



**Universidade de Brasília**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**FABIANO FAGUNDES MOSER DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE ANÁLOGOS DO  
PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO Bc77(K) ISOLADO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DO  
ANURO *Boana crepitans***

**BRASÍLIA/DF**

**2025**

**FABIANO FAGUNDES MOSER DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE ANÁLOGOS DO  
PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO Bc77(K) ISOLADO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DO  
ANURO *Boana crepitans***

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

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

**BRASÍLIA/DF  
2025**

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

**FABIANO FAGUNDES MOSER DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE ANÁLOGOS DO  
PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO Bc77(K) ISOLADO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DO  
*ANURO Boana crepitans***

**Comissão Examinadora:**

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

**Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende  
Departamento de Odontologia/FS  
Universidade de Brasília**

**Profa. Dra. Karla de Aleluia Batista  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás  
Câmpus Goiânia Oeste**

**Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior  
Departamento de Ciências Fisiológicas/IB  
Universidade de Brasília**

“Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança a sua melhor amiga; da experiência, o seu conselheiro; da prudência, o seu irmão mais velho; e da esperança, o seu anjo da guarda.”

Joseph Addison

Quem me dará um ombro amigo  
Quando eu precisar?  
E se eu cair, se eu vacilar  
Quem vai me levantar?  
Sou eu quem vai ouvir você  
Quando o mundo não puder te entender  
Foi Deus quem te escolheu pra ser  
O melhor amigo que eu pudesse ter  
Amigos pra sempre  
Dois amigos que nasceram pela fé  
Amigos pra sempre  
Para sempre amigos, sim, se Deus quiser  
Quem é que vai me acolher  
Na minha indecisão?  
Se eu me perder pelo caminho  
Quem me dará a mão?  
Foi Deus quem consagrou você e eu  
Para sermos bons amigos num só coração  
Por isso eu estarei aqui  
Quando tudo parecer sem solução  
Peço a Deus que te guarde  
Que te guarde, abençoe e mostre a sua face  
E te dê sua paz  
Amigos pra sempre  
Dois amigos que nasceram pela fé  
Amigos pra sempre  
Para sempre amigos, sim, se Deus quiser  
Amigos pra sempre  
Dois amigos que nasceram pela fé  
Amigos (amigos) pra sempre  
Para sempre amigos, sim, se Deus quiser



Amigos pela fé  
Canção de Anjos de Resgate

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à Nossa Senhora, por sempre abençoarem o meu caminho e o da minha família. Muito obrigado!

Agradeço à minha Família. Especialmente meus pais que sem eles nada seria possível, nunca me deixaram desistir, em diversas etapas da vida incentivavam os estudos mesmo que isso significasse renunciar a algo, nunca deixaram faltar nada para que eu pudesse atingir a melhor versão de mim. Amo vocês, só tenho a agradecer. Muito obrigado!

Agradeço ao meu irmão por sempre ser um exemplo e uma referência como pessoa, como pai, como filho e como marido. Muito obrigado!

Agradeço aos meus padrinhos de batismo Francisco (*in memoriam*) e Maria que mesmo de longe sempre rezaram e torceram pelo meu sucesso desde que eu era um pequeno bebê. Amo vocês, muito obrigado!

Agradeço também à minha cunhada e minhas sobrinhas, porque sem vocês essa trajetória seria mais árdua do que foi, vocês sempre trouxeram muito amor e diversão para minha vida, bons momentos de relaxar e refletir. Muito obrigado!

Agradeço à minha madrinha de crisma Cátia por sempre acreditar em mim em todos os momentos, desde anos atrás nas lições de português, e por me colocar em suas orações, sempre senti as boas energias que você me enviava. Muito obrigado!

Um agradecimento especial à minha orientadora Profa. Dra. Mariana S. Castro que me aceitou mesmo com minhas limitações de horários, distância, e mesmo assim sempre soube me ouvir, sempre disposta a ensinar, sempre com um brilho no olhar e carinho no coração, saiba que levarei o seu exemplo para minha vida, quero um dia poder ser tão bom quanto você. Meus sinceros sentimentos de admiração e muitíssimo obrigado!

A todos os colegas do LBQP (para não ser injusto em esquecer algum nome sintam-se todos contemplados nesse momento) que, em suas particularidades, me auxiliaram, ou me compreenderam nos momentos da realização dos experimentos, e me estimularam de ir mais longe. Muito obrigado!

Agradeço a todos os funcionários da UnB que sempre estavam dispostos a contribuir com o que fosse necessário, seja de um serviço básico, porém essencial até o mais alto cargo da instituição. Muito obrigado!

Agradeço a todos os professores que em alguma etapa dessa jornada contribuíram com uma palavra de incentivo, ou me auxiliaram e transmitiram conhecimentos durante os experimentos e disciplinas, para que corresse tudo bem, em especial à Profa. Dra. Sônia Freitas do Laboratório de Biofísica da Universidade de Brasília que me guiou no ensaio de dicroísmo circular. Ao Dr. Lúcio H. Freitas Júnior e à Dra. Carolina Borsoi Moraes do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) pela colaboração nos ensaios antivirais. Ao MSc Keven Wender Macedo pelo auxílio nos ensaios com biofilme. Ao Prof. Wagner Fontes e à MSc Raquel Takaya pela colaboração nos ensaios com neutrófilos. Ao Prof. Dr. Osmindo Junior, por sua amizade e pelos puxões de orelha, pelo seu ombro presente sempre que precisei desabafar. Ao Dr. Carlos José Correia de Santana, pelos ensinamentos e ajuda inestimável durante a realização do presente trabalho. Muito obrigado!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, pela oportunidade.

Aos “Gordos” por estarem comigo em várias etapas desse processo, sempre ouvindo minhas frustrações e comemorando os sucessos, sempre auxiliando na descontração e estimulando uns aos outros o crescimento pessoal, sem perder o ar natural da alegria e leveza de um GORDO. Muito obrigado!

Agradeço por último, porém não menos importante, mas pelo contrário, minha esposa Dra. Jacqueline Moser, que sempre soube me ouvir, ensinar, estimular, compreender, estudou comigo diversas vezes temas e textos para o bom desenvolvimento deste trabalho, sendo a reta final a mais emocionante e desafiadora, pois com o princípio de terminar esta tese, ela me agraciou com a benção de poder ser pai de três filhos maravilhosos, Henrique Moser, Anna Moser e Charlotte Moser. A vocês não sei como agradecer sem ser com um sincero Eu Amo Vocês e muitíssimo obrigado! Saibam que minhas ausências foi para poder conquistar um futuro melhor para todos nós, nunca se esqueçam que a educação moldará nosso amanhã.

## **APOIO FINANCEIRO**

A tese de doutorado intitulada “Avaliação das propriedades biológicas de análogos do peptídeo antimicrobiano Bc77(K) isolado da secreção cutânea do anuro *Boana crepitans*” desenvolvida por Fabiano Fagundes Moser da Silva sob a orientação da Profa. Dra. Mariana de S. Castro teve o apoio financeiro do CNPq, da CAPES, da FAPDF, da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.



## RESUMO

A resistência de microrganismos aos antibióticos disponíveis é um grave problema de saúde pública, dificultando o tratamento de infecções comuns. Peptídeos antimicrobianos surgem como promissoras alternativas terapêuticas, atuando de forma rápida e multifatorial, com menor risco de induzir resistência, sendo potenciais candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos. Este projeto teve como objetivo geral propor e sintetizar quimicamente novos análogos do peptídeo antimicrobiano Bc77(K) isolado da secreção cutânea de *Boana crepitans* e avaliar: 1) seus efeitos antimicrobianos sobre diferentes patógenos (bactérias, fungos e vírus), 2) seus efeitos antiproliferativos em linhagens de células de mamíferos (HeLa e HaCaT) e 3) seus efeitos na ativação e quimiotaxia de neutrófilos humanos. Após a realização dos ensaios, os resultados obtidos evidenciaram que os análogos 1, 2 e 3 demonstraram ampla ação antimicrobiana. O análogo 2 foi o mais eficaz contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo cepas multirresistentes, como *Acinetobacter baumannii*, com reduções de até 7 CIMs. Também apresentou forte atividade antifúngica contra *Candida albicans*, enquanto os análogos 1 e 3 mostraram atividade moderada. Em testes antivirais com SARS-CoV-2, os peptídeos analisados não foram capazes de inibir a multiplicação do vírus, sendo que alguns exibiram efeitos citotóxicos relevantes. Em relação à atividade antiproliferativa, os peptídeos inibiram a proliferação da linhagem tumoral HeLa, embora sem seletividade frente à linhagem celular não-tumoral HaCaT. Quanto à resposta imune, os peptídeos apresentaram ação quimiotática sobre neutrófilos. Bc77(K) mostrou maior quimiotaxia, enquanto os análogos 1 e 2 também induziram migração de neutrófilos em tempo real. Além disso, os análogos 1 e 2 foram eficazes na destruição de biofilmes bacterianos pré-formados, com destaque para o análogo 1. Todos os peptídeos exibiram capacidade de adotar conformação em  $\alpha$ -hélice na presença de SDS, um composto membrana-mimético. Assim, os análogos 1, 2 e 3 são candidatos promissores como agentes antimicrobianos e imunomoduladores, com possíveis aplicações terapêuticas.

**Palavras-chave:** Anuros; Análogos; Peptídeos antimicrobianos; Biofilme; Neutrófilos; Quimiotaxia

## ABSTRACT

The resistance of microorganisms to available antibiotics is a serious public health issue, making the treatment of common infections more difficult. Antimicrobial peptides have emerged as promising therapeutic alternatives due to their rapid and multifactorial action and lower risk of inducing resistance, positioning them as potential candidates for the development of new drugs. This project aimed to design and chemically synthesize new analogues of the antimicrobial peptide Bc77(K), isolated from the skin secretion of *Boana crepitans*, and to evaluate: (1) their antimicrobial effects against various pathogens (bacteria, fungi, and viruses); (2) their antiproliferative effects on mammalian cell lines (HeLa and HaCaT); and (3) their effects on human neutrophil activation and chemotaxis. After conducting the experiments, the results showed that analogues 1, 2, and 3 demonstrated broad-spectrum antimicrobial activity. Analogue 2 was the most effective against both Gram-negative and Gram-positive bacteria, including multidrug-resistant strains such as *Acinetobacter baumannii*, with reductions of up to 7 MICs. It also exhibited strong antifungal activity against *Candida albicans*, while analogues 1 and 3 showed moderate activity. In antiviral tests with SARS-CoV-2, the peptides analyzed were not able to inhibit the multiplication of the virus, and some exhibited relevant cytotoxic effects. Regarding antiproliferative activity, the peptides inhibited the proliferation of the HeLa tumor cell line, although without selectivity against the non-tumor HaCaT cell line. As for the immune response, the peptides exhibited chemotactic action on neutrophils. Bc77(K) showed greater chemotaxis, while analogues 1 and 2 also induced real-time neutrophil migration. Additionally, analogues 1 and 2 were effective in destroying pre-formed bacterial biofilms, with analogue 1 being particularly notable. All peptides demonstrated the ability to adopt an  $\alpha$ -helical conformation in the presence of SDS, a membrane-mimetic compound. Thus, analogues 1, 2, and 3 are promising candidates as antimicrobial and immunomodulatory agents, with potential therapeutic applications.

**Keywords:** Anurans; Analogues; Antimicrobial peptides; Biofilm; Neutrophils; Chemotaxis.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	20
1.1. Biofilmes bacterianos .....	23
1.2. Peptídeos antimicrobianos (PAMs) .....	25
1.3. Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos .....	27
1.4. Atividade antibacteriana dos PAMs .....	32
1.5. Atividade antifúngica dos PAMs .....	33
1.6. Atividade antiviral dos PAMs .....	33
1.7. Mecanismos de resistência aos peptídeos antimicrobianos .....	34
1.8. PAMs com atividade imunomoduladora .....	37
1.9. Imunidade inata .....	38
1.10. Fagocitose e armadilhas extracelulares por neutrófilos .....	39
1.11. Otimização de atividade antimicrobiana dos PAMS .....	40
1.12. Peptídeos antimicrobianos de anuros do gênero <i>Boana</i> como agentes terapêuticos .....	41
2. JUSTIFICATIVA .....	44
3. OBJETIVOS .....	45
3.1. OBJETIVO GERAL .....	45
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	46
4.1. Reagentes químicos .....	46
4.2. Desenho racional e síntese química dos análogos de peptídeos antimicrobianos de <i>B. crepitans</i> .....	46
4.3. Quantificação espectrofotométrica de peptídeos .....	46
4.4. Linhagens microbianas utilizadas .....	47
4.5. Avaliação da atividade antibacteriana .....	47
4.6. Avaliação da atividade antifúngica .....	48
4.7. Ensaio sobre biofilme bacteriano .....	49

4.7.1. Inibição da formação do biofilme .....	49
4.7.2. Ensaio de destruição de biofilme pré-formado (redução de biomassa) .....	49
4.8. Avaliação da atividade hemolítica .....	50
4.9. Ensaio <i>High Content Screening</i> (SARS-CoV-2/Vero cells) .....	51
4.9.1. Preparação dos compostos .....	51
4.9.2. Descrição do ensaio .....	51
4.10. Determinação da atividade antiproliferativa de células de mamíferos .....	51
4.11. Ativação de neutrófilos .....	52
4.11.1. Coleta de sangue .....	52
4.12. Separação de neutrófilos .....	52
4.13. Análise de ativação de neutrófilo por citometria de fluxo .....	52
4.14. Determinação de quimiotaxia de neutrófilos em tempo real .....	53
4.15. Dicroísmo circular .....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
5.1. Análogos do PAM Bc77(K) de <i>Boana crepitans</i> .....	55
5.2. Análises por dicroísmo circular (DC) .....	55
5.3. Efeitos antimicrobianos sobre bactérias Gram-negativas linhagem padrão .....	58
5.4. Efeitos antimicrobianos sobre bactérias Gram-positivas linhagem padrão .....	59
5.5. Efeitos antimicrobianos sobre bactérias multirresistentes .....	61
5.6. Efeitos antimicrobianos sobre fungos de linhagem padrão .....	62
5.7. Compilação dos resultados dos ensaios antimicrobianos .....	63
5.8. Ensaio <i>High Content Screening</i> (SARS-CoV-2/Vero cells) .....	63
5.9. Efeito hemolítico .....	69

5.10. Determinação da atividade antiproliferativa sobre linhagens celulares de mamíferos .....	70
5.11. Inibição da formação do biofilme .....	73
5.12. Ensaio de destruição de biofilme pré-formado (redução de biomassa) .....	76
5.13. Ativação dos neutrófilos .....	79
5.14. Determinação da ação ativadora de neutrófilos via produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) .....	79
5.15. Ensaio de migração por análise de células em tempo real (RTCA) ..	80
6. CONCLUSÃO .....	83
7. PERSPECTIVAS .....	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	86

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação conceitual dos possíveis caminhos de microrganismos multirresistentes ou genes de resistência em diferentes ecossistemas. Fonte: SHARMA <i>et al.</i> , 2018, com modificações.....	21
<b>Figura 2.</b> Lista de patógenos bacterianos prioritários de acordo com a Organização Mundial de Saúde, 2024. ....	22
<b>Figura 3.</b> A maturação do biofilme é um processo complexo de desenvolvimento que envolve cinco estágios. Etapa 1, fixação inicial; estágio 2, apego irreversível; estágio 3, maturação I; estágio 4, maturação II; estágio 5, dispersão. Fonte: MONROE, 2007. ....	24
<b>Figura 4.</b> Diversidade estrutural de peptídeos antimicrobianos (PAMs). Fonte: MORETTA <i>et al.</i> , 2021, com modificações. ....	27
<b>Figura 5.</b> Modelos de mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos. Fonte: MOOKHERJEE <i>et al.</i> , 2020. ....	29
<b>Figura 6.</b> Resumo das funções imunomoduladoras exibidas por peptídeos antimicrobianos. Fonte: MOOKHERJEE <i>et al.</i> , 2020. ....	31
<b>Figura 7.</b> Modelos esquemáticos dos principais mecanismos de ação propostos dos PAMs nas membranas celulares de bactérias. Fonte: CARMO <i>et al.</i> , 2022. ....	32
<b>Figura 8.</b> Principais mecanismos de resistência contra os PAMs. Fonte: PFALZGRAFF <i>et al.</i> , 2018 com modificações.....	36
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática do modo de ação de PAMs ilustrando sua ampla gama de funções imunomoduladoras. Fonte: MAHLAPUU <i>et al.</i> , 2016. ....	37
<b>Figura 10.</b> 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. Fonte: SILVA, 2021. ....	40
<b>Figura 11.</b> Representação gráfica da busca e desenvolvimento de PAMs farmacologicamente ativos. Fonte: LUONG <i>et al.</i> , 2020. ....	41
<b>Figura 12.</b> Espécime adulto de <i>Boana crepitans</i> . Foto gentilmente cedida por Carlos José Correia de Santana. ....	42

<b>Figura 13.</b> Espectros dicróicos na região distante da UV de peptídeos em água (linha sólida) e SDS 35 mM (linha pontilhada). <b>(A)</b> Bc77(K), <b>(B)</b> análogo 1, <b>(C)</b> análogo 2, <b>(D)</b> análogo 3, <b>(E)</b> análogo 4 e <b>(F)</b> análogo 5. ....	57
<b>Figura 14.</b> Efeitos da cloroquina (controle positivo), do Bc77(K) e de seus análogos 1, 2, 3, 4 e 5 sobre a proliferação de células (linha vermelha) e do vírus Sars-cov-2 (linha preta). O eixo X representa a concentração do peptídeo, em escala logarítmica. O eixo Y da esquerda mostra a atividade viral normalizada (em relação aos controles) e o da direita a citotoxicidade.....	67
<b>Figura 15.</b> Atividade hemolítica dos peptídeos A) Bc77(K), B) Análogo1, C) Análogo 2 e D) Análogo 3. ....	69
<b>Figura 16.</b> Atividade antiproliferativa sobre células HaCat e HeLa na presença do peptídeo Bc77(K) e dos análogos 1, 2 e 3. ....	71
<b>Figura 17.</b> Atividade antiproliferativa sobre células HaCaT <b>(A)</b> e HeLa <b>(E)</b> na presença do peptídeo Bc77(K).....	71
<b>Figura 18.</b> Atividade antiproliferativa sobre células HaCaT <b>(B)</b> e HeLa <b>(F)</b> na presença do análogo 1.....	72
<b>Figura 19.</b> Atividade antiproliferativa sobre células HaCaT <b>(B)</b> e HeLa <b>(F)</b> na presença do análogo 2.....	72
<b>Figura 20.</b> Atividade antiproliferativa sobre células HaCaT <b>(B)</b> e HeLa <b>(F)</b> na presença do análogo 3.....	73
<b>Figura 21.</b> Inibição da formação do biofilme promovida pelo peptídeo Bc77(K) <b>(A)</b> e análogos 1 <b>(B)</b> e 2 <b>(C)</b> .....	75
<b>Figura 22.</b> Destruição de biofilme pré-formado (redução de biomassa) do peptídeo Bc77(K) <b>(A)</b> e dos análogos 1 <b>(B)</b> e 2 <b>(C)</b> . ....	77
<b>Figura 23.</b> Avaliação da migração de neutrófilos humanos na presença ou não do peptídeo Bc77(K). ....	81
<b>Figura 24.</b> Avaliação da migração de neutrófilos humanos na presença ou não do análogo 1.....	81
<b>Figura 25.</b> Avaliação da migração de neutrófilos humanos na presença ou não do análogo 2.....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Condições do ensaio de migração celular por análise de células em tempo real (RTCA). .....	54
<b>Tabela 2.</b> Helicidade calculada dos peptídeos Bc77(K) e de seus análogos na presença de SDS (35 mM) a 25 °C. ....	57
<b>Tabela 3.</b> Efeitos antimicrobianos do peptídeo Bc77(K) e de seus análogos sobre microrganismos Gram-negativos de linhagem padrão. ....	58
<b>Tabela 4.</b> Efeitos antimicrobianos do peptídeo selvagem Bc77(K) e de seus cinco análogos sobre microrganismos Gram positivos de linhagem padrão. ....	59
<b>Tabela 5.</b> Efeitos antimicrobianos do peptídeo selvagem Bc77(K) e de seus análogos sobre microrganismos multiresistentes. ....	61
<b>Tabela 6.</b> Efeitos antimicrobianos do peptídeo selvagem Bc77(K) e de seus cinco análogos sobre a levedura <i>Candida albicans</i> . ....	62
<b>Tabela 7.</b> Compilado de todos os ensaios antimicrobianos realizados. ....	63
<b>Tabela 8.</b> Resumo dos resultados dos efeitos dos peptídeos sobre SARS-CoV-2. ....	63



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\mu$ L - Microlitro

$\mu$ M - Micromolar

APD3 - *Antimicrobial Peptide Database*

ATCC - *American Type Culture Collection*

BHI - *Brain Heart Infusion*

CFU - Unidade formadora de colônia

CMI - Concentração inibitória mínima

Da - Daltons

DC - Dicroísmo circular

DCM - Diclorometano

DIPEA - N,N'-diisopropiletilamina

DMF - Dimetilformamida

DMSO - Dimetilsulfóxido

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

fMLP - N-Formilmetionil-leucil-fenilalanina

Fmoc-Cloroformiato de 9-fluorenilmetila

GRAVY- Índice médio de hidropaticidade

HBSS - *Hank's Balanced Salt Solution*

HBTU - 1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurôniohexafluorofatato

HCCA - Ácido alfa-ciano-4-hidroxinâmico

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

IC50 - Concentração inibitória 50%

KCN - Cianeto de potássio

LPS - Lipossacarídeo

LTA - Ácido lipoteicóico

MALDI - TOF-*Matrix Associated Laser Desorption Ionization – Time of Flight*

mA - Miliamper

mmol - Milimolar

MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólico

nm - Nanômetro

PAMs - Peptídeos antimicrobianos

RTCA - Analisador de células em tempo real

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SMH - Modelo de Shai-Matsuzaki-Huang

TFA - Ácido trifluoracético

TFE - Trifluoroetanol

TIS - Triisopropilsilano

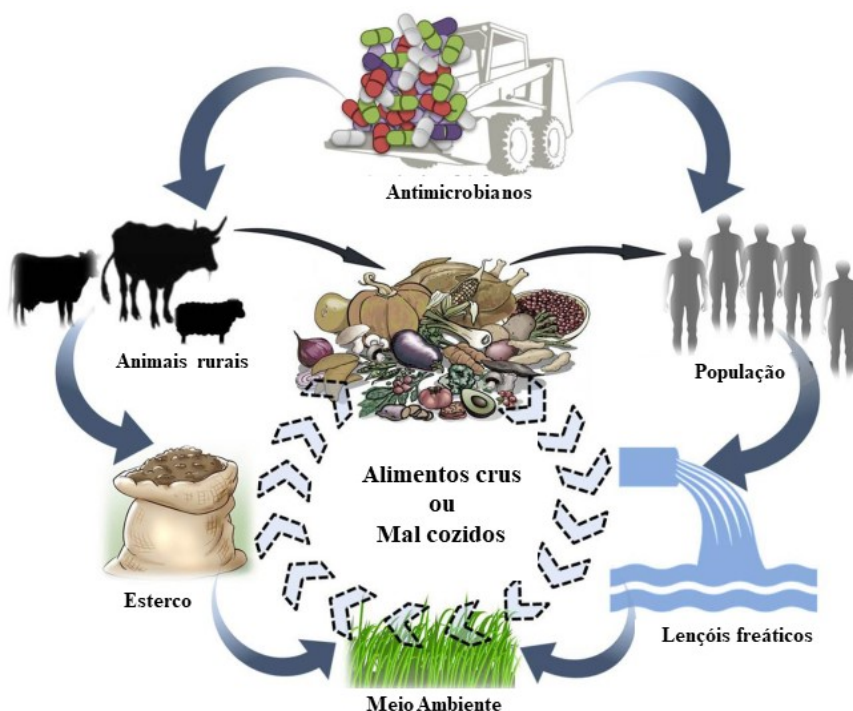
## TABELA DE AMINOÁCIDOS

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

## 1. INTRODUÇÃO

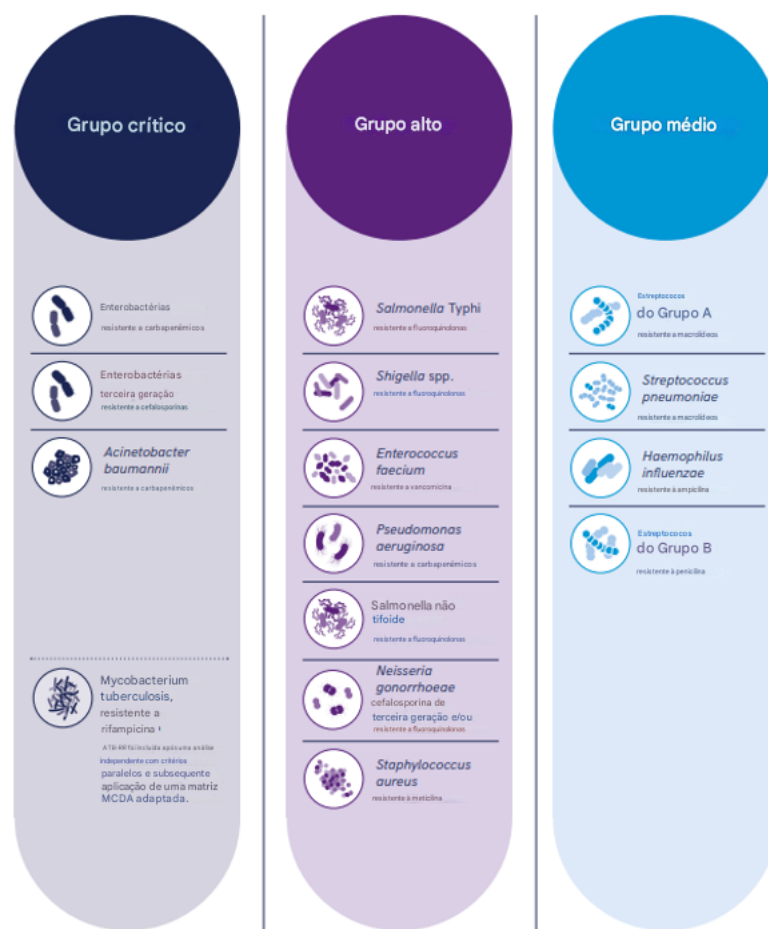
Os microrganismos são, ao mesmo tempo, grandes aliados e grandes inimigos da humanidade. Desde que Leeuwenhoek os descobriu, nosso conhecimento sobre eles só aumentou, especialmente na identificação como causadores de infecções (ANTONY *et al.*, 2024). Para combatê-los, diversas medidas são adotadas ao redor do mundo, com destaque para o uso de antimicrobianos. A descoberta do primeiro antibiótico, a penicilina, reduziu drasticamente as doenças infecciosas e salvou milhões de vidas, especialmente durante a Segunda Guerra Mundial. Logo após sua descoberta, Sir Alexander Fleming alertou sobre a possibilidade de as bactérias exibirem resistência aos tratamentos antibacterianos e logo surgiram relatos de falhas nos tratamentos (ABRAHAM *et al.*, 1988; AJULO *et al.*, 2024). A resistência aos antimicrobianos é entendida como a ineficácia das doses usuais de medicamentos antimicrobianos em tratamentos clínicos (ZHOU *et al.*, 2024).

Além disso, os microrganismos multirresistentes ultrapassam fronteiras geográficas facilmente, espalhando-se por países e continentes através de humanos, animais e pela água (DECKER *et al.*, 2022). No século XXI, com a globalização e urbanização, os tratamentos não conseguem mais limitar as linhagens resistentes apenas aos ambientes de saúde. Muitas doenças infecciosas tornam-se difíceis de controlar, grandes cirurgias estão cada vez mais ameaçadas e, atualmente, formas resistentes se espalham no meio ambiente por diversos meios, incluindo a pecuária, agricultura e a população em geral, não apenas por profissionais de saúde (figura1) (BRUNETTI *et al.*, 2023).



**Figura 1.** Representação conceitual dos possíveis caminhos de microrganismos multirresistentes ou genes de resistência em diferentes ecossistemas. Fonte: SHARMA *et al.*, 2018, com modificações.

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) estão ganhando destaque como novas alternativas para tratar infecções microbianas. Na década de 1980, acreditava-se que as infecções estavam sob controle (SPELLBERG *et al.*, 2008), mas a atual resistência levanta preocupações sobre uma era pós-antibiótico sem opções de tratamento antimicrobiano. Estima-se que, até 2050, 10 milhões de pessoas por ano poderão morrer em todo o mundo devido a infecções por bactérias multirresistentes (AGUILAR *et al.*, 2023). A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a resistência aos antibióticos uma das maiores ameaças à saúde humana (figura 2) (PFALZGRAFF *et al.*, 2018).



**Figura 2.** Lista de patógenos bacterianos prioritários de acordo com a Organização Mundial de Saúde, 2024.

Um exemplo são os patógenos do grupo ESKAPE, que incluem *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter* sp. Esses microrganismos são resistentes a quase todos os antibióticos comuns e são responsáveis por muitas hospitalizações devido a infecções (SANTAJIT *et al.*, 2016).

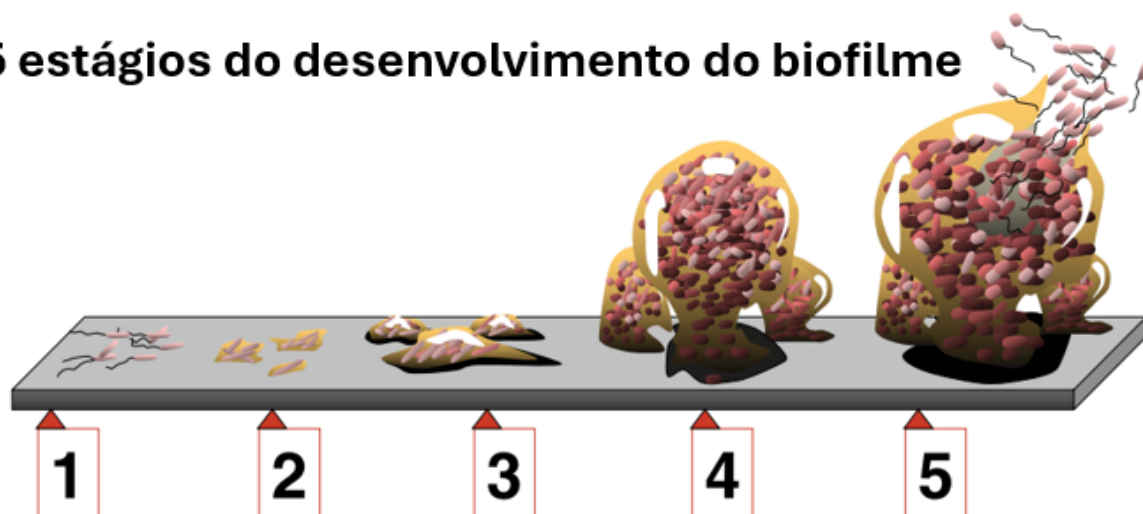
Infecções de pele e de tecidos moles são, em grande parte, causadas por *S. aureus*, com linhagens de MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina) representando 50% de todas essas infecções. Além disso, patógenos Gram-negativos e Gram-positivos, como *P. aeruginosa* e *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE), estão sendo cada vez mais identificados, especialmente em feridas crônicas (GUILLAMET *et al.*, 2016).

### 1.1. Biofilmes bacterianos

Os microrganismos evoluíram ao longo de muitos anos e desenvolveram mecanismos que causam infecções, protegendo-os dos efeitos ambientais e sobrevivendo em humanos. Nos últimos anos, os cientistas sugeriram antibióticos peptídicos, produzidos por organismos que vivem na natureza, como uma alternativa aos antibióticos existentes, e iniciaram uma nova era na guerra da humanidade contra os microrganismos. Os antibióticos peptídicos são moléculas em estrutura peptídica produzidas por organismos para se protegerem contra infecções (POLAT *et al.*, 2024).

Biofilmes bacterianos se tornaram um contribuidor essencial para problemas de saúde globais devido à resistência a antibióticos, ao sistema de defesa imunológica do hospedeiro e outras pressões externas. Biofilmes são comumente encontrados na superfície de instrumentos hospitalares e tecidos corporais, na indústria, unidades de processamento de alimentos e ambientes naturais. Quase todas as bactérias podem formar biofilmes (ZHAO *et al.*, 2023). Os biofilmes bacterianos são geralmente definidos como comunidades microbianas fixas envoltas em substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (figura 3). É caracterizado por mudanças na adesão irreversível de células microbianas a superfícies ou substratos ou entre si, embutidas em EPS, e exibindo fenótipos específicos em termos de transcrição genética e taxas de crescimento. Um biofilme bacteriano pode ser composto de um único microrganismo ou uma mistura de bactérias, fungos, arqueas, protozoários e leveduras. Ele tem uma estrutura de canal que controla a liberação de gases, nutrientes e antimicrobianos (ZHAO *et al.*, 2023).

## 5 estágios do desenvolvimento do biofilme



**Figura 3.** A maturação do biofilme é um processo complexo de desenvolvimento que envolve cinco estágios. Etapa 1, fixação inicial; estágio 2, apego irreversível; estágio 3, maturação I; estágio 4, maturação II; estágio 5, dispersão. Fonte: MONROE, 2007.

Os microrganismos aderem ao seu ambiente produzindo um biofilme e são protegidos do efeito antimicrobiano de antibióticos e fagocitose. A camada de biofilme é uma estrutura extremamente importante no fornecimento de resistência contra os efeitos de fatores ambientais e substâncias antimicrobianas que prejudicarão o microrganismo. Há uma necessidade de antibióticos de nova geração com amplo espectro e atividade antimicrobiana e antibiofilme de longa duração, especialmente devido ao aumento no número de pacientes recebendo tratamento de longo prazo em hospitais. Graças às propriedades dos antibióticos peptídicos, o desenvolvimento de novos fármacos com propriedades antimicrobianas se destaca como uma forte opção (POLAT *et al.*, 2024).

Com a melhoria da tecnologia médica, o uso generalizado de dispositivos médicos e a busca por alta qualidade de vida para os pacientes, os biofilmes associados a dispositivos médicos representam uma grave ameaça à vida e à saúde dos pacientes. Os microrganismos podem aderir a quase todos os dispositivos médicos e causar infecções de biofilme associadas a dispositivos médicos. As infecções associadas a dispositivos geralmente ocorrem durante o tratamento, onde alguns microrganismos se originam do hospedeiro. Quando esses microrganismos se fixam e colonizam a superfície de um dispositivo médico, eles podem formar um recipiente biológico. Quando o biofilme na superfície de dispositivos médicos implantados atinge um nível crítico, ele pode induzir uma resposta



inflamatória no hospedeiro e pode até causar falha do implante. Os microrganismos mais comuns para infecções associadas a dispositivos médicos são *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Bactérias gram-negativas multirresistentes (por exemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*) também podem causar infecções associadas a dispositivos médicos em ambientes hospitalares complexos (ZHAO *et al.*, 2023; POLAT *et al.*, 2024).

## 1.2. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Os PAMs são componentes-chave do sistema imunológico inato universalmente requerido para a sobrevivência de invertebrados e vertebrados. A lisozima, descoberta por Sir Alexander Fleming em 1922, é reconhecida como a primeira proteína antimicrobiana (WANG, 2015) e assim deu início às descobertas que se seguiram, sendo que em 1939 obteve-se a extração de gramicidina de *Brevibacillus brevis* seguida do isolamento de cecropinas e magaininas nos anos 80 (KANG *et al.*, 2017).

Os PAMs da secreção de pele dos anuros apresentam cerca de 8-46 resíduos de aminoácidos, com carga positiva e características anfipáticas. A expressão dos peptídeos antimicrobianos pode ser constitutiva ou induzida por estímulos infecciosos ou inflamatórios, tais como citocinas pró-inflamatórias, bactérias, fungos ou moléculas patogênicas que estimulam a imunidade inata (CONLON *et al.*, 2023).

Os PAMs também podem ser aniônicos (um pequeno grupo presente em ruminantes, principalmente ricos em aspartato e glutamato) ou catiônicos (um grande grupo presente na maioria dos animais). Peptídeos catiônicos podem ser lineares, helicoidais, ricos em prolina ou estabilizados por cisteínas. Normalmente eles exibem atividade antimicrobiana de amplo espectro contra bactérias e fungos (LIU *et al.*, 2024).

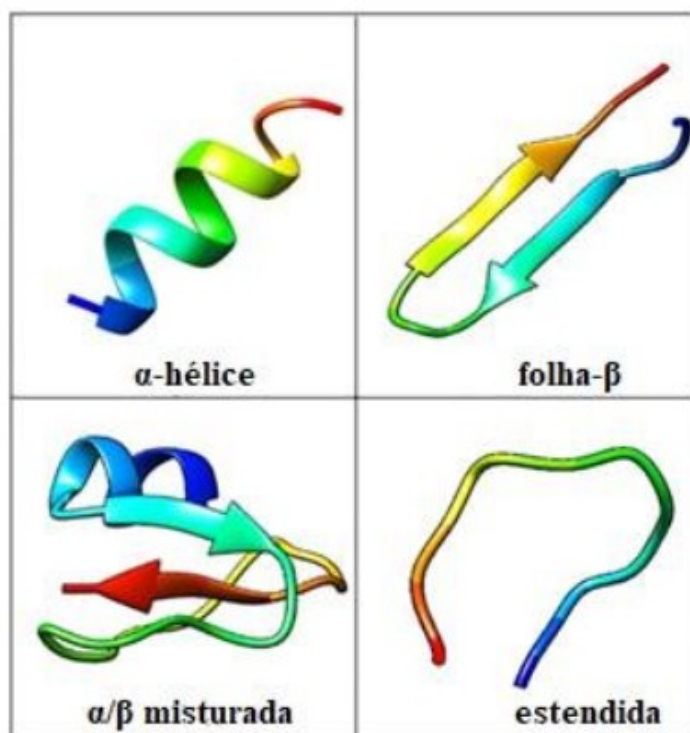
Devido ao seu amplo espectro de atuação e capacidade limitada de induzir resistência, os PAMs são amplamente estudados como substitutos aos antimicrobianos convencionais que estão rapidamente tornando-se ineficazes contra diversas linhagens de microrganismos (FEI *et al.*, 2023). Houve um aumento na pesquisa com esforços focados no desenho racional e na previsão de PAMs. Diversos trabalhos empregam estratégias de desenho racional para gerar novos PAMS com

melhorias de atividade e redução da toxicidade (PORTO *et al.*, 2017). Mais recentemente, durante a pandemia de COVID-19 provocada pelo SARS-CoV-2 (coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave), o foco sobre os PAMs mudou, passando a se concentrar em seu uso como moléculas antivirais no combate à COVID-19 (KURPE *et al.*, 2020; MORETTA *et al.*, 2021).

A estratégia de desenho racional envolve identificação de padrões de sequência, resíduos cruciais, posições e frequências de aminoácidos de PAMs conhecidos. Estas informações são então usadas para propor novos PAMs. Outra abordagem usada para projetar racionalmente novos PAMs é o método baseado em modelo onde substituições/truncamentos no peptídeo selvagem podem levar a desenhos de PAMs mais potentes com toxicidade reduzida. Esse exercício é, portanto, fortemente dependente de algoritmos altamente sensíveis que podem prever com precisão a mudança na atividade da membrana devido a pequenas variações de sequência (TANG *et al.*, 2024).

Os PAMs apresentam uma variedade de estruturas secundárias, permitindo a sua classificação em cinco grupos principais: (1) peptídeos que adotam conformação de folha- $\beta$  quando são estabilizados por duas ou três ligações dissulfeto; (2) peptídeos sem resíduos de cisteína que adotam estruturas de  $\alpha$ -hélice anfipáticas; (3) peptídeos aniônicos ricos em aspartato e glutamato; (4) peptídeos ricos em resíduos de triptofano, prolina e/ou histidina; e (5) peptídeos compostos de aminoácidos raros (HANCOCK *et al.*, 2002; REDDY *et al.*, 2004).

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



**Figura 4.** Diversidade estrutural de peptídeos antimicrobianos (PAMs). Fonte: MORETTA *et al.*, 2021, com modificações.

### 1.3. Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos

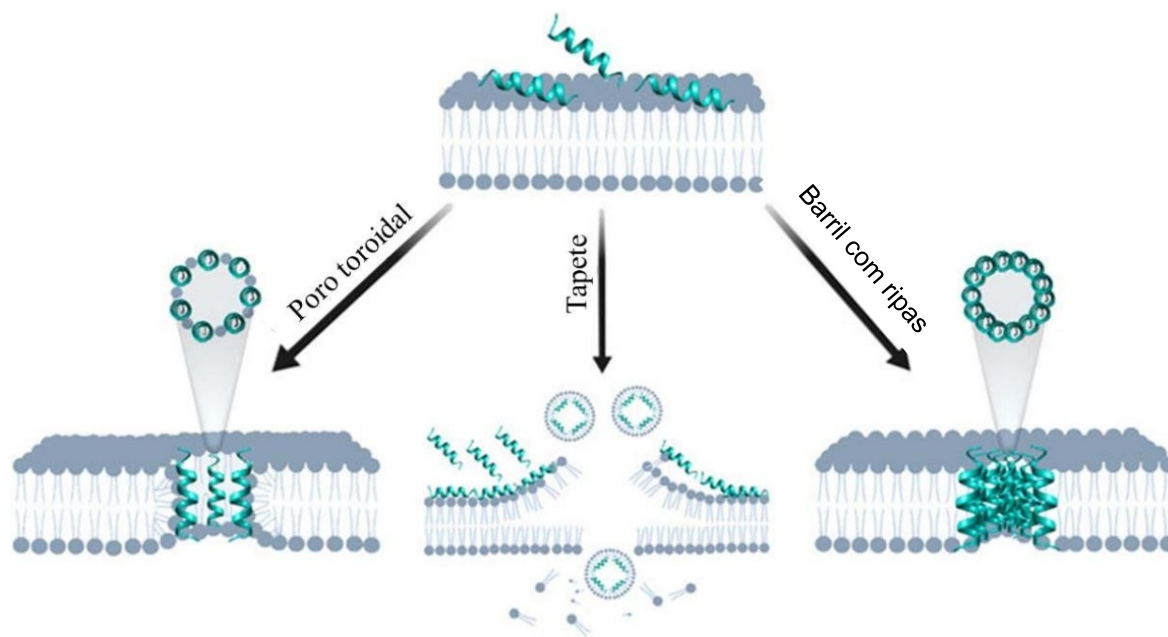
A seletividade dos peptídeos antimicrobianos (PAMs) é baseada nas diferenças de composição lipídica e carga das membranas de células eucarióticas e procarióticas. Quando os PAMs interagem com a membrana celular dos patógenos, alteram o potencial elétrico devido às interações com os lipídeos da membrana (TEIXEIRA *et al.*, 2012). A superfície das membranas celulares de mamíferos e outros eucariontes é composta por lipídeos neutros, dificultando a interação eletrostática com os PAMs e, assim, protegendo a célula de sua ação (YEAMAN *et al.*, 2003). Em contraste, as interações eletrostáticas com células bacterianas são facilitadas pela presença de fosfolipídios negativamente carregados na superfície externa da bicamada lipídica, permitindo uma interação hidrofóbica com a face apolar do peptídeo, o que altera a permeabilidade da membrana da célula alvo (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

As membranas biológicas são compostas por bicamadas fluidas de fosfolipídios com proteínas associadas e, em alguns organismos, também contêm glicerol e esteroides. As composições das membranas de células bacterianas e animais diferem, sendo que os principais componentes das membranas bacterianas incluem

fosfolipídios hidroxilados como o fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) e fosfatidilserina (PS). Por outro lado, as membranas de vertebrados são ricas em fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e esfingomielina (SM), que são considerados fosfolipídios zwitteriônicos devido à sua carga neutra. O colesterol e outros esteroides, como o ergosterol, são comuns em membranas eucarióticas, mas raramente encontrados em membranas procarióticas (ZASLOFF, 2002; EBENHAN *et al.*, 2014; EPAND *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2018).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm alta seletividade por células microbianas devido à composição lipídica das suas membranas, que inclui lipopolissacarídeos (LPS) em bactérias Gram-negativas e ácidos teicoicos em bactérias Gram-positivas (MOOKHERJEE *et al.*, 2020). No entanto, em algumas situações, eles podem interferir na síntese proteica e no núcleo celular de certos patógenos (Figura 5). Por isso, são vistos como promissores para o desenvolvimento de novas drogas antivirais, antifúngicas, antiparasitárias e, especialmente, antibacterianas (SADREDINAMIN *et al.*, 2016; KAPIL & SHARMA, 2021).

Ao se pensar em PAMs para uso farmacológico vêm à mente a toxicidade seletiva que ele deverá possuir para não danificar as células do hospedeiro. A ação dos PAMs ocasiona um desarranjo na membrana celular, visto que a molécula não se liga a nenhum receptor específico, apesar da conformação da molécula, se for em  $\alpha$ -hélice, folhas- $\beta$ , linear ou desorganizada, sendo que o que auxilia no sítio alvo é principalmente a carga e a hidrofobicidade dos peptídeos (YEAMAN *et al.*, 2003). Vários modelos vêm sendo propostos envolvendo como mecanismo de ação a permeabilização da bicama lipídica, podem ser classificados como: agregação, poro toroidal, barril e tapete (*carpet-like*) (figura 5) (TEIXEIRA *et al.*, 2012).



**Figura 5.** Modelos de mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos. Fonte: MOOKHERJEE *et al.*, 2020.

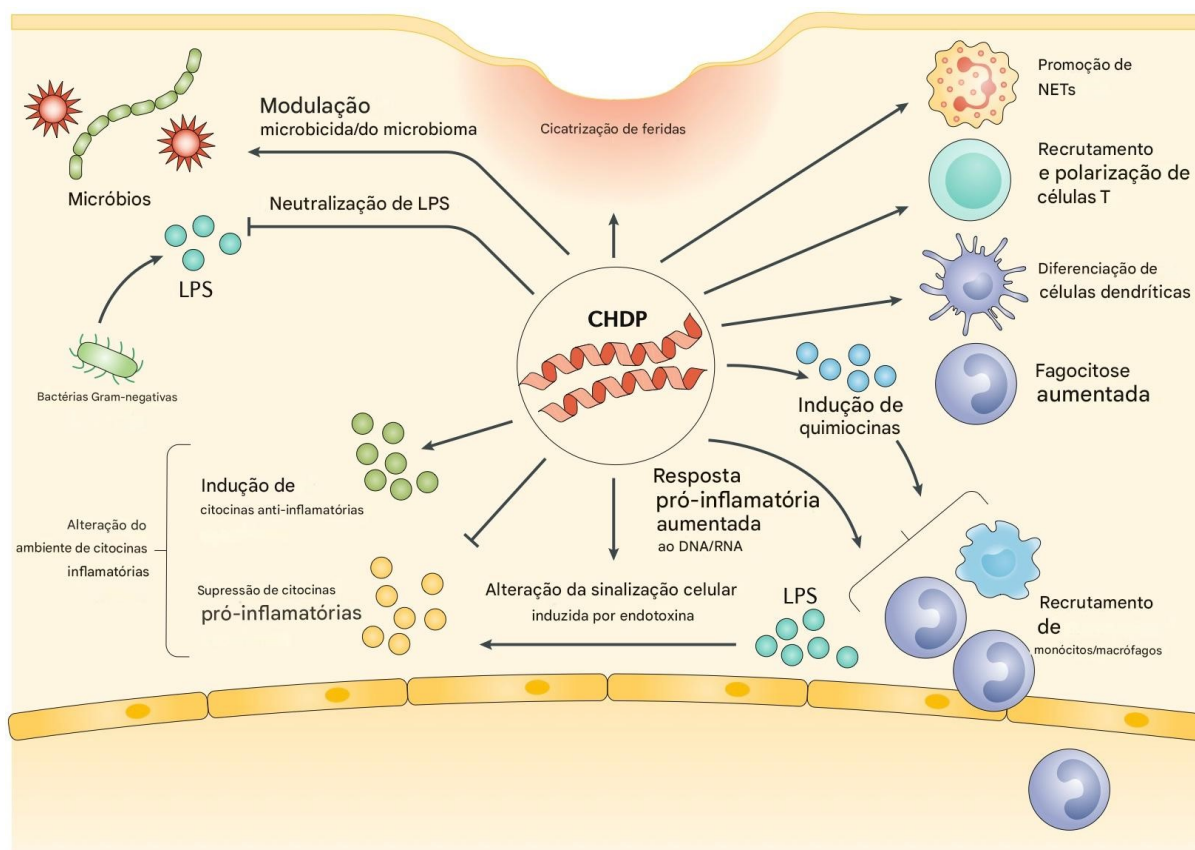
O modelo de poro toroidal é um processo em dois estágios, onde a interação entre os peptídeos antimicrobianos (PAMs) e a membrana ocorre inicialmente com o alinhamento paralelo dos PAMs à membrana celular de forma inativa. Após a adesão, há um aumento na contração na região, elevando os limiares de interação peptídeo/membrana, o que permite que os PAMs se infiltrem na membrana bacteriana (TRAVKOVA *et al.*, 2017). Em seguida, os PAMs transicionam de um estado inativo para um estado funcional, estimulando a dobra da monocamada lipídica. Os peptídeos inseridos geram fendas irreversíveis na face hidrofóbica da membrana (KUMAR *et al.*, 2018). Essa instabilidade criada pelo poro facilita a entrada dos PAMs no folheto interno da membrana. A concentração e a composição fosfolipídica das membranas influenciam essa transição dos PAMs de inativos para funcionais (BENFIELD & HENRIQUES, 2020).

O modelo de barril (*barrel-stave*) envolve o acúmulo de PAMs monoméricos lineares na membrana, seguido por mudanças conformacionais e agregação que resultam na formação de estruturas multiméricas inseridas verticalmente na membrana (DAVENPORT *et al.*, 1991). A agregação força as regiões hidrofóbicas dos PAMs para o núcleo hidrofóbico das membranas, evitando a exposição das partes hidrofílicas dos PAMs, criando canais iônicos permeáveis (MATSUZAKI, 2019), que podem causar morte celular por pressão osmótica (ZHANG *et al.*, 2021). Este modelo

é assim nomeado devido à organização das ripas que lembram um barril, que podem variar em tamanho e são menores que os poros toroidais (BECHINGER & GORR, 2017).

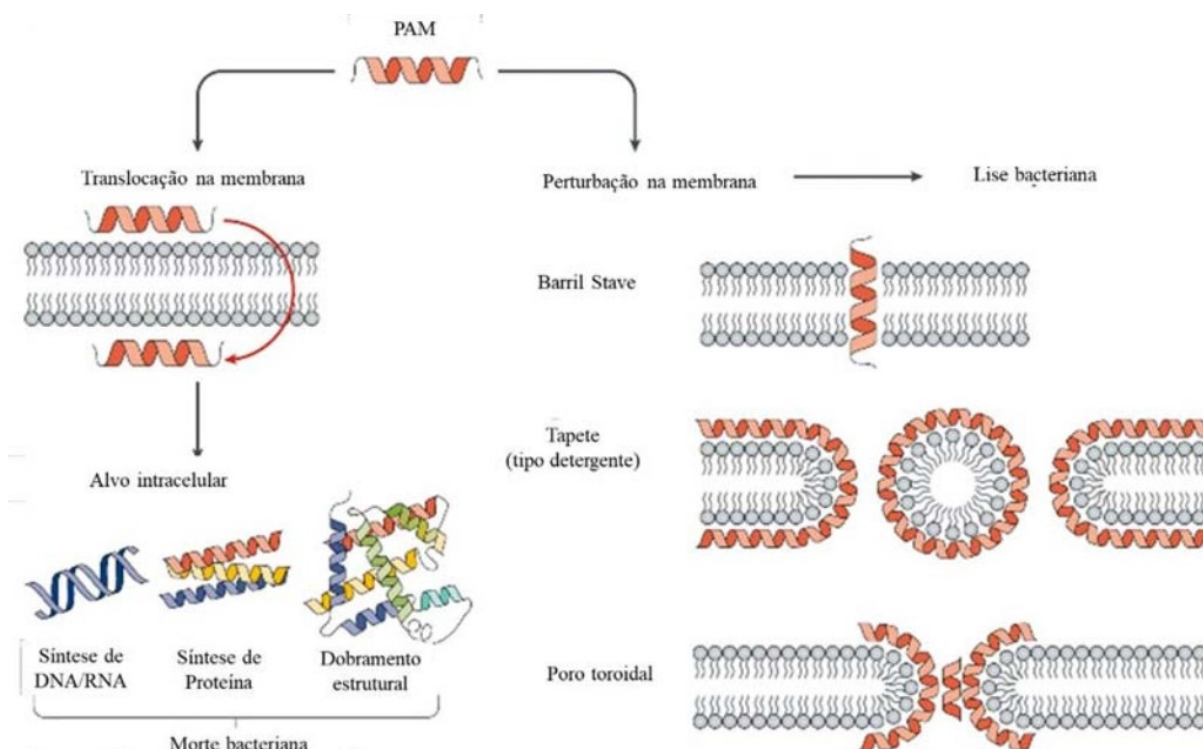
No modelo *carpet-like*, os PAMs se ligam à membrana citoplasmática aniônica por meio de interações eletrostáticas, forçando uma curvatura entre os peptídeos e lipídios, formando um complexo peptídeo/membrana que se adsorve à interface da membrana (HAZAM *et al.*, 2019). Esse mecanismo é similar ao de detergentes, levando à formação de micelas e vesículas (WANG *et al.*, 2016). Em altas concentrações, os PAMs se aglomeram e cobrem partes da membrana bacteriana, induzindo a formação de micelas e rupturas na membrana, semelhantes aos surfactantes, resultando em lise total ou parcial da membrana celular e morte bacteriana (PARK *et al.*, 2024).

Embora os peptídeos antimicrobianos possam atuar diretamente nas membranas bacterianas ou afetar de forma específica a síntese proteica e a expressão gênica, alguns deles também podem influenciar indiretamente o sistema imunológico inato dos organismos, desempenhando um papel importante na imunidade local e/ou sistêmica, em conjunto com outras proteínas imunológicas (KHINE *et al.*, 2006). Por exemplo, os PAMs podem operar através de diversos mecanismos, como a quimiotaxia de células de defesa, a modulação da resposta das células hospedeiras via TLR (receptor *Toll-Like*), a estimulação da angiogênese e a ativação e diferenciação de leucócitos/monócitos, além de influenciar a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Figura 6) (ZHANG & GALLO, 2016; MOOKHERJEE *et al.*, 2020). Essas moléculas são essenciais para a resposta imune contra infecções bacterianas, atuando como sinalizadoras que regulam o sistema imunológico (GURYANOVA & OVCHINNIKOVA, 2022).



**Figura 6.** Resumo das funções imunomoduladoras exibidas por peptídeos antimicrobianos. Fonte: MOOKHERJEE *et al.*, 2020.

O modelo Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) combina a formação de carpete e poros por meio da adesão dos peptídeos à membrana bacteriana, permitindo que os peptídeos interajam com alvos intracelulares (figura 7). Acredita-se que este modelo represente a interação da maioria dos PAMs, levando os pesquisadores a reconhecerem a importância do modelo SMH, uma vez que contempla a entrada de peptídeos nas células-alvo (SEKIYA *et al.*, 2018; VISHNEPOLSKY *et al.*, 2019; LUO & SONG, 2021).



**Figura 7.** Modelos esquemáticos dos principais mecanismos de ação propostos dos PAMs nas membranas celulares de bactérias. Fonte: CARMO *et al.*, 2022.

#### 1.4. Atividade antibacteriana dos PAMs

São descritos na literatura PAMs com um grande espectro antibacteriano ou com concentrações inibitórias mínimas (CIM) comparáveis com antibacterianos já utilizados para tratamento clínico. Um exemplo é a dermaseptina S4 que alcança uma CIM de 1  $\mu\text{M}$  contra isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* (NAVON-VENEZIA *et al.*, 2002). Existem alguns peptídeos atualmente em fase de estudos para uso tópico como as cecropinas D2A21, D4E1 e a gramicidina S, utilizados para combater estirpes de *Pseudomonas* sp e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente (MARR *et al.*, 2006; LUCA *et al.*, 2013).

Os peptídeos Hylin-a1, AR-23 e RV-23, isolados de anfíbios, mostraram forte ação antibacteriana contra *E. coli* e *K. pneumoniae*, inclusive resistentes a carbapenêmicos. Com baixa toxicidade e resistência à degradação, inibiram biofilmes e atuaram em sinergia com meropenem. Sua eficácia está ligada à flexibilidade estrutural e conformação  $\alpha$ -helicoidal ao interagir com membranas bacterianas, destacando seu potencial terapêutico (CHIANESE *et al.*, 2025).



### 1.5. Atividade antifúngica dos PAMs

Os peptídeos com atividade antifúngica variam substancialmente em termos de similaridade estrutural e sua atividade poderia estar correlacionada com sua habilidade para formar complexos lipídicos (LÓPEZ-GARCÍA *et al.*, 2004; JENSSEN *et al.*, 2006). Entre os principais mecanismos propostos encontram-se: 1) a quebra da estrutura da membrana celular (LEE *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2004; JANG *et al.*, 2006), 2) a danificação da parede celular (LEE *et al.*, 2003), 3) a interação com mitocôndrias (KAVANAGH *et al.*, 2004), e 4) a despolarização do citoesqueleto por despolimerização das fibras de actina (KOO *et al.*, 2004).

Grande parte dos PAMs com características antifúngicas atuam comumente na parede celular ou em compostos intracelulares (NARAYANA *et al.*, 2015). A parede celular dos fungos é rica em quitina e muitos PAMs são capazes de se ligarem a esta molécula, por exemplo, a defensina 1 murina (mBD1) e a histatina 5, ambos mostram uma eficiente ação sobre linhagens de *Candida albicans* (HELMERHORST *et al.*, 1999; SHEN *et al.*, 2014). Há também peptídeos com ação contra fungos filamentosos como *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme*, um exemplo é a iturina A que é eficaz contra dermatomicoses, tendo um amplo espectro de propriedades antifúngicas e poucas reações alergênicas, isso em ensaios clínicos com seres humanos e animais, porém o peptídeo apresenta atividade hemolítica (LATOUD *et al.*, 1986).

O peptídeo [K3] temporina-SHa, um análogo da temporina-SHa previamente isolada da pele da espécie *Pelophylax saharicus* e contendo uma lisina na posição 3 ao invés de uma serina, apresentou forte atividade antifúngica *in vitro* contra leveduras e fungos filamentosos, especialmente *Candida albicans*, com CIMs entre 5,5 e 45 µM. Demonstrou ação fungicida rápida por permeabilização da membrana e sinergia com a anfotericina B. Esses achados indicam seu potencial como nova alternativa terapêutica para infecções fúngicas, incluindo aquelas por *Candida* e *Cryptococcus neoformans* (BRUNET *et al.*, 2022).

### 1.6. Atividade antiviral dos PAMs

A comunidade científica enfrenta novos desafios com relação à vigilância, tratamento e prevenção de viroses emergentes como é o caso das infecções pelos vírus zika, chikungunya e dengue, que vêm causando alerta, principalmente nas Américas (HEUKELBACH *et al.*, 2016). Embora a atividade antibacteriana dos

peptídeos com características catiônicas seja a mais estudada, pouco se sabe sobre a capacidade que possuem para atuar como agentes antivirais. Além disso, o mecanismo de ação desses peptídeos que exibem atividade antiviral ainda é pouco compreendido (JENSSEN *et al.*, 2004).

A atividade antiviral de um grupo de peptídeos catiônicos de folha- $\beta$ , contra vírus envelopados foram atribuídos à inativação direta de partículas virais, um exemplo são os vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2), vírus da imunodeficiência tipo 1 (HIV-1), vírus da estomatite vesicular (VSV), influenzavírus e citomegalovírus (MOHAN *et al.*, 2010). No entanto, se relata que os peptídeos  $\alpha$ -helicoidais podem atuar como agentes virucidas ou como inibidores da multiplicação do vírus. As magaininas I e II são peptídeos  $\alpha$ -helicoidais contendo 23 resíduos de aminoácidos, previamente isolados da pele do sapo *Xenopus laevis*, que diferem por substituições nas posições 10 e 22 (MARCOCCI *et al.*, 2018) e tem sido relatado que análogos sintéticos de magaininas exibem ação virucida contra HSV-1 (MARCOCCI *et al.*, 2018).

O peptídeo Hylin-a1, secretado pela rã *Boana albopunctata*, demonstrou forte efeito antiviral contra diversos vírus respiratórios envelopados, como SARS-CoV-2, H1N1 e parainfluenza. Inibiu significativamente a infectividade desses vírus, mas não atuou contra o coxsackievírus B3 (CHIANESE *et al.*, 2023). Mais recentemente, o mesmo peptídeo exibiu potente ação antiviral contra HSV-1 e HSV-2, inclusive cepas resistentes ao aciclovir. Atua nos estágios iniciais da infecção, provavelmente danificando o envelope viral. Apresenta sinergia com aciclovir, baixa toxicidade, efeito anti-inflamatório e boa estabilidade, sendo um promissor agente terapêutico contra infecções herpéticas (CHIANESE *et al.*, 2024).

### **1.7. Mecanismos de resistência aos peptídeos antimicrobianos**

Os microrganismos patogênicos têm apresentado diversos mecanismos que limitam os efeitos dos PAMs. Esses mecanismos podem ser intrínsecos, sendo expressos, tanto na presença, quanto na ausência de estímulo, ou adaptativo, manifestando-se em resposta à presença do peptídeo ou às reações que ele provoca na célula-alvo (YOUNT & YEAMAN, 2005).

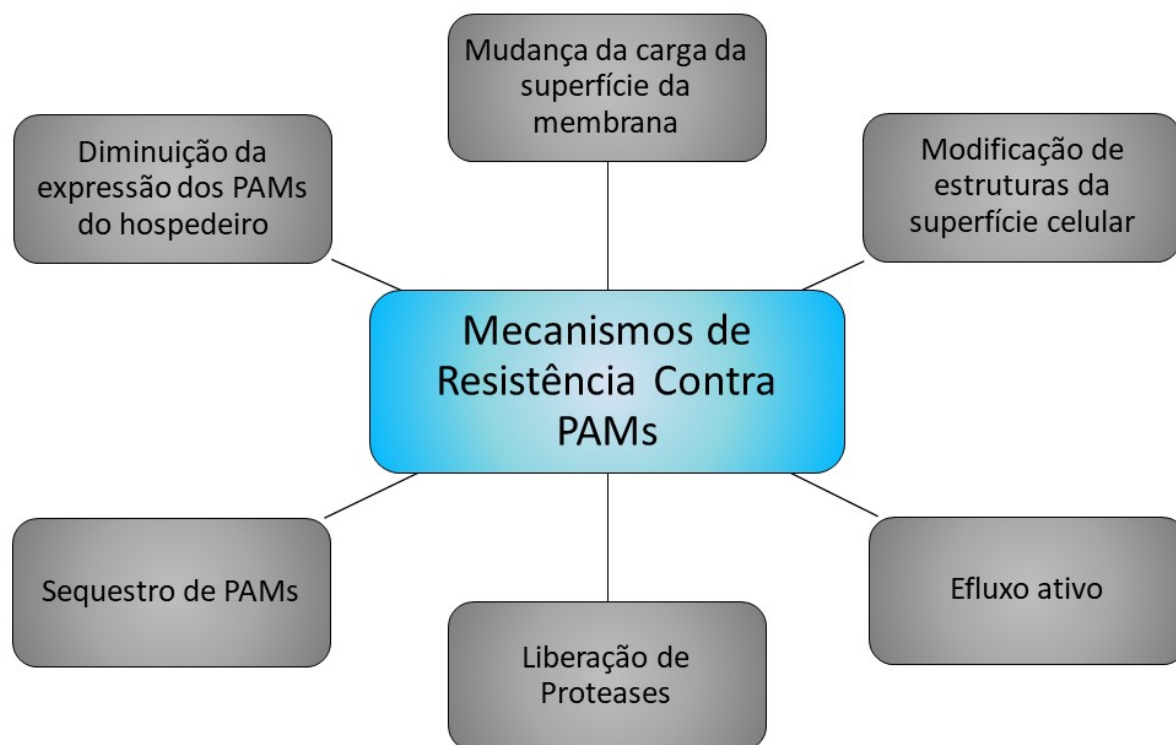
A resistência pode ser resultado de modificações em lipídios e lipopolissacarídeos que normalmente seriam alvos extracelulares dos PAMs, assim

como componentes da parede celular, de modo a diminuir a carga líquida negativa e conseguindo assim repelir os PAMs positivamente carregados (GUO *et al.*, 1998; ERNST *et al.*, 1999; ZHOU *et al.*, 1999; JOO *et al.*, 2016).

Algumas bactérias e fungos teriam a capacidade de ejetar os PAMs do seu interior, de maneira dependente de energia, através da indução de genes que codificam proteínas formadoras de canais (SHAFFER *et al.*, 1998; BENGOCHEA *et al.*, 2000). Outro mecanismo consiste na modificação de proteínas-alvo intracelulares (DEL CASTILLO *et al.*, 2001). Alguns patógenos, aliás, podem afetar os sistemas de defesa induzíveis ao interferirem com cascatas de sinalização (ISLAM *et al.*, 2001).

A resistência bacteriana contra PAMs já foram relatadas (OUHARA *et al.*, 2008; ANDERSSON *et al.*, 2016; OMARDIEN *et al.*, 2016) e isso ocasiona o risco de que as bactérias que apresentam resistência aos PAMs possam exibir resistência cruzada às células do hospedeiro (DOBSON *et al.*, 2014; KUBICEK-SUTHERLAND *et al.*, 2017), como *S. aureus* que demonstrou resistência a HNP-1 após tratamento com pexiganan (CONLON, 2015). No entanto, peptídeos sintéticos poderiam superar o obstáculo da resistência em relação aos peptídeos naturais de defesa do hospedeiro (NIJNIK, 2009). Pode-se aumentar a atividade biológica dos peptídeos antimicrobianos, propondo-se algumas alterações em relação ao peptídeo selvagem e com isso pode-se potencializar os efeitos frente as linhagens microbianas, visando sempre diminuir as possíveis interações com as células dos seres humanos e assim os PAMs mostram-se como uma opção viável para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (PFALZGRAFF *et al.*, 2018).

A Figura 8 ilustra os principais mecanismos de resistência bacteriana e fúngica contra os PAMs.



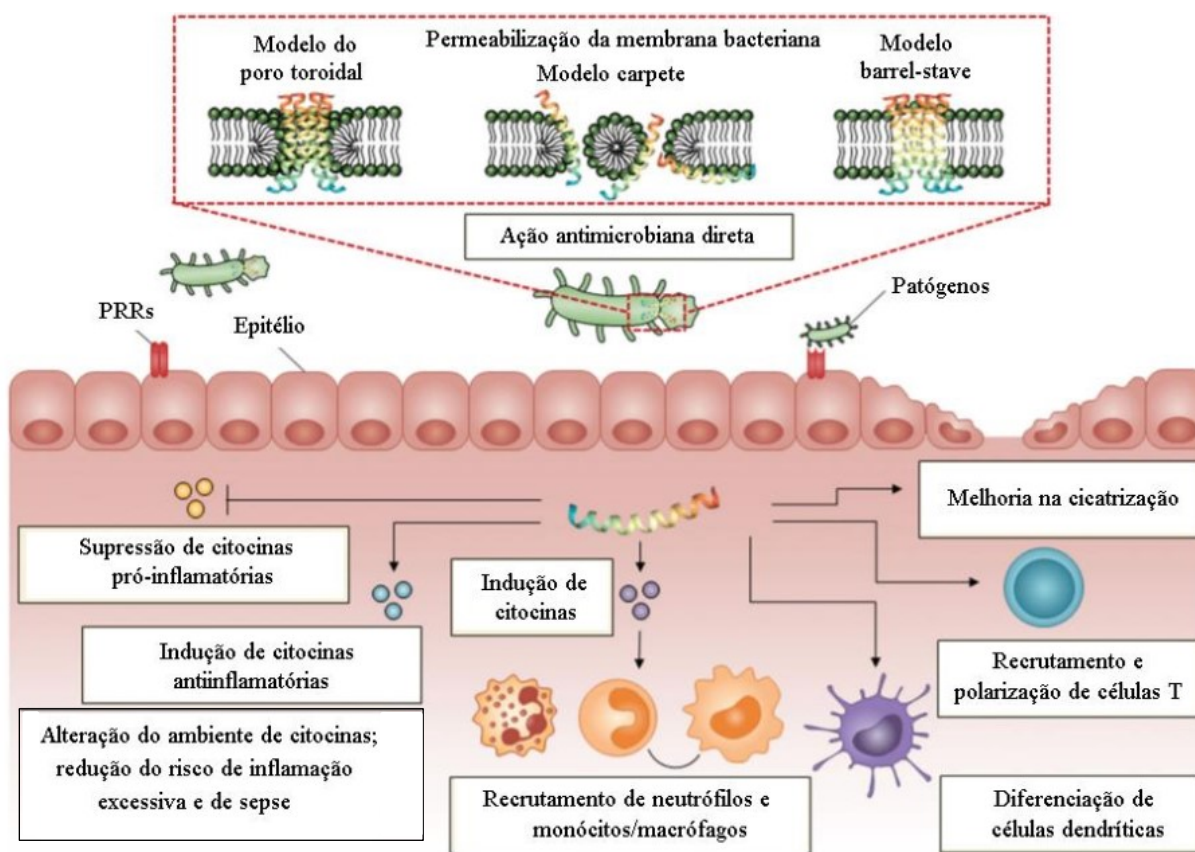
**Figura 8.** Principais mecanismos de resistência contra os PAMs. Fonte: PFALZGRAFF *et al.*, 2018 com modificações.

Resistência bacteriana aos PAMs pode ser selecionada devido à mudança de carga de superfície, enquanto a modificação seria em LPS nos Gram-negativos e ácido lipoteicoico em Gram-positivas, com isso há um aumento das cargas positivas, reduzindo assim a atração de PAMs (JOO *et al.*, 2016).

Modificações da composição fosfolipídica e alteração da estrutura da membrana citoplasmática, tais como amino-acilação de grupos de cabeça de fosfatidilglicerol, que mascara fosfatos aniônicos com aminas primárias catiônicas, diminui a atração de PAMs e a inserção deles na membrana. Além disso, bombas de efluxo presentes em bactérias Gram-negativas e fungos podem contribuir para a resistência aos PAMs. Os mecanismos de resistência que contribuem para a virulência *in vivo* são modificações estruturais da superfície celular e bombas de efluxo (BAUER, 2015). A resistência associada aos vírus pode ocorrer devido a mutações em glicoproteínas do envelope (ex., hemaglutinina do Influenza) reduzindo a afinidade pelos PAMs (ZHOU *et al.*, 2024).

### 1.8. PAMs com atividade imunomoduladora

Vários PAMs possuem atividade imunomoduladora. As diversas funções imunomodulatórias apresentadas por esses PAMs incluem a quimiotaxia aumentada de células do sistema imunológico, a ativação e diferenciação de células imunes, a repressão mediada por citocinas, a interação com receptores semelhantes aos de *Toll* (TLR) que resultam na liberação de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (ROS), a indução de citocinas anti-inflamatórias, a eliminação de endotoxinas bacterianas e a estimulação da angiogênese, contribuindo para a cicatrização de feridas (Figura 9) (PANTIC *et al.*, 2017).



**Figura 9.** Representação esquemática do modo de ação de PAMs ilustrando sua ampla gama de funções imunomoduladoras. Fonte: MAHLAPUU *et al.*, 2016.

Além disso, os sistemas imunológicos de anfíbios e mamíferos apresentam várias semelhanças em relação às funções da imunidade inata e adaptativa. Genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL)-1, IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e interferon (IFN)- $\gamma$ , estão presentes no genoma de *Xenopus tropicalis* (anteriormente *Silurana tropicalis*), e a ativação de macrófagos da pele em

resposta a patógenos extracelulares já foi documentada (JUSTYNA, 2017; PANTIC *et al.*, 2017).

### **1.9. Imunidade inata**

O sistema imunológico dos vertebrados é tradicionalmente classificado em imunidade inata e adaptativa. As células do sistema imunológico inato identificam patógenos e danos teciduais por meio de receptores de reconhecimento de padrões, que detectam diferentes padrões moleculares associados a patógenos e a danos (PAMPs). Os processos são rápidos, considerados não específicos e incluem respostas como fagocitose, movimentação celular, destruição 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 participam das respostas imunes adaptativas, que podem ser ativadas simultaneamente. Essas respostas adaptativas dependentes de linfócitos são mais lentas para se desenvolver, mas são específicas para antígenos e resultam em 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 são ativadas durante uma resposta inflamatória e se diferenciam em células efetivas de curta duração para combater a infecção. Os componentes não-hematopoiéticos incluem a pele e as células epiteliais que revestem os tratos gastrointestinal, geniturinário e respiratório. As defesas celulares são complementadas por componentes humorais, que incluem proteínas do complemento, como a proteína C-reativa, proteína de ligação a lipopolissacarídeo (LBP), pentraxinas, colectinas e peptídeos antimicrobianos, incluindo defensinas. As proteínas circulantes do sistema imunológico inato reconhecem microrganismos e auxiliam nos mecanismos para combater a infecção (KAUR & SECORD, 2021).

Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares e granulares que desempenham um papel fundamental no sistema imunológico inato. Nos seres humanos, eles representam de 50% a 70% de todos os leucócitos circulantes. Neutrófilos maduros na corrente sanguínea têm aproximadamente 7-10 µm de diâmetro, um núcleo segmentado e um citoplasma rico em grânulos e vesículas

secretoras. Eles são produzidos na medula óssea e, em seguida, liberados na circulação (ROSALES, 2020). A principal função dos neutrófilos é fagocitar microrganismos, especialmente aqueles opsonizados, e produtos de células danificadas, além de destruir esse material nos fagolisossomos (ABBAS & LICHTMAN, 2023).

Quando um patógeno ultrapassa as barreiras epiteliais, os neutrófilos são as primeiras células do sistema imunológico inato a serem rapidamente recrutadas da corrente sanguínea para os locais de infecção, trazendo consigo um arsenal antimicrobiano para combater a infecção. Eles utilizam uma combinação de espécies reativas de oxigênio (ROS), componentes de grânulos citotóxicos, peptídeos antimicrobianos e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) para criar um ambiente altamente letal, crucial para a morte e degradação dos microrganismos invasores (TENG *et al.*, 2017).

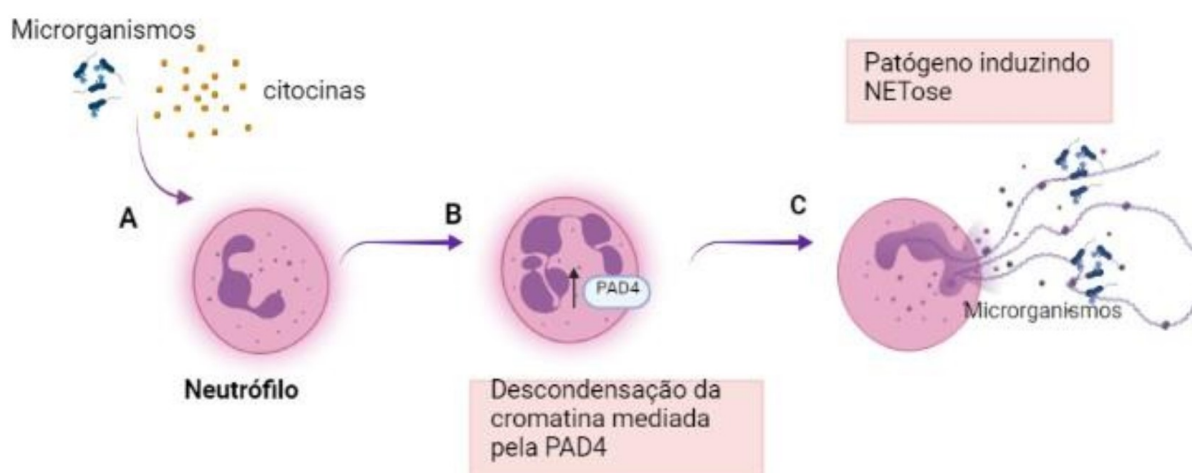
Durante uma infecção ou dano tecidual, padrões moleculares associados ao patógeno e/ou padrões moleculares de dano (DAMPs) são detectados por receptores de reconhecimento de padrões, que podem ativar células residentes para produzir mediadores inflamatórios, como as quimiocinas CXCL1 e CXCL2, que se ligam e ativam receptores acoplados à proteína G nos neutrófilos. Esses neutrófilos possuem uma variedade de mecanismos efetivos para combater patógenos, incluindo fagocitose, produção de proteases e armadilhas extracelulares (NETs). Portanto, a falha no recrutamento de neutrófilos para um local de infecção facilita a disseminação de patógenos em órgãos vitais e no sangue, podendo levar ao desenvolvimento de infecções sistêmicas e, eventualmente, à morte (CASTANHEIRA & KUBES, 2019).

#### **1.10. Fagocitose e armadilhas extracelulares por neutrófilos**

A habilidade dos neutrófilos em realizar fagocitose é o mecanismo empregado para eliminar agentes microbianos que conseguiram superar as barreiras físicas e químicas do epitélio. Esse processo, mediado por receptores, envolve a internalização de partículas maiores que 0,5  $\mu\text{m}$  em um vacúolo conhecido como fagossoma. Os neutrófilos identificam partículas que foram opsonizadas através de receptores de anticorpos ou do complemento, resultando em uma fagocitose eficiente (ROSALES, 2020).

Após serem ativados, os neutrófilos têm a capacidade de formar as "Neutrophil Extracellular Traps" (Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos - NETs) (Figura 10). As NETs são constituídas por fibras extracelulares que contêm grânulos intracitoplasmáticos ricos em elastase, lactoferrina e gelatinase, sendo o DNA (histonas e cromatina) o principal componente estrutural dessas redes (BRINKMANN & ZYCHLINSKY, 2012).

A formação de NETs ocorre por meio de um processo de morte celular conhecido como NETose. Essas armadilhas podem se aderir a microrganismos, proporcionando uma alta concentração local de moléculas antimicrobianas que ajudam a eliminar os patógenos e atuam como uma barreira para impedir sua propagação. A formação das NETs pode ser induzida por diversos sinais, incluindo produtos microbianos como o LPS. Para iniciar a NETose, os neutrófilos cessam seu movimento e despolarizam; em seguida, a membrana nuclear se rompe e a cromatina nuclear é liberada para o citoplasma (SILVA, 2015).



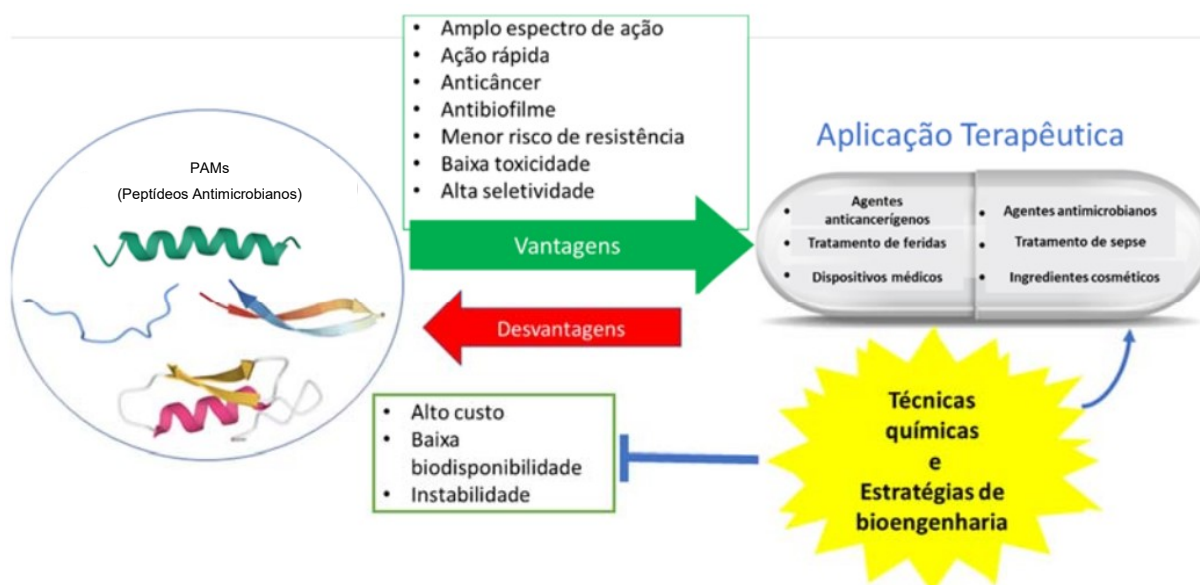
**Figura 10.** Formação de NETs. A) Neutrófilos são estimulados pelo contato com microrganismos ou seus produtos (citocinas), promovendo: B) mudanças ultraestruturais no núcleo com descondensação de cromatina mediada pela PAD4; C) liberação de estruturas extracelulares como histonas, proteínas granulares de neutrófilos e citoplasmáticas (NETs), que prendem e matam microrganismos. Fonte: SILVA, 2021.

### 1.11. Otimização de atividade antimicrobiana dos PAMS

Devido ao seu mecanismo único de ruptura de membrana, os peptídeos antimicrobianos evoluíram ao longo das gerações para se tornarem mais eficazes na defesa imunológica de seus hospedeiros. No entanto, os PAMs naturais enfrentam



uma série de desafios que dificultam sua aplicação farmacológica e clínica (PUENTES *et al.*, 2020), como alta citotoxicidade, instabilidade em pH extremos, curta meia-vida, degradação por proteases e falta de seletividade para linhagens específicas (TAN *et al.*, 2021). Assim, a utilização clínica dos PAMs naturais representa um grande desafio para a medicina contemporânea, devido aos aspectos biofísicos desfavoráveis que apresentam (Figura 11). Apesar disso, as estratégias de otimização têm como objetivo melhorar as propriedades biológicas e químicas desses PAMs para que possam ser utilizados de forma mais eficaz e comercialmente viável (LUONG *et al.*, 2020).



**Figura 11.** Representação gráfica da busca e desenvolvimento de PAMs farmacologicamente ativos. Fonte: LUONG *et al.*, 2020.

O desenho baseado em estrutura, também conhecido como *design* racional de peptídeos visa melhorar as propriedades físico-químicas de peptídeos naturais, potencializando os efeitos desejados e diminuindo os efeitos adversos, tais como baixa especificidade e atividade hemolítica, por exemplo. O desenho racional é uma técnica fundamental no desenvolvimento de novos antibióticos e medicamentos, relacionados com a remodelação da estrutura secundária (MISHRA *et al.*, 2017; TAN *et al.*, 2021).

### 1.12. Peptídeos antimicrobianos de anuros do gênero *Boana* como agentes terapêuticos

A família Hylidae é composta por anfíbios da ordem Anura, com espécies distribuídas por todos os continentes, exceto a Antártida, totalizando cerca de

1071 espécies descritas até o momento (FROST, 2024). O nome da família deriva do gênero *Hyla*, que faz referência a Hílas, o companheiro de Hércules na mitologia grega (DUELLMAN *et al.*, 2016).

Os membros dessa família são comumente chamados de "pererecas" e possuem adaptações específicas para um estilo de vida arbóreo, como olhos direcionados para a frente que proporcionam visão binocular e almofadas adesivas nos dedos das mãos e dos pés (figura 12). Em espécies que não habitam árvores, essas características podem ser bastante reduzidas ou mesmo inexistentes (ALMEIDA *et al.*, 2015). Além disso, esses anfíbios são reconhecidos como uma fonte promissora de PAMs (AZEVEDO CALDERON *et al.*, 2011).

Dentro da família Hylidae, estudos recentes identificaram diversos peptídeos antimicrobianos (PAMs) inéditos a partir de secreções cutâneas de anfíbios do gênero *Boana*, destacando seu potencial como agentes terapêuticos contra patógenos multirresistentes. Esses peptídeos apresentam características estruturais e mecanismos de ação variados, o que contribui para sua ampla atividade antimicrobiana (SANTANA *et al.*, 2020a; SANTANA *et al.*, 2020b; LISCANO *et al.*, 2021; MORÁN-MARCILLO *et al.*, 2022; FREITAS *et al.*, 2023; CONLON *et al.*, 2024).



**Figura 12.** Espécime adulto de *Boana crepitans*. Foto gentilmente cedida por Carlos José Correia de Santana.

Exemplos de PAMs isolados do gênero *Boana* incluem as pugninas, identificadas no transcriptoma de *Boana pugnax*, mostraram atividade antimicrobiana e anticâncer seletiva contra células de mama e próstata. Apesar do potencial

terapêutico, apresentaram citotoxicidade em queratinócitos humanos, indicando baixa seletividade para células normais e destacando a necessidade de otimização antes de aplicações clínicas (LISCANO *et al.*, 2021).

A rã *Boana picturata* revelou-se uma fonte promissora de peptídeos bioativos. Utilizando clonagem molecular e espectrometria de massas, foram identificadas três novas famílias: Picturinas (PTR), Pictuseptinas (PTS) e Boaninas (BNS). PTR e PTS foram sintetizados e testados, demonstrando atividade antimicrobiana e baixa hemólise. Pictuseptinas, especialmente PTS-1, mostraram alta eficácia contra *E. coli* e baixa toxicidade. A descoberta reforça a importância da biodiversidade equatoriana na busca por novas terapias contra a resistência antimicrobiana (MORÁN-MARCILLO *et al.*, 2022).

Recentemente, em *Boana raniceps*, foram isolados e caracterizados quatro peptídeos: as Figaininas 1 e 2 e as Raniseptinas 3 e 6. A Figainina 1 mostrou atividade contra bactérias, *T. cruzi* e células cancerosas, mas também apresentou citotoxicidade em células humanas (SANTANA *et al.*, 2020a). A Figainina 2 demonstrou estabilidade térmica, atividade antiparasitária, bacteriana e efeito imunomodulador em neutrófilos (SANTANA *et al.*, 2020b). Já as Raniseptinas 3 e 6 exibiram potente ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, baixa hemólise e citotoxicidade contra células tumorais murinas, reforçando o potencial terapêutico desses peptídeos multifuncionais (FREITAS *et al.*, 2023).

Cinco peptídeos isolados de *Boana platanera* apresentaram efeitos diversos: Raniseptin PL e Figainin 2PL foram bactericidas e citotóxicos com baixa hemólise; Hylin PL teve baixa ação antimicrobiana e alta hemólise; o peptídeo YL estimulou significativamente a liberação de insulina, destacando-se como potencial agente antidiabético (CONLON *et al.*, 2024).

## 2. JUSTIFICATIVA

A descoberta do primeiro antibiótico, a penicilina, permitiu que milhões de vidas fossem salvas, particularmente durante a Segunda Guerra Mundial. No entanto, o fácil acesso aos antibióticos e seu uso indiscriminado, promoveu a seleção de linhagens microbianas multirresistentes (AJULO *et al.*, 2024). Devido ao relevante aumento da resistência bacteriana em países em desenvolvimento, observa-se que as doenças infecciosas e os custos aumentam de acordo com o transcorrer da infecção. Com isso há uma necessidade de controle sobre os antimicrobianos utilizados, pois com a alta demanda de uso ocorre uma rápida adaptação do microrganismo frente aos mais novos antimicrobianos utilizados na prática clínica (MARTIN, 2018).

A secreção cutânea de anuros (rãs, sapos e pererecas) concentra um arsenal variado de peptídeos bioativos. Uma classe abundante desses peptídeos é representada pelos PAMs, peptídeos curtos que devido às suas características anfipáticas, são capazes de atuar eliminando vários microrganismos (MA *et al.*, 2023). Neste contexto, os peptídeos antimicrobianos advindo de recursos naturais atraíram muita atenção devido às suas propriedades favoráveis, entre elas, a ação rápida, a indução de atividade de amplo espectro antimicrobiano, e a falha em desencadear mecanismos de resistência em comparação com antimicrobianos convencionais. Além disso, estudos revelam que peptídeos antimicrobianos de origem animal combinados com antimicrobianos utilizados clinicamente poderiam ser alternativas para auxiliar o combate do problema da resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais (CONLON *et al.*, 2023).

Os PAMs podem ter sua atividade biológica original potencializada quando realizadas algumas alterações pontuais para agregar alguns benefícios. O desenho de moléculas permite diminuir as possíveis interações com as células dos seres humanos, pode-se aumentar a atividade biológica frente as linhagens microbianas, e com isso os PAMs se mostram como uma saída real para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (GARCÍA *et al.*, 2024).

Dentro desse contexto, o presente projeto justifica-se como uma fonte alternativa de PAMs frente à crise de antibióticos vigente.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Este projeto teve como objetivo geral propor e sintetizar quimicamente novos análogos do peptídeo antimicrobiano Bc77(K) isolado da secreção cutânea de *Boana crepitans* e avaliar: 1) seus efeitos antimicrobianos sobre diferentes patógenos (bactérias, fungos e vírus), 2) seus efeitos antiproliferativos em linhagens de células de mamíferos (HeLa e HaCaT) e 3) seus efeitos na ativação e quimiotaxia de neutrófilos humanos.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição de elementos de estrutura secundária dos peptídeos antimicrobianos por meio de dicroísmo circular
- Determinar os efeitos antimicrobianos sobre bactérias Gram-positivas, inclusive em linhagens multirresistentes e de cepas padrão;
- Determinar os efeitos antimicrobianos sobre bactérias Gram-negativas, inclusive em linhagens multirresistentes e de cepas padrão;
- Determinar os efeitos antimicrobianos sobre leveduras;
- Determinar os efeitos inibitórios sobre SARS-CoV-2;
- Determinar os efeitos antiproliferativos e citotóxicos sobre células de mamíferos (HeLa e HaCaT);
- Determinar os efeitos citolíticos sobre eritrócitos humanos;
- Determinar os efeitos inibitórios sobre linhagem bacteriana produtora de biofilme;
- Determinar a ativação e quimiotaxia de neutrófilos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes químicos

Em todos os experimentos, foram utilizados somente reagentes de grau analítico, provenientes de diferentes fontes comerciais. Todas as soluções foram preparadas com água Mili-Q (Millipore Reagent Water System USA).

### 4.2. Desenho racional e síntese química dos análogos de peptídeos antimicrobianos de *B. crepitans*

As estruturas primárias de peptídeos antimicrobianos de *B. crepitans* previamente isolados e caracterizados pelo grupo de “Tecnologia de Peptídeos Biologicamente Ativos” da Universidade de Brasília-UnB foram analisadas com vistas a se produzir mutações nas faces polares e apolares de tais moléculas visando à obtenção de análogos cujas atividades antibacteriana e antifúngica fossem mantidas ou aumentadas. O desenho racional foi realizado a partir do peptídeo selvagem Bc77(K) isolado de *Boana crepitans* por MÁRQUEZ, 2016 e cinco derivados foram produzidos por meio de síntese química por empresa especializada, sendo que dois dos análogos testados (análogos 1 e 2) tinham sido descritos por MÁRQUEZ, 2016.

### 4.3. Quantificação espectrofotométrica de peptídeos

Os peptídeos sintéticos foram dosados pelo método de determinação da concentração proteica por absorção ao UV. O material foi quantificado por leitura espectrofotométrica realizada em equipamento Bel Photonics modelo UV/VIS M51 e as leituras foram realizadas nos comprimentos de onda de 205, 215 e 225 nm.

As fórmulas para estimar a concentração dos peptídeos (em µg/mL) estão descritas a seguir:

$$\text{Concentração}_1 = 144 \times (A_{215} - A_{225})$$

$$\text{Concentração}_2 = (A_{205} / 31) \times 1000$$

Para obter a concentração da alíquota analisada foi calculada a média dos resultados das concentrações 1 e 2 para cada amostra (AITKEN e LEARMONTH, 2002). Após realizar as dosagens, cada peptídeo foi alíquotado para o volume de 1 mL em tubos tipo *ependorf* e, em seguida, secados em concentrador a vácuo.

#### 4.4. Linhagens microbianas utilizadas

Linhagens referenciais de bactérias, obtidas do Banco de Culturas do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília, foram utilizadas no presente trabalho: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 17666), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* (ATCC 1026), *Streptococcus agalactiae* (cepa clínica) e *Candida albicans* (ATCC 14053). As linhagens multirresistentes de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases (KPC), *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenens e *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenens foram obtidas do Banco de Culturas do Setor de Microbiologia do Hospital Universitário de Brasília – HUB.

#### 4.5. Avaliação da atividade antibacteriana

Linhagens referenciais de bactérias sem resistência e multirresistentes obtidas do Banco de Culturas do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília, foram cultivadas em placas contendo meios de cultura apropriados para cada estirpe bacteriana pelo período de 18-24h, a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . As bactérias, em fase logarítmica, foram diluídas no meio de cultura Mueller-Hinton caldo na proporção 1:200, foram inoculados 200  $\mu\text{L}$  das linhagens selecionadas em 6,8 ml de meio líquido Mueller-Hinton, foram realizadas leituras a 625 nm em espectrofotômetro (UV-VIS SPECTROPHOTOMETER UV-MS1), para avaliação da densidade óptica. As suspensões foram diluídas e ajustadas entre 0,08-0,1 de absorbância. Em seguida, os inóculos foram diluídos na proporção de 1:200 para todas as bactérias testadas (adaptado da norma CLSI, 2018). Para avaliação dos valores de CIM foram empregadas alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  (concentração inicial: 256  $\mu\text{M}$ ) previamente filtradas em filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millex GV, Millipore, Merck). As amostras foram diluídas em série e incubadas com 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de bactéria contendo aproximadamente de  $5 \times 10^5$  UFC (preparadas como descrito acima), durante um período de 24 h a  $37^\circ\text{C}$  em placas de micro titulação estéreis (96 poços, fundo chato), os controles para inibição de crescimento e crescimento pleno foram formaldeído 0,8% (v/v) e água Milli-Q, respectivamente, ambos incubados com as suspensões bacterianas.

Os poços com formaldeído foram cobertos com Parafilm® para evitar interferência nos demais poços em virtude da sua evaporação. Após a incubação, foi realizada a leitura do crescimento bacteriano a 620 nm em leitora de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA). A concentração inibitória mínima (CIM) foi assumida como sendo a menor concentração na qual não houve crescimento espectrofotometricamente detectável.

#### **4.6. Avaliação da atividade antifúngica**

Linhagem de *Candida albicans* ATCC 14053 (obtida do Banco de Culturas do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília-UnB) foi cultivada em placa contendo meio de cultura apropriado pelo período de 24 h, a  $35 \pm 2$  °C. As leveduras, em fase logarítmica, foram diluídas em meio RPMI 1640 caldo na proporção 1:2000, foram inoculados 200 µL da linhagem selecionada em 6,8 mL de meio líquido Mueller-Hinton, foi realizada leitura a 530 nm em espectrofotômetro (UV-VIS SPECTROPHOTOMETER UV-MS1), para avaliação da densidade óptica. A suspensão foi diluída e ajustada entre 0,08-0,1 de absorbância. Em seguida, o inóculo foi diluído na proporção de 1:2000 (adaptado da norma CLSI, 2018). Para avaliação dos valores de CIM foram empregadas alíquotas de 50 µL (concentração inicial: 256 µM) previamente filtradas em filtros de 0,22 µm (Millex GV, Millipore, Merck). As amostras foram diluídas em série e incubadas com 50 µL da suspensão de leveduras contendo aproximadamente de  $5 \times 10^2$  UFC (preparadas como descrito), durante um período de 24 h a 37 °C em placas de micro-titulação estéreis (96 poços, fundo chato), os controles para inibição de crescimento e crescimento pleno foram formaldeído 0,8% (v/v) e água Milli-Q, respectivamente, ambos incubados com as suspensões fúngicas. Os poços com formaldeído foram cobertos com Parafilm® para evitar interferência nos demais poços em virtude da sua evaporação. Após a incubação, foi realizada a leitura do crescimento das leveduras a 530 nm em leitora de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA). A concentração inibitória mínima (CIM) foi assumida como sendo a menor concentração na qual não houve crescimento espectrofotometricamente detectável.



#### **4.7. Ensaios sobre biofilme bacteriano**

##### **4.7.1. Inibição da formação do biofilme**

O ensaio sobre inibição de biofilme foi realizado e o biofilme corado com cristal violeta conforme protocolo descrito por Christensen *et al.*, 1985 com modificações (OMMEN *et al.*, 2017; URQUHART *et al.*, 2023). Para avaliar a atividade inibitória dos PAMs foi selecionada a bactéria formadora de biofilme *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 cultivada 7 mL de caldo de soja tríptico suplementado com 2,5 g/L de dextrose pH 7.3 a 37 °C até a densidade óptica igual a 1 em 620 nm em espectrofotômetro (UV-VIS Spectrophotometer UV-M51 Bel Photonics, Itália). Em fase logarítmica a suspensão de bactérias foi diluída na proporção de 1:100 para uma concentração final de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFUs. Os PAMs foram incubados em microplacas de 96 poços em diluição seriada e 50 µL da suspensão de bactérias foram adicionados para um volume final de 100 µL/poço. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas para formação e adesão do biofilme na placa. Os controles para ausência de crescimento utilizaram 50 µL formaldeído 0.8% (v/v) e 50 µL de água deionizada estéril como controle de crescimento pleno. Completado o tempo de incubação os sobrenadantes foram removidos e as placas foram lavadas 3 vezes com água destilada estéril para a remoção de bactérias planctônicas e 125 µL de cristal violeta 0,1% foram adicionados e incubados por 15 minutos, seguindo por nova remoção do sobrenadante e 3 lavagens com água destilada estéril para a remoção do excesso de cristal violeta. Por fim 125 µL de ácido acético 30% foram adicionados por 10 minutos para solubilizar o biofilme corado, o conteúdo dos poços foi transferido para uma nova microplaca e a absorbância foi medida pela leitura da densidade óptica a 570 nm com uma leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

##### **4.7.2. Ensaio de destruição de biofilme pré-formado (redução de biomassa)**

O ensaio de redução de biomassa consiste na destruição do biofilme previamente formado seguido a mesma metodologia aplicada acima, entretanto os PAMs não são adicionados à microplaca, permitindo o pleno crescimento do biofilme em todos os poços inoculados. Após as 48 horas de incubação, o sobrenadante é aspirado e as placas lavadas 3 vezes com água destilada, a placa então é seca a temperatura ambiente (27 °C) e 100 µL dos respectivos PAMs são adicionados em

concentrações iguais ao MIC, 2MIC e 4MIC, a placa é novamente incubada a 37 °C por 24 horas. Como controle de inibição são utilizados 100 µL de formaldeído 0,8%, para o controle de crescimento pleno são reservados poços onde o biofilme estabelecido não sofre nenhum tipo de tratamento. Passado o tempo de incubação a placa é novamente corada por cristal violeta seguindo a mesma metodologia acima citada. Todos os inóculos e controles são realizados em triplicata e os valores obtidos por leitor de placas a 570 nm.

#### 4.8. Avaliação da atividade hemolítica

Para o ensaio de avaliação da atividade hemolítica foi empregado o método descrito por (ONUMA *et al.*, 1999), com modificações. Eritrócitos humanos do tipo O<sup>+</sup>, oriundo de um doador saudável foi centrifugado e lavado quatro vezes com tampão Tris- HCl 10 mM pH 7,4 contendo NaCl 150 mM (tampão-salina) para remoção total de plasma. Em seguida, foi preparada uma suspensão a 1% (v/v) de eritrócitos. Alíquotas de 100 µL dos peptídeos foram ressuspensas em tampão-salina na concentração inicial de 256 µM e diluídos em série em placas de 96 poços de fundo U. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foi misturada às amostras e as placas foram incubadas por 60 min à temperatura de 37 °C. Após a incubação, as placas foram centrifugadas a 3.000rpm por 3 min. Alíquotas de 100 µL de cada sobrenadante foram transferidas para os poços de uma placa de 96 poços de fundo chato (Kasvi, Brasil) e foi realizada leitura espectrofotométrica a 405 nm em leitora de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA). Utilizou-se 100 µL da suspensão de eritrócitos a 1% (v/v) incubada com 100 µL de Triton X-100 1% (v/v) como referência de 100% de hemólise e 100 µL de suspensão de eritrócitos a 1% (v/v) incubada com 100 µL de tampão-salina como referência de 0% de hemólise.

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

Utilizando o programa GraphPad Prism v.5.04, foi possível calcular as concentrações capazes de promover 50% de hemólise e obter o gráfico resultante do experimento.

Todo procedimento adotado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

#### **4.9. Ensaio *High Content Screening* (SARS-CoV-2/Vero cells)**

##### **4.9.1. Preparação dos compostos**

Os peptídeos foram dissolvidos em PBS 1X estéril, em uma concentração inicial de 120  $\mu\text{M}$ . Antes de realizar o tratamento das células, os peptídeos foram diluídos em série (1:1) em PBS 1X, em uma placa de 384 poços. Em seguida, 10  $\mu\text{L}$  de cada poço foram transferidos para as placas de ensaio, tendo, portanto, um fator de diluição final de 6x. Os peptídeos foram testados em concentração-resposta, sendo 20  $\mu\text{M}$  a primeira concentração testada. O ensaio foi realizado em duplicata. Como controle, foi utilizada cloroquina.

##### **4.9.2. Descrição do ensaio**

Células Vero CCL-81 foram plaqueadas em placas de 384 poços. Após 24 horas, as células receberam os compostos conforme indicado acima e em seguida o vírus foi adicionado em uma multiplicidade de ensaio (MOI) de 0,1 partículas virais por célula. A concentração final de DMSO nas placas de ensaio foi 0,5% (v/v). Após 33 horas de ensaio SARS-CoV-2, as placas foram fixadas, a imunofluorescência foi realizada com soro de pacientes de covid-19 foi feita e as imagens foram adquiridas e analisadas pelo equipamento de HCS Operetta.

#### **4.10. Determinação da atividade antiproliferativa de células de mamíferos**

Para a avaliação da atividade antiproliferativa foram utilizadas as linhagens celulares de carcinoma cervical imortalizadas HeLa (ATCC CCL-2), bem como queratinócito normal adulto HaCaT (CVCL\_0038). As células foram cultivadas utilizando o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) com suplementação de 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, ambas linhagens foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Para manutenção das garrafas de cultura celular, os meios eram trocados a cada 48 horas até atingirem um estado de confluências para realização dos experimentos.

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

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

#### **4.11. Ativação de neutrófilos**

##### **4.11.1. Coleta de sangue**

As células foram obtidas de doadores masculinos hígidos, com idades entre 18 e 38 anos, os quais assinaram o termo de consentimento informando que atendem os critérios de elegibilidade: não fumantes; sem condições crônicas de saúde; sem histórico de condições inflamatórias nos últimos 14 dias. A coleta de sangue foi realizada por punção venosa periférica com seringa de 10 mL previamente heparinizada com 0,3 mL de heparina (5000 IU/mL). Protocolo seguido conforme descrito por LUZ *et al.*, 2023. Todo o procedimento adotado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

#### **4.12. Separação de neutrófilos**

Os polimorfonucleares foram isolados por meio da centrifugação de gradiente de densidade seguido por lise de hemácias residuais por hipotonicidade do meio. Ao final das hemólises, obteve-se pureza e viabilidade >97%. Protocolo seguido conforme descrito por LUZ *et al.*, 2023.

#### **4.13. Análise de ativação de neutrófilo por citometria de fluxo**

Para realização dos testes de citometria de neutrófilos as amostras foram ressuspensas em 100 vezes o volume do CIM, no caso foram escolhidos os CIMs de 8 µM para o peptídeo Bc77(K), 4 µM para o análogo 1 e 2 µM para o análogo 2. As células foram separadas por gradiente de densidade de Percoll com concentrações de 60% e 70%, em seguida foram lavadas 2 vezes para retirada do Percoll da amostra e hemólise para retirada das hemácias residuais. As células foram ajustadas para 6.667 cell/µL e alíquotas contendo 91 µL foram separadas para análise de citometria, em seguida foi adicionada 0,91 µL de solução contendo fMLP (N-Formilmetionil-leucil-

fenilalanina), após a adição os tubos foram incubados por 1 h à 37°C. Ao término da incubação as amostras foram centrifugadas 1.600 rpm por 5 min à 19°C, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas duas vezes com 500 µL de PBS gelado. As amostras foram observadas com equipamento BD FACSVerse™ Cell Analyzer (BD Biosciences), os parâmetros escolhidos foram 10.000 eventos com flow rate médio, os canais escolhidos FSC 240, SSC 340 e FITC 260, inicialmente foi escolhido um gráfico de densidade para escolher a melhor range de células, e as amostras foram analisadas.

#### **4.14. Determinação de quimiotaxia de neutrófilos em tempo real**

Os ensaios de detecção da quimiotaxia de neutrófilos foi realizado utilizando-se o sistema de análise celular em tempo real (RTCA) que detecta a diminuição da impedância, para a realização deste ensaio foi utilizado o equipamento xCELLigence RTCA-DP (ACEA Biosciences Inc.) acoplado nas placas de invasão e migração celular (CIM-Plate 16; ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA). Para a obtenção dos neutrófilos foi-se utilizado a mesma metodologia já supracitado, para determinação da migração dos neutrófilos foi padronizado a dose de 8 µM para o peptídeo Bc77(K), 4 µM para o análogo 1 e 2 µM para o análogo 2, como quimiotático positivo foi utilizado fMLP (N-Formilmetionil- eucil-fenilalanina) e para controle negativo foi utilizado HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). A placa foi montada com a câmara inferior contendo 160 µL de amostra, fMLP 100 nM (controle positivo) e HBSS (controle negativo) todo ensaio foi realizado em duplicata. Em seguida, a câmara superior foi travada com a parte inferior onde foi acrescentado 25 µL de HBSS em todos os poços, e incubada a temperatura ambiente por 60 minutos, antes dos neutrófilos serem adicionados, após o período de incubação alíquotas de 60 µL de células contendo 6.667 cell/µL suspensas foram adicionadas na parte superior da placa. A análise foi programada para medição do índice celular a cada 60 segundos durante 3 horas, as aquisições dos dados de índice celular (IC) foram obtidas e analisadas com auxílio do software xCELLigence RTCA (ACEA Biociências).

De acordo com a tabela 1, a solução quimiotática foi colocada na câmara inferior e a suspensão de células foi colocada na câmara superior. Segue abaixo descrição das condições e das câmaras. O símbolo ">", neste contexto, pode ser interpretado como "migrando para".

**Tabela 1.** Condições do ensaio de migração celular por análise de células em tempo real (RTCA).

Condição	Câmara inferior	Câmara superior
<b>Suspensão de células &gt; HBSS</b>	Solução de HBSS	Suspensão de células
<b>Suspensão de células &gt; fMLP</b>	Solução de fMLP	Suspensão de células
<b>Suspensão de células &gt; Peptídeo</b>	Solução de Peptídeo	Suspensão de células
<b>Suspensão de células + Peptídeo &gt; fMLP</b>	Solução de fMLP	Suspensão de células + Peptídeo
<b>Suspensão de células + fMLP &gt; Peptídeo</b>	Solução de Peptídeo	Suspensão de células + fMLP

#### 4.15. Dicroísmo circular

A análise de estruturas secundárias foi estimada por dicroísmo circular (DC), utilizando-se o espectropolarímetro Jasco, modelo J-815 (Jasco instrumentos, Japão) equipado com sistema de controle de temperatura Peltier, conectado à uma bomba de água (Instrumentos analíticos, Japão). Os espectros dicroicos foram obtidos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm, na faixa de comprimento de onda distantes da luz UV (190 – 260 nm) com intervalos de 0,2 nm, taxa de escaneamento de 100 nm/min, tempo de resposta de 0,5 segundos e largura da banda de 0,85 nm, na temperatura de 25 °C. Os resultados foram analisados no software Spectra Manager II.

A partir de soluções peptídicas a 50 µM em água e a 50 µM em dodecilsulfato de sódio (SDS, Amershan Biosciences) a 35 mM, foram gerados os espectros dicroicos em água e em SDS do peptídeo Bc77(K) e os 5 análogos. As elipticidades observadas foram convertidas em elipticidade molar utilizando a seguinte equação:

$$[\theta] = \frac{(\theta \times 100 \times M)}{(C \times \ell \times n)}$$

Onde  $\theta$  é a elipticidade em graus,  $\ell$  é o comprimento do caminho óptico em cm,  $C$  é a concentração em mg/mL,  $M$  é a massa molecular e  $n$  é o número de resíduos existentes na proteína. A elipticidade molar média  $[\theta]$  é dada em grau.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>.

Os percentuais de helicidade foram calculados a partir das elipticidades molares a 208 nm.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análogos do PAM Bc77(K) de *Boana crepitans*

No presente trabalho, foram avaliadas as propriedades antimicrobianas, antivirais, antitumorais e citolíticas de cinco análogos derivados do PAM Bc77(K) cuja sequência primária é  $^1\text{FLGAILPALAGAIGSLIK}^{18}.\text{CONH}_2$ , previamente identificado por MÁRQUEZ (2016) em seu trabalho de doutoramento. Tais análogos foram denominados pelos respectivos números arábicos conforme foram sendo propostos, com suas modificações visando aumentar a cationicidade e sua interação com as membranas bacterianas. Por questões de proteção da propriedade intelectual, a estratégia racional voltada ao desenho dos análogos e suas estruturas primárias não serão apresentadas no presente estudo. Ao longo do trabalho, serão utilizadas as seguintes denominações: peptídeo selvagem será nomeado Bc77(K), os análogos propostos por MÁRQUEZ (2016) e avaliados no presente estudo serão referenciados como análogos 1 e 2 e os demais análogos serão denominados análogos 3, 4 e 5.

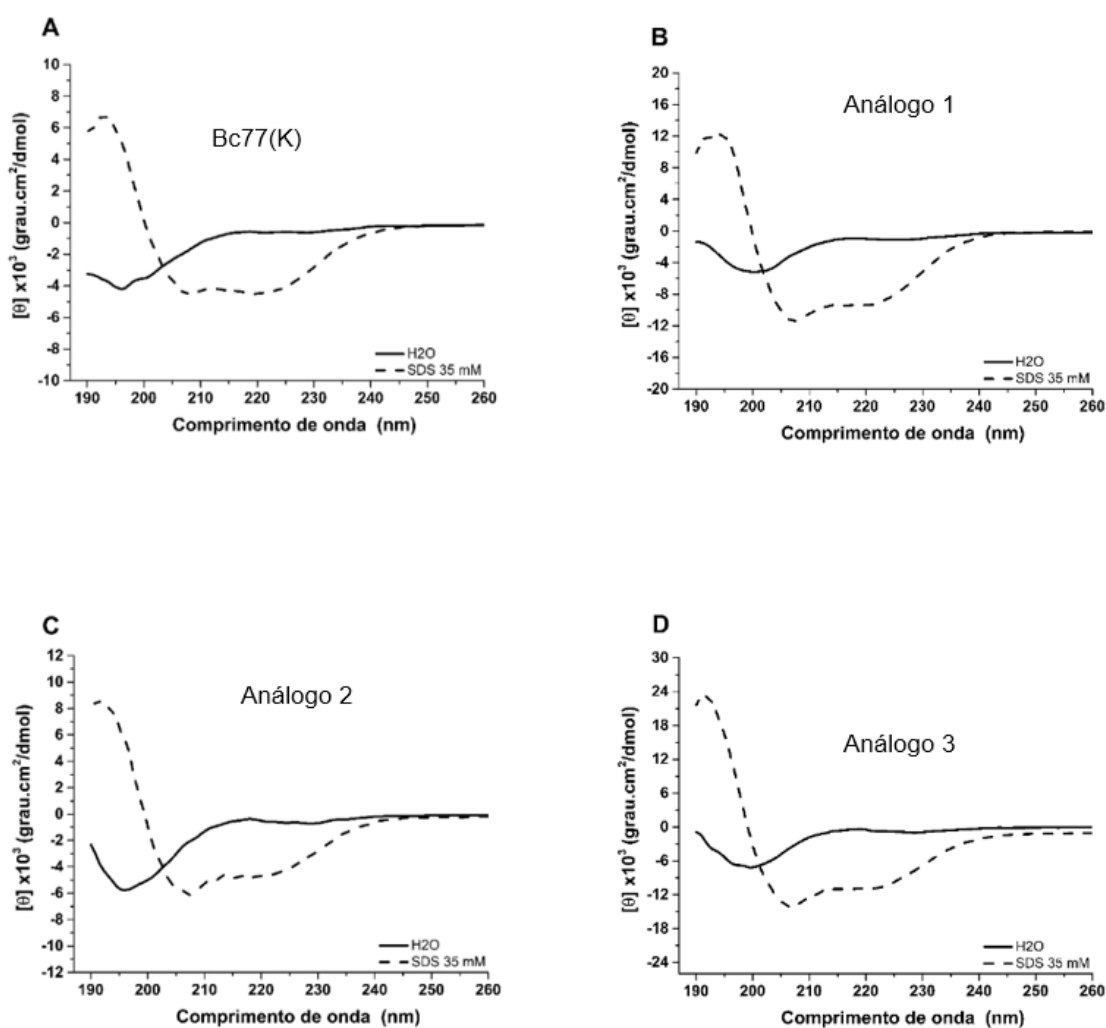
### 5.2. Análises por dicroísmo circular (DC)

A composição de elementos de estrutura secundária dos peptídeos Bc77(K) e dos análogos 1 a 5 foi avaliada por dicroísmo circular (DC). Os ensaios foram realizados em uma cubeta de 0,1 cm e os peptídeos Bc77(K), (0,38 mg/mL), análogo 1 (0,34 mg/mL), análogo 2 (0,27 mg/mL), análogo 3 (0,28 mg/mL), análogo 4 (0,34 mg/mL) e análogo 5 (0,38 mg/mL) foram preparados em água milli-Q e na presença do surfactante aniônico, dodecilsulfato de sódio (SDS), a 35 mM (m/v) e temperatura de 25°C.

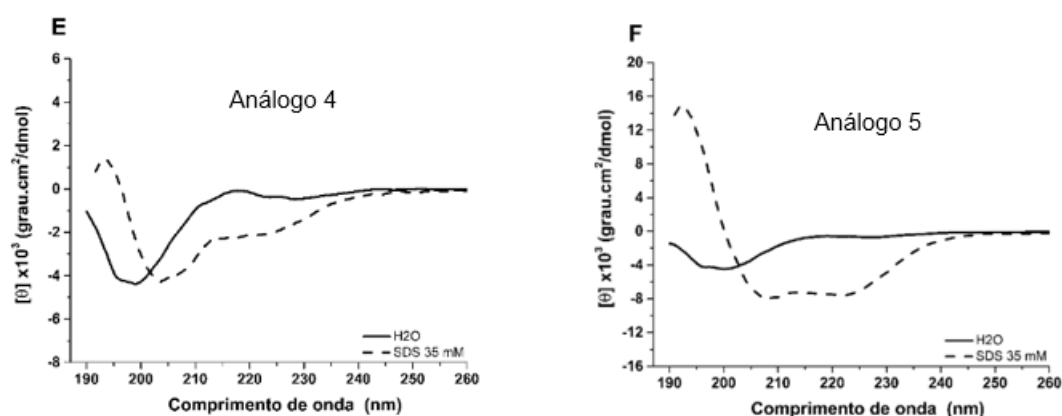
As análises experimentais por dicroísmo circular permitiram investigar os elementos de estrutura secundária presentes nos peptídeos em estudo. Os espectros dicróicos indicam que todos os peptídeos adotam conformação em  $\alpha$ -hélice quando na presença de SDS. No entanto, quando diluídos em água Milli-Q, sua estruturação torna-se desordenada. Essas características similares podem estar relacionadas com suas estruturas primárias semelhantes.

Os perfis do espectro dicróico do peptídeo Bc77(K) e dos análogos 1 a 5 obtidos em água a 25°C apresentaram uma banda dicróica negativa em 200 nm, correspondendo a moléculas com estrutura secundária do tipo desordenada em solução aquosa (Figura 13). Entretanto, na presença de surfactantes, como dodecil

sulfato de sódio (SDS) ou trifluoretanol (TFE), alguns peptídeos tendem a se estruturar, assumindo majoritariamente uma conformação em  $\alpha$ -hélice, com sinal dicróico negativo nas regiões de 208 nm e 222 nm e positivo na região de 190 nm (KRITTANAI e JOHNSON, 2000). Para os peptídeos em estudo, os espectros dicróicos obtidos na presença de SDS (35  $\mu$ M) mostraram deslocamento da banda dicróica negativa de 200 nm, para as regiões de 208 nm e 222 nm, com valores de  $[\theta]_{208\text{nm}}$  variando entre -4.000 e -12.000 grau.cm<sup>2</sup>/dmol, e uma banda dicróica positiva acentuada em 190 nm (Figura 13, A-F). Esses resultados indicam que, na presença de SDS, os peptídeos assumiram uma conformação de estrutura secundária majoritária em  $\alpha$ -hélice, com maior estruturação observada para o análogo 1 (Figura 13, B) e análogo 3 (Figura 13, D).







**Figura 13.** Espectros dicróicos na região distante da UV de peptídeos em água (linha sólida) e SDS 35 mM (linha pontilhada). **(A)** Bc77(K), **(B)** análogo 1, **(C)** análogo 2, **(D)** análogo 3, **(E)** análogo 4 e **(F)** análogo 5.

A helicidade do peptídeo Bc77(K) e dos análogos 1 a 5 foi calculada considerando o valor da elipticidade molar a  $\lambda_{208}$  nm na presença de SDS 35 mM (Tabela 2). O percentual calculado para os peptídeos analisados por DC evidenciou que os análogos 1 e 3 apresentaram maior percentual de  $\alpha$ -hélice, destacando-se o peptídeo análogo 3, com percentual de  $\alpha$ -hélice em 47,8% na presença de SDS, conforme mostrado na Tabela 3. Estes resultados sugerem que os análogos 1 e 3 apresentam maior potencial para estruturação em modelos de membranas.

**Tabela 2.** Helicidade calculada dos peptídeos Bc77(K) e de seus análogos na presença de SDS (35 mM) a 25 °C.

$\alpha$ -Hélice (%)	
Peptídeos	SDS
Bc77(K)	23,0
Análogo 1	41,5
Análogo 2	27,2
Análogo 3	47,8
Análogo 4	20,9
Análogo 5	32,1

### 5.3. Efeitos antimicrobianos sobre bactérias Gram-negativas linhagem padrão

Foram realizados ensaios para avaliação da capacidade antimicrobiana do PAM Bc77(K) e seus análogos sobre linhagens padrão de bactérias Gram-negativas sendo elas *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 17666), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Escherichia coli* (ATCC 35218), obtendo os resultados apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Efeitos antimicrobianos do peptídeo Bc77(K) e de seus análogos sobre microrganismos Gram-negativos de linhagem padrão.

Microrganismo	Bc77(K)	Análogo 1	Análogo 2	Análogo 3	Análogo 4	Análogo 5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	>128 µM	>128 µM	32 µM	>128 µM	>128 µM	>128 µM
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (ATCC 17666)	>128 µM	>128 µM	64 µM	NT	NT	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853)	>128 µM	>128 µM	64 µM	>128 µM	>128 µM	>128 µM
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	64 µM	128 µM	2 µM	>128 µM	>128 µM	>128 µM
<i>Escherichia coli</i> (ATCC35218)	128 µM	>128 µM	2 µM	>128 µM	>128 µM	>128 µM

NT: não testado

Das linhagens avaliadas por MÁRQUEZ, 2016, acerca do peptídeo Bc77(K), as linhagens de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) não apresentaram sensibilidade a nenhuma concentração testada.

Realizando o ensaio com *Escherichia coli* (ATCC 25922) visualizou-se a redução de 1 CIM e uma leve atividade quando testado frente a linhagem *Escherichia coli* (ATCC 35218) somente na maior concentração. Contudo ao analisarmos as demais linhagens de bactérias Gram-negativas, não obtivemos sensibilidade, mesmo nas maiores concentrações testadas.

Analisando o desempenho dos análogos, o análogo 1 obteve uma leve ação frente à linhagem *Escherichia coli* (ATCC 25922), porém quando comparada com o peptídeo Bc77(K) observa-se que houve um aumento da CIM, entretanto o análogo 2 apresentou redução de 1 CIM para as linhagens de *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 17666) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), diminuição de 2 CIMs para a linhagem de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), e ainda apresentou diminuição de 7 CIMs para as linhagens *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Escherichia coli* (ATCC 35218). Os análogos 3, 4 e 5, não apresentaram nenhuma atividade mesmo nas maiores concentrações testadas.

#### 5.4. Efeitos antimicrobianos sobre bactérias Gram-positivas linhagem padrão

Foram realizados ensaios para avaliação da capacidade antimicrobiana do peptídeo Bc77(K) e seus análogos sobre linhagens padrão de bactérias sendo elas *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 1026), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Streptococcus agalactiae* (cepa clínica) obtendo os resultados apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Efeitos antimicrobianos do peptídeo selvagem Bc77(K) e de seus cinco análogos sobre microrganismos Gram positivos de linhagem padrão.

<b>Microrganismo</b>	<b>Bc77(K)</b>	<b>Análogo 1</b>	<b>Análogo 2</b>	<b>Análogo 3</b>	<b>Análogo 4</b>	<b>Análogo 5</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC29213)	4 µM	2 µM	2 µM	>128 µM	NT	NT
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)	32 µM	128 µM	32 µM	>128 µM	>128 µM	>128 µM
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC1026)	32 µM	128 µM	8 µM	>128 µM	>128 µM	>128 µM
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC29212)	128 µM	>128 µM	128 µM	NT	NT	NT

<i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i> (cepa clínica)	32 $\mu$ M	32 $\mu$ M	32 $\mu$ M	NT	NT	NT
---	------------	------------	------------	----	----	----

NT: não testado

Das linhagens avaliadas por MÁRQUEZ, 2016, apenas a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foram sensíveis ao peptídeo Bc77(K) na concentração de 32  $\mu$ M, contudo neste estudo observou-se uma CIM para *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) diferente da encontrada, sendo a CIM apresentando uma leve atividade em sua maior concentração. Entretanto ao testar-se o peptídeo frente a outras linhagens puderam-se observar redução de 3 CIM para as linhagens *Streptococcus agalactiae* (cepa clínica), *Staphylococcus aureus* (ATCC 1026), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e ao analisarmos o peptídeo frente à linhagem de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) observa-se uma diminuição de 6 CIM.

Analisando o desempenho dos análogos, o análogo 1 exibiu ausência de atividade frente à linhagem de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), uma leve atividade frente às linhagens *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 1026) mesmo em sua maior concentração testada, para a linhagem de *Streptococcus agalactiae* (cepa clínica) obteve-se uma redução de 3 CIM. Contudo sua melhor atividade demonstra-se frente à linhagem de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) onde observa-se uma diminuição de 7 CIM. O análogo 2 demonstra atividades diferentes do anterior iniciando com uma discreta atividade frente à *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), quando avalia-se com as linhagens *Streptococcus agalactiae* (cepa clínica) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) visualiza-se uma diminuição de 3 CIM, quando avaliado contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 1026) evidencia-se uma diminuição de 5 CIM, e sua melhor atividade frente às linhagens de bactérias Gram-positivas se mostra na linhagem de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) onde observa-se a diminuição de 7 CIM.

Os análogos 3, 4 e 5, não apresentaram nenhuma atividade mesmo nas maiores concentrações testadas.

### 5.5. Efeitos antimicrobianos sobre bactérias multirresistentes

Foram realizados ensaios para avaliação da capacidade antimicrobiana do peptídeo Bc77(K) e três de seus análogos sobre linhagens multirresistentes sendo elas *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases (KPC), *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenens (cepa clínica) e *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenens (cepa clínica) obtendo os resultados apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Efeitos antimicrobianos do peptídeo selvagem Bc77(K) e de seus análogos sobre microrganismos multiessistentes.

<b>Microrganismo</b>	<b>Bc77(K)</b>	<b>Análogo 1</b>	<b>Análogo 2</b>	<b>Análogo 3</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) cepa clínica	4 µM	2 µM	2 µM	>128 µM
<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenens (KPC) cepa clínica	128 µM	>128 µM	8 µM	>128 µM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente aos carbapenens (cepa clínica)	>128 µM	>128 µM	>128 µM	>128 µM
<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente aos carbapenens (cepa clínica)	64 µM	16 µM	2 µM	64 µM

Analisando o desempenho de todos os peptídeos frente à linhagem bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenens (cepa clínica) visualizou-se que nenhum demonstrou atividade.

Ao analisarmos contra a linhagem de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenens (KPC) cepa clínica, o peptídeo Bc77(K) obteve uma discreta atividade, porém o análogo 2 demonstrou-se ser mais ativo atingindo uma redução de 5 CIM. Os análogos 1 e 3 não apresentaram atividade.

Quando considerada a atividade frente ao *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenens (cepa clínica), observa-se uma atividade nos peptídeos Bc77(K) e análogo 3 com diminuição de 1 CIM, quando observamos o análogo 1 vê-se diminuição de 3 CIM, e a melhor atividade foi observada no análogo 2 com uma redução de 7 CIM.

Ao avaliar a única linhagem resistente de bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA) visualizamos que o análogo 3 não teve nenhuma atividade, o peptídeo Bc77(K) teve uma atividade considerável com redução de 6 CIM, porém os análogos 1 e 2 tiveram um desempenho ainda melhor com redução de 7 CIM.

### 5.6. Efeitos antimicrobianos sobre fungos de linhagem padrão

Foram realizados ensaios para avaliação da capacidade antiproliferativa do peptídeo Bc77(K) e seus análogos sobre linhagem padrão de *Candida albicans* (ATCC 14053) obtendo os resultados apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Efeitos antimicrobianos do peptídeo selvagem Bc77(K) e de seus cinco análogos sobre a levedura *Candida albicans*.

<b>Microrganismo</b>	<b>Bc77(K)</b>	<b>Análogo 1</b>	<b>Análogo 2</b>	<b>Análogo 3</b>	<b>Análogo 4</b>	<b>Análogo 5</b>
<i>Candida albicans</i> (ATCC14053)	32 µM	>128 µM	2 µM	32 µM	>128 µM	>128 µM

Analisando o desempenho dos análogos, conseguiu-se uma diminuição de 2 CIM com os peptídeos Bc77(K) e análogo 3, contudo a melhor atividade foi com o análogo 2 onde apresentou redução de 7 CIM, os análogos 1, 4 e 5 não apresentaram atividade.

### 5.7. Compilação dos resultados dos ensaios antimicrobianos

Compilado de todas as tabelas para melhor compreensão e comparação entre os resultados das atividades antiproliferativas sobre microrganismos, apresentado na tabela 7.

**Tabela 7.** Compilado de todos os ensaios antimicrobianos realizados.

	CIM (μM)														
PAMs	Kp	Sm	Pa	Ec	Ec35	Sa29	Sa25	Sa10	Ef	Sa	MRSA	KPC	PMDR	AMDR	Ca
Bc77(K)	>128	>128	>128	64	128	4	32	32	128	32	4	128	>128	64	32
Análogo1	>128	>128	>128	128	>128	2	128	128	>128	32	2	>128	>128	16	>128
Análogo2	32	64	64	2	2	2	32	8	128	32	2	8	>128	2	2
Análogo3	>128	NT	>128	>128	>128	>128	>128	>128	NT	NT	>128	>128	>128	64	32
Análogo4	>128	NT	>128	>128	>128	NT	>128	>128	NT	NT	NT	NT	NT	NT	>128
Análogo5	>128	NT	>128	>128	>128	NT	>128	>128	NT	NT	NT	NT	NT	NT	>128

CIM = Concentração inibitória mínima; PAMs = Peptídeos antimicrobianos; Kp = *Klebsiella pneumoniae* (ATCC700603); *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC17666); Pa = *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); Ec = *Escherichia coli* (ATCC25922); Ec35 = *Escherichia coli* (ATCC35218); Sa29 = *Staphylococcus aureus* (ATCC29213); Sa25 = *Staphylococcus aureus* (ATCC25923); Sa10 = *Staphylococcus aureus* (ATCC1026); Ef = *Enterococcus faecalis* (ATCC29212); Sa = *Streptococcus agalactiae* (cepa clínica); MRSA = *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA); KPC = *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases (KPC) cepa clínica; PMDR = *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenens (cepa clínica); AMDR = *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenens (cepa clínica); Ca = *Candida albicans* (ATCC14053); NT = não testado.

### 5.8. Ensaio High Content Screening (SARS-CoV-2/Vero cells)

A atividade antiviral das amostras foi avaliada pela determinação do número total de células e o número total de células infectadas onde a redução de células infectadas corresponde ao percentual de atividade antiviral do composto. A partir dos controles infectado e não infectado, a atividade de cada um dos compostos foi normalizada, assim como a taxa de sobrevivência celular, apresentado na Tabela 8.

**Tabela 8.** Resumo dos resultados dos efeitos dos peptídeos sobre SARS-CoV-2.

Composto	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	SI ( $\mu$ M)	Atividade Máxima (%)
Cloroquina	<0,10	60,04	>600,4	95

<b>Bc77(K)</b>	2,54	1,26	0,5	61
<b>Análogo 1</b>	ND	0,26	ND	-13
<b>Análogo 2</b>	>20,00	0,29	0,0	10
<b>Análogo 3</b>	ND	>20,00	ND	-17
<b>Análogo 4</b>	ND	>20,00	ND	-11
<b>Análogo 5</b>	ND	>20,00	ND	3

ND: indica que o valor não foi passível de determinação para o parâmetro avaliado.

Valor  $EC_{50}$ : concentração da amostra que causa uma redução de 50% na infecção viral, em comparação com controles infectados.

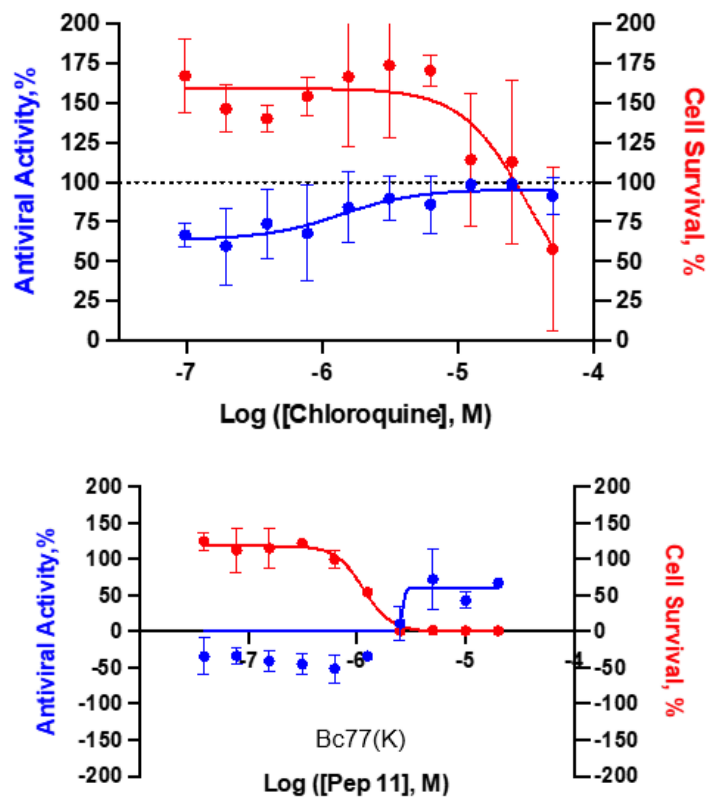
Valor  $CC_{50}$ : concentração da amostra que causa uma redução de 50% na sobrevivência celular, em comparação com controles infectados.

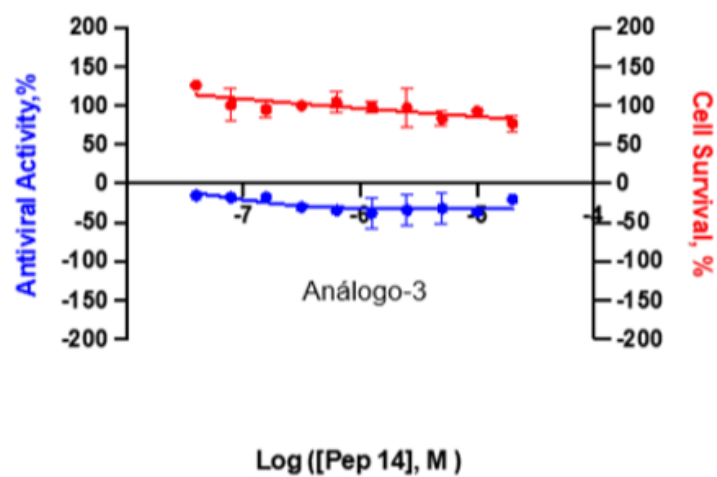
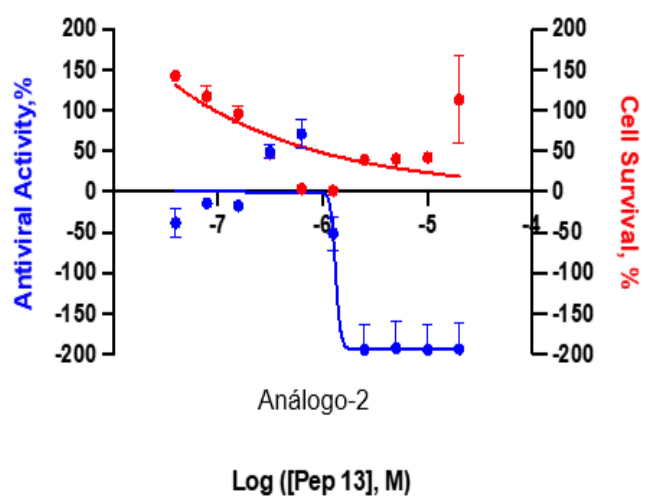
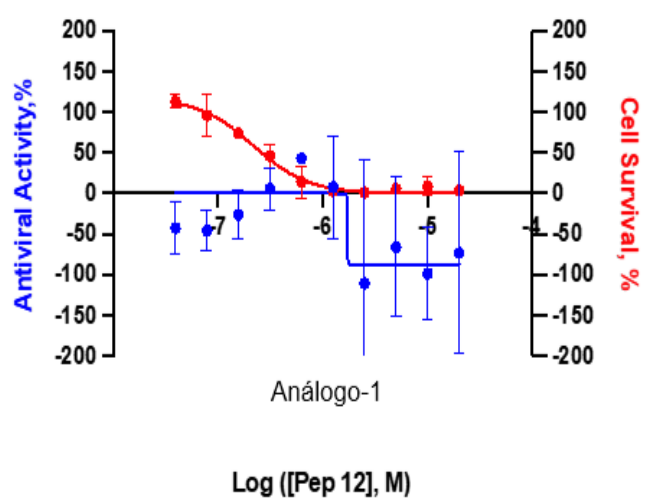
SI: Índice de Seletividade é a relação entre  $CC_{50}$  e  $EC_{50}$  ( $CC_{50}/EC_{50}$ ). É uma estimativa da seletividade do composto em relação ao vírus.

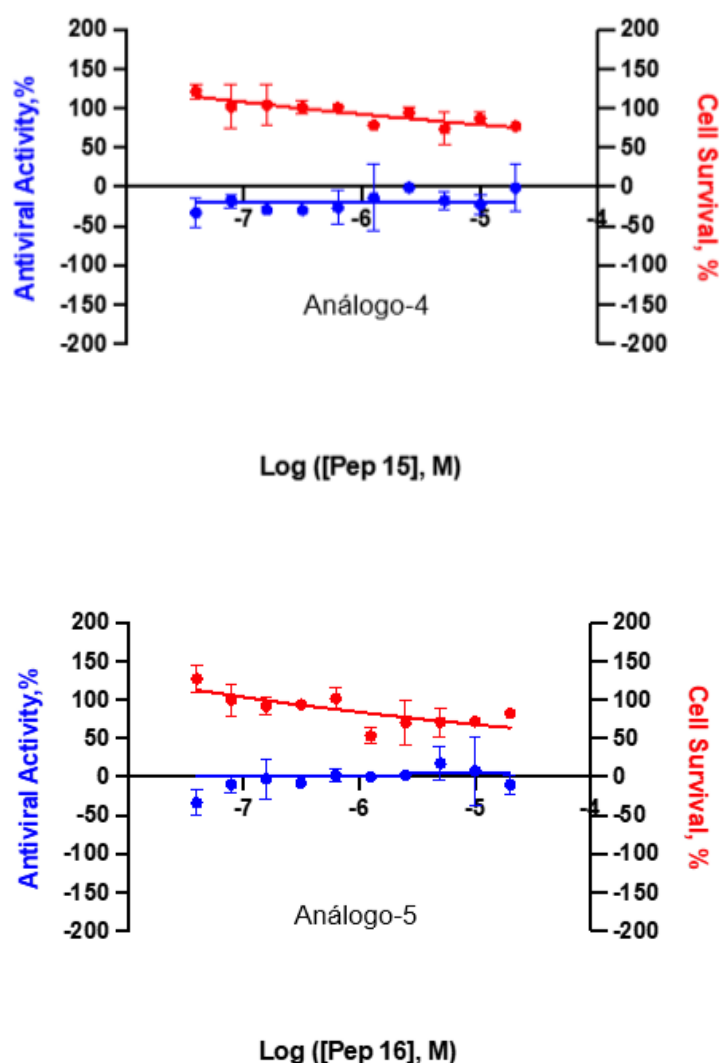
Atividade Máxima: É a inibição máxima da infecção observada para uma amostra, em comparação com os controles.



As curvas de viabilidade celular e de atividade antiviral estão apresentadas na figura 14.







**Figura 14.** Efeitos da cloroquina (controle positivo), do Bc77(K) e de seus análogos 1, 2, 3, 4 e 5 sobre a proliferação de células (linha vermelha) e do vírus Sars-cov-2 (linha preta). O eixo X representa a concentração do peptídeo, em escala logarítmica. O eixo Y da esquerda mostra a atividade viral normalizada (em relação aos controles) e o da direita a citotoxicidade.

De maneira geral, o peptídeo Bc77(K) e seus análogos não exibiram efeitos antivirais relevantes, seja por se mostrarem citotóxicos sobre as células hospedeiras (células Vero) no caso do peptídeo selvagem e dos análogos 1 e 2, seja pela ausência de efeitos sobre a multiplicação do vírus, caso dos análogos 3, 4 e 5.

O coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) utiliza várias proteases do hospedeiro para clivar a proteína spike (S) para entrar nas células do hospedeiro. A proteína S do SARS-CoV-2 é clivada em subunidades S1 e S2 pela furina, que está intimamente envolvida na patogenicidade do SARS-CoV-2. Geralmente, o SARS-CoV-2 do tipo selvagem entra nas células Vero pela rota de endocitose dependente de CTSL. Foi relatado que o SARS-CoV-2 adaptado às

células VeroE6 usa CTSL de forma relativamente mais eficaz do que outras proteases (MINAMI *et al.*, 2024).

Devido ao papel essencial da proteína S em infecções virais, as vacinas têm como alvo apenas a proteína S (por exemplo, vacinas de mRNA e vetor viral) são eficazes e amplamente utilizadas. No entanto, a proteína S é frequentemente mutada para escapar de anticorpos neutralizantes. A imunização com a vacina atual pode não proteger contra a infecção pelas variantes emergentes do SARS-CoV-2 (MINAMI *et al.*, 2024).

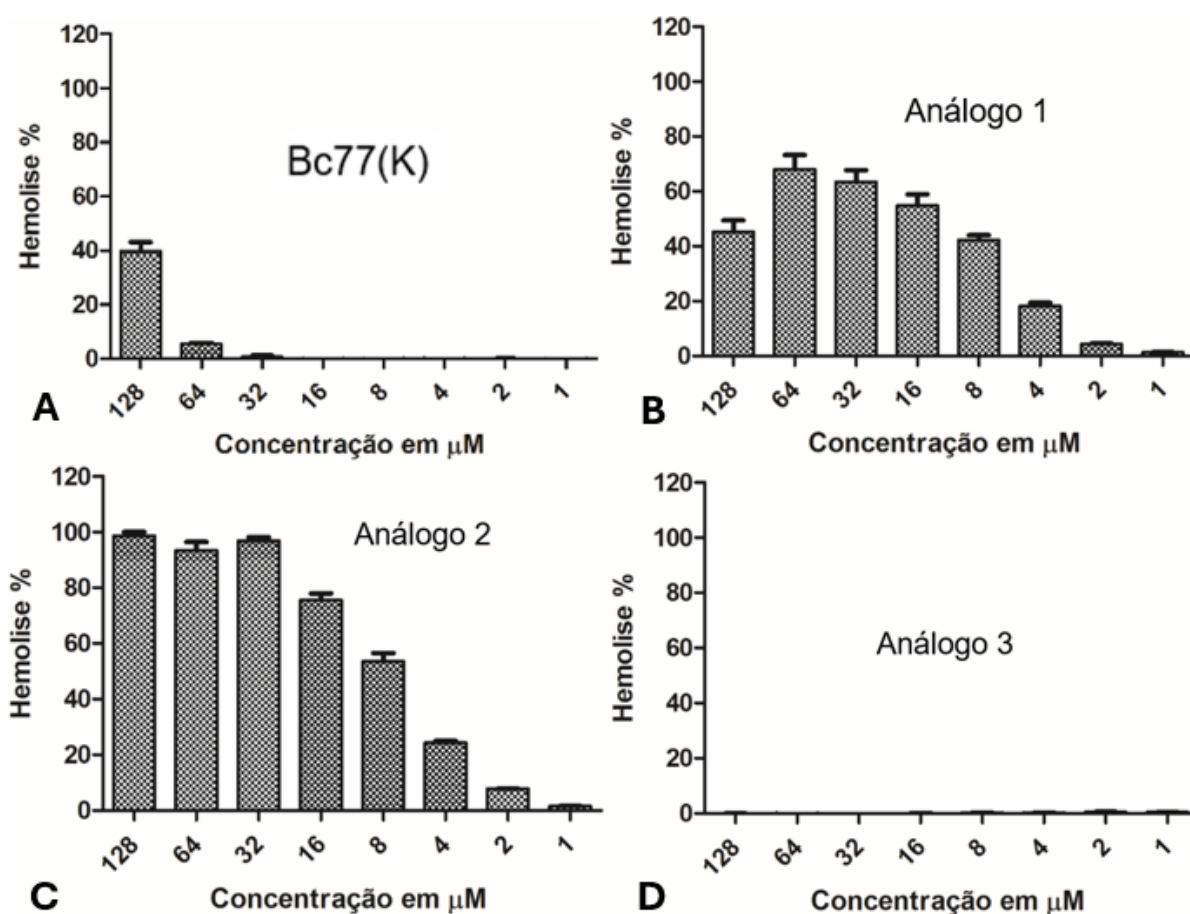
Desde o surgimento da COVID-19, esforços têm sido direcionados à busca por agentes terapêuticos eficazes. Peptídeos antimicrobianos secretados por anuros têm se destacado como candidatos promissores devido ao seu potencial antiviral. Estudos *in silico* indicaram que peptídeos das famílias Caerinas, Dermaseptinas e Magaininas possuem potencial atividade antiviral contra o SARS-CoV-2, principalmente por impedir a entrada do vírus nas células hospedeiras. Magaininas atuam bloqueando a ligação ao receptor ACE-2; Dermaseptinas, impedindo o acoplamento da proteína spike; e Caerinas, reduzindo a fusão viral. Embora promissores, esses peptídeos ainda necessitam de validação experimental. Outras famílias, como Brevininss e Temporinas, também podem ser exploradas como candidatas a antivirais contra o SARS-CoV-2 (DE AMARAL & IENES-LIMA, 2022).

Pandemias causadas por vírus respiratórios representam sérios desafios à saúde pública. Diante da eficácia limitada de vacinas e antivirais atuais, há necessidade urgente de novos fármacos de amplo espectro. Diante desse cenário, foi avaliada a atividade antiviral do peptídeo Hylin-a1, secretado pela rã *Boana albopunctata*. O PAM Hylin-a1 demonstrou potente efeito inibitório contra diversos vírus envelopados respiratórios, incluindo SARS-CoV-2, HCoV-229E, vírus do sarampo, parainfluenza tipo 3 e influenza H1N1. No entanto, não foi eficaz contra o coxsackievírus B3, que não possui envelope. Este estudo demonstrou que o peptídeo Hylin-a1 atua como um inibidor amplo de infecções virais respiratórias humanas. Sua ação antiviral é direcionada de forma inespecífica ao envelope viral, provavelmente devido à interação entre suas cargas positivas e os fosfolípidos aniônicos da membrana viral, resultando em danos estruturais. Hylin-a1 também apresentou efeito bactericida contra *S. aureus*, sugerindo um mecanismo semelhante baseado na destruição da membrana. Além disso, o peptídeo interferiu na infecção por vírus sincicial respiratório (RSV) ao reduzir drasticamente os níveis da proteína de fusão

(F), indicando que sua atividade antiviral pode combinar ação inespecífica na membrana com interação específica em proteínas virais (CHIANESE *et al.*, 2023).

### 5.9. Efeito hemolítico

A capacidade em induzir hemólise do peptídeo Bc77(K) e dos análogos 1, 2 e 3 foram avaliadas em um *pool* de eritrócitos (Figura 15). Alterações na estrutura dos peptídeos visando reduzir a hidrofobicidade podem acarretar produtos com atividade antimicrobiana melhorada ou mantida, com perda ou redução da atividade hemolítica. Os efeitos hemolíticos do peptídeo Bc77(K) e dos análogos 1, 2 e 3 estão apresentados na figura 15, A-D.



**Figura 15.** Atividade hemolítica dos peptídeos A) Bc77(K), B) Análogo1, C) Análogo 2 e D) Análogo 3.

Ao analisarmos os gráficos observa-se que o peptídeo Bc77(K) tem uma atividade próxima à descrita por MARQUEZ (2016) que evidenciou atividade até a concentração de 79,4  $\mu$ M, onde nas maiores concentrações observa-se atividade hemolítica, que sofre redução à medida em que a concentração do peptídeo é diminuída. No presente estudo evidenciamos uma redução significativa a partir da concentração de 64  $\mu$ M. Os análogos 1 e 2 exibiram atividade hemolítica bem relevante, sendo que mesmo em baixas concentrações se mostraram capazes de lisar os eritrócitos. O análogo 3 não apresentou atividade significativa mesmo nas maiores concentrações testadas.

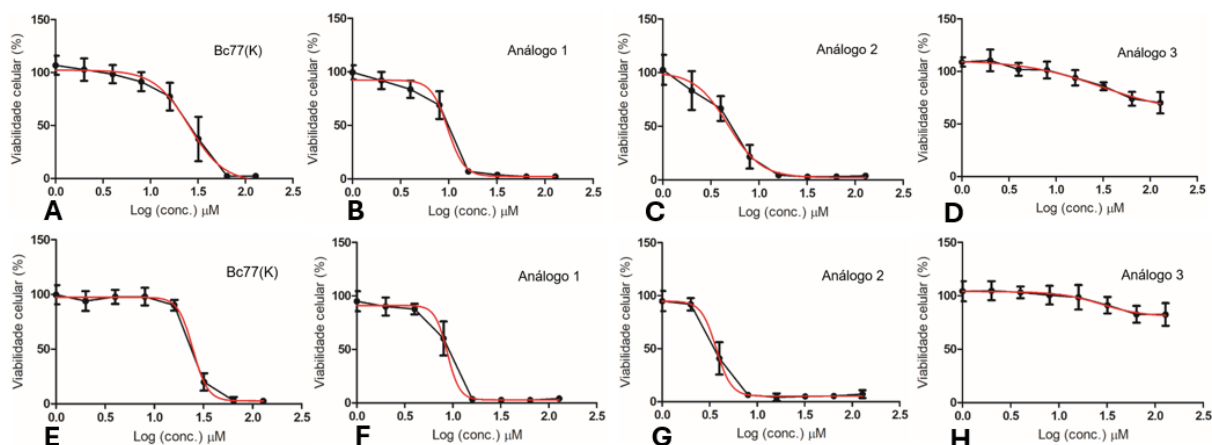
A atividade hemolítica é uma singularidade que limita o uso sistêmico de um peptídeo antimicrobiano. Logo, com o intuito de que os peptídeos possam se constituir em uma nova opção terapêutica aos antibióticos clássicos e convencionais, modificações estruturais em peptídeos devem ser realizadas, gerando produtos mais seguros e eficientes.

O ensaio hemolítico foi realizado somente com o peptídeo selvagem Bc77(K) e com os análogos 1, 2 e 3 pelo fato de serem os únicos a apresentarem atividade nos ensaios antibacterianos. Como os análogos 4 e 5 não demonstraram atividades nos ensaios prévios, decidiu-se por não progredir com a avaliação de seus efeitos nos demais ensaios realizados.

#### **5.10. Determinação da atividade antiproliferativa sobre linhagens celulares de mamíferos**

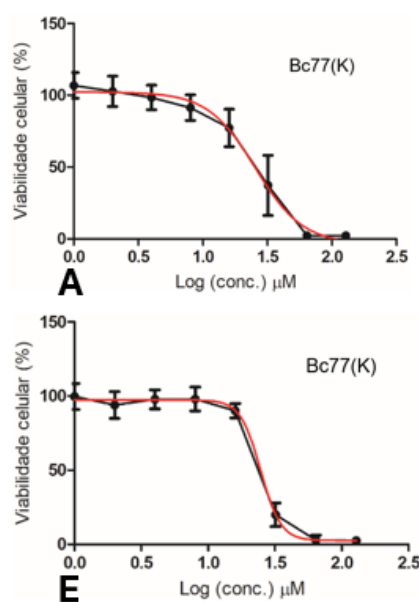
A atividade antiproliferativa dos PAMs em estudo foi avaliada em linhagens celulares de câncer HeLa (ATCC CCL-2, câncer cervical humano) e linhagem não-tumoral HaCAT (CVCL\_0038, queratinócitos imortalizados humanos) empregando o ensaio com MTT.

O peptídeo Bc77(K) e os análogos 1 e 2 se mostraram ativos em linhagens de células cancerosas HeLa e em células normais da linhagem HaCaT, evidenciando assim sua baixa seletividade. O análogo 3 não apresentou atividade, conforme demonstrado na figura 16.



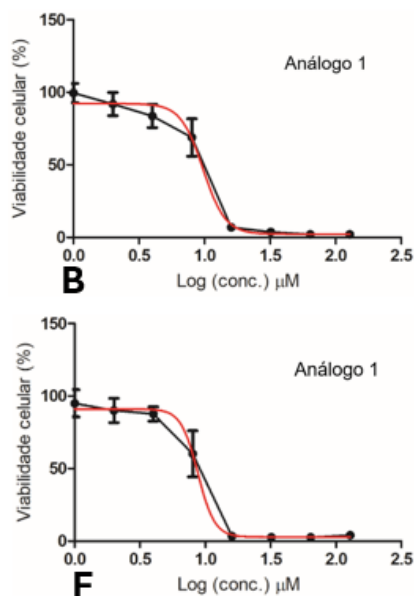
**Figura 16.** Atividade antiproliferativa sobre células HaCat e HeLa na presença do peptídeo Bc77(K) e dos análogos 1, 2 e 3.

Testes de viabilidade mostraram diminuições relevantes nos valores de  $IC_{50}$ : quando comparados a linhagem tumoral frente a não tumoral como evidenciado na figura 17, **A e E**, sendo que em **A**) HaCaT 25,5  $\mu M$  e **E**) 24,68  $\mu M$ , contudo a seletividade foi baixa, com uma melhor ação frente à célula cancerosa (Figura 17, A e E).



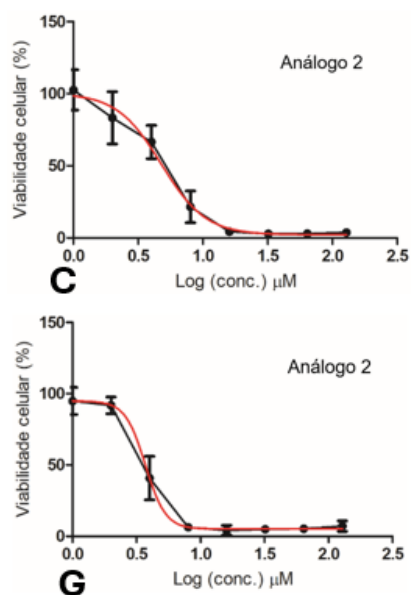
**Figura 17.** Atividade antiproliferativa sobre células HaCaT (**A**) e HeLa (**E**) na presença do peptídeo Bc77(K).

O análogo 1 demonstrou uma melhora nos valores de  $IC_{50}$  de **B**) 10,2  $\mu M$  e **F**) 8,75  $\mu M$ , para as linhagens de HaCaT e HeLa, ao ser comparado aos do peptídeo Bc77(K), respectivamente (Figura 18, B e F).



**Figura 18.** Atividade antiproliferativa sobre células HaCaT (**B**) e HeLa (**F**) na presença do análogo 1.

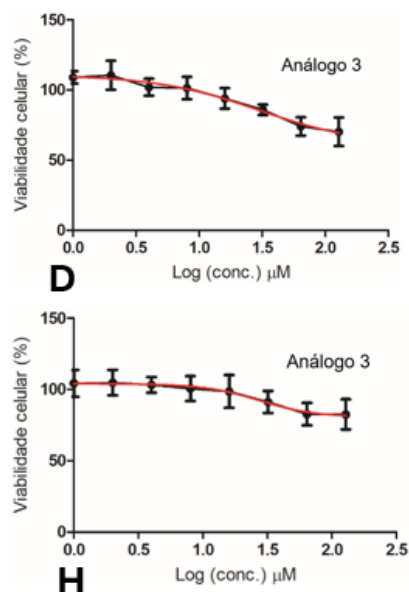
O análogo 2 demonstrou ganho de potência, quando comparado ao peptídeo Bc77(K), exibindo valores de  $\text{IC}_{50}$  menores para todas as células testadas: **C**)  $4,7 \mu\text{M}$  e **G**)  $3,7 \mu\text{M}$ , para as células HaCaT e HeLa, respectivamente (Figura 19, C e G)



**Figura 19.** Atividade antiproliferativa sobre células HaCaT (**B**) e HeLa (**F**) na presença do análogo 2.

O análogo 3 não demonstrou atividade em ambas as linhagens **D**)  $>128\mu\text{M}$  e **H**)  $>128\mu\text{M}$ , para as células HaCaT e HeLa, respectivamente (Figura 20, D e H).





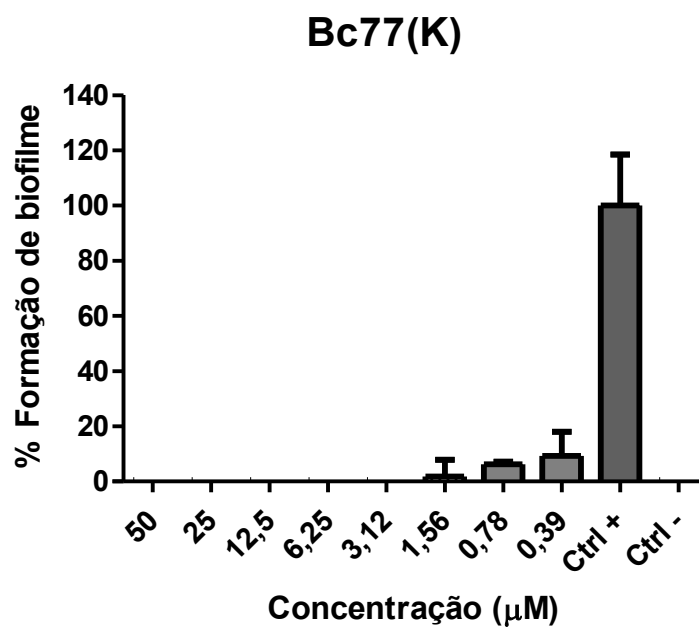
**Figura 20.** Atividade antiproliferativa sobre células HaCaT **(B)** e HeLa **(F)** na presença do análogo 3.

Embora a atividade antitumoral *in vitro* do peptídeo Bc77(K) e dos análogos 1 e 2 avaliados neste estudo não tenham sido seletivas em relação às células saudáveis usadas como referência, esses peptídeos e seus derivados são interessantes para o desenvolvimento de medicamentos anticâncer. No entanto, é crucial considerar as limitações dos testes realizados em condições *in vitro* e por períodos curtos, já que os efeitos biológicos *in vivo* de um agente anticâncer podem não ser comparáveis aos observados *in vitro*, pois esses testes não conseguem replicar satisfatoriamente a complexidade do efeito no paciente (REIMANN & SCHIMTT, 2007).

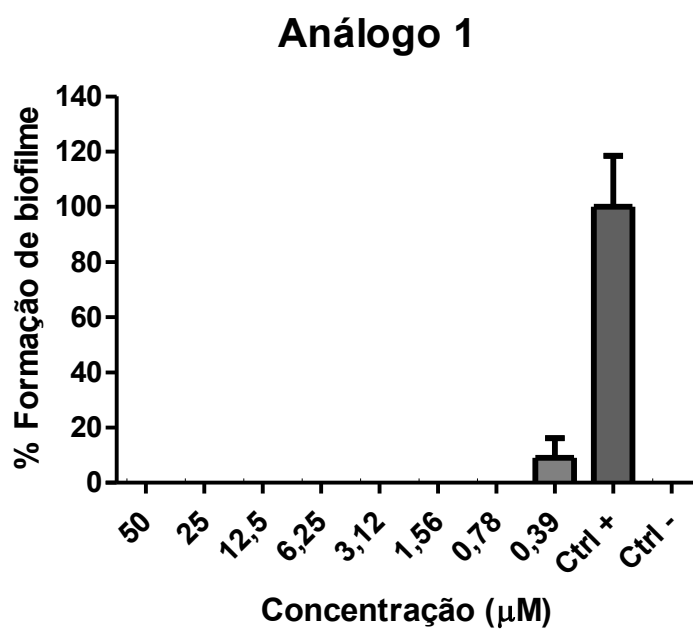
### 5.11. Inibição da formação do biofilme

Os ensaios de inibição de biofilme foram realizados com os peptídeos Bc77(K), análogo 1 e análogo 2. Os efeitos de inibição para formação de biofilmes dos peptídeos estão representados na figura 21, A-C, sendo que os resultados obtidos demonstram uma atividade acentuada.

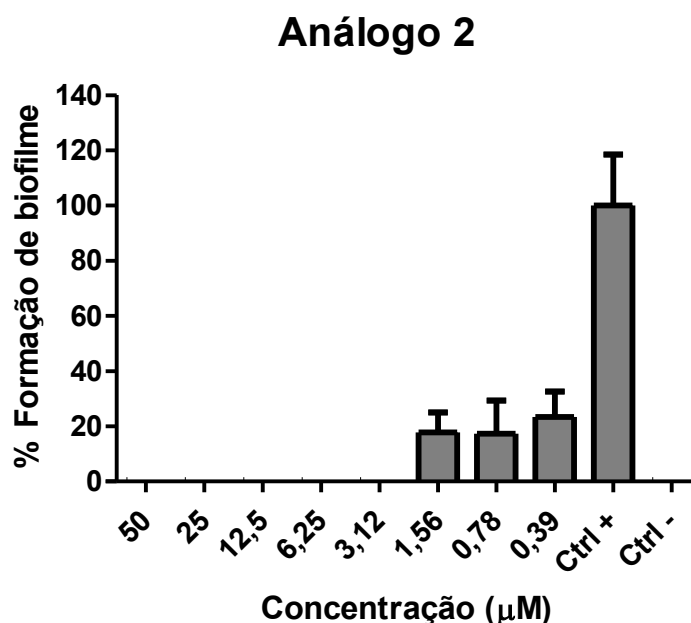
(A)



(B)



(C)



**Figura 21.** Inibição da formação do biofilme promovida pelo peptídeo Bc77(K) (A) e análogos 1 (B) e 2 (C).

Os efeitos de inibição para formação de biofilmes pelo peptídeo Bc77(K) demonstrou uma atividade acentuada conseguindo impedir a formação de biofilme mesmo nas menores concentrações empregadas.

Ao analisarmos o análogo 1, obteve-se uma resposta ainda mais exacerbada demonstrando atividade marcante mesmo na concentração de 0,39 µM.

Ao analisarmos o análogo 2, obteve-se uma resposta mais moderada em comparação com os demais.

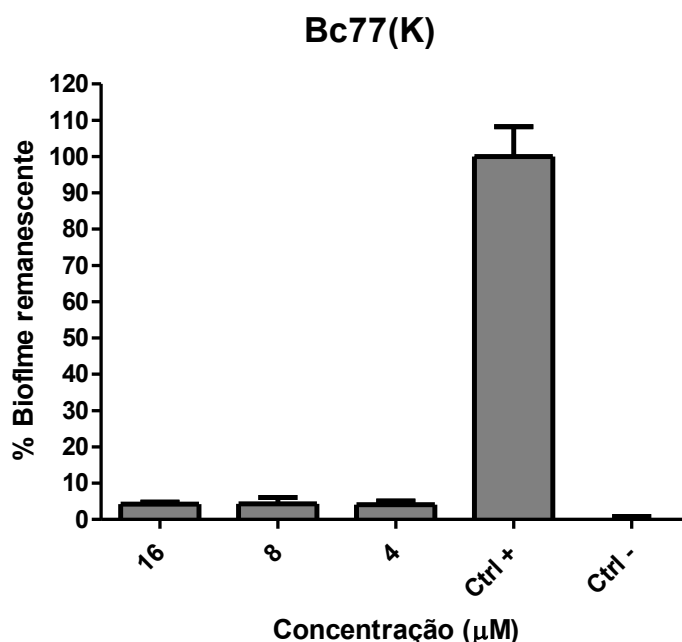
Os peptídeos antibiofilmes podem dificultar ou inibir a aderência dos biofilmes a superfícies. Abordagens envolvendo a combinação de compostos têm se mostrado eficiente em inibir ou erradicar biofilmes de cepas bacterianas resistentes. Estudos envolvendo a combinação da lisostafina com o antibiótico oxacilina, por exemplo, resultou no aumento da sensibilidade bacteriana ao antibiótico (HOIBY *et al.*, 2011).

O ensaio para inibição da formação do biofilme foi realizado somente com o peptídeo selvagem Bc77(K) e com os análogos 1 e 2 por terem sido os únicos a apresentar atividade nos ensaios antibacterianos contra *Staphylococcus aureus*.

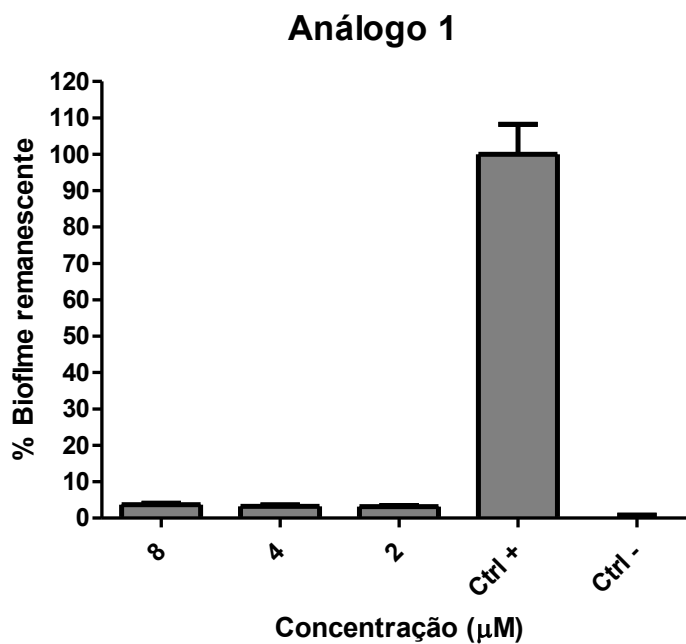
### 5.12. Ensaio de destruição de biofilme pré-formado (redução de biomassa)

O ensaio de redução de biomassa consiste na destruição do biofilme previamente formado seguido a mesma metodologia aplicada acima, entretanto os PAMs não são adicionados à microplaca, permitindo o pleno crescimento do biofilme em todos os poços inoculados. Os efeitos do ensaio de destruição de biofilme pré-formado (redução de biomassa) dos peptídeos estão representados na figura 22, A-C. Os resultados obtidos demonstram uma atividade acentuada de redução da biomassa.

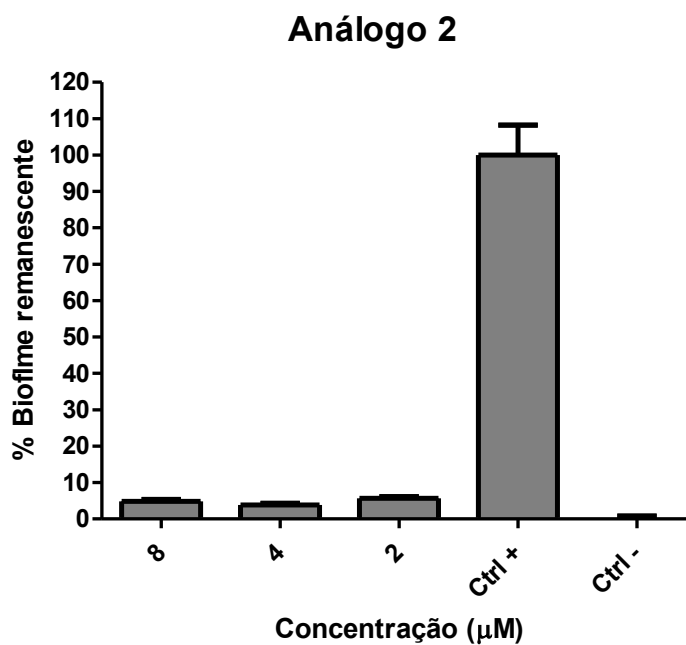
(A)



(B)



(C)



**Figura 22.** Destruição de biofilme pré-formado (redução de biomassa) do peptídeo Bc77(K) (A) e dos análogos 1 (B) e 2 (C).

Ao analisarmos os efeitos do peptídeo Bc77(K), observa-se que, mesmo em concentrações baixas, foi capaz de reduzir o biofilme pré-formado eliminando assim grande quantidade de biomassa.

Ao analisarmos os análogos 1 e 2, na concentração de 2  $\mu\text{M}$  foram capazes de reduzir o biofilme pré-formado, eliminando assim grande quantidade de biomassa, sendo que o análogo 1 demonstrou uma redução mais acentuada.

Patógenos microbianos formam biofilmes e produzem diversos fatores que aumentam sua virulência, resultando em infecções duradouras nos hospedeiros. Um biofilme é um agrupamento de células microbianas que se fixam a superfícies, sejam elas biológicas ou não, e são envolvidas por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que eles mesmos produzem, compostas por DNA extracelular (eDNA), polissacarídeos e proteínas. Essa formação de biofilme é o principal mecanismo que confere resistência a agentes antimicrobianos, contribuindo para altas taxas de morbidade e mortalidade em decorrência de doenças infecciosas. Biofilmes podem se desenvolver em superfícies de células hospedeiras e em diversos dispositivos médicos, como válvulas cardíacas artificiais, cateteres venosos centrais, lentes de contato, cateteres urinários e dispositivos intrauterinos. A presença de biofilmes nas células hospedeiras resulta em infecções crônicas, especialmente quando esses dispositivos médicos são utilizados. Além disso, o tratamento das infecções relacionadas a biofilmes gera custos elevados (JEONG *et al.*, 2024).

Existem exemplos de peptídeos antibiofilme na literatura evidenciando o potencial terapêutico dessa classe de moléculas. Em um estudo recente, o peptídeo Pep 6, do néctar do tabaco, serviu como base para o desenho racional de novos PAMs, resultando em quatro candidatos: KF19, KF16, LK16 e LR16. Desses, apenas KF19 e LR16 apresentaram potente atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, com baixos valores de CIM e baixa hemólise. Ambos atuam na membrana bacteriana e eliminaram as bactérias em até 2 horas. Destacadamente, os dois peptídeos foram eficazes na destruição de biofilmes de *S. aureus*, demonstrando forte potencial terapêutico (ISMAEL *et al.*, 2025).

O peptídeo GHaR4G7R, derivado de *Temporin-GHa* da rã *Hylarana guentheri*, demonstrou potentes propriedades biológicas contra *Cutibacterium acnes*, principal causador da acne vulgar. In vitro, apresentou MIC e MBC de 3,1  $\mu\text{M}$ , atuando por lise da membrana bacteriana e com baixa tendência à indução de resistência. Destacadamente, GHaR4G7R inibiu a formação de biofilmes iniciais e eliminou biofilmes maduros, reduzindo a síntese de exopolissacarídeos. Além disso, mostrou efeito anti-inflamatório em células HaCaT e em modelo animal, por meio da modulação

da via TLR2/NF- $\kappa$ B/MAPK. Esses resultados sugerem seu potencial como agente terapêutico inovador para o tratamento da acne vulgar (ZHAO *et al.*, 2025).

Infecções em feridas agudas e crônicas associadas a biofilmes e patógenos resistentes representam um grande desafio clínico. O peptídeo antimicrobiano D-Bac8c2,5 Leu destacou-se pela potente atividade contra biofilmes mono e polimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Em testes *in vitro*, promoveu redução de 2 a 3 logs na carga bacteriana e demonstrou eficácia em modelos estáticos e dinâmicos. Apresentou baixa citotoxicidade em células humanas e, quando incorporado em hidrogel de metilcelulose, permitiu liberação sustentada e maior atividade antimicrobiana. O hidrogel com o peptídeo também foi eficaz na destruição de biofilmes já formados, mostrando alto potencial terapêutico (SHAHROUR *et al.*, 2025).

### **5.13. Ativação dos neutrófilos**

Após o isolamento, as concentrações celulares foram ajustadas e as células foram ativadas de acordo com o delineamento experimental. Para cada condição celular, a concentração final foi de 6600 células/ $\mu$ L. Já a concentração final do mediador fMLP foi de 100 nmol/L. Todos os experimentos seguiram estas concentrações.

### **5.14 Determinação da ação ativadora de neutrófilos via produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)**

As concentrações finais de 8  $\mu$ M, 4  $\mu$ M e 2  $\mu$ M, estabelecidas para os peptídeos Bc77(K), análogo 1 e análogo 2, respectivamente, foram determinadas mediante ajuste metodológico decorrente da elevada citotoxicidade observada no ensaio preliminar de triagem. Nesta etapa exploratória, as concentrações iniciais de 64  $\mu$ M, 32  $\mu$ M e 16  $\mu$ M (para Bc77(K), análogo 1 e análogo 2, respectivamente) induziram efeito letal sobre a população de neutrófilos, comprometendo a viabilidade celular e inviabilizando a aquisição de dados. Ajustando o protocolo experimental por meio de três diluições sequenciais, visando reduzir a atividade citotóxica dos peptídeos e mantendo assim a viabilidade das células durante o ensaio para obtenção dos dados.

Para avaliar se os peptídeos estudados induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em neutrófilos, foi empregada citometria de fluxo com um total de 10.000 eventos com *flow rate* médio. O ensaio foi realizado após o tratamento dos neutrófilos com os peptídeos por 1 hora, onde o peptídeo Bc77(K) e os análogos 1 e 2 foram testados nas concentrações de 8  $\mu$ M, 4  $\mu$ M e 2  $\mu$ M, respectivamente. Pôde-se observar que os peptídeos não induziram a produção de EROs neste teste em específico.

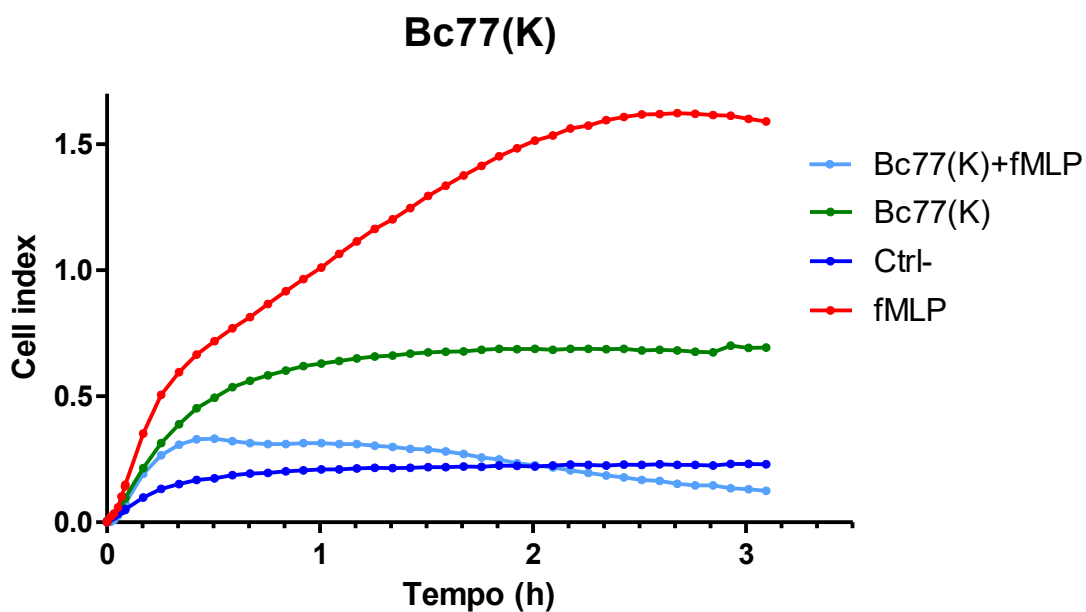
### 5.15 Ensaio de migração por análise de células em tempo real (RTCA)

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

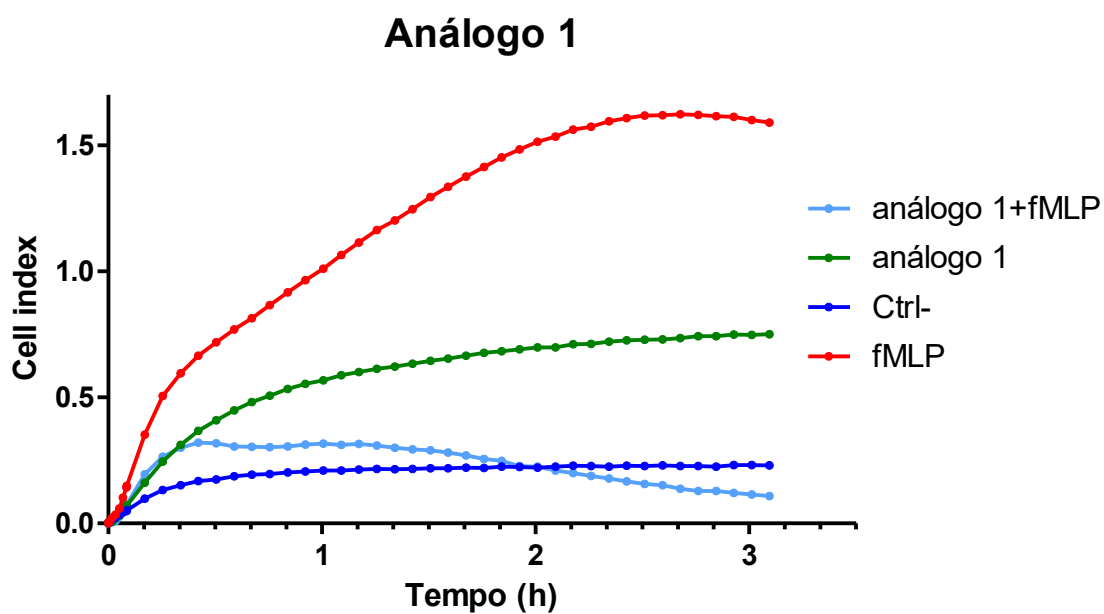
Os ensaios foram realizados em duas condições diferentes para cada peptídeo, sendo estes o peptídeo Bc77(K), análogo 1 e análogo 2, sempre nas concentrações de 8  $\mu$ M, 4  $\mu$ M e 2  $\mu$ M, respectivamente. A primeira condição apresentava o peptídeo antimicrobiano na câmara inferior e apenas neutrófilos na câmara superior, para avaliar a ação quimiotática dos peptídeos estudados. Já a segunda condição apresentava fMLP na câmara inferior e neutrófilos com peptídeos na câmara superior, para avaliação da eficácia de inibição ou dupla ativação por parte das amostras sobre os neutrófilos.

O peptídeo Bc77(K) demonstrou ser quimiotático quando isolado e foi capaz de interferir com a migração induzida por fMLP (Figura 23), assim como o análogo 1 (Figura 24). O análogo 2 não exibiu atividade quimiotática, nem foi capaz de interferir com a capacidade de induzir migração pelo fMLP (Figuras 25).

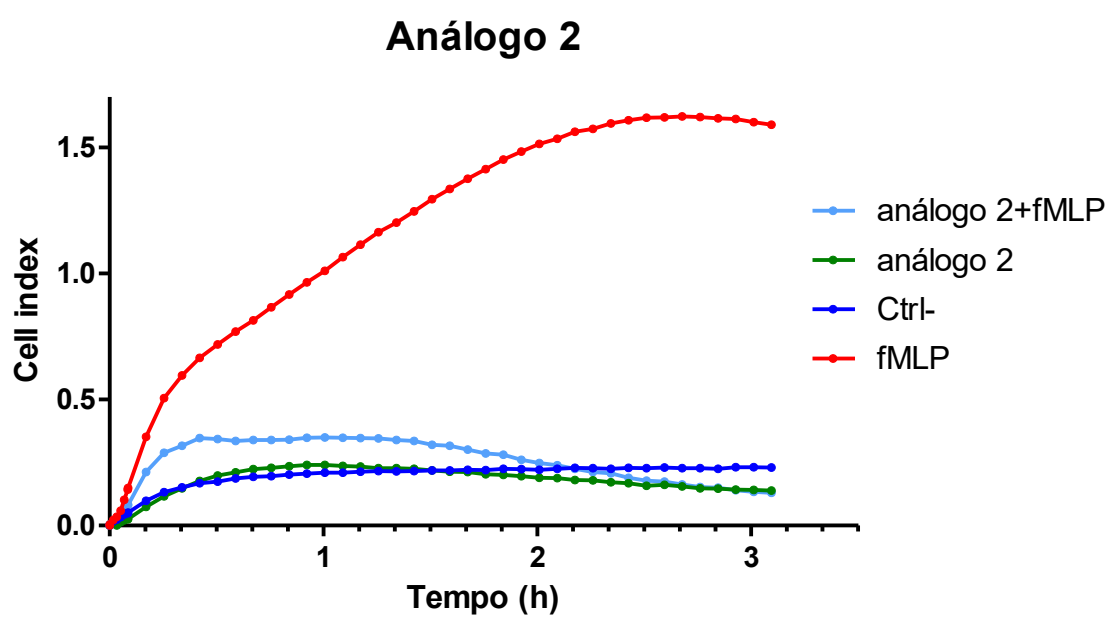




**Figura 23.** Avaliação da migração de neutrófilos humanos na presença ou não do peptídeo Bc77(K).



**Figura 24.** Avaliação da migração de neutrófilos humanos na presença ou não do análogo 1.



**Figura 25.** Avaliação da migração de neutrófilos humanos na presença ou não do análogo 2.

## 6. CONCLUSÃO

As análises de dicroísmo circular na presença de SDS indicaram formação de  $\alpha$ -hélice para todos os peptídeos.

O peptídeo Bc77(K) apresentou uma atividade considerável frente às linhagens de bactérias Gram-positivas *Saphylococcus aureus* (ATCC 29213) e contra a linhagem multirresistente e discreta contra *Acinetobacter baumannii* resistente as carbapenens.

O análogo 1 apresentou uma atividade considerável frente às linhagens de bactérias Gram-positivas *Saphylococcus aureus* (ATCC 29213) e contra a linhagem multirresistente e boa contra *Acinetobacter baumannii* resistente as carbapenens.

O análogo 2 apresentou atividade excelente frente às linhagens de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e contra linhagens multirresistentes, assim como, frente ao fungo leveduriforme *C. albicans*.

O análogo 3 apresentou uma atividade discreta frente à linhagem multirresistente de *Acinetobacter baumannii* resistente as carbapenens e ligeiramente melhor frente ao fungo leveduriforme *C. albicans* (ATCC 14053).

Os análogos 4 e 5 não apresentaram atividades frente às linhagens microbianas testadas.

No teste antiviral frente ao SARS-CoV-2, o peptídeo Bc77(K) e os análogos não demonstraram atividade, mesmo o peptídeo Bc77(K) e o análogo 2 tendo uma porcentagem de atividade máxima, não exibiram seletividade frente ao vírus.

No ensaio frente a células cancerosas e não-tumorais, o peptídeo Bc77(K) e os análogos 1 e 2 não resultaram em uma boa seletividade frente as linhagens celulares.

O peptídeo Bc77(K) apresentou um grau hemolítico aceitável, porém os análogos 1 e 2 foram extremamentes hemolíticos frente a eritrócitos humanos, sendo que o análogo 3 não exibiu atividade hemolítica em nenhuma das concentrações empregadas.

No ensaio de biofilme, o peptídeo Bc77(K) e os análogos 1 e 2 obtiveram uma redução boa frente a formação do biofilme bacteriano, com concentrações baixas e eficazes.

No ensaio de biomassa após o biofilme já formado, o peptídeo Bc77(K) e os análogos 1 e 2 promoveram uma redução considerável frente a destruição do biofilme bacteriano já estabelecido, mesmo em baixas concentrações.

No ensaio sobre migração de neutrófilos, o peptídeo Bc77(K) e o análogo 1 exibiram atividade quimiotática, já o análogo 2 não estimulou quimiotaxia dos neutrófilos.

Em síntese, os resultados obtidos indicam um potencial terapêutico e sanitário promissor para as moléculas estudadas. Os análogos 1 e 2 demonstraram-se candidatos viáveis para aplicação em tratamentos sistêmicos. Embora apresentem valores baixos de concentração inibitória mínima (CIM) acompanhados de elevada atividade hemolítica, esse fator não inviabiliza seu uso *in vivo*, considerando a possibilidade de otimização por meio de modificações estruturais, encapsulamento em nanopartículas ou combinação com outras moléculas e antimicrobianos já disponíveis, o que pode atenuar seus efeitos adversos. Além disso, sua utilização em formulações tópicas de liberação controlada, como pomadas, adesivos e géis, representa uma estratégia viável. Também se projeta a aplicação desses peptídeos em superfícies biológicas e inertes, incluindo dentes, lesões cutâneas, cicatrizes, materiais cirúrgicos, maçanetas e equipamentos hospitalares, visando desinfecção ou mesmo esterilização, conforme o tipo de substrato. A associação com substâncias degermantes e o controle do tempo de exposição podem ampliar significativamente a eficácia dessas aplicações.

## 7. PERSPECTIVAS

1. Avaliar a concentração bactericida mínima (CBM);
2. Avaliar o potencial terapêutico dos peptídeos antimicrobianos estudados em comparação aos antibióticos disponíveis;
3. Avaliar os possíveis efeitos combinado dos peptídeos selvagens e análogos, utilizando-se antibióticos comerciais;
4. Avaliar o potencial antiparasitário dos peptídeos estudados no presente trabalho sobre protozoários de interesse médico e veterinário, como *Leishmania* sp., *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*;
5. Avaliar o potencial antiviral dos peptídeos estudados no presente trabalho sobre arbovírus emergentes como os vírus da febre Chikungunya, da febre amarela, da dengue e Zika vírus;
6. Avaliar os efeitos citolíticos sobre lipossomas;
7. Avaliar os efeitos sobre a permeabilidade da membrana de bactérias Gram-negativas;
8. Avaliar os efeitos sobre a despolarização da membrana de bactérias;
9. Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio sobre as membranas das bactérias com a utilização de estudos oximétricos e/ou ensaios colorimétricos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*. 10. ed. 2023.
- ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 677-678, 1988.
- AGUILAR, S. *et al.* Structure and function of cationic hylin bioactive peptides from the tree frog *Boana pulchella* in interaction with lipid membranes. **Peptides**, v. 159, p. 170900, 2023. DOI: 10.1016/j.peptides.2022.170900.
- AITKEN, A.; LEARMONTH, M. Protein identification by in-gel digestion and mass spectrometric analysis. **Molecular Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 95-97, 2002.
- AJULO, S.; AWOSILE, B. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS 2022): Investigating the relationship between antimicrobial resistance and antimicrobial consumption data across the participating countries. **PLoS One**, v. 19, n. 2, p. e0297921, 2024. DOI: 10.1371/journal.pone.0297921.
- ALMEIDA, R. A. *et al.* Cinerascetins, new peptides from *Hypsiboas cinerascens*: MALDI LIFT-TOF-MS/MS *de novo* sequence and imaging analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 11, p. 2290-2297, 2015. DOI: 10.5935/0103-5053.20150219.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D.; KUBICEK-SUTHERLAND, J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Drug Resistance Updates**, v. 26, p. 43-57, 2016.
- ANTONY, A. *et al.* Antimicrobial and antitumor properties of anuran peptide temporin-SHf induce apoptosis in A549 lung cancer cells. **Amino Acids**, v. 56, n. 1, p. 12, 2024. DOI: 10.1007/s00726-023-03373-3.
- AZEVEDO CALDERON, L. de; SILVA, A. D. A. E.; CIANCAGLINI, P.; STÁBELI, R. G. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: From biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 29-49, 2011. DOI: 10.1007/s00726-010-0622-3.
- BAUER, M. E.; SHAFER, W. M. On the in vivo significance of bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v.1848, n.11, p.3101–3111, 2015.
- BECHINGER, B.; GORR, S.-U. Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 3, p. 254-260, 2017.

BENFIELD, A. H.; HENRIQUES, S. T. Mode-of-action of antimicrobial peptides: membrane disruption vs. intracellular mechanisms. **Frontiers in Medical Technology**, v. 2, p. 610997, 2020.

BENGOCHEA, J. A.; SKURNIK, M. Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. **Molecular Microbiology**, v.37, n.1, p.67-80, 2000.

BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? **Journal of Cell Biology**, v. 198, n. 5, p. 773-783, 2012.

BRUNET, K. *et al.* Antifungal activity of [K3]temporin-SHa against medically relevant yeasts and moulds. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 427-434, 2022. DOI: 10.1139/cjm-2021-0250.

BRUNETTI, A. E. *et al.* The significance of hypervariability and conserved motifs in antimicrobial peptides from tree frogs. **Journal of Natural Products**, v. 86, n. 7, p. 1761-1769, 2023. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.3c00224.

CANO, P. M.; VARGAS, A.; LAVOIE, J.-P. A real-time assay for neutrophil chemotaxis. **BioTechniques**, v. 60, n. 5, p. 245-251, 2016. DOI: 10.2144/000114416.

CARMO, B. A. *et al.* Antimicrobial peptide analogs from scorpions. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, 2022. DOI: 10.3389/fmolb.2022.887763.

CASTANHEIRA, F. V. S.; KUBES, P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. **Blood**, v. 133, n. 20, p. 2178-2185, 2019.

CHIANESE, A. *et al.* Frog skin peptides Hylin-a1, AR-23, and RV-23: promising tools against carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* infections. **Antibiotics**, v. 14, n. 4, p. 374, 2025. DOI: 10.3390/antibiotics14040374.

CHIANESE, A. *et al.* Hylin-a1: A pan-inhibitor against emerging and re-emerging respiratory viruses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, p. 13888, 2023. DOI: 10.3390/ijms241813888.

CHIANESE, A. *et al.* The antiherpetic and anti-inflammatory activity of the frog-derived peptide Hylin-a1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 135, n. 7, p. 1xae165, 2024. DOI: 10.1093/jambio/1xae165.

CHRISTENSEN, G. D. *et al.* Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, 1985.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-eighth informational supplement*. 28. ed. Wayne: CLSI, 2018. (CLSI/NCCLS document M100-S28).

CONLON, J. M. *et al.* Multifunctional host-defense peptides isolated from skin secretions of the banana tree dwelling frog *Boana platanera* (Hylidae; Hylinae). **Biochimie**, v. 223, p. 23-30, 2024. DOI: 10.1016/j.biochi.2024.03.012.

CONLON, J. M. *et al.* Purification, conformational analysis and cytotoxic activities of host-defense peptides from the *Tungara* frog *Engystomops pustulosus* (Leptodactylidae; Leiuperinae). **Amino Acids**, v. 55, n. 10, p. 1349-1359, 2023.

CONLON, J. M. Host-defense peptides of the skin with therapeutic potential: from hagfish to human. **Peptides**, v.67, p.29–38, 2015.

DAVENPORT, A. *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* in patients with end-stage renal failure and renal transplant recipients. **Nephron**, v. 59, n. 4, p. 597-601, 1991.

DE AMARAL, M.; IENES-LIMA, J. Anurans against SARS-CoV-2: A review of the potential antiviral action of anurans cutaneous peptides. **Virus Research**, v. 315, p. 198769, 2022. DOI: 10.1016/j.virusres.2022.198769.

DECKER, A.P.; MECHESSO, A.F.; WANG, G. Expanding the landscape of amino acid-rich antimicrobial peptides: Definition, deployment in nature, implications for peptide design and therapeutic potential. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 12874, 2022.

DEL CASTILLO, F. J.; DEL CASTILLO, I.; MORENO, F. Construction and characterization of mutations at codon 751 of the *Escherichia coli* gyrB gene that confer resistance to the antimicrobial peptide microcin B17 and alter the activity of DNA Gyrase. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.6, p.2137-2140, 2001.

DOBSON, A. J.; PURVES, J.; ROLFF, J. Increased survival of experimentally evolved antimicrobial peptide-resistant *Staphylococcus aureus* in an animal host. **Evolutionary Applications**, v.7, n.8, p.905–912, 2014.

DUELLMAN, W. E.; MARION, A. B.; HEDGES, S. B. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). **Zootaxa**, v. 4104, n. 1, 2016. DOI: 10.11646/zootaxa.4104.1.1.

DUNNILL, P. The use of helical net-diagrams to represent protein structures. **Biophysical Journal**, v. 8, n. 7, p. 865-875, 1968.



EBENHAN, T. *et al.* Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 867381, 2014. DOI: 10.1155/2014/867381.

EISENBERG, D.; WEISS, R. M.; TERWILLIGER, T. C. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. **Nature**, v. 299, n. 5881, p. 371-374, 1982.

EPAND, R. M. *et al.* Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 5, p. 980-987, 2016.

ERNST, R. K.; GUINA, T.; MILLER, S. I. How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. **Journal of Infectious Diseases**, v.179, n.2, p.326-330, 1999.

FAUCHÈRE, J.-L.; PLISKA, V. E. Amino acid scale: Hydrophobicity scale (pir). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 369-375, 1983.

FEI, F. *et al.* A frog-derived antimicrobial peptide as a potential anti-biofilm agent in combating *Staphylococcus aureus* skin infection. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 27, n. 11, p. 1565-1579, 2023.

FREITAS, G. G. *et al.* Purification and biological properties of Raniseptins-3 and -6, two antimicrobial peptides from *Boana raniceps* (Cope, 1862) skin secretion. **Biomolecules**, v. 13, n. 3, p. 576, 2023. DOI: 10.3390/biom13030576.

FROST, D. R. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 6.2. Nova Iorque: American Museum of Natural History, 2024. Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. Acesso em: 14 de maio de 2025.

GARCÍA, F. A. *et al.* A comprehensive review of patented antimicrobial peptides from amphibian anurans. **Journal of Natural Products**, v. 87, n. 3, p. 600-616, 2024.

GASTEIGER, E. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J. M. (Ed.). *The Proteomics Protocols Handbook*. [S. l.]: Humana Press, 2005. p. 571-607.

GAUTIER, R.; DOUGUET, D.; ANTONNY, B.; DRIN, G. Heliquet: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. **Bioinformatics**, v. 24, n. 18, p. 2101-2102, 2008.

GUILLAMET, C. V.; KOLLEF, M. H. How to stratify patients at risk for resistant bugs in skin and soft tissue infections? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, p. 116-123, 2016.

GUO, L.; LIM, K. B.; PODUJE, C. M.; DANIEL, M.; GUNN, J. S.; HACKETT, M.; MILLER, S. I. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. **Cell**, v.95, n.2, p.189-198, 1998.

GURYANOVA, S. V.; OVCHINNIKOVA, T. V. Immunomodulatory and allergenic properties of antimicrobial peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2499, 2022.

HANCOCK, R. E. W.; PATRZYKAT, A. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. **Current Drug Targets - Infectious Disorders**, v. 2, p. 79-83, 2002.

HAZAM, P. K.; GOYAL, R.; RAMAKRISHNAN, V. Peptide based antimicrobials: Design strategies and therapeutic potential. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 142, p. 10-22, 2019.

HELMERHORST, E. J. *et al.* The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 7286-7291, 1999.

HEUKELBACH, J. *et al.* Zika virus outbreak in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.10, n.2, p.116-120, 2016. doi: 10.3855/jidc.8217. PMID: 26927450.

HOIBY, N. *et al.* The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Science**, v. 3, n. 2, p. 55-65, 2011. DOI: 10.4248/IJOS11026.

ISLAM, D. *et al.* Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. **Nature Medicine**, v.7, p.180-185, 2001.

ISMAEL, M.; JULIAH, K.; EDWIN, M. Antimicrobial and potent anti-biofilm properties of rationally designed  $\alpha$ -helix antimicrobial peptides. **Journal of Peptide Science**, v. 31, n. 6, p. e70027, 2025. DOI: 10.1002/psc.70027.

JANG, W. S. *et al.* Antifungal activity of synthetic peptide derived from halocidin, antimicrobial peptide from the tunicate, *Halocynthia aurantium*. **FEBS Letters**, v. 580, p. 1490-1496, 2006.

JENSSEN, H. V. *et al.* Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 491-511, 2006.

JENSSEN, H.; ANDERSEN, J. H.; MANTZILAS, D.; GUTTEBERG, T. J. A wide range of medium-sized, highly cationic,  $\alpha$ -helical peptides show antiviral activity

against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 64, n. 2, p. 119-126, 2004. DOI: 10.1016/j.antiviral.2004.08.003.

JEONG, G.-J. *et al.* Marine polysaccharides for antibiofilm application: A focus on biomedical fields. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 283, pt. 4, p. 137786, 2024. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.137786.

JOO, H. S.; FU, C. I.; OTTO, M. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. **Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences**. v.371, n.20150292, p. 1-11, 2016.

JUSTYNA, W. *Mycobacterium liflandii* outbreak in a research colony of *Xenopus (Silurana) tropicalis* frogs. **Physiology & Behavior**, v. 176, n. 5, p. 139-148, 2017. DOI: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

KANG, H. K. *et al.* The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. **Journal of Microbiology**, v. 55, p. 1-12, 2017.

KAPIL, S.; SHARMA, V. D-amino acids in antimicrobial peptides: a potential approach to treat and combat antimicrobial resistance. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 119-137, 2021.

KAUR, B. P.; SECORD, E. Innate Immunity. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 41, n. 4, p. 535-541, 2021.

KAVANAGH, K.; DOWD, S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 285-289, 2004.

KHINE, A. A. *et al.* Human neutrophil peptides induce interleukin-8 production through the P2Y6 signaling pathway. **Blood**, v. 107, n. 7, p. 2936-2942, 2006.

KOO, J. C. *et al.* Pn-AMP1, a plant defense protein, induces actin depolarization in yeasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, p. 1669-1680, 2004.

KRITTANAI, C.; JOHNSON, W. C. Relative order of helical propensity of amino acids changes with solvent environment. **Proteins**, v. 39, p. 132-141, 2000.

KUBICEK-SUTHERLAND, J. Z.; LOFTON, H.; VESTERGAARD, M.; HJORT, K.; INGMER, H.; ANDERSSON, D. I. Antimicrobial peptide exposure selects for *Staphylococcus aureus* resistance to human defence peptides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.72, n.1, p.115–127, 2017.

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*. **Biomolecules**, v. 8, n. 1, 2018.

KURPE, S. R. *et al.* Antimicrobial and amyloidogenic activity of peptides. Can antimicrobial peptides be used against SARS-CoV-2? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 1-37, 2020.

LATOUD, C. *et al.* Interactions of antibiotics of the iturin group with human erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 856, p. 526-535, 1986.

LEE, D. G. *et al.* Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, p. 305-310, 2003.

LISCANO, Y. *et al.* *In silico* selection and evaluation of pugnins with antibacterial and anticancer activity using skin transcriptome of tree frog (*Boana pugnax*). **Pharmaceutics**, v. 13, n. 4, p. 578, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13040578.

LIU, W. *et al.* Transcriptomic analysis of skin immunity genes in the Chinese spiny frog (*Quasipaa spinosa*) after *Proteus mirabilis* infection. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 49, p. 101172, 2024.

LÓPEZ-GARCÍA, B. *et al.* Stabilisation of mixed peptide/lipid complexes in selective antifungal hexapeptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1660, p. 131-137, 2004.

LUCA, V. *et al.* 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**, v. 70, p. 2773-2786, 2013.

LUO, Y.; SONG, Y. Mechanism of antimicrobial peptides: antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11401, 2021.

LUONG, H. X.; THANH, T. T.; TRAN, T. H. Antimicrobial peptides – advances in development of therapeutic applications. **Life Sciences**, v. 260, p. 118407, 2020.

LUZ, I. *et al.* A set of screening techniques for a quick overview of the neutrophil function. **Journal of Visualized Experiments**, p. 12, 2023. DOI: 10.3791/65329.

MA, X. *et al.* A novel antimicrobial peptide, dermaseptin-SS1, with anti-proliferative activity, isolated from the skin secretion of *Phyllomedusa tarsius*. **Molecules**, v. 28, n. 18, p. 6558, 2023. DOI: 10.3390/molecules28186558.

MAHLAPUU, M.; HÅKANSSON, J.; RINGSTAD, L.; BJÖRN, C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.6, n.194, p.1-12, 2016.

MARCOCCI, M. E. *et al.* The amphibian antimicrobial peptide Temporin B inhibits *in vitro* herpes simplex virus 1 Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.62, n.5, p.2367–17, 2018. DOI: 10.1128/aac.02367-17.

MÁRQUEZ, C. A. P. Atividade antitumoral da secreção cutânea de *Hypsiboas crepitans* e de peptídeos derivados da pele dos anuros *Hypsiboas crepitans* e *Leptodactylus labyrinthicus*. 2016. 118 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília.

MARR, A. K.; GOODERHAM, W. J.; HANCOCK, R. E. W. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, p. 468-472, 2006.

MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 1-15, 2018.

MATANIC, A.V. C.; CASTILLA, V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.23, n.4, p.382-389, 2004.

MATSUZAKI, K. Membrane permeabilization mechanisms. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1117, p. 9-16, 2019. DOI: 10.1007/978-981-13-3588-4\_2.

MISHRA, B. *et al.* Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 38, p. 87-96, 2017.

MOHAN, K. V.; RAO, S. S.; ATREYA, C. D. Antiviral activity of selected antimicrobial peptides against vaccinia virus. **Antiviral Research**, v. 86, n. 3, p. 306-311, jun. 2010. DOI: 10.1016/j.antiviral.2010.03.012.

MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biology**, v. 5, n. 11, p. e307, 2007. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050307.

MOOKHERJEE, N. *et al.* Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, n. 5, p. 311-332, 2020.

MORÁN-MARCILLO, G. *et al.* Picturins and Pictuseptins, two novel antimicrobial peptide families from the skin secretions of the Chachi treefrog, *Boana picturata*. **Journal of Proteomics**, v. 264, p. 104633, 2022. DOI: 10.1016/j.jprot.2022.104633.

MORETTA, A. *et al.* Antimicrobial peptides: A new hope in biomedical and pharmaceutical fields. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1-26, 2021.

MORRISETT, J. D.; DAVID, J. S.; POWNALL, H. J.; GOTTO, A. M. JR. Interaction of an apolipoprotein (apoLP-alanine) with phosphatidylcholine. **Biochimie**, v. 12, p. 1290-1299, 1973.

NARAYANA, J. L.; CHEN, J. Y. Antimicrobial peptides: possible anti-infective agents. **Peptides**, v. 72, p. 88-94, 2015.

NAVON-VENEZIA, S. *et al.* Antibacterial properties of dermaseptin S4 derivatives with *in vivo* activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 689-694, 2002.

NETEA, M. G. *et al.* Defining trained immunity and its role in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 375-388, 2020.

NIJNIK, A.; HANCOCK, R. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. **Emerging Health Threats Journal**, v.2, n.1, p.1-7, 2009.

OMARDIEN, S.; BRUL, S.; ZAAT, S. A. Antimicrobial activity of cationic antimicrobial peptides against gram-positives: current progress made in understanding the mode of action and the response of bacteria. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v.4, n.111, p.1-16, 2016.

OMMEN, P.; ZOBEEK, N.; MEYER, R. L. Quantification of biofilm biomass by staining: Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. **Journal of Microbiological Methods**, v. 141, p. 87-89, 2017.

ONUMA, Y. *et al.* Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. **Toxicon**, v. 37, n. 1, p. 55-65, 1999. DOI: 10.1016/S0041-0101(98)00133-0.

OUHARA, K.; KOMATSUZAWA, H.; KAWAI, T.; NISHI, H.; FUJIWARA, T.; FUJIIUE, Y.; M; SAYAMA, K.; HASHIMOTO, K.; SUGAI, M. Increased resistance to cationic antimicrobial peptide LL-37 in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.61, n.6, p.1266-1269, 2008.

PACE, N. R. *et al.* Phylogenetic comparative analysis and the secondary structure of ribonuclease P RNA—A review. **Gene**, v. 82, p. 65-75, 1989.

PANTIC, J. M. *et al.* The potential of frog skin-derived peptides for development into therapeutically-valuable immunomodulatory agents. **Molecules**, v. 22, n. 12, 2017.

PARK, P. *et al.* Vesicle protrusion induced by antimicrobial peptides suggests common carpet mechanism for short antimicrobial peptides. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 9701, 2024.

PARK, Y.; LEE, D. G.; HAHM, K. S. HP(2-9)-magainin 2(1-12), a synthetic hybrid peptide, exerts its antifungal effect on *Candida albicans* by damaging the plasma membrane. **Journal of Peptide Science**, v. 10, p. 204-209, 2004.

PFALZGRAFF, A.; BRANDENBURG, K.; WEINDL, G. Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1-23, 2018.

POLAT, T. *et al.* New-generation biofilm effective antimicrobial peptides and a real-time anti-biofilm activity assay: CoMIC. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 316, 2024.

PORTO, W. F.; PIRES, A. S.; FRANCO, O. L. Computational tools for exploring sequence databases as a resource for antimicrobial peptides. **Biotechnology Advances**, v. 35, p. 337-349, 2017.

PUENTES, P. R. *et al.* Design, screening, and testing of non-rational peptide libraries with antimicrobial activity: *in silico* and experimental approaches. **Antibiotics**, v. 9, n. 12, p. 854, 2020.

REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 536-547, 2004.

REIMANN, M.; SCHIMTT, C. A. Apoptosis and Cancer Therapy. In: SRIVASTAVA, R. (Ed.). **Apoptosis, Cell Signaling and Human Diseases: Molecular Mechanisms**. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., v.1, 2007. cap. 13, p.303-319. ISBN 978-1-58829-677-1.

ROSALES, C. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 108, n. 1, p. 377-396, 2020.

SADREDINAMIN, M. *et al.* Antimicrobial peptides (AMPs). **Novelty in Biomedicine**, v. 4, n. 2, p. 70-76, 2016.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

SANTANA, C. J. C. *et al.* Biological properties of a novel multifunctional host defense peptide from the skin secretion of the chaco tree frog, *Boana raniceps*. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 790, 2020b. DOI: 10.3390/biom10050790.

SANTANA, C. J. C. *et al.* Figainin 1, a novel amphibian skin peptide with antimicrobial and antiproliferative properties. **Antibiotics**, v. 9, n. 9, p. 625, 2020a. DOI: 10.3390/antibiotics9090625.

SEKIYA, Y. *et al.* Channel current analysis estimates the pore-formation and the penetration of transmembrane peptides. **The Analyst**, v. 143, n. 15, p. 3540-3543, 2018.

SHAFFER, W. M.; QU, X.; WARING, A. J.; LEHRER, R. I. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.95, n.4, p.1829-1833, 1998.

SHAHROUR, H. *et al.* Potent antimicrobial activity of hydrogel loaded with the antimicrobial peptide, D-Bac8c2,5 Leu, against monospecies and polymicrobial biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, p. 1571649, 2025. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1571649.

SHARMA, C.; ROKANA, N.; CHANDRA, M.; SINGH, B. P.; GULHANE, R. D.; GILL, J. P. S.; RAY, P.; PUNIYA, A. K.; PANWAR, H. Antimicrobial resistance: its surveillance, impact, and alternative management strategies in dairy animals. **Frontiers in Veterinary Science**. v.4, n.237, p.1-27, 2018.

SHEN, D.; WU, B. Structure, biological properties and utilities of marine-derived antimicrobial peptides. **Current Organic Chemistry**, v. 18, p. 793-803, 2014.

SILVA, Í. C. Neutrófilos: Aspectos clássicos, plasticidade e novas funções imunorregulatórias. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 7, n. 1, p. 35-46, 2015.

SILVA, B. O. Síntese química e caracterização das propriedades biológicas do peptídeo antimicrobiano Raniseptina-BI 1 presente na secreção cutânea do anuro *Boana lundii*. 2021. Dissertação (mestrado) — Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

SPELLBERG, B. *et al.* The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 155-164, 2008.

TAN, P.; FU, H.; MA, X. Design, optimization, and nanotechnology of antimicrobial peptides: From exploration to applications. **Nano Today**, v. 39, p. 101229, 2021. DOI: 10.1016/j.nantod.2021.101229.



TANG, S. *et al.* Multi omics resources for the Australian southern stuttering frog (*Mixophyes australis*) reveal assorted antimicrobial peptides. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 3991, 2024.

TEIXEIRA, V. *et al.* Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 51, p. 149-177, 2012.

TENG, T. S. *et al.* Neutrophils and immunity: From bactericidal action to being conquered. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, 2017.

TRAVKOVA, O. G. *et al.* The interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 247, p. 521-532, 2017.

URQUHART, C. G. *et al.* Antimicrobial activity of water-soluble tetra-cationic porphyrins on *Pseudomonas aeruginosa*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 42, p. 103266, 2023.

VISHNEPOLSKY, B. *et al.* *De novo* design and *in vitro* testing of antimicrobial peptides against Gram-negative bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 2, p. 82, 2019.

WANG, C. *et al.* Real-time observation of antimicrobial polycation effects on *Escherichia coli*: adapting the carpet model for membrane disruption to quaternary copolyoxetanes. **Langmuir**, v. 32, n. 12, p. 2975-2984, 2016.

WANG, G. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. **Methods in Molecular Biology**, v. 1268, p. 43-66, 2015.

XI, B.; YU, N.; WANG, X.; XU, X.; ABASSI, Y. The application of cell-based label-free technology in drug discovery. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 4, p. 484-495, 2008. DOI: 10.1002/biot.200800020.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 27-55, 2003.

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. *Immunocontinuum*: perspectives in antimicrobial peptide mechanisms of action and resistance. **Protein and Peptide Letters**, v.12, n.1, p.49-67, 2005. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929866053405959>

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.

ZHANG, L.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Current Biology**, v. 26, n. 1, p. R14-R19, 2016.

ZHANG, Q.-Y. *et al.* Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. **Military Medical Research**, v. 8, n. 1, p. 48, 2021. DOI: 10.1186/s40779-021-00343-2.

ZHAO, A. *et al.* Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1137947, 2023. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1137947.

ZHAO, T. *et al.* Temporin-GHa derived peptide shows inhibitory efficacy against *Cutibacterium acnes* and alleviates inflammatory reactions in acne vulgaris. **International Immunopharmacology**, v. 157, p. 114756, 2025. DOI: 10.1016/j.intimp.2025.114756.

ZHOU, Y. *et al.* BAG6 inhibits influenza A virus replication by inducing viral polymerase subunit PB2 degradation and perturbing RdRp complex assembly. **PLOS Pathogens**, v. 20, p. e1012110, 2024. DOI: 10.1371/journal.ppat.1012110

ZHOU, Z.; LIN, S.; COTTER, R. J.; RAETZ, C. R. H. Lipid A Modifications characteristic of *Salmonella typhimurium* are induced by NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> in *Escherichia coli* K12. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, p.18503-18514, 1999.