics5030029>.
- Jia, F., Wang, J., Peng, J., Zhao, P., Kong, Z., Wang, K., Yan, W., & Wang, R. (2017). D-amino acid substitution enhances the stability of antimicrobial peptide polybia-CP. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 49(10), 916–925. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx091>.
- Kapil, S., & Sharma, V. (2021). D-Amino acids in antimicrobial peptides: a potential approach to treat and combat antimicrobial resistance. *Canadian Journal of Microbiology*,

67(2), 119–137. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0142>.

Khine, A. A., Del Sorbo, L., Vaschetto, R., Voglis, S., Tullis, E., Slutsky, A. S., Downey, G. P., & Zhang, H. (2006). Human neutrophil peptides induce interleukin-8 production through the P2Y6 signaling pathway. *Blood*, *107*(7), 2936–2942. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2314>.

Kim, S. Y., Zhang, F., Gong, W., Chen, K., Xia, K., Liu, F., Gross, R., Wang, J. M., Linhardt, R. J., & Cotten, M. L. (2018). Copper regulates the interactions of antimicrobial piscidin peptides from fish mast cells with formyl peptide receptors and heparin. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(40), 15381–15396. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001904>.

Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *6*(6), a027029. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>.

Kumar, P., Kizhakkedathu, J., & Straus, S. (2018). Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*, *8*(1), 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>.

Le, C.-F., Fang, C.-M., & Sekaran, S. D. (2017). Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *61*(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.02340-16>.

Lee, T.-H., N. Hall, K., & Aguilar, M.-I. (2015). Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: a focus on the role of membrane structure. *Current topics in medicinal chemistry*, *16*(1), 25–39. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150703121700>.

Lehrer, R. I., & Ganz, T. (2002). Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Current opinion in hematology*, *9*(1), 18–22. <https://doi.org/10.1097/00062752-200201000-00004>.

Lenz, K. D., Klosterman, K. E., Mukundan, H., & Kubicek-Sutherland, J. Z. (2021). Macrolides: From toxins to therapeutics. *Toxins*, *13*(5), 347. <https://doi.org/10.3390/toxins13050347>.

Li, S., Wang, Y., Xue, Z., Jia, Y., Li, R., He, C., & Chen, H. (2021). The structure-mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *109*, 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.005>.

Li, W., Separovic, F., O'Brien-Simpson, N. M., & Wade, J. D. (2021). Chemically modified and conjugated antimicrobial peptides against superbugs. *Chemical Society Reviews*, *50*(8), 4932–4973. <https://doi.org/10.1039/D0CS01026J>.

- Libardo, M. D., Cervantes, J. L., Salazar, J. C., & Angeles-Boza, A. M. (2014). Improved bioactivity of antimicrobial peptides by addition of amino-terminal copper and nickel (ATCUN) binding motifs. *ChemMedChem*, 9(8), 1892–1901. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402033>.
- Libardo, M. D. J., Nagella, S., Lugo, A., Pierce, S., & Angeles-Boza, A. M. (2015a). Copper-binding tripeptide motif increases potency of the antimicrobial peptide Anoplin via Reactive Oxygen Species generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(1), 446–451. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.11.104>.
- Libardo, M. D. J., Paul, T. J., Prabhakar, R., & Angeles-Boza, A. M. (2015b). Hybrid peptide ATCUN-sh-Buforin: Influence of the ATCUN charge and stereochemistry on antimicrobial activity. *Biochimie*, 113, 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.04.008>.
- Lin, W.-J., Chien, Y.-L., Pan, C.-Y., Lin, T.-L., Chen, J.-Y., Chiu, S.-J., & Hui, C.-F. (2009). Epinecidin-1, an antimicrobial peptide from fish (*Epinephelus coioides*) which has an antitumor effect like lytic peptides in human fibrosarcoma cells. *Peptides*, 30(2), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.10.007>.
- Liu, B., Zhang, W., Gou, S., Huang, H., Yao, J., Yang, Z., Liu, H., Zhong, C., Liu, B., Ni, J., & Wang, R. (2017). Intramolecular cyclization of the antimicrobial peptide Polybia-MPI with triazole stapling: influence on stability and bioactivity. *Journal of Peptide Science*, 23(11), 824–832. <https://doi.org/10.1002/psc.3031>.
- Lopez, S., F., Kim, H.-S., Choi, E. C., Delgado, M., Granja, J. R., Khasanov, A., Kraehenbuehl, K., Long, G., Weinberger, D. A., Wilcoxon, K. M., & Ghadiri, M. R. (2001). Antibacterial agents based on the cyclic d,l- α -peptide architecture. *Nature*, 412(6845), 452–455. <https://doi.org/10.1038/35086601>.
- Lombardi, L., Falanga, A., Del Genio, V., & Galdiero, S. (2019). A new hope: self-assembling peptides with antimicrobial activity. *Pharmaceutics*, 11(4), 166. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11040166>.
- Luo, Y., & Song, Y. (2021). Mechanism of antimicrobial peptides: antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 11401. <https://doi.org/10.3390/ijms222111401>.
- Luong, H. X., Thanh, T. T., & Tran, T. H. (2020). Antimicrobial peptides – Advances in development of therapeutic applications. *Life Sciences*, 260, 118407. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118407>.
- Lyu, Z., Yang, P., Lei, J., & Zhao, J. (2023). Biological function of antimicrobial peptides on suppressing pathogens and improving host immunity. *Antibiotics*, 12(6), 1037. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061037>.

- Ma, B., Guo, Y., Fu, X., & Jin, Y. (2020). Identification and antimicrobial mechanisms of a novel peptide derived from egg white ovotransferrin hydrolysates. *LWT*, *131*, 109720. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109720>.
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>.
- Martins, J. P. A., & Ferreira, M. M. C. (2013). QSAR modeling: um novo pacote computacional open source para gerar e validar modelos QSAR. *Química Nova*, *36*(4), 554–560. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000400013>.
- Matsuzaki, K. (2019). Membrane permeabilization mechanisms. *Antimicrobial Peptides: Basics for Clinical Application*, 9-16. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_2.
- Matthyssen, T., Li, W., Holden, J. A., Lenzo, J. C., Hadjigol, S., & O'Brien-Simpson, N. M. (2022). The potential of modified and multimeric antimicrobial peptide materials as superbug killers. *Frontiers in Chemistry*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.795433>.
- Majdanik, M. M. (2021). Mechanisms of resistance to macrolide antibiotics among *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, *10*(11), 1406. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111406>.
- Medina, E., & Pieper, D. H. (2016). Tackling threats and future problems of multidrug-resistant bacteria. *How to overcome the antibiotic crisis: facts, challenges, technologies and future perspectives*, 3-33. https://doi.org/10.1007/82_2016_492.
- Melino, S., Santone, C., Di Nardo, P., & Sarkar, B. (2014). Histatins: salivary peptides with copper (II)- and zinc (II)-binding motifs: perspectives for biomedical applications. *The FEBS Journal*, *281*(3), 657–672. <https://doi.org/10.1111/febs.12612>.
- Mishra, B., Reiling, S., Zarena, D., & Wang, G. (2017). Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies. *Current Opinion in Chemical Biology*, *38*, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.014>.
- Mookherjee, N., Anderson, M. A., Haagsman, H. P., & Davidson, D. J. (2020). Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, *19*(5), 311–332. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0058-8>.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, *65*(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Murphy, J. B., & Kies, M. W. (1960). Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. *Biochimica et Biophysica Acta*, *45*, 382–384. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(60\)91464-5](https://doi.org/10.1016/0006-3002(60)91464-5).

Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A.P., McManigal, B., Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).

Myers, A. G., & Clark, R. B. (2021). Discovery of macrolide antibiotics effective against multi-drug resistant gram-negative pathogens. *Accounts of Chemical Research*, 54(7), 1635–1645. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00020>.

Naskar, A., Lee, S., Lee, Y., Kim, S., & Kim, K. (2020). A new nano-platform of erythromycin combined with Ag nano-particle ZnO nano-structure against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceutics*, 12(9), 841. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090841>.

Neu, H. C., & Gootz, T. D. (1996). Antimicrobial chemotherapy. Medical Microbiology. 4th edition. PMID: 21413283

Neupane, K. P., Aldous, A. R., & Kritzer, J. A. (2014). Metal-binding and redox properties of substituted linear and cyclic ATCUN motifs. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 139, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.06.004>.

Olsen, J. E., Christensen, H., & Aarestrup, F. M. (2006). Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), 450–460. <https://doi.org/10.1093/jac/dki492>.

O'Neill, J. (2014). Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. Review on Antimicrobial Resistance. CRID: 1370857593729357568

Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasolofonirina, N., Ratsimaloto, M., Naoki, H., & Yasumoto, T. (1999). Identification of putative palytoxin as the cause of clupestoxism. *Toxicon*, 37(1), 55–65. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00133-0](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00133-0).

Park, P., Matsubara, D. K., Barzotto, D. R., Lima, F. S., Chaimovich, H., Marrink, S. J., & Cuccovia, I. M. (2024). Vesicle protrusion induced by antimicrobial peptides suggests common carpet mechanism for short antimicrobial peptides. *Scientific Reports*, 14(1), 9701. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60601-w>.

Park, Y. J., Lee, S. K., Jung, Y. S., Lee, M., Lee, H. Y., Kim, S. D., Park, J. S., Koo, J., Hwang, J. S., & Bae, Y.-S. (2016). Promotion of formyl peptide receptor 1-mediated neutrophil chemotactic migration by antimicrobial peptides isolated from the centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. *BMB Reports*, 49(9), 520–525. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.9.098>.

Park, Y.-K., & Hahm, K.-S. (2005). Antimicrobial peptides (AMPs): peptide structure and mode of action. *BMB Reports*, 38(5), 507–516. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2005.38.5.507>.

Pearson, C. S., Kloos, Z., Murray, B., Tabe, E., Gupta, M., Kwak, J. H., Karande, P., McDonough, K. A., & Belfort, G. (2016). Combined bioinformatic and rational design approach to develop antimicrobial peptides against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(5), 2757–2764. <https://doi.org/10.1128/AAC.00940-15>.

Pérez-Rodríguez, F., & Mercanoglu Taban, B. (2019). A state-of-art review on multi-drug resistant pathogens in foods of animal origin: risk factors and mitigation strategies. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02091>.

Piotrowska, U., Sobczak, M., & Oledzka, E. (2017). Current state of a dual behaviour of antimicrobial peptides—Therapeutic agents and promising delivery vectors. *Chemical Biology & Drug Design*, 90(6), 1079–1093. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13031>.

Pirtskhalava, M., Gabrielian, A., Cruz, P., Griggs, H. L., Squires, R. B., Hurt, D. E., Grigolava, M., Chubinidze, M., Gogoladze, G., Vishnepolsky, B., Alekseev, V., Rosenthal, A., & Tartakovsky, M. (2016). DBAASP v.2: an enhanced database of structure and antimicrobial/cytotoxic activity of natural and synthetic peptides. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1104–D1112. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1174>.

Powers, J.-P. S., & Hancock, R. E. W. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24(11), 1681–1691. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.08.023>.

Puentes, P. R., Henao, M. C., Torres, C. E., Gómez, S. C., Gómez, L. A., Burgos, J. C., Arbeláez, P., Osmá, J. F., Muñoz-Camargo, C., Reyes, L. H., & Cruz, J. C. (2020). Design, screening, and testing of non-rational peptide libraries with antimicrobial activity: in silico and experimental approaches. *Antibiotics*, 9(12), 854. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120854>.

Sadredinamin, M., Mehrnejad, F., Hosseini, P., & Doustdar, F. (2016). Antimicrobial Peptides (AMPs). *Novelty in Biomedicine*, 4(2), 70–76. <https://doi.org/https://doi.org/10.22037/nbm.v4i2.9158>.

Sani, M.-A., & Separovic, F. (2016). How membrane-active peptides get into lipid membranes. *Accounts of Chemical Research*, 49(6), 1130–1138. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00074>.

Savini, F., Loffredo, M. R., Troiano, C., Bobone, S., Malanovic, N., Eichmann, T. O., Caprio, L., Canale, V. C., Park, Y., Mangoni, M. L., & Stella, L. (2020). Binding of an antimicrobial peptide to bacterial cells: Interaction with different species, strains and cellular components. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(8),

183291. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183291>.

Sekiya, Y., Sakashita, S., Shimizu, K., Usui, K., & Kawano, R. (2018). Channel current analysis estimates the pore-formation and the penetration of transmembrane peptides. *The Analyst*, *143*(15), 3540–3543. <https://doi.org/10.1039/C8AN00243F>.

Shi, G., Kang, X., Dong, F., Liu, Y., Zhu, N., Hu, Y., Xu, H., Lao, X., & Zheng, H. (2022). DRAMP 3.0: an enhanced comprehensive data repository of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D488–D496. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab651>.

Shin, M. K., Park, H.-R., Hwang, I.-W., Bu, K.-B., Jang, B.-Y., Lee, S.-H., Oh, J. W., Yoo, J. S., & Sung, J.-S. (2023). In silico-based design of a hybrid peptide with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* using a spider toxin peptide. *Toxins*, *15*(12), 668. <https://doi.org/10.3390/toxins15120668>.

Shiomi, K., Yokota, H., Nagashima, Y., & Ishida, M. (2001). Primary and secondary structures of grammistins, peptide toxins isolated from the skin secretion of the soapfish *Pogonoperca punctata*. *Fisheries Science*, *67*(1), 163–169. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2001.00213.x>.

Song, C., Weichbrodt, C., Salnikov, E. S., Dynowski, M., Forsberg, B. O., Bechinger, B., Steinem, C., de Groot, B. L., Zachariae, U., & Zeth, K. (2013). Crystal structure and functional mechanism of a human antimicrobial membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(12), 4586–4591.

Stogios, P. J., & Savchenko, A. (2020). Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein Science*, *29*(3), 654–669. <https://doi.org/10.1002/pro.3819>.

Subramaniam, G., & Girish, M. (2020). Antibiotic resistance — A cause for reemergence of infections. *The Indian Journal of Pediatrics*, *87*(11), 937–944. <https://doi.org/10.1007/s12098-019-03180-3>.

Sugiyama, N., Araki, M., Ishida, M., Nagashima, Y., & Shiomi, K. (2005). Further isolation and characterization of grammistins from the skin secretion of the soapfish *Grammistes sexlineatus*. *Toxicon*, *45*(5), 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.12.021>.

Tamang, J. P., Shin, D.-H., Jung, S.-J., & Chae, S.-W. (2016). Functional properties of microorganisms in fermented foods. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00578>.

Tan, P., Fu, H., & Ma, X. (2021). Design, optimization, and nanotechnology of antimicrobial peptides: From exploration to applications. *Nano Today*, *39*, 101229. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101229>.

Therrien, C., & Levesque, R. C. (2000). Molecular basis of antibiotic resistance and

β -lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(3), 251–262. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00541.x>.

Torres, M. D. T., Sothiselvam, S., Lu, T. K., & de la Fuente-Nunez, C. (2019). Peptide design principles for antimicrobial applications. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3547–3567. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.015>.

Travkova, O. G., Moehwald, H., & Brezesinski, G. (2017). The interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 247, 521–532. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.06.001>.

Tsodikova, S. G., & Labby, K. J. (2016). Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *MedChemComm*, 7(1), 11–27. <https://doi.org/10.1039/C5MD00344J>.

Tyagi, A., Tuknait, A., Anand, P., Gupta, S., Sharma, M., Mathur, D., Joshi, A., Singh, S., Gautam, A., & Raghava, G. P. S. (2015). CancerPPD: a database of anticancer peptides and proteins. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D837–D843. <https://doi.org/10.1093/nar/gku892>.

Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. Bin, Dhama, K., Ripon, Md. K. H., Gajdacs, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, Md. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>.

Usmani, S. S., Bedi, G., Samuel, J. S., Singh, S., Kalra, S., Kumar, P., Ahuja, A. A., Sharma, M., Gautam, A., & Raghava, G. P. S. (2017). THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics. *PLOS ONE*, 12(7), e0181748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181748>.

Usmani, S. S., Kumar, R., Kumar, V., Singh, S., & Raghava, G. P. S. (2018). AntiTbPdb: a knowledgebase of anti-tubercular peptides. *Database*, 2018. <https://doi.org/10.1093/database/bay025>.

Vikesland, P., Garner, E., Gupta, S., Kang, S., Maile-Moskowitz, A., & Zhu, N. (2019). Differential drivers of antimicrobial resistance across the world. *Accounts of Chemical Research*, 52(4), 916–924. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00643>.

Vilas Boas, L. C. P., Campos, M. L., Berlanda, R. L. A., de Carvalho Neves, N., & Franco, O. L. (2019). Antiviral peptides as promising therapeutic drugs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(18), 3525–3542. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03138-w>.

Vishnepolsky, B., Zaalishvili, G., Karapetian, M., Nasrashvili, T., Kuljanishvili, N., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D. E., Tartakovsky, M., Grigolava, M., &

Pirtskhalava, M. (2019). De novo design and in vitro testing of antimicrobial peptides against Gram-negative bacteria. *Pharmaceuticals*, 12(2), 82. <https://doi.org/10.3390/ph12020082>.

Walters, M. S., Eggers, P., Albrecht, V., Travis, T., Lonsway, D., Hovan, G., Taylor, D., Rasheed, K., Limbago, B., & Kallen, A. (2015). Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* — Delaware, 2015. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 64(37), 1056. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6437a6>.

Walsh, C., & Wencewicz, T. (2020). Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities. John Wiley & Sons. PhD. *Laboratory Medicine*, 48(3), e42–e42. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmw070>.

Wang, C., Zolotarskaya, O. Y., Nair, S. S., Ehrhardt, C. J., Ohman, D. E., Wynne, K. J., & Yadavalli, V. K. (2016a). Real-time observation of antimicrobial polycation effectson *Escherichia coli*: adapting the carpet model for membrane disruption to quaternary copolyoxetanes. *Langmuir*, 32(12), 2975–2984. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04247>.

Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016b). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1087–D1093. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>.

Wang, J., Dou, X., Song, J., Lyu, Y., Zhu, X., Xu, L., Li, W., & Shan, A. (2019). Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. *Medicinal Research Reviews*, 39(3), 831–859. <https://doi.org/10.1002/med.21542>.

Wang, T.-Y., Libardo, M. D. J., Angeles-Boza, A. M., & Pellois, J.-P. (2017). Membrane oxidation in cell delivery and cell killing applications. *ACS Chemical Biology*, 12(5), 1170–1182. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00237>.

Webber, M. A. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 9–11. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg050>.

Wei, L., LaBouyer, M. A., Darling, L. E. O., & Elmore, D. E. (2016). Bacterial spheroplasts as a model for visualizing membrane translocation of antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(10), 6350–6352. <https://doi.org/10.1128/AAC.01008-16>.

Williams, R. L., Sroussi, H. Y., Leung, K., & Marucha, P. T. (2012a). Antimicrobial decapeptide KSL-W enhances neutrophil chemotaxis and function. *Peptides*, 33(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.11.022>.

Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 35–48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3155>.

Wright, G. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451–1470. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002>.

Wu, Z.-C., & Boger, D. L. (2020). Maxamycins: Durable antibiotics derived by rational redesign of vancomycin. *Accounts of Chemical Research*, 53(11), 2587–2599. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00569>.

Xi, B., Yu, N., Wang, X., Xu, X., & Abassi, Y. (2008). The application of cell-based label-free technology in drug discovery. *Biotechnology Journal*, 3(4), 484–495. <https://doi.org/10.1002/biot.200800020>.

Zasloff, M. (2019). Antimicrobial peptides of multicellular organisms: my perspective (pp. 3–6). https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_1.

Zgurskaya, H. I., Mallocci, G., Chandar, B., Vargiu, A. V., & Ruggerone, P. (2021). Bacterial efflux transporters' polyspecificity – a gift and a curse? *Current Opinion in Microbiology*, 61, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.03.009>.

Zhang, H., Zou, J., Yan, X., Chen, J., Cao, X., Wu, J., Liu, Y., & Wang, T. (2021). Marine-Derived Macrolides 1990–2020: An overview of chemical and biological diversity. *Marine Drugs*, 19(4), 180. <https://doi.org/10.3390/md19040180>.

Zhang, L., & Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1), R14–R19. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>.

Zhang, Q.-Y., Yan, Z.-B., Meng, Y.-M., Hong, X.-Y., Shao, G., Ma, J.-J., Cheng, X.-R., Liu, J., Kang, J., & Fu, C.-Y. (2021). Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research*, 8(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>.

Zhao, J., Ge, G., Huang, Y., Hou, Y., & Hu, S.-Q. (2022). Butelase 1-mediated enzymatic cyclization of antimicrobial peptides: improvements on stability and bioactivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(50), 15869–15878. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06588>.

Zhong, C., Zhu, N., Zhu, Y., Liu, T., Gou, S., Xie, J., Yao, J., & Ni, J. (2020). Antimicrobial peptides conjugated with fatty acids on the side chain of D-amino acid promises antimicrobial potency against multidrug-resistant bacteria. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 141, 105123. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105123>.

Zhong, C., Zou, J., Mao, W., Yang, P., Zhang, J., Gou, S., Zhang, Y., Liu, H., & Ni, J. (2024). Structure modification of anoplin for fighting resistant bacteria. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 268, 116276. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116276>.

Zhu, X., Zhang, L., Wang, J., Ma, Z., Xu, W., Li, J., & Shan, A. (2015). Characterization

of antimicrobial activity and mechanisms of low amphipathic peptides with different α -helical propensity. *Acta Biomaterialia*, 18, 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.02.023>.

Zhuo, C., Xu, Y., Xiao, S., Zhang, G., & Zhong, N.-S. (2013). Glycopeptide minimum inhibitory concentration creep among meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* from 2006–2011 in China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41(6), 578–581. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.02.014>.

10. ANEXO 1 - PROJETOS COMPLEMENTARES DESENVOLVIDOS DURANTE O DOUTORADO

Durante o período de doutoramento, foram desenvolvidos projetos complementares diretamente relacionados com o tema da tese de doutorado (peptídeos antimicrobianos) que resultaram na publicação de um artigo científico intitulado “Purification and Biological Properties of Raniseptins-3 and -6, Two Antimicrobial Peptides from *Boana raniceps* (Cope, 1862) Skin Secretion” publicado na revista *Biomolecules* e a submissão de um artigo na forma de *short communication* ao periódico *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*.



Article

Purification and Biological Properties of Raniseptins-3 and -6, Two Antimicrobial Peptides from *Boana raniceps* (Cope, 1862) Skin Secretion

Gabriel Gonçalves de Freitas ^{1,2} , João Martins Barbosa ^{1,2} , Carlos José Correia de Santana ^{1,2} , Ana Carolina Martins Magalhães ¹ , Keven Wender Rodrigues Macedo ¹ , Jéssica Oliveira de Souza ¹, Jessica Schneider de Castro ¹ , Isadora Alves de Vasconcelos ¹ , Amanda Araújo Souza ³, Sonia Maria de Freitas ⁴ , Sônia Nair Bão ⁵ , Samuel Ribeiro Costa ⁶, Guilherme Dotto Brand ⁶ , Ian de Meira Chaves ⁷, Vivian Vasconcelos Costa ⁷, Wagner Fontes ² , Osmindo Rodrigues Pires Júnior ¹ and Mariana S. Castro ^{1,2,*}

- ¹ Laboratory of Toxinology, Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia 70.910-900, DF, Brazil
 - ² Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia 70.910-900, DF, Brazil
 - ³ Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), National Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas 13083-970, SP, Brazil
 - ⁴ Laboratory of Biophysics, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia 70.910-900, DF, Brazil
 - ⁵ Electron Microscopy Laboratory, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia 70.910-900, DF, Brazil
 - ⁶ Laboratory of Synthesis and Analysis of Biomolecules, Institute of Chemistry, University of Brasilia, Brasilia 70.910-900, DF, Brazil
 - ⁷ Center for Research and Development of Pharmaceuticals, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil
- * Correspondence: mscastro@unb.br



Citation: Freitas, G.G.d.; Barbosa, J.M.; Santana, C.J.C.d.; Magalhães, A.C.M.; Macedo, K.W.R.; Souza, J.O.d.; Castro, J.S.d.; Vasconcelos, I.A.d.; Souza, A.A.; Freitas, S.M.d.; et al. Purification and Biological Properties of Raniseptins-3 and -6, Two Antimicrobial Peptides from *Boana raniceps* (Cope, 1862) Skin Secretion. *Biomolecules* **2023**, *13*, 576. <https://doi.org/10.3390/biom13030576>

Academic Editors: Juei-Tang Cheng, Yumin Dai and Marc Maresca

Received: 30 January 2023
Revised: 20 February 2023
Accepted: 22 February 2023
Published: 22 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The number of multidrug-resistant pathogenic microorganisms has been growing in recent years, most of which is due to the inappropriate use of the commercial antibiotics that are currently available. The dissemination of antimicrobial resistance represents a serious global public health problem. Thus, it is necessary to search for and develop new drugs that can act as antimicrobial agents. Antimicrobial peptides are a promising alternative for the development of new therapeutic drugs. Anurans' skin glands are a rich source of broad-spectrum antimicrobial compounds and hylids, a large and diverse family of tree frogs, are known as an important source of antimicrobial peptides. In the present study, two novel antimicrobial peptides, named Raniseptins-3 and -6, were isolated from *Boana raniceps* skin secretion and their structural and biological properties were evaluated. Raniseptins-3 and -6 are cationic, rich in hydrophobic residues, and adopt an α -helix conformation in the presence of SDS (35 mM). Both peptides are active against Gram-negative bacteria and Gram-positive pathogens, with low hemolytic activity at therapeutic concentrations. No activity was observed for yeasts, but the peptides are highly cytotoxic against B16F10 murine melanoma cells and NIH3T3 mouse fibroblast cells. None of the tested compounds showed improvement trends in the MTT and LDH parameters of MHV-3 infected cells at the concentrations tested.

Keywords: anurans; *Boana raniceps*; skin secretion; antimicrobial peptides; Raniseptins

1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) is an ancient natural phenomenon related to the evolutionary biology of bacteria. Unfortunately, the misuse and long-term use of conventional antibiotics have led to an acceleration in the resistance process, causing a serious public health problem at a global level [1–5]. The World Health Organization (WHO) considers

infections caused by multidrug-resistant bacteria to be one of the greatest threats to human health of the 21st century [2,6], and this problem is perceptible when faced with infections that were hitherto curable and are currently refractory, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection [7].

The rapid spread of AMR has driven many efforts by researchers to seek new compounds and antimicrobial strategies to limit this phenomenon and ensure the treatment of microbial infections. Faced with these challenges, anurans have proved to be an impressive source of biologically active compounds, mainly peptides with antimicrobial activity, with potential for the development of new drugs aimed at the treatment of infections caused by multidrug-resistant microorganisms [8–12].

Antimicrobial peptides (AMPs) are molecules that can vary in size, sequence, net charge, hydrophobicity, three-dimensional structure and spectrum of action. They are small molecules (<100 amino acid residues), positively charged (between +2 and +6 at pH 7.0) and about 50% of the amino acid residues present in their peptide chains are hydrophobic, and amphipathic (have both hydrophobic and hydrophilic domains) [13,14].

AMPs, in general, act by producing disturbances in the bacterial membrane through electrostatic and hydrophobic interactions, leading to the formation of pores and destabilization of biological membranes. These electrostatic interactions occur between cationic residues and the electronegative surface of bacterial phospholipids such as phosphatidylglycerol, phosphatidylserine, cardiolipin and other types of phospholipids, such as lipopolysaccharides (LPS) for Gram-negative bacteria, and teichoic and teichuronic acids for Gram-positive bacteria [14]. In general, this disturbance causes the formation of pores or micellization of the bacterial membrane [15]. These peptides are capable of inducing their activities directly through interaction with the biological membrane of the pathogens or indirectly modulating host immunity through the recruitment/activation of immunocytes or by mediating Toll-like receptor (TLR) recognition of microbial products and nucleic acids released with tissue damage [16].

Hylids, a large and diverse family of tree frogs, are known as an important source of antimicrobial peptides, with highly conserved features [17,18]. *Boana raniceps* (Cope, 1862), the target species of the present study, is a neotropical hylid of large size with a snout-vent length ranging from 70 to 75 mm. It has a slender body and limbs, broad head, smooth back with a yellowish cream color and uniformly colored belly. The presence of transverse bands on their back is common [19] (Figure 1). These animals can be commonly found in the Brazilian Cerrado and Caatinga, and their distribution ranges from Amazonian Colombia (vicinity of Leticia) and Venezuela (Amazonas) to French Guiana, Brazil (central Amazonia to Bahia), Paraguay, northern Argentina, and eastern Bolivia [20]. Its population is considered to be stable and can be found in degraded habitats and urban areas [21]. This species is associated with rivers or large swamps [22].



Figure 1. Adult specimen of *Boana raniceps*. Photo courtesy by Prof. Dr. Pedro Ivo Simões (Pernambuco Federal University, Recife, Brazil).

The aim of the present study was to carry out peptidomic analysis of the skin secretion of the hylid *B. raniceps*, leading to the purification and characterization of the biological properties of two novel Raniseptins.

2. Materials and Methods

2.1. Collection of Skin Secretion

The adult specimens were collected by means of an active search during the night. The collections were carried out in the municipality of Monte Alegre de Goiás, in the state of Goiás, Brazil, under the SISBIO/ICMBio license number 75407-1, and under the SISGEN protocol number AB8B1C1. The crude secretion was obtained with the aid of moderate electrical stimulation of a direct current of 50 V with low amperage, 500 mA. The released secretion was collected by washing the animal's body with Milli-Q water, then frozen, lyophilized, and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the time of use. The skin-secretion-harvesting procedure was approved by the Animal Ethics Committee of the University of Brasilia.

2.2. Fractionation of Crude Secretion by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Aliquots of the freeze-dried *Boana raniceps* crude secretion were prepared in 10 mg/mL of water with 0.12% (*v/v*) trifluoroacetic acid (TFA), homogenized and then centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. Then, 100 μL of the supernatant was injected into a C_{18} column (Shim-pack VP-ODS, no. 2122095, 4.6 mm \times 150 mm, 5 μm). Elution was carried out at a flow of 1 mL/min with a gradient of acetonitrile with 0.12% (*v/v*) TFA. Elution was monitored at 216 and 280 nm and fractions were collected, dried and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3. Purification of Antimicrobial Peptides

The fraction of interest was rechromatographed to purify the antimicrobial peptides. Dried aliquots were prepared in water with 0.12% (*v/v*) TFA, homogenized and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. The supernatant was injected into a normal phase hydrophilic interaction liquid chromatography column (HILIC) (Phenomenex Luna 200A, no. H18-129976, 4.6 mm \times 50 mm, 5 μm). Chromatography was performed on a linear gradient of 10–30% acetonitrile with 0.12% (*v/v*) TFA, at a flow rate of 1 mL/min and monitored at 216 and 280 nm.

2.4. Mass Spectrometry

The fractions of interest were analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) using an AutoFlex II equipment (Bruker, Germany), in positive ion reflectron mode with *m/z* range of 700–4000. The matrix used for ionization was α -cyano-4-hydroxycinnamic acid and the calibration was performed using the Peptide Calibration Standard II (Bruker, Germany), composed of a mixture of Bradykinin (757.399 Da), Angiotensin I (1046.5418 Da), Angiotensin II (1296.6848 Da), Substance P (1347.7354 Da), Bombesin (1619.8223 Da), ACTH_clip (1–17) (2093.0862 Da), ACTH_clip (18–39) (2465.1983 Da) and Somatostatin (3147.4710 Da).

2.5. Chemical Sequencing

The isolated peptides were sequenced by Edman degradation, using an automatic peptide and protein sequencer (model PSSQ 33A, Shimadzu, Japan), which was previously calibrated with a standard phenylthiohydantoin (PTH) amino acid mixture.

2.6. Circular Dichroism

The structural analysis of the peptides was performed using circular dichroism measurements on the spectropolarimeter model J-815 equipped with a Peltier-type temperature control system, coupled to a water pump (Jasco, Japan). The samples were analyzed in a 0.05 cm quartz cuvette, in the presence of Milli-Q water and, as a membrane mimic, 35 mM of sodium dodecyl sulfate (SDS) at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ was used. Each peptide spectrum in the Far-UV range (190–260 nm) was obtained from 10 consecutive measurements and after subtraction of the corresponding water and SDS spectra. The observed ellipticity was converted into molar ellipticity $[\theta]$ ($\text{degree}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) based on the molecular mass per residue of

112 Da. The α -helix secondary structure content was estimated considering the values of molar ellipticity ($\text{degree}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) in $\lambda_{208\text{nm}}$ based on [23].

2.7. Bioinformatic Analysis

The BLAST software (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, accessed on 20 October 2022) [24] was used to identify similar peptide sequences; the APD3 database (the Antimicrobial Peptide Database, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>, accessed on 20 October 2022) [25] was also used, with the purpose of determining the degree of identity or similarity with the peptides available in the database; Emboss Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) [26] was used for the alignment of peptide sequences; NetWheels (<http://tools.alanmol.com.br/NetWheels/>) [27], SOPMA software (<https://npsa-prabi.ibcp.fr>) [28], I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) and several tools available at <https://www.expasy.org/> [29] were used to obtain the physicochemical properties of the peptides, helical wheel projections, secondary structure prediction and three-dimensional structure model prediction.

2.8. Solid-Phase Synthesis and Purification

The Raniseptin-3 and -6 peptides were synthesized by the solid-phase method and purified as previously described by [30,31]. Fmoc-Gln(trt)-Wang resin (Sigma-Aldrich) was used. The qualitative effectiveness of each step was evaluated by the Kaiser test, and the peptide cleavage step was performed with TFA, triisopropylsilane (TIS), and H₂O in the proportion of 95/2.5/2.5, *v/v*. In the final step, the resin was solubilized for 1 h and 30 min, and then the samples were evaporated in argon, as described by [30]. The synthetic peptides were purified by RP-HPLC using an analytical C₁₈ reversed-phase column (Shim-pack VP-ODS, no. 2122095, 4.6 mm \times 50 mm, 5 μ m), and the molecular masses of both peptides were confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry.

2.9. Quantification of Peptides

The peptides were quantified according to the methodology described by [32]. A spectrophotometer (UV-M51, Bel Photonics, Brazil) was used for determining the UV absorption at 205, 215 and 225 nm.

2.10. Antibacterial Activity

The evaluation of the antibacterial activity was performed with the following Gram-negative and Gram-positive bacteria: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase CAPB053, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Aliquots of 200 μ L of the selected strains were incubated with 6.8 mL in Mueller–Hinton broth for 24 h at 37 °C. After the incubation period, the optical density (OD) at 625 nm was determined. Then, the bacterial suspensions were diluted and adjusted to an OD of 0.08–0.1, according to the CLSI (M7-A6) protocol [33]. This inoculum was diluted in the proportion of 1:200, for all the tested bacteria. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were evaluated using 50 μ L aliquots of each peptide (initial concentration: 256 μ M) that were previously filtered through 0.22 μ m filters (Millex GV, Millipore, Merck). Serial dilution was performed and incubation with 50 μ L of the bacterial inoculum was carried out for 24 h at 37 °C. At the end of the incubation time, bacterial growth was evaluated at 620 nm using a Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA).

The MIC was defined as the lowest concentration of peptide or other antimicrobial agents at which no growth was detectable after incubation at 37 °C for 24 h.

2.11. Antifungal Activity

The evaluation of the antifungal activity was performed with the yeast *Candida albicans* (ATCC 14053). Aliquots of 200 μ L of the strain were resuspended in 6.8 mL of Brain Heart Infusion (BHI) broth, and then incubated under constant agitation for 24 h at 37 °C. To

perform the test, an OD of 0.08–0.1 at 620 nm was obtained according to CLSI (M27-A3) [34], following by dilution in the proportion of 1:2000 in BHI broth. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were evaluated using 50 μL aliquots of each peptide (initial concentration: 256 μM) that were previously filtered through a 0.22 μm filter (Millex GV, Millipore, Merck), and then diluted in series. Aliquots of 50 μL of the fungi suspension with approximately 5×10^2 CFU/mL were applied to a 96-well plate and incubated for 24 h at 37 °C. The fungal growth was detected by reading the OD at 620 nm using a Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA).

The MIC was defined as the lowest concentration of peptide or other antimicrobial agents at which no growth was detectable after incubation at 37 °C for 24 h.

2.12. Antiproliferative Activity

The antiproliferative activity was evaluated with the murine cutaneous melanoma cancer cell line B16F10 (ATCC CRL-6475) and mouse embryonic fibroblast NIH3T3 (ATCC CRL-1658). Cells were maintained as described by [35]. B16F10 and NIH3T3 cells were seeded in 75 cm^2 culture flasks with complete medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% of fetal bovine serum, 100 IU/mL of penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of streptomycin) and kept in an incubator at 37 °C in 5% CO_2 . After the incubation period, cells were seeded at a density of 5×10^3 /well in 96-well plates with complete medium and incubated overnight. Antiproliferative activity was evaluated using 50 μL aliquots of each peptide (initial concentration: 256 μM) that were previously filtered through a 0.22 μm filter (Millex GV, Millipore, Merck), and then serially diluted. After the treatment period, 15 μL aliquots of MTT (5 mg/mL in PBS, pH 7.4) with 135 μL of complete medium were added to the wells and incubated for 3 h. Formazan crystals were solubilized in 100 μL of DMSO, and then read at 595 nm on a Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific, San Jose-CA, USA).

2.13. Human Hemolysis Activity

Fresh human erythrocytes (O positive) were centrifuged and washed to remove plasma with 10 mM Tris-HCl buffer at pH 7.4, containing 150 mM NaCl (four washes, 2000 rpm for 3 min). To carry out the assay, a human erythrocytes suspension at 1% (*v/v*) was prepared, using the saline-Tris buffer.

Each peptide was resuspended in 100 μL of saline-Tris buffer (initial concentration: 256 μM) and then serially diluted. Then, aliquots of 100 μL of the 1% erythrocytes suspension were added and incubated for 1 h at room temperature. After the incubation time, the samples were centrifuged at 2000 $\times g$ for 3 min and 100 μL aliquots of the supernatant were transferred to 96-well flat-bottom plates. The absorbance measurements were performed at 405 nm using a Multiskan FC plate reader (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA).

For positive and negative controls, 1% (*v/v*) Triton-X and saline-Tris buffer were used. All tests were performed in triplicates and expressed as mean \pm SD. The percentage of hemolysis was calculated based on [36].

2.14. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy was used to visualize the morphological alterations of *Escherichia coli* (ATCC 25922) induced by the incubation with Raniseptins-3 and -6. After the mid-log period, the bacteria were centrifuged at 13,000 rpm for 10 min, washed with 10 mM PBS (pH 7.6) and resuspended with an OD = 0.3, and then incubated with the peptides for 1 h and 30 min, using concentrations that corresponded to the MIC value. At the end of the incubation time, the cells were washed 3 times with PBS and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. Then, the pellets were fixed overnight with 0.1% Karnovsky, washed with buffer and dehydrated in a gradual series of acetone. After drying at the critical point and metallization of the material, the samples were observed using a JEOL JSM-7001F scanning electron microscope (Jeol Ltd., Akishima, Tokyo, Japan).

2.15. Infection and Viability Tests Protocol

The MHV-3 strain was provided and sequenced (GenBank accession no. MW620427.1) by [37]. L929 cells were distributed in a 96-well microtiter plate ($\times 10^5$ cells/well; 100 μ L) and incubated at 37 °C in an atmosphere with 5% CO₂, for 24 h. The medium was removed, and cells were inoculated with 100 μ L of MHV-3 MOI = 0.01 and incubated for 16 h at 37 °C with 5% CO₂. After incubation, viability tests were performed (MTT and LDH). Four different concentrations of the compound were tested. The following controls were used: a cell control (with DMEM 1% FBS); a cell control with DMEM 1% FBS plus the highest concentration of the tested compound; a virus control with MHV-3 inoculum and RPMI 1% FBS. Tests were performed on the technical duplicates.

After incubation, 10 μ L of the MTT solution (5 mg/mL in PBS; final concentration of 0.2 μ g/mL) was added to each well containing 90 μ L of the supernatant. The plate was incubated at 37 °C with 5% CO₂, for 120 min. After incubation, the entire content of the wells was discarded and the salt formed by the MTT reaction was dissolved with the addition of 100 μ L of DMSO to each well, followed by constant agitation of the plate for 3 min at room temperature. The OD measurements were taken in a microplate spectrophotometer at 490 nm. With the absorbance values, we calculated the cell viability through the following equation: %cell viability = [(A \times 100)/B], considering A as the sample to be compared to the control and B being the corresponding cell control.

For the LDH test, using LDH UV (Ref K084 Quibasa®), 4 μ L of supernatant from each well was transferred to a new 96-well plate. 200 μ L of the LDH kit's working solution was added and 3 different readings were performed in a microplate spectrophotometer at 340 nm, with an interval of 1 min between each reading to calculate substrate consumption per minute. Values were expressed in absorbance (Δ /min).

Cell viability was calculated using the following equation:

$$\Delta/\text{min} = [(\text{Abs. 1st read} - \text{Abs. 2nd read}) + (\text{Abs. 2nd read} - \text{Abs. 3rd read}) + (\text{Abs. 3rd read} - \text{Abs. 4th read})]/3$$

3. Results

3.1. Purification of Antimicrobial Peptides from *B. raniceps*

The cutaneous secretion obtained by electrical stimulation was lyophilized and subjected to fractionation by RP-HPLC using a C₁₈ reverse-phase column. The chromatographic profile obtained with the fractionation of the cutaneous secretion of *B. raniceps* resulted in the elution of several chromatographic fractions (Figure 2). To identify the active fractions, an antimicrobial screening assay was performed using *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923, resulting in the identification of six fractions with antimicrobial activity.

The fractions that exhibited antimicrobial activity were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. The fraction indicated in Figure 2 presented in its composition two components with distinct monoisotopic molecular masses. After the rechromatographic procedure (Figure 3A), the main component exhibited a protonated monoisotopic mass [M+H]⁺ of 3120.5 Da (Figure 3B), and the other component with a protonated monoisotopic molecular mass [M+H]⁺ of 2959.7 Da (Figure 3C).

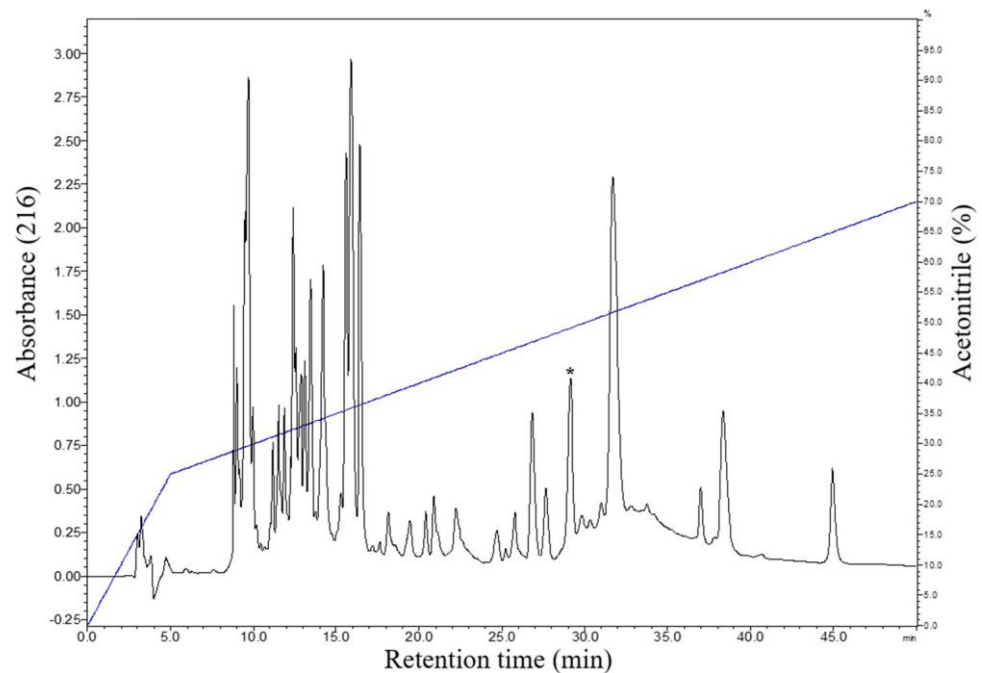


Figure 2. Typical chromatographic profile of the fractionation of the crude secretion of *B. raniceps*, using a C₁₈ column (Shim-pack VP-ODS, no. 2122095, 4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with a flow rate of 1 mL/min and detection at 216 nm. The fraction with antimicrobial activity that was characterized in the present study is indicated by an asterisk.

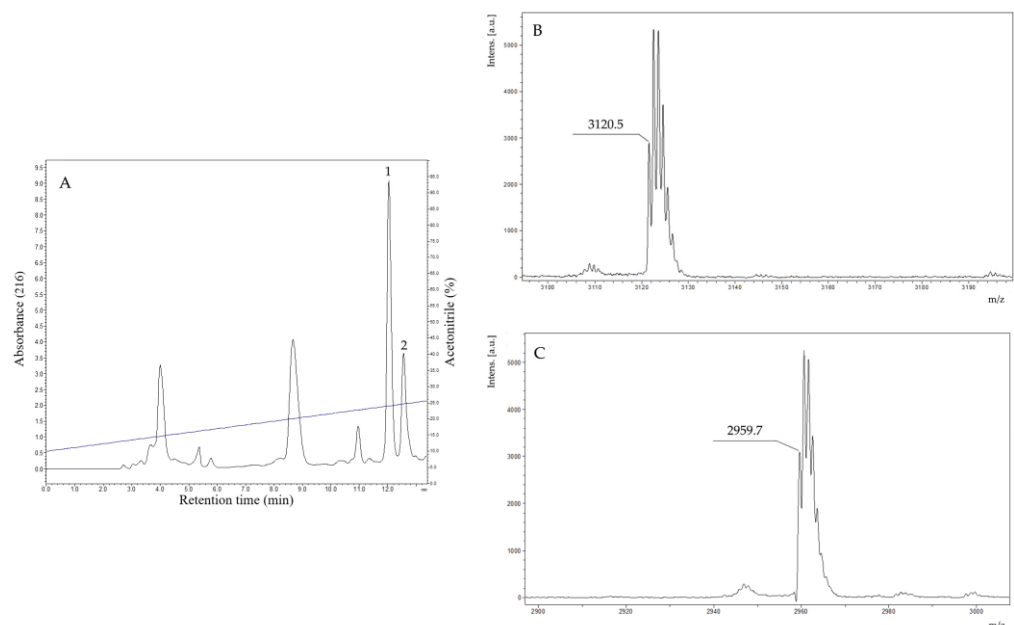


Figure 3. (A). Rechromatographic profile of the purification of the antimicrobial fraction found in the crude secretion of *B. raniceps*, using an HILIC column (Phenomenex Luna 200A, no. H18-129976, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a flow of 1 mL/min and detection at 216 nm. The fractions 1 and 2 (obtained after a rechromatographic step) were analyzed by MALDI-TOF MS and resulted in two purified peptides. (B). MALDI-TOF mass spectrum of fraction 1 (indicated in Figure 3A) exhibits a major component with a protonated molecular mass $[M+H]^+$ of 3120.5 Da. (C). MALDI-TOF mass spectrum of fraction 2 (indicated in Figure 3A) exhibits a major component with a protonated molecular mass $[M+H]^+$ of 2959.7 Da. The analyses were performed using an AutoFlex II equipment (Bruker, Germany), applying 1 μL of HCCA matrix at 20 mg/mL.

3.2. Structural Characterization of Antimicrobial Peptides from *B. raniceps*

The native peptides were subjected to chemical sequencing by Edman degradation. The peptides found in fractions 1 and 2 (Figure 3A) resulted in the following two distinct partial sequences with 25 and 24 amino acid residues, respectively: Peptide 1 (¹ALLDKLKSLGKVVGKVALGVVQNYL²⁵) and Peptide 2 (¹AWLDKLSIGKVVGKVAIGVAKNL²⁴). With these partial sequences, similarity searches were performed using the BLASTp tool and also the APD3 sequence bank. Peptide 1 corresponds to Raniseptin-6 (Rsp-6) and the peptide called 2 corresponds to Raniseptin-3 (Rsp-3), considering the molecular masses experimentally observed for these two peptides (Figure 3B,C), which allowed us to establish their complete primary structures (Figure 4).

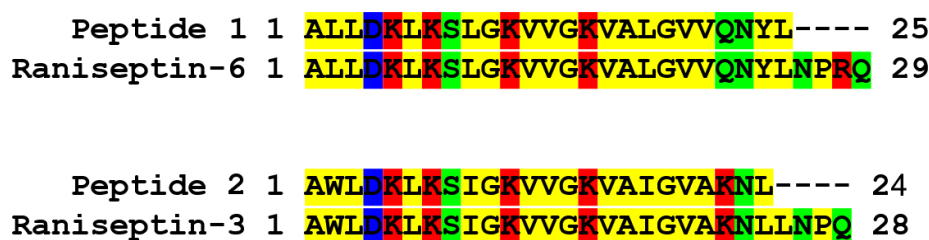


Figure 4. Alignment of peptides 1 and 2 (directly sequenced) isolated from *B. raniceps* skin secretion with the predicted amino acid sequences for the Raniseptins-3 and -6 identified in the *B. raniceps* cDNA library.

These two Raniseptins were previously identified in a cDNA library constructed with *B. raniceps* skin [38]. Magalhães et al. described nine different Raniseptins, with five belonging to the A family with the N-terminal portion starting with AWL and four belonging to the B family with the N-terminal portion starting with ALL [38,39]. In the case of the Raniseptins isolated here, Rsp-3 belongs to family A and Rsp-6 belongs to family B.

Raniseptins-3 and -6 are cationic peptides (+4), hydrophobic and demonstrate GRAVY scores of 0.300 and 0.169, respectively (Table 1), features commonly found in AMPs [36,40].

Table 1. Physicochemical properties of Raniseptins-3 and -6.

Peptide	Mass calc. (Da)	Mass obs. (Da)	Net Charge	Hydrophobic Face	Hydrophobicity <H>	GRAVY
Raniseptin-3	2958.77	2958.7	+4	VIPWVLLA	43.77	0.300
Raniseptin-6	3119.85	3119.5	+4	VLPLVLYA	43.60	0.169

The analysis of the helical wheel projections allowed us to observe that the antimicrobial peptides of *B. raniceps* tend to form amphipathic α -helices (Figure 5A). Secondary structure modelling revealed that both Raniseptins show tendencies to form α -helices with random N- and C-terminal regions (Figure 5B).

Our experimental analyses using circular dichroism revealed that the Raniseptins-3 and -6 adopt an α -helix conformation. The dichroic spectra of the peptides obtained in water at 25 °C showed mostly a negative dichroic band at 200 nm. These analyses revealed that both peptides presented disordered structures in aqueous solution; however, in the presence of SDS micelles, the peptides tended to structure themselves, mainly assuming a conformation in an α -helix (Figure 6). The dichroic spectra of the peptides in the presence of SDS 35 mM showed a significant shift of the negative dichroic band from 200 nm to the 208 nm and 222 nm regions, with $[\theta]_{208\text{nm}}$ values ranging between $-16,000$ and $-31,000$ degree cm^2/dmol , and a positive dichroic band at 190 nm. These results indicated that, in the presence of SDS, the peptides assumed a conformation predominantly in an α -helix.

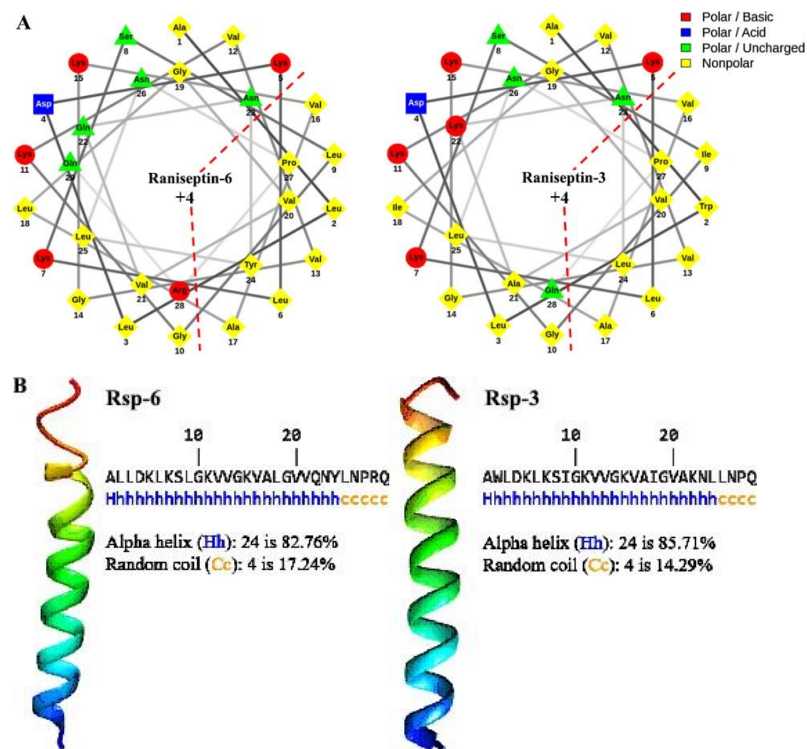


Figure 5. (A). Schiffer–Edmundson helical projections made using NetWheels of the antimicrobial peptides Raniseptins-3 and -6, highlighting the hydrophobic face of both peptides. (B). Secondary structure models for Raniseptins-3 and -6 using the I-TASSER server. In blue, the most electronegative region (N-terminal) can be observed, and in red, the electropositive region (C-terminal) can be observed.

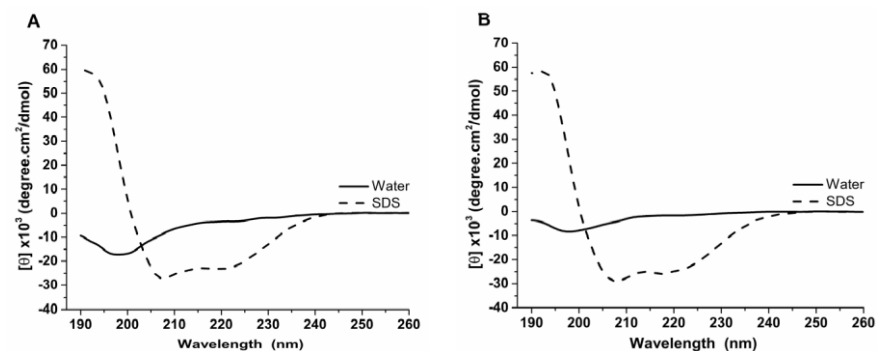


Figure 6. Circular dichroism analysis of the antimicrobial peptides of *B. raniceps* isolated in the present work. (A). Rsp-6 and (B). Rsp-3. Dichroic spectra were obtained from 190 to 260 nm, in aqueous solution and in the presence of SDS 35 mM. The thick black lines represent the dichroic curves of the samples in water, whereas the thin and dashed lines represent the dichroic curves in the presence of SDS 35 mM.

3.3. Biological Characterization of Antimicrobial Peptides from *B. raniceps*

In order to advance in the biological characterization of the Raniseptins isolated in the present work, the peptides were produced using the Fmoc solid-phase peptide synthesis strategy. Mass spectrometry analyses were performed with the purified synthetic peptides to confirm the quality of the products produced by comparing the molecular masses obtained experimentally with the theoretical molecular masses expected for each of the peptides.

The synthetic antimicrobial peptides Rsp-3 and -6 were tested against four ATCC bacterial species, one multidrug-resistant *K. pneumonia* strain, and one ATCC yeast species,

in addition to human erythrocytes, B16F10 murine melanoma cells, mouse fibroblasts NIH3T3 and MHV-3-infected L929.

Both peptides were shown to be very effective in inhibiting the growth of the Gram-negative bacteria *E. coli* and *K. pneumoniae*, with MIC values equal to 2 and 1 μM , respectively (Table 2), for both peptides. Inhibitory activity was slightly lower for the Gram-positive pathogens *S. aureus* and *S. epidermidis*, with Rsp-3 exhibiting MICs of 4 and 8 μM , respectively, for these bacteria (Table 2). The antimicrobial peptide Rsp-6 was also active against these microorganisms, showing MIC values equal to 32 and 8 μM for *S. aureus* and *S. epidermidis*, respectively (Table 2). Raniseptins were active against the resistant strain of *K. pneumoniae* carbapenemase (CAPB053), with MIC = 4 μM for both peptides.

Table 2. Antimicrobial activities of Raniseptins-3 and -6 (MIC in μM).

Microorganisms	Rsp-3	Rsp-6
Gram-negative bacteria		
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	2	2
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	1	1
<i>K. pneumoniae</i> carbapenemase (KPC CAPB053)	4	4
Gram-positive bacteria		
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	4	32
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	8	8
Yeast		
<i>C. albicans</i> (ATCC 14053)	>128	>128

These peptides were not able to completely inhibit the growth of the yeast *C. albicans*, even at the highest concentration used (128 μM) (Table 2). Even so, it was observed that both were able to markedly inhibit the growth of this yeast at this concentration (personal communications).

The effect of Rsp-3 and -6 on the cell membrane of *E. coli* (ATCC 25922) was examined using Scanning Electron Microscopy (SEM). The grooves observed on the surface of the control group represent the effect of the fixation process and dehydration of the bacterial membrane (Figure 7A, indicated by a white arrow); however, it is possible to observe the presence of intact bacteria with a normal shape and smooth surface without any defects (Figure 7A, indicated by a black arrow). In the treated groups, various alterations in the cellular shape and surface of the bacteria were observed. The bacterial cells exhibited roughening surfaces and crumpled morphologies with pores on the cell surface (Figure 7B,C).

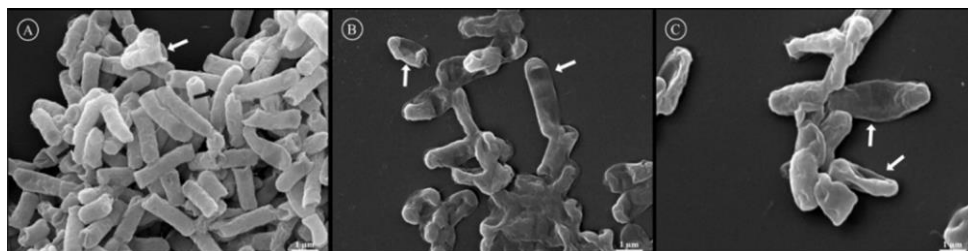


Figure 7. Analysis of the effect of Rsp-3 and -6 on the membrane of *Escherichia coli* (ATCC 25922) by SEM. (A) represents the control group incubated only with water, the white arrow shows the effect of the process of fixation and the black arrow indicates a bacterium with an intact membrane. (B,C) represent the effects induced by the presence of Rsp-6 and Rsp-3, respectively, on *E. coli* membranes, where the white arrows indicate the damages to the membranes by the peptides at the effective concentration of 2 μM .

The peptides exhibited dose-dependent hemolytic behavior and even at the highest concentration used (128 μM), the hemolytic activity detected was below 20%. Furthermore,

at the concentration range in which the antimicrobial activity proved to be relevant (between 2 and 8 μM), hemolysis was below 5% (Figure 8).

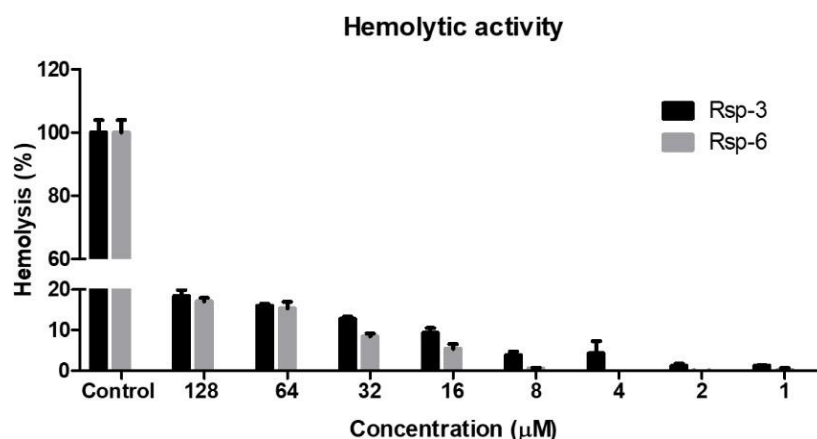


Figure 8. Hemolytic activity of Raniseptins-3 and -6 against human erythrocytes. Data points show mean \pm SD.

MTT-based assays for the measurement of antiproliferative activity for NIH3T3 murine fibroblast lines and B16F10 murine skin cancer cells were employed (Figure 9). The development of formazan crystals from the metabolism of MTT was detected after the cells were treated with the peptides. The Rsp-3 peptide showed an $\text{IC}_{50} = 4.21 \mu\text{M}$ and $\text{IC}_{50} = 6.56 \mu\text{M}$ for NIH3T3 and B16F10, respectively, whereas Rsp-6 showed an $\text{IC}_{50} = 5.94 \mu\text{M}$ and $\text{IC}_{50} = 8.69 \mu\text{M}$ for the same cells.

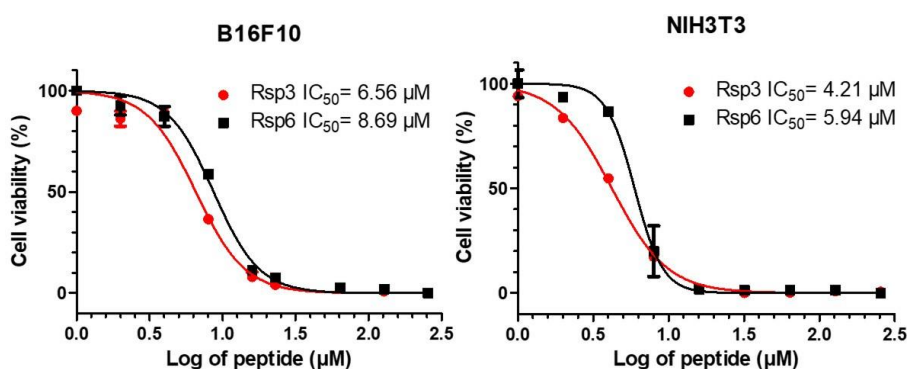


Figure 9. The antiproliferative effects of Raniseptins-3 and -6 on murine skin melanoma B16F10 cells and NIH3T3 mouse fibroblasts cells.

LDH is an enzyme widely used for cytotoxicity evaluation, since it is released in the culture supernatant during cellular damage processes, and MTT is also a useful strategy used to assess the possible cell damage, since the tetrazolium salt of this compound is reduced to purple formazan crystals in the presence of mitochondrial dehydrogenases that are present in metabolically viable cells, serving as a good indicator of cell viability. Our results showed that the highest concentration of all the compounds tested exhibited high toxicity to the cell, which can be observed both in the MTT and LDH assay. In addition, MHV-3 infection was able to reduce cell viability after 16 h of infection; on the other hand, none of the tested compounds showed improvement trends in the MTT and LDH parameters of MHV-3 infected cells at the concentrations tested (Figure 10).

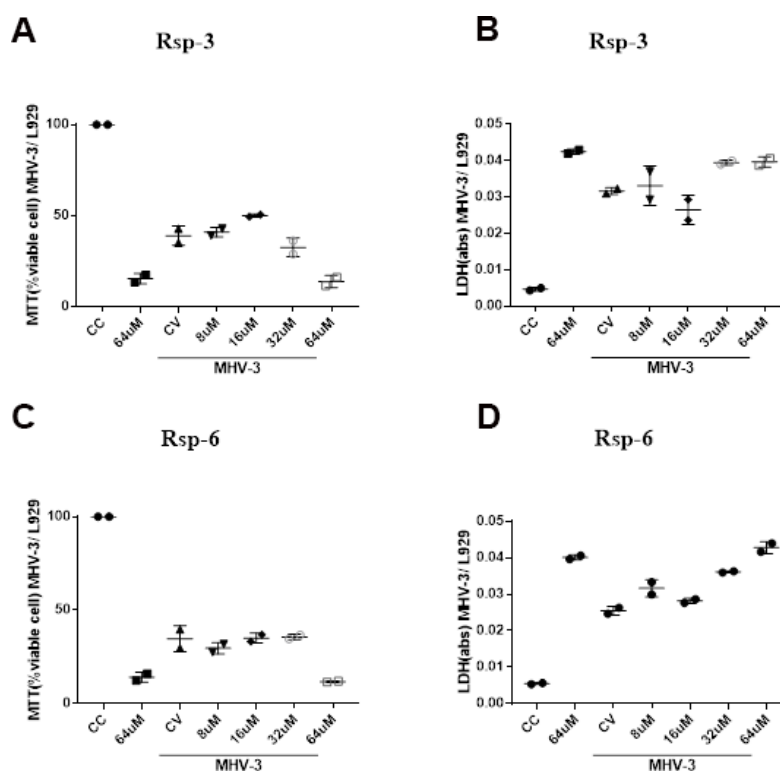


Figure 10. Biological effects of Raniseptins-3 and -6 on MHV-3-infected (L929) cells. Cell viability assessed by MTT assay ((A), Rsp-3 and (C), Rsp-6) and by LDH assay ((B), Rsp-3 and (D), Rsp-6).

4. Discussion

The cutaneous secretion of amphibians includes a great variety of substances, and these compounds can be more or less expressed according to certain variables, such as food, the season of year (rainy or dry), cycle or phase of the individual's development and even the animal collection location. For the genus *Boana*, few antimicrobial peptides have been isolated and characterized so far, and among them, Hylaseptin-P1 was found in the secretion of *B. punctata* [41], Hylin-a1 was isolated from *B. albopunctatus* [42], Cinerascetin was found in *B. cinerascens* [17] and Raniseptin-1 [38] and Figainins were isolated from the cutaneous secretion of *B. raniceps* [36,40].

The chromatographic profile of *B. raniceps* exhibited high complexity in its composition, presenting several chromatographic fractions, where the fractions of interest exhibited hydrophobic behavior after being eluted from 40% acetonitrile (Figure 2). In general, antimicrobial peptides are hydrophobic, with only a few exceptions [36,40,42]. The hydrophobicity of these molecules results from the presence of amino acids with apolar features, such as Leu, Ile, Val, Phe, Tyr and Trp. Its cationicity is related to the presence of the positively charged amino acids Lys and Arg [43]. When analyzing the primary structures of the peptides isolated in the present study, it is possible to observe that these peptides have a high percentage of hydrophobic and basic residues, justifying their physicochemical properties, such as high retention time, positive net charge and high hydrophobicity.

According to Kyte and Doolittle [44], it is possible to assess the degree of hydrophobicity by determining the mean hydropathicity index (GRAVY), which is calculated as the sum of the hydropathy values of all amino acids divided by the number of residues in the sequence, resulting in positive values for hydrophobic molecules. Raniseptins-3 and -6 exhibit GRAVY values of 0.3 and 0.169, respectively, indicating the hydrophobic profile of both peptides.

The peptides identified in the present study correspond to the Raniseptins-3 and -6 previously identified in a cDNA library produced from the skin of *B. raniceps* [38]. However, only Raniseptin-1 (Rsp-1) was isolated and characterized by Magalhães et al. [38], and due

to the limited amount of material, its chemical synthesis was performed. Raniseptin-1 was significantly active against the same bacteria tested in the present work, with MIC values equal to 5 μM for *E. coli* and 20 μM for *S. aureus* [38].

Raniseptin-3 showed marginally higher antimicrobial activity against *E. coli* with MIC = 2 μM , but a strong effect on *S. aureus* with MIC = 4 μM in comparison to Rsp-1. Rsp-6 exhibited antimicrobial activity identical to that of Rsp-3 against the Gram-negative bacteria tested, although it was less effective against the Gram-positive bacterium *S. aureus*.

It is believed that the selectivity observed for AMPs may be related to the differences in the constitution of the membranes of Gram-negative and Gram-positive bacteria [36,45]. While the inner or cytoplasmic membranes of both groups of bacteria are similar, their outer envelopes are quite different. In Gram-positive bacteria, there is a layer of peptidoglycan (with associated teichoic acid) that allows the diffusion of AMPs through nano-sized pores. In Gram-negative bacteria, the peptidoglycan layer is thinner, and an additional external membrane formed mainly by LPS is found, which implies the need for AMPs to promote disturbance or rupture of the external and cytoplasmic membranes, resulting in a two-step process [46]. Rsp-3 is active against both types of bacteria, which can include interactions not only with lipopolysaccharides and lipoteichoic acid, but also with peptidoglycans.

Another factor that may influence the antimicrobial activity observed for the two Raniseptins could be associated with the fact that Rsp-3 has a larger hydrophobic face than Rsp-6, which may justify the more effective action against a wider spectrum of bacteria [47]. Cationicity does not seem to be a determining factor for the selectivity of these two peptides since they have the same net charge (+4). Some peptides described for the genus *Boana* are more effective against Gram-positive bacteria, such as Hylin a1 with a MIC value of 8 μM [42] and Cinerascetin 01 with a MIC equal to 10 μM against *S. aureus* [17]. Other peptides found in hylids also demonstrate greater action against Gram-positive bacteria, such as Brevinins with a MIC = 2.5–10 μM and Esculentins with a MIC = 2.5–5 μM [48].

The cytolytic effects of antimicrobial peptides are related to their cationic properties, with this effect being due to their interaction with the sialic acid molecules present on the surface of erythrocytes [49]. Sialic acid is negatively charged, which favors interaction with higher net charged peptides. In general, antimicrobial peptides have a net positive charge, ranging from +4 to +7, with a few exceptions represented by the peptides with a net negative charge, of which only 15 have been described in amphibian secretions [50]. The net positive charge of these molecules is directly related to the ratio between the basic amino acids, such as His, Lys and Arg, and acidic amino acids, such as Asp and Glu, present in these molecules [43]. In the case of Rsp-3 and -6 peptides, both have five positive residues in their sequences balanced by an Asp residue, resulting in a net charge equal to +4. Although cationicity is an important factor for their cytolytic activity against human erythrocytes, the peptides Rsp-3 and -6 demonstrated less than 20% hemolysis even at the highest concentration used of 128 μM , in contrast to what was observed for Figainin 2 and Hylin a1, which showed HC₅₀ values equal to 48.9 and 18.6 μM , respectively [36,42].

Both peptides were also tested against mouse cell lines and exhibited antiproliferative and cytotoxic effects on murine melanoma B16F10 cells and on L929 and NIH3T3 mouse fibroblasts. The observed results may be related to the cationic properties of the peptides studied [49], which lead to their stronger interaction with anionic molecules such as phosphatidylserine, O-glycosylated mucins, sialylated gangliosides and heparin sulfate present in cancer cell membranes that may or may not be overexpressed [51,52]. Other hydrophobic properties can also affect the cytotoxicity process.

For comparative purposes, the peptide Dermaseptin-L1, identified in the secretion of *Agalychnis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae), exhibits stronger selectivity over cancerous cell lines than normal cells. For HepG2 human hepatoma-derived cells, the peptide Dermaseptin-L1 showed a LC₅₀ = 45 μM ; nevertheless, for human erythrocytes, this peptide exhibited a LC₅₀ = 200 μM [53]. The Figainin 1 and 2 peptides, which belong to the same family, are present in the cutaneous secretion of the species *B. raniceps*. Figainin 1 peptide has demonstrated activity against the human cervical adenocarcinoma HeLa, human mam-

mary adenocarcinoma cell line MCF-7, and the murine skin melanoma cell line B16F10, with IC_{50} values equal to 11.1, 13.7, 10.5 μM , respectively. For the Figainin 2 peptide, an $IC_{50} = 12.8 \mu\text{M}$ was observed for B16F10 and $IC_{50} = 15.3 \mu\text{M}$ for MCF-7; however, these two peptides demonstrate potent hemolytic action against human erythrocytes [36,40].

Currently, the use of antimicrobial peptides as potential drugs against emerging infectious viral pathogens, such as dengue virus, Zika virus, and SARS-CoV-2, is under investigation [54,55] and in the present study, we tested Raniseptins-3 and -6 against the MHV-3 virus, a murine hepatitis virus that shares the same genus (*Betacoronavirus*) with the SARS-CoV-2 virus, the severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 that infected millions of people worldwide [56–58]. MHV is a well-studied animal coronavirus that serves as a safe and cost-effective model used to investigate infections by coronaviruses [59]. Before testing the compounds of interest on a SARS-CoV-2 antiviral assay, the MHV model can be initially used and, if deleterious effects on this virus are detected, the effects on SARS-CoV-2 can be evaluated. Unfortunately, the Raniseptins peptides were highly toxic for the host L929 cells.

As an alternative, the adverse effects observed on mammalian cells can be avoided with the use of nanoencapsulation and delivery strategies [60,61].

5. Conclusions

In conclusion, the antimicrobial peptides isolated from the cutaneous secretion of *Boana raniceps* exhibited therapeutically interesting antimicrobial properties, which may contribute to the development of new antimicrobial agents in order to combat the current crisis in the treatment of infections caused by resistant microorganisms, reinforcing the need to advance in the exploration, for pharmaceutical purposes, of the Brazilian anuran's biodiversity.

Author Contributions: Conceptualization, M.S.C. and G.G.d.F.; methodology, G.G.d.F., J.M.B., C.J.C.d.S., A.C.M.M., K.W.R.M., J.O.d.S., J.S.d.C., I.A.d.V., A.A.S., S.M.d.F., S.N.B., S.R.C., G.D.B., I.d.M.C. and V.V.C.; writing—original draft preparation, G.G.d.F.; writing—review and editing, C.J.C.d.S., W.F., O.R.P.J. and M.S.C.; supervision, M.S.C.; project administration, M.S.C.; funding acquisition, M.S.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This manuscript was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil, n. 88881.507175/2020-01), FAPDF (Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal, Brazil), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Dengue e Interação Microorganismo-Hospedeiro (CNPq n. 465425/2014-3 and FAPEMIG APQ-03606-17), DPG and DPI—FUB/UnB (Fundação Universidade de Brasília, Brazil), PPG em Biologia Animal and PPG em Biologia Molecular (Universidade de Brasília, Brazil).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee for Research with Humans Subjects of the School of Health Sciences at University of Brasília (protocol number 45/2010) and by the Animal Ethics Committee of the University of Brasília.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article.

Acknowledgments: The authors would like to thank the following agencies that provided financial and technical support for the execution of this research project: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil), FAPDF (Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal, Brazil), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), DPG and DPI—FUB/UnB (Fundação Universidade de Brasília, Brazil), PPG em Biologia Animal and PPG em Biologia Molecular (Universidade de Brasília, Brazil).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Prestinaci, F.; Pezzotti, P.; Pantosti, A. Antimicrobial Resistance: A Global Multifaceted Phenomenon. *Pathog. Glob. Health* **2015**, *109*, 309–318. [CrossRef]
2. Roca, I.; Akova, M.; Baquero, F.; Carlet, J.; Cavalieri, M.; Coenen, S.; Cohen, J.; Findlay, D.; Gyssens, I.; Heure, O.E.; et al. The Global Threat of Antimicrobial Resistance: Science for Intervention. *New Microbes New Infect.* **2015**, *6*, 22–29. [CrossRef]
3. Murray, C.J.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Aguilar, G.R.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *Lancet* **2022**, *399*, 629–655. [CrossRef]
4. Iskandar, K.; Murugaiyan, J.; Halat, D.H.; El Hage, S.; Chibabhai, V.; Adukkadukkam, S.; Roques, C.; Molinier, L.; Salameh, P.; Van Dongen, M. Antibiotic Discovery and Resistance: The Chase and the Race. *Antibiotics* **2022**, *11*, 182. [CrossRef] [PubMed]
5. Ventola, C.L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharm. Ther.* **2015**, *40*, 277–283.
6. Laxminarayan, R.; Mouton, R.P.; Pant, S.; Brower, C.; Røttingen, J.-A.; Klugman, K.; Davies, S. Access to Effective Antimicrobials: A Worldwide Challenge. *Lancet* **2016**, *387*, 168–175. [CrossRef] [PubMed]
7. Le, C.-F.; Fang, C.-M.; Sekaran, S.D. Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e02340-16. [CrossRef] [PubMed]
8. Nascimento, A.C.; Fontes, W.; Sebben, A.; Castro, M. Antimicrobial Peptides from Anurans Skin Secretions. *Protein Pept. Lett.* **2003**, *10*, 227–238. [CrossRef] [PubMed]
9. Ladram, A.; Nicolas, P. Antimicrobial Peptides from Frog Skin: Biodiversity and Therapeutic Promises. *Front. Biosci.* **2016**, *21*, 1341–1371. [CrossRef]
10. Patocka, J.; Nepovimova, E.; Klimova, B.; Wu, Q.; Kuca, K. Antimicrobial Peptides: Amphibian Host Defense Peptides. *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*, 5924–5946. [CrossRef] [PubMed]
11. Conlon, J.M.; Mechkarska, M.; Leprince, J. Peptidomic Analysis in the Discovery of Therapeutically Valuable Peptides in Amphibian Skin Secretions. *Expert Rev. Proteom.* **2019**, *16*, 897–908. [CrossRef]
12. Romero, S.M.; Cardillo, A.B.; Martínez Ceron, M.C.; Camperi, S.A.; Giudicessi, S.L. Temporins: An Approach of Potential Pharmaceutical Candidates. *Surg. Infect.* **2020**, *21*, 309–322. [CrossRef] [PubMed]
13. Conlon, J.M. Structural Diversity and Species Distribution of Host-Defense Peptides in Frog Skin Secretions. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 2303–2315. [CrossRef]
14. Mojsoska, B.; Jenssen, H. Peptides and Peptidomimetics for Antimicrobial Drug Design. *Pharmaceuticals* **2015**, *8*, 366–415. [CrossRef] [PubMed]
15. Kim, Y.S.; Cha, H.J. Disperse Distribution of Cationic Amino Acids on Hydrophilic Surface of Helical Wheel Enhances Antimicrobial Peptide Activity. *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *107*, 216–223. [CrossRef] [PubMed]
16. Zhang, L.-J.; Gallo, R.L. Antimicrobial Peptides. *Curr. Biol.* **2016**, *26*, R14–R19. [CrossRef]
17. Almeida, R.A.; Gordo, M.; Da Silva, F.M.A.; De Araújo, R.C.; Ramada, M.H.S.; Abrão, F.Y.; Costa, T.O.G.; Koolen, H.H.F.; De Souza, A.D.; Bloch, C., Jr. Cinerascetins, New Peptides from *Hypsiboas cinerascens*: MALDI LIFT-TOF-MS/MS *de novo* Sequence and Imaging Analysis. *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *26*, 2290–2297. [CrossRef]
18. Nacif-Margal, L.; Pereira, G.R.; Abranches, M.V.; Costa, N.C.; Cardoso, S.A.; Honda, E.R.; de Paula, S.O.; Feio, R.N.; Oliveira, L.L. Identification and Characterization of an Antimicrobial Peptide of *Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824) (Amphibia, Hylidae). *Toxicon* **2015**, *99*, 16–22. [CrossRef]
19. Vaz-Silva, W.; Maciel, N.M.; Nomura, F.; de Moraes, A.R.; Batista, V.G.; Santos, D.L.; Andrade, S.P.; de Oliveira, A.Â.B.; Brandão, R.A.; Bastos, R.P. *Guia de Identificação das Espécies de Anfíbios (Anura e Gymnophiona) do Estado de Goiás e do Distrito Federal, Brasil Central*; Sociedade Brasileira de Zoologia: Curitiba, Brazil, 2020; ISBN 9786587590011.
20. Frost, D.R. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 6.1. Available online: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php> (accessed on 7 June 2022).
21. La Marca, E.; Azevedo-Ramos, C.; Silvano, D.; Scott, N.; Aquino, L.; Faivovich, J. *Hypsiboas raniceps*. The IUCN Red List of Threatened Species. Available online: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T55622A11341908.en> (accessed on 8 June 2022).
22. Fouquet, A.; Gilles, A.; Vences, M.; Marty, C.; Blanc, M.; Gemmell, N. Underestimation of Species Richness in Neotropical Frogs Revealed by MtDNA Analyses. *PLoS ONE* **2007**, *2*, e1109. [CrossRef]
23. Greenfield, N.J.; Fasman, G.D. Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation. *Biochemistry* **1969**, *8*, 4108–4116. [CrossRef]
24. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [CrossRef] [PubMed]
25. Wang, G.; Li, X.; Wang, Z. APD3: The Antimicrobial Peptide Database as a Tool for Research and Education. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D1087–D1093. [CrossRef] [PubMed]
26. Needleman, S.B.; Wunsch, C.D. A General Method Applicable to the Search for Similarities in the Amino Acid Sequence of Two Proteins. *J. Mol. Biol.* **1970**, *48*, 443–453. [CrossRef] [PubMed]
27. Mol, A.R.; Castro, M.S.; Fontes, W. NetWheels: A Web Application to Create High Quality Peptide Helical Wheel and Net Projections. *BioRxiv* **2018**, 416347.

28. Geourjon, C.; Deléage, G. SOPMA: Significant Improvements in Protein Secondary Structure Prediction by Consensus Prediction from Multiple Alignments. *Bioinformatics* **1995**, *11*, 681–684. [CrossRef]
29. Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M.R.; Appel, R.D.; Bairoch, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2005; pp. 571–607.
30. Chan, W.; White, P. (Eds.) *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*; Oxford University Press: Oxford, UK, 1999; ISBN 9780199637256.
31. Silva, L.P.; Leite, J.R.; Brand, G.D.; Regis, W.; Tedesco, A.; Azevedo, R.B.; Freitas, S.M.; Bloch, C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Liposomes Fusion and/or Lysis Investigated by Fluorescence and Atomic Force Microscopy. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **2008**, *151*, 329–335. [CrossRef]
32. Aitken, A.; Learmonth, M.P. Protein Determination by UV Absorption. In *The Protein Protocols Handbook*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 1996; pp. 3–6.
33. *CLSI Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Document M7-A6; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2003.
34. *CLSI Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, 3rd ed.; Document M27-A3; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2008.
35. Libério, M.S.; Joanitti, G.; Azevedo, R.B.; Cilli, E.M.; Zanotta, L.C.; Nascimento, A.C.; de Sousa, M.V.; Júnior, O.R.P.; Fontes, W.; Castro, M.S. Anti-Proliferative and Cytotoxic Activity of Pentadactylin Isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on Melanoma Cells. *Amino Acids* **2011**, *40*, 51–59. [CrossRef]
36. Santana, C.J.C.; Magalhães, A.C.M.; Priás-Márquez, C.A.; Falico, D.A.; Júnior, A.C.M.D.S.; Lima, B.D.; Ricart, C.A.O.; De Pilger, D.R.B.; Bonotto, R.M.; Moraes, C.B.; et al. Biological Properties of a Novel Multifunctional Host Defense Peptide from the Skin Secretion of the Chaco Tree Frog, *Boana raniceps*. *Biomolecules* **2020**, *10*, 790. [CrossRef]
37. Garcia, A.B.; de Moraes, A.P.; Rodrigues, D.M.; Gilioli, R.; de Oliveira-Filho, E.F.; Durães-Carvalho, R.; Arns, C.W. Coding-Complete Genome Sequence of Murine Hepatitis Virus Strain 3 from Brazil. *Microbiol. Resour. Announc.* **2021**, *10*, e00248-21. [CrossRef]
38. Magalhães, B.S.; Melo, J.A.; Leite, J.R.S.; Silva, L.P.; Prates, M.V.; Vinecky, F.; Barbosa, E.A.; Verly, R.M.; Mehta, A.; Nicoli, J.R.; et al. Post-Secretory Events Alter the Peptide Content of the Skin Secretion of *Hypsiboas raniceps*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *377*, 1057–1061. [CrossRef]
39. Barbosa, E. Avaliação Da Transcrição, Expressão e Indução de Genes Que Codificam Peptídeos Antimicrobianos Em *Hypsiboas raniceps* Por Ferramentas de Biologia Molecular e Espectrometria de Massa. Master's Thesis, University of Brasilia, Brasilia, Brazil, 2010.
40. Santana, C.J.C.; Magalhães, A.C.M.; Júnior, A.C.M.D.S.; Ricart, C.A.O.; Lima, B.D.; Álvares, A.D.C.M.; De Freitas, S.M.; Pires, J.O.R.; Fontes, W.; Castro, M.S. Figainin 1, a Novel Amphibian Skin Peptide with Antimicrobial and Antiproliferative Properties. *Antibiotics* **2020**, *9*, 625. [CrossRef] [PubMed]
41. Prates, M.V.; Sforça, M.L.; Regis, W.C.B.; Leite, J.R.S.A.; Silva, L.P.; Pertinhez, T.A.; Araújo, A.L.T.; Azevedo, R.B.; Spisni, A.; Bloch, C. The NMR-derived Solution Structure of a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of the Anuran *Hyla punctata*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13018–13026. [CrossRef]
42. Castro, M.S.; Ferreira, T.C.G.; Cilli, E.M.; Crusca, E.; Mendes-Giannini, M.J.S.; Sebben, A.; Ricart, C.A.O.; Sousa, M.V.; Fontes, W. Hylin a1, the First Cytolytic Peptide Isolated from the Arboreal South American Frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). *Peptides* **2009**, *30*, 291–296. [CrossRef]
43. Bechinger, B.; Gorr, S.-U. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *J. Dent. Res.* **2017**, *96*, 254–260. [CrossRef] [PubMed]
44. Kyte, J.; Doolittle, R.F. A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* **1982**, *157*, 105–132. [CrossRef] [PubMed]
45. Neelay, O.P.; Peterson, C.A.; Snavely, M.E.; Brown, T.C.; Tecler-Mariam, A.F.; Campbell, J.A.; Blake, A.M.; Schneider, S.C.; Cremeens, M.E. Antimicrobial Peptides Interact with Peptidoglycan. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1146*, 329–336. [CrossRef]
46. Li, J.; Koh, J.J.; Liu, S.; Lakshminarayanan, R.; Verma, C.S.; Beuerman, R.W. Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Front Neurosci.* **2017**, *11*, 73. [CrossRef]
47. Wang, G. (Ed.) *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies*; CABI: Wallingford, UK, 2010; ISBN 9781845936570.
48. Wang, Y.; Zhang, Y.; Lee, W.-H.; Yang, X.; Zhang, Y. Novel Peptides from Skins of Amphibians Showed Broad-Spectrum Antimicrobial Activities. *Chem. Biol. Drug Des.* **2016**, *87*, 419–424. [CrossRef]
49. Blondelle, S.E.; Lohner, K.; Aguilar, M.-I. Lipid-Induced Conformation and Lipid-Binding Properties of Cytolytic and Antimicrobial Peptides: Determination and Biological Specificity. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Biomembr.* **1999**, *1462*, 89–108. [CrossRef]
50. Dennison, S.R.; Harris, F.; Mura, M.; Phoenix, D.A. An Atlas of Anionic Antimicrobial Peptides from Amphibians. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2018**, *19*, 823–838. [CrossRef]
51. Oelkrug, C.; Hartke, M.; Schubert, A. Mode of Action of Anticancer Peptides (ACPs) from Amphibian Origin. *Anticancer Res.* **2015**, *35*, 635–643.
52. Hoskin, D.W.; Ramamoorthy, A. Studies on Anticancer Activities of Antimicrobial Peptides. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Biomembr.* **2008**, *1778*, 357–375. [CrossRef]

53. Conlon, J.M.; Woodhams, D.C.; Raza, H.; Coquet, L.; Leprince, J.; Jouenne, T.; Vaudry, H.; Rollins-Smith, L.A. Peptides with Differential Cytolytic Activity from Skin Secretions of the Lemur Leaf Frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae). *Toxicon* **2007**, *50*, 498–506. [CrossRef] [PubMed]
54. Elnagdy, S.; AlKhazindar, M. The Potential of Antimicrobial Peptides as an Antiviral Therapy against COVID-19. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2020**, *3*, 780–782. [CrossRef] [PubMed]
55. Ahmed, A.; Siman-Tov, G.; Hall, G.; Bhalla, N.; Narayanan, A. Human Antimicrobial Peptides as Therapeutics for Viral Infections. *Viruses* **2019**, *11*, 704. [CrossRef]
56. Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 727–733. [CrossRef]
57. Guan, W.J.; Ni, Z.Y.; Hu, Y.; Liang, W.H.; Qu, C.Q.; He, J.X.; Liu, L.; Shan, H.; Lei, C.L.; Hui, D.S.C.; et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 1708–1720. [CrossRef] [PubMed]
58. Hu, B.; Guo, H.; Zhou, P.; Shi, Z.-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 141–154. [CrossRef]
59. Oliveira, G.P.; Kroon, E.G. Mouse Hepatitis Virus: A Betacoronavirus Model to Study the Virucidal Activity of Air Disinfection Equipment on Surface Contamination. *J. Virol. Methods* **2021**, *297*, 114274. [CrossRef]
60. Makowski, M.; Silva, Í.C.; Pais do Amaral, C.; Gonçalves, S.; Santos, N.C. Advances in Lipid and Metal Nanoparticles for Antimicrobial Peptide Delivery. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 588. [CrossRef]
61. Thakur, A.; Sharma, A.; Alajangi, H.K.; Jaiswal, P.K.; Lim, Y.-B.; Singh, G.; Barnwal, R.P. In Pursuit of Next-Generation Therapeutics: Antimicrobial Peptides against Superbugs, their Sources, Mechanism of Action, Nanotechnology-Based Delivery, and Clinical Applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *218*, 135–156. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

A new temporin with antibacterial activity and cytotoxicity from the skin secretion of *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) (Amphibia: Ranidae) from Brazilian Atlantic Forest

Géssica Gomes Barbosa^{a#}, Carlos José Correia de Santana^{b#}, Tulíbia Laurindo Silva^a, Brenda Conceição Guimarães Santana^b, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Gabriel Gonçalves de Freitas^b, Osmindo Rodrigues Pires Júnior^b, Mariana S. Castro^b, Thiago Henrique Napoleão^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil.*

These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. E-mail: thiago.napoleao@ufpe.br

Abstract

This work investigated the peptide profile of skin secretion from *Lithobates palmipes* collected at Brazilian Atlantic Forest. In addition, a novel peptide from temporin family was evaluated for antimicrobial and cytotoxic activities. The secretion was submitted to reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and the fractions were screened for antibacterial activity. The fraction 6 was resubmitted to RP-HPLC and the isolated peptide (temporin-PMb) had its primary structure determined. Temporin-PMb and non-amidated temporin-PMb were synthesized, purified and evaluated for antibacterial activity, hemolytic activity and cytotoxicity to keratinocytes and cancer cells. RP-HPLC resulted in the separation of several peaks, among which and 10 showed antibacterial activity and contained peptides of the ranatuerin, brevinin and temporin families. Temporin-PMb was active against *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* as well as against methicilin-resistant *S. aureus* (MRSA) and *Acinetobacter baumannii*. It was cytotoxicity to human cervical adenocarcinoma cells (HeLa) and human mammary adenocarcinoma cells (MCF7) with IC₅₀ of 32.4 and 24.1 μM, respectively. It was also toxic to human keratinocytes (HaCaT; IC₅₀ of 25.0 μM) and showed hemolytic activity. The non-amidated form showed low hemolytic activity and lower HaCaT toxicity, but was only against *E. coli*, *S. aureus* MRSA, and *A. baumannii*. In conclusion, *L. palmipes* skin secretion from Atlantic Forest contains different bioactive peptides, including a novel temporin with antibacterial effect cytotoxicity towards human cancer cells. The amide group is responsible for the activities of the wild-type temporin-PMb. Peptide engineering studies are encouraged aimed at minimizing unwanted effects.

Keywords: antimicrobial peptide; cancer cells; amidation; anuran secretions.

1. Introduction

Amphibians have been increasingly studied regarding the biomedical and biotechnological applications of molecules found in their skin secretions [1]. Because they have a varied chemical composition, the secretions of cutaneous glands from anuran amphibians display diverse bioactivities, such as cytotoxic, cardiotoxic, neurotoxic, myotoxic, anesthetic, healing, hemolytic, hallucinogenic, immunosuppressive, and spermicidal effects [2, 3]. Furthermore, the presence of molecules capable of inhibiting the growth of bacteria and fungi [4–7] has been reported, in addition to potential candidates for cancer treatment [8–10].

The increasing threat of bacterial resistance has driven studies focusing on the search for new compounds with antimicrobial activities. Among the antimicrobial peptides (AMPs) present in skin secretions from amphibians, it can be highlighted the families of esculentins, brevinins, ranatuerins, ranacyclines, temporins, bombinins and dybowskins [11]. The composition of amphibian skin secretions varies depending on climatic conditions, physiological adaptations [12], diet [13], and anthropogenic pressure [14], both inter and intraspecies [15]. Skin secretions from anurans belonging to the Ranidae family, which currently includes 455 known species [16], have been studied as a source of AMPs [17–20] and proteins [21]. Peptidomic analyzes showed the potential of ranids skin secretions as source of anti-infectious, anti-inflammatory and anti-diabetic agents [19].

The Amazon River frog *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) is a Ranidae species mainly associated with tropical humid lowland forests, being widely distributed in the Amazon, but also disjunctly occurring in the Brazilian Northeast at the Atlantic Forest. Studies on skin secretions of *Lithobates* species described their pharmacological uses [18, 22] as well as their importance for the cladistics of the species [23]. A study using norepinephrine-stimulated skin secretions from *L. palmipes* collected in Trinidad identified four peptides of the ranatuerin-2 family, four peptides belonging to the brevinin-1 family, and a temporin-PMa [24].

In view of the biomedical potential of compounds from skin secretions of ranids, and the reported influence of environmental conditions on chemical composition, this work investigated the peptide profile of skin secretion from *L. palmipes* individuals from Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Brazil), with emphasis on the evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of a novel peptide from temporin family.

2. Materials and methods

2.1 Extraction of skin secretion

Specimens of *L. palmipes* were collected through active nocturnal searches in the municipality of Gravatá, state of Pernambuco, Brazil. Taxonomic confirmation was achieved according to Haddad et al. [25]. Skin secretion from 30 males, with body weight between 40 and 80 g and measuring between 65 and 100 mm from snout to vent, were extracted at the collection site. For this, the skin was washed with Milli-Q water and the secretion was collected after electrical stimulation at 12 V for 8 s [26]. Next, the animals were kept under observation for 2 h, to verify their physical and motor integrity, and then released at the place of origin. The pool of the collected secretions was called SLPaF (secretion of *L. palmipes* from Atlantic Forest), lyophilized, and stored at -20 °C in aliquots of 20 mg. Animal collection was licensed by the Brazilian Ministry of Environment (SISBIO/ICMBio register no. 63494) and this research was entered (no. A177772) in the *Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado* (SisGen). The method for secretion collection was approved (protocol no. 0089/2023) by the Ethics Committee on Use of Animals of the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE).

2.2 Chromatographic fractionation of SLpAF

An aliquot (20 mg) of SLpAF was solubilized in 1 mL of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in water, homogenized, and centrifuged for 10 min at 12,000 rpm. The supernatant (200 μ L) was injected onto a reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) on a C18 analytical Shim-pack CLC-ODS column (150 mm \times 6.0 mm, 5 μ m (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) at a flow rate of 1 mL/min. The column was pre-equilibrated with water/0.1% (v/v) TFA (solvent A) for 20 min and then a linear gradient of 0–55% acetonitrile/0.1% TFA (solution B) was applied for 55 min and 55–100% of B for 5 min and 100% of B for 5 min. Absorbance was monitored at 216 nm and fractions were manually collected, dried in a vacuum concentrator and stored at -20°C .

2.3 Antimicrobial activity assessment of the fractions

The fractions from SLpAF chromatographic separation were screened for growth inhibitory effect on the standard strains of the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) and the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* (ATCC 25922). The bacteria were grown in Mueller Hinton (MH) medium under shaking at 37°C until the culture reached an optical density at 620 nm (OD_{620}) of 0.08–0.1. Then, the cultures were diluted 1:10 in MH. Finally, a further dilution (1:20) was performed to prepare the inoculum at 5×10^5 cells/mL. To assess the antimicrobial effect, each fraction was dissolved in Milli-Q water and 50 μ L were transferred to a flat-bottom 96- microplate well and then 50 μ L of the bacterial inoculum was added. After 24 h at 37°C , the OD_{620} was measured using a Multiskan FC plate reader (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Controls for no growth and full growth (100%) were, respectively, 0.8% (v/v) formaldehyde and Milli Q water, both incubated with the bacterial suspensions.

2.4 Mass spectrometry analysis

The fractions from SLpAF with antibacterial activity at 216 nm were subjected to matrix assisted laser desorption ionization – time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in a Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) instrument. The fractions were resuspended in 50% (v/v) acetonitrile containing 0.12% (v/v) TFA and 1 μ L of each chromatographic fraction was applied to a stainless-steel plate together with 1 μ L of α -cyano- 4-hydroxycinnamic acid matrix (20 μ g/ μ L in 50% (v/v) acetonitrile containing 0.1% (v/v) TFA). The procedure was carried out in positive reflected mode, analyzing a m/z range of 500–5000 Da. The Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics) standard was used.

2.5 Determination of primary structure and computational analysis

Fraction 6 was rechromatographed onto the RP-HPLC C18 Shim-pack CLC-ODS column (150 mm \times 6.0 mm, 5 μ m) column at the same conditions described above. Primary structure of the isolated peptide (called temporin-PMb) was determined by Edman degradation on a PPSQ-31A/33A automatic sequencer (Shimadzu), according to the manufacturer's instructions. The BLAST algorithm (<https://www.uniprot.org/blast>) and the APD3 database (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) were used for similarity searches in databases [27, 28]. The ExPASy pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/) was used to calculate the theoretical monoisotopic mass of the peptide [29]. Clustal Omega (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) was used for the alignment of multiple sequences [30] and

EMBOSS Needle Pairwise Sequence Alignment was used and for the alignment of just two sequences [31].

2.6 Synthesis of temporin-PMb and non-amidated temporin-PMb

Peptides were synthesized by the solid phase synthesis method and purified as described by Chan and White [32] and Silva et al. [33]. The Rink Amide resin and the Oxyma/DIC synthesis technique were used to produce temporin-PMb (FLPFLGKLFSGIF- NH₂), which has a C-terminal amidation. For non-amidated temporin (FLPFLGKLFSGIF- COOH), the Wang resin and the HBTU/DIPEA synthesis technique were used. Both peptides were synthesized at a concentration of 0.15 mmol/L. The qualitative effectiveness of each amino acid coupling step was evaluated using the Kaiser test. For the final step of cleavage, both peptides were individually solubilized for 90 min in a cleavage solution composed of TFA, triisopropylsilane (TIS) and H₂O in a ratio of 95:2.5:2.5 (v/v), and then evaporated with argon [32]. The synthetic amidated peptide was purified by RP-HPLC in two steps: first, the sample was chromatographed using a semi-preparative column Vydac 218TP510 (250 mm × 10 mm, 5 μm; Grace, Deerfield, IL, USA) at a flow rate of 3 mL/min and then was purified in an analytical Phenomenex Kinetex 100 Å PFP column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm; Phenomenex, Torrance, California, USA) at a flow rate of 1 mL/min. The acidic (non-amidated) form was purified on a C18 Shim-pack CLC-ODS column (150 mm × 6.0 mm, 5 μm (Shimadzu, Kyoto, Japan) at a flow rate of 1 mL/min. The wavelength was monitored at 216 nm and samples were manually collected, dried in a vacuum concentrator and stored at -20 °C, and the molecular masses were determined by MALDI-TOF mass spectrometry.

2.7. Peptides quantification

The peptides were quantified spectrophotometrically at 205, 215 and 225 nm according to Aitken and Learmonth [34]. Then, 1 mL aliquots at 256 μM were made, vacuum concentrated and frozen at -20°C until use.

2.8 Antimicrobial activity of temporins

Temporin-PMb or non-amidated temporin-PMb (concentrations ranging from 1 to 128 μM) were evaluated for antibacterial activity against standard strains of Gram-positive *S. aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) and a methicillin-resistant strain of *S. aureus* (MRSA) as well as standard strains of Gram-negative *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and resistant strains of *Acinetobacter baumannii* (multi-drug resistant, MDR), *K. pneumoniae* (KPC carbapenemase producer), and *P. aeruginosa* (MDR). The assays were performed as described in section 2.3.

2.9 Hemolytic activity assay

The hemolytic activity of temporin-PMb or non-amidated temporin-PMb was assessed by determining the release of hemoglobin from suspensions of human red blood cells collection from a healthy donor as approved (protocol no. 45/2010) by the Human Ethics Committee of the *Universidade de Brasília*. The erythrocytes were washed three times using a Tris-saline buffer (0.01 M Tris-HCl, pH 7.4, containing 0.15 M NaCl) and a 1% (v/v) suspension was prepared in the same buffer. Aliquots of 100 μL were added to 100 μL of temporin (0.25–64.0 μM) and the assays were incubated for 1 h at 25 °C. After centrifugation

at $400 \times g$ for 5 min, the absorbance (Abs) at 405 nm was read in the Multiskan FC microplate reader. Tris-saline buffer and 1% (v/v) Triton X-100 were used as negative (NC) and positive (PC) controls, respectively. Assays were performed in triplicate. Hemolytic activity was calculated using the following formula: Hemolysis (%) = $100 \times (\text{Abs}_{\text{temporin}} - \text{Abs}_{\text{NC}}) / (\text{Abs}_{\text{PC}} - \text{Abs}_{\text{NC}})$.

2.10 Cytotoxicity evaluation

Human keratinocytes (HaCaT), human cervical adenocarcinoma cells (HeLa; ATCC CCL-2), and human mammary adenocarcinoma cells (MCF7; ATCC HTB-22) were cultured at 37 °C and 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 10% (v/v) fetal bovine serum (Invitrogen, Waltham, MA, USA). In 96-well microplates, the cells (8×10^3 /well) were cultured overnight in DMEM complete medium. Then, 50 µL of temporin-PMb (1–128 µM) or Milli-Q water (negative control) were added. After 24 h, cell viability was determined by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay [35]. Briefly, 15 µL of 5 mg/mL MTT (Invitrogen) in PBS was added to each well. After 3 h of incubation at 37 °C in 5% CO₂, the culture medium was aspirated and 100 µL of dimethyl sulfoxide was added. Absorbance at 595 nm was read in the Multiskan FC microplate reader. Non-amidated temporin-PMb was also assessed for cytotoxicity on HaCaT cells.

2.11. Statistical analysis

The data are presented as mean \pm standard deviation. Significant differences were checked using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test using GraphPad Prism version 5.04 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A $p < 0.05$ was considered as the level of significance.

3. Results and discussion

As important sources of AMPs, amphibian skin secretions are studied as therapeutic alternatives against pathogenic bacteria [7, 36]. Frogs from the Ranidae family are known as a valuable source of AMPs with therapeutic potential. Skin secretion molecules from *Lithobates* genus have been studied, but data on *L. palmipes* are scarce [24] and do not approach individuals collected in the Brazilian Atlantic Forest.

The RP-HPLC profile of SLpAF on Vydac 218TP54 column resulted in the separation of several peaks (Figure 1). Among the collected fractions, 10 showed antibacterial activity in the initial screening and are identified in the Figure 1. The fraction 1 showed inhibitory activity only against *S. aureus* ATCC 25923, while fractions 2 to 10 inhibited the growth of *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, and *E. faecalis* ATCC 29212 (Figure 2). For *S. aureus*, inhibition higher than 93% was observed for all the ten fractions, highlighting fractions 2, 3, 4 and 5 that caused total inhibition (Figure 2A). Inhibition greater than 80% against *E. coli* was observed for all fractions and, again, fractions 2, 3, 4 and 5 inhibited the growth in 100% (Figure 2B). For *E. faecalis*, the fractions inhibited the growth between 40% and 99.5%, with the greatest activity for fractions 3 and 4 (Figure 2C).

From the molecular mass data, it was possible to categorize some peptides from SLpAF as belonging to the ranatuerin and brevinin families. When comparing our data with the molecular masses of AMPs detected in *L. palmipes* from Trinidad [24], it was observed that fraction 2 contains a peptide with mass (2933.2 Da) close to ranatuerin-2PMa and

ranatuerin-2PMb; the peptide in fraction 3 presented a mass (2916.1 Da) near to those of ranatuerin-2PMc and ranatuerin-2PMd; fraction 4 corresponds to a peptide (2609.6.1 Da) equivalent to brevenin-1PM; fraction 6 presented a mass peak (2559.3 Da) close to that of temporin-PMa; and fractions 7, 8 and 9 have components with molecular masses of 2527.3, 2594.9, and 2604.0 Da, near to those of brevenins 1PMa, 1PMb, and 1PMc. Finally, the fraction 10 presented two components with 2604 and 4163 Da, with the first peak having a mass close to brevenin-1PMc. These results show that, despite the geographic distance, several peptide classes are present in the secretions of *L. palmipes* from both Trinidad and Pernambuco. Coelho et al. [37] sequenced two fragments of mitochondrial DNA from *L. palmipes* collected in Atlantic Forest (AtF) and Amazonia (AmF) and found that both groups are nested without signals of demographic change and evidence of niche divergence. All the peptides mentioned above will be target of future studies to determine their primary sequences. In the present work, we focused on the temporin found in the fraction 6.

The temporin from SLpAF was purified by rechromatography of the fraction on the reverse-phase column (Figure 3A) and the peptide sequence showed thirteen amino acid residues (FLPFLGKLFSGIF_{NH₂}), with similarities with other sequences present in the database (Figure 4A) and identity values ranging from 58.3 to 73.0%. The highest identity value was found for temporins MT3 from *Amolops mantzorum* (David, 1872) as well as temporins ALa, ALd and ALh from *Amolops loloensis* (Liu, 1950). It was also detected 73% identity with pelophylaxin-4 from *Pelophylax fukienensis* (Pope, 1929). Comparison with temporin-PMa from *L. palmipes* collected in Trinidad [24] revealed a high identity of 92.3% (Figure 4B), with a single difference in position 9 (phenylalanine in temporin from SLpAF and leucine in temporin-PMa). The peptide from SLpAF was then named temporin-PMb since it did not correspond exactly to any peptide already described. Temporin-PMb showed a hydrophobic ratio of 62%, GRAVY index of 1.53, and a liquid charge of +2.

To perform the bioactivity assays, temporin-PMb was synthesized and purified as shown in Figure 3B. The mass spectrum indicated a molecular mass of 1484.8 Da, identical to the peptide purified from the skin secretion. The antibacterial assay revealed that temporin-PMb was active against the non-resistant strains of *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* as well as against *S. aureus* MRSA and *A. baumannii* (Table 1). It was not active on *K. pneumoniae* KPC carbapenemase producer and *P. aeruginosa* MDR.

AMPs are extremely important components of the innate immune system and their direct interaction with bacterial cell membranes become difficult the resistance development by bacteria [38], which reinforces their potential and alternative candidates for antibiotics [39]. In addition to the damage caused to bacterial plasma membrane, they can also interfere with intracellular processes, such as transcription, translation, protein synthesis and formation of the bacterial cell wall [40].

Temporins constitute a large family of antimicrobial peptides usually with short sequences, making them easier to study and isolate [41]. They have shown notable antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, but usually low or no activity against Gram-negative bacteria [39, 42]. However, Mangoni et al. [43] highlighted that, although most temporins are specifically active against Gram-positive bacteria, the temporin L showed a remarkable action against Gram-negative bacteria and yeasts. Interestingly, temporin-PMb was also active on both Gram-positive and Gram-negative species.

Temporin-PMb showed cytotoxicity to HeLa and MCF7 cells, presenting IC₅₀ of 32.4 and 24.1 μM, respectively (Figure 5A and 5B). However, it was also cytotoxic to HaCaT cells, presenting IC₅₀ of 25.0 μM (Figure 5C) and showed a high hemolytic activity at concentrations above 64 μM (Figure 6A).

Aiming to evaluate whether the presence of amidation has substantial impact on the activities of temporin-PMb, a non-amidated (acidic) form of temporin-PMb was synthesized

and purified (Figure 3C). The non-amidated temporin-PMb showed a molecular mass of 1485.9 Da and was evaluated for antibacterial activity, hemolytic activity and cytotoxicity to HaCaT.

Non-amidated temporin-PMb showed a low hemolytic activity (Figure 6B) and was less toxic to HaCaT cells (Figure 5D) than temporin-PMb. However, this reduction in toxicity to non-target cells was accompanied by a decrease in the antibacterial effect. The non-amidated peptide was active only against *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* MRSA, and *A. baumannii* (Table 1). Despite the 4-fold increase of the MIC against this last bacterium, it is still interesting that non-amidated form did not lose completely the effect, since *A. baumannii* is one of the most threats to human health nowadays, being a nosocomial pathogen that often displays multidrug resistance [44]. Thus, future studies can evaluate, for example, sub-inhibitory and non-toxic concentrations of temporin-PMb as well as the non-amidated form as synergic agents together with currently used antibiotics or other candidates for antimicrobial drugs.

As seen, the amidated temporin-PMb is more active than its acidic form in all assays. C-terminal amidation is one of the most commonly found posttranslational modifications in amphibian antimicrobial peptides [45] and its presence has been related to increased biological activity, such as antimicrobial and hemolytic. Silva et al. [46] showed that the acidic protonectarin-MP analogue is considerably less active in the degranulation and lysis of mast cells, as well as regarding its hemolytic and antimicrobial activity. In the same direction, was observed that amidated dermaseptin s3 showed a superior antimicrobial activity than its non-amidated analogue [47]. Strandberg et al. [48], investigating the influence of C-terminal amidation on the antimicrobial and hemolytic activity of cationic peptides, observed that the PGLa and MAP peptides also had a decrease in antimicrobial and hemolytic activity when compared to their original amidated sequence; conversely, the MSI-103 peptide did not show a decrease in activity in its acidic form.

Previous research has shown that C-terminal amidation favors the stabilization of the α -helix of peptides [46, 49, 50]. Amidation also results in increased positive charge, and this has also been linked to increased biological activity of these peptides [51]. On the other hand, Shahmiri and Mechler [52] investigated the role of modifications at the C-terminus of the aurein 1.2 peptide and found that the modification with a secondary amide formed by a methyl group significantly reduced its ability to bind the membrane when compared to the wild-type form, indicating that, for this peptide, the net charge does not influence its activity, while the primary amide is crucial for this.

4. Conclusion

The skin secretion of *L. palmipes* collected in the Atlantic Forest contains different bioactive peptides with antibacterial action belonging to the families of ranatuerins, brevinins and temporins. A novel temporin, called temporin-PMb, was isolated and showed activity against non-resistant and antibiotic-resistant bacteria, as well as cytotoxicity towards human cancer cells. However, this temporin proved to be toxic to non-transformed cells and erythrocytes, which stimulates peptide engineering studies aimed at minimizing unwanted effects. Deamidation-type modification was tested but, despite reducing toxicity, it also led to a decrease in biological activity indicating that the amide group is important for the activity of the wild-type temporin-PMb peptide.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for financial support (407192/2018-2). We are also grateful to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES; Finance Code 001), the *Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal* (FAPDF: Processo no. 00193.00000930/2021-40) and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE: APQ-0108-2.08/14; APQ-1491-2.08/22) for financial support. GGB would like to thank FACEPE for the graduate scholarship (IBPG-1102-2.08/18).

Declaration of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- [1] S. Indriani, S. Karnjanapratum, N.P. Nirmal, S. Nalinanon, Amphibian skin and skin secretion: an exotic source of bioactive peptides and its application, *Foods* 12 (2023) 1282. <https://doi.org/10.3390/foods12061282>
- [2] R.C. Toledo, C. Jared, Cutaneous granular glands and amphibian venoms, *Comp. Biochem. Physiol. A* 111 (1995) 1-29. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)98515-I](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)98515-I)
- [3] L. Kröner, S. Lötters, M.T. Hopp, Insights into caudate amphibian skin secretions with a focus on the chemistry and bioactivity of derived peptides, *Biol. Chem.* (2024). <https://doi.org/10.1515/hsz-2024-0035>
- [5] C. Rodriguez, R. Ibáñez, L.A. Rollins-Smith, M. Gutiérrez, M., A.A. Durant-Archibold, Antimicrobial secretions of toads (Anura, Bufonidae): Bioactive extracts and isolated compounds against human pathogens. *Antibiotics* 9 (2020) 843. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120843>
- [5] L.A. Rollins-Smith, L.K. Reinert, V. Miera, J.M. Conlon, Antimicrobial peptide defenses of the Tarahumara frog, *Rana tarahumarae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297 (2002) 361-367. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)02217-9](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02217-9)
- [6] G.G. Barbosa, T.L. Silva, A.P.S. Oliveira, T.A. Lima, P.M. Silva, C.J.C. Santana, J.R.C. Vieira, D.R. Sousa, F.A.L. Souza, R. Pereira, R.B. Zingali, R.M.P.B. Costa, P.M.G. Paiva, G.G. Rodrigues, M.S. Castro, T.H. Napoleão, Cutaneous glands of the striped toad, *Rhinella crucifer* (Wied-Neuwied, 1821) (Amphibia: Bufonidae): Histological study and bioactivities of glandular secretions, *Comp. Biochem. Physiol. B* 273 (2024) 110983. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2024.110983>
- [7] T.L. Silva, G.G. Barbosa, C.J.C. Santana, P.M.G. Paiva, M.S. Castro, T.H. Napoleão, First Report of Ocellatin-VT from the Skin Secretion of *Leptodactylus vastus* Lutz (Amphibia: Leptodactylidae), *Chemistry* 6 (2024) 333-344. <https://doi.org/10.3390/chemistry6020019>
- [8] J.M. Sciani, P.L.S. Júnior, A.K. Ferreira, A. Pereira, M.M. Antoniazzi, C. Jared, D.C. Pimenta, Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells, *Biomed. Prev. Nutr.* 3 (2013) 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2012.11.001>
- [9] G. Schmeda-Hirschmann, C. Quispe, C. Theoduloz, P.T. Sousa Jr., C. Parizotto, Antiproliferative activity and new argininyl bufadienolide esters from the “cururu” toad *Rhinella* (*Bufo*) *schneideri*, *J. Ethnopharmacol.* 155 (2014) 1076-1085. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.06.025>
- [10] A.F.D. Oliveira, L. Castoldi, G.M. Vieira Junior, E.D.S. Monção Filho, M.H. Chaves, D.D.J. Rodrigues, M.M. Suguí, Avaliação da atividade antimutagênica e citotóxica da secreção cutânea de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* (Anura, Bufonidae), *Acta Amazon.* 49 (2019) 145-151. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201801751>

- [11] X. Chen, S. Liu, J. Fang, S. Zheng, Z. Wang, Y. Jiao, P. Xia, H. Wu, Z. Ma, L. Hao, Peptides isolated from amphibian skin secretions with emphasis on antimicrobial peptides, *Toxins* 14 (2022) 722. <https://doi.org/10.3390/toxins14100722>
- [12] B. Titon Jr., F.R. Gomes, Associations of water balance and thermal sensitivity of toads with macroclimatic characteristics of geographical distribution, *Comp. Biochem. Physiol. A* 208 (2017) 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.012>
- [13] N.A. Moskowicz, B. Dorritie, T. Fay, O.C. Nieves, C. Vidoudez, Cambridge Rindge Latin 2017 Biology Class, Masconomet 2017 Biotechnology Class, E.K. Fischer, S.A. Trauger, L.A. Coloma, D.A. Donoso, L.A. O'Connel, Land use impacts poison frog chemical defenses through changes in leaf litter ant communities, *Neotrop. Biodiv.*, 6 (2017) 75-87. <https://doi.org/10.1080/23766808.2020.1744957>
- [14] D. Ong, M.N. Ismail, S. Shahrudin, Comparative Proteomics Analysis of *Hylarana erythraea* (Schlegel, 1837) (Anura: Ranidae) Skin Secretion from Disturbed and Undisturbed Habitats, *Res. Square* (2022) 1-23. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2240502/v1>
- [15] R.A. Hayes, M.R. Crossland, M. Hagman, R.J. Capon, R. Shine, Ontogenetic variation in the chemical defenses of cane toads (*Bufo marinus*): toxin profiles and effects on predators, *J. Chem. Ecol.* 35 (2009) 391-99. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9608-6>
- [16] D.R. Frost, *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 6.1. American Museum of Natural History, New York, USA. 2021. Available at: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.
- [17] J.M. Conlon, L. Coquet, J. Leprince, T. Jouenne, H. Vaudry, J. Kolodziejek, N. Nowotny, C.R. Bevier, P.E. Moler, Peptidomic analysis of skin secretions from *Rana heckscheri* and *Rana okaloosae* provides insight into phylogenetic relationships among frogs of the *Aquarana* species group, *Regul. Pept.* 138 (2007) 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2006.08.007>
- [18] J.M. Conlon, Reflections on a systematic nomenclature for antimicrobial peptides from the skins of frogs of the family Ranidae. *Peptides* 29 (2008) 1815–1819. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.05.029>
- [19] J.M. Conlon, M. Mechkarska, J. Leprince, Peptidomic analysis in the discovery of therapeutically valuable peptides in amphibian skin secretions, *Exp. Rev. Proteom.* 11-12 (2019) 897-908. <https://doi.org/10.1080/14789450.2019.1693894>
- [20] F. Alamsjah, D.H. Tjong, Z.F. Rahma, Antimicrobial Activity of Skin Secretion of *Rana hosii* Frog (Anura: Ranidae) against several pathogenic microbes, *Jurnal Biologi UNAND* 8 (2020) 48-53. <https://doi.org/10.25077/jbioua.8.2.48-53.2020>
- [21] A. Leal, E. Karnopp, Y.C. Barreto, R.S. Oliveira, M.E. Rosa, B.T. Borges et al. The insecticidal activity of *Rhinella schneideri* (Werner, 1894) paratoid secretion in *Nauphoeta cinerea* cocoroaches. *Toxins* 12 (2020) 630. <https://doi.org/10.3390/toxins12100630>
- [22] J.M. Conlon, M. Mechkarska, L. Coquet, T. Jouenne, J. Leprince, H. Vaudry, J. Kolodziejek, N. Nowotny, Characterization of antimicrobial peptides in skin secretions from discrete populations of *Lithobates chiricahuensis* (Ranidae) from central and southern Arizona. *Peptides* 32 (2011) 664-669. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.018>
- [23] J.M. Conlon, M. Mechkarska, J. Kolodziejek, N. Nowotny, L. Coquet, J. Leprince, T. Jouenne, H. Vaudry, Host-defense peptides from skin secretions of Fraser's clawed frog *Xenopus fraseri* (Pipidae): Further insight into the evolutionary history of the Xenopodinae. *Comp. Biochem. Physiol. D* 12 (2014) 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2014.10.001>
- [24] M. Mechkarska, G. Barran, J. Kolodziejek, L. Coquet, J. Leprince, T. Jouenne, N. Nowotny, J.M. Conlon, Peptidomic analysis of the host-defense peptides in skin secretions of the Amazon River frog *Lithobates palmipes* (Ranidae), *Comp. Biochem. Physiol. D* 46 (2023) 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2023.101069>

- [25] C.F. Haddad, L.F. Toledo, C.P. Prado, D. Loebmann, J.L. Gasparini, I. Sazima, Guia dos anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia, Anolis Books, 2013.
- [26] J.B. Grant, B. Land, Transcutaneous Amphibian Stimulator (TAS): a device for the collection of amphibian skin secretions, *Herpetol. Rev.*, 33 (2022) 38-41.
- [27] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- [28] G. Wang, The antimicrobial peptide database is 20 years old: Recent developments and future directions, *Protein Sci.* 32 (2023) e4778. <https://doi.org/10.1002/pro.4778>
- [29] B. Bjellqvist, G.J. Hughes, C. Pasquali, N. Paquet, F. Ravier, J.C. Sanchez, S. Frutiger, D. Hochstrasser, The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences, *Electrophoresis*, 14 (1993) 1023-31. <https://doi.org/10.1002/elps.11501401163>
- [30] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J.D. Thompson, D.G. Higgins, Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst. Biol.* 7 (2011) 539.
- [31] P.M. Rice, A.J. Bleasby, J.C. Ison, *EMBOSS User's Guide: Practical Bioinformatics with EMBOSS*, Cambridge University Press, 2011.
- [32] W. Chan, P. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, 1999.
- [33] L.P. Silva, J.R. Leite, G.D. Brand, W. Regis, A. Tedesco, R.B. Azevedo, S.M. Freitas, C. Bloch, Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: liposomes fusion and/or lysis investigated by fluorescence and atomic force microscopy. *Comp. Biochem. Physiol. A* 151 (2008) 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.02.031>
- [34] A. Aitken, M. Learmonth, Protein Determination by UV Absorption, in: J.M. Walker (Ed.), *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press, Totowa, 1996, pp. 3-6.
- [35] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 16 (1983) 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- [36] C.J.C. Santana, A.C.M. Magalhães, A.C.S. Júnior, C.A.O. Ricart, B.D. Lima, A.D.C.M. Álvares, M.S. Castro, Figainin 1, a novel amphibian skin peptide with antimicrobial and antiproliferative properties, *Antibiotics* 9 (2020) 625. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090625>
- [37] F.E.A. Coelho, F. Camurugi, R. Marques, F.M. Magalhães, F.P. Werneck, A.A. Garda, Historical connections between Atlantic Forest and Amazonia drove genetic and ecological diversity in *Lithobates palmipes* (Anura, Ranidae), *System. Biodiv.* 20 (2022) 1-19.
- [38] J.M. Sierra, E. Fusté, F. Rabanal, T. Vinuesa, M. Viñas, An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development, *Expert Opin. Biol. Ther.* 17 (2017) 663–676. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1315402>.
- [39] Z. Ye, X. Zhou, X. Xi, Y. Zai, M. Zhou, X. Chen, H.F. Kwok, In vitro & in vivo studies on identifying and designing temporin-1CEh from the skin secretion of *Rana chensinensis* as the optimised antibacterial prototype drug, *Pharmaceutics* 14 (2022) 604. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030604>
- [40] J. Mwangi, X. Hao, R. Lai, Z.Y. Zhang, Antimicrobial peptides: New hope in the war against multidrug resistance, *Zool. Res.* 40 (2019) 488–505. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2019.062>
- [41] E. Buommino, A. Carotenuto, I. Antignano, R. Bellavita, B. Casciaro, M.R. Loffredo, F. Merlino, E. Novellino, M.L. Mangoni, F.P. Nocera et al. The Outcomes of Decorated Prolines

- in the Discovery of Antimicrobial Peptides from Temporin-L, *Chem. Med. Chem.* 14 (2019) 1283–1290. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900221>
- [42] Y. Zai, X. Xi, Z. Ye, C. Ma, M. Zhou, X. Chen, L. Wang, H.F. Kwok, Aggregation and its influence on the bioactivities of a novel antimicrobial peptide, temporin-PF, and its analogues, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 4509. <https://doi.org/10.3390/ijms22094509>
- [43] M.L. Mangoni, A.C. Rinaldi, A. Di Giulio, G. Mignogna, A. Bozzi, D. Barra, M. Simmaco, Structure-function relationships of temporins, small antimicrobial peptides from amphibian skin. *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 1447–1454. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01143.x>
- [44] G. Liu, D.B. Catacutan, K. Rathod, K. Swanson, W. Jin, J.C. Mohammed, A. Chiappino-Pepe, S.A. Syed, M. Fragis, K. Rachwalski, J. Magolan, M.G. Surette, B.K. Coombes, T. Jaakkola, R. Barzilay, J.J. Collins, J.M. Stokes, Deep learning-guided discovery of an antibiotic targeting *Acinetobacter baumannii*, *Nat Chem Biol.* 19 (2023) 1342-1350. <https://doi.org/10.1038/s41589-023-01349-8>
- [45] X. Xu, R. Lai, The Chemistry and Biological Activities of Peptides from Amphibian Skin Secretions, *Chem. Rev.* 115 (2015) 1760-1846. <https://doi.org/10.1021/cr4006704>
- [46] A.V.R. Silva, B.M. Souza, M.P.S. Cabrera, N.B. Dias, P.C. Gomes, J.R. Neto, R.G. Stabeli, M.S. Palma, The effects of the C-terminal amidation of mastoparans on their biological actions and interactions with membrane-mimetic systems, *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes* 1838 (2014) 2357-2368. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.06.012>
- [47] A. Mor, K. Hani, P. Nicolas, The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 31635-31641. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)31742-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)31742-3)
- [48] E. Strandberg, D. Tiltak, M. Ieronimo, N. Kanithasen, P. Wadhvani, A.S. Ulrich, Influence of C-terminal amidation on the antimicrobial and hemolytic activities of cationic α -helical peptides, *Pure Appl. Chem.* 79 (2007) 717-728. <https://doi.org/10.1351/pac200779040717>
- [49] R. Fairman, K.R. Shoemaker, E.J. York, J.M. Stewart, R.L. Baldwin, Further studies of the helix dipole model: Effects of a free α -NH₃⁺ or α -COO⁻ group on helix stability, *Proteins* 5 (1989) 1-7. <https://doi.org/10.1002/prot.340050102>
- [50] S.R. Dennison, D.A. Phoenix, Influence of C-Terminal Amidation on the Efficacy of Modelin-5. *Biochemistry* 50 (2011) 1514-1523. <https://doi.org/10.1021/bi101687t>
- [51] N. Chen, C. Jiang, Antimicrobial peptides: Structure, mechanism, and modification, *Eur. J. Med. Chem.* 255 (2023) 115377. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115377>
- [52] M. Shahmiri, A. Mechler, The role of C-terminal amidation in the mechanism of action of the antimicrobial peptide aurein 1.2, *EuroBiotech J.* 4 (2020) 25-31, doi:doi:10.2478/ebtj-2020-0004.

Figure captions

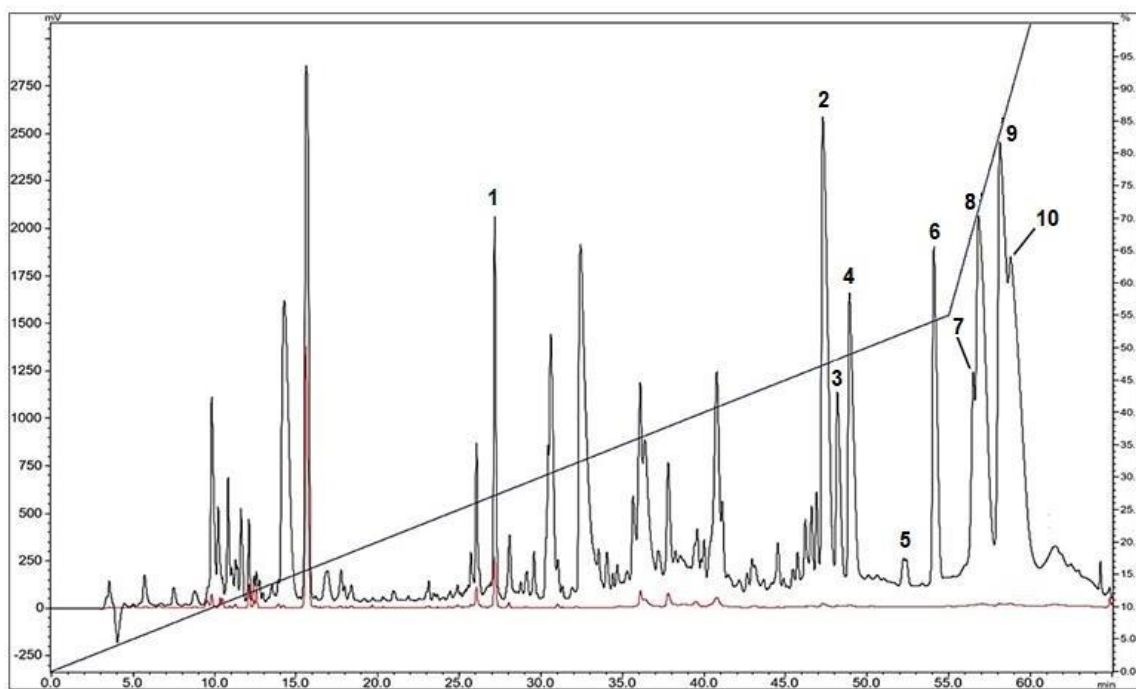


Figure 1. RP-HPLC profile of skin secretion of *Lithobates palmipes* from Atlantic Forest (SLpAF) on a Shim-pack CLC-ODS column. The numbered fractions are those that showed antibacterial activity as shown in Figure 2.

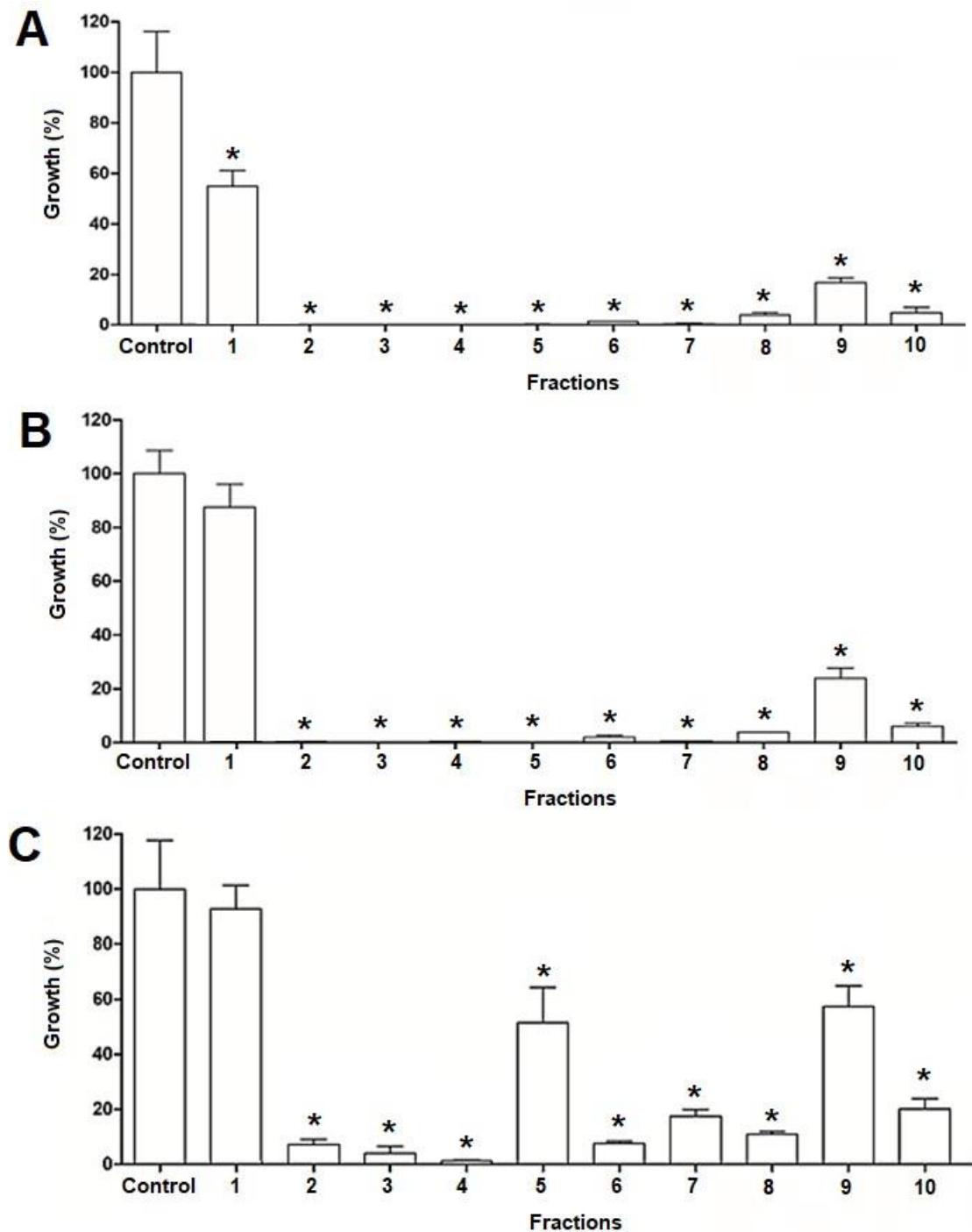


Figure 2. Antibacterial activity screening of the fractions 1 to 10 obtained after RP-HPLC of skin secretion of *Lithobates palmipes* from Atlantic Forest (SLpAF). (A) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. (B) *Escherichia coli* ATCC 25922. (C) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. (*) $p < 0.05$ in comparison with control.

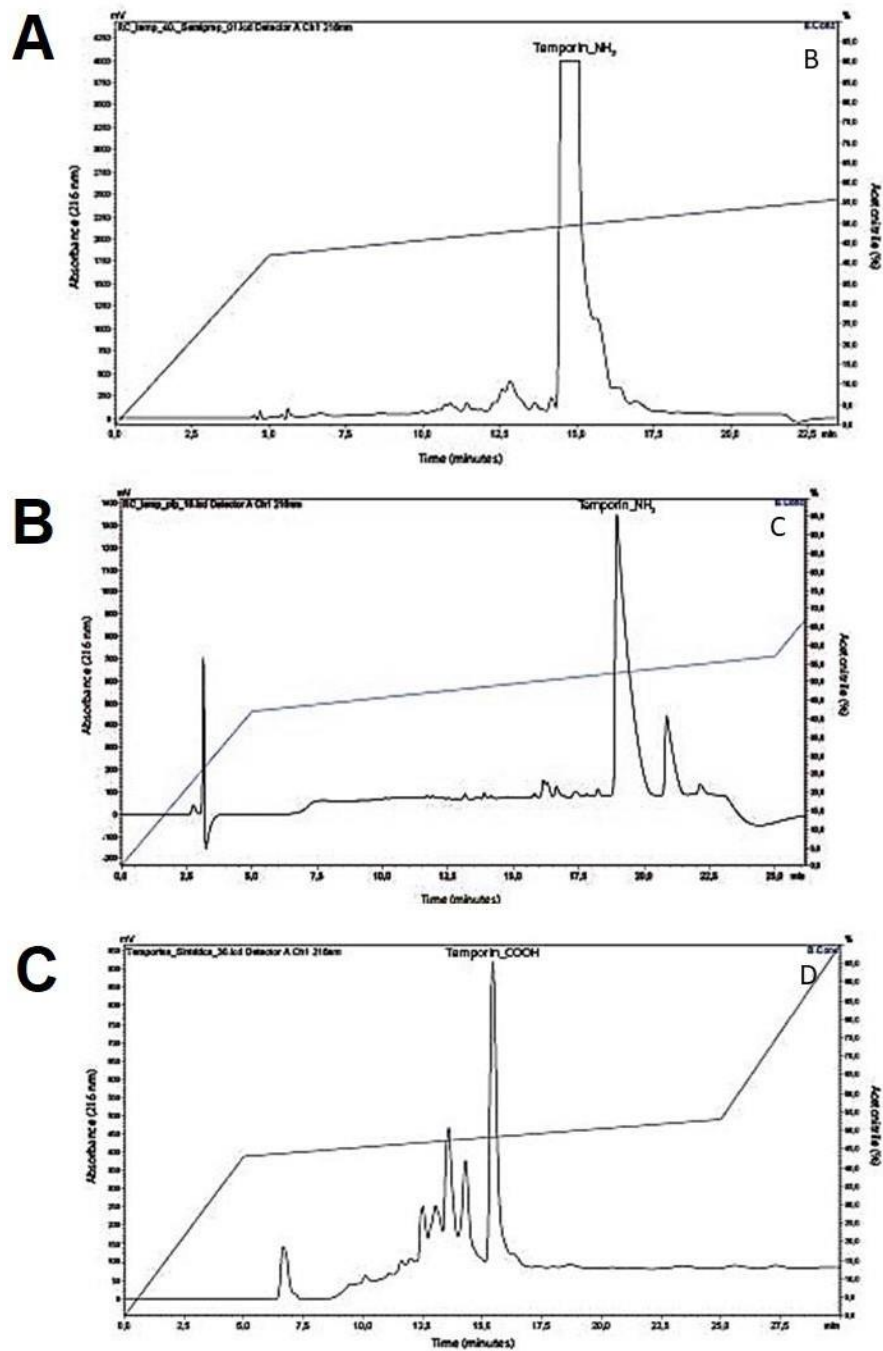


Figure 3. Purification of temporin-PMb. (A) Isolation of temporin-PMb from rechromatography of fraction 6 of skin secretion of *Lithobates palmipes* from Atlantic Forest (SLpAF) on a semi-preparative Vydac 218TP5510 column. (B) Isolation of synthetic temporin-PMb by RP-HPLC on a Phenomenex Luna PFP column. (C) Isolation of non- amidated synthetic temporin-PMb by RP-HPLC on a C18 Shimpack VP-ODS column.

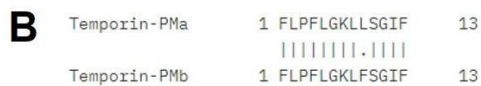


Figure 4. Sequence similarities of temporin-PMb isolated from the skin secretion of *Lithobates palmipes* from Atlantic Forest (SLpAF). (A) Multiple alignment performed in Clustal Omega of temporin-PMb and antimicrobial peptides from the Ranidae family. The asterisk (*) indicates identical residues and a colon (:) indicates conservative substitution. The colors of amino acid residues represent their physicochemical properties: red = nonpolar; green = uncharged polar; pink = basic; blue = acid. (B) Pair alignment performed in EMBOSS Needle Pairwise Sequence Alignment (PSA) of temporin-PMa (from *L. palmipes* collected in Trinidad) and temporin-PMb.

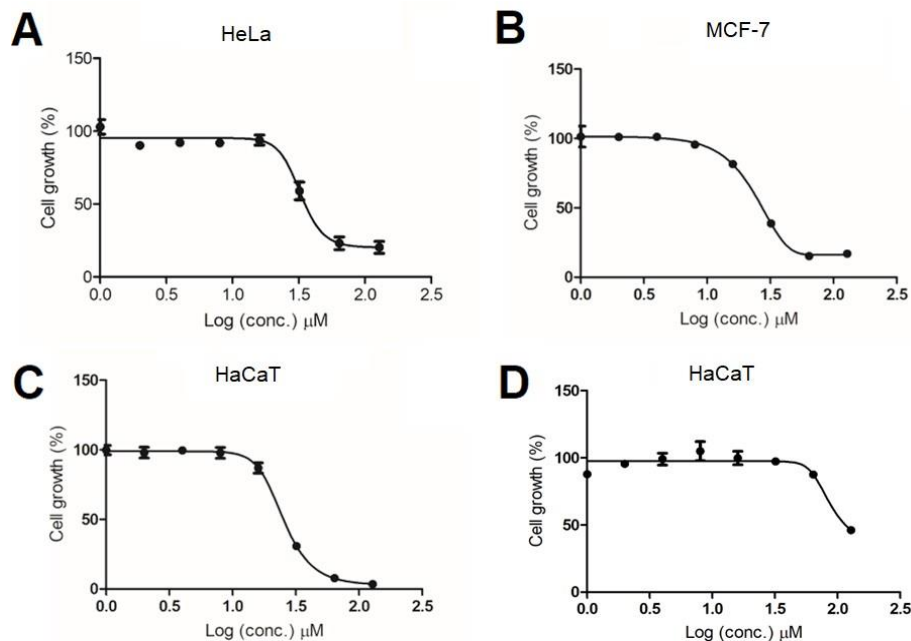


Figure 5. Assessment of the cytotoxicity of temporin-PMb to (A) human cervical adenocarcinoma cells (HeLa) and (B) human mammary adenocarcinoma cells (MCF-7) and temporin-PMb (C) and its non-amidated form (D) for human keratinocytes (HaCaT).

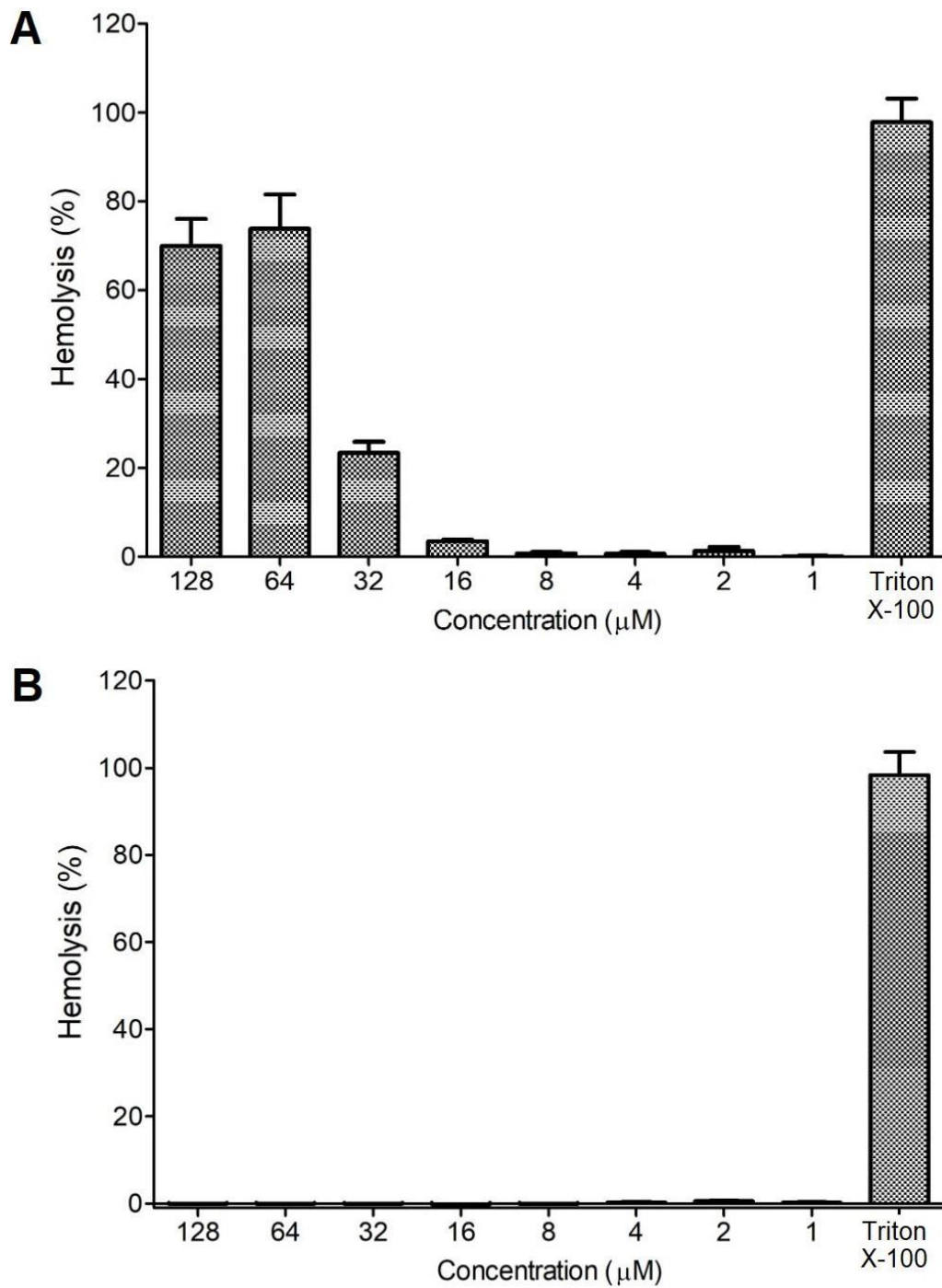


Figure 6. Assessment of the hemolytic activity of temporin-PMb (A) and its non-amidated form (B) in human erythrocytes. Triton X-100 was used as positive control.

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of temporin-PMb and its non-amidated form against pathogenic bacteria.

MDR: multidrug resistant. KPC: *K. pneumoniae* carbapenemase producer. MRSA:

Bacteria	MIC (μM)	
	Temporin-PMb	Non-amidated temporin-PMb
Standard (non-resistant) strains		
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	16	128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	16	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	32	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	8	ND
Resistant strains		
<i>Acinetobacter baumannii</i> (MDR)	8	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KPC)	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDR	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	16	ND

methicillin-resistant *S. aureus*. ND: not detected (MIC > 128 μM).