



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Síntese química e caracterização das propriedades biológicas do
peptídeo antimicrobiano Raniseptina-BI 1 presente na secreção
cutânea do anuro *Boana lundii***

Autora: Brunna de Oliveira Silva

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Brasília

2021



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Síntese química e caracterização das propriedades biológicas do peptídeo antimicrobiano Raniseptina-BI 1 presente na secreção cutânea do anuro *Boana lundii*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Autora: Brunna de Oliveira Silva

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Brasília

2021



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Síntese química e caracterização das propriedades biológicas do peptídeo antimicrobiano Raniseptina-BI 1 presente na secreção cutânea do anuro *Boana lundii*

Autora: Brunna de Oliveira Silva

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Mariana S. Castro

Presidente

Departamento de Ciências Fisiológicas/IB

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Fernanda de Assis Araújo

Membro Titular

Departamento de Fisiologia/ICB

Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Dra. Lorena Carneiro Albernaz

Membro Titular

Departamento de Farmácia/FS

Universidade de Brasília

Dedicatória

Dedico aos meus pais, Fátima e Carlos Roberto, pelo amor, apoio e incentivo aos estudos que sempre tive deles. Aos meus irmãos, Jéssica e Matheus, meus companheiros, que também sempre me apoiaram nos meus estudos.

“O Senhor é meu Pastor, e nada me faltará”. (Salmo 23)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois ele é meu refúgio e amparo, e sem ele nada sou.

À minha família, que são minha base, meus tesouros, e sempre me incentivaram na minha formação acadêmica. Agradeço aos meus amigos, que sempre me apoiaram nos meus estudos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Mariana S. Castro, que desde a época de graduação, me abriu as portas do laboratório quando me tornei sua estagiária. Desde então, sigo como aluna de mestrado dela. Obrigada pela sua orientação, paciência e ensinamentos aprendidos durante todos esses anos.

Aos professores Osmino Rodrigues Pires Júnior e Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima, pela co-orientação durante o mestrado e ensinamentos.

Ao professor Wagner Fontes e à aluna Isabelle S. Luz pelos ensaios com neutrófilos.

Ao professor Guilherme Dotto Brand e ao doutorando Thiago Viana de Freitas pela orientação na síntese química do peptídeo Raniseptina-B1 1.

À professora Sônia Maria Freitas e à Dra. Amanda Souza Bernasol pela orientação na realização dos experimentos de dicroísmo circular.

À professora Simoni Campos Dias, da Universidade da Católica de Brasília, pelo auxílio na liofilização do peptídeo sintético.

À mestre Gislene Ferreira Baptista, muito mais que uma colega, tornou-se uma amiga. Obrigada por toda a sua paciência, ensinamentos e risadas. Como ela mesmo diz: Minha ruivinha!

Ao mestre Carlos José Correia de Santana pela ajuda e lições aprendidas durante a execução do presente trabalho.

Aos meus colegas de trabalho Mariana, Priscila, Joyce, Camila, Gabriel, João, Keven, Ana Luiza pela ajuda e companhia durante o período do mestrado.

Ao técnico Nuno Manuel Domingues pela disposição de sempre me ajudar no MALDI.

A todos os demais colegas do Laboratórios de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP), pela companhia e incentivo durante este tempo.

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

APOIO FINANCEIRO

A dissertação de mestrado intitulada “Síntese química e caracterização das propriedades biológicas do peptídeo antimicrobiano Raniseptina-B1 1 presente na secreção cutânea do anuro *Boana lundii*” desenvolvida por Brunna de Oliveira Silva sob a orientação da Profa. Dra. Mariana S. Castro teve o apoio financeiro do CNPq, da FAPDF, da CAPES (por meio da concessão de bolsa de estudos – mestrado), da FINEP (CT-INFRA) e do DPG e DPI - UnB.

RESUMO

O uso indiscriminado de antibióticos tem contribuído para o aumento da prevalência de doenças patogênicas promovidas por microrganismos multirresistentes ao redor do mundo, o que representa um sério risco para a saúde humana. Diante desse quadro, a busca por novos agentes antimicrobianos tem mobilizado a comunidade científica. Os anuros possuem glândulas em sua pele que produzem e secretam uma grande variedade de compostos bioativos, dentre eles merecem destaque os peptídeos biologicamente ativos. Estas moléculas apresentam uma extensa gama de bioatividades, incluindo atividade antimicrobiana, imunomoduladora, antiviral e antitumoral. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) ou peptídeos de defesa do hospedeiro (HDPs) surgem como uma alternativa para enfrentar as infecções por microrganismos multirresistentes. O presente estudo teve como objetivo geral a síntese química e a caracterização das propriedades biológicas do peptídeo antimicrobiano Raniseptina-BI 1 identificado na secreção cutânea do anuro *Boana lundii*, espécie endêmica do Brasil. A Raniseptina-BI 1 foi sintetizada manualmente com o emprego do método Fmoc/tBu. O peptídeo bruto foi purificado empregando-se RP-HPLC em uma coluna C₁₈, resultando na obtenção do peptídeo sintético com alto grau de pureza o que foi confirmado por análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF observando-se a presença de um único componente com massa molecular protonada igual a 2724,2 Da, correspondendo ao peptídeo nativo isolado por Naywara Araújo, em 2018, a partir da secreção cutânea do anuro *B. lundii*. O peptídeo Raniseptina-BI 1 representa o primeiro peptídeo da família das raniseptinas isolado da espécie *B. lundii* exibindo elevados índices de identidade e de similaridade com as Raniseptinas 3 e 13, previamente identificadas na pele do anuro *Boana raniceps*. A análise por dicroísmo circular, na presença de micelas de SDS, evidenciou que o peptídeo Raniseptina-BI 1 assume uma conformação de estrutura secundária predominante em α -hélice, com helicidade de 82,7%. A raniseptina-BI 1 sintética foi testada contra 4 bactérias e 2 espécies de fungos patogênicos. O peptídeo foi efetivo na inibição do crescimento das bactérias Gram-positivas com valores de MIC de 4 μ M para *Staphylococcus aureus* e de 2 μ M para *S. epidermidis*. No caso das bactérias Gram-negativas testadas, observou-se uma maior atividade da Raniseptina-BI 1, com valores de 0,5 μ M para *Escherichia coli* e de 1 μ M para *Klebsiella pneumoniae*. O peptídeo também foi efetivo inibindo o crescimento das leveduras patogênicas *Candida albicans* apresentando valor de MIC de 8 μ M e *Cryptococcus neoformans* com MIC igual a 64 μ M. Sua capacidade de lisar eritrócitos humanos também foi avaliada, exibindo uma taxa de hemólise moderada, menor que 40%, na maior concentração empregada (128 μ M). Já na região dos valores de MICs determinados para as bactérias testadas (0,5–4 μ M), a porcentagem de hemólise ficou abaixo de 10%, indicando uma baixa atividade citolítica. As alterações morfológicas sofridas pela bactéria Gram-negativa *E. coli* tratada com o peptídeo Raniseptina-BI 1 foram avaliadas por microscopia eletrônica de

varredura (MEV). As bactérias tratadas nas diferentes concentrações (2, 4 e 8 μM) apresentaram rugosidades, irregularidades e deformidades na superfície celular. Também analisou-se os efeitos do peptídeo Raniseptina-B1 1 na imunidade inata por meio da avaliação da influência na modulação da capacidade fagocítica e da produção de NETs por neutrófilos humanos. A incubação de neutrófilos com a Raniseptina-B1 1, apesar de aparentemente influenciar o resultado, não teve validação estatística no caso da atividade fagocítica e da produção de NETs. Houve uma aparente interação entre a Raniseptina-B1 1 e o fMLP na produção de NETs, no entanto não houve comprovação estatística pelo ANOVA de 2 vias do ponto central. Analisando-se os parâmetros das retas, houve uma diferença significativa no coeficiente linear entre neutrófilos quiescentes e a combinação Raniseptina-B1 1 e fMLP que sugere uma possível ação combinada, talvez sinérgica entre eles, de forma que juntos são possivelmente capazes de induzir formação de NETs. A Raniseptina-B1 1 exibiu propriedades antimicrobianas promissoras, com valores de MIC na faixa de 0,5 a 8 μM para os microrganismos testados, além de uma baixa atividade hemolítica (menos de 10% de hemólise na faixa detectada para os MICs). Esse conjunto de resultados sinaliza o potencial da Raniseptina-B1 1 em servir como modelo para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos de modo a superar a atual crise associada a resistência microbiana aos antibióticos comercialmente disponíveis.

Palavras-chave: Anuros, *Boana lundii*, peptídeo antimicrobiano, Raniseptina-B1 1, síntese química.

ABSTRACT

The indiscriminate use of antibiotics has contributed to the increase in the prevalence of pathogenic diseases promoted by multidrug-resistant microorganisms around the world, which represents a serious risk to human health. Given this situation, the search for new antimicrobial agents has mobilized the scientific community. Anurans have glands in their skin that produce and secrete a wide variety of bioactive compounds, including biologically active peptides. These molecules have an extensive range of bioactivities, such as antimicrobial, immunomodulatory, antiviral and antitumor activities. Antimicrobial peptides (AMPs) or host defense peptides (HDPs) have emerged as an alternative to face infections by multidrug-resistant microorganisms. The aim of the present work was to perform the chemical synthesis and characterization of the biological properties of the antimicrobial peptide Raniseptin-BI 1 found in the cutaneous secretion of the anuran *Boana lundii*, an endemic species in Brazil. Raniseptin-BI 1 was manually synthesized using the Fmoc/tBu method. The crude peptide was purified using RP-HPLC on a C₁₈ column, resulting in the synthetic peptide with a high degree of purity, which was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry analysis, observing the presence of a single component with a protonated molecular mass equal to 2724.2 Da, corresponding to the native peptide isolated by Naywara Araújo, in 2018, from the cutaneous secretion of the anuran *B. lundii*. Raniseptin-BI 1 represents the first peptide of the raniseptin family isolated from the species *B. lundii* exhibiting high identity and similarity indices with Raniseptins 3 and 13, previously identified in the skin of the anuran *B. raniceps*. Circular dichroism analysis, in the presence of SDS micelles, showed that Raniseptin-BI 1 assumed a predominant secondary structure conformation in α -helix, with a helicity of 82.7%. The synthetic raniseptin-BI 1 was tested against 4 bacteria and 2 species of pathogenic fungi. The peptide was effective in inhibiting the growth of Gram-positive bacteria with MIC values of 4 μ M for *Staphylococcus aureus* and 2 μ M for *S. epidermidis*. In the case of the Gram-negative bacteria tested, a higher activity of Raniseptin-BI 1 was observed, with values of 0.5 μ M for *Escherichia coli* and 1 μ M for *Klebsiella pneumoniae*. The peptide was also effective in inhibiting the growth of pathogenic yeasts *Candida albicans* with a MIC value of 8 μ M and *Cryptococcus neoformans* with a MIC equal to 64 μ M. Its ability to lyse human erythrocytes was also evaluated, showing a moderate hemolysis rate, less than 40%, at the highest concentration used (128 μ M). In the region of the MICs values determined for the tested bacteria (0.5–4 μ M), the percentage of hemolysis was below 10%, indicating a low cytolytic

activity. The morphological changes suffered by the Gram-negative bacteria *E. coli* treated with raniseptin-BI 1 were evaluated by scanning electron microscopy (SEM). Bacteria treated at different concentrations (2, 4 and 8 μM) showed roughness, irregularities, and deformities on the cell surface. We also analyzed the effects of the peptide Raniseptin BI 1 on innate immunity by evaluating its influence on the modulation of the phagocytic capacity and the production of NETs by human neutrophils. The incubation of neutrophils with Raniseptin-BI 1, despite apparently influencing the result, did not have statistical validation in the case of phagocytic activity and NET production. There is an apparent interaction between Raniseptin-BI 1 and fMLP in the production of NETs, however there was no statistical confirmation by 2-way ANOVA of the central point. Analyzing the straight line parameters, there is a significant difference in the linear coefficient between quiescent neutrophils and the combination of Raniseptin-BI 1 and fMLP, which suggests a possible combined action, perhaps synergistic between them, in a way that together they are probably able to induce the formation of NETs. Raniseptin-BI 1 exhibited promising antimicrobial properties, with MIC values ranging from 0.5 to 8 μM for the microorganisms tested, in addition to a low hemolytic activity (less than 10% hemolysis in the range detected for MICs). This set of results signals the potential of Raniseptin-BI 1 to serve as a model for the development of new antimicrobial agents in order to overcome the current crisis associated with microbial resistance to commercially available antibiotics.

Keywords: Anurans, *Boana lundii*, antimicrobial peptides, Raniseptin-BI 1, chemical synthesis.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Antibióticos e resistência microbiana	21
1.2. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)	22
1.2.1. Ação dos PAMs na membrana celular bacteriana	23
1.2.2. Resistência microbiana aos PAMs	26
1.3. Imunidade inata	27
1.3.1. Neutrófilos	28
1.3.2. Fagocitose	28
1.3.3. NETs	29
1.3.4. PAMs com atividade imunomodulatória	30
1.4. Os anfíbios como fonte de peptídeos antimicrobianos	31
1.4.1. Família Hylidae	33
1.4.2. <i>Boana lundii</i>	34
2. JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVOS E METAS	36
3.1. Objetivo geral	36
3.2. Metas estabelecidas	36
4. Materiais e Métodos	37
4.1. Síntese química do peptídeo Raniseptina-BI 1	37
4.2. Purificação do peptídeo raniseptina-BI 1 por cromatografia líquida de alta eficiência	39
4.3. Análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF	39
4.4. Quantificação do peptídeo Raniseptina-BI 1 sintético	39
4.5. Análises computacionais	40
4.6. Análise da estrutura secundária do peptídeo raniseptina-BI 1 por dicroísmo circular	40
4.7. Ensaio <i>in vitro</i>	39
4.7.1. Ensaio antibacteriano	39
4.7.2. Ensaio antifúngico	39
4.7.3. Ensaio hemolítico	40
4.8. Análise da morfologia de <i>E. coli</i> após incubação com o peptídeo Raniseptina-BI 1	41

4.9 Avaliação da capacidade imunomodulatória do peptídeo Raniseptina-BI 1 sobre neutrófilos humanos	41
4.9.1 Separação de neutrófilos.....	42
4.9.2. Ativação de neutrófilos	42
4.9.3. Fagocitose de <i>Saccaromyces cerevisiae</i>.....	42
4.9.4 Avaliação da produção de NET-DNA.....	43
4.10. Análise estatística	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÃO.....	63
7. PERSPECTIVAS.....	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diversidade estrutural de peptídeos antimicrobianos (PAMs)	21
Figura 2. Estrutura esquemática das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	23
Figura 3. Efeitos biológicos dos PAMs	23
Figura 4. Representação esquemática dos principais mecanismos de ação de PAMs sobre membranas procarióticas onde: A) Modelo <i>barrel-stave</i> , B) Modelo poro toroidal, C) Modelo <i>carpet-like</i> . Figura adaptada de McMillan & Coombs, 2020). Imagem criada com https://biorender.com/	24
Figura 5. Ilustração do modelo Shai-Matsuzaki-Huang	25
Figura 6. Formação de NETs	28
Figura 7. Representação esquemática do modo de ação de PAMs ilustrando sua ampla gama de funções imunomoduladoras.....	29
Figura 8. Exemplar adulto de <i>B. lundii</i>	31
Figura 9. Perfil cromatográfico típico do fracionamento por RP-HPLC do peptídeo Raniseptina-BI 1.....	45
Figura 10. Espectro de massas (MALDI-TOF) do peptídeo Raniseptina-BI 1 obtido em modo positivo com uso de refletor (matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico).....	46
Figura 11. Alinhamento múltiplo da sequência do peptídeo Raniseptina-BI 1 com as sequências das Raniseptinas 3 e 13 identificadas na pele de <i>Boana raniceps</i>	47
Figura 12. Alinhamento múltiplo da sequência do peptídeo Raniseptina-BI 1 com as sequências das Raniseptinas 1, 2, 6, 9 e 11 identificadas na pele de <i>Boana raniceps</i>	47
Figura 13. Alinhamento múltiplo entre a sequência do peptídeo Raniseptina-BI 1 com a das Hilinas identificadas na pele de <i>Boana lundii</i>	48
Figura 14. Projeção em roda helicoidal (projeção de Schiffer-Edmundson) da Raniseptina-BI 1	50
Figura 15. Predição da estrutura secundária da Raniseptina-BI 1 gerada pelo servidor Pep2D.....	50
Figura 16. Espectros dicróicos na região distante do UV do peptídeo Raniseptina-BI 1 em água (linha sólida) e em SDS 35 mM (linha pontilhada).....	51
Figura 17. Porcentagem de crescimento das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas após incubação com o peptídeo Raniseptina-BI 1, onde: A) <i>E. coli</i> , B) <i>K. pneumoniae</i> , C) <i>S. aureus</i> e D) <i>S. epidermidis</i>	52
Figura 18. Atividade hemolítica do peptídeo raniseptina-BI 1 em eritrócitos humanos	54
Figura 19. Micrografias da microscopia eletrônica de varredura de células de <i>E. coli</i> após 30 min de tratamento com o peptídeo raniseptina-BI 1	56
Figura 20. Micrografia da microscopia eletrônica de varredura de células de <i>E. coli</i> após 30 min de tratamento com o peptídeo raniseptina-BI 1 na concentração de 2 μ M (4 x MIC).....	57
Figura 21. Fagocitose de leveduras por neutrófilos	58
Figura 22. Avaliação da capacidade fagocitária de neutrófilos expostos ao peptídeo	

Raniseptina-B1 1.....	58
Figura 23. Quantidade de leveduras por neutrófilos em 100 células contadas	59
Figura 24. Produção de NETs por neutrófilos em relação ao tempo (120 minutos) com detecção por fluorescência emitida por Sytox.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características físico-químicas do peptídeo raniseptina-B1.....	48
Tabela 2. Características físico-químicas das Raniseptinas 1, 2, 3, 8, 9, 11 e 13.....	49
Tabela 3. Atividade antimicrobiana (MIC ^a , μM) do peptídeo Raniseptina-B1.....	52
Tabela 4. Pontuação PROB (potencial hemolítico) do peptídeo Raniseptina-B1	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	Coleção Americana de Culturas Típicas, do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
BHI	Infusão cérebro-coração, do inglês <i>brain heart infusion</i>
Boc	t-Butiloxicarbonila
CL	Cardiolipina
CXCL1	Quimiocina (motivo CXC) ligante 1
CXCL2	Quimiocina (motivo CXC) ligante 2
Da	Dalton
DC	Células dendríticas, inglês <i>dendritic cells</i>
DCM	Diclorometano
DIC	N, N' – diisopropilcarbodiimida
DIPEA	N, N'-diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
fMLP	n-Formil-metionil-leucil-fenilalanina
Fmoc	Cloroformiato de 9-fluorenilmetila
GRAVY	Índice médio de hidropaticidade
HBTU	1H-benzotriazol-1-il) -1,1,3,3-tetrametilurôniohexafluorofosfato
HC₅₀	Concentração hemolítica 50%
HCCA	Ácido-alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
HDP	Peptídeo de defesa do hospedeiro
IFN-γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
KCN	Cianeto de potássio
LMN	Laboratório de Microscopia e Microanálise
LPS	Lipopolissacarídeos
MALDI	Ionização/dessorção a laser assistida por matriz, do inglês <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

MIC	Concentração inibitória mínima
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina (MRSA)
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenosina
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
nm	Nanômetro
NK	Células assassinas naturais, do inglês <i>natural killer cells</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
Oxyrna Pure	Acetato de etil 2-ciano-2-(hidroxiimino)
PAM	Peptídeo antimicrobiano
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PS	Fosfatidilserina
p/v	Peso/volume
RAM	Resistência antimicrobiana
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, do inglês <i>reversed-phase high-performance liquid chromatography</i>
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SM	Esfingomiélna
tBu	t-Butila
TFA	Ácido trifluoroacético
TIS	Triisopropilsilano
TLR	Receptores do tipo Toll, do inglês <i>toll-like receptors</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TOF	Tempo de voo, do inglês <i>time-of-flight</i>
Trt	Tritila
v/v	Volume/volume

UFC

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

UV

Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

1.1. Antibióticos e resistência microbiana

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928 e o consequente desenvolvimento de antibióticos estão, sem dúvida, entre as maiores conquistas da medicina. A descoberta da penicilina trouxe grandes esperanças para o tratamento das doenças infecciosas. No entanto, no início de 1945, Fleming previu que a alta demanda pública por antibióticos levaria a uma "era de abuso"; o que acabou se tornando realidade. Assim que os efeitos milagrosos da penicilina se tornaram aparentes para o público em geral, o antibiótico começou a ser usado em excesso. Isso desencadeou uma pressão seletiva para o surgimento de linhagens bacterianas resistentes à penicilina, que em pouco tempo se espalharam ao redor do mundo (Lobanovska & Pilla, 2017).

Após duas décadas, a aceitação, a produção e a distribuição em massa levaram ao advento da resistência antimicrobiana (RAM). À medida que surgiam outras classes de antibióticos, um padrão semelhante estabeleceu-se levando a um aumento no número e na diversidade de bactérias resistentes aos antibióticos. As práticas precárias de controle de infecções em ambientes de saúde facilitaram a transmissão de organismos resistentes, amplificando a disseminação da RAM (Shankar, 2016). Isso levou ao surgimento das "superbactérias", como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Mycobacterium tuberculosis* extremamente resistente a medicamentos, bactérias difíceis ou impossíveis de tratar com os medicamentos existentes.

A pesquisa e o desenvolvimento de novos antibióticos é um processo longo e caro. Estima-se um custo de 800 milhões a 1 bilhão de dólares para trazer um novo medicamento ao mercado, levando em média mais de 10 anos para ser empregado na clínica médica. As aprovações de antibióticos sistêmicos pela U.S. Food and Drug Administration diminuíram 90% nos últimos 30 anos e a RAM tem impacto negativo sobre as taxas de morbidade, de mortalidade e sobre a economia (Luepke et al., 2017). Estima-se que, se não houver controle da RAM, até o ano 2050, as infecções por bactérias resistentes causarão 10 milhões de mortes, superando a mortalidade por câncer, e com perdas econômicas da ordem de 100 trilhões de dólares (Woon & Fisher, 2016). Atualmente existe um interesse crescente na busca por novos agentes antimicrobianos e os PAMs tem se destacado como uma possível opção terapêutica na luta contra as infecções causadas por microrganismos multiresistentes (Bahar & Ren, 2013).

1.2. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Peptídeos antimicrobianos, também conhecidos como peptídeos de defesa do hospedeiro (HDPs), são encontrados na maioria dos organismos, sendo parte do sistema imunológico inato, ou seja, atuam como primeira linha de defesa imediata desses organismos (Assoni et al., 2020). Eles exibem propriedades antimicrobianas de amplo espectro contra uma grande variedade de bactérias, fungos, protozoários e, surpreendentemente, até mesmo células cancerosas. Também foi observado que vários PAMs exibem atividades imunomodulatórias influenciando, por exemplo, na resposta inflamatória (Moravej et al., 2018). Mais recentemente, durante a pandemia de COVID-19 causada pelo SARS-CoV-2 (coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave), o interesse por PAMs sofreu um redirecionamento voltado ao seu emprego como moléculas antivirais para combater a doença COVID-19 (Kurpe et al., 2020; Moretta et al., 2021).

Os PAMs são moléculas pequenas (5 a 50 resíduos de aminoácidos), a maioria apresenta carga líquida positiva, variando entre +2 e +9, e contendo aproximadamente 50% de aminoácidos hidrofóbicos em suas cadeias peptídicas (Luong et al., 2020; Marr et al., 2006; Nascimento et al., 2005). Em geral, assumem estrutura anfipática, com regiões hidrofóbicas e hidrofílicas bem definidas, que lhes permitem ser solúveis em ambientes aquosos (Moretta et al., 2021).

Os PAMs são comumente classificados em quatro categorias com base em seus componentes de estrutura secundária: 1) α -hélice, 2) folha β , 3) misturada α -hélice/folha β e 4) estendida (Figura 1), sendo que a maioria dos PAMs pertencem às duas primeiras categorias (Moretta et al., 2021).

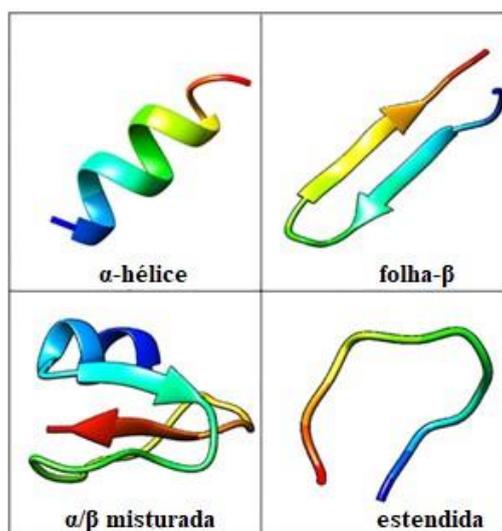


Figura 1. Diversidade estrutural de peptídeos antimicrobianos (PAMs). Fonte: Moretta et al., 2021, com modificações.

As propriedades físico-químicas dos peptídeos antimicrobianos estão relacionadas com seus efeitos antibacterianos, como a composição/frequência de aminoácidos, comprimento da cadeia peptídica, cationicidade, hidrofobicidade, tipo de estrutura secundária e a curvatura adotada pelos PAMs (Li et al., 2021). Por exemplo, PAMs formadores de α -hélices anfipáticas com carga positiva na porção N-terminal exibem atividade formadora de poros aumentada (Li et al., 2021). A cationicidade representa um fator que favorece a atração e a ligação de PAMs aos componentes carregados negativamente na superfície das bactérias, como lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa de bactérias Gram-negativas ou ácidos lipoteicoicos na parede celular dos Gram-positivos (Mangoni et al., 2015). A anfipaticidade dos peptídeos ajuda a melhorar a atividade inibitória contra microrganismos (Sultana et al., 2021). A distribuição de resíduos polares e hidrofóbicos (~ 50% em PAMs) em uma estrutura anfipática desempenha um papel fundamental na capacidade de penetração do peptídeo (Ciurac et al., 2019; Magrone et al., 2018).

1.2.1. Ação dos PAMs na membrana celular bacteriana

As membranas biológicas são formadas por bicamadas fosfolipídicas fluidas com proteínas associadas, apresentando, em alguns organismos, glicerois e esteroides. A constituição da membrana das células bacterianas e de células animais diferem em sua composição, sendo que fosfolipídios hidroxilados, tais como fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) e fosfatidilserina (PS), são os principais constituintes das membranas de bactérias, enquanto as membranas de vertebrados são ricas em fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e esfingomielina (SM), considerados fosfolipídeos zwitteriônicos, pois tendem a apresentar carga neutra. O colesterol e outros esteróis, como o ergosterol, que são abundantemente encontrados em membranas eucarióticas, são raramente encontrados em membranas procarióticas (Zaslhoff, 2002; Ebenhan et al., 2014; Epanand et al., 2016; Kumar et al., 2018).

Em geral, a capacidade dos PAMs de matar bactérias depende de sua capacidade de interagir com membranas bacterianas ou paredes celulares. A maioria dos PAMs exibe carga líquida positiva e uma alta proporção de aminoácidos hidrofóbicos, permitindo que eles se liguem seletivamente a membranas bacterianas carregadas negativamente (Bala & Kumar, 2014). A Figura 2 representa o esquema geral das paredes celulares de bactérias Gram-positivas

e Gram-negativas. A interação eletrostática entre as cadeias laterais dos resíduos catiônicos do peptídeo e as cabeças dos fosfolipídeos carregadas negativamente podem promover a formação de poros na membrana bacteriana que destroem a integridade da membrana, promovendo a lise celular (Zhang & Gallo, 2016).

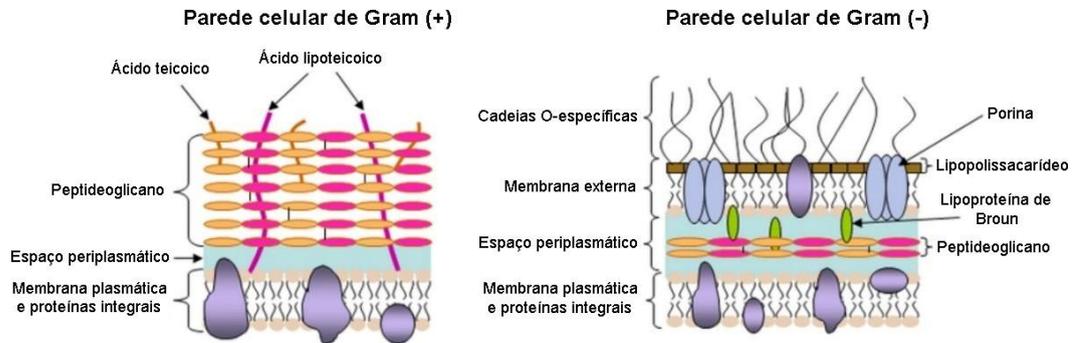


Figura 2. Estrutura esquemática das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Fonte: Atanasova, 2010.

A figura 3 ilustra os efeitos biológicos dos PAMs em células procarióticas onde podem promover a morte direta do microrganismo por desestabilização da membrana celular ou então são capazes de atravessar a bicamada lipídica sem causar nenhum dano, mas matam as bactérias inibindo funções intracelulares, como o bloqueio da atividade enzimática ou inibindo a síntese de proteínas e ácidos nucleicos (Figura 3). Além das atividades antimicrobianas diretas, alguns PAMs também são capazes de inibir a formação de biofilme e erradicar os biofilmes existentes (Zhang & Gallo, 2016).

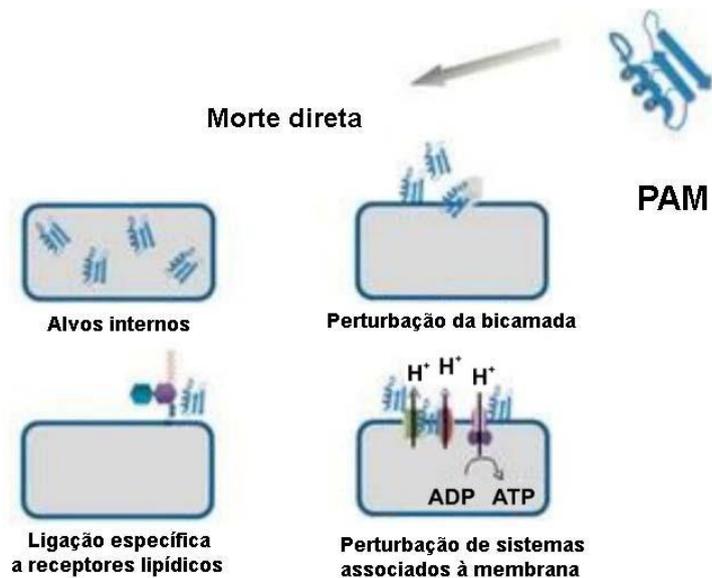


Figura 3. Efeitos biológicos dos PAMs. Os PAMs ligam-se às membranas bacterianas através de interações eletrostáticas, podendo romper a membrana ou entrar na bactéria inibindo alguma função intracelular. ADP: difosfato de adenosina; ATP: trifosfato de adenosina. Fonte: Kumar et al., 2018, com modificações.

Baseado nestas observações, vários modelos de interações peptídeo/membrana foram propostos para explicar como, após a fixação inicial, os peptídeos antimicrobianos interagem com a membrana bacteriana, para formação de poros transmembranas que resultam na permeabilização da membrana biológica (Jenssen et al., 2006).

A figura 4 ilustra os principais modelos propostos de interação dos PAMs com a membrana de células procarióticas: *barrel-stave* (barril/bastão), *carpet-like* (carpete) e poro toroidal.

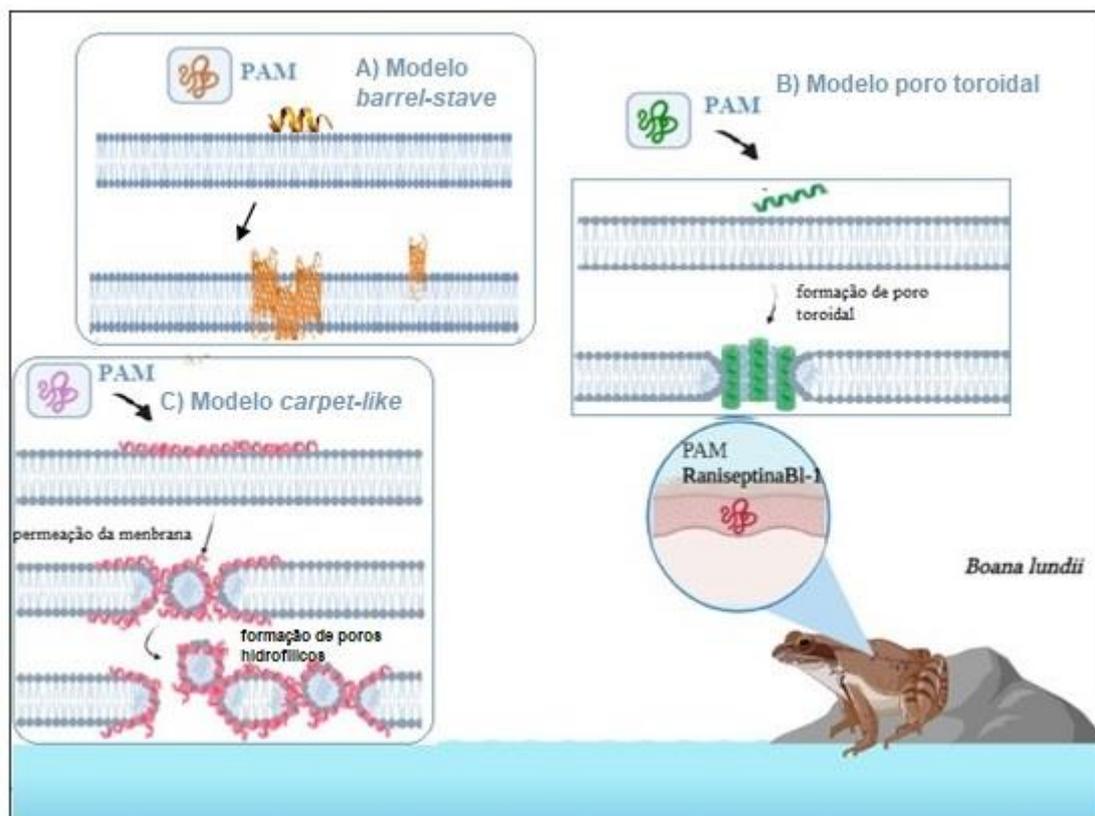


Figura 4. Representação esquemática dos principais mecanismos de ação de PAMs sobre membranas procarióticas onde: A) Modelo *barrel-stave*, B) Modelo poro toroidal e C) Modelo *carpet-like*. Figura adaptada de McMillan & Coombs, 2020. Imagem criada com <https://biorender.com/>.

Modelo *barrel-stave*: consiste na formação de poros hidrofílicos no núcleo hidrofóbico da estrutura da membrana bacteriana, resultando em vazamento do conteúdo extracelular (Kumar et al., 2018; Shai & Oren, 2001).

Modelo poro toroidal: as interações peptídeo/membrana mostram-se mais fortes. Os peptídeos antimicrobianos agregam-se e se inserem em direção perpendicular na membrana bacteriana para a formação dos poros, bastante semelhante a formação do poro *barrel-stave*, porém este modelo se diferencia pelo fato de que a membrana bacteriana se curva para dentro do poro. Os peptídeos antimicrobianos só se inserem na membrana logo após atingirem o limiar

de concentração, até então eles ficam dispersos perpendicularmente na membrana (Brogden et al., 2003; Falanga et al., 2016).

Modelo *carpet-like*: foi proposto inicialmente por Pouny *et al.* (1992) estudando o PAM dermaseptina. Os peptídeos se ligam à membrana-alvo formando algo semelhante a um tapete e, em seguida, os peptídeos causam a permeabilização e desintegração da membrana (Shai & Oren, 2001).

Modelo Shai-Matsuzaki-Huang: este modelo envolve a formação de carpete e de poro pela adesão de peptídeos na membrana do microrganismo, causando uma diminuição na espessura da membrana, estiramento e formação de poros e a interação de peptídeos com alvos intracelulares (Shai & Oren, 2001) (Figura 5).

Figura 5. Ilustração do modelo Shai-Matsuzaki-Huang. Fonte: Osman & Mahmoud (2015), com modificações.

1.2.2. Resistência microbiana aos PAMs

Uma das forças motrizes por trás da pesquisa com PAMs foi a observação de que esses peptídeos exibem atividade de amplo espectro e que as bactérias não apresentam resistência tão facilmente como a exibida frente aos antibióticos convencionais. Algumas linhagens são naturalmente resistentes à atividade de alguns PAMs, sugerindo que a expressão de vários tipos de peptídeos no mesmo tecido é necessária para obter uma defesa de amplo espectro. Em geral, vários mecanismos naturais de resistência à atividade de PAMs foram observados. Um dos mecanismos de ação observados entre PAMs e bactérias é a interação eletrostática entre o peptídeo catiônico e o envelope aniônico da bactéria. Como essas estruturas são quase universais entre as bactérias, elas formam um dos fundamentos da sensibilidade das bactérias aos PAMs. Independentemente disso, as espécies bacterianas desenvolveram mecanismos para modificar até mesmo essas importantes estruturas, e inibindo as interações com os peptídeos. Por exemplo, alterações genéticas são encontradas em bactérias Gram-positivas, que modificam o ácido teicoico, e em bactérias Gram-negativas, que modificam a porção lipídica de sua membrana (Diamond et al., 2009).

1.3. Imunidade inata

O sistema imunológico dos vertebrados tem sido tradicionalmente dividido em imunidade inata e adaptativa. As células do sistema imunológico inato reconhecem patógenos e

danos teciduais através de receptores de reconhecimento de padrões, que detectam diversos padrões moleculares associados ao patógeno e associados a danos (PAMPs). Os processos ativados no engajamento das PRRs são rápidos, são considerados não específicos e incluem respostas como fagocitose, locomoção celular, morte de patógenos ou células e produção de citocinas. Esses mecanismos imunológicos inatos são geralmente muito eficazes na eliminação de patógenos invasores. Além disso, células dendríticas (DCs), células T especializadas e células B conduzem respostas imunes adaptativas, que podem ser induzidas concomitantemente. Essas respostas imunes adaptativas dependentes de linfócitos são mais lentas para se desenvolver, mas são específicas de antígeno e levam à memória imunológica de longo prazo (Netea et al., 2020).

Os componentes do sistema imunológico inato incluem macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas e células assassinas naturais. Essas células tornam-se ativadas durante uma resposta inflamatória e se diferenciam em células efetivas de curta duração para debelar a infecção. Os componentes não-otopoiéticos incluem a pele e as células epiteliais que revestem os tratos gastrointestinal, geniturinário e respiratórios. As defesas celulares são ainda complementadas por componentes humorais, que incluem proteínas complementares, como a proteína C-reativa, proteína de ligação a lipossacarídeo (LBP), pentraxinas, colectinas e peptídeos antimicrobianos, incluindo as defensinas. As proteínas circulantes do sistema imunológico inato tanto reconhecem micróbios quanto ajudam com mecanismos para debelar a infecção (Kaur & Secord, 2021).

1.3.1. Neutrófilos

Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares e granulares que funcionam como uma parte essencial do sistema imunológico inato. Eles representam, em humanos, 50-70% de todos os leucócitos circulantes. Neutrófilos maduros em circulação apresentam em torno de 7-10 μm de diâmetro com núcleo segmentado e tendo um citoplasma enriquecido com grânulos e vesículas secretoras. São produzidos na medula óssea e depois liberados na circulação (Rosales, 2020). A principal função dos neutrófilos é fagocitar microrganismos, especialmente microrganismos opsonizados, e produtos de células necróticas, bem como destruir esse material nos fagolisossomos (Abbas & Lichtman, 2019).

Depois que um patógeno rompe as barreiras epiteliais, neutrófilos são as primeiras células imunes inatas que são rapidamente recrutados da corrente sanguínea para os locais de infecção, sendo que os neutrófilos têm um arsenal antimicrobiano à sua disposição para debelar o foco infeccioso. Os neutrófilos utilizam uma combinação de espécies reativas de oxigênio

(ROS), componentes de grânulos citotóxicos, peptídeos antimicrobianos e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) para gerar um ambiente altamente letal que é essencial para morte e degradação dos microrganismos invasores (Teng et al., 2017).

Durante uma infecção ou dano tecidual, padrões moleculares associados ao patógeno e/ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) são percebidos por receptores de reconhecimento de padrões, bem como receptores úmidos, que podem ativar células residentes para produzir mediadores inflamatórios, como as quimiocinas CXCL1 e CXCL2, que se ligam e ativam receptores acoplados à proteína G em neutrófilos. Os neutrófilos apresentam uma ampla gama de mecanismos de efeito para combater patógenos que incluem fagocitose, proteases e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Assim, o comprometimento do recrutamento de neutrófilos para um local infeccioso facilita a disseminação de patógenos em órgãos sanguíneos e vitais, desenvolvimento de infecção sistêmica e eventual morte (Castanheira & Kubes, 2019).

1.3.2. Fagocitose

A capacidade fagocitária do neutrófilo é o meio utilizado para a destruição do agente microbiano que conseguiu ultrapassar as barreiras físicas e químicas epiteliais (Lee et al., 2003). A fagocitose é um processo mediado por receptor durante o qual uma partícula maior que 0,5 µm é internalizada pela célula em um vacúolo chamado fagossoma. Os neutrófilos reconhecem partículas opsonizadas por receptores de anticorpos ou receptores do complemento, levando a uma fagocitose eficiente (Rosales, 2020).

1.3.3. NETs

Após a ativação, os neutrófilos podem gerar “*Neutrophil Extracellular Traps*” (Redes Extracelulares de Neutrófilos - NETs) (Figura 6). NETs são compostas por fibras extracelulares ricas em grânulos intracitoplasmáticos que apresentam em seu interior elastase, lactoferrina e gelatinase, sendo o DNA (histonas e cromatina) o maior componente estrutural de NETs (Brinkmann & Zychlinsky, 2012; Silva, 2015).

A geração de NETs pode ser alcançada por meio de um processo de morte celular denominado morte celular NETose. Essa armadilha pode se ligar a bactérias, fungos e outros microrganismos, fornecendo uma alta concentração local de moléculas antimicrobianas para matar os patógenos e como uma barreira para prevenir sua disseminação. A formação do NETs pode ser estimulada por vários sinais, entre eles produtos microbianos, como LPS. Para iniciar

a morte celular netose, os neutrófilos interrompem seu movimento e despolarizam, o envelope nuclear então se quebra e a cromatina nuclear é liberada no citoplasma (Lehman & Segal, 2020).

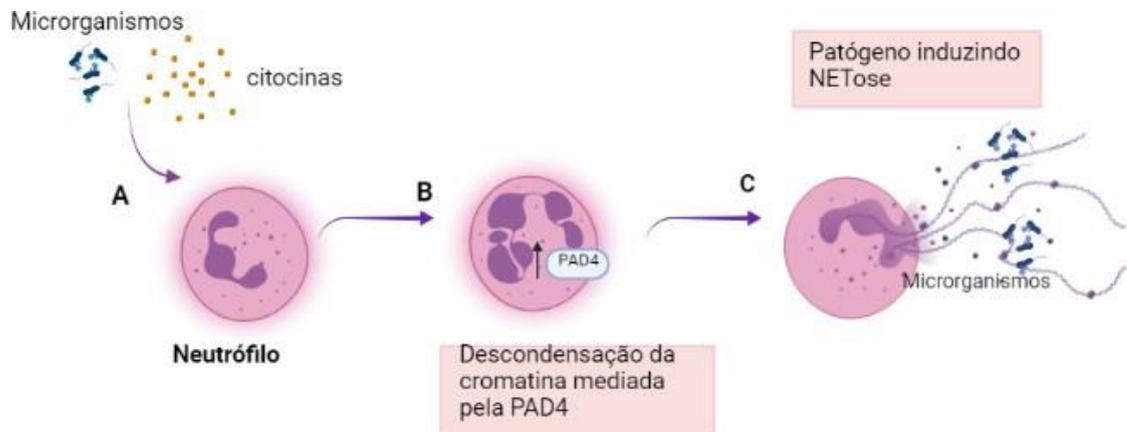


Figura 6. Formação de NETs. A) Neutrófilos são estimulados pelo contato com microrganismos ou seus produtos (citocinas), promovendo: B) mudanças ultraestruturais no núcleo com descondensação de cromatina mediada pela PAD4; C) liberação de estruturas extracelulares como histonas, proteínas granulares de neutrófilos e citoplasmáticas (NETs), que prendem e matam microrganismos. Criada com <https://biorender.com/> por Brunna de Oliveira.

1.3.4. PAMs com atividade imunomodulatória

Muitos PAMs exercem atividade imunomodulatória. O vasto conjunto de funções imunomodulatórias exibidas por PAMs incluem quimiotaxia aprimorada de células do sistema imunológico, ativação da diferenciação de células imunes, repressão mediada por citocinas e semelhantes a Toll, liberação mediada por receptor (TLR) de citocinas pró-inflamatória, espécies reativas de oxigênio (ROS), indução de citocinas antiinflamatórias, eliminação de endotoxinas bacterianas, estimulação de angiogênese, promovendo a cicatrização de feridas (Figura 7) (Pantic et al., 2017).

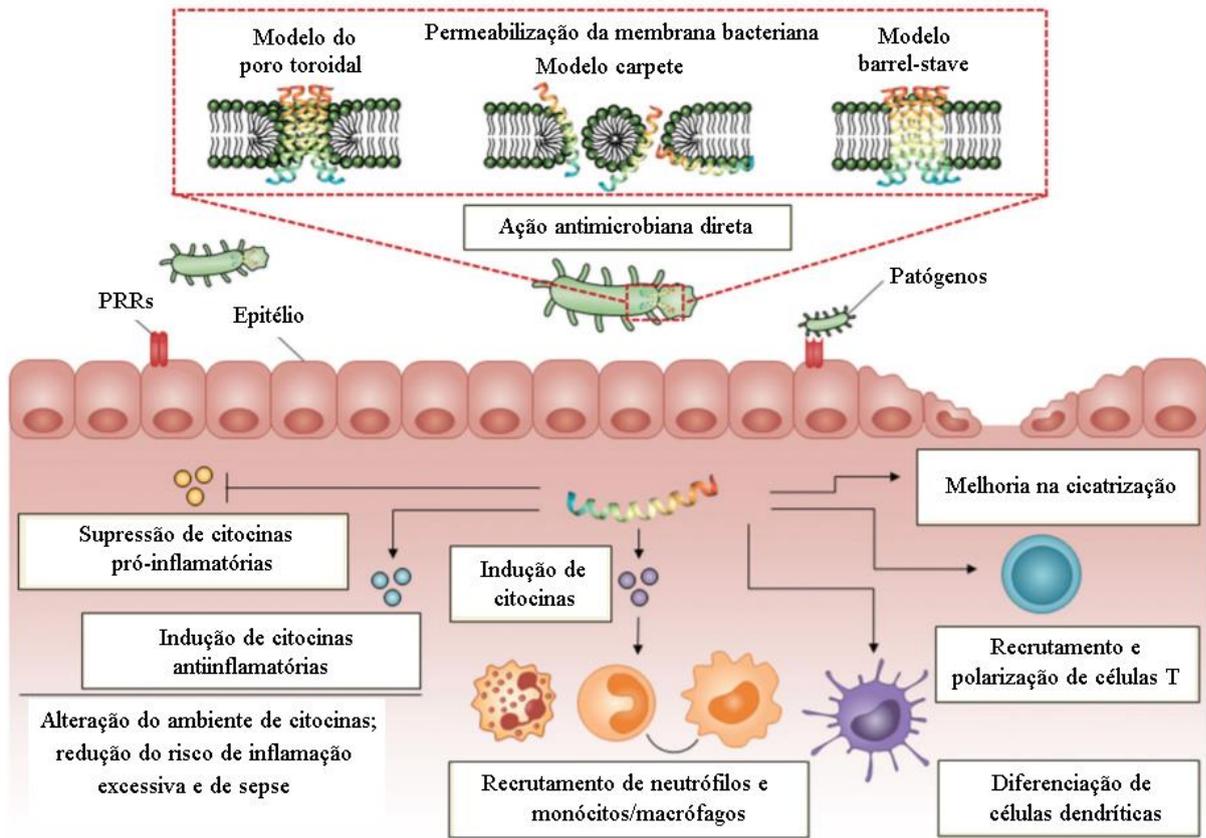


Figura 7. Representação esquemática do modo de ação de PAMs ilustrando sua ampla gama de funções imunomoduladoras. Fonte: Mahlapuu et al., 2020.

Além disso, a organização dos sistemas imunológicos de anfíbios e mamíferos compartilham inúmeras semelhanças em termos das funções de imunidade inata e adaptativa. Genes codificando citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL)-1, IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- α e interferon (IFN)- γ , estão presentes no genoma da *Xenopus tropicalis* (*ex-Silurana tropicalis*), e a ativação de macrófagos de pele em resposta a patógenos extracelulares foi relatada (Justyna, 2017; Pantic et al., 2017; Robert & Ohta, 2009).

1.4. Os anfíbios como fonte de peptídeos antimicrobianos

A classe Anfíbia é composta por 8403 espécies descritas, sendo distribuídas em 3 ordens: Apoda (cecilídeos), Caudada (salamandras e tritões) e Anura (sapos, rãs e pererecas)

(Frost, 2021). A fauna de anfíbios do Brasil compreende cerca de 1.188 espécies, sendo a ordem dos anuros a maior, com 1.144 espécies, distribuídas em 20 famílias e 107 gêneros (Segalla et al., 2021). O Brasil está classificado em primeiro lugar em biodiversidade de anuros, seguido de Colômbia e Equador.

A pele dos anfíbios é um importante órgão envolvido na defesa animais. Vários mecanismos de defesa são observados, incluindo: (i) barreiras físicas - funcionam como uma barreira para patógenos como observado em outras espécies. Glândulas de muco nas peles dorsais dos anfíbios secretam proteoglicanos e essas substâncias se agregam para formar malhas polipeptídicas que cobrem toda a superfície externa da pele para formar uma barreira natural contra a invasão de patógeno (Rollins-Smith, 2009; Xiao et al., 2011); (ii) componentes da imunidade adaptativa - como células B, anticorpos e células T, sendo que respondem muito lentamente à invasão de patógenos; (iii) componentes da imunidade inata - incluindo fagócitos, proteínas do sistema complemento, sistemas de interferon, células assassinas naturais (células NK) e peptídeos antiimicrobianos (PAMs). Embora todos esses componentes desempenhem papéis importantes na eliminação de patógenos invasores, uma variedade de PAMs liberados em toda a superfície da pele podem funcionar rápida e diretamente limitando a proliferação de microrganismos (Barra et al., 1998; Simmaco et al., 1996).

Os PAMs de anuros podem ser agrupados em famílias com base em semelhanças limitadas na sequência de aminoácidos. Secreções da pele de uma única espécie frequentemente contém vários membros de uma família particular que são presume-se ter surgido de múltiplas duplicações de um gene ancestral. A heterogeneidade molecular dos peptídeos dentro de uma família é muitas vezes considerável e essa variação na estrutura primária é refletida em uma ampla variabilidade nas potências antimicrobianas e especificidades para diferentes microrganismos (Conlon et al., 2019).

A natureza e o número dos PAMs em cada gênero/espécie de anuro é dado de acordo com o Banco de dados de peptídeos antimicrobianos (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Os nomes das famílias de rãs e sapos, gêneros e espécies foram obtidos a partir da atualização classificação de anuros encontrados em espécies de anfíbios do Mundo (<http://research.amnh.org/vz/herpetology/anfibios/>). (Ladram & Nicolas, 2016).

Exemplo de PAMs de anuros são as rãs da família Pipidae que provaram ser uma rica fonte de peptídeos ativos. Com base na similaridade estrutural limitada, cinco famílias de HDPs com vários graus de atividades antimicrobianas foram identificados em secreções da pele de rãs pertencente ao gênero *Xenopus*. Estes são magainina, peptídeo glicina-leucina-amida (PGLa) Magaininas- Magainin-AM1 e -AM2 mostraram atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S.*

aureus e baixa atividade hemolítica contra eritrócitos humanos (Conlon et al., 2019).

Já na família das temporinas compreende peptídeos contendo entre 10 e 20 aminoácidos, e é a família que contém os menores PAMs de rãs já relatados. O primeiro temporinas foram identificadas nas secreções de *Rana esculenta* e *R. temporaria*, mas já foram descritos em outras espécies. Em geral, as temporinas mostram atividade contra bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium* (M. S. Castro et al., 2009).

A família das filoseptinas reúne peptídeos caracterizados a partir da secreção de hilídeos do gênero *Phyllomedusa*, que são encontrados em florestas tropicais nas regiões Central e América do Sul. As filoseptinas 7 e 8, isoladas da secreção de *P. nordestina*, foram avaliados em *L. infantum* e *T. cruzi* em um trabalho por [75]. Entre os peptídeos analisados, apenas o PLS-7 mostrou-se ativo contra ambos os parasitas, sendo também o composto mais citotóxico (34,42 M). Dentre esses exemplos de algumas famílias descritas hoje demonstram uma riquíssima fonte de PAMs e seu grande potencial antimicrobiano (M. S. Castro et al., 2009).

1.4.1. Família Hylidae

Hylidae é uma família de anfíbios da ordem Anura, cujas espécies podem ser encontradas em todos os continentes, com exceção da Antártida, com cerca de 744 espécies descritas até o momento (Frost, 2021). O nome da família é baseado no nome do gênero *Hyla*, que é uma alusão a Hílas, companheiro de Hércules, segundo a mitologia grega (Duellman et al., 2016).

Membros desta família são comumente referidos como "pererecas" com adaptações adequadas para um estilo de vida arbóreo, incluindo olhos voltados para a frente fornecendo visão binocular e almofadas adesivas nos dedos das mãos e dos pés. Nas espécies não arbóreas, estes recursos podem ser bastante reduzidos ou ausentes (Almeida et al., 2015). Membros dessa família são conhecidos como uma fonte promissora de PAMs (Azevedo Calderon et al., 2011).

1.4.2. *Boana lundii*

O gênero *Boana* possui 98 espécies descritas até o momento pelo mundo, as quais se encontram distribuídas em grande parte na América do Sul sendo encontradas em florestas de galeria (Frost, 2021).

Boana lundii (Burmeister, 1856) é uma espécie de anfíbio da família Hylidae, subfamília Cophomantinae (Frost, 2021) (Figura 8). É caracterizada por possuir coloração dorsal cinza-claro, esverdeado, com manchas pretas delicadas e sem formas, simulando uma casca de árvore. A cabeça é mais larga do que longa. Apresenta tímpanos e mãos grandes, com

dedos unidos por membranas interdigitais (Figura 5). Espécie endêmica do bioma Cerrado, está distribuída na região do cerrado do centro-leste do Brasil no sul de Mato Grosso, Goiás, DF, centro e oeste de Minas Gerais e São Paulo (Frost, 2021). Até recentemente, a espécie *B. lundii* era identificada pela denominação *Hypsiboas lundii*, o mesmo ocorrendo com várias espécies do gênero *Hypsiboas* (Dubois, 2017).



Figura 8. Exemplar adulto de *B. lundii*. Fotografia cedida por Ana Cecilia Holler del Prette.

Exemplos de PAMs que já foram isolados do genero Boana como a A hilaseptina-4 é um peptídeo antimicrobiano originalmente isolado da perereca *Hypsiboas punctatus* (Nunes et al., 2021). Já a Hylina a1, um PAM extraído da secreção da pele de um sapo sul-americano, *Hypsiboas albopunctatus*, mostrou uma forte citotoxicidade contra bactérias e fungos, mas também uma considerável ação hemolítica (Vignoli Muniz et al., 2020). Hp-1935, um peptídeo natural extraído das secreções da pele de uma rã argentina (*Boana pulchella*) (Sanchis et al., 2020).

A espécie *Boana lundii* também já foi conhecida como *Hyla biobeba*. Dois peptídeos hemolíticos foram isolados da secreção da pele da rã Hylidae brasileira *Hyla biobeba*, usando procedimentos cromatográficos de fase reversa (M. Castro et al., 2005).

2. JUSTIFICATIVA

A crescente resistência aos antimicrobianos (RAM) é um problema grave que, se não for combatido rapidamente, pode comprometer a saúde das próximas gerações, com um retorno à era pré-antibiótica. Além disso, o aumento de infecções resultantes de patógenos e cepas resistentes em contextos clínicos intensificou a demanda por terapias alternativas (Camou et al., 2017).

Os peptídeos antimicrobianos têm sido alvos de inúmeros estudos ao redor do mundo, uma vez que são candidatos promissores para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de infecções causadas por microrganismos multirresistentes. A abundância de PAM na pele dos anuros é notável e representam uma rica fonte de protótipos para o desenho racional de novas moléculas farmacêuticas. Os PAMs de anuros possuem amplo espectro, sendo ativos sobre bactérias, protozoários, leveduras e fungos, promovendo sua morte diretamente e/ou inativando alvos intracelulares (Ladram & Nicolas, 2016).

O acesso aos PAMs de anuros é limitado pela disponibilidade de material biológico para avançar na sua caracterização biológica. De modo a superar essa limitação, a síntese química de PAMs apresenta diversas vantagens em relação à extração de peptídeos de suas fontes naturais. As principais vantagens da síntese química em fase sólida (SPPS, *solid-phase peptide synthesis*) são: (i) simplicidade e velocidade (realizando todas as reações em um único vaso de reação) e (ii) eficiência com altos rendimentos de produtos finais através do uso de reagentes em excesso (Palomo, 2014). O número de peptídeos sintéticos que entram em ensaios clínicos tem crescido continuamente na última década e os avanços recentes na tecnologia SPPS com química Fmoc são uma resposta à crescente demanda da química e farmacologia medicinal (Behrendt et al., 2016).

Diante desse cenário, o grupo de pesquisa liderado pela Profa. Mariana S. Castro vem se dedicando à busca por peptídeos antimicrobianos presentes, principalmente, na secreção cutânea de anuros da fauna brasileira, como possíveis protótipos para o desenvolvimento de novas drogas no tratamento de infecções causadas por patógenos multirresistentes, dentro do contexto da atual crise dos antibióticos.

3.OBJETIVOS E METAS

3.1Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral a síntese química e a caracterização das propriedades biológicas do peptídeo antimicrobiano Raniseptina-BI 1, previamente identificado por Araújo (2018) na secreção cutânea do anuro *Boana lundii*.

3.1. Metas estabelecidas

3.1.1 Síntese química em fase sólida do peptídeo Raniseptina-BI 1 empregando a química Fmoc;

3.1.2 Purificação do peptídeo Raniseptina-BI 1 sintético por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (RP-HPLC);

3.1.3 Análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF do peptídeo Raniseptina-BI 1 sintético;

3.1.4 Buscas por similaridade/identidade do peptídeo Raniseptina-BI 1 com outros peptídeos antimicrobianos já descritos para o gênero *Boana*;

3.1.5 Análises estruturais computacionais do peptídeo Raniseptina-BI 1;

3.2.5. Determinação da composição de elementos de estrutura secundária do peptídeo Raniseptina-BI 1 com o emprego da técnica de dicroísmo circular;

3.2.6. Determinação dos efeitos antibacterianos e antifúngicos do peptídeo Raniseptina-BI 1 sintético sobre bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas e fungos patogênicos por meio da determinação das concentrações inibitórias mínimas (MICs);

3.2.7. Determinação da atividade hemolítica do peptídeo Raniseptina-BI 1 sintético;

3.2.8. Avaliação dos efeitos promovidos pela incubação do peptídeo Raniseptina-BI 1 sintético sobre a morfologia da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, empregando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV);

3.2.9. Determinação dos efeitos sobre a imunidade inata do peptídeo Raniseptina-BI 1 sintético.

4. Materiais e Métodos

4.1 Síntese química do peptídeo Raniseptina-BI 1

O peptídeo Raniseptina BI-1, previamente identificado por Araújo (2018), foi escolhido para ser produzido por síntese química em fase sólida empregando o método Fmoc/tBu com o intuito de obter material em quantidade suficiente de modo a avançar na caracterização de suas propriedades biológicas. O procedimento foi realizado sob a supervisão do Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand, especialista em síntese química de peptídeos, nas dependências do Instituto de Química da UnB.

Preparo da resina

A síntese foi realizada em uma escala de concentração de 0,15 mmol. L⁻¹. Utilizou-se a resina Wang já acoplada ao último aminoácido da sequência peptídica (Fmoc-Ser-Wang). A resina foi inchada com cerca de 2 mL de diclorometano (DCM) e submetida a agitação por 30 min a 200 rpm, conforme protocolo estabelecido por (Chan & White, 2000). Em seguida, a resina foi lavada com dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM). Toda a síntese foi realizada em uma seringa de vaso de reação de 10 mL.

Desproteção

A resina, uma vez inchada, encontra-se com seu N-terminal protegido pelo grupo de proteção Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonil). Desse modo é realizada sua desproteção utilizando 4-metilpiperidina em DMF numa proporção de 1:5. Dois ciclos de desproteção foram realizados, cada um compreendendo 15 min de agitação a 200 rpm, resultando na resina com um N-terminal livre para acoplamento do primeiro resíduo. Completado o segundo ciclo de desproteção, a resina foi lavada com DMF e DCM (três ciclos de lavagem).

Teste de Kaiser

A efetividade da etapa de desproteção foi avaliada para confirmação de que a resina apresenta um N-terminal livre por meio do teste de Kaiser. O teste de Kaiser é um teste qualitativo que determina a presença de aminas livres no meio. A resina assume uma coloração azul escura quando da presença de aminas livres, indicando que a desproteção foi bem-sucedida, ou permanece com aspecto transparente, caso a porção N-terminal continue protegida, revelando assim a necessidade de repetição da etapa de desproteção.

O teste foi realizado conforme protocolo 13A descrito em Chan & White (2000). Esse protocolo envolve três soluções: 5% (m/v) de ninhidrina (2,2-diidroxi-hidrindeno-1,3-diona) em etanol, 80% (m/v) de fenol em etanol e KCN em piridina (2 mL 0,001 M de KCN em 98 ml de piridina). Grãos da resina foram coletados e imersos em gotas das soluções, sendo posteriormente aquecidos em banho seco (120°C) por 1 min.

Acoplamento de aminoácido

Com a resina desprotegida, o aminoácido pode ser acoplado, iniciando-se pelo último aminoácido da sequência peptídica. O acoplamento envolve o ataque do grupo amino de um aminoácido ao grupo carboxi de outro aminoácido, estando esse último ativado pela inserção de um grupo retirador de elétrons (El-Faham & Albericio, 2011). A reação de acoplamento foi utilizada o método de acoplamento: carbodiimidas (DIC/Oxyma).

Síntese utilizando carbodiimidas

A reação é processada utilizando o reagente Oxyma Pure (acetato de etil 2-ciano-2-hidroxiimino), que reage com a porção C-terminal na presença de carbodiimida. A massa calculada para cada aminoácido dentro da escala de concentração de 0,15 mmol. L⁻¹ foi pesada e adicionada no meio reacional. O mesmo foi aplicado ao reagente Oxyma Pure (85,3 mg). Com os reagentes sólidos adicionados ao meio, 2 mL de DMF foram acrescentados para solubilização dos reagentes. O reagente de acoplamento DIC (N,N' – diisopropilcarbodiimida) foi adicionado ao meio na quantidade de 93 µL. O meio foi submetido à agitação por 1h e 30 min. Em seguida, foram realizados os três ciclos de lavagem com DMF e DCM. A efetividade da reação é conferida pelo teste de Kaiser, que agora deve revelar grãos transparentes, indicando o sucesso do acoplamento.

Clivagem

Após as etapas acima serem repetidas e concluídas (desproteção - teste de Kaiser - acoplamento - teste de Kaiser), de modo que cada aminoácido da sequência peptídica represente um ciclo completo, seguiu-se para o processo final de clivagem. Utilizou-se ácido trifluoroacético (TFA), que leva à clivagem do peptídeo da resina com concomitante eliminação dos grupos protetores dos aminoácidos da cadeia. Assim, foi obtido o peptídeo livre da resina e dos grupos protetores (Chan & White, 2000).

O “coquetel” de clivagem foi preparado com os seguintes reagentes: TFA/tioanisol/água/fenol/etanoditiol na proporção 82,5:5:5:2,5 (v/v). A inserção de reagentes como tioanisol, água, fenol e etanoditiol visa evitar a reação secundária dos grupos de proteção clivados dos aminoácidos do peptídeo com outros aminoácidos da mesma molécula.

A etapa de clivagem requer inicialmente desproteção e teste de Kaiser, para só então todo o conteúdo resultante da síntese ser misturado ao "coquetel", em agitação a 200 rpm durante 1 hora e 30 min. Após esse período de incubação, secou-se o material com o auxílio de gás argônio, seguido da adição de éter diisopropílico gelado para promover precipitação. Essa mistura foi filtrada e o precipitado retido no filtro é composto por resina e peptídeo que foram separados pela lavagem com acetonitrila/água Milli-Q na proporção 1:1. A resina ficou retidano filtro,

enquanto o peptídeo foi solubilizado, guardado em tubos de polipropileno de 50 mL e liofilizado.

4.2 Purificação do peptídeo raniseptina-BI 1 por cromatografia líquida de alta eficiência

O peptídeo sintético liofilizado foi dividido em alíquotas de 10 mg e dissolvido em 1 mL de TFA 0,12% (v/v) em água milli-Q (solvente A). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 10 min. Alíquotas de 150 µL do sobrenadante foram injetadas em uma coluna de fase reversa C₁₈ (Shim-pack VP-ODS, No. 2122095, 4,6 mm x 150 mm, 5 µm), com fluxo de 1 mL/min. A eluição foi realizada empregando-se gradiente de 0-45% de TFA 0,12% (v/v) em acetonitrila (solvente B) em 10 min. e de 45-47% de solvente B em 22 min, com monitoramento a 216 nm. As frações cromatográficas eluídas foram coletadas manualmente, secas a vácuo e armazenadas a -20°C.

4.3 Análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF

As frações cromatográficas resultantes da purificação foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF modelo Autoflex II (Bruker, Alemanha) de modo a confirmar seu grau de pureza e determinar a correção do processo de síntese. Cada fração cromatográfica foi ressuspensa em TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q e 1 µL de amostra foi aplicado em placa de aço inoxidável juntamente com matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA 20 µg/µL) ressuspensa em 0,1% de TFA (v/v) em 50% (v/v) de acetonitrila. O equipamento foi previamente calibrado com Pepmix (Bruker, Alemanha) e as análises realizadas no modo positivo com uso do refletor na faixa m/z de 500 a 4000.

4.4 Quantificação do peptídeo Raniseptina-BI 1 sintético

O peptídeo Raniseptina-BI 1 sintético foi dosado em espectrofotômetro (Bel Photonics UV/Vis M51), por meio da leitura das absorvâncias nos comprimentos de onda 205, 215 e 225 nm (Aitken & Learmonth, 2002; <https://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/abs205.html>).

A concentração protéica (em µg/mL) foi obtida a partir das medidas de absorvância com o uso das equações abaixo:

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

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

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

2

O volume total do estoque de cada peptídeo foi alíquotado em tubos de polipropileno de 1 mL

e secos a vácuo (SpeedVac modelo SC 100, Savant).

4.6 Análises computacionais

O algoritmo BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) foi utilizado para buscas de identidade e similaridade entre a sequência do peptídeo antimicrobiano Raniseptina-BI 1 e outros peptídeos antimicrobianos já caracterizados. O alinhamento múltiplo das sequências dos peptídeos foi feito com o emprego da ferramenta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). A ferramenta ExPasy pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi) foi usada para se determinar as massas teóricas dos peptídeos. A projeção em roda helicoidal do peptídeo foi obtida com o emprego do software NetWheels software (www.lbqp.unb.br/NetWheels/). O servidor PEP2D (disponível em <http://crdd.osdd.net/raghava/pep2d/result/pep2dres.php?ran=6411>) foi usado para predição da estrutura secundária da Raniseptina-BI 1. A razão hidrofóbica total e o índice GRAVY (*Grand Average of Hydropathy*) foram determinados empregando-se Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor (http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php). Para análise hemolítica foi utilizado o servidor web HemoPi (<http://crdd.osdd.net/raghava/hemopi/>).

Os gráficos foram plotados com o uso do software GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Todos os valores foram expressos como médias \pm DP (desvio padrão).

4.7 Análise da estrutura secundária do peptídeo Raniseptina-BI 1 por dicroísmo circular

Os elementos de estrutura secundária do peptídeo Raniseptina-BI 1 foram analisados por dicroísmo circular utilizando o espectropolarímetro Jasco, modelo J-815 (Jasco instrumentos, Japão), contendo um sistema de controle de temperatura do tipo *Peltier* e uma bomba de água acoplada (Jasco instrumentos, Japão). O peptídeo Raniseptina-BI 1 (0,13 mg/mL) foi analisado em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm, na presença de água ou de dodecil sulfato de sódio (SDS) 35mM (m/v) a 25 °C. O experimento foi realizado na região distante do UV (190-260 nm) a partir de dez medidas consecutivas e a média final foi calculada a partir dos espectros coletados. Os espectros dicroicos foram considerados após subtração dos espectros referentes as linhas de base da água e do SDS (35mM) (m/v). A elipticidade observada foi convertida em elipticidade molar ($[\theta]$) ($\text{grau.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) utilizando-se uma massa molecular por resíduo de 112 Da (Pace et al., 1989).

A helicicidade do peptídeo foi estimada considerando-se os valores de elipticidade molar ($\text{grau.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) em $\lambda_{208\text{nm}}$ baseado em Morrisett et al., 1973).

4.8 Ensaaios *in vitro*

4.8.1 Ensaio antibacteriano

Para avaliar a atividade antimicrobiana do peptídeo Raniseptina-BI 1 sobre bactérias patogênicas foram utilizadas as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e Gram-positivas *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Foram inoculados 200 µL das linhagens selecionadas em 6,8 mL de meio líquido Muller-Hinton e incubados, sob agitação constante, durante 24 h a 37 °C.

Após o período de incubação, foram realizadas leituras a 625 nm em espectrofotômetro para avaliação da densidade óptica (DO). As suspensões foram diluídas e a DO ajustada para a faixa entre 0,08-0,1. Em seguida, os inóculos foram diluídos na proporção de 1:200 para todas as bactérias testadas (Norma técnica CLSI, 2005).

Após serem esterilizados em filtros de 0,22 µm (Millex GV, Millipore, Merck), diluições seriadas do peptídeo dissolvidas em água Milli-Q foram preparadas em placas de 96 poços de fundo chato (TPP, Merck) para um volume final de 50 µL. O peptídeo Raniseptina-BI 1 foi testado na faixa de concentração de 128 a 0,25 µM, sendo que 50 µL do inóculo em meio foram adicionados a cada poço na concentração final de 10⁵ células/mL e incubado por 24 h a 37 °C. A inibição do crescimento foi determinada pela leitura da DO a 620 nm em uma leitora de placas Multiskan[®]FC (Thermo Scientific, USA).

Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,8% (v/v) e água Milli-Q, ambos incubados com as suspensões bacterianas.

A concentração inibitória mínima (MIC) foi definida como a menor concentração na qual não houver crescimento espectrofotometricamente detectável do patógeno ao término do tempo de incubação. Os experimentos foram realizados, pelo menos, três vezes em datas distintas.

4.8.2 Ensaio antifúngico

Para avaliar a atividade anfúngica do peptídeo Raniseptina-BI 1 sobre fungos patogênicos foram utilizadas as leveduras *Candida albicans* ATCC 14053 e *Cryptococcus neoformans* H99) Alíquotas de 200 µL da suspensão fúngica foram transferidas para 6,8 mL de meio BHI (*Brain Heart Infusion*) e mantida sob agitação constante durante 20 h a 37 °C. Após a incubação, foi realizada a leitura da DO a 620 nm e ajustada para 0,08 – 0,1. Em seguida, a suspensão foi diluída em meio BHI na proporção de 1:2000 (Norma técnica CLSI, 2005).

Alíquotas de 50 µL da Ranisetpina-BI 1 (na concentração inicial: 256 µM) foram filtradas em filtros de 0,22 µm (Millex GV, Millipore, Merck), diluídas em série e misturadas com 50

μL da suspensão fúngica contendo aproximadamente 5×10^2 CFUs em placas de 96 poços. Em seguida, a placa foi incubada por 22 h a 37°C . Após o período da incubação, as placas foram lidas a 620 nm em leitora de microplacas Multiskan[®] FC (Thermo Scientific, USA).

Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,8% (v/v) e água Milli-Q, ambos incubados com as suspensões fúngicas.

A concentração inibitória mínima (MIC) foi definida como a menor concentração na qual não houver crescimento espectrofotometricamente detectável do patógeno ao término do tempo de incubação. Os experimentos foram realizados, pelo menos, três vezes em datas distintas.

4.8.3 Ensaio hemolítico

O ensaio hemolítico foi realizado como descrito em Castro e colaboradores (2009). Eritrócitos de sangue humano de doador voluntário foram separados do plasma por centrifugação (800 g, 5 min a 25°C) e lavados três vezes com tampão-salina Tris-HCL 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M. O mesmo tampão foi empregado para solubilizar as amostras e preparar uma suspensão 1% (v/v) de eritrócitos. A suspensão de eritrócitos humanos foi tratada com os peptídeos na faixa de concentração de 128 a $0,25 \mu\text{M}$. Alíquotas de $100 \mu\text{L}$ da suspensão de eritrócitos foram adicionadas às diferentes concentrações do peptídeo e incubadas por 1 h à temperatura ambiente. Após esse período, os tubos foram centrifugados e uma alíquota de $100 \mu\text{L}$ de cada sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços de fundo chato (TPP, Merck) e a leitura da absorvância realizada a 405 nm em leitora de microplacas Multiskan[®] FC (Thermo Scientific, USA).

Foram empregados como controles: solução tampão, para indicar a ausência de hemólise e solução 1% (v/v) Triton X-100, para indicar 100% de hemólise. Todos os experimentos foram realizados em triplicada e os resultados expresso como média \pm DP. A porcentagem de hemólise foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ hemólise} = 100 (A_{\text{peptídeo}} - A_{\text{Tris-salina}}) / (A_{\text{Triton}} - A_{\text{Tris-salina}})$$

A concentração do peptídeo capaz de promover 50% de lise dos eritrócitos (HC_{50}) foi calculada por regressão não-linear usando o programa GraphPad Prism v. 5.04.

O procedimento descrito foi submetido à aprovação do Comitê de Ética Humana da Universidade de Brasília.

4.9 Análise da morfologia de *E. coli* após incubação com o peptídeo Raniseptina-BI 1

Este protocolo foi baseado em Luca et al., 2013; Mangoni et al., 2004, com modificações.

Crescimento do inóculo

As células de *E. coli* (ATCC 25922) foram retiradas diretamente da placa de cultura bacteriana, com o auxílio de uma alça calibrada de 10 µL, e colocadas em tubos de polipropileno contendo 7 mL de tampão PBS 1x. Foi realizada a leitura do inóculo em espectrômetro no comprimento de onda de 535 nm e ajustado para a faixa entre 0,08 e 0,1.

Preparação das amostras

Aproximadamente 1×10^8 células bacterianas foram utilizadas. Alíquotas de 100 µL desse inóculo foram incubados com 100 µL do peptídeo em diferentes concentrações (2, 4 e 8 µM), escolhidas conforme os valores de MIC obtidos com os ensaios contra microrganismos. As amostras foram incubadas por 30 min a 37 ° e, em seguida, centrifugadas a 10.000 g por 5 min. Como controle negativo, empregou-se 100 µL do inóculo em 100 µL de água Milli-Q.

Fixação primária

Após a etapa de centrifugação, o sedimento obtido foi dissolvido em 500 µL de fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5% em 0,2 M tampão cacodilato de sódio, pH 7,2) e incubando por 24 h (Corliss et al., 1975).

Pós-Fixação com Tetróxido de Ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1 M (v/v)

Após fixação primária, a amostra foi centrifugada a 10000 x g por 2 min e descartado o sobrenadante. Então, adicionou-se o tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,4), seguido de 2 lavagens com o mesmo tampão durante 5 min. Após fixação foi realizada com a adição de tetróxido de ósmio 1% durante 1 h. Para eliminação do excesso de tetróxido de ósmio, fez-se 2 lavagens com tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Em seguida, as amostras foram colocadas em uma lamínula de vidro, foi pingada 1 gota de poli-L-lisina e espalhada sobre toda a superfície da lamínula. Deixou-se em repouso por 5 min para secagem e depois foi retirado o excesso.

Desidratação

A amostra foi submetida a desidratação com passagem por uma série crescente de acetona (50%, 70%, 90% e 100%), tendo sido incubada por 10 min em cada concentração. A etapa de incubação na concentração de 100% foi repetida 2 vezes.

Ponto crítico e metalização

Após o procedimento de desidratação, a amostra foi colocada por 40 min na câmara de ponto crítico, a fim de retirar toda a água do tecido. Finalmente foi realizado o processo de metalização, onde uma fina camada de ouro (~ 20 nm de espessura) foi depositada sobre as amostras.

Processamento de imagem por MEV

Por fim, a imagem foi gerada no equipamento Quanta 450 – FEI, no Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM) da Universidade de Brasília-UnB. As amostras foram examinadas e fotografadas no aumento de 10.000 vezes.

4.10 Avaliação da capacidade imunomodulatória do peptídeo Raniseptina-BI 1 sobre neutrófilos humanos

4.10.1 Separação de neutrófilos

Alíquotas de sangue periférico (20 mL) foram coletados de três doadores saudáveis em seringa estéril e heparinizada dos quais 12 mL foram colocados sobre gradiente de densidade utilizando Percoll (60 % e 70 %). O sangue sobre o gradiente foi centrifugado por 15 min a 1.300 rpm, lavado 2x com HBSS 1x e as hemácias foram lisadas adicionando-se 3 mL de água Milli-Q por 25 seg seguido da adição de 3 mL de HBSS 2x. Os neutrófilos foram então avaliados quanto à viabilidade e quantidade em câmara de Neubauer e quanto à morfologia e pureza.

34.10.2. Ativação de neutrófilos

Os neutrófilos foram divididos igualmente em alíquotas para análise de quatro condições, sendo três delas estímulos simples (controle, fMLP 100 nM e peptídeo 16 µM) e uma condição de estímulo duplo (peptídeo + fMLP). A concentração da suspensão de células foi ajustada com adição de HBSS com Ca²⁺ e Mg²⁺ e plasma autólogo de forma que a concentração final de células fosse 6667 células/mL. Todas as condições foram incubadas em ThermoMixer (Eppendorf AG, Alemanha) a 37 °C, 350 rpm durante 1 h. Na condição de estímulo duplo, o fMLP foi adicionado após 20 min de incubação com o peptídeo.

4.10..3 Fagocitose de *Saccaromyces cerevisiae*

Após 20 min de ativação, para avaliação da fagocitose, uma alíquota de células de cada condição foi ressuspendida em suspensão de *Saccaromyces cerevisiae* na proporção de 1:5 (neutrófilos: leveduras) e colocada em lâmina para incubação em banho maria por mais 40 min. Finalizada a incubação, as lâminas foram secadas com ar quente e coradas utilizando o kit Panótico rápido. Para análise, 100 células de cada poço foram avaliadas quanto à presença de

leveduras no interior ou na membrana dos neutrófilos e quanto à quantidade de leveduras em cada fagócito.

4.10.4 Avaliação da produção de NET-DNA

Neutrófilos (6600 células/mL) após incubação com o peptídeo (16 μ M) foram transferidos para poços de uma placa escura de 96 poços e marcados com Sytox Green[®] (Invitrogen S7020). A quantificação fluorimétrica de NET-DNA foi realizada em equipamento CLARIOstar[®] Multi-Mode Microplate Reader (BMG Labtech, Alemanha) a cada 15 min durante 120 minutos (parâmetros empregados ex:485 nm/em:535 nm). As leituras foram obtidas a 37 °C como unidades arbitrárias de fluorescência.

4.11. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 7.03[®]. Foi realizado o teste ANOVA de 2-vias seguido de pós-teste de Tukey para comparação entre todos os valores obtidos adotando um valor de significância de $p < 0,05$.

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso indevido e o abuso de antibióticos ao longo dos anos tem levado à seleção de bactérias que são, atualmente, resistentes a todos os antibióticos comercialmente disponíveis, conhecidas popularmente como “superbactérias”, para as quais temos escassos ou nenhum tratamento. A resistência bacteriana a antibióticos (RAM) é especialmente dramática nas infecções adquiridas em hospitais (nosocomiais), onde qualquer pequena cirurgia ou tratamentos hospitalares de pequeno porte podem trazer, em muitos casos, riscos de infecções bacterianas graves aos pacientes. Isso, por sua vez, cria um ciclo de *feedback* que leva à seleção de bactérias ainda mais resistentes aos antimicrobianos (Bravo et al., 2018).

Diante desse grave cenário, várias terapias alternativas foram propostas, entre as quais o uso terapêutico de peptídeos antimicrobianos (Rima et al., 2021; Yu et al., 2018). De maneira geral, os PAMs exibem várias características interessantes, como alta potência, seletividade e eficácia, amplo espectro de ação, toxicidade potencialmente baixa e baixo acúmulo nos tecidos (Boparai & Sharma, 2019).

A pele de anuros (sapos, rãs e pererecas) é uma fonte abundante de PAMs abundantes que podem ter emprego terapêutico (Patocka et al., 2018). As ações microbidas dos peptídeos da pele do sapo contra patógenos multirresistentes têm atraído considerável atenção e, além da exploração do riquíssimo arcabouço de PAMs naturais presentes na secreção dos anuros, inúmeros análogos sintéticos com aumento da potência antimicrobiana, diminuição da toxicidade e meia-vida mais longa na circulação foram propostos e suas propriedades terapêuticas avaliadas (Pantic et al., 2017).

O objetivo geral desse trabalho foi produzir, por síntese química, o peptídeo Raniseptina-B1 1 isolado por Araújo (2018) da pele da rã *Boana lundii* de modo a obter quantidade suficiente de material para avançar na caracterização de suas propriedades biológicas.

A descoberta inicial de PAMs dependia do isolamento a partir de suas fontes naturais, geralmente exigindo grandes quantidades de material biológico bruto do qual pequenas quantidades de peptídeo puro poderiam ser extraídas. Agora é possível a produção de PAMs em grande escala por meio da tecnologia do DNA recombinante ou por síntese química de peptídeos (Gan et al., 2021). A síntese química de peptídeos em fase sólida (SPPS), inicialmente introduzida por Merrifield (1963), é o método mais comumente empregado para produzir peptídeos de tamanho pequeno a médio (até 50 resíduos) (Merrifield, 1963).

A síntese química por fase sólida com estratégia Fmoc do peptídeo Raniseptina-B1 1 foi empregada com sucesso. Alíquotas de 10,0 mg do peptídeo bruto foram purificadas

empregando-se RP-HPLC em uma coluna C18, resultando na obtenção do peptídeo sintético com alto grau de pureza. A Figura 9 representa o perfil típico resultante da purificação do peptídeo Raniseptina-BI 1 sintético. O peptídeo de interesse exibiu o tempo de retenção de 21 min, eluindo na concentração do gradiente de acetonitrila de aproximadamente 46%, revelando o caráter hidrofóbico desse peptídeo. Peptídeos antimicrobianos de anuros são muito ricos em resíduos hidrofóbicos, os quais correspondem por, pelo menos, 50% de sua composição, sendo a leucina o aminoácido mais abundante observado. De 12,5 min até 20 min foram eluídos subprodutos gerados durante os procedimentos de síntese e clivagem, o que é normal nos protocolos de síntese química manual.

Conforme pode ser observado no perfil cromatográfico exibido na Figura 9, o peptídeo Raniseptina-BI 1 aparece em maior proporção que os produtos eluídos até 20 min de cromatografia, sendo que, após a eluição da Raniseptina-BI 1, há a eluição de poucos contaminantes. Após o término do processo de síntese, o peptídeo é clivado da resina. Durante esta etapa, dependendo das condições de clivagem, todos os grupos de proteção laterais serão removidos e o peptídeo estará disponível como material bruto a ser purificado. Esta abordagem linear é a estratégia padrão para síntese realizada em suporte sólido (Bruckdorfer et al., 2005). O uso de uma etapa de purificação por RP-HPLC do material bruto produzido é essencial para atingir a pureza necessária do produto final (Zompra et al., 2009).

Outro fator de grande importância para a avaliação da estratégia sintética é o perfil de impurezas e a eficiência na purificação desses subprodutos. Por exemplo, no método SPPS, os principais subprodutos resultam de uma falha de sequência que comumente ocorre como resultado de uma deleção ou de uma adição dupla durante a síntese. Este tipo de subproduto é difícil de purificar e a combinação de várias etapas/técnicas cromatográficas se faz necessária. Assim, uma estratégia que fornece produtos facilmente purificados em uma etapa única por coluna cromatográfica simples é comumente preferida a uma estratégia em que o subproduto produzido é extremamente difícil de ser separado do produto principal (Zompra et al., 2009).

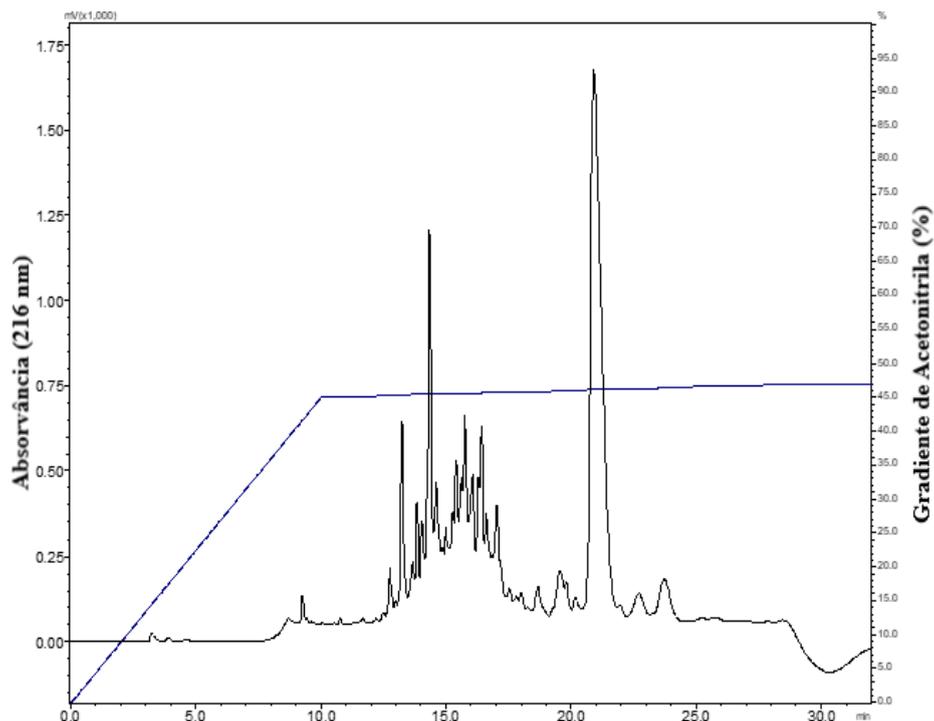


Figura 9. Perfil cromatográfico típico do fracionamento por RP-HPLC do peptídeo Raniseptina-B1 1. A corrida cromatográfica foi realizada empregando-se coluna C18 (Shim-pack VP-ODS, 4,6 x 150 mm, 5 μ m) com fluxo de 1 mL/min e detecção ao UV em 216 nm. A linha azul representa o gradiente de solvente B (0,1% de TFA em acetonitrila). A fração cromatográfica com tempo de retenção de 21 min corresponde ao peptídeo Raniseptina-B1 1 puro.

O peptídeo Raniseptina-B1 1 sintético purificado foi submetido à análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF de modo a se determinar o seu grau de homogeneidade, por meio da análise das massas moleculares monoisotópicas protonadas dos principais componentes peptídicos presentes. O peptídeo apresentou alto grau de homogeneidade com a presença de um único componente com massa molecular protonada

igual a 2724,2 Da (Figura 10), correspondendo ao peptídeo nativo isolado por Naywara Araújo, em 2018, a partir da secreção cutânea do anuro *Boana lundii* (Araújo, 2018). Assim, o peptídeo Raniseptina-BI 1 sintético exibiu alto grau de pureza, não sendo necessária etapas cromatográficas adicionais.

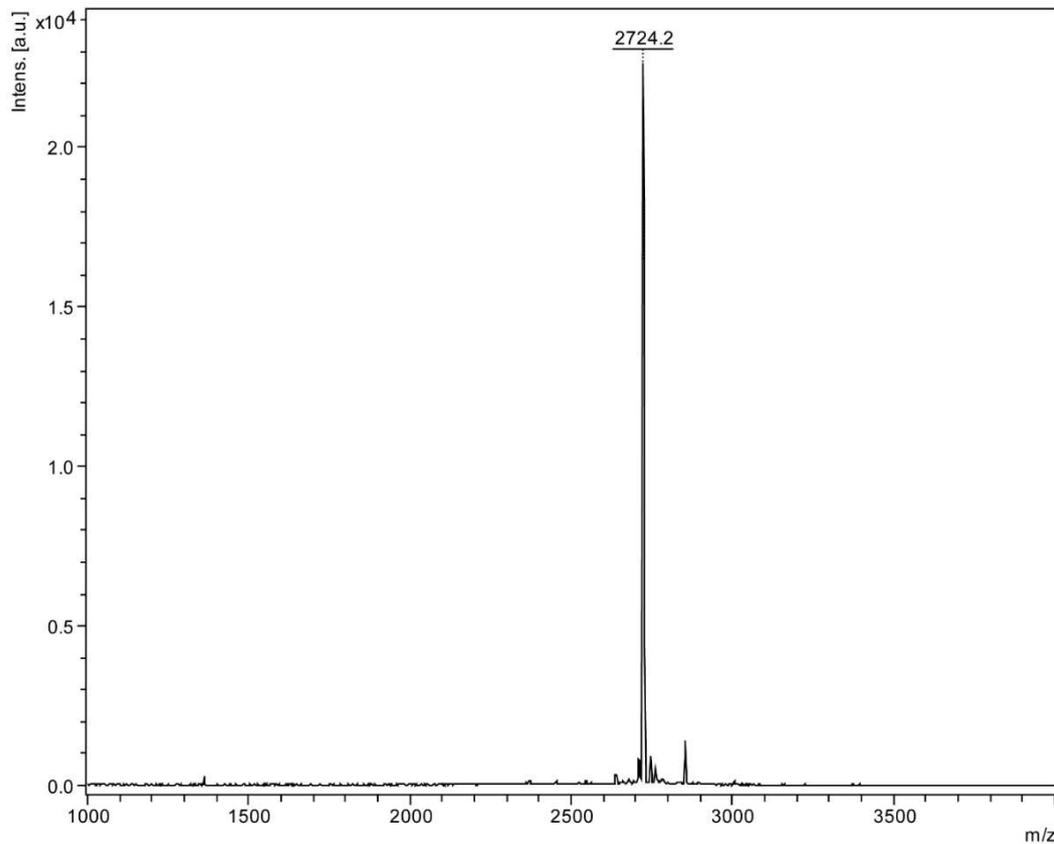


Figura 10. Espectro de massas (MALDI-TOF) do peptídeo Raniseptina-BI 1 obtido em modo positivo com uso de refletor (matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico).

O peptídeo Raniseptina-BI 1 representa o primeiro peptídeo da família das raniseptinas isolado da espécie *B. lundii* (Araújo, 2018). As buscas por similaridade/identidade foram realizadas utilizando-se o algoritmo BLASTp, um algoritmo empregado para comparar informações de sequências biológicas primárias, tais como sequências de aminoácidos de diferentes proteínas disponíveis em bancos de sequências públicos. Adicionalmente, foram incluídas nas análises, comparações com peptídeos descritos pelo nosso grupo de pesquisa isolados de outras espécies de anuros do gênero *Boana* (Araújo, 2018; Castro et al., 2005).

Os resultados da busca empregando Blastp mostrou que o peptídeo Raniseptina-BI 1 apresenta um índice de identidade de 79% e de similaridade de 83% com a Raniseptina 3 e de 75% e de 79% de identidade e similaridade, respectivamente, com a Raniseptina 13, ambas previamente identificadas na pele do anuro *Boana raniceps* (Magalhães et al., 2008).

O alinhamento múltiplo entre as sequências de aminoácidos Raniseptina-B1 1 e das duas raniseptinas de *B. raniceps* está ilustrado na Figura 11 onde pode-se observar o alto grau de identidade entre esses peptídeos.



Figura 11. Alinhamento múltiplo da sequência do peptídeo Raniseptina-B1 1 com as sequências das Raniseptinas 3 e 13 identificadas na pele de *Boana raniceps*. Resíduos idênticos estão indicados por (*) e substituições conservativas estão indicadas por (:). Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos estão indicados em vermelho, os ácidos em azul, os básicos em magenta e os polares em verde. O multi-alinhamento foi realizado empregando-se a ferramenta CLUSTAL OMEGA (1.2.4).

Já com as Raniseptinas 1, 2, 8, 9 e 11, também resultantes das buscas, os índices de identidade e de similaridade foram de 63% e 66%, respectivamente. A Figura 12 ilustra esse menor grau de similaridade estrutural com a Raniseptina-B1 1 por meio do multi-alinhamento entre as sequências de aminoácidos desses peptídeos.



Figura 12. Alinhamento múltiplo da sequência do peptídeo Raniseptina-B1 1 com as sequências das Raniseptinas 1, 2, 6, 9 e 11 identificadas na pele de *Boana raniceps*. Resíduos idênticos estão indicados por (*) e substituições conservativas estão indicadas por (:). Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos estão indicados em vermelho, os ácidos em azul, os básicos em magenta e os polares em verde. O multi-alinhamento foi realizado empregando-se a ferramenta CLUSTAL OMEGA (1.2.4).

As comparações com as hiliinas, peptídeos previamente identificados na secreção de *B. lundii* (Araújo, 2018; Castro et al., 2005), revelaram níveis de similaridade muito baixos (Figura 13).

Raniseptina-B1 1	GFLDAVKAIGKKVGVKIAIGVAKNLLNS	27
Hilina b1	-FIGAILP-----AIAGLVHGLINR	19
Hilina b2	-FIGAILP-----AIAGLVGGLINR	19
Hilina b3	-FLGAILP-----ALAGVIGKLING	19
Hilina b4	-FLGAVLP-----ALAGVIGSLINR	19
	*: *: *: *	

Figura 13. Alinhamento múltiplo entre a sequência do peptídeo Raniseptina-B1 1 com a das Hilinas identificadas na pele de *Boana lundii*. Os símbolos (*) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos estão indicados em vermelho, os ácidos em azul, os básicos em magenta e os polares em verde. O multi-alinhamento foi realizado empregando-se a ferramenta CLUSTAL OMEGA (1.2.4).

As raniseptinas formam uma família de peptídeos antimicrobianos relacionados às dermaseptinas que foram identificadas a partir da clonagem de cDNAs da pele do hilídeo *Boana raniceps* (Magalhães et al., 2008). As propriedades antimicrobianas da Raniseptina 1 foi demonstrada contra as bactérias patogênicas *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, exibindo um potencial antimicrobiano *in vitro* preferencialmente contra bactérias Gram-negativas e citotoxicidade limitada contra hemácias (Magalhães et al., 2008).

O peptídeo Raniseptina-B1 1 é catiônico com carga líquida +4 e apresentou um índice médio de hidropaticidade (GRAVY) igual a 0,559 (Tabela 1). Sua face hidrofóbica é longa, composta por Phe, Val, Val, Val, Leu, Ala, Gly, Leu e Ala.

O peptídeo Raniseptina-B1 1 apresenta características físico-química similares àquelas observadas nas demais raniseptinas, em especial com as Raniseptinas 3 e 13, que exibiram carga líquida +4 e Razão Hidrofóbica Total de 50%. No caso do índice Gravy, as três raniseptinas exibiram valores positivos, o que indica o caráter hidrofóbico dessas moléculas (Tabela 2). A hidrofobicidade é uma característica relevante nas interações dos PAMs com as membranas dos microrganismos, no entanto aumento excessivo na hidrofobicidade relaciona-se com uma atividade hemolítica mais pronunciada e uma queda na atividade antimicrobiana. Esse é um parâmetro muito importante a ser considerado ao se propor novos análogos de peptídeos antimicrobianos mais seletivos.

Tabela 1. Características físico-químicas do peptídeo raniseptina-B1 1.

Peptídeo	Mass Calc. (Da) ^a	Mass Obs. (Da) ^b	Carga Líquida ^c	Razão Hidrofóbica ^c Total (%)	GRAVY ^d
----------	---------------------------------	--------------------------------	-------------------------------	--	--------------------

Raniseptina-BI 1	2723,6	2723,2	+4	52	0.559
------------------	--------	--------	----	----	-------

^aMassa molecular teórica calculada empregando-se a ferramenta *Compute pI/Mw* disponível em https://web.expasy.org/compute_pi/

^aMassa molecular experimental obtida empregando-se análise por MALDI-TOF MS

^aValores calculados com o emprego da ferramenta *Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor* disponível em <https://aps.unmc.edu/prediction>.

^dValores calculados com o emprego da ferramenta *Gravy Calculator* disponível em <http://www.gravy-calculator.de/>.

Tabela 2. Características físico-químicas das Raniseptinas 1, 2, 3, 8, 9, 11 e 13.

Peptídeo	Mass Calc. (Da) ^a	Carga Líquida ^b	Razão Hidrofóbica	
			Total (%) ^b	GRAVY ^c
Raniseptina 1	3136,78	+3	44	-0,041
Raniseptina 2	3159,79	+3	45	-0,0069
Raniseptina 3	2958,77	+4	50	0,3
Raniseptina 8	3086,80	+3	45	0,155
Raniseptina 9	2958,74	+3	46	0,286
Raniseptina 11	3198,80	+4	45	-0,110
Raniseptina 13	2992,76	+4	50	0,264

^aMassa molecular teórica calculada empregando-se a ferramenta *Compute pI/Mw* disponível em https://web.expasy.org/compute_pi/

^bValores calculados com o emprego da ferramenta *Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor* disponível em <https://aps.unmc.edu/prediction>.

^cValores calculados com o emprego da ferramenta *Gravy Calculator* disponível em <http://www.gravy-calculator.de/>.

Estudos de relação estrutura-atividade com peptídeos revelaram que vários parâmetros físico-químicos e estruturais, incluindo cationicidade, anfipaticidade, hidrofobicidade e composição da sequência de aminoácidos estão entre os determinantes estruturais mais importantes para suas atividades microbicidas e citotóxicas (Takahashi et al., 2010).

A cationicidade é um dos fatores mais críticos para sua atividade antibacteriana (Takahashi et al., 2010), sendo que a grande maioria dos peptídeos antimicrobianos já descritos apresentam carga líquida positiva entre +2 e +6, resultado da presença de aminoácidos carregados positivamente (Lys e Arg) (Conlon, 2011).

A hidrofobicidade é outro fator importante que define a potência antimicrobiana e a seletividade celular (Takahashi et al., 2010) e, no caso da Raniseptina-BI 1 observa-se a presença de um elevado número de resíduos de aminoácidos apolares como Phe, Val, Leu, Ala, com uma Razão Hidrofóbica Total igual a 52%.

Esse conjunto de parâmetros físico-químicos associados ao peptídeo Raniseptina-BI 1 indicam que esse peptídeo provavelmente exibirá propriedades antimicrobianas.

A projeção em roda helicoidal (projeção de Schiffer-Edmundson) e a predição de estrutura secundária da Raniseptina-BI 1 foram realizadas com o uso de ferramentas de análise online. A projeção obtida (Figura 14) demonstra claramente uma hélice anfipática com duas regiões bem delimitadas (uma face hidrofóbica e outra hidrofílica), característica comumente

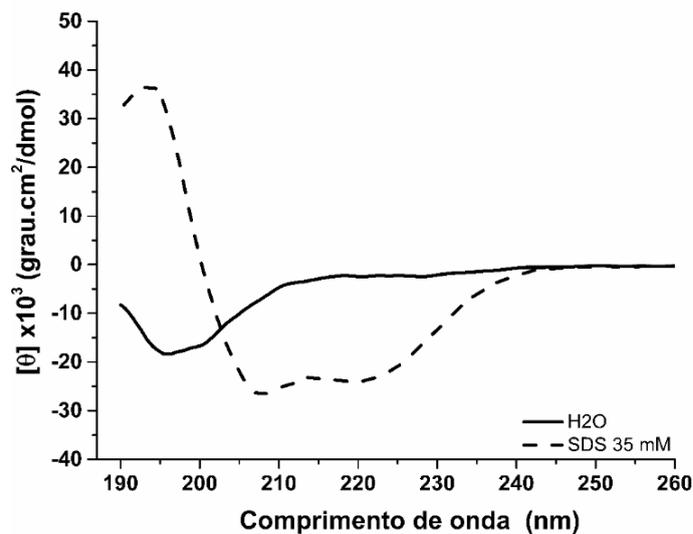


Figura 16. Espectros dicróicos na região distante do UV do peptídeo Raniseptina-BI 1 em água (linha sólida) e em SDS 35 mM (linha pontilhada).

A helicicidade do peptídeo raniseptina-BI 1 calculada, considerando o valor da elipticidade molar a 208 nm, na presença de SDS 35 mM foi de 82.7%. Este resultado sugere que este peptídeo apresenta alto potencial para estruturar-se adotando conformação em α -hélice na presença de membranas biológicas, podendo assim agir como agente antimicrobiano contra microrganismos patogênicos.

PAMs formadores de α -hélices são frequentemente mais ativos do que peptídeos com estrutura secundária menos definida e o aumento no conteúdo α -helicoidal correlaciona-se com atividades antimicrobianas mais fortes (Li et al., 2021; Brogden, 2005; Park et al., 2000). Embora vários novos peptídeos antimicrobianos ainda estejam sendo descobertos nas secreções da pele de anuros, a grande maioria dos PAMs já descritos exibe uma alta propensão à formação de α -hélices anfipáticas como, por exemplo, citropina 1.1, uperina 3.6, hilaseptina P1 e frenatina 1, onde todos adotam conformações α -helicoidais anfipáticas na presença de trifluoretanol, um agente membrano-mimético (Haney et al., 2009).

O peptídeo raniseptina-BI 1 sintético foi testado contra 4 bactérias e 2 espécies de fungos patogênicos. O peptídeo foi efetivo na inibição do crescimento das bactérias Gram-positivas com valores de MIC de 4 μ M para *S. aureus* e de 2 μ M para *S. epidermidis*. No caso das bactérias Gram-negativas testadas, observou-se uma maior atividade da Raniseptina-BI 1, com valores de 0,5 μ M para *E. coli* e de 1 μ M para *K. pneumoniae* (Figura 17, Tabela 3). O peptídeo também foi efetivo inibindo o crescimento das leveduras patogênicas *C. albicans* apresentando valor de MIC de 8 μ M e *Cryptococcus neoformans* com MIC igual a

64 μM (Tabela 3).

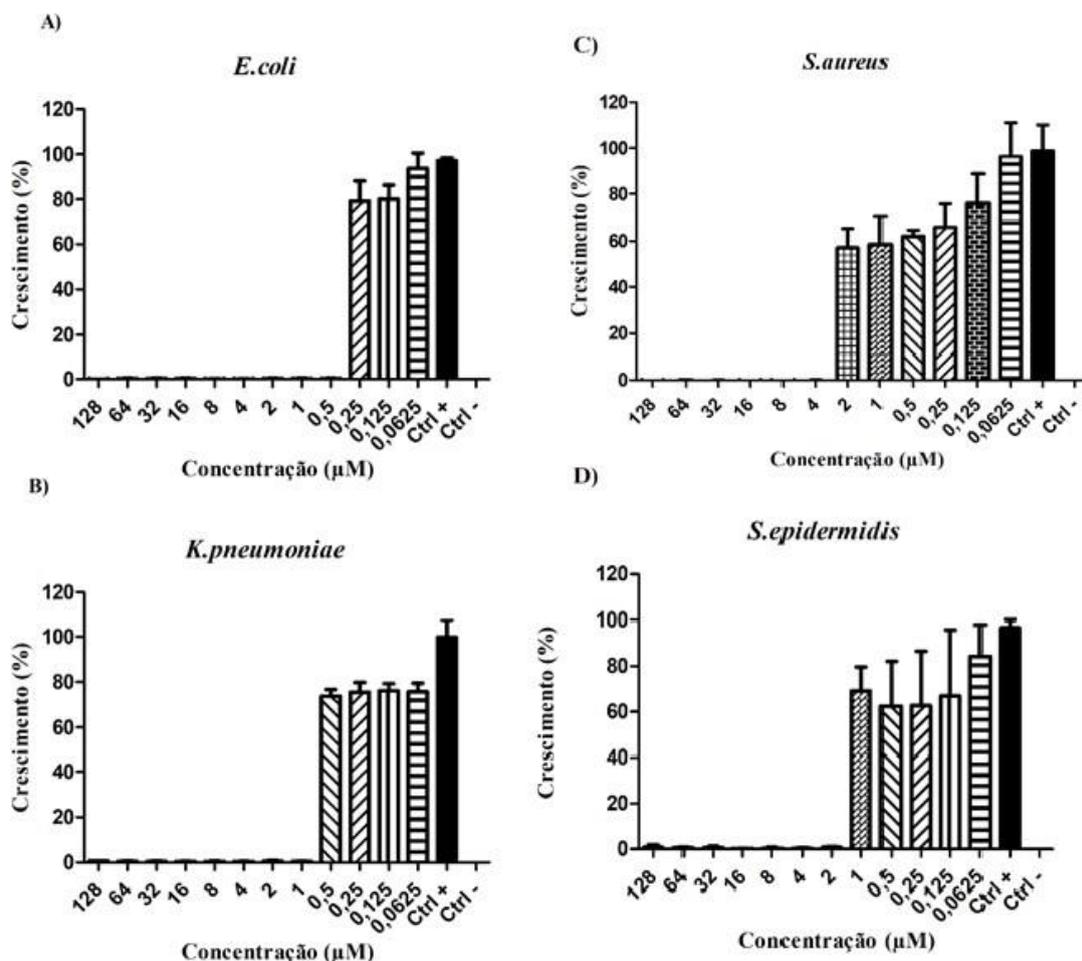


Figura 17. Porcentagem de crescimento das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas após incubação com o peptídeo Raniseptina-BI 1, onde: A) *E. coli*, B) *K. pneumoniae*. C) *S. aureus* e D) *S. epidermidis*. Controle positivo: suspensão bacteriana e água Milli-Q. Controle negativo: suspensão bacteriana e formaldeído 0,8%. Os resultados estão expressos como média + desvio padrão.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana (MIC^a, μM) do peptídeo Raniseptina-BI 1.

Microrganismos	Raniseptina-BI 1 (μM)
Bactéria Gram-negativa	
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	0,5
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	1
Bactéria Gram-positiva	
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	4
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	2
Leveduras	
<i>C. albicans</i> (ATCC 14053)	8
<i>Cryptococcus neoformans</i> (H99)	64

^aMIC: concentração inibitória mínima

Os valores de MICs obtidos foram semelhantes aos encontrados por Araújo (Araújo, 2018) em experimentos realizados com a versão natural da Raniseptina-B1 1 para a maioria dos microrganismos testados. Merecem destaque os valores obtidos para a bactéria Gra-negativa *E. coli* com valor de MIC igual a 4 μM , enquanto no presente trabalho foi obtido um valor de 0,5 μM e para a levedura *C. neoformans* foi determinado anteriormente um MIC igual a 4 μM e nesse estudo o valor obtido foi de 64 μM . Essas diferenças observadas podem ser explicadas em função de ajustes no protocolo do ensaio antimicrobiano adotado no presente estudo e à escala logarítmica do inóculo bacteriano empregado conforme protocolo estabelecido pelo NCCLS/CLSI M7-A6.

Ao se comparar os efeitos antimicrobianos da Raniseptina-B1 1 com outros peptídeos já isolados da espécie *B. lundii*, pode-se constatar que as hiliinas b3 e b4 mostram-se, em geral, menos ativas sobre as bactérias e leveduras testadas com valores de MIC variando de 8-64 μM (Araújo, 2018).

Também foram similares aos resultados obtidos com a avaliação das propriedades antimicrobianas da Raniseptina 1 (previamente isolada de *B. raniceps*) com valores de MIC de 5 μM para *E. coli* e 20 μM para *S. aureus* (Magalhães et al., 2008). No caso das Raniseptinas 3 e 6, descritas por Freitas (2020), observou-se valores de MIC na faixa de 1-32 μM para as mesmas bactérias, também se apresentando mais efetivas contra as bactérias Gram-negativas testadas. Esses valores estão na mesma faixa dos valores de MICs comumente observados para PAMs da família das dermaseptinas (Brand et al., 2006; Mor et al., 1994).

Alguns outros peptídeos descritos para o gênero *Boana* apresentaram também, em geral, menor efetividade sobre as bactérias Gram-positivas, como a Hylina a1 que exibiu um MIC igual a 8 μM contra *S. aureus* (Castro et al., 2009), a Cinerascetina 01 com MIC igual a 10 μM (Almeida et al., 2015) e a Figainina 2 com MIC igual a 8 μM contra a bactéria *S. aureus*.

O peptídeo Raniseptina-B1 1 apresenta uma longa superfície hidrofóbica, com um índice médio de hidropaticidade de 0,56 e carga líquida +4. Peptídeos que foram projetados para ter domínios hidrofóbicos e com carga líquida positiva parecem interagir com os grupos aniônicos de fosfatidilglicerol e cardiolipina na superfície da membrana citoplasmática de *E. coli*, por exemplo (Anunthawan et al., 2015). Assim, a facilidade de adentrarem na membrana da bactéria Gram-negativa *E. coli*, refletindo-se em um valor de MIC bem baixo, 0,5 μM .

Também avaliou-se a citotoxicidade da Raniseptina-B1 1 por meio da detecção da sua capacidade em induzir a lise de eritrócitos. Na maior concentração empregada (128 μM), o peptídeo apresentou uma taxa de hemólise moderada, ~ 40% de hemólise. Já na região dos valores de MICs determinados para as bactérias testadas (0,5 – 4 μM), a porcentagem de

hemólise ficou abaixo de 10%, indicando uma baixa atividade citolítica.

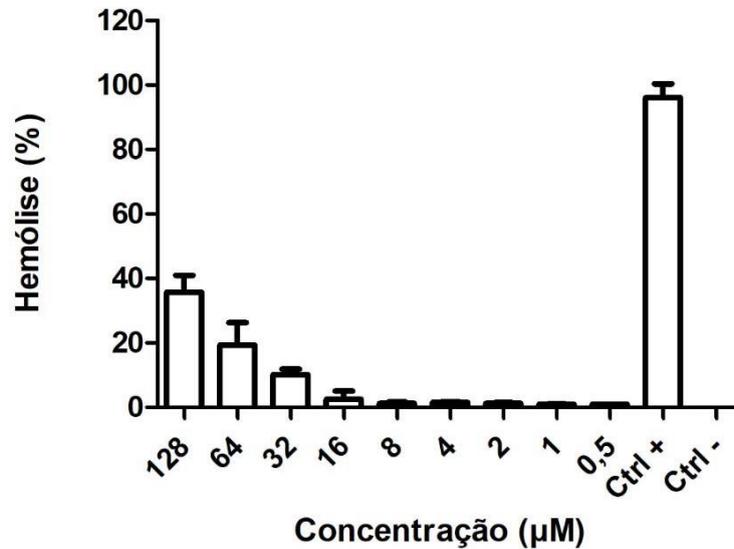


Figura 18. Atividade hemolítica do peptídeo raniseptina-BI 1 em eritrócitos humanos. Controle positivo foi utilizado o Triton X-100 1% (v/v) como 100% de hemólise e Tris-NaCl para o controle negativo (0% de hemólise). Valores mostrados com \pm SD médias.

Atualmente existem alguns sites para predição de atividade hemolítica de peptídeos (Chaudhary et al., 2016; Timmons & Hewage, 2020). Foi realizado uma busca em um deles, o HemoPi, um servidor web e também aplicativo móvel, desenvolvido para predição e triagem de peptídeos com potencial hemolítico, com alcance de 95% de precisão, baseando-se em algumas características do peptídeo, tais como sua sequência e composição de aminoácidos e propriedades físico-químicas (Chaudhary et al., 2016). Analisando-se a sequência do peptídeo raniseptina-BI 1, foi obtido o valor de 0,41 em uma escala entre 0 e 1, onde 1 indica muito provavelmente hemolítico e 0 muito improvável de ser hemolítico.

Tabela 4. Pontuação PROB (potencial hemolítico) do peptídeo Raniseptina-BI 1.

Peptídeo	Sequência	Pontuação PROB
Raniseptina-BI 1	GFLDAVKAIGKKVKGIAIGVAKNLLNS	0,41

A ocorrência de atividade hemolítica é um dos fatores limitantes na aplicação terapêutica dos PAMs, sendo assim essencial conhecer sua toxicidade sobre células de mamíferos (Wang, 2020). Como observado, a Raniseptina-BI 1 apresentou uma taxa de hemólise baixa na região terapêutica e tal efeito pode ser decorrente do caráter catiônico desse peptídeo, favorecendo as interações com as moléculas de ácido siálico carregadas negativamente presentes nas membranas dos eritrócitos (Blondelle et al., 1995).

Nas concentrações efetivas contra os microrganismos avaliados (MICs entre 0,5 e 4 μM), o peptídeo Raniseptina-BI 1 não promoveu hemólise significativa (abaixo de 10%), o que torna este peptídeo um candidato promissor para seu uso na clínica médica, comportamento semelhante ao observado para as Raniseptinas 3 e 6, onde ambas promoveram cerca de 20% de hemólise mesmo na concentração mais alta utilizada (128 μM), sendo que nas concentrações onde a atividade antibacteriana foi relevante (entre 2 e 8 μM), a sua atividade citolítica ficou abaixo de 5% (Freitas, 2020).

As alterações morfológicas sofridas pela bactéria Gram-negativa *E. coli* (bactéria que se mostrou mais susceptível à Raniseptina-BI 1) tratada com o peptídeo raniseptina-BI 1 foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A MEV é uma técnica comumente usada para avaliar as mudanças morfológicas sofridas por bactérias após o tratamento com PAMs, com foco principalmente na interrupção da integridade da membrana plasmática associada a alterações morfológicas das células (Li et al., 2021; Li et al., 2019). Os dados de MEV podem auxiliar na elucidação do possível mecanismo de morte celular promovido pelos PAMs. Por exemplo, no modelo "*barrel-stave*", os peptídeos formam poros transmembrânicos por sua inserção direta no núcleo lipídico da membrana alvo (Ehrenstein & Lecar, 1977). Neste modelo, o PAM se liga à superfície da membrana na forma monomérica, seguido por sua oligomerização e formação de poros. O recrutamento de monômeros adicionais pode aumentar o tamanho dos poros, permitindo o vazamento de conteúdo citoplasmático com a morte celular subsequente. Nesse mecanismo, estruturas secundárias de peptídeos, como α -hélices, são essenciais para a formação dos poros (Guilhelmelli et al., 2013).

As bactérias não tratadas com o peptídeo apresentaram uma superfície com aspecto brilhante, típica desta bactéria (Normark et al., 1969). Em contraste, as bactérias tratadas nas diferentes concentrações (2, 4 e 8 μM) apresentaram rugosidades, irregularidades, e deformidades na superfície celular. Também foram observadas a presença de poros, provavelmente causadas pela interação e inserção dos peptídeos na camada externa dos microrganismos (Figuras 19 e 20).

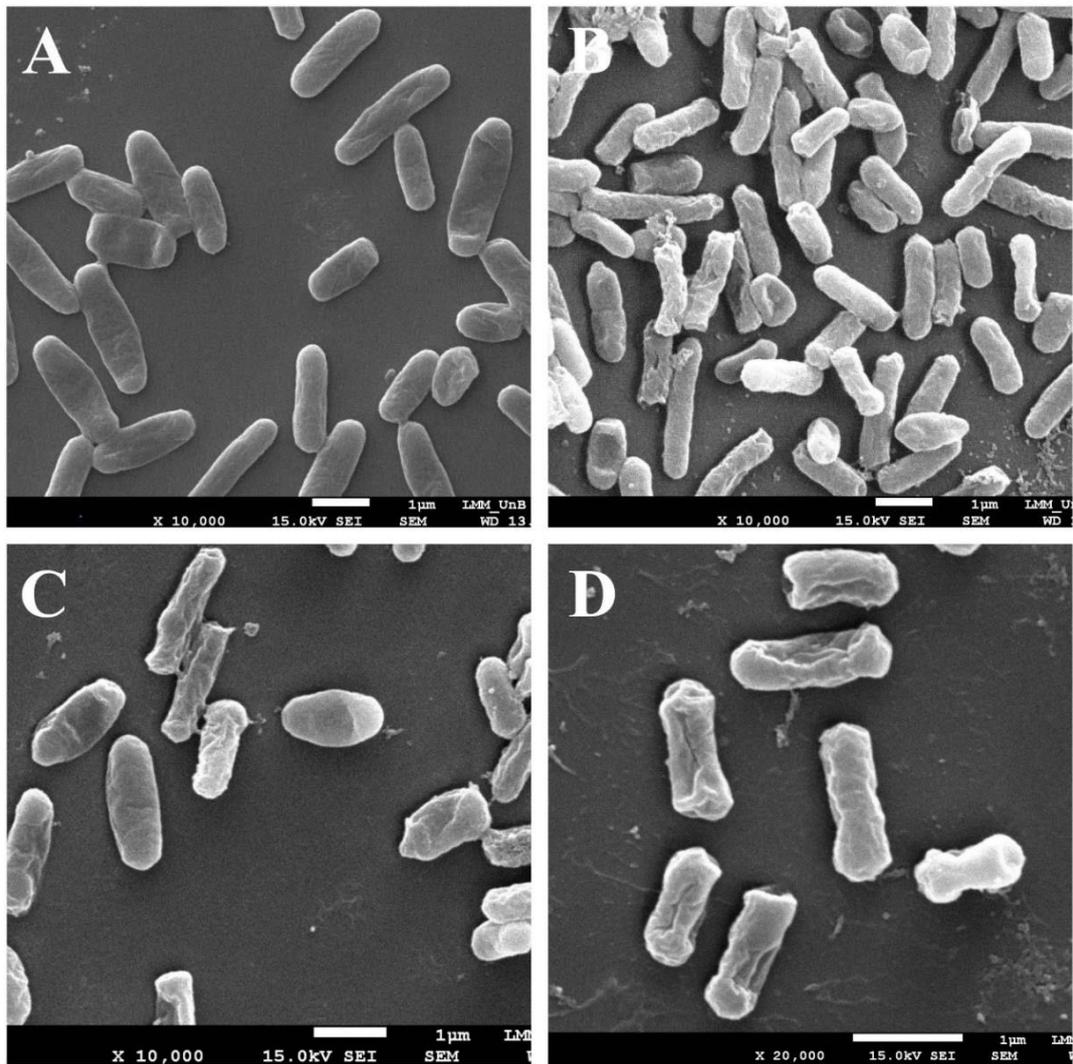


Figura 19. Micrografias da microscopia eletrônica de varredura de células de *E. coli* após 30 min de tratamento com o peptídeo raniseptina-BI 1. Onde: A) Células não tratadas (controle); B) Bactérias tratadas com Raniseptina-BI 1 2 μM (4 x MIC); C) Bactérias tratadas com Raniseptina-BI 1 4 μM (8 x MIC) e D) Bactérias tratadas com Raniseptina-BI 1 8 μM (16 x MIC). As figuras foram ampliadas x10.000 e x20.000 vezes. Barra de escala = 1 μm.

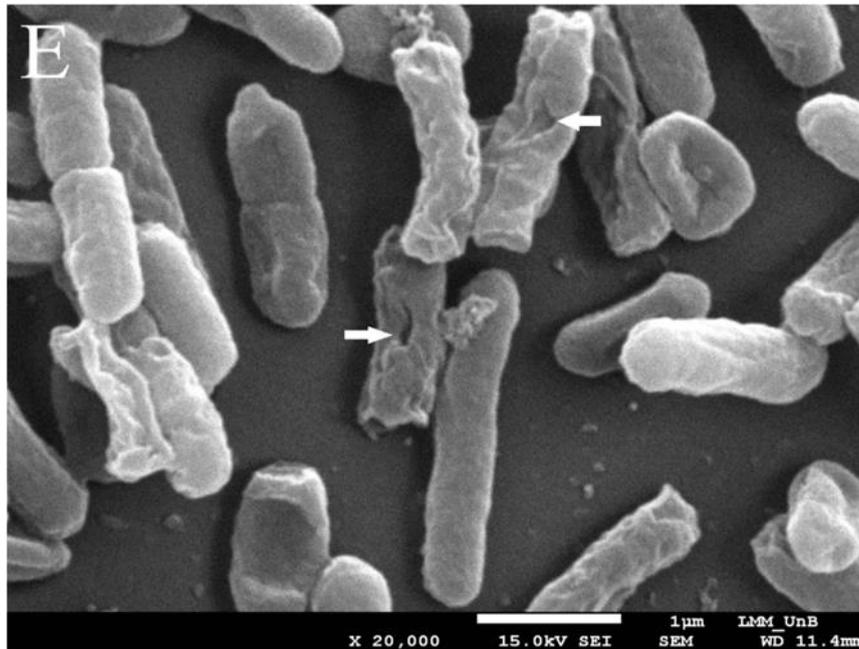


Figura 20. Micrografia da microscopia eletrônica de varredura de células de *E. coli* após 30 min de tratamento com o peptídeo raniseptina-BI 1 na concentração de 2 μM (4 x MIC). Note nas setas (em branco) a presença de poros causadas por este PAM. Ampliação de x 20 000 vezes. Barra de escala = 1 μm .

Ao se comparar esses resultados com os descritos na literatura, pode-se observar semelhanças como no caso do PAM Temporina L (isolado da secreção da pele da rã *Rana temporaria*) que promoveu na bactéria *E. coli* na concentração de 2 μM o aparecimento de um padrão de rugosidade profunda da superfície celular da bactéria (Mangoni et al., 2004). Em um estudo com a Brevinin-OS, oriunda de *Odorrana schmackeri*, observou que o peptídeo foi capaz de promover a morte da bactéria pela combinação da formação de poros / canais de íons (pelo modelo “barrel-stave” ou modelo do poro toroidal). Esses peptídeos direcionados à membrana das bactérias interrompem a integridade da membrana com a formação de poros e, finalmente, levam ao vazamento do conteúdo celular das bactérias (Zhou et al., 2020).

Também analisou-se os efeitos do peptídeo Raniseptina-BI 1 na imunidade inata por meio da avaliação da influência na modulação da capacidade fagocítica e da produção de NETs de neutrófilos humanos.

A capacidade fagocitária do neutrófilo é o meio utilizado para a destruição do agente microbiano que conseguiu ultrapassar as barreiras físicas e químicas epiteliais (Figura 21) (Lee et al., 2003). No presente estudo, a eliminação de microrganismos foi observada por meio de dois parâmetros: (1) em função do número de neutrófilos realizando fagocitose da levedura *Saccaromyces cerevisiae* (Figura 22); (2) e em função do número de leveduras (*S. cerevisiae*) fagocitadas por cada neutrófilo (Figura 23).

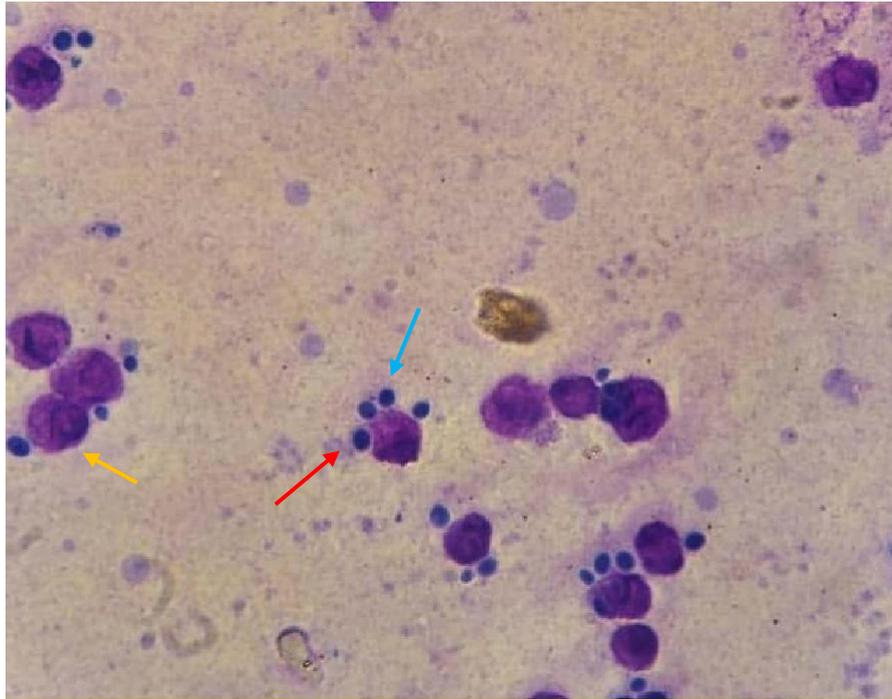


Figura 21. Fagocitose de leveduras por neutrófilos. Seta amarela indica neutrófilo, seta azul levedura *Saccharomyces cerevisiae* e seta vermelha, neutrófilo fagocitando a levedura. Aumento de 100x. Fonte: Arquivo pessoal.

O número de neutrófilos realizando fagocitose apresentou diferença significativa somente em relação ao fMLP ($p = 0,0137$) (Figura 22). A incubação de neutrófilos com a Raniseptina-B1 1, apesar de aparentemente influenciar o resultado, não teve validação estatística.

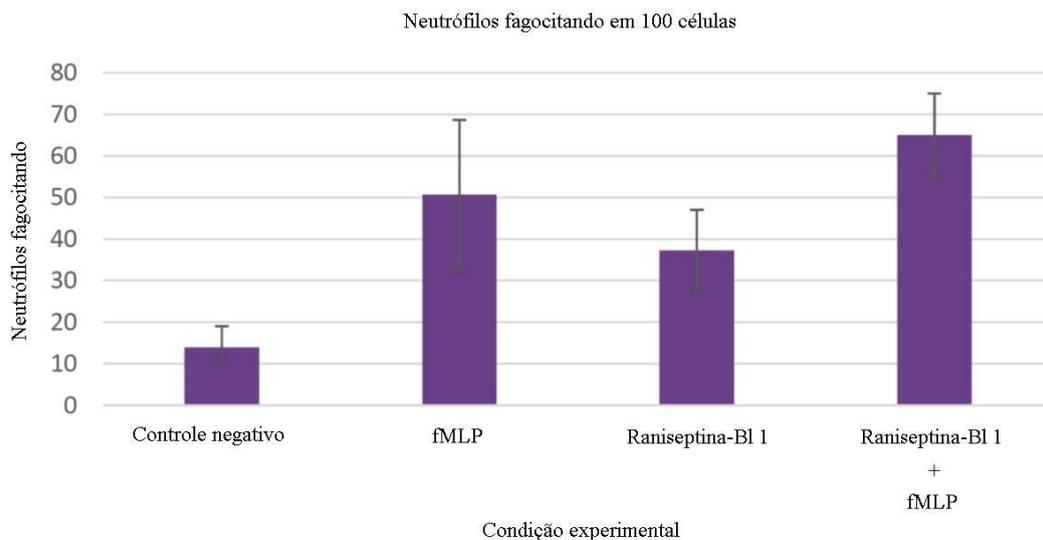


Figura 22. Avaliação da capacidade fagocitária de neutrófilos expostos ao peptídeo Raniseptina-B1 1. As diferenças entre as amostras foram determinadas pela ANOVA unidirecional com o pós-teste de Tukey.

Já o número de leveduras fagocitadas por neutrófilo foi claramente influenciado pelo fMLP ($p = 0,00863$), não sendo observada influência da Raniseptina-B1 1 nesse processo (Figura 23).

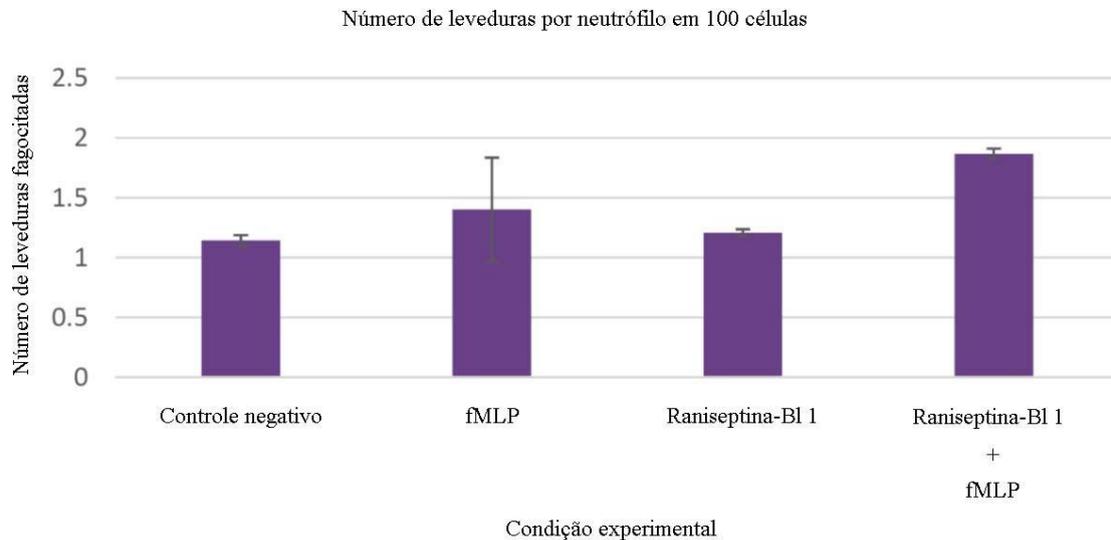


Figura 23. Quantidade de leveduras por neutrófilos em 100 células contadas. As diferenças entre as amostras foram determinadas pela ANOVA unidirecional com o pós-teste de Tukey.

A formação de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs) é um mecanismo da imunidade inata em que o neutrófilo emite uma rede extracelular com a finalidade de conter e eliminar patógenos. Como consequência da formação das redes o neutrófilo passa por um processo de morte celular, denominado NETose. No presente estudo, a produção de NETs também foi avaliada na presença do peptídeo Raniseptina-B1 1 (Figura 24).

Apesar de haver uma aparente interação entre a Raniseptina-B1 1 e o fMLP na produção de NETs, não houve comprovação estatística pelo ANOVA de 2 vias do ponto central. Como foram só 3 replicatas e a variação biológica é grande, isso pode ter limitado o experimento. Analisando-se os parâmetros das retas, há uma diferença significativa no coeficiente linear entre neutrófilos quiescentes e a combinação Raniseptina-B1 1 e fMLP que mostra uma possível ação combinada, talvez sinérgica entre eles, de forma que juntos são capazes de induzir formação de NETs.

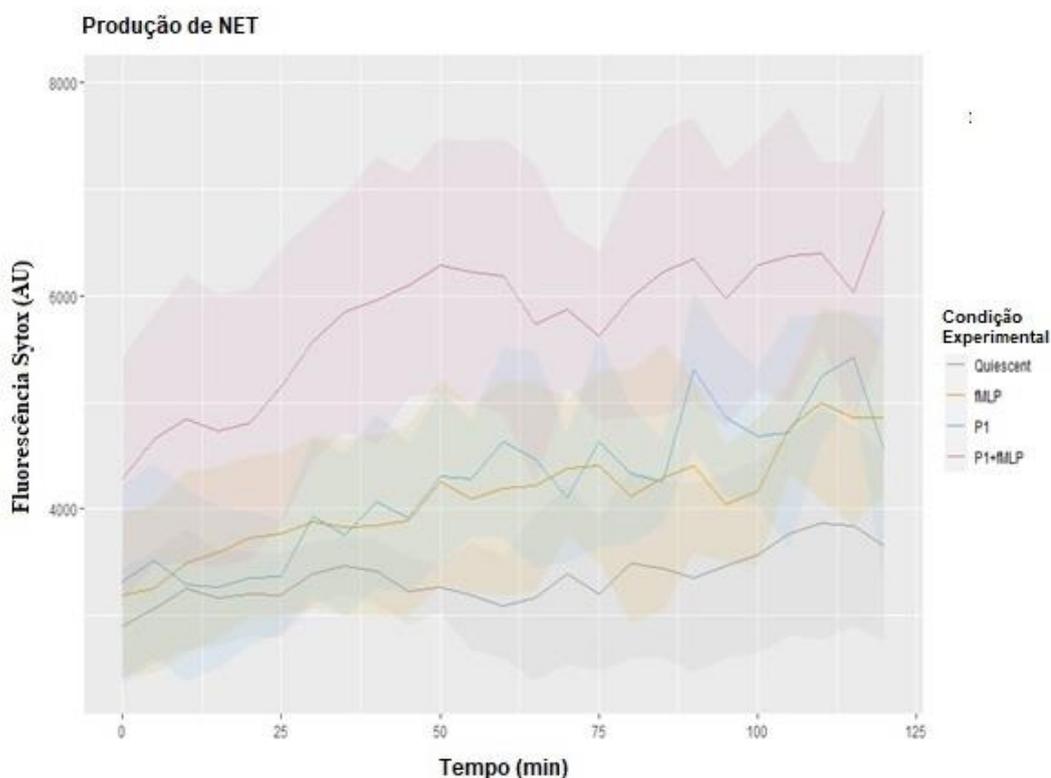


Figura 24. Produção de NETs por neutrófilos em relação ao tempo (120 minutos) com detecção por fluorescência emitida por Sytox. Condições experimentais: células quiescentes - tampão (quiescent), células na presença de fMLP (fMLP), células na presença do peptídeo Raniseptina-B11 (peptídeo nomeado como P1), células na presença do peptídeo Raniseptina-B11 e fMLP (P1 + fMLP).

Os neutrófilos formam a primeira linha do mecanismo de defesa do hospedeiro devido, principalmente, à rapidez com que são recrutados. As funções dos neutrófilos são altamente reguladas por sinais recebidos de seu repertório de PRRs, e isso permite que os neutrófilos, cujo recrutamento é modulado por quimiocinas, detectem tanto padrões moleculares associados a padrões (PAMPs) quanto padrões moleculares associados a danos (DAMPs) no local de inflamação. O recrutamento robusto de neutrófilos para um local inflamado é a marca registrada de todas as lesões e infecções microbianas agudas. Embora os neutrófilos destruam os agentes patogênicos, eles também têm a capacidade de modular significativamente as funções de outras células do sistema imunológico (Effah et al., 2021).

Embora, ao que tudo indica em função da análise estatística realizada, não foi observado estímulo à fagocitose e à produção de NETs pelos neutrófilos na presença da Raniseptina-B1, essas atividades são importantes na defesa contra a invasão por patógenos nos tecidos dos hospedeiros permitindo assim a interrupção de processo infecciosos.

Recentemente, um análogo sintético da temporina-L apresentou potente atividade antiinflamatória em um modelo *in vivo* bem caracterizado de inflamação aguda. Isso foi exemplificado por sua capacidade de inibir o recrutamento de monócitos inflamatórios (Bellavita et al., 2020). Outros exemplos de PAMs de anfíbios com atividade imunomodulatória são as temporinas A e B, que podem atuar como mediadores multifuncionais da imunidade inata em humanos (Grazi et al., 2014; Luisa Mangoni et al., 2015).

As propriedades multifuncionais exibidas pelos PAMs isolados de anuros têm os alçado a uma importante posição como possíveis modelos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, em especial, como drogas anti-infecciosas. Os PAMs exibem uma plêiade de atividades biológicas de interesse médico e representam uma possível opção aos tratamentos convencionais atualmente disponíveis (Sultana et al., 2021). O Brasil é detentor de uma imensa e diversificada anurofauna (Segalla et al., 2021) e é de extrema importância a exploração desse riquíssimo repositório de moléculas de interesse terapêutico.

6. CONCLUSÃO

Em resumo, o peptídeo antimicrobiano Raniseptina-B1 1, previamente identificado na secreção cutânea do anuro *Boana lundii*, foi produzido com sucesso por síntese química manual e suas propriedades biológicas e estruturais foram avaliadas. A Raniseptina-B1 1 exibiu propriedades antimicrobianas promissoras, com valores de MIC na faixa de 0,5 a 8 μ M para os microrganismos testados (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Candida albicans*), além de uma baixa atividade hemolítica (menos de 10% de hemólise na faixa detectada para os MICs). Esse conjunto de resultados sinaliza o potencial da Raniseptina-B1 1 em servir como modelo para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos de modo a combater a atual crise associada a resistência microbiana aos antibióticos comercialmente disponíveis.

7.PERSPECTIVAS

Como perspectivas para o presente trabalho, destacamos:

1. Avaliar a propriedade antimicrobiana do peptídeo do presente estudo por meio da realização de ensaios complementares de inibição avaliando seus efeitos sobre microrganismos multirresistentes, como *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA);
2. Avaliar os efeitos antiproliferativos e citotóxicos do peptídeo do presente estudo sobre linhagens de células tumorais, como linhagens de células de câncer de mama (MCF-7) e células de melanoma murino (B16F10);
3. Avaliar o efeito do peptídeo do presente estudo sobre diferentes organismos patogênicos como protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*, arbovírus (vírus da febre Chikungunya, da dengue, da febre amarela e Zika) e coronavírus como o SARS-CoV-2.
4. Avaliar o potencial antioxidante do peptídeo do presente estudo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. I. C. e M. (2019). Imunologia Celular e Molecular. In *Imunologia Celular e Molecular: Vol. 9º ed (9º ed)*. 2019. <https://doi.org/10.24927/rce2020.037>.
- Adegoke, A. A., Faleye, A. C., Singh, G., & Stenström, T. A. (2017). Antibiotic resistant superbugs: Assessment of the interrelationship of occurrence in clinical settings and environmental niches. *Molecules*, 22(1). <https://doi.org/10.3390/molecules22010029>.
- Aitken, A., Learmonth, M. 1996. (1996). *Protein Handbook Edited by* (Issue January) Almeida, R. A., Gordo, M., Da Silva, F. M. A., De Araújo, R. C., Ramada, M. H. S., Abrão, F. Y., Costa, T. O. G., Koolen, H. H. F., De Souza, A. D. L., & Bloch, C. (2015). Cinerascetins, new peptides from *Hypsiboas cinerascens*: MALDI LIFT-TOF-MS/MS de novo sequence and imaging analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(11), 2290–2297. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150219>.
- Anunthawan, T., De La Fuente-Núñez, C., Hancock, R. E. W., & Klaynongsruang, S. (2015). Cationic amphipathic peptides KT2 and RT2 are taken up into bacterial cells and kill planktonic and biofilm bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1848(6), 1352–1358. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.02.021>.
- Araújo, N. O. (2018). *Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea do anuro*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília.
- Assoni, L., Milani, B., Carvalho, M. R., Nepomuceno, L. N., Waz, N. T., Guerra, M. E. S., Converso, T. R., & Darrieux, M. (2020). Resistance mechanisms to antimicrobial peptides in Gram-positive bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.593215>.
- Atanasova, K. R. (2010). Interactions between porcine respiratory coronavirus and bacterial cell wall toxins in the lungs of pigs. *January 2010*, 140. https://www.researchgate.net/profile/Kalina_Atanasova/publication/294263540/figure/fig2/AS:478497148805120@1491094018230/Schematic-structure-of-Gram-positive-and-Gram-negative-cell-walls-Gram-positive-cell.ppm.
- Azevedo Calderon, L. De, Silva, A. D. A. E., Ciancaglini, P., & Stábeli, R. G. (2011). Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: From biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. *Amino Acids*, 40(1), 29–49. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0622-3>.

Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543–1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>

Bala, P., & Kumar, J. (2014). Antimicrobial peptides: a Review. *Int. J. LifeSc. Bt& Pharm. Res*, 3(1), 2250–3137.

Barra, D., Simmaco, M., & Boman, H. G. (1998). Gene-encoded peptide antibiotics and innate immunity. Do “animalcules” have defence budgets? *FEBS Letters*, 430(1–2), 130–134. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00494-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00494-3).

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

Behrendt, R., White, P., & Offer, J. (2016). Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Journal of Peptide Science*, 22(1), 4–27. <https://doi.org/10.1002/psc.2836>.

Bellavita, R., Raucci, F., Merlino, F., Piccolo, M., Ferraro, M. G., Irace, C., Santamaria, R., Iqbal, A. J., Novellino, E., Grieco, P., Mascolo, N., & Maione, F. (2020). Temporin L-derived peptide as a regulator of the acute inflammatory response in zymosan-induced peritonitis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 123, 109788. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109788>.

Blondelle, S. E., Takahashi, E., Dinh, K. T., & Houghten, R. A. (1995). The antimicrobial activity of hexapeptides derived from synthetic combinatorial libraries. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(1), 39–46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb01671.x>.

Boparai, J. K., & Sharma, P. K. (2019). Mini review on antimicrobial peptides, sources, mechanism and recent applications. *Protein & Peptide Letters*, 27(1), 4–16. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190822165812>.

Brand, G. D., Leite, J. R. S. A., de Sá Mandel, S. M., Mesquita, D. A., Silva, L. P., Prates, M. V., Barbosa, E. A., Vinecky, F., Martins, G. R., Galasso, J. H., Kuckelhaus, S. A. S., Sampaio, R. N. R., Furtado, J. R., Andrade, A. C., & Bloch, C. (2006). Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347(3), 739–746. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.168>.

Bravo, A., Ruiz-Cruz, S., Alkorta, I., & Espinosa, M. (2018). Mini review When humans met superbugs: Strategies to tackle bacterial resistances to antibiotics what is so different about was ist so anders am neuroenhancement? *De Gruyter*, 216–226.

Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: Is immunity

the second function of chromatin? *Journal of Cell Biology*, 198(5), 773–783. <https://doi.org/10.1083/jcb.201203170>.

Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>.

Brogden, K. A., Ackermann, M., McCray, P. B., & Tack, B. F. (2003). Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(5), 465–478. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00180-8](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00180-8).

Bruckdorfer, T., Marder, O., & Albericio, F. (2005). From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 5(1), 29–43. <https://doi.org/10.2174/1389201043489620> Camou, T., Zunino, P., & Hortal, M. (2017). Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. *Revista Medica Del Uruguay*, 33(4), 277–284. <https://doi.org/10.29193/rmu.33.4.6>.

Castanheira, F. V. S., & Kubes, P. (2019). Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood*, 133(20), 2178–2185. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-844530>.

Castro, M. S., Ferreira, T. C. G., Cilli, E. M., Crusca, E., Mendes-Giannini, M. J. S., Sebben, A., Ricart, C. A. O., Sousa, M. V., & Fontes, W. (2009). Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* (“spotted treefrog”). *Peptides*, 30(2), 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.11.003>.

Castro, M., Matsushita, R., Sebben, A., Sousa, M., & Fontes, W. (2005). Hyllins: Bombinins H Structurally Related Peptides from the Skin Secretion of the Brazilian Tree-Frog *Hyla biobeba*. *Protein & Peptide Letters*, 12(1), 89–93. <https://doi.org/10.2174/0929866053405977>

Chaudhary, K., Kumar, R., Singh, S., Tuknait, A., Gautam, A., Mathur, D., Anand, P., Varshney, G. C., & Raghava, G. P. S. (2016). A web server and mobile app for computing hemolytic potency of peptides. *Scientific Reports*, 6, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep22843>.

Ciumac, D., Gong, H., Hu, X., & Lu, J. R. (2019). Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 537, 163–185.

<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.103> CLSI, 2005 (6th ed., Vol. 23, Issue 2).

Conlon, J. M. (2011). Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(13), 2303-2315. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0720-8>.

Conlon, J. M., Abdel-Wahab, Y. H. A., Flatt, P. R., Leprince, J., Vaudry, H., Jouenne, T., & Condamine, E. (2009). A glycine-leucine-rich peptide structurally related to the plasticins from skin secretions of the frog *Leptodactylus laticeps* (Leptodactylidae). *Peptides*, 30(5), 888–892. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.01.008>.

Conlon, J. M., Mechkarska, M., Pantic, J. M., Lukic, M. L., Coquet, L., Leprince, J., Nielsen, P. F., & Rinaldi, A. C. (2013). An immunomodulatory peptide related to frenatin 2 from skin secretions of the Tyrrhenian painted frog *Discoglossus sardus* (Alytidae). *Peptides*, 40, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.12.012>.

Corliss, J. O., Kessel, R. G., & Shih, C. Y. (1975). Scanning electron microscopy in biology. In *Transactions of the American Microscopical Society* (Vol. 94, Issue 2). <https://doi.org/10.2307/3224993>.

Costa, H. C., & Bérnils, R. S. (2018). Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: lista de espécies. *Revista Herpetologia Brasileira*, 7(1), 11–57. <http://public.sbherpetologia.org.br/assets/Documentos/2016/10/lista-de-repteis-2018-2.pdf>,

Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A., & Kisich, K. O. (2009). The roles of antimicrobial peptides in innate host. *Current Pharmaceutical Design*, 15(21), 2377-2392. <https://doi.org/10.2174/138161209788682325>.

Dubois, A. (2017). The nomenclatural status of Hysaplesia, Hylaplesia, Dendrobates and related nomina (Amphibia, Anura), with general comments on zoological nomenclature and its governance, as well as on taxonomic databases and websites. *Bionomina*, 11(1), 1–48. <https://doi.org/10.11646/bionomina.11.1.1>.

Duellman, W. E., Marion, A. B., & Hedges, S. B. (2016). Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). In *Zootaxa* (Vol. 4104, Issue 1). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4104.1.1>.

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 Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/867381>.

Effah, C. Y., Drokow, E. K., Agboyibor, C., Ding, L., He, S., Liu, S., Akorli, S.

Y., Nuamah, E., Sun, T., Zhou, X., Liu, H., Xu, Z., Feng, F., Wu, Y., & Zhang, X. (2021). Neutrophil-dependent immunity during pulmonary infections and inflammations. *Frontiers in Immunology*, *12*, 1–25. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.689866>.

Ehrenstein, G., & Lecar, H. (1977). Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q Rev Biophys.*, *10*(1), 1-34. <https://doi.org/10.1017/s0033583500000123>.

El-Faham, A., & Albericio, F. (2011). Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chemical Reviews*, *111*(11), 6557–6602. <https://doi.org/10.1021/cr100048w>.

Epanand, R. M., Walker, C., Epanand, R. F., & Magarvey, N. A. (2016). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1858*(5), 980–987. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.018>.

Faivovich, J., Haddad, C. F. B., Garcia, P. C. A., Frost, D. R., Campbell, J. A., & Wheeler, W. C. (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, *294*, 1–227. [https://doi.org/10.1206/0003-0090\(2005\)294\[0001:srotff\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2005)294[0001:srotff]2.0.co;2).

Falanga, A., Lombardi, L., Franci, G., Vitiello, M., Iovene, M. R., Morelli, G., Galdiero, M., & Galdiero, S. (2016). Marine antimicrobial peptides: Nature provides templates for the design of novel compounds against pathogenic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(5). <https://doi.org/10.3390/ijms17050785>.

Freitas, G. G. (2020). Identificação e caracterização de peptídeos ativos sobre bactérias patogênicas isolados da pele do anuro *Boana raniceps* (Cope, 1862). Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília.

Frost, D. R. (2021). Espécies de anfíbios do mundo: uma referência online. Versão 6.1 (03 de dezembro de 2021). Banco de dados eletrônico acessível em <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php> . Museu Americano de História Natural, Nova York, EUA. <https://doi.org/10.5531/db.vz.0001>.

Gan, B. H., Gaynord, J., Rowe, S. M., Deingruber, T., & Spring, D. R. (2021). The multifaceted nature of antimicrobial peptides: Current synthetic chemistry approaches and future directions. *Chemical Society Reviews*, *50*(13), 7820–7880. <https://doi.org/10.1039/d0cs00729c>.

Gesell, J., Zasloff, M., & Opella, S. J. (1997). Two-dimensional ¹H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an α -helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. *Journal of Biomolecular NMR*, *9*(2), 127–135.

<https://doi.org/10.1023/A:1018698002314>.

Grazi, A. Di, Luca, V., Segev-Zarko, L. A. T., Shai, Y., & Mangoni, M. L. (2014). Temporins a and b stimulate migration of hacat keratinocytes and kill intracellular *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5), 2520–2527. <https://doi.org/10.1128/AAC.02801-13>.

Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., & Derengowski, L. S. (2013). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. 4, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00353>.

Guimarães, A.B., Costa, F.J., Pires, O.R., Fontes, W. & Castro, M.S. (2016). The amazing world of peptide engineering: the example of antimicrobial peptides from frogs and their analogues. *Protein Pept Lett.*, 23(8), 722-737. <https://doi.org/10.2174/0929866523666160530185137>.

Haney, E. F., Hunter, H. N., Matsuzaki, K., & Vogel, H. J. (2009). Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: Linking structure to function? *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 1788(8), 1639–1655. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.01.002>.

Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511. <https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>.

Jiang, Y., Wu, Y., Wang, T., Chen, X., Zhou, M., Ma, C., Xi, X., Zhang, Y., Chen, T., Shaw, C., & Wang, L. (2020). Brevinin-1GHD: A novel *Hylarana guentheri* skin secretion-derived Brevinin-1 type peptide with antimicrobial and anticancer therapeutic potential. *Bioscience Reports*, 40(5), 1–15. <https://doi.org/10.1042/BSR20200019>.

Justyna, W. (2017). *Mycobacterium liflandii* Outbreak in a Research Colony of *Xenopus (Silurana) tropicalis* Frogs. *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>.

Kaur, B. P., & Secord, E. (2021). Innate Immunity. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 41(4), 535–541. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2021.07.003>.

Khan, S. N., & Khan, A. U. (2016). Breaking the spell: Combating multidrug resistant “superbugs.” *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00174>.

Krittanai, C., & Johnson, W. C. (2000). The relative order of helical propensity of amino acids changes with solvent environment. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 39(2), 132–141. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-)

0134(20000501)39:2<132::AID-PROT3>3.0.CO;2-2.

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). <https://doi.org/10.3390/biom8010004>.

Kurpe, S. R., Grishin, S. Y., Surin, A. K., Panfilov, A. V., Slizen, M. V., Chowdhury, S. D., & Galzitskaya, O. V. (2020). Antimicrobial and amyloidogenic activity of peptides. Can antimicrobial peptides be used against sars-cov-2? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 1–37. <https://doi.org/10.3390/ijms21249552>.

Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0).

Ladram, A., & Nicolas, P. (2016). Antimicrobial peptides from frog skin: Biodiversity and therapeutic promises. *Front Biosci.*, 21, 1341-1371. <https://doi.org/10.2741/4461>.

Lee, W. L., Harrison, R. E., & Grinstein, S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*, 5(14), 1299–1306. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.014> Lehman, H. K., & Segal, B. H. (2020). The role of neutrophils in host defense and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 145(6), 1535–1544. .

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

Li, T., Liu, Q., Wang, D., & Li, J. (2019). Characterization and antimicrobial mechanism of CF-14, a new antimicrobial peptide from the epidermal mucus of catfish. *Fish and Shellfish Immunology*, 92, 881–888. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.07.015>.

Lobanovska, M., & Pilla, G. (2017). Penicillin's discovery and antibiotic resistance: Lessons for the future? *Yale Journal of Biology and Medicine*, 90(1), 135-145.

Luca, V., Stringaro, A., Colone, M., Pini, A., & Mangoni, M. L. (2013). Esculentin(1-21), an amphibian skin membrane-active peptide with potent activity on both planktonic and biofilm cells of the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(15), 2773–2786.

<https://doi.org/10.1007/s00018-013-1291-7>.

Luepke, K. H., Suda, K. J., Boucher, H., Russo, R. L., Bonney, M. W., Hunt, T. D., & Mohr, J. F. (2017). Past, present, and future of antibacterial economics: Increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. *Pharmacotherapy*, *37*(1), 71–84. <https://doi.org/10.1002/phar.1868>.

Mangoni, M. L., Di Grazia, A., Cappiello, F., Casciaro, B., & Luca, V. (2015). Naturally occurring peptides from *Rana temporaria*: Antimicrobial properties and more. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *16*(1), 54–64. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150703121403>.

Luong, H. X., Thanh, T. T., & Tran, T. H. (2020). Antimicrobial peptides – Advances in development of therapeutic applications. *Life Sciences*, *260*, 118407. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118407>.

Magalhães, B. S., Melo, J. A. T., Leite, J. R. S. A., Silva, L. P., Prates, M. V., Vinecky, F., Barbosa, E. A., Verly, R. M., Mehta, A., Nicoli, J. R., Bemquerer, M. P., Andrade, A. C., & Bloch, C. (2008). Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *377*(4), 1057–1061. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.102>.

Magrone, T., Russo, M. A., & Jirillo, E. (2018). Antimicrobial peptides: phylogenic sources and biological activities. First of two parts. *Current Pharmaceutical Design*, *24*(10), 1043–1053. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180403123736>.

Mahlapuu, M., Björn, C., & Ekblom, J. (2020). Antimicrobial peptides as therapeutic agents: Opportunities and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, *40*(7), 978–992. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1796576>.

Malanovic, N., & Lohner, K. (2016). Antimicrobial peptides targeting Gram-positive bacteria. *Pharmaceuticals*, *9*(3), 59. <https://doi.org/10.3390/ph9030059>.

Mangoni, M. L., Papo, N., Barra, D., Simmaco, M., Bozzi, A., Di Giulio, A., & Rinaldi, A. C. (2004). Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane permeability and viability of *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, *380*(3), 859–865. <https://doi.org/10.1042/BJ20031975>.

Marr, A. K., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, *6*(5), 468–472. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>.

McMillan, K. A. M., & Coombs, M. R. P. (2020). Review: Examining the natural role of amphibian antimicrobial peptide magainin. *Molecules*, *25*(22).

<https://doi.org/10.3390/molecules25225436>.

Merrifield, R. B. (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14), 2149–2154. <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>.

Mor, A., Hani, K., & Nicolas, P. (1994). The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *Journal of Biological Chemistry*, 269(50), 31635–31641. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)31742-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)31742-3).

Moravej, H., Moravej, Z., Yazdanparast, M., Heiat, M., Mirhosseini, A., Moosazadeh Moghaddam, M., & Mirnejad, R. (2018). Antimicrobial peptides: Features, action, and their resistance mechanisms in bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 24(6), 747–767. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0392>.

Moretta, A., Scieuzo, C., Petrone, A. M., Salvia, R., Manniello, M. D., Franco, A., Lucchetti, D., Vassallo, A., Vogel, H., Sgambato, A., & Falabella, P. (2021). Antimicrobial peptides: A new hope in biomedical and pharmaceutical fields. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 1–26. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.668632>.

Morrisett, J. D., David, J. S. K., Pownall, H. J., & Gotto, A. M. (1973). Interaction of an apolipoprotein (ApoLP-alanine) with phosphatidylcholine. *Biochemistry*, 12(7), 1290–1299. <https://doi.org/10.1021/bi00731a008>.

Nascimento, A. C., Fontes, W., Sebben, A., & Castro, M. (2005). Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein Pept Lett.*, 10(3), 227–238. <https://doi.org/10.2174/0929866033478933>.

Netea, M. G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L. B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., Joosten, L. A. B., van der Meer, J. W. M., Mhlanga, M. M., Mulder, W. J. M., Riksen, N. P., Schlitzer, A., Schultze, J. L., Stabell Benn, C., Sun, J. C., Xavier, R. J., & Latz, E. (2020). Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 20(6), 375–388. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0285-6>.

Nicolas, P., & El Amri, C. (2009). The dermaseptin superfamily: A gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(8), 1537–1550. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.09.006>.

Normark, S., Boman, H. G., & Matsson, E. (1969). Mutant of *Escherichia coli* with anomalous cell division and ability to decrease episomally and chromosomally

mediated resistance to ampicillin and several other antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 97(3), 1334–1342. <https://doi.org/10.1128/jb.97.3.1334-1342.1969>.

Nunes, L. O., Munhoz, V. H. O., Sousa, A. A., de Souza, K. R., Santos, T. L., Bemquerer, M. P., Ferreira, D. E. C., de Magalhães, M. T. Q., Resende, J. M., Alcântara, A. F. C., Aisenbrey, C., Veloso, D. P., Bechinger, B., & Verly, R. M. (2021). High-resolution structural profile of hylaseptin-4: Aggregation, membrane topology and pH dependence of overall membrane binding process. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1863(5). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183581>

Pace, N. R., Smith, D. K., Olsen, G. J., & James, B. D. (1989). Phylogenetic comparative analysis and the secondary structure of ribonuclease P RNA - a review. *Gene*, 82(1), 65–75. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90031-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90031-0).

Palomo, J. M. (2014). Solid-phase peptide synthesis: An overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. *RSC Advances*, 4(62), 32658–32672. <https://doi.org/10.1039/c4ra02458c>.

Pantic, J. M., Jovanovic, I. P., Radosavljevic, G. D., Arsenijevic, N. N., Conlon, J. M., & Lukic, M. L. (2017). The potential of frog skin-derived peptides for development into therapeutically-valuable immunomodulatory agents. *Molecules*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/molecules22122071>.

Park, C. B., Yi, K. S., Matsuzaki, K., Kim, M. S., & Kim, S. C. (2000). Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), 8245–8250. <https://doi.org/10.1073/pnas.150518097>.

Patocka, J., Nepovimova, E., Klimova, B., Wu, Q., & Kuca, K. (2018). Antimicrobial peptides: Amphibian host defense peptides. *Current Medicinal Chemistry*, 26(32), 5924–5946. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180713125314>.

Pouny, Y., Rapaport, D., Shai, Y., Mor, A., & Nicolas, P. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes. *Biochemistry*, 31(49), 12416–12423. <https://doi.org/10.1021/bi00164a017>.

Osman, A., & Sitohy, M. (2015). Protein Esterification: Design, Antibacterial and Safety Assessment: Protein Esterification. LAP LAMBERT Academic Publishing.

ISBN- 10: 3659698059; ISBN-13: 978-3659698057.

Rima, M., Rima, M., Fajloun, Z., Sabatier, J. M., Bechinger, B., & Naas, T. (2021). Antimicrobial peptides: A potent alternative to antibiotics. *Antibiotics*, *10*(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091095>.

Robert, J., & Ohta, Y. (2009). Comparative and developmental study of the immune system in *Xenopus*. *Developmental Dynamics*, *238*(6), 1249–1270. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21891>.

Rollins-Smith, L. A. (2009). The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1788*(8), 1593–1599. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.03.008>.

Rosales, C. (2020). Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, *108*(1), 377–396. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MIR0220-574RR>.

Santana, C. J. C., Magalhães, A. C. M., Dos Santos Júnior, A. C. M., Ricart, C. A. O., Lima, B. D., Álvares, A. D. C. M., Freitas, S. M., Pires, O. R. Jr., Fontes, W., Castro, M. S. (2020). Figainin 1, a Novel amphibian skin peptide with antimicrobial and antiproliferative properties. *Antibiotics*, *9*(9), 625. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090625>.

Santana, C. J. C., Magalhães, A. C. M., Prías-Márquez, C. A., Falico, D. A., Dos Santos Júnior, A. C. M., Lima, B. D., Ricart, C. A. O., de Pilger, D. R. B., Bonotto, R. M., Moraes, C. B., Freitas-Júnior, L. H., Álvares, A. da C. M., Freitas, S. M., Luz, I. S., Pires, O. R., Fontes, W., & Castro, M. S. (2020). Biological properties of a novel multifunctional host defense peptide from the skin secretion of the chaco tree frog, *Boana raniceps*. *Biomolecules*, *10*(5), 1–18. <https://doi.org/10.3390/biom10050790>.

Sanchis, I., Spinelli, R., Aschemacher, N., Humpola, M. V., & Siano, A. (2020). Acetylcholinesterase inhibitory activity of a naturally occurring peptide isolated from *Boana pulchella* (Anura: Hylidae) and its analogs. *Amino Acids*, *52*(3), 387–396. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02815-1>

Farias, S. E., Kline, K. G., Klepacki, J., Wu, C. C. (2010). Quantitative improvements in peptide recovery at elevated chromatographic temperatures from microcapillary liquid chromatography-mass spectrometry analyses of brain using selected reaction monitoring. *Anal Chem.*, *82*(9), 3435-3440.

<https://doi.org/10.1021/ac100359p>.

Schmidtchen, A., Pasupuleti, M., & Malmsten, M. (2014). Effect of hydrophobic modifications in antimicrobial peptides. *Adv Colloid Interface Sci.*, 205, 265-274. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.06.009>.

Segalla, M., Berneck, B., Canedo, C., Caramaschi, U., Cruz, C.A.G., Garcia, P. C. A., Grant, T., Haddad, C. F. B., Lourenço, A. C., Mangia, S., Mott, T., Nascimento, L., Toledo, L. F., Werneck, F. & Langone, J. A. (2021). List of Brazilian Amphibians. *Herpetologia Brasileira*, 10, 121-216. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4716176>.

Shai, Y., & Oren, Z. (2001). From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides*, 22(10), 1629–1641. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00498-3](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00498-3).

Shankar, Pr. (2016). Book review: Tackling drug-resistant infections globally. *Archives of Pharmacy Practice*, 7(3), 110. <https://doi.org/10.4103/2045-080x.186181>

Silva, Í. C. (2015). Neutrófilos: Aspectos clássicos, plasticidade e novas funções imunorregulatórias *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*, 7(1), 35–46.

Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R., Mangoni, M. L., & Barra, D. (1996). Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *European Journal of Biochemistry*, 242(3), 788–792. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0788r.x>.

Sultana, A., Luo, H., & Ramakrishna, S. (2021). Antimicrobial peptides and their applications in biomedical sector. *Antibiotics*, 10(9), 1–24. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091094>.

Takahashi, D., Shukla, S. K., Prakash, O., & Zhang, G. (2010). Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie*, 92(9), 1236–1241. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.02.023>.

Teng, T. S., Ji, A. L., Ji, X. Y., & Li, Y. Z. (2017). Neutrophils and immunity: From bactericidal action to being conquered. *Journal of Immunology Research*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9671604>.

Timmons, P. B., & Hewage, C. M. (2020). HAPPENN is a novel tool for hemolytic activity prediction for therapeutic peptides which employs neural networks. *Scientific Reports*, 10(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67701-3>.

Chan, W., & White, P. (2000). Fmoc solid phase peptide synthesis: a Practical approach. Practical Approach Series. Oxford University Press.

Vignoli Muniz, G. S., De la Torre, L. I., Duarte, E. L., Lorenzón, E. N., Cilli, E. M., Balan, A., & Lamy, M. T. (2020). Interaction of synthetic antimicrobial peptides of the Hylin a1 family with models of eukaryotic structures: Zwitterionic membranes and DNA. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100827>

Wang, G. (2020). Bioinformatic analysis of 1000 amphibian antimicrobial peptides uncovers multiple length-dependent correlations for peptide design and prediction. *Antibiotics*, 9(8), 1–26. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080491>.

Woon, S. A., & Fisher, D. (2016). Antimicrobial agents - optimising the ecological balance. *BMC Medicine*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0661-z>.

Xiao, Y., Liu, C., & Lai, R. (2011). Antimicrobial peptides from amphibians. *Biomolecular Concepts*, 2(1–2), 27–38. <https://doi.org/10.1515/bmc.2011.006>.

Yu, G., Baeder, D. Y., Regoes, R. R., & Rolff, J. (2018). Predicting drug resistance evolution: Insights from antimicrobial peptides and antibiotics. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1874). <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2687>.

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multilamellar organisms. *Nature*, 415, 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>.

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

Zhou, X., Liu, Y., Gao, Y., Wang, Y., Xia, Q., Zhong, R., Kwok, H. F., & Wang, L. (2020). Enhanced antimicrobial activity of N-terminal derivatives of a novel brevinin-1 peptide from the skin secretion of *Odorrana schmackeri*. *Toxins*, 12(8), 484. <https://doi.org/10.3390/toxins12080484>.

Zompra, A. A., Galanis, A. S., Werbitzky, O., & Albericio, F. (2009). Manufacturing peptides as active pharmaceutical ingredients. *Future Medicinal Chemistry*, 1(2), 361–377. <https://doi.org/10.4155/fmc.09.23>.