



**Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
Universidade de Brasília**

**PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DA PELE DE
Physalaemus cicada BOKERMANN, 1966 (ANURA, LEIUPERINAE):
IDENTIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES**

GISLENE FERREIRA BAPTISTA

**BRASÍLIA
2019**



Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
Universidade de Brasília

**PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DA PELE DE
Physalaemus cicada BOKERMANN, 1966 (ANURA, LEIUPERINAE):
IDENTIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestra em Biologia Animal.

Autora: Gislene Ferreira Baptista
Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

**BRASÍLIA
2019**



**Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
Universidade de Brasília**

GISLENE FERREIRA BAPTISTA

**PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DA PELE DE
Physalaemus cicada BOKERMANN, 1966 (ANURA, LEIUPERINAE):
IDENTIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES**

Comissão Examinadora:

**Profa. Dra. Mariana de Souza Castro
Presidente
Departamento de Ciências Fisiológicas/IB
Universidade de Brasília**

**Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves
Membro Titular
Departamento de Farmácia/ FS
Universidade de Brasília**

**Prof. Dr. Samuel Coelho Mandacaru
Membro Titular
Departamento de Biologia Celular/IB
Universidade de Brasília**

DEDICATÓRIA

Dedico a meus filhos Letícia e Felipe, meus companheiros de madrugada, e a meu marido Baruc, pelas noites de sono perdidas e por todo apoio incondicional.

À minha mãe Francisca e meu pai Benedito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade e pela capacitação neste período, por ter sido meu refúgio nos momentos de turbulência e sempre de maneira suave acalmava meu coração.

Ao Sérgio e Karina por ter intermediado e possibilitado meu contato com a Profa. Dra. Mariana S. Castro.

À Profa. Dra. Mariana S. Castro., minha orientadora, por ter me acolhido como sua aluna, mesmo não me conhecendo, e por ter me incentivado nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior, pela sua paciência, amizade, que foram tão preciosas nestes dois anos.

À Profa. Dra. Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima, pelo privilégio de sua amizade.

Aos doutorandos Carlos José Correia Santana, meu querido amigo, que com tanta paciência me acompanhou e Ana Carolina Martins Magalhães, minha querida amiga, pela sua amizade, pelo seu constante incentivo, que me acompanhou em todos os estágios do meu mestrado e foi um grande porto seguro nos dias difíceis.

Ao doutorando Lucas Oliveira, meu querido amigo, que tanto me ensinou e ao Dr. Marcos Rodrigo Alborghetti por todo apoio.

Aos meus amigos Luis Felipe e Diogo, pela disposição em me ajudar mesmo quando estavam extremamente ocupados.

Aos meus filhos Felipe e Letícia, as verdadeiras joias que Deus colocou em minha vida.

Ao meu querido esposo Baruc, que possibilitou minha dedicação total neste período de mestrado.

À Capes pelo apoio financeiro por meio da concessão de bolsa de estudos.

APOIO FINANCEIRO

A dissertação de mestrado intitulada “Peptídeos antimicrobianos da pele de *Physalaemus cicada* Bokermann, 1966 (Anura, Leiuperinae): identificação, purificação e propriedades” desenvolvida por Gislene Ferreira Baptista sob a orientação da Profa. Dra. Mariana S. Castro teve o apoio financeiro do CNPq (processos no. 311202/2015-2 - Produtividade em Pesquisa e no. 407801-2013 - Rede Centro-Oeste de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação - REDE PRÓ-CENTRO-OESTE), da FAPDF (processos no. 193.000.955/2015 e no. 0193.001736/2017), da CAPES (por meio da concessão de bolsa de estudos – mestrado), da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

RESUMO

A descoberta dos antibióticos trouxe um grande avanço para a medicina, melhorando a qualidade de vida e promovendo uma queda drástica da mortalidade por infecções microbianas. Mas o seu uso indiscriminado tem conduzido a um processo de retorno à era pré-antibióticos e, mesmo com os diversos recursos tecnológicos atualmente disponíveis, tem havido dificuldades em encontrar novos compostos antimicrobianos que possam sanar a problemática gerada pela resistência dos microrganismos aos antibióticos convencionais. Os anuros possuem glândulas em sua pele que produzem e secretam uma grande variedade de compostos bioativos como alcaloides, esteroides, aminas biogênicas, proteínas e peptídeos. Estas moléculas apresentam uma extensa gama de bioatividades, incluindo antimicrobiana, antiparasitária, imunomoduladora, antiviral e antitumoral. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) presentes na secreção cutânea de anuros têm sido considerados uma opção terapêutica no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para combater o fenômeno de multirresistência aos antibióticos convencionais. Neste trabalho, foi realizada a purificação e caracterização de quatro novos peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea do anuro *Physalaemus cicada*, espécie endêmica do Brasil. A secreção bruta foi obtida por estimulação elétrica moderada e submetida ao fracionamento por RP-HPLC em coluna C₁₈. As frações eluídas que apresentaram atividade antimicrobiana no ensaio de varredura foram analisadas por MALDI-TOF MS (Autoflex II, Brüker). Quatro peptídeos antimicrobianos foram purificados e suas estruturas primárias foram determinadas por degradação de Edman: Pc24 (¹GFRDNLKKIADMLGQIAGAVAEKPKSQ²⁹), Pc26.1 (¹GFKDFMKNIVGKVVAVVEKFKPSQ.NH₂²⁵), Pc26.2 (¹GFKDFMKNMAKNLVEKVAVIEKPKSQ.NH₂²⁹) e Pc28 (GLVSGIANTLSGLLGRL.NH₂¹⁷). Os peptídeos denominados Pc24, Pc26.1 e Pc26.2 exibiram similaridade significativa com as nattererinas, uma família de PAMs isolada do sapo *Physalaemus nattereri*. O peptídeo Pc28 não apresentou similaridade relevante com nenhuma das famílias de PAMs já descritas. Os PAMs Pc24 e Pc28 foram produzidos por síntese química e seus efeitos antimicrobianos foram avaliados sobre bactérias e levedura patogênicas. O peptídeo Pc24 mostrou-se ativo sobre as bactérias Gram-negativas testadas com valor de CMI₅₀ de 4 µM para *Escherichia coli* e de 16 µM para *Klebsiella pneumoniae*. Já o peptídeo Pc28 exibiu um espectro de ação mais abrangente, mostrando-se ativo sobre as bactérias *E. coli* e *Staphylococcus epidermidis* e sobre a levedura patogênica *Candida albicans*. Em conclusão, o presente trabalho resultou na purificação e caracterização parcial de quatro novos peptídeos antimicrobianos presentes na secreção da pele de *P. cicada*, um anuro da família Leptodactylidae, espécie endêmica do Brasil e com distribuição na região da Caatinga brasileira. Esses resultados ressaltam a importância de se expandir os estudos acerca do potencial farmacológico dos anuros da fauna brasileira, englobando espécies de outros biomas, como a Caatinga.

Palavras-chave: Anuros, *Physalaemus cicada*, secreção cutânea, peptídeos antimicrobianos, purificação, caracterização

ABSTRACT

The discovery of antibiotics was a major breakthrough for medicine, improving the quality of life and promoting a drastic drop in mortality from microbial infections. But its indiscriminate use has led to a process of return to the pre-antibiotic era and, even with the various technological resources currently available, there have been difficulties in finding new antimicrobial compounds that can solve the problem generated by the resistance of microorganisms to conventional antibiotics. Anurans have glands in their skin that produce and secrete a wide variety of bioactive compounds such as alkaloids, steroids, biogenic amines, proteins and peptides. These molecules have a wide range of bioactivities, including antimicrobial, antiparasitic, immunomodulatory, antiviral and antitumoral. Antimicrobial peptides (AMPs) found in the cutaneous secretion of anurans have been considered a therapeutic option in the development of new antimicrobial agents to combat the phenomenon of multiresistance to conventional antibiotics. In this work, the purification and characterization of four novel antimicrobial peptides isolated from the cutaneous secretion of the anuran *Physalaemus cicada*, an endemic species of Brazil, was carried out. Crude secretion was obtained by moderate electrical stimulation and submitted to fractionation by RP-HPLC in a C₁₈ column. The eluted fractions that showed antimicrobial activity in a screening assay were analyzed by MALDI-TOF MS (Autoflex II, Brüker). Four antimicrobial peptides were purified and their primary structures were determined by Edman degradation: Pc24 (¹GFRDNLKKIADMLGQIAGAVAEKPKPSQ²⁹) Pc26.1 (¹GFKDFMKNIVGKVVGAVVEKFKPSQ.NH₂²⁵) Pc26.2 (¹GFKDFMKNMAKNLVEKVAGAVIEKPKPSQ.NH₂²⁹) and Pc28 (¹GLVSGIANTLSGLLGRL.NH₂¹⁷). The peptides, named Pc24, Pc26.1 and Pc26.2, exhibited remarkable similarity to nattererins, an antimicrobial peptide family isolated from the frog *Physalaemus nattereri*. The peptide designated Pc28 has no relevant similarity to the already described families of AMPs. The peptides Pc24 and Pc28 were produced by chemical synthesis and their antimicrobial effects were evaluated on pathogenic bacteria and yeast. Pc24 was active on Gram-negative bacteria with MIC values of 4 µM for *Escherichia coli* and 16 µM for *Klebsiella pneumoniae*. The peptide Pc28 showed a broader spectrum of action, being active on the bacteria *E. coli* and *Staphylococcus epidermidis* and on the pathogenic yeast *Candida albicans*. In conclusion, the present work resulted in the purification and partial characterization of four novel antimicrobial peptides found in the skin secretion of *P. cicada*, an anuran of the Leptodactylidae family, an endemic species of Brazil and distributed in the Brazilian Caatinga. These results highlight the importance of expanding the studies about the pharmacological potential of the anurans of the Brazilian fauna, including species of other biomes, such as Caatinga.

Key words: Anura, *Physalaemus cicada*, skin secretion, antimicrobial peptides, purification, characterization

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aumento da resistência aos antimicrobianos e o declínio na descoberta de novos antibióticos. 2
- Figura 2.** Diversidade estrutural de peptídeos antimicrobianos (PAMs). 5
- Figura 3.** Interação inicial de PAMs catiônicos com membranas de células animais (à esquerda) e membranas bacterianas (à direita). 7
- Figura 4.** Esquema dos diferentes modelos de mecanismos de ação propostos para os PAMs. 8
- Figura 5.** Esquema do modelo de Shai-Matsuzaki-Huang. 9
- Figura 6.** Exemplar adulto de *P. cicada*. 12
- Figura 7.** Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de *Physalameus cicada* em coluna C₁₈ (Shimadzu Shim-pack VP-ODS 4,6 x 150 mm) em sistema HPLC com fluxo de 1 mL/min e detecção realizada a 216 nm. 18
- Figura 8.** Espectro de massas da fração 24 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA), indicando a presença de contaminantes. 19
- Figura 9.** Espectro de massas da fração 26 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA), indicando a presença de contaminantes. 20
- Figura 10.** Espectro de massas da fração 28 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). 21
- Figura 11.** Perfil cromatográfico resultante da recromatografia da fração 24 em coluna de interação hidrofílica (Phenomenex Luna[®] HILIC 5 μ m, 200 Å, 4,6 x 150 mm) em sistema HPLC com fluxo de 1 mL/min e detecção realizada a 216 nm. 22
- Figura 12.** Perfil cromatográfico da recromatografia da fração 26 em coluna de interação hidrofílica (Phenomenex Luna[®] HILIC 5 μ m, 200 Å, 4,6 x 150 mm) em sistema HPLC com um fluxo de 1 mL/min e detecção realizada a 216 nm. 22
- Figura 13.** Espectros de massas dos peptídeos Pc26.1 (A) e Pc26.2 (B) obtidos em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). 23
- Figura 14.** Alinhamentos entre as sequências do peptídeo Pc24 isolado da secreção cutânea de *P. cicada* com a dos peptídeos: hymenochirina-2B de

Hymenochirus boettgeri (A); ocellatina-S1 de *Leptodactylus syphax* (B); brevenina-2ED de *Rana esculeta* (C); dermaseptina-A4 de *Agalychnis annae* (D) e dahleina 5.4 de *Litoria dahlia*. 25

Figura 15. Alinhamento múltiplo das sequências dos PAMs relacionados na Figura 14 com o peptídeo Pc24 de *P. cicada* revelando os baixos níveis de similaridade entre eles. 26

Figura 16. Alinhamento entre a sequência do peptídeo Pc24 de *P. cicada* com as sequências dos peptídeos nattererina-1 (A), nattererina-2 (B) e nattererina-3 (C) de *P. nattereri*. 26

Figura 17. Alinhamento múltiplo entre as sequências de Pc24 e as nattererinas-1, -2 e -3. 27

Figura 18. Alinhamentos entre as sequências do peptídeo Pc26.1 isolado da secreção cutânea de *P. cicada* com a dos peptídeos: cruzioseptina-1 isolado de *Cruziohyla calcarifer* (A); desercicolina-1 isolado de *Crinia desercoticola* (B); aureina 2.5 de *Litoria aurea* (C); aureina 2.1 de *L. raniformis* (D) e brevenina-2PTE de *Hylarana picturata* (E). 28

Figura 19. Alinhamento múltiplo das sequências dos PAMs relacionados na Figura 18 com o peptídeo Pc26.1 de *P. cicada* revelando os baixos níveis de similaridade entre eles. 28

Figura 20. Alinhamento entre a sequência do peptídeo Pc26.1 de *P. cicada* com as sequências dos peptídeos nattererina-1 (A), nattererina-2 (B) e nattererina-3 (C) de *P. nattereri* 29

Figura 21. Alinhamento múltiplo entre as sequências de Pc26.1 e as nattererinas-1, -2 e -3 29

Figura 22. Alinhamento entre as sequências do peptídeo Pc26.2 isolado da secreção cutânea de *P. cicada* com a dos peptídeos: brevinina-2LF-1 isolado de *Hylarana taipehensis* (A); meucina-24 isolado de *Mesobuthus eupeus* (B); ranatuerina-2PLx isolado de *Rana palustres* (C); ascaphina-4 isolado de *Ascaphus truei* (D) e cruzioseptina-1 isolado de *Cruziohyla calcarifer* (E). 30

Figura 23. Alinhamento múltiplo das sequências dos PAMs relacionados na Figura 22 com o peptídeo Pc26.2 de *P. cicada* revelando os baixos níveis de similaridade entre eles. 31

Figura 24. Alinhamento entre a sequência do peptídeo Pc26.2 de *P. cicada* com as sequências dos peptídeos nattererina-1 (A), nattererina-2 (B) e nattererina-3 (C) de *P. nattereri*. 31

Figura 25. Alinhamento múltiplo entre as sequências de Pc26.2 e as nattererinas-1, -2 e -3. 32

Figura 26. Alinhamento entre as sequências do peptídeo Pc28 isolado da secreção cutânea de *P. cicada* e a dos peptídeos: temporina-ITa isolado de *Rana italica* (A); plasticina-C1 isolado de *Agalychnis callidryas* (B); DFTamP1, um peptídeo sintético (C); peptide#4 isolado de *Rana temporaria* (D) e frenatina-1 isolado de *Rana infrafronata* (E). 33

Figura 27. Alinhamento múltiplo das sequências dos PAMs relacionados na Figura 26 com o peptídeo Pc28 de *P. cicada* revelando os baixos níveis de similaridade entre eles. 33

Figura 28. Alinhamento entre a sequência do peptídeo Pc28 de *P. cicada* com as sequências dos peptídeos nattererina-1 (A), nattererina-2 (B) e nattererina-3 (C) de *P. nattereri*. 34

Figura 29. Alinhamento múltiplo entre as sequências de Pc28 e as nattererinas-1, -2 e -3. 34

Figura 30. Espectros dicróicos na região distante do ultravioleta dos peptídeos antimicrobianos isolados da secreção de *P. cicada* em água (linha sólida) e em SDS 35 mM (linha tracejada). (A) Pc24; (B) Pc26.1; (C) Pc26.2 e (D) Pc28. 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fármacos peptídicos disponíveis comercialmente	4
Tabela 2. Estruturas primárias e características físico-químicas dos peptídeos antimicrobianos isolados da pele do anuro <i>P. cicada</i>	24
Tabela 3. Conteúdo estimado de α -hélice para os peptídeos Pc24, Pc26.1, Pc26.2 e Pc28 em água e em SDS 35 mM a 25°C	35
Tabela 4. Efeitos antimicrobianos (CMI ₅₀ , μ M) dos peptídeos isolados da secreção de <i>P. cicada</i> sobre bactérias e fungos patogênicos	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC – Coleção Americana de Culturas Típicas, do inglês *American Type Culture Collection*

ATP - Adenosina trifosfato

BHI – Infusão cérebro-coração, do inglês *brain heart infusion*

CMI – Concentração mínima inibitória, do inglês *minimum inhibitory concentration*

Da – Dalton

Fmoc – 9-fluorenil-metoxicarbonil

HCCA – Ácido-alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, do inglês *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*

MALDI-TOF – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – Tempo de voo, do inglês *matrix assisted laser desorption ionization – time of flight*.

nm – Nanometro

OMS – Organização Mundial da Saúde

p/v – Peso/volume

PAM – Peptídeo antimicrobiano

RP-HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, do inglês *reversed-phase high-performance liquid chromatography*

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TFA – Ácido trifluoroacético, do inglês *trifluoroacetic acid*

UFC – Unidade formadora de colônia, do inglês *colony-forming unit*

v/v – volume/volume

μ g – Micrograma

μ L – Microlitro

μ m – Micrômetro

μ M – Micromolar

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
APOIO FINANCEIRO	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiii
ÍNDICE GERAL	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Descoberta dos antibióticos e o advento da resistência aos antimicrobianos	1
1.2. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)	5
1.2.1. Ação dos PAMs na membrana celular bacteriana	6
1.3. Peptídeos antimicrobianos de anuros	9
1.4. Mecanismos de resistência microbiana aos PAMs	10
1.5. A espécie <i>Physalaemus cicada</i>	12
2. OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVO GERAL	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Coleta dos espécimes e extração da secreção cutânea de <i>P. cicada</i>	14
3.2. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea de <i>P. cicada</i>	14
3.3. Purificação dos peptídeos antimicrobianos de <i>P. cicada</i>	14
3.4. Síntese química dos peptídeos antimicrobianos de <i>P. cicada</i>	14
3.5. Quantificação dos peptídeos antimicrobianos de <i>P. cicada</i>	15
3.6. Avaliação da atividade antimicrobiana	15
3.7. Análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF	16
3.8. Determinação da estrutura primária dos peptídeos de <i>P. cicada</i>	17
3.9. Análises computacionais	17
3.10. Análise dos componentes de estrutura secundária dos peptídeos antimicrobianos de <i>P. cicada</i> por dicroísmo circular	17
4. RESULTADOS	18

5. DISCUSSÃO	37
6. PERSPECTIVAS	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. INTRODUÇÃO

1.1. Descoberta dos antibióticos e o advento da resistência aos antimicrobianos

Na história da humanidade, existem feitos marcantes e a descoberta dos antibióticos foi uma delas. Revolucionaram a medicina do século XX, salvando a vida de milhões de soldados na Segunda Guerra Mundial (1938-1945) que morriam em virtude de infecções associadas aos ferimentos causados nas batalhas. Com seu uso, doenças como pneumonia, gonorreia, febre reumática e tuberculose deixaram de ser fatais (Kalvaitis, 2008; Aminov, 2017). Entretanto, como predito por Alexandre Fleming, a resistência bacteriana aos antibióticos foi notada logo após sua introdução na terapêutica, não se restringindo apenas aos ambientes hospitalares, já que nossa microbiota é constituída naturalmente por bactérias que são de grande importância na homeostase e vivem de maneira comensal em nosso organismo, estando presentes nas regiões oral, nasal, epiderme, intestino e tendo papel relevante em vários processos metabólicos, nutricionais, entre outros (Ohland e Jobin, 2015). Relatos recentes demonstram o aumento de resistência microbiana aos antibióticos em infecções comunitárias não só em países em desenvolvimento, como também em países desenvolvidos (Van Hecke *et al.*, 2017) propagando-se a nível mundial pelo uso indiscriminado de antibióticos, prescrição incorreta, abandono do tratamento, falta de controle pelos órgãos regulamentadores, uso excessivo na pecuária, utilização de inseticidas na agricultura e sanitizantes de uso doméstico (OMS, 2012; O'Neill, 2016). Previsões recentes indicam que, se não forem tomadas medidas preventivas urgentes, em 2050 mais de 10 milhões de pessoas morrerão em decorrência de infecções por bactérias resistentes aos antimicrobianos (O'Neill, 2016) (Figura 1).

A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA - *Infectious Diseases Society of America*, <https://www.idsociety.org/>) tem alertado acerca do risco oferecido por microrganismos multiresistentes, em especial por um grupo que usa o acrônimo ESKAPE que inclui seis patógenos bacterianos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* (Pendleton *et al.*, 2013; Santajit e Indrawattana, 2016). Tal denominação, resultante do emprego das iniciais das bactérias do grupo, também faz referência à capacidade desses patógenos em escapar dos efeitos dos antimicrobianos.

A preocupação com a resistência antimicrobiana vem associada com a diminuição do interesse das grandes indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de novos

antibióticos, pela falta de incentivos governamentais em pesquisas e o elevado custo (em média US\$ 800 milhões de investimentos em 10 anos e, em torno, de US\$ 50-70 milhões na fase clínica III) (Conly e Johnston, 2005; Rex *et al.*, 2013). O baixo retorno em relação ao tempo e valores investidos tem levado o mercado a investir em doenças crônicas como diabetes, artrite, hipertensão, HIV, que demandam medicamentos de uso contínuo e de manutenção prolongada, tornando-se um campo de investimentos mais atrativo e rentável que o de desenvolvimento de novos antibióticos (Spellberg, 2014). A Figura 1 resume o aumento da resistência e a diminuição na busca por novos antibióticos nas últimas décadas.

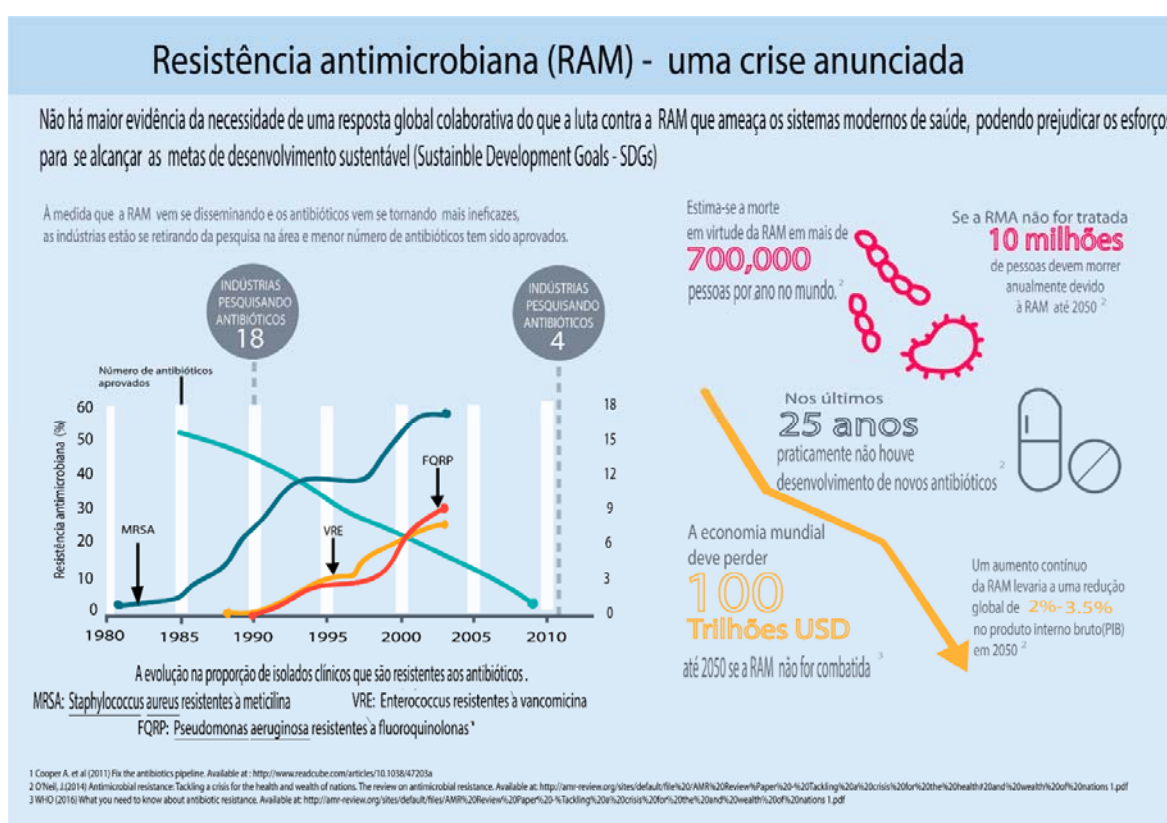


Figura 1. Aumento da resistência aos antimicrobianos e o declínio na descoberta de novos antibióticos. (Retirado de Brennan, 2016).

Há uma urgência voltada ao desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos, já que as falhas terapêuticas se tornaram infelizmente uma constante. Diversos estudos têm apontado os peptídeos antimicrobianos (PAMs), também chamados de peptídeos de defesa (PDs), como fortes candidatos na produção de opções terapêuticas que sanem

a problemática criada pela resistência aos antimicrobianos (Nascimento *et al.*, 2003; Ladram e Nicolas, 2016).

Dentro desse cenário, a secreção dos anfíbios é uma fonte rica em peptídeos farmacologicamente ativos, principalmente peptídeos ativos em membranas biológicas (Nascimento *et al.*, 2003; Conlon *et al.*, 2012; Conlon *et al.*, 2014; Ladram e Nicolas, 2016). A membrana plasmática parece ser o principal alvo de ação dos peptídeos antimicrobianos e muitos dos seus efeitos estão relacionados às alterações no balanço osmótico celular e nas propriedades funcionais da membrana plasmática, resultando em morte celular (Nascimento *et al.*, 2003; Ladram e Nicolas, 2016) e em contraste a muitos antibióticos convencionais, que inviabilizam ou matam bactérias em um período de dias, os peptídeos antimicrobianos, por agirem instantaneamente, reduzem a taxa de multiplicação o que torna o microrganismo menos resistente às drogas convencionais (Nascimento *et al.*, 2003; Conlon *et al.*, 2014).

Estudos tem apontado a relevância dos PAMs como candidatos promissores a novos fármacos, como pode ser exemplificado pelo peptídeo PMA SAA-148 que é capaz de inibir a formação e erradicar biofilmes proteicos com *S. aureus* e *A. baumannii*, comumente encontrados em infecções hospitalares (de Breij *et al.*, 2018). Essa classe de moléculas, além de ser promissora como agentes antimicrobianos, pode ter outras aplicações terapêuticas como antitumorais, hipoglicemiantes, anti-trombolíticos, antiparasitários (da Costa *et al.* 2015).

A Tabela 1 relaciona alguns fármacos peptídicos já utilizados na clínica médica evidenciando seu potencial terapêutico (da Costa *et al.* 2015).

Tabela 1. Fármacos peptídicos disponíveis comercialmente.

Empresa	Nome genérico	Nome comercial	Aplicação terapêutica	Ano de lançamento
Elan Farmacêutica	Ziconotide	Prialt®	Dor crônica	2004
Amylin (agora BMI)	Pramlintide	Symlin®	Diabetes tipo 1 e 2	2005
Amylin (agora BMI)	Exenatide	Byetta®	Diabetes tipo 2	2005
Ipsin	Lareotide	Somatuline®	Acromegalia	2007
Amgen	Romiplostin	Nplate®	Púrpura trombocitopênica	2008
Ferring	Degarelix	Firmagon®	Câncer de próstata	2008
Dyax corp	Eccallantide	Kalbitor®	Angiodema hereditário	2009
Astellas Pharma	Telavancin	Vibativ®	Infecções de pele	2009
Novo Nordisk	Liraglutide	Victoza®	Diabetes tipo 2	2010
Vertex Pharmaceuticals	Telaprevir	Incivek®	Hepatite C	2011
Merk	Boceprevir	Victrelis®	Hepatite C	2011
NPS Pharmaceuticals	Teduglutide	Revestive® (EU); Gattex® (USA)	Síndrome do intestino curto	2012
Thrombogenics	Ocriplasmin	Jetrea®	Adesão vítreomacular	2012
Onix Farmacêutica	Carfilzomib	Kyprolis®	Mieloma múltiplo	2012
Novartis	Pasireotide	Signifor®	Doença de Cushing	2012
Afymax	Peginesatide ^a	Omontys®	Anemia	2012
Discovery Labs	Lucinactant	Surfaxin®	Síndrome da angústia respiratória do recém-nascido (SARRN)	2012
Sanofi	Lixisenatide	Lyxumia®	Diabetes tipo 2	2013

1.2. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Os peptídeos antimicrobianos são moléculas muito conservadas e desempenham papel crucial na resposta imune dos organismos vivos, incluindo plantas, seres invertebrados e vertebrados. Eles formam um grupo extremamente versátil com funções variadas, destacando-se papel imunomodulatório, pró-apoptótico, na defesa inata, no combate a microrganismos invasores e na cicatrização de feridas (Nawrocki *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016).

Os PAMs podem ter até 100 resíduos de aminoácidos, a maioria deles é básico, com carga líquida positiva que pode variar entre +2 a +13, resultante da presença de resíduos de lisina, arginina e histidina em suas estruturas (Kumar *et al.*, 2018).

Os PAMs são geralmente classificados em quatro grandes famílias com base em suas estruturas secundárias: folha β , α -hélice, estendida e *loop*, sendo que as mais comumente encontradas são a estrutura em α -hélice e em folha β (Bahar e Ren, 2013; Andersson *et al.*, 2016) (Figura 2).

Os PAMs formadores de α -hélice são a família mais estudada, correspondendo a 30-50% de todos os peptídeos antimicrobianos identificados. A organização em estrutura helicoidal parece ser determinante para a atividade antimicrobiana dos PAMs, assim como a cationicidade e anfipaticidade exibidas por essas moléculas (Bahar e Ren, 2013; Andersson *et al.*, 2016).

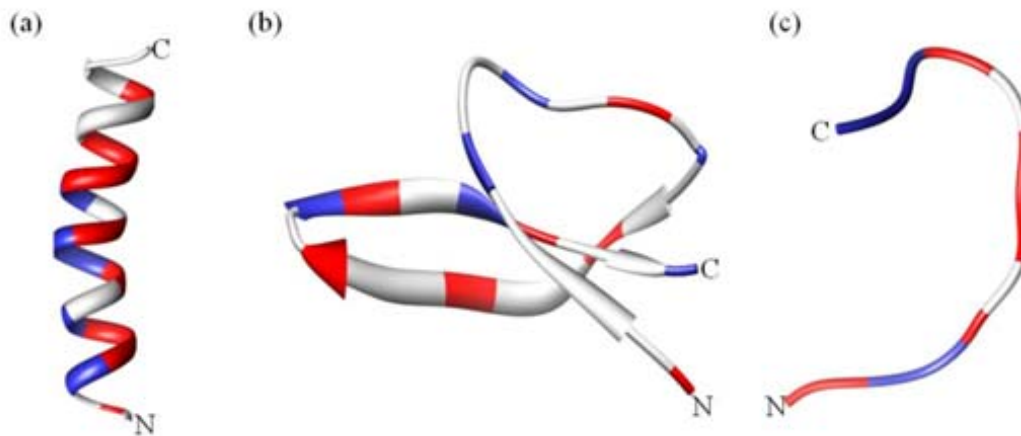


Figura 2. Diversidade estrutural de peptídeos antimicrobianos (PAMs). (a) Magainina, α -helicoidal; (b) Defensina humana, folha β e (c) Indolicidina, espiral estendida. As regiões com resíduos com carga positiva estão representados na cor azul, ao passo que as regiões contendo resíduos hidrofóbicos estão em vermelho. As porções N- e C-terminais estão indicadas (Retirado de Kumar *et al.*, 2018).

Sabe-se que parâmetros físico-químicos, como carga, extensão da cadeia peptídica, estrutura, índice hidrofóbico e anfipaticidade, são de extrema importância para a atividade biológica dos PAMs e estudos têm apontado que esses fatores interagem de modo a garantir sua atividade antimicrobiana (Lee *et al.*, 2015).

1.2.1. Ação dos PAMs na membrana celular bacteriana

As membranas biológicas são estruturas laminares formadas principalmente por fosfolípidos e proteínas, tendo em alguns organismos a presença de gliceróis e esteroides que contribuem para sua composição bioquímica e topologia. Entretanto há diferenças fundamentais na constituição da membrana das células bacterianas e de células animais (Zaslöff, 2002). O colesterol e outros esteróis, como o ergosterol, que são abundantemente encontrados em membranas eucarióticas, são raramente encontrados em membranas procarióticas. Os fosfolípidos hidroxilados, tais como fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) e fosfatidilserina (PS), que possuem alta eletronegatividade sob condições fisiológicas, são os principais constituintes das membranas de bactérias patogênicas, enquanto as membranas celulares de mamíferos que são ricas em fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e esfingomiéline (SM), considerados fosfolípidos zwitteriônicos, tendem a ter uma carga neutra (Zaslöff, 2002; Ebenhan *et al.*, 2014; Epanand *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018).

Esta compreensão é necessária para entendermos a seletividade destas moléculas e a sua forma de interação com a membrana bacteriana na qual os fosfolípidos carregados negativamente tornando-se alvo para ligação dos PAMs, que são moléculas catiônicas, ou seja, carregadas positivamente, sendo esta interação eletrostática considerada a forma primária dos mecanismos de ação dos PAMs. A Figura 3 representa o esquema geral da possível interação dos PAMs com membranas procarióticas e eucarióticas.

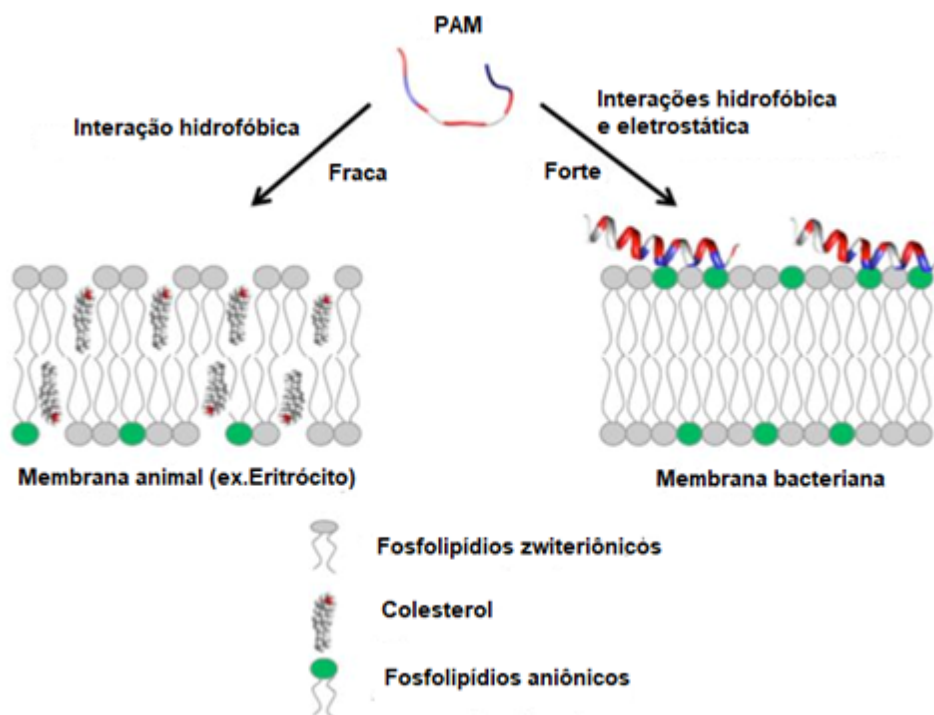


Figura 3. Interação inicial de PAMs catiônicos com membranas de células animais (à esquerda) e membranas bacterianas (à direita) (Retirado de Kumar *et al.*, 2018).

Alguns modelos de mecanismos de ação foram propostos tendo como base interações iniciais (eletrostática e hidrofóbica) entre os peptídeos e a membrana celular (Carvalho e MacHini, 2013; da Costa *et al.* 2015).

A Figura 4 ilustra os diferentes modelos propostos de interação dos PAMs com a membrana de células procarióticas, sendo os modelos formadores de poro (modelos *barrel-stave* e poro toroidal) e não formadores de poro (modelo *carpete*) os mais amplamente descritos (Salditt *et al.*, 2006).

Modelo *barrel-stave*: após ligação dos PAMs à superfície da membrana bacteriana, sua estrutura secundária sofre uma mudança conformacional, ocorrendo uma cascata de agregação das unidades monoméricas de forma paralela à face hidrofóbica que fica orientada em direção ao núcleo hidrofóbico da membrana e a face hidrofílica fica orientada na direção das regiões aquosas da membrana formando um poro em “barril”. A diferença entre o modelo *barrel-stave* e o modelo do poro toroidal é que os monômeros peptídicos ligam-se de maneira paralela a cabeça fosfolipídicas da membrana e não entre si (Salditt *et al.*, 2006; da Costa *et al.*, 2015; Andersson *et al.*, 2016).

No modelo carpete, os peptídeos se acumulam na membrana, causando uma desorganização dos lipídeos enfraquecendo estas ligações e permitindo que estes penetrem para o interior da membrana, levando a sua desestabilização com formação de micelas (Salditt *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2015; Le *et al.*, 2017).

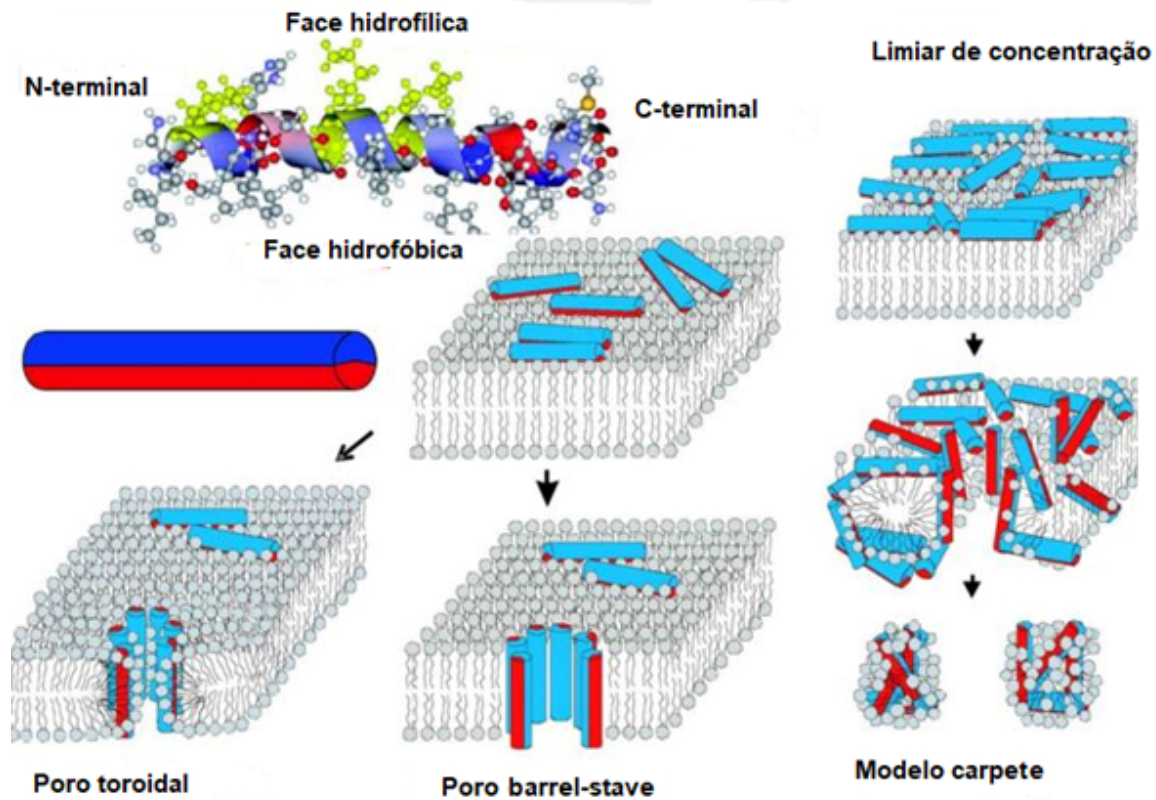


Figura 4. Esquema dos diferentes modelos de mecanismos de ação propostos para os PAMs. Na parte superior à esquerda está representada a conformação helicoidal de magainina com seus lados hidrofílicos e hidrofóbicos da hélice, juntamente com a representação como um cilindro anfifílico. (à esquerda). O modelo de poro toroidal como proposto para a magainina (centro e esquerda). No esquema apresentado ao centro, observa-se o estado de superfície dos PAMs com os grupos laterais hidrofóbicos ancorados no núcleo hidrofóbico da bicamada. Modelo *barrel-stave* como proposto para alameticina.(centro). Modelo carpete: peptídeos antimicrobianos aglomerados na superfície da membrana e, finalmente, conduzindo à formação de micelas (à direita, parte superior, centro e parte inferior) (Retirado de Salditt *et al.*, 2006).

Existe ainda um modelo que prevê efeitos dos PAMs sobre alvos intracelulares, sendo esse modelo conhecido como modelo de Shai-Matsuzaki-Huang (Figura 5). Segundo esse modelo, formam-se poros transitórios por onde os peptídeos difundem-se no citoplasma possivelmente atingindo alvos celulares (Zasloff, 2002).

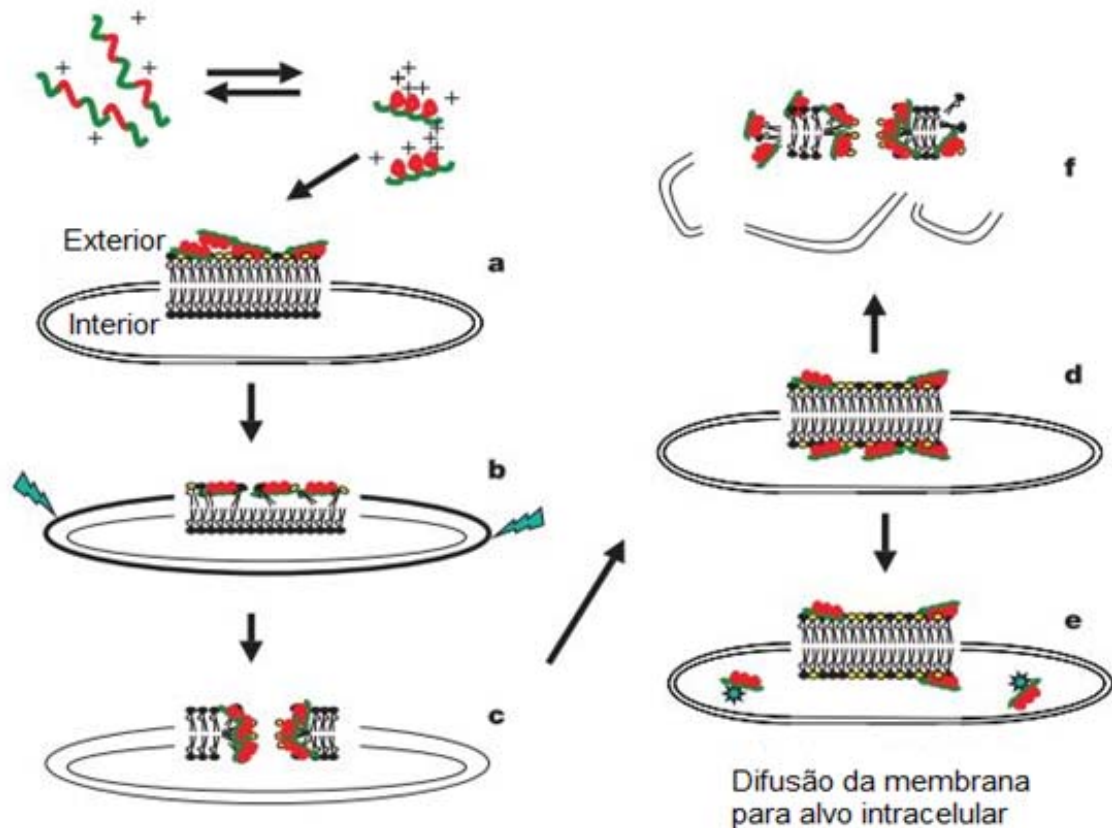


Figura 5. Esquema do modelo de Shai-Matsuzaki-Huang. a) Formação de um carpete de peptídeos na camada externa da membrana. b) Integração do peptídeo à membrana e afinamento da camada externa. c) Formação de poros transitórios. d) Transporte de lipídios e peptídeos para a camada interna. e) Difusão dos peptídeos para alvos intracelulares (em alguns casos). f) Colapso da membrana em fragmentos e ruptura física da membrana da célula alvo (Retirado de Zasloff, 2002).

1.3. Peptídeos antimicrobianos de anuros

A classe anfíbia é composta de 7977 espécies descritas, sendo dividida nas ordens: Apoda (cecílias), Caudada (salamandras e tritões) e Anura (sapos, rã e pererecas) (Frost, 2019). No Brasil existem 1080 espécies, a maior riqueza mundial em espécies de anfíbios, sendo 1039 espécies pertencentes à ordem Anura (Segalla *et al.*, 2016).

Grande parte dos anfíbios apresenta ciclo bifásico, com uma fase larval aquática, e outra fase terrestre. Este processo evolutivo, associado às drásticas mudanças

ambientais, trouxe grandes desafios fisiológicos, como manutenção e balanceamento hídrico, ajuste da respiração em resposta à saturação de oxigênio e maiores flutuações da temperatura ambiente diária, sendo a pele dos anfíbios a responsável pela maioria destas funções (König *et al.*, 2015). Em sua derme há um vasto número de glândulas mucosas e granulosas distribuídas em sua região dorsal, que se comunicam com a superfície externa diretamente através de ductos secretórios. As glândulas mucosas secretam mucopolissacarídeos para manutenção da umidade da pele e as granulosas secretam substâncias de defesa contra predadores vertebrados e microrganismos, sendo essa secreção liberada por estímulos, como estresse e injúria, que comprimem os miócitos que através das células serosas liberando a secreção (Xu e Lai, 2015).

Existe um crescente interesse nesse táxon em virtude da presença de compostos químicos de grande importância farmacológica na pele desses animais (Nascimento *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2017). Estas secreções também exibem grande diversidade de peptídeos com variadas atividades biológicas já descritas como: inibidor de proteases, antioxidante, liberador de insulina, cicatrizante, imunomoduladora, antiviral, antitumoral, antiparasitária, antibacteriana, entre outras (Xu e Lai, 2015).

Na composição da secreção das glândulas granulosas existem peptídeos com ampla atividade antimicrobiana, os quais fazem parte do arsenal de imunidade inata do animal, protegendo-o da proliferação de microrganismos patogênicos. Esses peptídeos têm atraído a atenção da comunidade científica como potencial agente terapêutico contra bactérias que apresentam resistência aos antibióticos convencionais disponíveis comercialmente (Conlon *et al.*, 2012; Conlon *et al.*, 2014).

1.4. Mecanismos de resistência microbiana aos PAMs

Com a co-existência dos PAMs e dos microrganismos em ambientes competitivos, como solo, água, locais ricos em microbiotas como mucosas oral, intestino, tecido epitelial e outros, há a expectativa da seleção de estratégias para sobrevivência das mesmas, levando à resistência aos antimicrobianos (Andersson *et al.*, 2016).

Esta resistência ocorre por diferentes vias, podendo ser passiva quando já é intrínseco do microrganismo como, por exemplo, é observado nos gêneros *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* e *Burkholderia*, sendo a resistência resultado da presença de lipídios A carregados positivamente, reduzindo assim a interação com os PAMs; ou induzidas ou adaptativas, quando a bactéria, em resposta ao meio ambiente rico em

PAMs, por meio de seleção natural passa a apresentar respostas adaptativas, como descrito a seguir (Andersson *et al.*, 2016):

Degradação por proteases como metalo-, cisteíno-, serino- e aspártico-proteases que podem ser secretadas ou ancoradas à parede bacteriana, clivando e inativando os PAMs e impedindo que atinjam seu sítio alvo (Belas *et al.*, 2004; Band e Weiss, 2015).

Mudança de cargas da membrana bacteriana, já que os PAMs são atraídos pelas cargas eletronegativas dos fosfolipídios da parede bacteriana, ao se reduzir as cargas negativas dispostas na membrana, diminui a atração de ligação destes pela membrana. Um exemplo disto é a D-alanilação de ácidos teicoicos e lipoteicoicos da parede, reduzindo a carga negativa de bactérias Gram-positivas. No caso das Gram-negativas, observa-se alteração semelhante da carga superficial por meio da modificação dos lipopolissacarídeos que são parte da membrana externa por fosforilação reduzida, substituição de açúcares ou adição de lipídios, conferindo proteção relativa contra PAMs (Malanovic e Lohner, 2016).

Neutralização e captura. Proteínas e polissacarídeos associados à superfície bacteriana ou secretados no meio extracelular podem se ligar diretamente aos PAMs, bloqueando assim o acesso aos componentes da membrana citoplasmática e a formação de poros líticos. Outra estratégia de neutralização indireta de PAMs empregada por patógenos bacterianos envolve a liberação do PAM ligado à superfície bacteriana (Cole e Nizet, 2016).

Biofilme são agregados multicelulares tridimensionais que se formam sobre superfícies tanto na natureza quanto na clínica e são adaptativamente resistentes aos antibióticos em comparação com as bactérias planctônicas (Pletzer *et al.*, 2016). Sua presença é um fator limitante para permeabilização de antibióticos (entre eles os PAMs) colaborando como um mecanismo de resistência, tanto por servir de barreira, como por promover mudanças conformacionais nos alvos dos antibióticos (Band e Weiss, 2015).

Bombas de efluxo são complexos de proteínas ligadas principalmente à membranas que movem compostos tóxicos (incluindo antibióticos) para fora da célula. São transportadores ativos, requerendo diretamente ATP ou usando um gradiente de potencial eletroquímico. São importante na resistência a antibióticos incluindo os PAMs, contribuindo para colonização no hospedeiro (Band e Weiss, 2015; Joo *et al.*, 2016).

Devido ao seu mecanismo de ação relativamente não específico, a seleção de mecanismos de resistência aos PAMs pelos microrganismos ocorre a uma taxa bem menor que a dos antibióticos convencionais, sendo que estudos recentes têm demonstrado eficácia dos PAMs mesmo na presença dos mecanismos de resistência supra-citados como, por exemplo, a inibição de biofilmes, continuando assim a ser uma excelente alternativa às bactérias MDR (multirresistentes aos antibióticos convencionais) (Pletzer *et al.*, 2016; Chung e Khanum, 2017; de Breij *et al.*, 2018).

1.5. A espécie *Physalaemus cicada*

O gênero *Physalaemus* compreende 48 espécies documentadas (Frost, 2019) e está amplamente distribuído na região dos Andes, Bolívia, Colômbia e Brasil. A espécie *Physalaemus cicada* (Leptodactylidae, Leiuperinae) é endêmica do Brasil, geralmente encontrada em planícies de áreas abertas, na caatinga e cerrado dos estados do Ceará, Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Sergipe e Minas Gerais (Arzabe e Silvano, 2004; Benício *et al.*, 2012).

P. cicada (Figura 6) caracteriza-se por apresentar porte médio, corpo delgado, ausência de glândula inguinal, barriga imaculada com algumas manchas marrons nas laterais do abdômen e da garganta. A coloração da região inguinal é amarela (Benício *et al.*, 2012). É comumente encontrado vocalizando em corpos d'água temporários.



Figura 6. Exemplar adulto de *P. cicada*. Foto gentilmente cedida por Lucas Grandinetti.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Identificar, purificar e caracterizar peptídeos inéditos da secreção do anuro *Physalaemus cicada* com ênfase na prospecção e caracterização de peptídeos antimicrobianos para aplicações terapêuticas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Identificar, isolar e caracterizar estruturalmente peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea de *P. cicada*;

2.2.2. Analisar comparativamente os peptídeos antimicrobianos de *P. cicada* com outros PAMs já descritos na literatura;

2.2.3. Determinar a composição de elementos de estrutura secundária dos peptídeos identificados e isolados da secreção cutânea de *P. cicada* com o emprego da técnica de dicroísmo circular;

2.2.4. Determinar os efeitos antimicrobianos dos peptídeos identificados e isolados da secreção cutânea de *P. cicada* sobre bactérias e leveduras patogênicas por meio da determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMIs).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta dos espécimes e extração da secreção cutânea de *P. cicada*

Espécimes adultos da espécie *P. cicada* foram coletados em excursões, durante período noturno, no município de Correntina (Bahia). As secreções cutâneas empregadas no presente estudo foram obtidas por meio da aplicação de corrente elétrica branda alternada na região dorsal dos animais. A secreção liberada foi recolhida por lavagem do corpo do animal com água Milli-Q, congelada, liofilizada e armazenada a -20°C até a sua utilização. Todas as coletas foram realizadas sob licença do ICMBIO (no. 66313-2).

3.2. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea de *P. cicada*

Alíquotas individualizadas da secreção liofilizada (3,0 mg) foram dissolvidas em 250 µL de TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q, centrifugadas por 5 min a 15.800 x *g*. Alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram aplicadas em uma coluna de fase reversa do tipo C₁₈ (Shimadzu Shim-pack VP-ODS 15 cm). Um gradiente linear de TFA 0,1 % (v/v) em acetonitrila foi empregado na eluição, com fluxo de 1 mL/min. A detecção ao UV foi monitorada no comprimento de onda de 216 nm. As frações de *P. cicada* foram eluídas aplicando-se as seguintes condições: gradiente de 0 a 25% do solvente B (TFA 0,1%, v/v, em acetonitrila) em 5 min; de 25 a 45% do solvente B em 20 min, de 45 a 62% de solvente B em 10 min. As frações eluídas foram coletadas manualmente, secadas a vácuo e armazenadas a -20°C.

3.3. Purificação dos peptídeos antimicrobianos de *P. cicada*

A purificação das frações com atividade antimicrobiana de *P. cicada* foi realizada em coluna de fase reversa do tipo C₁₈ (Phenomenex Luna 5 µ Hilic 200 Å, 15 cm x 4.60 mm) com fluxo de 1 mL/min e utilizando-se um gradiente linear de 1% por minuto, sendo a fase móvel A: acetonitrila 90%, água Milli-Q 9,9% e TFA 0,1% e a fase móvel B: TFA 0,1% em água Milli-Q. A detecção foi monitorada a 216 nm e as frações coletadas manualmente, secadas a vácuo e armazenadas a -20°C.

3.4. Síntese química dos peptídeos antimicrobianos de *P. cicada*

Os peptídeos Pc24 e Pc28 foram produzidos por síntese química pela empresa GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brasil) empregando-se a química Fmoc

(9-fluorenil-metoxicarbonil) com grau de pureza acima de 95%. O controle de qualidade foi realizado mediante análises por espectrometria de massas para se determinar se foram corretamente sintetizados.

3.5. Quantificação dos peptídeos antimicrobianos de *P. cicada*

Os peptídeos empregados no presente estudo foram quantificados em espectrofotômetro (Bel Photonics UV/Vis M51), por meio da leitura das absorvâncias nos comprimentos de onda 205, 215 e 225 nm (Aitken e Learmonth, 2002; <https://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/abs205.html>).

O cálculo que permitiu obter a concentração protéica em µg/mL a partir das medidas de absorvância está descrito abaixo:

$$\text{Concentração}_1 = \frac{\text{Abs}_{(205\text{nm})} \times 1000}{31}$$

$$\text{Concentração}_2 = 144 \times [\text{Abs}_{(215\text{nm})} - \text{Abs}_{(225\text{nm})}]$$

$$\frac{\text{Concentração}_1 + \text{Concentração}_2}{2} = \text{Concentração da alíquota analisada}$$

O volume total do estoque de cada peptídeo foi alíquotado em tubos tipo *ependorf* de 1 mL, que posteriormente foram secos a vácuo (SpeedVac modelo SC 100, Savant).

3.6. Avaliação da atividade antimicrobiana

Linhagens de bactérias e leveduras obtidas do estoque de células do Banco de Culturas do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília foram cultivadas em 7 mL de meio Mueller-Hinton, sob agitação, a 37°C, durante 16 horas. Quando a densidade óptica a 595 nm atingiu o valor de 1.0, cada suspensão microbiana foi diluída em meio Mueller-Hinton (bactérias) ou BHI (leveduras) fresco, nas proporções 1:50 para bactérias Gram-negativas e 1:100 para Gram-positivas e para a levedura *Candida albicans*. As amostras foram solubilizadas em água Milli-Q estéril e incubadas com a suspensão microbiana diluída, numa proporção de 1:1 (v/v), em placas de microtitulação estéreis (96 poços, fundo chato).

Como controle representativo da ausência de crescimento microbiano foi utilizado formaldeído 0,4% (v/v) e como controle de crescimento pleno foi feita a incubação da suspensão microbiana com água Milli-Q estéril. Após a incubação por um período de 18 a 24 horas, a 37°C, as placas foram analisadas a 595 nm, em leitora de microplacas (Multiskan®FC, Thermo Scientific, EUA).

O ensaio de varredura foi realizado com as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922, a fim de verificar quais componentes resultantes do fracionamento da secreção de *P. cicada* apresentavam atividade inibitória sobre o crescimento microbiano. Cada fração cromatográfica de cinco corridas de RP-HPLC foram reunidas, solubilizadas em 250 µL de água Milli-Q e incubadas (50 µL) com a suspensão bacteriana, de acordo com o método descrito acima.

Os peptídeos que apresentaram atividade antimicrobiana no ensaio de varredura foram acumulados ou produzidos por síntese química para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI). A CMI foi assumida como sendo a menor concentração na qual não houve crescimento espectrofotometricamente detectável. Foram realizadas determinações de CMI para as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e para a levedura *Candida albicans* ATCC 14053. Alíquotas de 50 µL de diluições seriadas de cada peptídeo puro, feitas a partir de uma solução-estoque a 256 µM esterilizada por filtração em filtro Millex GV 0,22 µm, foram incubadas com 50 µL de suspensão microbiana. Após a incubação por um período de 22 h a 37°C, as placas foram analisadas a 595 nm, em leitora de microplacas (Multiskan®FC, Thermo Scientific, EUA).

3.7. Análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF

As frações cromatográficas obtidas que apresentavam atividade inibitória sobre o crescimento microbiano foram analisadas *off-line* em um espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF modelo Autoflex II (Bruker, Alemanha) operado no modo positivo e com emprego do refletor de modo a se determinar o grau de homogeneidade e as massas moleculares dos componentes presentes.

As frações foram reconstituídas em acetonitrila 50% (v/v) contendo TFA 0,1% (v/v) e 1 µL de cada fração cromatográfica foi aplicada em placa de aço inoxidável juntamente com matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, 10 µg/µL) ressuspensa em acetonitrila 50% (v/v) contendo TFA 0,1% (v/v). O equipamento foi previamente calibrado utilizando-se o padrão Peptide Calibration Standard II (Bruker, Alemanha), sendo analisada a faixa de m/z de 750 a 4000.

3.8. Determinação da estrutura primária dos peptídeos de *P. cicada*

A estrutura primária dos peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea de *P. cicada* foi determinada por degradação de Edman, em seqüenciador automático PPSQ-31A/33A (Shimadzu, Japão), de acordo com as orientações do fabricante.

3.9. Análises computacionais

O algoritmo BLASTp (Altschul *et al.*, 1990; disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), o banco de dados APD3 (Wang *et al.*, 2016; disponível em <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) e diferentes referências bibliográficas sobre o tema foram utilizados para buscas de similaridade entre as sequências encontradas para os PAMs de *P. cicada* e outros peptídeos antimicrobianos já descritos na literatura; a ferramenta *ExPASy pI/Mw tool* (http://web.expasy.org/compute_pi/) (Bjellqvist *et al.*, 1993) foi utilizada para o cálculo da massa teórica monoisotópica dos peptídeos; *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers *et al.*, 2011) foi usado para o alinhamento das múltiplas sequências similares e para o alinhamento de apenas duas sequências foi empregado *EMBOSS Needle Pairwise Sequence Alignment* (Rice *et al.*, 2000).

3.10. Análise dos componentes de estrutura secundária dos peptídeos antimicrobianos de *P. cicada* por dicroísmo circular

A composição de elementos de estrutura secundária presentes nos peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea de *P. cicada* foi determinada por medidas de dicroísmo circular (CD) realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-815, equipado com um sistema *Peltier* (Jasco, Japão) e uma bomba de água. Os peptídeos de *P. cicada* foram analisados em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm, na presença de água e de SDS 35 mM a 25°C. Cinco medidas consecutivas foram realizadas nos comprimentos de onda entre 190 e 260 nm, a média final entre os espectros foi obtida e da média dos espectros subtraíram-se os espectros referentes à linha de base da água e SDS. A elipticidade observada foi convertida em elipticidade molar ($[\theta]$) ($\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) baseada na massa molecular por resíduo de 115 Da (Pace *et al.*, 1989).

A obtenção da helicidade foi estimada considerando os valores de $[\theta]_{\lambda_{208\text{nm}}}$ usando a equação (Greenfield e Fasman, 1969):

$$f_H = \frac{([\theta]_{208} - 4000)}{(-33000 - 4000)}$$

4. RESULTADOS

Alíquotas (3,0 mg) de secreção cutânea bruta de *P. cicada* foram fracionadas em RP-HPLC empregando-se uma coluna C₁₈ com monitoramento da eluição no comprimento de onda de 216 nm. A análise do perfil cromatográfico típico (Figura 7) desse fracionamento revelou se tratar de uma secreção rica e diversificada, resultando na eluição de, aproximadamente, 28 frações cromatográficas, sendo que cada fração foi coletada manualmente para realização do ensaio de varredura para identificação das frações com propriedades inibitórias sobre bactérias patogênicas.

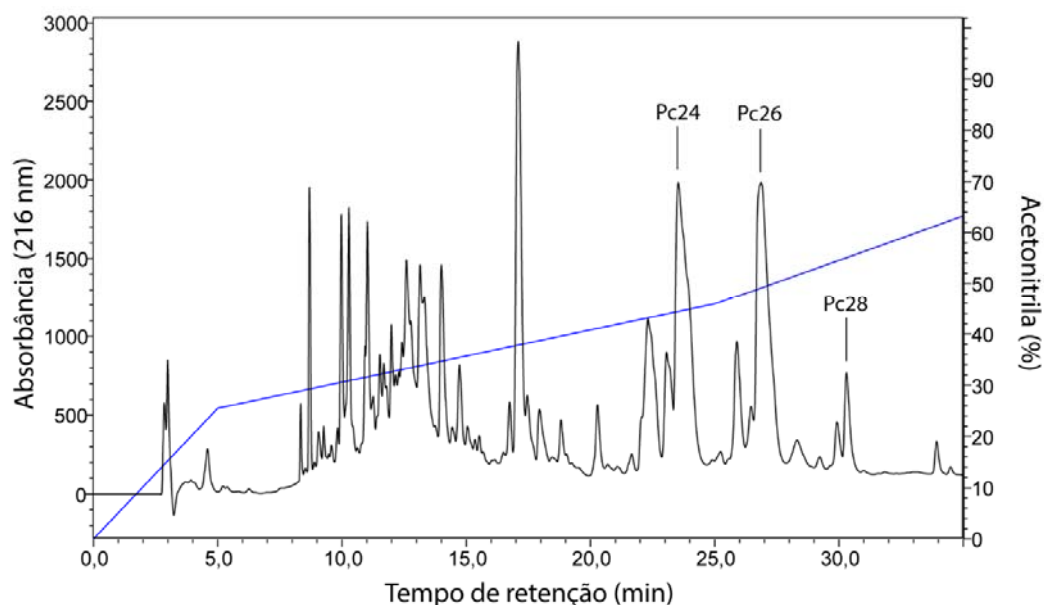


Figura 7. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de *Physalameus cicada* em coluna C₁₈ (Shimadzu Shim-pack VP-ODS 4,6 x 150 mm) em sistema HPLC com fluxo de 1 mL/min e detecção realizada a 216 nm. As frações que apresentaram atividade biológica (antibacteriana) e que foram purificadas e caracterizadas no presente estudo estão identificadas como Pc24, Pc26 e Pc28.

O ensaio de varredura para avaliação dos efeitos antimicrobianos das frações cromatográficas eluídas foi realizado com a incubação de cada fração obtida com as bactérias patogênicas *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva). Três frações (indicadas como Pc24, Pc26 e Pc28 na Figura 7) apresentaram atividade inibitória sobre as bactérias testadas e foram submetidas à análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF de modo a se determinar o seu grau de homogeneidade, bem como as massas moleculares

monoisotópicas dos principais componentes peptídicos presentes (Figuras 8, 9 e 10). As frações indicadas na Figura 7 foram denominadas Pc24, Pc26 e Pc28, de acordo com sua ordem de eluição durante o processo cromatográfico.

A análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF permitiu constatar que as frações Pc24 e Pc26 encontravam-se impuras, com a presença de contaminantes, sendo submetidas à recromatografia em coluna de interação hidrofílica (HILIC), resultando nos peptídeos puros denominados Pc24 (Figura 11), Pc26.1 e Pc26.2 (Figuras 12 e 13).

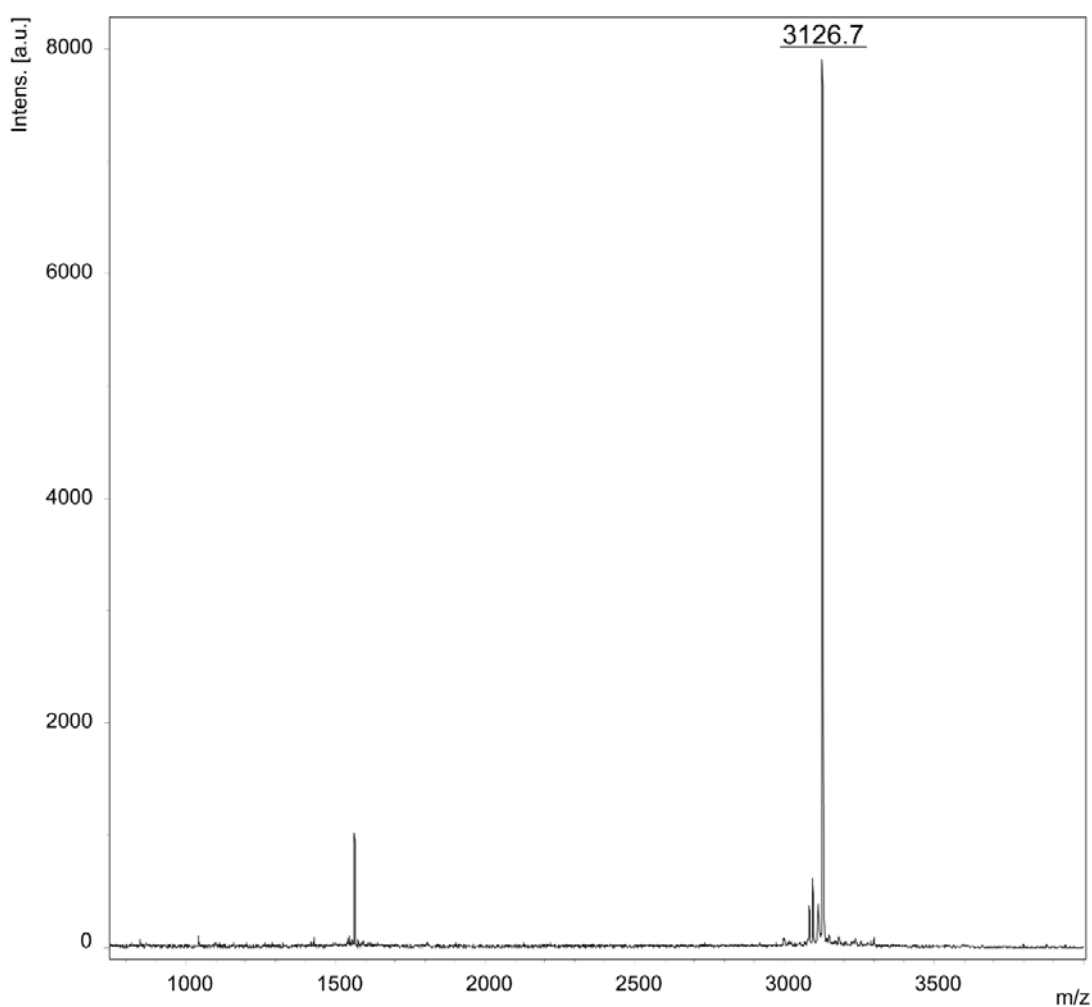


Figura 8. Espectro de massas da fração 24 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA), indicando a presença de contaminantes.

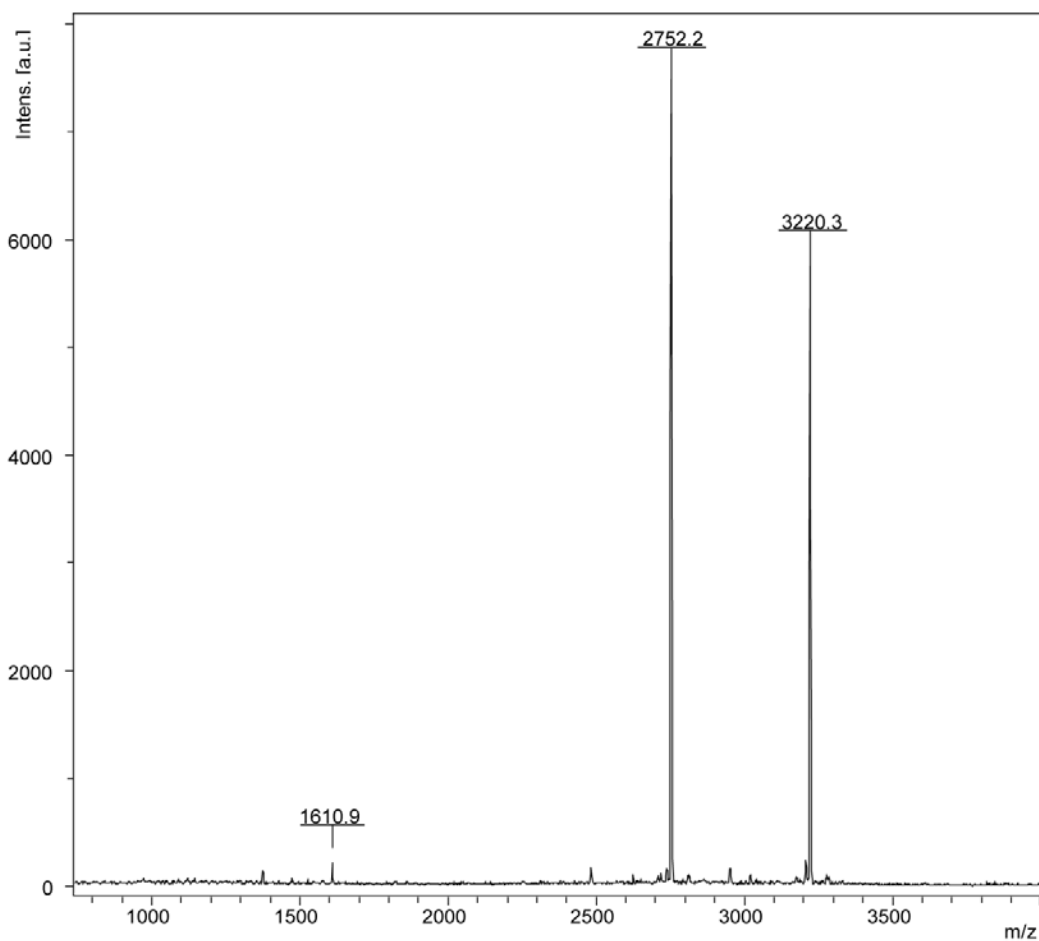


Figura 9. Espectro de massas da fração 26 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA), indicando a presença de contaminantes.

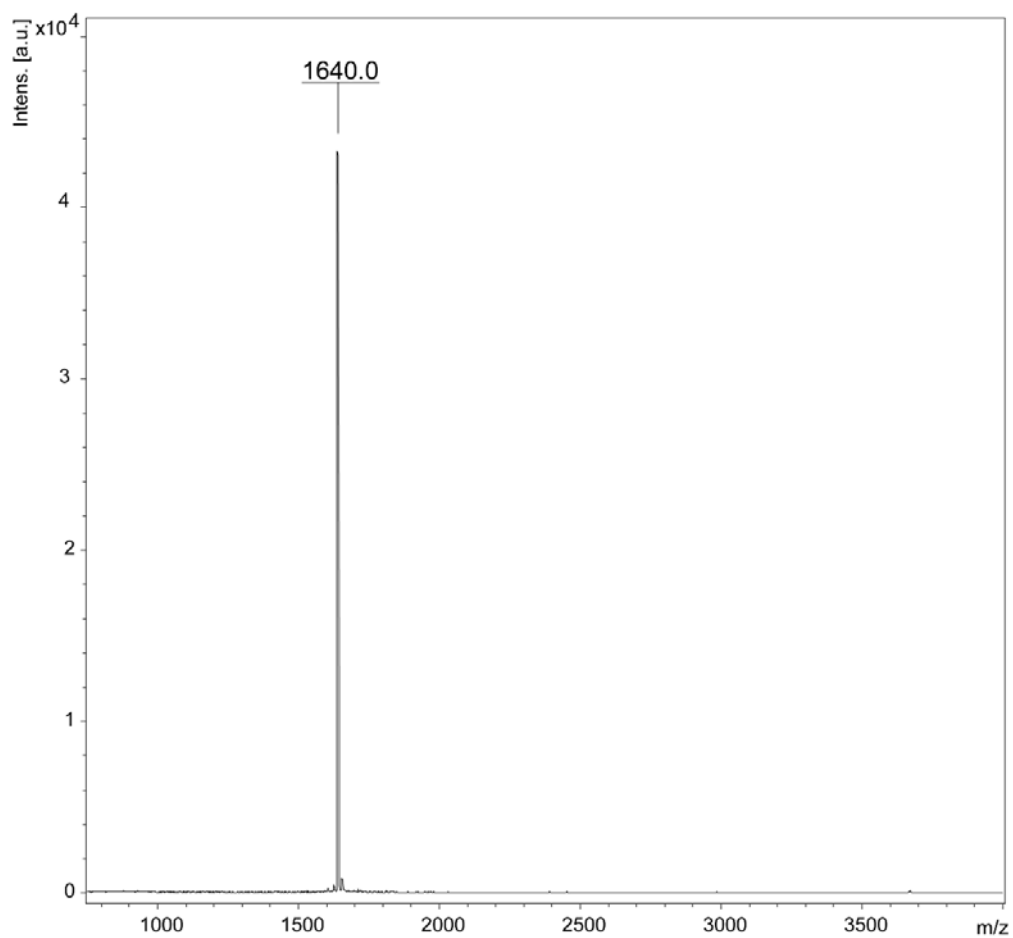


Figura 10. Espectro de massas da fração 28 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).

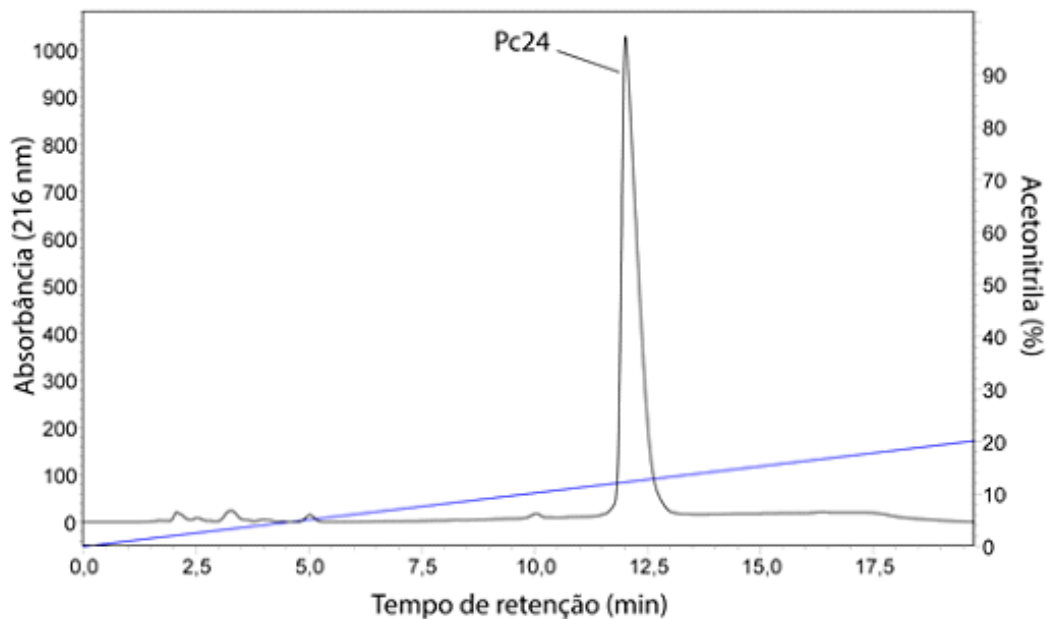


Figura 11. Perfil cromatográfico resultante da recromatografia da fração 24 em coluna de interação hidrofílica (Phenomenex Luna® HILIC 5 µm, 200 Å, 4,6 x 150 mm) em sistema HPLC com fluxo de 1 mL/min e detecção realizada a 216 nm. A fração com atividade antimicrobiana foi novamente nomeada Pc24.

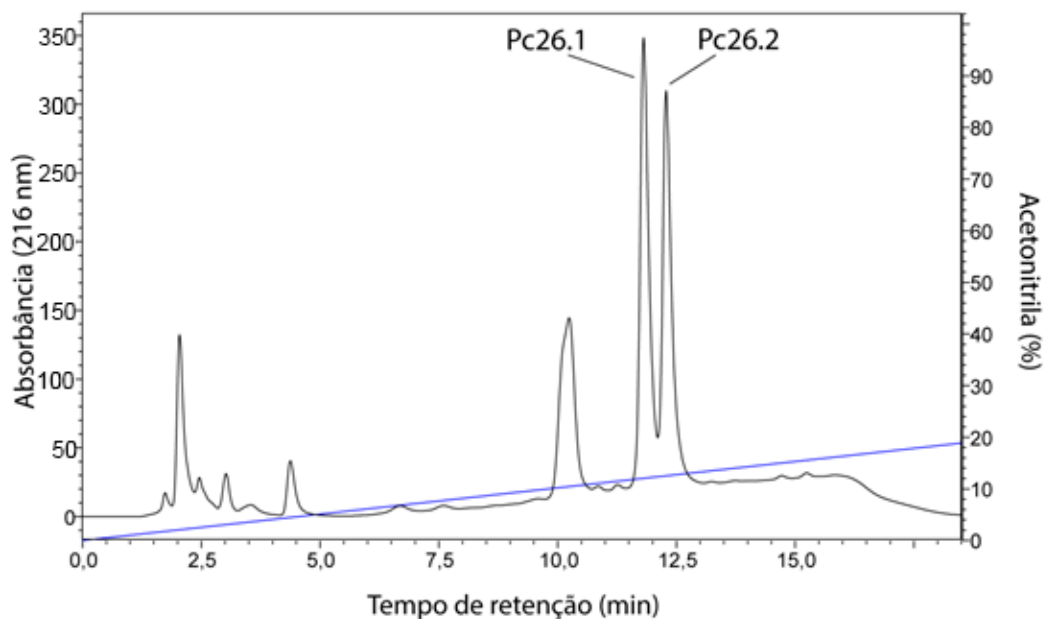


Figura 12. Perfil cromatográfico da recromatografia da fração 26 em coluna de interação hidrofílica (Phenomenex Luna® HILIC 5 µm, 200 Å, 4,6 x 150 mm) em sistema HPLC com um fluxo de 1 mL/min e monitoramento realizado a 216 nm. As frações com atividade antimicrobiana estão indicadas por Pc26.1 e Pc26.2.

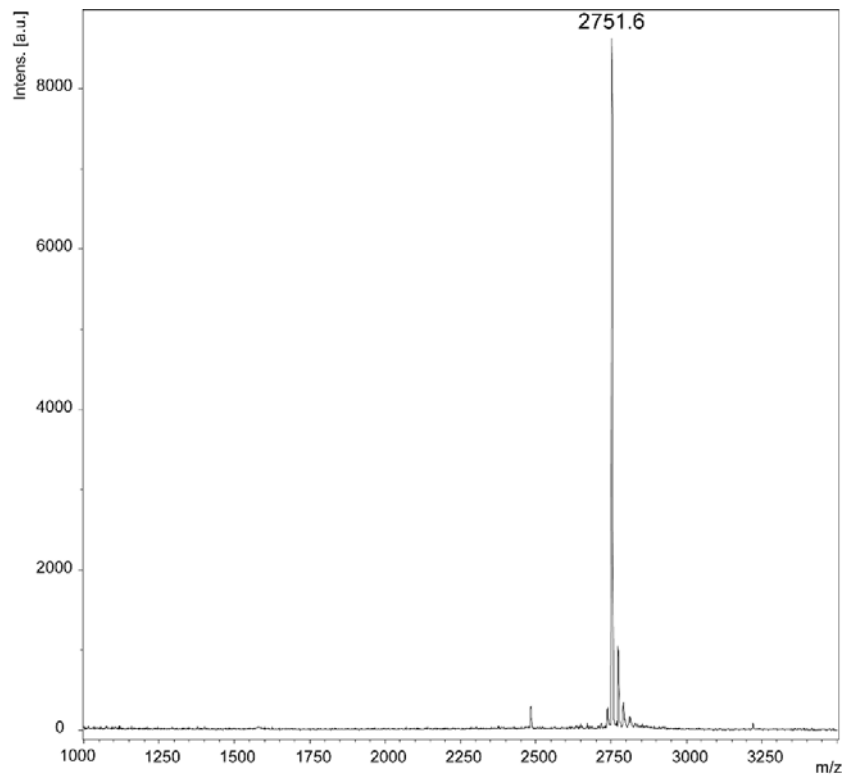
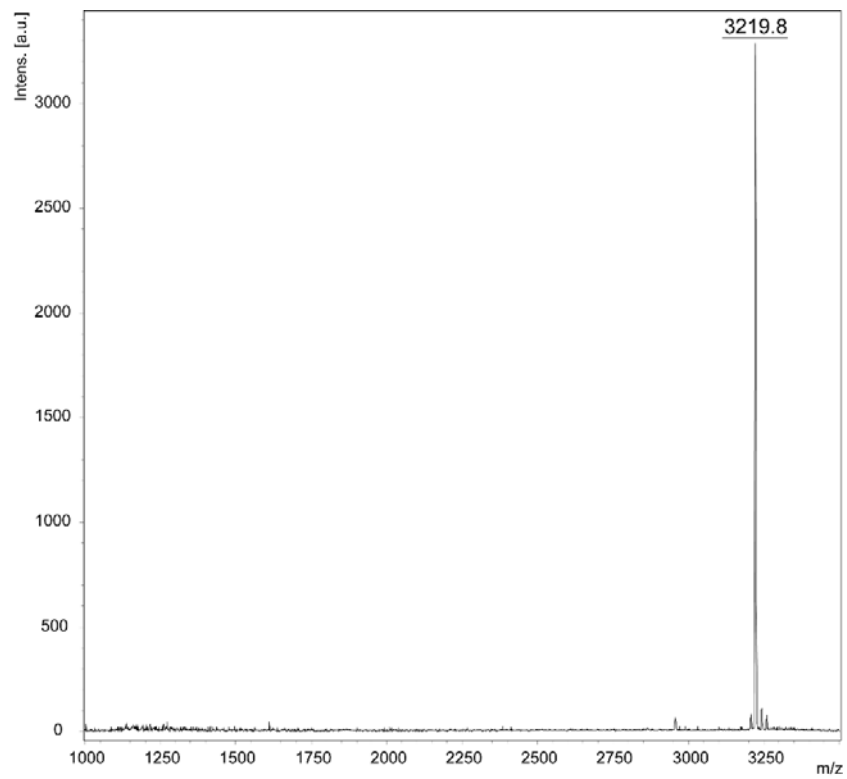
A**B**

Figura 13. Espectros de massas dos peptídeos Pc26.1 (A) e Pc26.2 (B) obtidos em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).

Considerando-se seus grau de homogeneidade como satisfatórios, os quatro peptídeos antimicrobianos de *P. cicada* foram submetidos ao procedimento de sequenciamento químico por degradação de Edman em sistema automatizado. A determinação das estruturas primárias foi possível para os quatro peptídeos purificados, tendo resultado em sequências sem ambiguidades que estão apresentadas na Tabela 2, sendo que, no caso dos peptídeos Pc26.1, Pc26.2 e Pc28 foi assumida a presença de amidação na porção C-terminal, tendo em vista a diferença de 1 Da entre a massa molecular teórica obtida a partir da estrutura primária obtida e a massa molecular experimental determinada nas análises por MALDI-TOF MS.

Tabela 2. Estruturas primárias e características físico-químicas dos peptídeos antimicrobianos isolados da pele do anuro *P. cicada*.

Peptídeo	Estrutura Primária	Massa molecular teórica	Massa molecular experimental	Carga	Razão hidrofóbica (%)
Pc24	¹ GFRDNLKKIAKDMLGQIAGAVAEKPKPSQ ²⁹	3125,7	3125,7	+3	44
Pc26.1	¹ GFKDFMKNIVGKVVGAVVEKFKPSQ.NH ₂ ²⁵	2751,5	2750,6	+4	44
Pc26.2	¹ GFKDFMKNMAKNLVEKVAGAVIEKPKPSQ.NH ₂ ²⁹	3219,8	3218,8	+4	44
Pc28	GLVSGIANTLSGLLGR.L.NH ₂ ¹⁷	1640,0	1639,0	+2	47

As sequências obtidas foram avaliadas quanto à similaridade com outros peptídeos antimicrobianos já descritos na literatura por meio da realização de buscas empregando-se o algoritmo BLAST, o banco de dados APD3 e consulta às referências bibliográficas disponíveis.

O peptídeo Pc24 exibiu índices de identidade de 38% e de similaridade de 53% com o peptídeo hymenochirina-2B (Mechkarska *et al.*, 2012), presente na secreção de *Hymenochirus boettgeri*, da família Pipidae, encontrado na floresta tropical africana; índices de identidade de 38% e de similaridade de 48% com o peptídeo ocellatina-S1 (Dourado *et al.*, 2007), isolado da rã *Leptodactylus syphax*, encontrada nas regiões rochosas da América do Sul; índices de identidade de 37% e de similaridade de 47% com peptídeo brevenina-2ED (Simmaco *et al.*, 1994) isolado da rã *Rana esculenta* da família Ranidae, encontrada na Europa; índices de identidade de 36% e de similaridade de 42% com o peptídeo dermaseptina-A4 (Wechselberger, 1998), isolado do anuro *Agalychnis annae*, uma rã da família Hylidae encontrada nas florestas tropicais da Costa Rica e Panamá e, finalmente, índices de identidade de 30% e de similaridade de 36%

com o peptídeo dahleina 5.4 (Wegener *et al.*, 2001), isolado de *Litoria dahlii*, uma rã aquática da família Hylidae encontrada em planícies de inundação e savanas do norte da Austrália (Figuras 14 e 15).

A			
Pc24	1	----GF-RDNLKKIADMLGQIAGAVAEKPKPSQ	29
		: : : : :	
Hymenochirina-2B	1	LKIPGFVKDTLKKVAKGIFSAVAGA----MTPS-	29
B			
Pc24	1	GFRDNLKKIADMLGQIAGAVAEKPKPSQ	29
		: : :	
Ocellatina-S1	1	GVLDILKGAADLAGHVATKVINKI----	25
C			
Pc24	1	GFRDNLKKIADMLGQIAGAVAEKPKPSQ-	29
		: : :	
Brevinina-2ED	1	GILDSLKLNLAQN-AGQILLNKASCKLSGQC	29
D			
Pc24	1	-GFRDNLKKIADMLGQIA-GAVAEKPKPSQ	29
		: :	
Dermaseptina-A4	1	GMFTNMLKGIGK-LAGQAALGAVKTLA----	26
E			
Pc24	1	GFRDNLKKIADMLGQI----AGAVAEKPKPSQ	29
		: :	
Dahleina 5.4	1	-----GLLGSIGKVLGGYLAEKLPK-	21

Figura 14. Alinhamentos entre as sequências do peptídeo Pc24 isolado da secreção cutânea de *P. cicada* com a dos peptídeos: hymenochirina-2B de *Hymenochirus boettgeri* (A); ocellatina-S1 de *Leptodactylus siphax* (B); brevenina-2ED de *Rana esculeta* (C); dermaseptina-A4 de *Agalychnis annae* (D) e dahleina 5.4 de *Litoria dahlii*. Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10.0; Extend penalty: 0.5.

Dermaseptina-A4	----GMFTNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLA----	26
Hymenochirina-2B	LKIPGFVKDTLKKVAKGIFSAVAG----AMTPS-	29
Dahleina-5.4	-----GLLSIGKVLGG----YLAEKLKPK-	21
Brevenina-2ED	-----GILDSLKNLAKNAGQILLNKASCKLSGQC	29
Pc24	-----GFRDNLKKIAKDMLGQIAGAVAEKPKPSQ	29
Ocellatina-S1	-----GVLDILKGAAKDLAGHVATKVINKI-----	25
	* *	

Figura 15. Alinhamento múltiplo das sequências dos PAMs relacionados na Figura 14 com o peptídeo Pc24 de *P. cicada* revelando os baixos níveis de similaridade entre eles. Os símbolos: (*) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment.

Foi também realizado alinhamento do PAM Pc24 com os peptídeos nattererinas-1, -2 e -3, isolados e caracterizados por Honorato (2009) a partir da secreção cutânea de *Physalaemus nattereri* (anteriormente denominado *Euphemix nattereri*), encontrado frequentemente próximo a corpos d'água permanentes ou temporários em regiões de savana ou cerrado no Brasil, Bolívia e Paraguai. O peptídeo Pc24 apresentou índices de similaridade de 57% com os PAMs nattererinas-1 e -2 e de 63% com a nattererina-3 (Figuras 16 e 17), sendo que em termos de identidade foram observados valores de 37% com a nattererina-1, de 33% com a nattererina-2 e de 47% com a nattererina-3.

A			
Pc24	1	GFRDNLKKIAKDMLGQIAGAVAEKPKPSQ-	29
		: : : : ::	
Nattererina-1	1	GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINKFSPQPQ	30
B			
Pc24	1	GFRDNLKKIAKDMLGQIAGAVAEKPKPSQ-	29
		: : : : :: :	
Nattererina-2	1	GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINRFSPQPQ	30
C			
Pc24	1	GFRDNLKKIAKDMLGQIAGAVAEKPKPSQ-	29
		: : : ::	
Nattererina-3	1	GLKDIIKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ	30

Figura 16. Alinhamento entre a sequência do peptídeo Pc24 de *P. cicada* com as sequências dos peptídeos nattererina-1 (A), nattererina-2 (B) e nattererina-3 (C) de *P. nattereri*. Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10.0; Extend penalty: 0.5.

Pc24	GFRDNLKKIAKDMLGQIAGAVAEKPKSQ-	29
Nattererina-3	GLKDI IKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ	30
Nattererina-1	GLKDMIKNLAKEAAVKLAVINKFSPQPQ	30
Nattererina-2	GLKDMIKNLAKEAAVKLAVINRFSPQPQ	30
	:: :*::** :***** :: *	

Figura 17. Alinhamento múltiplo entre as sequências de Pc24 e as nattererinas-1, -2 e -3. Os símbolos: (*) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment.

O peptídeo Pc26.1 apresentou índices de identidade de 46% e de similaridade de 58% com o peptídeo cruzioseptina-1 (Proaño-Bolaños *et al.*, 2016), isolado de *Cruziophyla calcarifer*, uma rã da família Hylidae encontrada nas florestas tropicais de Equador, Colômbia, Costa Rica e Panamá; índices de identidade de 36% e de similaridade de 40% com o peptídeo desercotocolina-1 (Jackway *et al.*, 2008), isolado de *Crinia desercotocolina* da família Myobatrachidae e endêmico da Austrália; índices de identidade de 24% e de similaridade de 40% com os peptídeos aureina 2.5 e aureina 2.1 (Tyler *et al.*, 2003), ambos isolados de anuros do gênero *Litoria* (*L. aurea* e *L. raniformis*), rãs da família Hylidae e também endêmicas da Austrália e índices de identidade de 27% e de similaridade de 30% com o peptídeo brevenina-2Pte (King *et al.*, 2008), isolado de *Hylarana picturata*, rã da família Ranidae, habitante de florestas de terras baixas em regiões da Ásia (Figuras 18 e 19).

A		
Pc26.1	1	GFKDFMKNIVGKV-VGAVVEKFKPSQ 25
		: : :
Cruzioseptina-1	1	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF---- 21
B		
Pc26.1	1	GFKDFMKNIVGKVVAVVEKFKPSQ 25
		:
Deserticolina-1	1	GLADFLNKAVGKVVDVFKS----- 19
C		
Pc26.1	1	GFKDFMKNIVGKVVAVVEKFKPSQ 25
		: : ::
Aureina 2.5	1	GLFDIVKKVVG-AFGSL----- 16
D		
Pc26.1	1	GFKDFMKNIVGKVVAVVEKFKPSQ 25
		: : ::
Aureina 2.1	1	GLLDIVKKVVG-AFGSL----- 16
E		
Pc26.1	1	GFKDFMKNI---VGKVVAVVEKFKPSQ----- 25
		:
Brevenina-2PTe	1	GFLDSFKNAMIGVAKSVGKTALSTLACKIDKSC 33

Figura 18. Alinhamento entre as seqüências do peptídeo Pc26.1 isolado da secreção cutânea de *P. cicada* com a dos peptídeos: cruzioseptina-1 isolado de *Cruziohyala calcarifer* (A); deserticolina-1 isolado de *Crinia desercotocola* (B); aureina 2.5 de *Litoria aurea* (C); aureina 2.1 de *L. raniformis* (D) e brevenina-2PTe de *Hylarana picturata* (E). Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10.0; Extend penalty: 0.5.

Brevenina-2PTe	GFLDSFKNAMIGVAKSVGKTALSTLACKIDKSC	33
Cruzioseptina-1	GFLDIVKGVGKVALGAVSKL-----F----	21
Aureina_2.5	GLFDIVKKVVGAFGSL-----	16
Pc26.1	GFKDFMKNIVGKVVAVVEK-----FKPSQ	25
Aureina_2.1	GLADFLNKAVGKVVDVFKS-----	19
Deserticolina-1	GLADFLNKAVGKVVDVFKS-----	19
	*: * :	

Figura 19. Alinhamento múltiplo das seqüências dos PAMs relacionados na Figura 18 com o peptídeo Pc26.1 de *P. cicada* revelando os baixos níveis de similaridade entre eles. Os símbolos: (*) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment.

Ao se realizar os alinhamentos do peptídeo Pc26.1 com as nattererinas-1, -2 e -3 observou-se similaridade de 53% com as nattererinas-1, -2 e -3 (Figuras 20 e 21) e

índices de identidade de 40% com a nattererina-1, de 37% com a nattererina-2 e de 40% com a nattererina-3.

A			
Pc26.1	1	GFKDFMKNIIVG----KVVGAVVEKFKPSQ-	25
		: : : :	
Nattererina-1	1	GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINKFSPQPQ	30
B			
Pc26.1	1	GFKDFMKNIIVG----KVVGAVVEKFKPSQ-	25
		: : : :	
Nattererina-2	1	GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINRFSPQPQ	30
C			
Pc26.1	1	GFKDFMKNI----VGKVVGAVVEKFKPSQ-	25
		: : : :	
Nattererina-3	1	GLKDIIKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ	30

Figura 20. Alinhamento entre a sequência do peptídeo Pc26.1 de *P. cicada* com as sequências dos peptídeos nattererina-1 (A), nattererina-2 (B) e nattererina-3 (C) de *P. nattereri*. Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10.0; Extend penalty: 0.5.

Pc26.1	GFKDFMKNI----VGKVVGAVVEKFKPSQ-	25
Nattererina-3	GLKDIIKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ	30
Nattererina-1	GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINKFSPQPQ	30
Nattererina-2	GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINRFSPQPQ	30
	*: * : * : * : * : * : * : * : * : *	

Figura 21. Alinhamento múltiplo entre as sequências de Pc26.1 e as nattererinas-1, -2 e -3. Os símbolos: (*) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment.

O peptídeo Pc26.2 exibiu índices de identidade de 36% e de similaridade de 58% com brevinina-2LF1 (Guo *et al.*, 2014), rã da família Ranidae, encontrada no noroeste da Índia e sul da China; índices de identidade de 42% e de similaridade de 58% com meucina-24 (Gao *et al.*, 2010) de escorpião *Mesobuthus eupeus* da família Buthidae, distribuído pelo leste da Turquia, sul da Rússia, norte da Síria, leste do Iraque, Austrália, norte da China; índices de identidade de 44% e de similaridade de 56% com ranatuerina-2PLx (Chen *et al.*, 2018) do anuro *Rana palustris* da família Ranidae, distribuído na América do Norte; índices de identidade de 34,5% e de similaridade de

55% com ascaphina-4 (Conlon *et al.*, 2004), isolado de *Ascaphus truei*, um anuro da família Ascaphidae encontrado nos Estados Unidos da América (Califórnia, Oregon e Washington) e Canadá (Columbia Britânica) e índices de identidade de 34,5% e de similaridade de 41% com cruzioseptina-1 (Proaño-Bolaños *et al.*, 2016), isolado de *Cruziohyla calcarifer*, uma rã da família Hylidae encontrada nas florestas tropicais de Equador, Colômbia, Costa Rica e Panamá (Figuras 22 e 23).

A			
Pc26.2	1	GFKDFMKNMAKNLVEKVAGAVIEKPKPSQ----	29
		: : : : : :	
Brevinina-2LF-1	1	GFMDTAKNVAKNVAKNVAVTLLDKLRCKVTGGC	33
B			
Pc26.2	1	--GFKDFMKNMAKNLVEKVAGAVIEKPKPSQ	29
		: : : : :	
Meucina-24	1	GRG-REFM----SNLKEKLSG-VKEKMKNS-	24
C			
Pc26.2	1	GFKDFMKNMAKNLVEKVAGAVIEKPKPSQ---	29
		: : :	
Ranatueringa-2PLx	1	GIMDTVKNAAKNL----AGQLLDKPKCSITAC	28
D			
Pc26.2	1	GFKDFMKNMAKNLVEKVAGAVIEKPKPSQ	29
		: : : : : :	
Ascaphina-4	1	GFKDWIKGAACKLIKTVAANIANQ-----	24
E			
Pc26.2	1	GFKDFMKNMAKNLVEKVAGAVIEKPKPSQ	29
		: :	
Cruzioseptina-1	1	GFLDIVKG-----VGKVALGAVSKLF---	21

Figura 22. Alinhamento entre as sequências do peptídeo Pc26.2 isolado da secreção cutânea de *P. cicada* com a dos peptídeos: brevinina-2LF-1 isolado de *Hylarana taipehensis* (A); meucina-24 isolado de *Mesobuthus eupeus* (B); ranatueringa-2PLx isolado de *Rana palustres* (C); ascaphina-4 isolado de *Ascaphus truei* (D) e cruzioseptina-1 isolado de *Cruziohyla calcarifer* (E). Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10.0; Extend penalty: 0.5.

Cruzioseptina-1	GFLDIVKGVGKVALGAVSKLF-----	21
Meucina-24	---GRGREFMSNLKEKLSG-VKEKMKNS-----	24
Brevinina-2LF1	GFMDTAKNVAKNVAKNVAVTLLDKLRCKVTGGC	33
Ranatueterina-2PLx	GIMDTVKNA----AKNLAGQLLDKLRCKSITAC-	28
Pc26.2	GFKDFMKNMAKNLVEKVAGAVIEKPKPSQ----	29
Ascaphina-4	GFKDWIKGAAKLIKTVAAIANQ-----	24
	: ::	

Figura 23. Alinhamento múltiplo das seqüências dos PAMs relacionados na Figura 22 com o peptídeo Pc26.2 de *P. cicada* revelando os baixos níveis de similaridade entre eles. Os símbolos: (*) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment.

Ao se realizar o alinhamento do peptídeo Pc26.2 com as nattererinas pode-se novamente observar altos níveis de similaridade: 70% com a nattererina-3 e 60% com as nattererinas-1 e -2, com índices de idênticas de 50% com a nattererina-1, de 47% com a nattererina-2 e de 57% com a nattererina-3 (Figuras 24 e 25).

A			
Pc26.2	1	GFKDFMKNMAKNLVEKVAGAVIEKPKPSQ-	29
		: : :	
Nattererina-1	1	GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINKFSPQPQ	30
B			
Pc26.2	1	GFKDFMKNMAKNLVEKVAGAVIEKPKPSQ-	29
		: : : :	
Nattererina-2	1	GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINRFSPQPQ	30
C			
Pc26.2	1	GFKDFMKNMAKNLVEKVAGAVIEKPKPSQ-	29
		: : : :	
Nattererina-3	1	GLKDIIKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ	30

Figura 24. Alinhamento entre a seqüência do peptídeo Pc26.2 de *P. cicada* com as seqüências dos peptídeos nattererina-1 (A), nattererina-2 (B) e nattererina-3 (C) de *P. nattereri*. Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10.0; Extend penalty: 0.5.

Pc26.2	GFKDFMKNMAKNLVEKVAGAVIEKPKSQ-	29
Nattererina-3	GLKDI IKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ	30
Nattererina-1	GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINKFSPQPQ	30
Nattererina-2	GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINRFSPQPQ	30
	*:***::***:**: *:*:*:*:*::: *	

Figura 25. Alinhamento múltiplo entre as sequências de Pc26.2 e as nattererinas-1, -2 e -3. Os símbolos: (*) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment.

Finalmente, o peptídeo Pc28 apresentou índices de identidade de 41% e de similaridade de 59% com temporina-ITa (Conlon *et al.*, 2017), isolado de *Rana italica* da família Ranidae, encontrada na Itália e em San Marco; índices de identidade de 52% e de similaridade de 56,5% com plasticina-C1 (Vanhoye *et al.*, 2003), isolado de *Agalychnis callidryas*, um hílideo arborícola nativo das florestas neotropicais e encontrado desde o México, atravessando a América Central até a Colômbia; índices de identidade de 44% e de similaridade de 56% com o peptídeo DFTamP1 (Mishra e Wang, 2012), um peptídeo sintético; índices de identidade de 53% e de similaridade de 53% com o peptídeo peptide#4 (Rončević *et al.*, 2018), isolado de *Rana temporaria* da família Ranidae, uma rã terrestre encontrada em florestas úmidas, comum na Grã-Bretanha e noroeste da Ásia e, por último, índices de identidade de 35% e de similaridade de 53% com o peptídeo frenatina-1, isolado de *Litoria infrafrenata*, espécie nativa das florestas tropicais de Queensland, Nova Guiné, Ilhas Bismarck e Admiralty (Raftery *et al.*, 1996) (Figuras 26 e 27).

A			
Pc28	1	GLVSGIANTLSGLLGRL	17
		: : :	
Temporina-ITa	1	VFLGAIQAQALTSLLGKL	17
B			
Pc28	1	GLVSGIANTLSGLLGRL-----	17
		:	
Plasticina-C1	1	GLLSGILNTAGLLGNLIGSLSN	23
C			
Pc28	1	GLVSGIANTLSGLLGRL-	17
		: .. :	
DFTamP1	1	GLLS-----LLSLLGKLL	13
D			
Pc28	1	GLVSGIANTLSGLLGRL	17
Peptide#4	1	-LVPFIGRTLGGLLARF	16
E			
Pc28	1	GLVSGIANTLSGLLGRL	17
		: : :	
Frenatina-1	1	----GLLDALSGILGL-	12

Figura 26. Alinhamento entre as sequências do peptídeo Pc28 isolado da secreção cutânea de *P. cicada* e a dos peptídeos: temporina-ITa isolado de *Rana italica* (A); plasticina-C1 isolado de *Agalychnis callidryas* (B); DFTamP1, um peptídeo sintético (C); peptide#4 isolado de *Rana temporaria* (D) e frenatina-1 isolado de *Rana infrafrenata* (E). Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10.0; Extend penalty: 0.5.

DFTamP1	-----GLLSLLSLLGKLL-----	13
Temporina-ITa	VFLGAIQAQALTSLLGKL-----	17
Frenatina-1	----GLLDALSGILGL-----	12
Peptide#4	-LVPFIGRTLGGLLARF-----	16
Pc28	GLVSGIANTLSGLLGRL-----	17
Plasticina-C1	GLLSGILNTAGLLGNLIGSLSN	23
	: :*	

Figura 27. Alinhamento múltiplo das sequências dos PAMs relacionados na Figura 26 com o peptídeo Pc28 de *P. cicada* revelando os baixos níveis de similaridade entre eles. Os símbolos: (*) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment.

O alinhamento do peptídeo Pc28 com os PAMs da família das nattererinas revelou os índices de identidade e de similaridade muito baixo: índices de identidade de 17% com as nattererinas-1, -2 e -3 e de similaridade de 20% com a nattererinas-1 e -2 e 23%

com a natterina-3 (Figuras 28 e 29), indicando que provavelmente o PAM Pc28 pertence a uma nova família de peptídeos ainda não descrita.

A			
Pc28	1	GLVSGIANTLSGLLGRL-----	17
		:	
Nattererina-1	1	GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINKFSPQPQ	30
B			
Pc28	1	GLVSGIANTLSGLLGRL-----	17
		:	
Nattererina-2	1	GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINRFSPQPQ	30
C			
Pc28	1	GLVSGIANTLSGLLGRL-----	17
		::	
Nattererina3	1	GLKDI IKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ	30

Figura 28. Alinhamento entre a sequência do peptídeo Pc28 de *P. cicada* com as sequências dos peptídeos nattererina-1 (A), nattererina-2 (B) e nattererina-3 (C) de *P. nattereri*. Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10.0; Extend penalty: 0.5.

Pc28	GLVSGIANTLSG----LLG----RL-----	17
Nattererina-3	GLKDI IKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ	30
Nattererina-1	GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINKFSPQPQ	30
Nattererina-2	GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINRFSPQPQ	30
	** * * : * ::	

Figura 29. Alinhamento múltiplo entre as sequências de Pc28 e as nattererinas-1, -2 e -3. Os símbolos: (*) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment.

Também foram realizadas análises por dicróismo circular dos PAMs de *P. cicada* de modo a se avaliar seu comportamento em água e na presença de micelas de SDS. Os espectros dicróicos obtidos em água e em SDS 35 mM a 25°C estão apresentados na Figura 30, A-D. O percentual de α -hélice foi determinado e está resumido na Tabela 3.

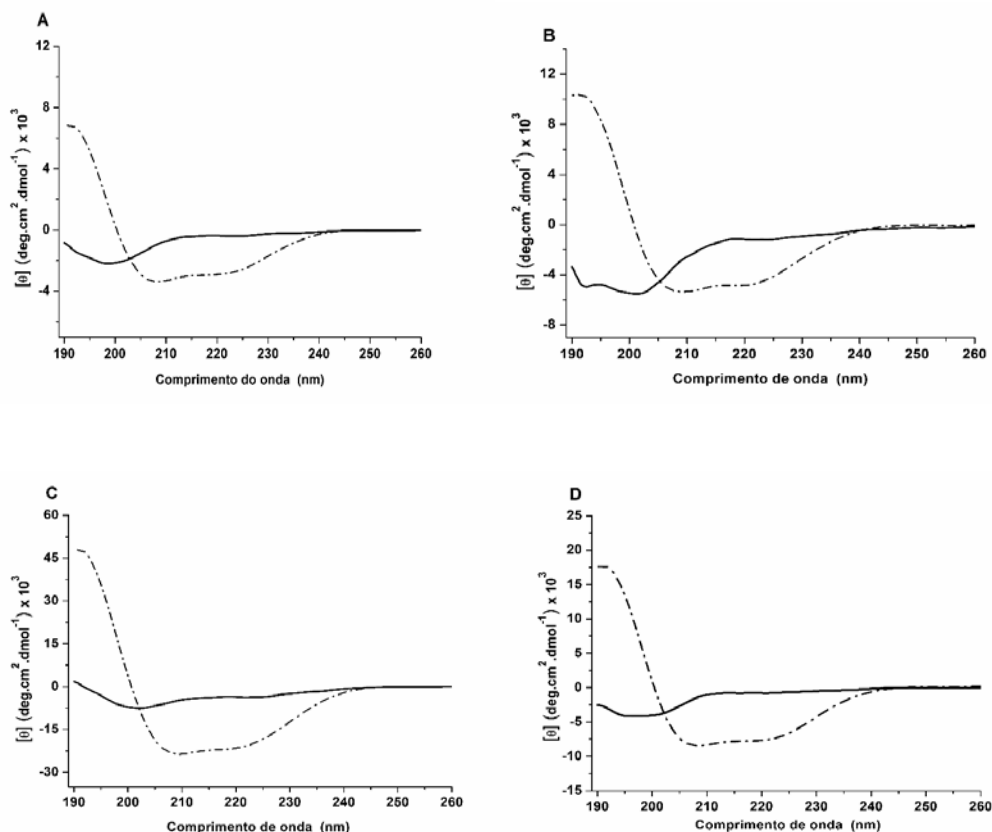


Figura 30. Espectros dicróicos na região distante do ultravioleta dos peptídeos antimicrobianos isolados da secreção de *P. cicada* em água (linha sólida) e em SDS 35 mM (linha tracejada). (A) Pc24; (B) Pc26.1; (C) Pc26.2 e (D) Pc28.

Tabela 3. Conteúdo estimado de α -hélice para os peptídeos Pc24, Pc26.1, Pc26.2 e Pc28 em água e em SDS 35 mM a 25°C.

Peptídeo	Conteúdo (%) de α -hélice	
	Água	SDS
Pc24	13,5	19,9
Pc26.1	19,6	25,1
Pc26.2	25,6	73,3
Pc28	14,9	33,7

Finalmente foram realizados ensaios de microdiluição seriada em meio líquido empregando-se bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas, bem como fungos com crescimento leveduriforme para se avaliar as propriedades antimicrobianas dos peptídeos isolados da secreção de *P. cicada*. Esses ensaios foram realizados

apenas com os PAMs Pc24 e Pc28 nas suas versões sintéticas, uma vez que, os peptídeos Pc26.1 e Pc26.2 foram purificados e caracterizados estruturalmente mais tardiamente, sendo que a caracterização de suas propriedades biológicas encontram-se em andamento. Os valores das CMI's estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4. Efeitos antimicrobianos (CMI's, μM) dos peptídeos isolados da secreção de *P. cicada* sobre bactérias e fungos patogênicos.

Microorganismos	Peptídeos	
	Pc24	Pc28
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4	32
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	16	128
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>128	>128
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	>128	32
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	>128	64

5. DISCUSSÃO

A secreção de anfíbios tem sido alvo de inúmeros estudos ao longo de vários anos e mesmo parecendo uma solução moderna para a crise dos antibióticos, já era amplamente utilizada na medicina secular, como na medicina chinesa onde é empregada como regulador de funções corporais e fertilidade e na medicina egípcia para dor e diarreia (Xu e Lai, 2015). Rica em compostos bioativos, como amins biogênicas, alcaloides, bufadienolídeos e peptídeos, parece estar ganhando cada vez maior importância na busca por novos agentes antimicrobianos, principalmente de natureza peptídica (Nascimento *et al.*, 2003; Conlon *et al.*, 2012; Conlon *et al.*, 2014; Ladram e Nicolas, 2016).

Os PAMs de anuros são moléculas extremamente versáteis, geralmente catiônicas, anfipáticas, adotando conformações diversas para facilitar sua interação quando em contato com membranas biológicas, principalmente a conformação α -helicoidal (Conlon *et al.*, 2014). Seus mecanismos de ação são distintos daqueles exibidos pelos fármacos convencionais, não se ligando a alvos específicos, dificultando assim a seleção de mecanismos de resistência (Ladram e Nicolas, 2016).

No presente estudo, foram isolados e caracterizados quatro peptídeos antimicrobianos a partir da secreção cutânea liberada por eletroestimulação da rã *Physalaemus cicada*, espécie restrita às regiões de caatingas brasileiras.

Os peptídeos de *P. cicada* foram denominados Pc24, Pc26.1, Pc26.2 e Pc28. São peptídeos com massas moleculares entre 1,6 e 3,2 kDa, catiônicos, com carga líquida variando entre +2 e +4 (Tabela 2). Possuem também características anfipáticas com a formação de uma face hidrofóbica graças à presença de resíduos de aminoácidos apolares como isoleucina, valina, metionina, leucina e fenilalanina, uma característica fundamental, juntamente com a cationicidade, para atividade antimicrobiana dos PAMs (Conlon *et al.*, 2014; Ladram e Nicolas, 2016).

A comparação das massas moleculares obtidas por análises em espectrômetro de massas tipo MALDI-TOF com as massas moleculares geradas a partir das estruturas primárias obtidas por sequenciamento químico N-terminal resultou em uma diferença de aproximadamente 1 Da entre a massa teórica e a massa experimental obtida, sugerindo a presença de amidação na porção C-terminal dos peptídeos Pc26.1, Pc26.2 e Pc28. Tal modificação é bastante comum em PAMs de anuros e parece estabilizar a formação de

α -hélices anfipáticas nos PAMs durante sua ligação com a membrana celular, favorecendo a atividade citolítica (Dennison e Phoenix, 2011; Aoki e Ueda, 2013).

A busca por similaridades em bancos de sequências revelaram índices de similaridade na faixa de 40-60% com PAMs já descritos, isolados de outras espécies de anuros das famílias Ascaphidae, Hylidae, Ranidae, Myobatrachidae e Pipidae, como também de escorpião da família Buthidae e com o peptídeo sintético DFTamP1 (Figuras 14, 18, 22 e 26). Tais níveis de similaridade entre os peptídeos em estudo e os PAMs descritos na literatura não permitem classificá-los em nenhuma das famílias de PAMs já identificados (Figuras 15, 19, 23 e 27).

Os peptídeos também foram confrontados com os PAMs da família das nattererinas, isolados de *Physalaemus nattereri* (Honorato, 2009). Os peptídeos Pc24 e Pc26.2 exibiram níveis de similaridade entre 63-70% com a nattererina-3 (Figuras 16 e 24), indicando provavelmente pertencerem a essa família. O peptídeo Pc26.1 exibiu índices de similaridade menores com as nattererinas, em torno de 53% (Figura 20). Já o peptídeo Pc28 exibiu índices de similaridade bem menores que os demais com valores entre 20-23% (Figuras 28) sugerindo não pertencer a essa mesma família de PAMs e que provavelmente pertence a uma família ainda não descrita na literatura.

Em relação à conformação adotada pelos PAMs de *P. cicada*, observou-se que não foram capazes de assumir nenhuma conformação preferencial, apresentando estrutura desordenada em água. Entretanto, na presença de micelas de SDS, adotaram conformação em α -hélice, com a formação de duas bandas negativas em 208 e 222 nm e com um máximo em 195 nm (Figura 30). Esse padrão de espectro dicróico é típico de moléculas ricas em α -hélice (Krittanaei e Johnson, 2000), estrutura adotada por grande parte dos PAMs ao interagirem com a membrana bacteriana (Conlon *et al.*, 2014). A deconvolução dos espectros indicam que Pc26.2 tem mais de 70% de estrutura helicoidal, enquanto os demais peptídeos apresentam entre 20-34% de α -hélice na presença de micelas de SDS (Tabela 3). Esses resultados estão de acordo com dados relatados na literatura para outros PAMs de anuros (Siano *et al.*, 2014).

Os PAMs Pc24 e Pc28 foram produzidos por síntese química e seus efeitos antimicrobianos foram avaliados sobre bactérias patogênicas e sobre a levedura *Candida albicans*. O peptídeo Pc24 mostrou-se ativo sobre as bactérias Gram-negativas testadas com valores de CMIs de 4 μ M para *E. coli* e de 16 μ M para *K. pneumoniae*. Já o peptídeo Pc28 exibiu um espectro de ação mais abrangente, mostrando-se ativo

sobre as bactérias *E. coli* e *S. epidermidis* e sobre a levedura patogênica *C. albicans* (Tabela 4).

Em conclusão, o presente trabalho resultou na purificação e caracterização parcial de 4 peptídeos antimicrobianos presentes na secreção da pele do anuro *P. cicada*, um anuro da família Leptodactylidae, espécie endêmica do Brasil e com distribuição na região da Caatinga brasileira. Esses resultados ressaltam a importância de se expandir os estudos acerca do potencial farmacológico dos anuros da fauna brasileira, englobando espécies de outros biomas, como a Caatinga.

6. PERSPECTIVAS

A partir dos achados do presente estudo (isolamento e caracterização preliminar de peptídeos antimicrobianos do anuro *P. cicada*), espera-se:

- Avançar na caracterização das propriedades antimicrobianas desses PAMs por meio da realização de ensaios complementares de inibição avaliando seus efeitos sobre bactérias multirresistentes, como *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA);
- Avaliar seu potencial terapêutico em combinação com outras drogas antibióticas comercialmente disponíveis;
- Avaliar seus efeitos sobre os microrganismos sensíveis com o emprego de técnicas de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica;
- Produzir, por síntese química, os PAMs Pc26.1 e Pc26.2 e proceder à sua caracterização biológica;
- Avaliar seu potencial antiparasitário sobre protozoários de interesse médico e veterinário, como *Leishmania* sp., *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*;
- Avaliar seus efeitos sobre a replicação de arbovírus (Dengue, Zika, Chikungunya e Febre amarela);
- Avaliar seus efeitos antiproliferativos e citotóxicos sobre diferentes linhagens de células de mamíferos, incluindo células tumorais e não-tumorais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken, A., Learmonth M., 2002. *Protein determination by UV absorption*. In The Protein Protocols Handbook (ed. Walker JM). Humana Press. pp. 3–6.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3), 403-410.
- Aminov, R., 2017. History of antimicrobial drug discovery: major classes and health impact. *Biochem. Pharmacol.* 133, 4–19.
- Andersson, D.I., Hughes, D., Kubicek-Sutherland, J.Z., 2016. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist. Updat.* 26, 43–57.
- Arzabe, C., Silvano, D., 2004. *Physalaemus cicada*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T57246A11608322. Disponível em <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T57246A11608322.en>.
- Aoki, W., Ueda, M., 2013. Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics. *Pharmaceuticals (Basel)*6(8), 1055-1081.
- Bahar, A.A., Ren, D., 2013. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*. 6(12), 1543-1575.
- Band, V.I., Weiss, D.S., 2015. Mechanisms of antimicrobial peptide resistance in Gram-negative bacteria. *Antibiotics (Basel)* 4(1), 18-41.
- Belas, R., Manos, J., Suvanasuthi, R., 2004. *Proteus mirabilis* ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. *Infect Immun.* 72(9), 5159-5167.
- Benício, R.A., Da Silva, G.R., Fonseca, M.G., 2012. *Physalaemus cicada* Bokermann, 1966 (Anura: Leiuperidae): distribution extension. *Check List* 8(4), 630-631.
- Bjellqvist, B., Hughes, G.J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J.C., Frutiger, S., Hochstrasser, D., 1993. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14(10), 1023-1031.
- Brennan, Z. 2016. Long-awaited UN report calls for breaking link between drug R&D costs and prices. *Regulatory Focus*. Disponível em <<https://www.raps.org/regulatory-focus%E2%84%A2/news-articles/2016/9/long-awaited-un-report-calls-for-breaking-link-between-drug-r-d-costs-and-prices>>.
- Carvalho, L.A.C., MacHini, M.T., 2013. Hemocidinas derivadas da hemoglobina:

- Estruturas, propriedades e perspectivas. Quim. Nova 36, 1021–1029.
- Chen, X., Zhang, L., Ma, C., Zhang, Y., Xi, X., Wang, L., Zhou, M., Burrows, J.F., Chen, T. 2018. A novel antimicrobial peptide, Ranatuerin-2PLx, showing therapeutic potential in inhibiting proliferation of cancer cells. Biosci Rep. 38(6). pii: BSR20180710.
- Chung, P.Y., Khanum, R., 2017. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. J Microbiol Immunol Infect. 50(4), 405-410.
- Cole, J.N., Nizet, V., 2016. Bacterial evasion of host antimicrobial peptide defenses. Microbiol Spectr. 4(1).
- Conlon, J.M., 2012. The potential of frog skin antimicrobial peptides for development into therapeutically valuable anti-infective agents. ACS Symp. Ser. 1095, 47–60.
- Conlon, J.M., Mechkarska, M., Lukic, M.L., Flatt, P.R., 2014. Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti-cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agents. Peptides 57, 67-77.
- Conlon, J.M., Musale, V., Attoub, S., Mangoni, M.L., Leprince, J., Coquet, L., Jouenne, T., Abdel-Wahab, Y.H.A., Flatt, P.R., Rinaldi, A.C., 2017. Cytotoxic peptides with insulin-releasing activities from skin secretions of the Italian stream frog *Rana italica* (Ranidae). J. Pept. Sci. 23, 769–776.
- Conlon, J.M., Sonnevend, A., Davidson, C., Smith, D.D., Nielsen, P.F., 2004. The ascaphins: a family of antimicrobial peptides from the skin secretions of the most primitive extant frog, *Ascaphus truei*. Biochem Biophys Res Commun. 320(1), 170-175.
- Conly, J.M., Johnston, B., 2005. Where are all the new antibiotics? The new antibiotic paradox. Can J Infect Dis Med Microbiol. 16, 159–160.
- da Costa, J.P., Cova, M., Ferreira, R., Vitorino, R., 2015. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 2023–2040.
- de Breij, A., Riool, M., Cordfunke, R.A., Malanovic, N., de Boer, L., Koning, R.I., Ravensbergen, E.; Franken, M.; van der Heijde, T.; Boekema, B. K.; Kwakman, P. H.S., Kamp, N., El Ghalbzouri, A., Lohner, K., Zaat, S.A.J., Drijfhout, J.W., Nibbering, P.H., 2018. The antimicrobial peptide SAAP-148 combats drug-resistant bacteria and biofilms. Sci. Transl. Med. 10(423), pii: eaan4044.
- Dennison, S.R., Phoenix, D.A., 2011. Influence of C-terminal amidation on the efficacy of modelin-5. Biochemistry 50, 1514–1523.

- Dourado, F.S., Leite, J.R.S.A., Silva, L.P., Melo, J.A.T., Bloch, C., Schwartz, E.F., 2007. Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus siphax*. *Toxicon* 50, 572–580.
- Ebenhan, T., Gheysens, O., Kruger., H.G., Zeevaart., J.R., Sathekge, M.M., 2014. Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. *Biomed Res. Int.* 2014, Article ID 867381.
- Epand, R.M., Walker, C., Epand, R.F., Magarvey, N.A., 2016. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858, 980–987.
- Frost, D.R., 2019. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.php>.
- Gao, B., Xu, J., Rodriguez Mdel, C., Lanz-Mendoza, H., Hernández-Rivas, R., Du, W., Zhu, S., 2010. Characterization of two linear cationic antimalarial peptides in the scorpion *Mesobuthus eupeus*. *Biochimie* 92, 350–359.
- Greenfield, N., Fasman, G.D., 1969. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*. 8(10), 4108-4116.
- Guo, C., Hu, Y., Li, J., Liu, Y., Li, S., Yan, K., Wang, X., Liu, J., Wang, H., 2014. Identification of multiple peptides with antioxidant and antimicrobial activities from skin and its secretions of *Hylarana taipehensis*, *Amolops lifanensis*, and *Amolops granulatus*. *Biochimie* 105, 192–201.
- Honorato, C.T., 2009. Análise peptidômica da secreção cutânea do anuro *Eupemphix nattereri* com ênfase na prospecção de peptídeos antimicrobianos. Dissertação de Mestrado (Biologia Animal). Universidade de Brasília.
- Jackway, R.J., Musgrave, I.F., Surinya-Johnson, K.H., Llewellyn, L.E., Maselli, V.M., Bowie, J.H., Pukala, T.L., Donnellan, S.C., Tyler, M.J., Doyle, J.R., Liu, Y., 2008. Disulfide-containing peptides from the glandular skin secretions of froglets of the genus *Crinia*: structure, activity and evolutionary trends. *Regul. Pept.* 151, 80–87.
- Joo, H.-S., Fu, C.-I., Otto, M., 2016. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 371, 20150292.
- Kalvaitis, K., 2008. Penicillin: an accidental discovery changed the course of medicine. *Endocr. Today* 6, 24.
- King, J.D., Conlon, J.M., Vaudry, H., Jouenne, T., Kolodziejek, J., Leprince, J., Coquet, L., Nowotny, N., 2008. Characterization of antimicrobial peptides from the skin

- secretions of the Malaysian frogs, *Odorrana hosii* and *Hylarana picturata* (Anura: Ranidae). *Toxicon* 52, 465–473.
- König, E., Bininda-Emonds, O.R.P., Shaw, C., 2015. The diversity and evolution of anuran skin peptides. *Peptides* 63, 96–117.
- Krittanaï, C., Johnson, W.C., 1997. Correcting the circular dichroism spectra of peptides for contributions of absorbing side chains. *Anal Biochem.* 253(1), 57-64.
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J.N., Straus, S.K., 2018. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*. *Biomolecules* 8(1), pii: E4.
- Ladram, A., Nicolas, P., 2016. Antimicrobial peptides from frog skin: biodiversity and therapeutic promises. *Front Biosci (Landmark Ed)* 21, 1341-71.
- Le, C.F., Fang, C.M., Sekaran, S.D., 2017. Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61(4). pii: e02340-16.
- Lee, T.H., Hall, K.N., Aguilar, M.I., 2015. Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: a focus on the role of membrane structure. *Curr. Top. Med. Chem.* 16, 25-39.
- Lu, C.X., Nan, K.J., Lei, Y., 2008. Agents from amphibians with anticancer properties. *Anticancer Drugs* 19(10), 931-939.
- Malanovic, N., Lohner, K., 2016. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858, 936–946.
- Mechkarska, M., Prajeep, M., Coquet, L., Leprince, J., Jouenne, T., Vaudry, H., King, J.D., Conlon, J.M., 2012. The hymenochirins: A family of host-defense peptides from the Congo dwarf clawed frog *Hymenochirus boettgeri* (Pipidae). *Peptides* 35, 269–275.
- Mishra, B., Wang, G., 2012. *Ab initio* design of potent anti-MRSA peptides based on database filtering technology. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 12426–12429.
- Nascimento, A.C., Fontes, W., Sebben, A., Castro, M.S., 2003. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein Pept Lett.* 10(3), 227-238.
- Nawrocki, K., Crispell, E., McBride, S., 2014. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. *Antibiotics* 3, 461–492.
- O'Neill, J., 2016. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations - The review on antimicrobial resistance. Disponível em

- https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf.
- Ohland, C.L., Jobin, C., 2015. Microbial activities and intestinal homeostasis: a delicate balance between health and disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 1, 28–40.
- Organização Mundial da Saúde (OMS), 2012. A crescente ameaça da resistência antimicrobiana - Opções de Ação - Sumário Executivo. Disponível em https://www.afro.who.int/sites/default/files/2017-06/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf.
- Pace, C.N., Shirley, B.A., Thomson, J.A., 1989. Measuring conformational stability of a protein. In *Protein structure: A practical approach* (ed. Creighton, T.E.). Oxford University Press, Oxford, UK.
- Pendleton, J.N., Gorman, S.P., Gilmore, B.F., 2013. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 11, 297–308.
- Pletzer, D., Coleman, S.R., Hancock, R.E. 2016, Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr Opin Microbiol.* 33, 35-40.
- Proaño-Bolaños, C., Zhou, M., Wang, L., Coloma, L.A., Chen, T., Shaw, C., 2016. Peptidomic approach identifies cruzioseptins, a new family of potent antimicrobial peptides in the splendid leaf frog, *Cruziohyla calcarifer*. *J. Proteomics* 146, 1–13.
- Rex, J.H., Eisenstein, B.I., Alder, J., Goldberger, M., Meyer, R., Dane, A., Friedland, I., Knirsch, C., Sanhai, W.R., Tomayko, J., Lancaster, C., Jackson, J., 2013. A comprehensive regulatory framework to address the unmet need for new antibacterial treatments. *Lancet Infect. Dis.* 13, 269–275.
- Rice, P., Longden, I., Bleasby, A., 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* 16, 276-277.
- Rončević, T., Gerdol, M., Spazzali, F., Florian, F., Mekinić, S., Tossi, A., Pallavicini, A., 2018. Parallel identification of novel antimicrobial peptide sequences from multiple anuran species by targeted DNA sequencing. *BMC Genomics* 19, 827.
- Salditt, T., Li, C., Spaar, A., 2006. Structure of antimicrobial peptides and lipid membranes probed by interface-sensitive X-ray scattering. *Biochim Biophys Acta.* 1758(9), 1483-1498.
- Santajit, S., Indrawattana, N., 2016. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed Res Int.* 2475067.
- Segalla, M.V., Caramaschi, U., Cruz, C.A.G., Grant, T., Haddad, C.F.B., Garcia, P.C.A.,

- Berneck, B.V.M., Langone, J.A., 2016. Brazilian amphibians: list of species. *Herpetologia Brasileira* 5(2), 34-46.
- Siano, A., Húmpola, M.V., de Oliveira, E., Albericio, F., Simonetta, A.C., Lajmanovich, R., Tonarelli, G.G., 2014. Antimicrobial peptides from skin secretions of *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). *J Nat Prod.* 77(4), 831-841.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011 Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 7, 539.
- Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D., Bossa, F., 1994. Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNAs encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides. *J. Biol. Chem.* 269, 11956–11961.
- Sousa, L.Q., Machado, K.D., Oliveira, S.F., Araújo, L.D., Monção-Filho, E.D., Melo-Cavalcante, A.A, Vieira-Júnior, G.M., Ferreira, P.M., 2017. Bufadienolides from amphibians: A promising source of anticancer prototypes for radical innovation, apoptosis triggering and Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase inhibition. *Toxicon* 127, 63-76.
- Spellberg, B., 2014. The future of antibiotics. *Crit. Care* 18, 228.
- Tyler, M.J., Carver, J.A., Wallace, J.C., Wegener, K.L., Bowie, J.H., Olver, I.N., Rozek, T., 2003. The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. *Eur. J. Biochem.* 267, 5330–5341.
- Van Hecke, O., Wang, K., Lee, J.J., Roberts, N.W., Butler, C.C. 2017. Implications of antibiotic resistance for patients' recovery from common infections in the community: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 65(3), 371-382.
- Vanhoye, D., Bruston, F., Nicolas, P., Amiche, M., 2003. Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *Eur. J. Biochem.* 270, 2068–2081.
- Wang, G., Li, X., Wang, Z., 2016. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* 44, D1087–D1093.
- Wechselberger, C., 1998. Cloning of cDNAs encoding new peptides of the dermaseptin-family. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1388, 279–283.
- Wegener, K.L., Brinkworth, C.S., Bowie, J.H., Wallace, J.C., Tyler, M.J., 2001. Bioactive

dahlein peptides from the skin secretions of the Australian aquatic frog *Litoria dahlii*: sequence determination by electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, 1726–1734.

Xu, X., Lai, R., 2015. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. *Chem. Rev.* 115, 1760–1846.

Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415(6870), 389-395.