



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**

***BIOPROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS
PRESENTES NA SECREÇÃO CUTÂNEA DO ANFÍBIO
Physalaemus centralis (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)***

ALUNO: JOÃO MARTINS BARBOSA

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. MARIANA S. CASTRO

Brasília-DF
2020



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**

***BIOPROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS
PRESENTES NA SECREÇÃO CUTÂNEA DO ANFÍBIO
Physalaemus centralis (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)***

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

ALUNO: JOÃO MARTINS BARBOSA

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. MARIANA S. CASTRO

Brasília-DF
2020



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**

JOÃO MARTINS BARBOSA

***BIOPROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS
PRESENTES NA SECREÇÃO CUTÂNEA DO ANFÍBIO
Physalaemus centralis (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)***

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Mariana de Souza Castro
Presidente
Departamento de Ciências Fisiológicas /IB
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart
Membro Titular
Departamento de Biologia Celular/IB
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Marcos Rodrigo Alborghetti
Membro Titular
Faculdade de Medicina
Universidade de Brasília

Dedico esse trabalho à minha avó Aldina, aos meus pais, Gardênia e Marcio, aos meus irmãos, Amaralina, Gabriel e Pedro (*in memoriam*) e a todos amigos e familiares que fizeram dele possível. Meus mais sinceros agradecimentos.

Agradecimentos

Nos últimos anos, uma pessoa tem desempenhado um papel muito especial na minha vida, o que me possibilitou dar os primeiros passos no meio acadêmico. Primordialmente, meus agradecimentos são direcionados à minha avó, Aldina Barbosa, pois sem ela, nada disso seria possível.

Agradeço imensamente à professora Mariana S. Castro por ter me aceitado como seu aluno durante essa fase, compartilhando conversas, experiência e seus conhecimentos. Isso não me fez apenas buscar o título de mestre. Mudou minha forma de observar a natureza de uma forma tão positiva e impactante que palavras não seriam o suficiente para agradecer tamanha transformação.

Meus mais profundos agradecimentos ao professor Osmindo Rodrigues Pires Júnior que desde o momento em que dei meus primeiros passos nesse caminho esteve presente ajudando de todas as formas possíveis. Desde o fornecimento de materiais ao compartilhamento de experiências de vida, o professor Osmindo acompanhou de perto de forma atenciosa o nascimento desse trabalho.

Tenho muito a agradecer também aos doutorandos do laboratório de Toxinologia, MSc. Carlos José C. de Santana e MSc. Ana Carolina M. Magalhães que se dedicaram a me ensinar os métodos e técnicas empregados na execução desse trabalho. Foram muitas horas de dedicação dispostas por eles e definitivamente esse trabalho não teria progresso algum sem a ajuda que me deram.

Ao Prof. Guilherme Brand e a todos os alunos e membros do Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas (LITMO/IQ-UnB), especialmente ao Samuel e à Fernanda, por terem compartilhado o espaço, estrutura, reagentes e conhecimentos sobre o processo de síntese química de peptídeos. Muito obrigado.

Meus sinceros agradecimentos à Dr^a. Amanda Souza e à Prof^a Sonia Maria de Freitas por auxiliarem com as avaliações de estrutura por dicroísmo circular e a interpretação dos dados.

Gostaria de agradecer também aos técnicos de laboratório Nuno, Jaques e Adolfo por terem concedido acesso a equipamentos e laboratórios, para que esse trabalho se concretizasse.

Agradeço aos amigos de laboratório, novos e antigos. Esses agradecimentos são especiais aos amigos Gislene Baptista, Isabelle Luz, Reynaldo Magalhães e Gabriel Freitas (que tem sido minha dupla nesses últimos dois anos). Todos estiveram ao meu lado durante essa missão me ajudando de várias maneiras possíveis,

Agradeço também à minha namorada, Tainá Ricchino, que tem sido minha maior

companheira, dividindo os bons e maus momentos que a vida nos proporciona.

Agradeço aos meus pais, Maria Gardêna e Marcio Barbosa, pelo incentivo de sempre aos estudos e por apoiarem minhas decisões.

A todos amigos e familiares que de alguma forma fizeram parte da minha vida, antes e durante esse momento, meus agradecimentos.

Apoio financeiro

A dissertação de mestrado intitulada “Bioprospecção de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anfíbio *Physalaemus centralis* (Anura: Leptodactylidae)” desenvolvida por João Martins Barbosa sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Mariana S. Castro teve o apoio financeiro do CNPq (processos no. 313855/2018-8 - Produtividade em Pesquisa e no. 407801/2013-8 - Rede Centro-Oeste de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação - REDE PRÓ-CENTRO-OESTE), da FAPDF (processo no. 193.000.955/2015 e no. 0193.001.736/2017), da CAPES (por meio da concessão de bolsa de estudos – mestrado), da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

Resumo

Infecções bacterianas ameaçam a saúde humana, revelando uma necessidade mundial associada à pesquisa e ao desenvolvimento de compostos com propriedades antibacterianas para tratar infecções, principalmente aquelas causadas por patógenos multi-resistentes, visto que o crescente número de organismos resistentes é uma das grandes ameaças à humanidade no século XXI. Estudos estimam que nos próximos 30 anos, 300 milhões de pessoas morrerão no mundo devido a doenças causadas por organismos resistentes, gerando um enorme impacto econômico. A primeira linha de defesa imunitária de vários seres vivos é composta por peptídeos antimicrobianos (PAMs). Peptídeos antimicrobianos são compostos que demonstram eficiência contra microrganismos resistentes a várias drogas comercialmente disponíveis. Os PAMs possuem mecanismos de atuação na membrana plasmática das bactérias (motivo que dificulta a seleção de mecanismos de resistência a esses compostos) e também mecanismos de atuação em nível intracelular, pela inativação de determinados processos celulares. O presente trabalho teve como objetivo identificar, purificar e caracterizar componentes da secreção cutânea do anuro *Physalaemus centralis* com ênfase na prospecção de peptídeos antimicrobianos para aplicações terapêuticas. No presente estudo, foram isolados e caracterizados quatro peptídeos, denominados PEP1_N4, PEP2_N5, PEP4_N6 e PEP5_N7, que apresentaram atividade antimicrobiana sobre bactérias patogênicas Gram-negativas e Gram-positivas e também sobre a levedura *Candida albicans*. Os peptídeos antimicrobianos isolados de *P. centralis* apresentam similaridades com peptídeos da família das nattererinas, peptídeos antimicrobianos isolados de espécie do mesmo gênero, *Physalaemus nattereri*. Ao se comparar as propriedades antimicrobianas desses dois grupos de peptídeos, os peptídeos de *P. centralis*, em alguns casos, mostraram-se mais eficientes, reduzindo a concentração necessária para inibir completamente o crescimento bacteriano pela metade. Análises de dicroísmo circular mostraram que um dos peptídeos já se apresenta estruturado em meio aquoso e que todos adotam conformação em α -hélice na presença do surfactante SDS. A elaboração de análogos usando tais peptídeos como modelo podem aprimorar sua eficiência contra patógenos e melhorar suas especificidades a fim de reduzir os possíveis efeitos adversos observados.

Palavras-chave: Anuros; *Physalaemus centralis*; secreção cutânea; peptídeos antimicrobianos; purificação; efeitos antimicrobianos.

Abstract

Bacterial infections threaten human health revealing a worldwide need associated with research and development of compounds with antibacterial properties to treat infections, especially those caused by multidrug-resistant pathogens, as the growing number of resistant organisms is one of the greatest threats to humanity in the century XXI. Studies estimate that in the next 30 years, 300 million people will die worldwide due to diseases caused by resistant organisms, under a huge economic impact. The first line of immune defense for several living beings is composed of antimicrobial peptides (AMPs). Antimicrobial peptides are compounds that demonstrate efficiency against microorganisms resistant to various commercially available drugs. AMPs have mechanisms of action on the plasma membrane of bacteria (which make it difficult to select mechanisms of resistance to these compounds) and also mechanisms of action at the intracellular level, due to the inactivation of certain cellular processes. The present work aimed to identify and characterize components of the cutaneous secretions of the anuran *Physalaemus centralis* with emphasis on prospecting antimicrobial peptides for therapeutic applications. Four peptides were isolated and characterized, named PEP1_N4, PEP2_N5, PEP4_N6 and PEP5_N7, which showed antimicrobial activity on Gram-negative and Gram-positive pathogenic bacteria and also on *Candida albicans* yeast cells. The antimicrobial peptides isolated from *P. centralis* are similar to peptides of the nattererin family, antimicrobial peptides isolated from a species of the same genus, *Physalaemus nattereri*. Comparing the antimicrobial properties of the peptides from both groups, the peptides from *P. centralis*, in some cases, proved to be more efficient, reducing the concentration needed to completely inhibit bacterial growth in half. Analysis of circular dichroism showed that one of the peptides was already structured in aqueous medium, and all of them adopt α -helical conformation in the presence of SDS surfactant. The production of analogues using such peptides as a model can improve their efficiency and specificities against pathogens in order to reduce the possible side effects observed.

Keywords: Anurans; *Physalaemus centralis*; skin secretion; antimicrobial peptides; purification; antimicrobial effects.

Sumário

1. Introdução	17
1.1. Anfíbios	17
1.2. <i>Physalaemus centralis</i>	17
1.3. Peptídeos Antimicrobianos.....	18
1.3.1. Mecanismos de Ação.....	20
1.4. Resistência Antimicrobiana.....	23
1.5. Síntese de Compostos Bioativos	24
1.5.1. Síntese Química de Peptídeos em Fase Sólida	25
2. Justificativa	27
3. Objetivo Geral	28
3.1. Metas Estabelecidas.....	28
4. Materiais e Métodos	29
4.1. Obtenção da Secreção Cutânea de <i>P. centralis</i>	29
4.2. Fracionamento Cromatográfico da Secreção Cutânea de <i>P. centralis</i>	29
4.3. Ensaio de Varredura para Detecção de Atividade Antimicrobiana	29
4.4. Purificação dos Peptídeos Antimicrobianos de <i>P. centralis</i>	30
4.5. Análise por Espectrometria de Massas tipo MALDI-TOF dos Peptídeos Antimicrobianos de <i>P. centralis</i>	30
4.6. Determinação das Estruturas Primárias dos Peptídeos Antimicrobianos de <i>P. centralis</i>	31
4.7. Síntese Química dos Peptídeos Antimicrobianos de <i>P. centralis</i>	31
4.7.1. Início da Síntese.....	31
4.7.2. Desproteção.....	32
4.7.3. Teste de Kaiser.....	32
4.7.4. Acoplamento de Aminoácidos.....	32
4.7.5. Clivagem.....	33
4.8. Quantificação das Versões Sintéticas dos Peptídeos Antimicrobianos de <i>P. centralis</i>	37
4.9. Análise por Dicroísmo Circular dos Componentes de Estrutura Secundária dos Peptídeos Antimicrobianos de <i>P. centralis</i>	37
4.10. Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Peptídeos de <i>P. centralis</i>	38
4.11. Avaliação da Atividade Hemolítica dos Peptídeos Antimicrobianos de <i>P. centralis</i>	38
4.12. Análises de Bioinformática	39

5. Resultados.....	40
6. Discussão	59
7. Conclusões.....	63
8. Perspectivas	64
9. Referências Bibliográficas.....	65

Lista de Figuras

Figura 1. (A) Área de distribuição de <i>P. centralis</i> segundo IUCN (2008). (B) Vista lateral de exemplar adulto de <i>P. centralis</i>	18
Figura 2. Diferentes estruturas adotadas por PAMs.....	19
Figura 3. Modelo de Shai-Matsuzaki-Huang.....	21
Figura 4. Modelos de permeabilização de membrana por PAMs formadores de α -hélice.....	22
Figura 5. Fatores que levam à disseminação de microrganismos resistentes e de genes de resistência a antibióticos.....	24
Figura 6. Modelo de uma resina e ilustração simplificada de modelo resina-aminoácido.....	26
Figura 7. Fluxograma do processo de síntese de peptídeos em suporte polimérico.....	34
Figura 8. Fluxograma do processo de clivagem.....	35
Figura 9. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção bruta de <i>P. centralis</i> em RP-HPLC.....	40
Figura 10. Perfis cromatográficos resultantes das recromatografias das frações identificadas como: A) PEP1_N4; B) PEP2_N5; C) PEP4_N6 e D) PEP5_N7.....	41
Figura 11. Espectros de massas dos peptídeos purificados que apresentaram atividade inibitória inicial sobre a bactéria <i>E. coli</i>	43
Figura 12. Alinhamento múltiplo das sequências dos peptídeos antimicrobianos de <i>P. centralis</i>	44
Figura 13. Perfis cromatográficos resultantes do processo de purificação dos peptídeos sintéticos. A) PEP1_N4; B) PEP2_N5; C) PEP4_6 e D) PEP5_N7.....	45
Figura 14. Projeções em roda helicoidal dos peptídeos antimicrobianos de <i>P. centralis</i> geradas pelo <i>software</i> online <i>NetWheels</i>	46
Figura 15. Alinhamento entre a sequência do peptídeo PEP1_N4, isolado da secreção cutânea de <i>P. centralis</i> , com as sequências dos peptídeos (A) nattererina 1, (B) nattererina 2 e (C) nattererina 3 de <i>P. nattereri</i>	47
Figura 16. Alinhamento entre a sequência do peptídeo PEP2_N5, isolado da secreção cutânea de <i>P. centralis</i> , com as sequências dos peptídeos (A) nattererina 1, (B) nattererina 2 e (C) nattererina 3 de <i>P. nattereri</i>	48

Figura 17. Alinhamento entre a sequência do peptídeo PEP4_N6, isolado da secreção cutânea de <i>P. centralis</i> , com as sequências dos peptídeos (A) nattererina 1, (B) nattererina 2 e (C) nattererina 3 de <i>P. nattereri</i>	49
Figura 18. Alinhamento entre a sequência do peptídeo PEP5_N7, isolado da secreção cutânea de <i>P. centralis</i> , com as sequências dos peptídeos (A) nattererina 1, (B) nattererina 2 e (C) nattererina 3 de <i>P. nattereri</i>	50
Figura 19. Alinhamento entre a sequência do peptídeo PEP1_N4, isolado da secreção cutânea de <i>P. centralis</i> , com as sequências dos peptídeos (A) Pc24 e (B) Pc28 de <i>P. cicada</i>	51
Figura 20. Alinhamento entre a sequência do peptídeo PEP2_N5, isolado da secreção cutânea de <i>P. centralis</i> , com as sequências dos peptídeos (A) Pc24 e (B) Pc28 de <i>P. cicada</i>	51
Figura 21. Alinhamento entre a sequência do peptídeo PEP4_N6, isolado da secreção cutânea de <i>P. centralis</i> , com as sequências dos peptídeos (A) Pc24 e (B) Pc28 de <i>P. cicada</i>	52
Figura 22. Alinhamento entre a sequência do peptídeo PEP5_N7, isolado da secreção cutânea de <i>P. centralis</i> , com as sequências dos peptídeos (A) Pc24 e (B) Pc28 de <i>P. cicada</i>	52
Figura 23. Espectros dicróicos na região distante da UV dos peptídeos de <i>P. centralis</i> em água (linha sólida) e em SDS 35 mM (linha pontilhada). (A) PEP1_N4; (B) PEP2_N5; (C) PEP4_N6 e (D) PEP5_N7.....	55
Figura 24. Efeito de concentrações decrescentes dos peptídeos isolados da secreção cutânea de <i>P. centralis</i> sobre o crescimento da bactéria Gram-negativa <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922).....	56
Figura 25. Efeito de concentrações decrescentes dos peptídeos isolados da secreção cutânea de <i>P. centralis</i> sobre o crescimento da bactéria Gram-negativa <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13882).....	56
Figura 26. Efeito de concentrações decrescentes dos peptídeos isolados da secreção cutânea de <i>P. centralis</i> sobre o crescimento da bactéria Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923).....	57
Figura 27. Efeito de concentrações decrescentes dos peptídeos isolados da secreção cutânea de <i>P. centralis</i> sobre o crescimento da bactéria Gram-positiva <i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228).....	57
Figura 28. Efeito de concentrações decrescentes dos peptídeos isolados da secreção	

cutânea de <i>P. centralis</i> sobre o crescimento da levedura <i>Candida albicans</i> (ATCC 14053).....	57
Figura 29. Efeito de concentrações decrescentes dos peptídeos isolados da secreção cutânea de <i>P. centralis</i> sobre eritrócitos humanos.....	58

Lista de Tabelas

Tabela 1. Lista de aminoácidos e suas quantidades utilizadas na síntese em escala de concentração de 0,15 mmol.L ⁻¹	36
Tabela 2. Estruturas primárias e características físico-químicas dos peptídeos antimicrobianos de <i>P. centralis</i>	44
Tabela 3. Conteúdo estimado de α -hélice (%) para os peptídeos antimicrobianos de <i>P. centralis</i> na presença de SDS 35 mM a 25°C.....	55
Tabela 4. Atividade antimicrobiana (MIC, μ M) dos peptídeos isolados da secreção cutânea de <i>P. centralis</i> sobre microrganismos patogênicos.....	58

Abreviações

APD – *Antimicrobial peptide database*

ARG – Genes de resistência a antibióticos, do inglês *Antibiotic Resistance Genes*

ATCC – Coleção americana de culturas típicas, do inglês *American Type Culture Collection*

BHI – Infusão cérebro-coração, do inglês *Brain Heart Infusion*

BLAST - Ferramenta de Pesquisa Básica de Alinhamento Local, do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*

CLSI – *Clinical & Laboratory Standards Institute*

Da – Dalton

DC – Dicroísmo circular

DCM – Diclorometano

DIPEA – *N,N'*-diisopropiletilamina

DMF - Dietilformamida

HBTU – Hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*

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

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, do inglês *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*.

MALDI-TOF – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – Tempo de Voo, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – time of flight*.

MIC – Concentração mínima inibitória, do inglês *Minimal Inhibitory Concentration*.

Min – Minuto

Nm – Nanometro

PAM – Peptídeo antimicrobiano

RP-HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, do inglês *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*.

TFA – Ácido trifluoroacético, do inglês *Trifluoroacetic Acid*

TFE - Tetrafluoretileno

SDS - Dodecil sulfato de sódio, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*

SPPS – Síntese de peptídeos em fase sólida, do inglês, *Solid Phase Peptide Synthesis*

v/v – Volume/volume

μg – Micrograma

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

μM – Micromolar

1. Introdução

1.1. Anfíbios

Com número aproximado de 8.121 espécies, a classe Amphibia possui três ordens (Anura, Caudata e Gymnophiona), sendo os Anuros os mais diversos, contendo 7.166 espécies (Frost, 2020). A Sociedade Brasileira de Herpetologia cita, no ano de 2016, 1.080 espécies de anfíbios presentes no território legal brasileiro, sendo dessas, 1.039 pertencentes à ordem Anura (Segalla *et al.*, 2016).

A priori, anfíbios podem parecer criaturas indefesas, fazendo parte da alimentação de vários predadores, porém, o processo evolutivo a qual esse grupo foi submetido selecionou diferentes recursos fisiológicos, morfológicos e comportamentais, que auxiliam a sobrevivência dos indivíduos desse grupo. Culturas humanas ao redor do globo acreditam nas propriedades medicinais das secreções dos anfíbios, desde a prevenção de doenças até como uso afrodisíaco (Gomes *et al.*, 2007).

Os anfíbios são considerados um grupo ancestral, representantes dos primeiros vertebrados terrestres e que sobreviveram à extinção em massa ocorrida no final do Período Cretáceo, mas podem se encontrar atualmente em riscos de extinção. Estudos de 2004 e 2008 mostram riscos de extinção de 40% das espécies de todos os anfíbios e indicativos de uma sexta extinção em massa. As três ordens da classe Amphibia são morfológicamente distintas, porém elas compartilham uma característica em comum muito importante, sua pele é seu principal órgão respiratório e produz extensa gama de biomoléculas em suas secreções (Wake & Koo, 2018).

Existem dois tipos de glândulas cutâneas nos anfíbios: **1)** glândulas mucosas, onde é produzido e secretado o muco que auxilia na regulação térmica, na reprodução, na respiração, na defesa, entre outras funções e **2)** glândulas granulosas, responsáveis pela produção de toxinas e substâncias repelentes, sendo também um dos principais elementos de sua defesa. Vários compostos ativos como peptídeos, alcaloides, aminas biogênicas e esteroides são encontrados no tecido cutâneo de muitos anfíbios podendo exibir diversas propriedades farmacológicas: cardiotoxica, hemotóxica, miotóxica, anestésica, neuroativa, dentre outras (Toledo & Jared, 1995; Nascimento, 2007; Guimarães *et al.*, 2016).

1.2. *Physalaemus centralis*

Physalaemus centralis é um anfíbio representante da ordem Anura que está

associado ao Bioma Cerrado, Pantanal e Mata-Atlântica tendo sua distribuição geográfica mapeada nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Norte do Brasil, habitando altitudes maiores que 1.000 metros em relação ao nível do mar. Essa espécie também é encontrada em outros países da América do Sul como Paraguai e Bolívia (Brandão *et al.*, 1997; Kokubum & Menin, 2002; Brusquetti & Lavilla, 2006; Brasileiro *et al.*, 2008).

A espécie *P. centralis* tem coloração padrão cinza, porém podendo variar entre tons de vermelho e “creme” (Bokermann, 1962). Outras características descritas para esse organismo foram a cabeça larga, tímpano com aproximadamente metade do tamanho do diâmetro ocular, braços fortes e saco vocal largo (Bokermann, 1962) (Figura 1).

(A)



(B)



Figura 1. (A) Área de distribuição de *P. centralis* segundo IUCN (2008). (B) Vista lateral de exemplar adulto de *P. centralis*, Estancia Laguna Blanca, Departamento San Pedro (Helen Pheasey, 2012). <http://www.faunaparaguay.com/physalaemuscentralis.html> (acesso em fevereiro de 2019).

1.3. Peptídeos Antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos ou PAMs, como também são conhecidos, estão presentes em animais, plantas, fungos, insetos e até mesmo em microrganismos. Esses peptídeos de defesa do hospedeiro podem ser considerados como elementos ancestrais da imunidade, derivados do processo evolutivo e universais, por terem sido encontrados em todas as plantas e animais nos quais já foram procurados tais compostos (Tossi *et al.*, 1997). Essa classe de moléculas demonstrou eficiência contra microrganismos resistentes a várias drogas devido ao seu diferenciado mecanismo de atuação na membrana plasmática das bactérias, exibindo uma interação distinta da maioria dos antibióticos comercialmente disponíveis (Tavares *et al.*, 2013).

Peptídeos antimicrobianos são uma classe diversa, com mais de 2.800 exemplares descritos até o ano de 2018. Podem ser classificados de diferentes formas como por

suas estruturas tridimensionais (Figura 2), estruturas primárias ou mecanismos de ação (Kumar *et al.*, 2018). A classificação baseada na organização estrutural desses peptídeos resulta em três subclasses:

a) peptídeos com estrutura em α -hélice – esses peptídeos geralmente não possuem estrutura em meio aquoso, porém, adquirem essa conformação quando em contato com membranas celulares ou em contato com agentes indutores de α -hélice com TFE (2,2,2-trifluoretanol) ou surfactantes como SDS (Dodecil sulfato de sódio) (Blondelle *et al.*, 1999).

b) peptídeos com estrutura em folhas β – esse grupo inclui peptídeos como as defensinas e protegrinas. Grande parte dos peptídeos estruturados em folhas β contém resíduos de cisteína, o que acaba gerando pontes dissulfeto, garantido estabilidade estrutural e reduz possíveis degradações por proteases (Dhople *et al.*, 2006).

c) peptídeos com estrutura em espiral estendido ou *random coils* – a maioria dos PAMs com essa estruturação são da família das catelicidinas e possuem dois ou mais resíduos de prolina, reconhecidas por quebrar estruturas secundárias como α -hélice e folhas β (Nelson *et al.*, 2013).

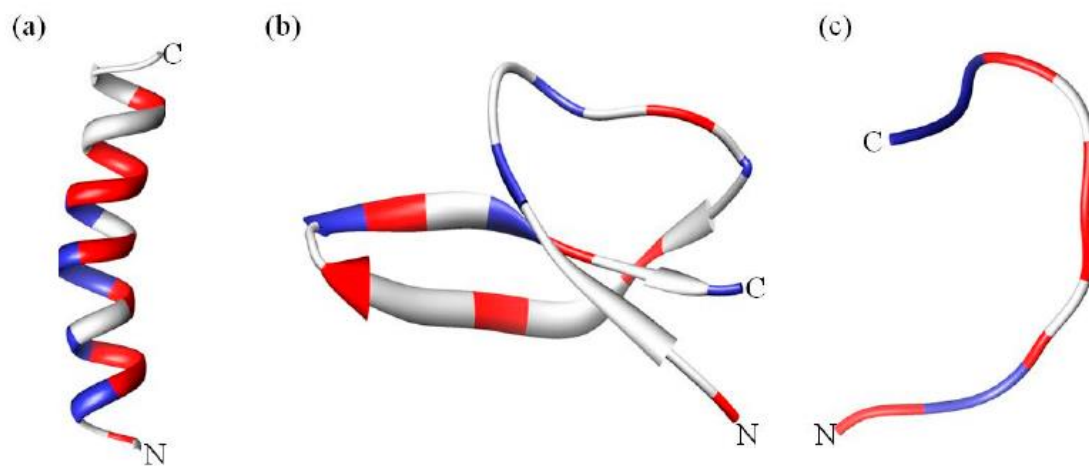


Figura 2. Diferentes estruturas adotadas por PAMs. Em (a) temos uma magainina com estrutura em α -hélice; (b) uma defensina-5 humana em conformação de folhas β e em (c) uma indolicidina em espiral estendido. Regiões indicadas pela cor vermelha indicam áreas hidrofóbicas dos peptídeos enquanto regiões em azul, porções carregadas positivamente. Imagens geradas com o uso do software CHIMERA (Retirado de Kumar *et al.*, 2018).

Esses peptídeos apresentam características comuns como pequena cadeia peptídica, contendo de 10 a 50 resíduos de aminoácidos, anfipaticidade, aproximadamente 50% dos resíduos de aminoácidos que os compõem são hidrofóbicos, e cationicidade, com

cargas variando de +2 até +11, o que favorece a ação antimicrobiana visto que bactérias possuem membranas plasmáticas negativamente carregadas, facilitando a interação eletroestática com os PAMs. Peptídeos antimicrobianos possuem uma extensa gama de propriedades distintas e são pesquisados não apenas como antibióticos, mas também como drogas antitumorais, antivirais, imunomoduladoras e antiparasitárias (Yeaman *et al.*, 2003; Hancock & Sahl, 2006; Tempone *et al.*, 2007; Melo *et al.*, 2009; Pasupuleti *et al.*, 2012; Guimarães *et al.*, 2016).

Nas últimas décadas, pesquisadores têm realizado intensas buscas por compostos que possuem potencial antimicrobiano oriundos de secreções cutâneas de anuros para utilizá-los em aplicações terapêuticas, como os peptídeos antimicrobianos isolados das espécies *Rana okinavana* (Conlon *et al.*, 2005) e *Rana dybowskii* (Xiao *et al.*, 2014). Várias espécies de anuros têm sido exploradas na busca por soluções mais eficientes no combate a infecções por patógenos humanos e, principalmente, em função da crescente resistência aos antibióticos convencionais.

1.3.1. Mecanismos de Ação

Como descrito por Zasloff (2002), os PAMs possuem mecanismos de ação na membrana plasmática das bactérias, motivo que dificulta a seleção de mecanismos de resistência a esses compostos, apesar da exposição constante ao longo da evolução. Peptídeos antimicrobianos têm sido foco de investigação nos últimos anos como uma possível nova classe de antibióticos usados contra organismos multirresistentes. Apesar de certos mecanismos de atuação serem bem elucidados, ainda existe um baixo entendimento sobre os princípios fundamentais das ações de PAMs (Wimley & Hristova, 2011).

É importante compreender os mecanismos de atuação dos PAMs para facilitar o futuro desenvolvimento de agentes terapêuticos. Acreditava-se que o único mecanismo de atuação dos peptídeos antimicrobianos eram sobre as membranas plasmáticas dos patógenos, porém, atualmente sabe-se que PAMs não atuam apenas na membrana plasmática de bactérias, mas também possuem efeitos intracelulares como na inativação de ácidos nucleicos e proteínas citoplasmáticas. Microscopia confocal mostrou que a magainina 2 biotinizada adere à membrana celular enquanto buforina II biotinizada acumula-se no citoplasma bacteriano (Park *et al.*, 1998).

O modelo de Shai-Matsuzaki-Huang explica a atuação da maioria dos PAMs

(Figura 3) (Zasloff, 2002; Brogden, 2005).

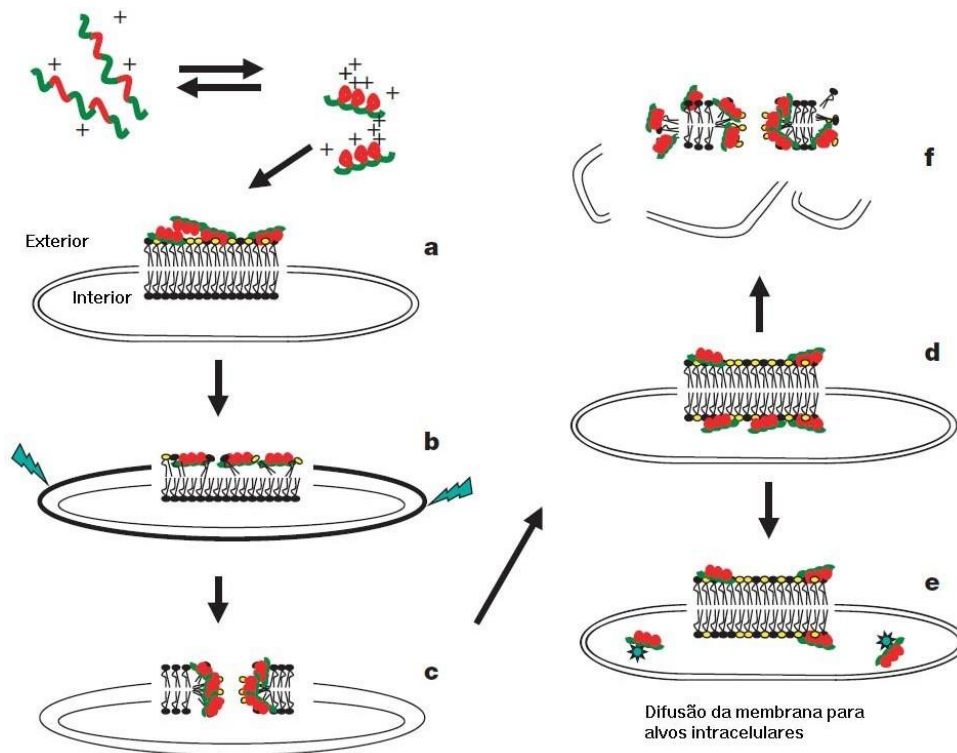


Figura 3. Modelo de Shai-Matsuzaki-Huang, ilustrando o mecanismo de atuação de PAMs. **a)** Formação do “carpete” na região externa da célula. **b)** Integração dos peptídeos afinando a camada externa por expansão (representado pelas setas irregulares). **c)** Formação de poros transitórios na membrana. **d)** Transporte de lipídeos e peptídeos para a camada interna. **e)** Difusão dos peptídeos para alvos intracelulares (em alguns casos). **f)** Colapso da membrana e fragmentação celular (Retirado de Zasloff, 2002, com adaptações).

Os modelos mais simples de permeação de membranas envolvem a formação de poros. O processo inicia-se com a adsorção dos peptídeos na membrana celular, adquirindo sua estrutura secundária, gerando a expansão da membrana e o afinamento do núcleo lipídico hidrofóbico.

No modelo *barrel-stave* (Figura 4a), os peptídeos antimicrobianos orientam-se paralelamente à membrana e, em seguida, perpendicularmente à mesma, em pequenos agregados formando os poros. Regiões hidrofóbicas dos peptídeos permanecem na região externa do poro, interagindo com as cadeias hidrofóbicas dos fosfolipídios, enquanto o lúmen do poro é revestido pelas regiões hidrofílicas (Toke, 2005). Outro modelo de formação de poros nas membranas bacterianas são os poros toroidais (Figura 4c). O acúmulo dos peptídeos na membrana bacteriana induz uma curvatura da bicamada lipídica e o poro formado é feito parcialmente dos peptídeos e parte pelos

próprios fosfolipídios da membrana, não havendo interação direta entre os peptídeos (Wimley, 2010; Kumar *et al.*, 2018).

Outro mecanismo de ação dos PAMs nas membranas bacterianas são a formação do modelo conhecido como *carpet-like* (Figura 4b). Nesse caso, quando o acúmulo de PAMs nas superfícies dos fosfolipídeos atinge um limiar crítico de concentração a o processo de permeação é disparado, ocorrendo a perda da integridade da membrana, causando sua ruptura e desintegração em micelas. A formação das micelas também fica reconhecida como modelo detergente ou *detergent-like model* (Toke, 2005; Kumar *et al.*, 2018).

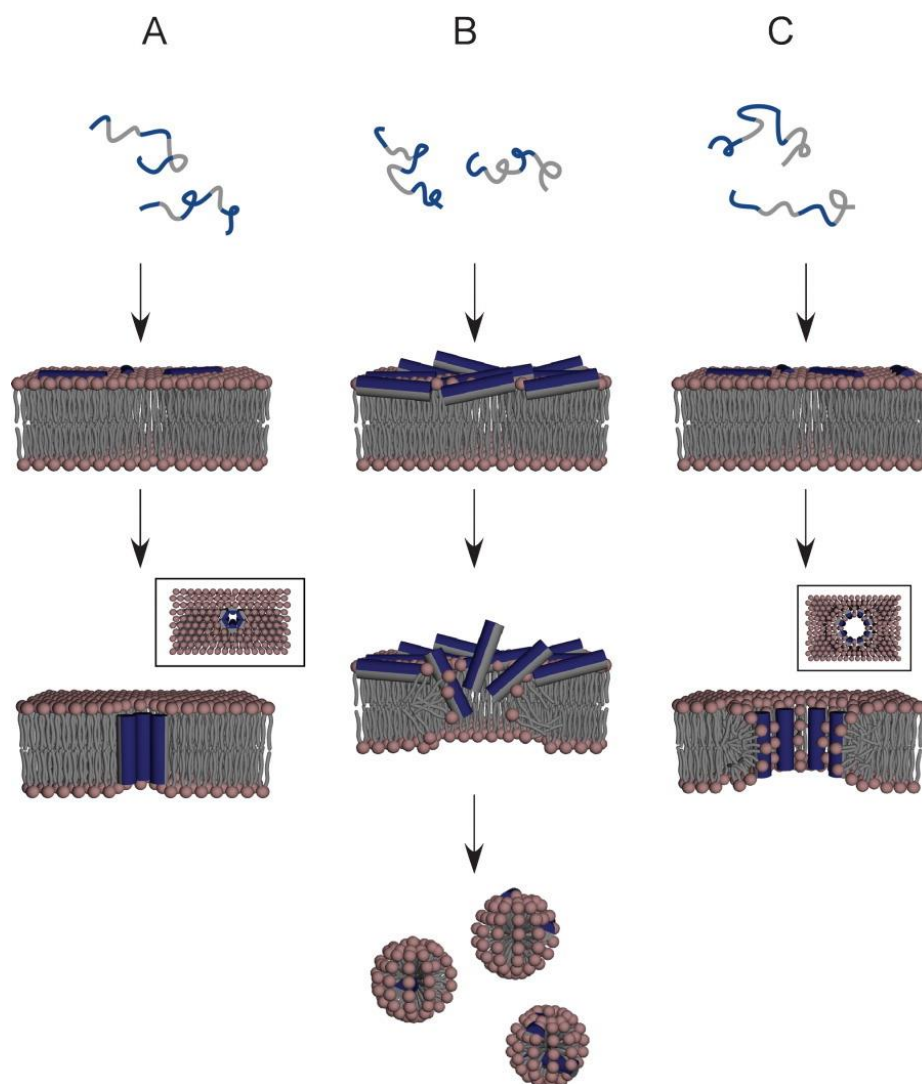


Figura 4. Ilustração demonstrando os modelos de permeabilização de membrana por PAMs formadores de α -hélice. **A)** Formação de poro tipo *barrel-stave*. **B)** Disrupção da membrana por interação *carpet-like*. **C)** Formação de poro toroidal. Regiões azuis dos PAMs representam porções hidrofílicas, enquanto regiões cinzas representam as hidrofóbicas (Retirado de Toke, 2005).

1.4. Resistência Antimicrobiana

Infecções bacterianas ameaçam a saúde humana, revelando uma necessidade mundial associada à pesquisa e ao desenvolvimento de compostos com propriedades antibacterianas para tratar infecções, principalmente aquelas causadas por patógenos multirresistentes, visto que o crescente número de organismos resistentes é uma das grandes ameaças à humanidade no século XXI (Hernández-Aponte *et al.*, 2011; Vikesland *et al.*, 2019). Estudos apontam que entre os anos de 2014 e 2016, aproximadamente um milhão de pessoas morreram devido a infecções causadas por organismos multirresistentes e projeções apontam que, até o ano de 2050, esse número será aproximadamente de 300 milhões de mortes (Vikesland *et al.*, 2019). Outros estudos estimam que nos próximos 30 anos, 2,4 milhões de pessoas morrerão por infecções bacterianas resistentes aos antibióticos convencionais na América do Norte, Europa e Austrália a um custo de 3,5 bilhões de dólares por ano nessas regiões segundo a OECD (*The Organisation for Economic Co-Operation and Development*). Na Europa, estudos mostram que 39% das infecções bacterianas causadas por organismos resistentes são promovidas por organismos resistentes à última linha de antibióticos, sendo muito difícil ou praticamente impossível o tratamento. O quadro torna-se ainda mais grave em regiões menos desenvolvidas, como no Brasil, onde as taxas de crescimento de organismos resistentes são mais altas e enfrentam números ainda maiores de infecções causadas por organismos resistentes (Hofer, 2019).

O aumento de resistência antimicrobiana resulta em maiores dificuldades no tratamento de infecções bacterianas. Com isso, são empregadas no tratamento drogas cada vez mais caras, menos eficientes e mais tóxicas (French, 2005). Nos últimos 30 anos, a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos não têm acompanhado o risco atrelado a doenças causadas por infecções bacterianas. Combinando o alto custo, risco financeiro e redução dos investimentos, desenvolver uma nova classe de antibióticos tem se mostrado cada vez mais difícil, fazendo com que companhias farmacêuticas acabem por deixar este campo de pesquisa voluntariamente ou por necessidades econômicas (Singer *et al.*, 2019).

Os fatores que levam à propagação global de microrganismos resistentes e genes de resistência a antibióticos (ARGs) são complexos e ainda pouco entendidos (Figura 5), mas são atribuídos primeiramente ao uso excessivo de antibióticos no meio

clínico e na agricultura (Vikesland *et al.*, 2019), assim como na produção de alimentos, aos fracos sistemas de prevenção e controle de infecções e à distribuição de medicamentos de baixa qualidade. Essa conjunção de fatores tem levado a níveis alarmantes no número de bactérias resistentes a antibióticos (Theuretzbacher & Toney, 2006; Årdal *et al.*, 2019).

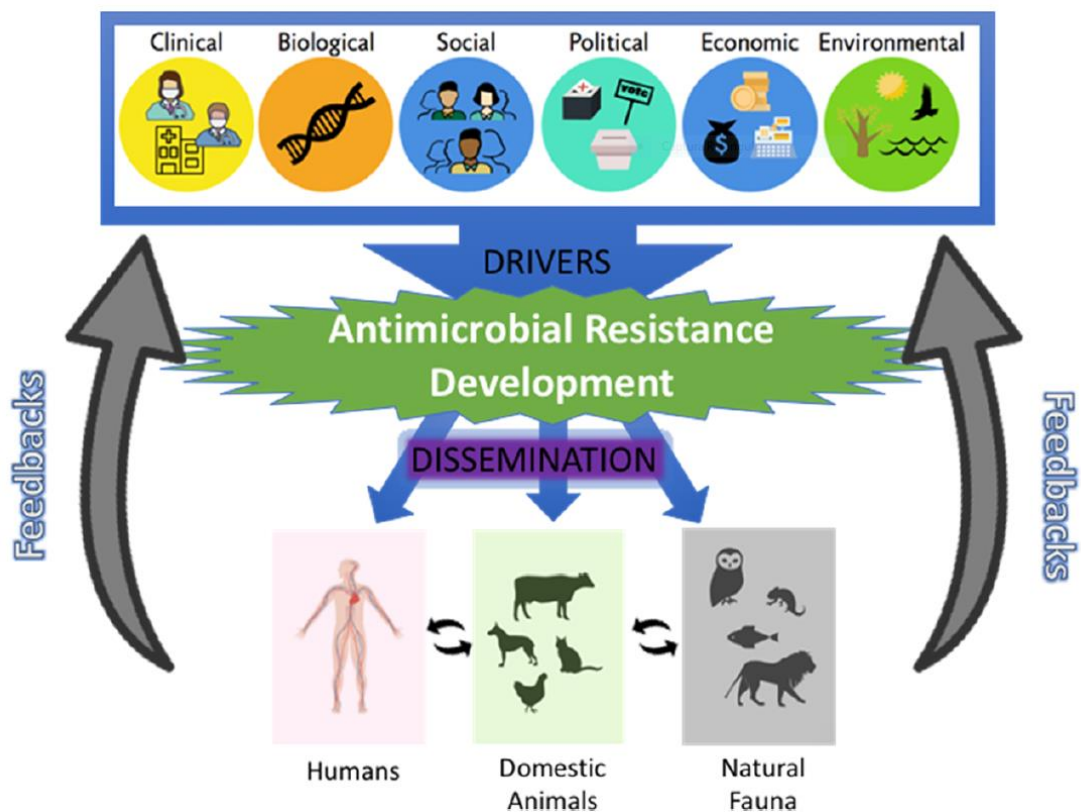


Figura 5. Fatores que levam à disseminação de microrganismos resistentes e de genes de resistência a antibióticos. A resistência antimicrobiana é um fenômeno impulsionado por aspectos clínicos, biológicos, sociais, políticos, econômicos e ambientais e afeta não apenas os seres humanos, mas também animais e ecossistemas. (Retirado de Vikesland *et al.*, 2019).

1.5. Síntese de Compostos Bioativos

O estudo de peptídeos biologicamente ativos está condicionado a disponibilidade do material para análise. Por vezes, fontes naturais são muitas vezes pobres em compostos bioativos de interesse terapêutico, fato que dificulta seu isolamento e a obtenção de quantidades satisfatórias para a execução de estudos envolvendo a caracterização de suas propriedades biológicas. Para exemplificar melhor, de 3,4 g de pele seca do anuro *Rana ornativentris*, é possível isolar apenas 37 nmol de brevinina-2Oa e 580 nmol de brevinina-2Ob, dois peptídeos antimicrobianos presentes

na pele dessa espécie (Kim *et al.*, 2001).

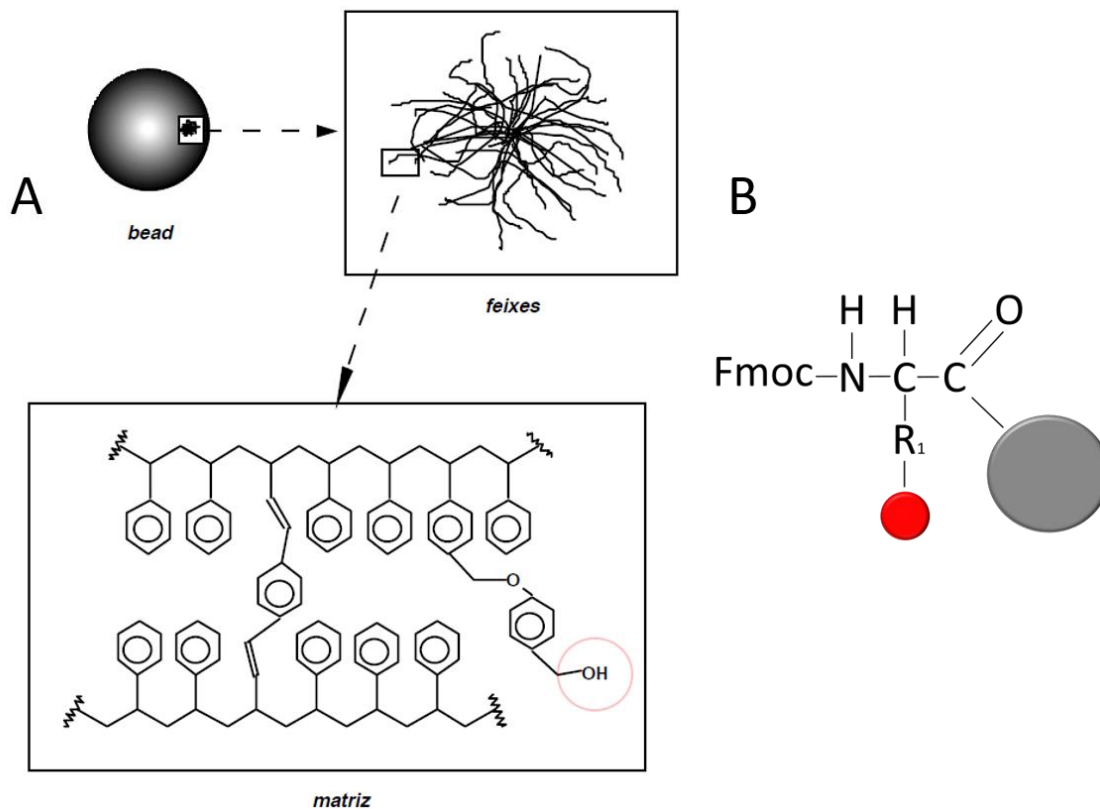
Tendo em vista que peptídeos sintéticos exibem propriedades biológicas equivalentes aos peptídeos naturais, a estratégia de síntese química de peptídeos em fase sólida torna-se bastante atraente para a sua produção em quantidades suficientes para que estudos aprofundados de caracterização biológica e funcional possam ser conduzidos (Machado *et al.*, 2004).

1.5.1. Síntese Química de Peptídeos em Fase Sólida

A síntese química de peptídeos em fase sólida (SPFS) ocorre da direção C-terminal para a N-terminal da cadeia polipeptídica. Uma das estratégias usadas é a Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonila) como proteção das porções N-terminais, que é estável ao TFA, porém lábil a bases orgânicas. Não apenas a região N-terminal é protegida pelo grupo Fmoc, como as cadeias laterais dos aminoácidos são protegidas por diferentes grupos estáveis como a t-butiloxicarbonila, o tritil e a t-butila. A construção da cadeia peptídica pode ser feita adicionando-se aminoácidos individuais ou fragmentos de peptídeos menores com suas cadeias laterais ainda protegidas. A técnica de SPFS é muito bem estabelecida e aplicável a qualquer sequência e pela sua proposição e aperfeiçoamento, Robert Bruce Merrifield foi contemplado com o prêmio Nobel de Química em 1984, com a síntese da bradiginina (Machado *et al.*, 2004).

Partindo desses primeiros estudos, ao longo dos anos, o campo da síntese de biomoléculas em suportes físicos têm evoluído e se aprimorado cada vez mais. Com pesquisas cada vez mais frequentes nesse campo, o volume de trabalhos publicados e o conhecimento acerca desse assunto vêm se tornando vasto e sendo aplicado a diferentes classes de moléculas como nucleotídeos (Gordon & Kerwin, 1998) e sacarídeos (Rademann & Schimidt, 1996).

Um dos suportes para SPFS bastante utilizado é a resina Wang. As resinas são estruturas complexas, formadas por polímeros retilíneos com ligações cruzadas (*cross-linking*) feitas por um monômero bifuncional (Carey, 1996), resultando geralmente em uma estrutura esférica (*beads*) (Figura 6). A composição da resina Wang é feita por polivinilbenzeno/poliestireno (PVB/PS), tendo como ligante um grupamento $-CH_2OH$ (Marquardt & Lima, 2004).



2. Justificativa

Infecções bacterianas ameaçam a saúde humana, intensificando a demanda por pesquisas voltadas ao desenvolvimento de compostos com propriedades antibacterianas para tratar infecções, principalmente aquelas causadas por patógenos multirresistentes (Hernández-Aponte *et al.*, 2011). Países subdesenvolvidos são os mais afetados por doenças infecciosas, sendo tal situação agravada pelo uso abusivo de antibióticos (Oliveira & Lacerda, 2014).

O Brasil possui a maior riqueza do mundo em espécies de anfíbios (Segalla *et al.*, 2016), o que torna o país um interessante território para bioprospecção de PAMs com possíveis aplicações no tratamento de doenças infecciosas. Até o ano de 2007, o banco de dados Uniprot continha 679 registros de peptídeos oriundos de pele ou secreções cutâneas de anfíbios, onde 94% de todos os peptídeos isolados de anfíbios eram restritos a apenas três famílias: Bombinatoridae, Hylidae e Ranidae (Nascimento, 2007). Com o passar dos anos, outras famílias de anuros passaram a ser estudadas, porém, como é evidenciado na revisão realizada por Ladram & Nicolas (2016), dos mais de mil peptídeos antimicrobianos identificados (banco de dados APD) da secreção cutânea de anfíbios, apenas 16 pertencem à família Leptodactylidae, descontando as nattererinas e os peptídeos recentemente isolados da espécie *Physalaemus cicada* (Baptista, 2019). Isso revela que estudos sobre os PAMs da família Leptodactylidae ainda são pouco explorados e o presente projeto representa uma oportunidade de aumentar os conhecimentos sobre os recursos genéticos dessa família de anuros, sendo que *Physalaemus centralis* é um dos seus representantes, tornando-o alvo potencial de novas descobertas.

3. Objetivo Geral

Identificar, isolar e caracterizar componentes das secreções cutâneas do anuro *Physalaemus centralis* (Bokermann, 1962) com ênfase na prospecção de peptídeos antimicrobianos com potencial terapêutico.

3.1. Metas Estabelecidas

1. Coleta de animais e extração da secreção cutânea de *P. centralis* por estimulação elétrica.
2. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea do anuro *P. centralis* por RP-HPLC.
3. Identificação das frações cromatográficas com atividades antimicrobianas.
4. Purificação cromatográfica dos peptídeos com atividades antimicrobianas.
5. Determinação das massas moleculares dos peptídeos antimicrobianos de *P. centralis* por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF.
6. Determinação das estruturas primárias dos peptídeos antimicrobianos de *P. centralis* por sequenciamento automático empregando-se degradação de Edman.
7. Análises de similaridades dos peptídeos antimicrobianos de *P. centralis* com outros peptídeos antimicrobianos já caracterizados.
8. Síntese química dos peptídeos antimicrobianos de *P. centralis*.
9. Determinação das concentrações inibitórias mínimas (MIC) dos peptídeos antimicrobianos de *P. centralis* sobre bactérias e fungos patogênicos.
10. Avaliação dos efeitos citolíticos dos peptídeos antimicrobianos de *P. centralis* sobre eritrócitos humanos.
11. Análise dos peptídeos antimicrobianos de *P. centralis* por métodos de bioinformática.
12. Determinação dos componentes de estrutura secundária dos peptídeos antimicrobianos de *P. centralis* por dicroísmo circular.

4. Materiais e Métodos

4.1. Obtenção da Secreção Cutânea de *P. centralis*

Exemplares adultos de *Physalaemus centralis* foram coletados na Fazenda Nossa Senhora Aparecida, município de Monte Alegre de Goiás, Goiás, região de divisa com Tocantins, durante o período noturno. A identificação da espécie foi baseada em sua vocalização e no reconhecimento visual. A secreção foi obtida por meio de estimulação com corrente elétrica branda, incapaz de ferir os animais, respeitando as normas estabelecidas pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) sob licença cadastrada no SISBIO nº 65370-1.

A secreção foi lavada de seus corpos com água deionizada e foram congeladas, liofilizadas e armazenadas a -20°C até o momento do fracionamento por RP-HPLC.

4.2. Fracionamento Cromatográfico da Secreção Cutânea de *P. centralis*

Alíquotas de 10 mg de secreção bruta de *Physalaemus centralis* liofilizada foram solubilizadas em 1 mL de fase móvel A (TFA 0,1% (v/v) em água deionizada) com a ajuda de um agitador de tubos tipo vórtex e centrifugadas por 10 minutos a 16.000 g para a separação de fases. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em filtros Millex 0,22 µm. Um volume de 200 µL foi aplicado em uma coluna de fase-reversa C₁₈ (Vydac 218TP54, 5µm, 4,6 x 250 mm), previamente equilibrada com fase móvel A, com fluxo de 1mL/min e detecção espectrofotométrica em 216 nm. A eluição foi realizada com o emprego de um gradiente de incremento linear de acetonitrila (fase móvel B: TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila) de 0 a 60% em 60 min e de 60 a 100% em 10 min, totalizando 70 min. As frações eluídas foram coletadas manualmente em tubos de polipropileno de 1,5 mL, secas em concentrador a vácuo e armazenadas a -20°C para uso futuro.

4.3. Ensaio de Varredura para Detecção de Atividade Antimicrobiana

Para identificar possíveis componentes da secreção de *P. centralis* com atividade antimicrobiana, foram realizados ensaios preliminares de varredura com as frações cromatográficas eluídas durante o fracionamento da secreção bruta. Nesses ensaios foram utilizadas as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva). Alíquotas de 200 µL de suspensão bacteriana do Banco de Culturas do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília foram cultivadas em meio Muller Hinton em tubos de 15 mL sob agitação e temperatura (37°C) constantes por 24h. A densidade óptica da cultura

após as 24h foi avaliada em espectrofotômetro (UV-M51, Bel Photonics, Brasil) com leitura a 625 nm e com ajuste da densidade celular tendo como referência a absorvância próxima de 0,1. Após o ajuste, foi realizada diluição de 1:200 das culturas bacterianas, seguindo o protocolo de ensaio antibacteriano definido pelo CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute).

Cada fração cromatográfica obtida com o fracionamento da secreção cutânea de *P. centralis* (62 frações) foi ressuspendida em 60 µL de água deionizada e agitada em agitador tipo vórtex. Alíquotas de 50 µL de cada fração foram transferidas para os poços de placas de 96 poços de fundo chato. Em seguida, foram adicionados 50 µL do inóculo bacteriano, que foi mantido em estufa microbiológica por 22h com temperatura de 37°C. Para controle positivo usou-se 50 µL de água deionizada com 50 µL de cultura bacteriana e como controle negativo 50 µL de formaldeído 0,8% (v/v) com 50 µL de cultura bacteriana. Após o período de 22h, a taxa de inibição de crescimento bacteriano foi avaliada em leitora de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific, San Jose, CA) por densidade óptica a 620 nm.

4.4. Purificação dos Peptídeos Antimicrobianos de *P. centralis*

Tendo identificado as frações cromatográficas com capacidade inibitória sobre o crescimento das bactérias utilizadas, tais frações foram submetidas ao procedimento de recromatografia para a remoção de quaisquer contaminantes presentes nas amostras. A recromatografia foi realizada em coluna C₁₈ (Kinetex 5µ XB-C₁₈, 100 Å, 4,6 x 250 mm) previamente equilibrada com fase móvel A. A eluição da amostra foi feita com fluxo de 1mL/min e detecção espectrofotométrica em 216 nm utilizando gradiente de incremento da fase móvel B, onde nos cinco primeiros minutos a concentração de solução B era igual a 0%, nos próximos 10 minutos ocorre o aumento de 0 a 40%, sendo que a partir desse ponto a concentração do solvente B se manteve constante até o término da corrida cromatográfica de duração de 30 min. O procedimento foi repetido diversas vezes a fim de acumular material suficiente para os experimentos subsequentes. As frações eluídas foram coletadas manualmente em tubos de polipropileno de 1,5 mL, secas em concentrador a vácuo e armazenadas a -20°C para uso futuro.

4.5. Análise por Espectrometria de Massas tipo MALDI-TOF dos Peptídeos Antimicrobianos de *P. centralis*

As frações cromatográficas que exibiram atividade antimicrobiana foram

analisadas em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF modelo Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) operado no modo positivo e com emprego do refletor para determinar as massas moleculares dos componentes presentes e avaliar o seu grau de pureza para realização das etapas subsequentes.

Das frações de interesse, foi coletado 1 µL após reconstituição em acetonitrila 50% (v/v) em água deionizada, aplicadas em placa de aço inoxidável própria do equipamento, em duplicata, para análise com diferentes matrizes ionizantes (1 µL), ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) e ácido sinapínico (SA). Antes das análises, o espectrômetro de massas foi previamente calibrado utilizando-se o padrão Peptide Calibration Standard II (Bruker, Alemanha). As análises foram realizadas na faixa de m/z de 750 a 4000.

4.6. Determinação das Estruturas Primárias dos Peptídeos Antimicrobianos de *P. centralis*

As estruturas primárias dos peptídeos antimicrobianos isolados a partir da secreção cutânea de *P. centralis* foram determinadas em sequenciador automático PPSQ-31A/33A (Shimadzu, Japão) por degradação de Edman seguindo o protocolo do fabricante.

4.7. Síntese Química dos Peptídeos Antimicrobianos de *P. centralis*

De modo a viabilizar a execução das etapas de caracterização estrutural e biológica dos peptídeos antimicrobianos de *P. centralis*, foi realizada a síntese química em fase sólida (SPPS) dos peptídeos empregando o método Fmoc/tBu (Chan & White, 2000). Os fluxogramas apresentados nas figuras 7 e 8 ilustram passo a passo a metodologia aplicada na síntese dos peptídeos de interesse.

4.7.1. Início da Síntese

A síntese foi realizada em escala de concentração de 0,15 mmol.L⁻¹. Trezentos e noventa e quatro miligramas (394 mg) de resina Wang previamente acoplada com o resíduo de aminoácido Alanina (resíduo C-terminal de cada peptídeo a ser sintetizado) foram pesados para cada peptídeo.

A resina passou pelo processo de inchamento, adicionando-se aproximadamente 3 mL de diclorometano (DCM) ao vaso de reação contendo resina Wang, mantendo-o sob agitação constante (200 rpm) por 30 minutos.

Decorrido esse intervalo de tempo, a resina foi lavada com dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM).

4.7.2. Desproteção

O resíduo de aminoácido presente na resina encontra-se com sua região N-terminal protegida por um grupamento Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonil), o qual impede o acoplamento de outros resíduos de aminoácidos. A desproteção ou remoção desse grupamento foi feita com 4-metilpiperidina a 20% (v/v) em DMF em dois ciclos independentes de 15 minutos cada, sob agitação contante (200 rpm) e, ao final, a resina foi lavada novamente com DMF e DCM.

4.7.3. Teste de Kaiser

A efetividade da etapa de desproteção (tanto quanto a de acoplamento tratada a seguir) foi avaliada por meio do teste de Kaiser.

O teste de Kaiser é um teste qualitativo colorimétrico que permite observar a presença de amins livres no meio. Caso o procedimento de desproteção tenha sido feito com sucesso, a resina testada apresentará coloração escura (azul escuro/preto). Ao contrário, a coloração observada será transparente (pode indicar desproteção sem sucesso e acoplamento com sucesso).

O teste de Kaiser foi realizado com o emprego de três soluções: ninidrina 5% (m/v) em etanol, fenol 80% (m/v) em etanol e cianeto de potássio (KCN) em piridina (2 mL de KCN 0,001 M em 98 mL de piridina), nas proporções 1:1:1, com uma pequena quantidade da resina a ser testada.

4.7.4. Acoplamento de Aminoácidos

O acoplamento dos aminoácidos durante a síntese é feita no sentido C-terminal para a região N-terminal do peptídeo a ser sintetizado. Após a desproteção do resíduo de Alanina, 276 mg de reagente de acoplamento HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurôniohexafluorofosfato) foi adicionado ao vaso de reação junto ao aminoácido (massa variável para cada aminoácido - vide Tabela 1) subsequente no procedimento. Dois mililitros de DMF foi adicionado ao meio para a solubilização dos reagentes. DIPEA (N,N'-diisopropiletilamina) foi o reagente responsável por criar o intermediário ativo para a formação da ligação peptídica. Foram adicionados 139 µL de DIPEA ao meio, que foi submetido a agitação a 200 rpm por 1h. A efetividade da reação de acoplamento foi verificada pelo teste de Kaiser.

O ciclos de desproteção e acoplamento foi repetido para cada aminoácido a ser inserido na cadeia peptídica, intercalando com testes de Kaiser para avaliar a efetividade dos passos.

4.7.5. Clivagem

Após o acoplamento do último resíduo de aminoácido na cadeia peptídica (região N-terminal), foi feita mais uma etapa de desproteção seguindo os passos apresentados em 4.8.2.

Um coquetel de clivagem foi preparado com os seguintes reagentes: TFA/tioanisol/água/fenol/etanoditiol nas proporções 82,5:5:5:2,5 (v/v).

A resina conjugada com o peptídeo sintetizado foi inserida no coquetel e mantida sob agitação constante (200 rpm) por 90 min. Após esse intervalo, o excesso de TFA foi evaporado com ajuda de fluxo de argônio. Após a remoção de grande parte do coquetel, foi feita a precipitação do peptídeo em éter diisopropílico gelado e mantido em congelador por 10 min. O material foi filtrado e a fase etérea descartada. Os peptídeos sintetizados foram então ressuspensos em água/acetronitrila, 1:1 (v/v), liofilizados e purificados por meio de técnicas cromatográficas utilizando coluna C₁₈ (Vydac 218TPC C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm). Análises por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF como descrito em 4.5 permitiram avaliar a homogeneidade dos peptídeos após a etapa de recromatografia assim como a confirmação do sucesso do processo de síntese com a análise dos produtos obtidos.

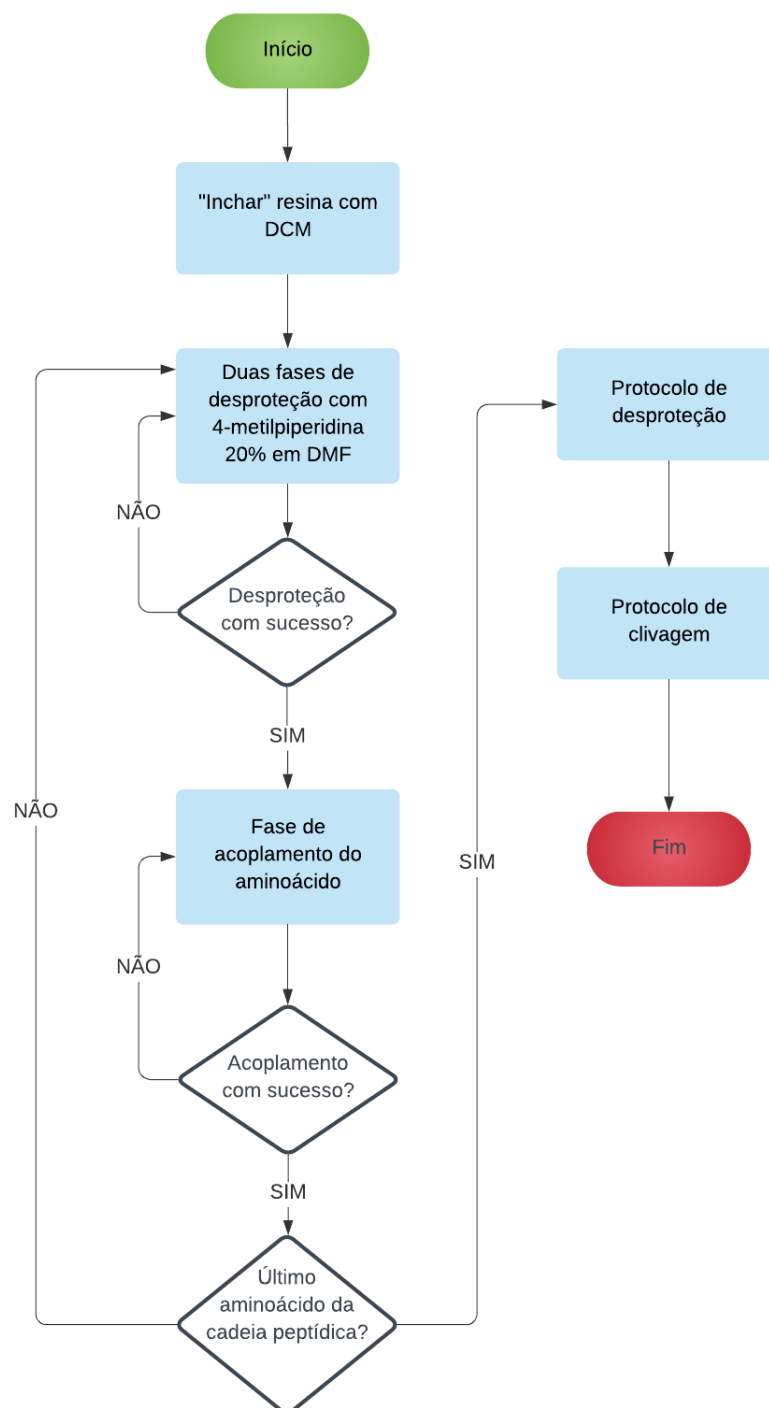


Figura 7. Fluxograma do processo de síntese de peptídeos em suporte polimérico. Procedimento realizado de forma cíclica, acoplando aminoácidos no sentido C→N-terminal.

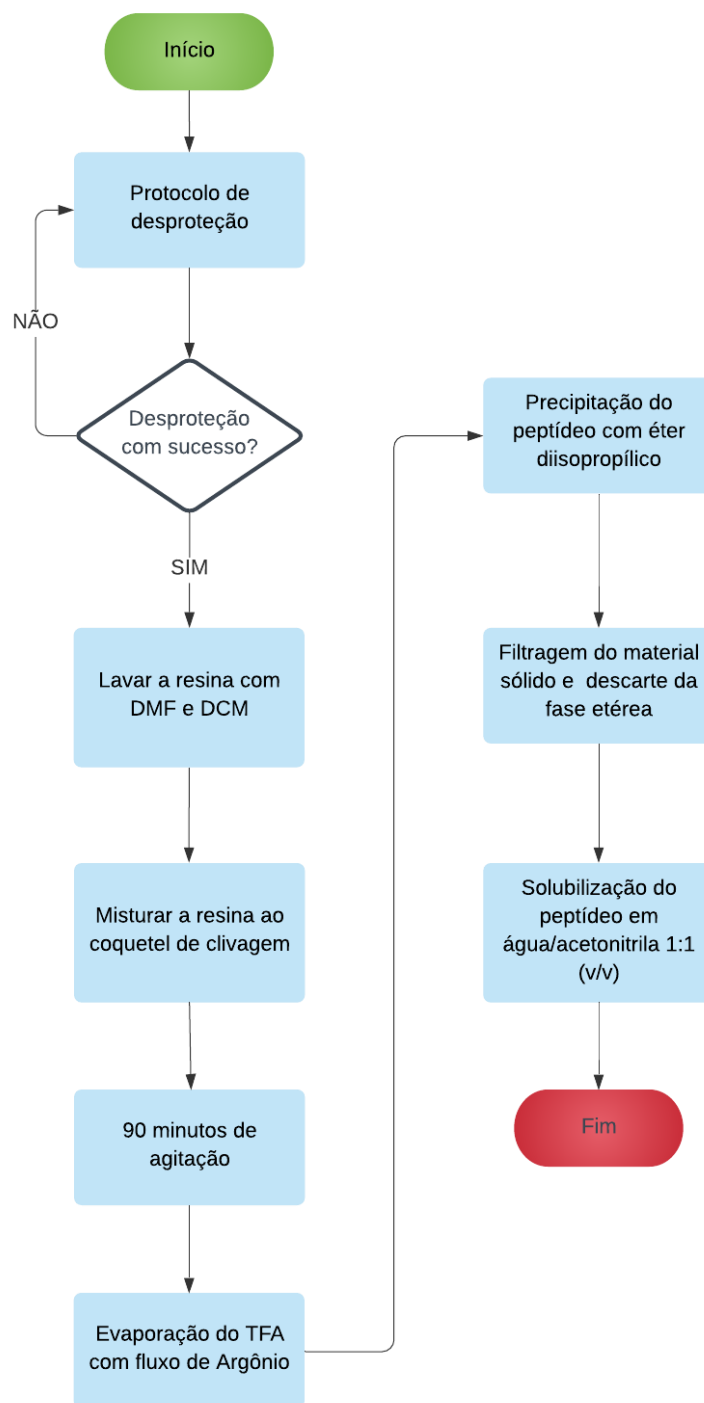


Figura 8. Fluxograma do processo de clivagem. Faz-se necessária a realização do protocolo de desproteção antes da realização da clivagem. O coquetel de clivagem, além de remover o peptídeo livre da resina, remove as proteções de cadeia lateral.

Tabela 1. Lista de aminoácidos e suas quantidades utilizadas na síntese em escala de concentração de 0,15 mmol.L⁻¹.

Aminoácido	Símbolo	Massa monoisotópica (Da)	Quantidade (mg) utilizada para síntese (0,15 mmol.L⁻¹)
Ácido aspártico	D	115,026	246,9
Ácido glutâmico	E	129,042	255,3
Alanina	A	71,037	186,8
Arginina	R	156,101	389,3
Asparagina	N	114,042	358,0
Cisteína	C	103,009	351,4
Fenilalanina	F	147,068	232,5
Glicina	G	57,021	178,4
Glutamina	Q	128,058	366,4
Histidina	H	137,058	371,8
Isoleucina	I	113,084	212,1
Leucina	L	113,084	212,0
Lisina	K	128,096	281,1
Metionina	M	131,040	222,9
Prolina	P	97,052	202,4
Serina	S	87,032	230,1
Tirosina	Y	163,063	275,7
Treonina	T	101,047	238,5
Triptofano	W	186,079	316,0
Valina	V	99,068	203,6

4.8. Quantificação das Versões Sintéticas dos Peptídeos Antimicrobianos de *P. centralis*

Os peptídeos sintéticos foram quantificados em espectrofotômetro (Bel Photonics UV/Vis M51), com leituras nos comprimentos de onda de 205, 215 e 225 nm (Aitken & Learmonth, 2002).

Os peptídeos liofilizados obtidos após o processo de síntese química foram ressuspensos em 10 mL de água deionizada resultando na solução estoque. Alíquotas de 700 µL foram feitas misturando-se 35 µL de solução estoque em 665 µL de água deionizada (1:20, v/v) e transferidas para cubetas de quartzo para as leituras espectrofotométricas.

As equações abaixo descrevem o cálculo que permitiu obter a estimativa da concentração dos peptídeos em µg/mL a partir das medidas de absorvância.

$$\text{Concentração1} = \frac{(\text{Abs205nm} \times 1000)}{31}$$

$$\text{Concentração2} = 144 \times [\text{Abs215nm} - \text{Abs225nm}]$$

$$\mu\text{g/mL} = \frac{\text{Concentração 1} + \text{Concentração 2}}{2} \times 20$$

4.9. Análise por Dicroísmo Circular dos Componentes de Estrutura Secundária dos Peptídeos Antimicrobianos de *P. centralis*

A análise da composição dos elementos de estrutura secundária presentes nos peptídeos antimicrobianos de *P. centralis* foram realizadas com o emprego da técnica de dicroísmo circular (DC) utilizando um espectropolarímetro do tipo Jasco, modelo J-815 (Jasco Corporation, Japão), equipado com sistema de controle de temperatura do tipo Peltier (Jasco Corporation, Japão), e uma bomba de água (Jasco Corporation, Japão). Os peptídeos foram analisados em uma cubeta de quartzo de 0,05 cm, na presença de água ou SDS 35 mM a 25°C. Dez espectros dicroicos foram coletados consecutivamente na região distante da UV visível (190-260 nm). A média final entre os espectros foi calculada e desta média foi subtraída a contribuição da linha de base dos espectros, tendo como referência os espectros gerados em água e em SDS 35 mM

isolados. A elipticidade observada foi convertida em elipticidade molar ($[\theta]$) ($\text{grau.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) baseada na massa molecular por resíduo de 112 Da (Pace *et al.*, 1989).

A obtenção da helicidade dos peptídeos foi estimada considerando os valores de elipticidade molar ($[\theta]$) ($\text{grau.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) em $\lambda_{208\text{nm}}$ baseado na equação abaixo (Morriset *et al.*, 1973).

$$fH = ([\theta]_{208} - 4,000)/(-33,000 - 4,000)$$

4.10. Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Peptídeos de *P. centralis*

As atividades antimicrobianas dos peptídeos de *P. centralis* foram avaliadas sobre os seguintes microrganismos patogênicos: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (bactérias Gram-negativas), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (bactérias Gram-positivas) e *Candida albicans* ATCC 14053 (levedura).

As bactérias foram cultivadas em meio Muller-Hinton e a levedura *C. albicans* foi cultivada em meio BHI (*brain-heart infusion*), seguindo o protocolo CLSI descrito em 4.3. Alíquotas de 50 μL em diluições seriadas de cada peptídeo puro, feitas a partir de uma solução-estoque de 256 μM previamente esterilizada em filtro Millex 0,22 μm , foram incubadas com 50 μL da suspensão de fungos ou bactérias em placas de 96 poços em estufa microbiológica a 37°C por 22h. Em seguida, as placas foram lidas em leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA) nos comprimentos de onda de 620 nm para bactérias e 550 nm para fungos, adaptado do protocolo CLSI devido às limitações do aparelho. Os ensaios foram realizados em triplicata com duplicata biológica, e Wuxceto para o peptídeo PCP5_N7 sobre *K. pneumoniae* que, por falta de material disponível, foi realizado apenas em triplicata.

4.11. Avaliação da Atividade Hemolítica dos Peptídeos Antimicrobianos de *P. centralis*

Para realização do ensaio hemolítico, seguiu-se a metodologia apresentada por Wu *et al.* (2014) com adaptações. Eritrócitos humanos coletados de doador voluntário saudável (10 mL de sangue coletado) foram separados do plasma sanguíneo por sedimentação em centrífuga a 735 g por 5 min e lavados três vezes com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 e NaCl 150 mM (tampão-salina) para remoção completa do plasma sanguíneo. Os eritrócitos foram reconstituídos em tampão-salina até o volume

de 10 mL. Para o preparo das alíquotas de eritrócitos utilizadas no ensaio, 10 µL da solução estoque de eritrócitos foram adicionadas a 990 µL de tampão, na razão 1:100. As amostras analisadas foram resuspendidas no mesmo tampão mantendo as concentrações de 256 µM dos peptídeos e diluídas em série em placa de 96 poços com volume de 100 µL em cada poço. Cem microlitros de eritrócitos ressuspendidos em tampão-salina foram adicionados a cada poço a ser testado e para controles foram empregados: 100 µL da suspensão de eritrócitos com 100 µL de Triton X-100 1% (v/v) correspondendo a 100% de hemólise (controle positivo) e 100 µL de suspensão eritrócitos com 100 µL de solução tampão-salina como referência para 0% de hemólise (controle negativo). A incubação foi feita por 1h em temperatura ambiente.

As placas foram centrifugadas a 735 g por 2 min para a sedimentação das células que se mantiveram intactas ou dos *debris* celulares após o período de incubação.

Para avaliação da atividade hemolítica dos peptídeos de *P. centralis*, 100 µL do sobrenadante dos poços foram transferidos para novas placas de 96 poços e foi realizada leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 405 nm em leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA). A conversão para % de hemólise foi feita aplicando-se a equação abaixo:

$$\frac{(A405_{peptídeos} - A405_{tampão})}{(405_{triton} - A405_{tampão})} \times 100$$

4.12. Análises de Bioinformática

A ferramenta online BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) (Altschul *et al.*, 1990) foi utilizada para identificar similaridades com outros peptídeos já identificados depositados em banco de dados; Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers *et al.*, 2011) foi utilizado para realização de alinhamentos de múltiplas sequências e e para o alinhamento de apenas duas sequências foi empregado EMBOSS Needle Pairwise Sequence Alignment) (Rice *et al.*, 2000); ExPASy pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/) (Gasteiger *et al.*, 2005) foi usado para calcular a massa teórica monoisotópica dos peptídeos; o software Heliquist (<http://heliquist.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParamsV2.py>) (Gautier *et al.*, 2008) determinou as cargas líquidas dos peptídeos e os resíduos de aminoácidos carregados; e, por último, o software online NetWheels (<http://lbqp.unb.br/NetWheels/>) (Mól *et al.*, 2018) foi usado para a projeção em roda helicoidal dos peptídeos.

5. Resultados

O fracionamento cromatográfico da secreção cutânea do anuro *P. centralis* resultou na eluição de 62 frações cromatográficas (Figura 9), evidenciando tratar-se de uma secreção bastante complexa como observado para as secreções de outros anuros da família Leptodactylidae (Nascimento *et al.*, 2004; Dourado *et al.*, 2007; Libério *et al.*, 2011; Cruz e Carvalho *et al.*, 2015). Os ensaios de varredura para identificação de componentes com atividade antimicrobiana presentes na secreção de *P. centralis* revelaram quatro frações com atividade antimicrobiana como indicado na Figura 9. As frações em destaque apresentaram atividade inibitória somente sobre a bactéria Gram-negativa *E. coli* em ensaio preliminar e foram nomeadas como PEP1_N4, PEP2_N5, PEP4_N6 e PEP5_N7 (Figura 9), de acordo com sua ordem de eluição durante o processo cromatográfico. O pico mais intenso observado no inserto da Figura 9 também exibiu atividade antimicrobiana, mas não foi possível a purificação dos componentes presentes nessa fração.

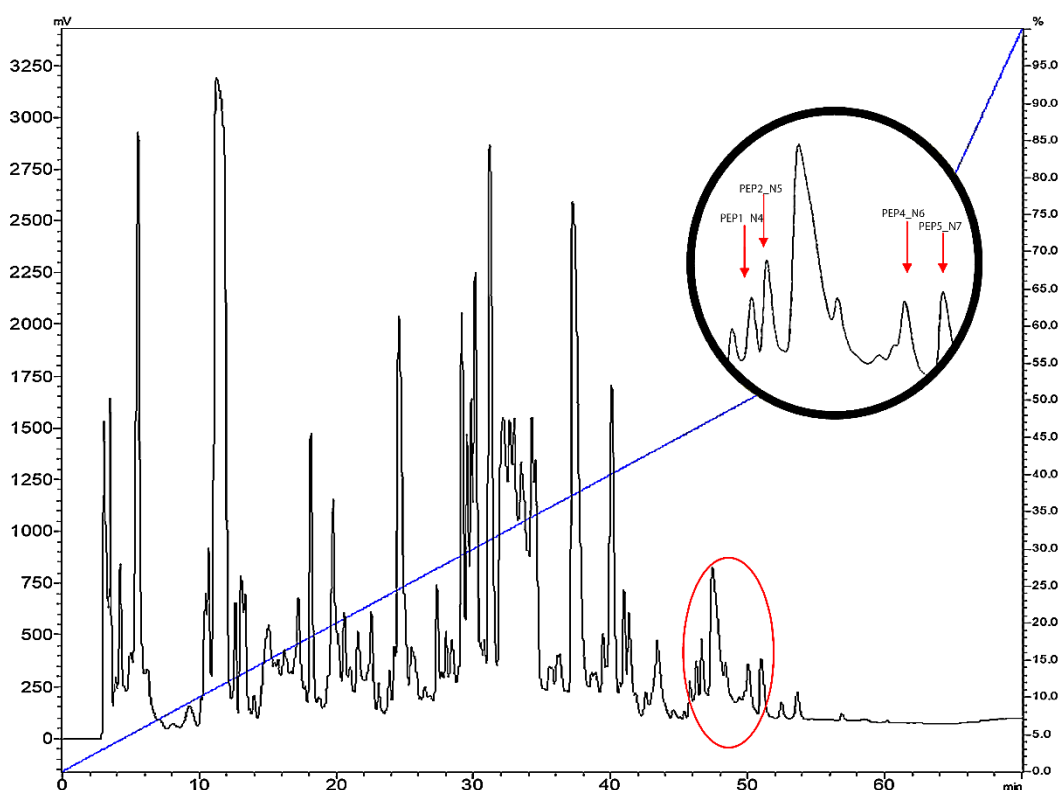


Figura 9. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção bruta de *P. centralis* em RP-HPLC com coluna C₁₈ (Vydac 218TPC C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm) com fluxo de 1 mL/min durante 70 min. O inserto exibe a região magnificada correspondente às frações cromatográficas com atividade antimicrobiana.

As frações que apresentaram atividade antimicrobiana foram acumuladas e recromatografadas (Figura 10). O seu grau de homogeneidade, assim como, as massas moleculares dos principais componentes presentes nessas frações foram analisados por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (Figura 11, A-D). De posse dos peptídeos purificados, foi realizado o sequenciamento químico por degradação de Edman em sistema automatizado para a elucidação das estruturas primárias dos peptídeos de *P. centralis* (Tabela 2).

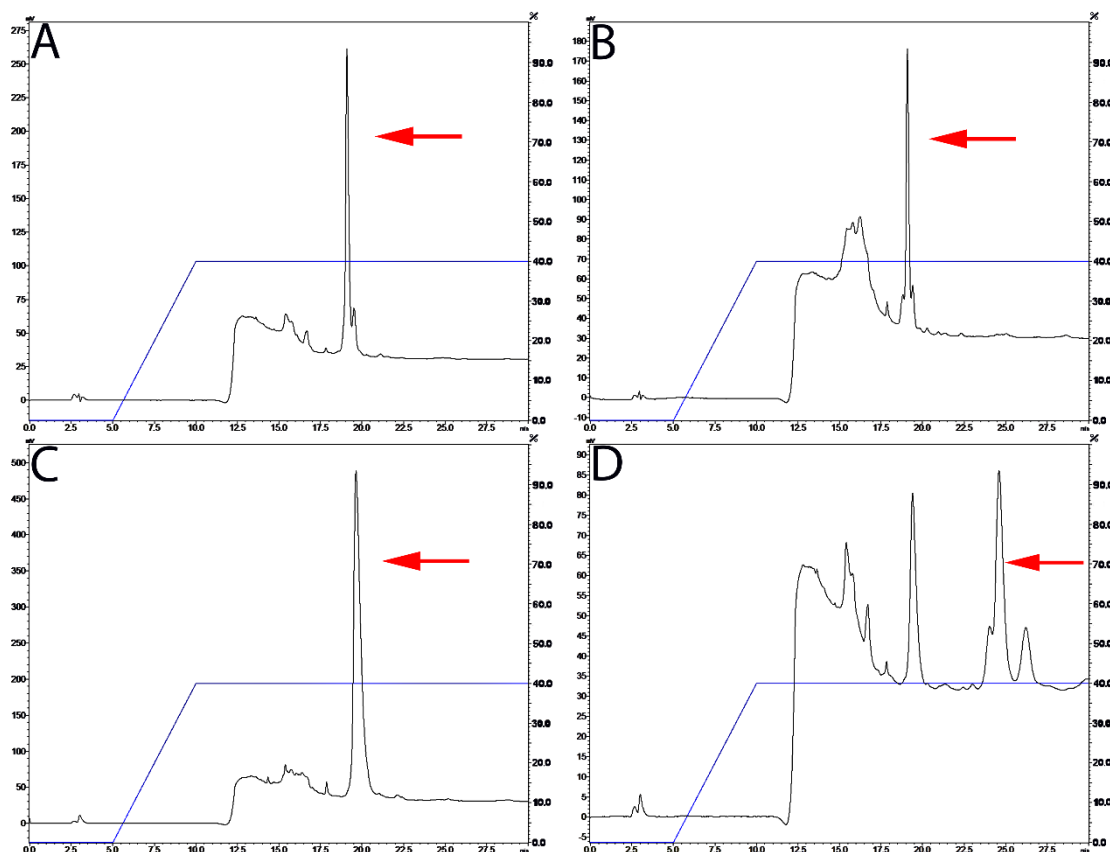


Figura 10. Perfis cromatográficos resultantes das recromatografias das frações identificadas como: **A)** PEP1_N4; **B)** PEP2_N5; **C)** PEP4_N6 e **D)** PEP5_N7. Foi empregada coluna C₁₈ (Kinetex 5μ XB-C₁₈, 100 Å, 4,6 x 250 mm) e a eluição foi realizada com fluxo de 1mL/min e detecção espectrofotométrica em 216 nm utilizando gradiente de incremento da fase móvel B, onde nos cinco primeiros minutos a concentração de solução B era igual a 0%, nos próximos 5 minutos ocorreu o aumento de 0 a 40%, sendo que a partir desse ponto a concentração do solvente B se manteve constante até o término da corrida cromatográfica de duração de 30 min. As frações indicadas por setas representam os peptídeos de interesse.

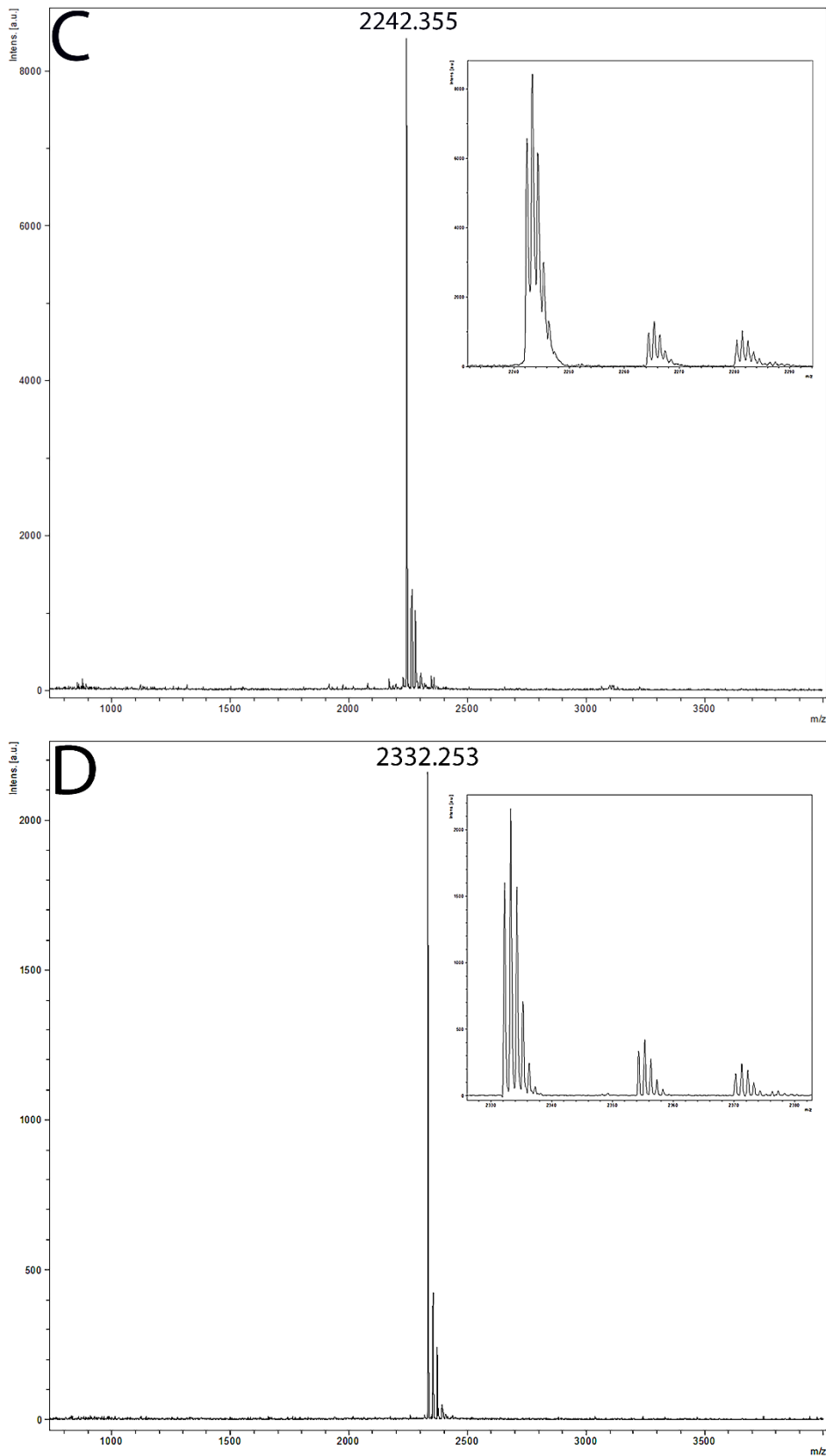


Figura 11. Espectros de massas dos peptídeos purificados que apresentaram atividade inibitória inicial sobre a bactéria *E. coli*. Os principais componentes moleculares observados exibiram as seguintes massas moleculares protonadas, $[M+H]^+$: **A)** PEP1_N4, 2269,041 Da; **B)** PEP2_N5, 2260,165 Da; **C)** PEP4_N6, 2242,355 Da e PEP5_N7, 2332,253 Da. Os componentes moleculares de menor intensidade evidenciados nos inserts correspondem a adutos de sódio e potássio.

Os quatro peptídeos isolados a partir da secreção de *P. centralis* possuem muitas semelhanças entre si (Figura 12). Todos eles apresentam cadeia peptídica formada por 22 resíduos de aminoácidos e, visto que não houve diferença entre as massas moleculares observadas experimentalmente por espectrometria de massas e os valores teóricos determinados com base na estrutura primária de cada peptídeo, foi descartada a possibilidade de amidação da porção C-terminal dos peptídeos, modificação bastante comum em PAMs de anuros (Nascimento *et al.*, 2003; Baptista, 2019). O *software Heliquest* foi utilizado para calcular as cargas líquidas dos peptídeos, sendo que os peptídeos PEP2_N5 e PEP4_N6 apresentaram-se duplamente carregados (+2) por conterem mais resíduos de lisina (K) enquanto PEP1_N4 e PEP5_N7 apresentaram apenas uma carga positiva (+1). Apesar de PEP5_N7 abarcar o mesmo número de lisinas (K) comparado aos peptídeos duplamente carregados, este apresenta também mais resíduos negativamente carregados (glutamina e ácido aspártico), o que resultou em sua carga líquida menor (Tabela 2).

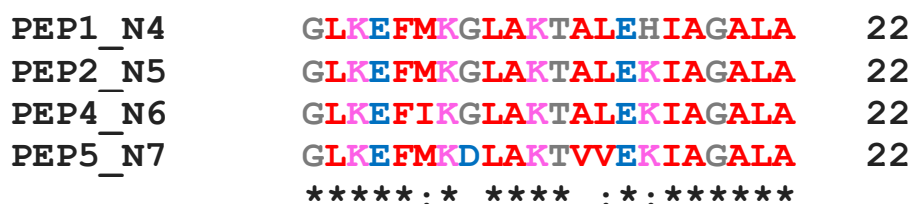


Figura 12. Alinhamento múltiplo das sequências dos peptídeos antimicrobianos de *P. centralis*. Os símbolos: (*) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas.

Tabela 2. Estruturas primárias e características físico-químicas dos peptídeos antimicrobianos de *P. centralis*.

Peptídeo	Estrutura primária	Massa molecular teórica (Da)	Massa molecular experimental (Da)	Carga líquida	Razão hidrofóbica (%)
PEP1_N4	GLKEFMKGLAKTALEHIAGALA	2268,27	2268,04	+1	54
PEP2_N5	GLKEFMKGLAKTALEKIAGALA	2259,30	2259,16	+2	54
PEP4_N6	GLKEFIKGLAKTALEKIAGALA	2241,32	2241,35	+2	54
PEP5_N7	GLKEFMKDLAKTVVEKIAGALA	2331,32	2331,25	+1	54

Tendo em vista a baixa disponibilidade de material purificado a partir de fontes naturais, o processo de síntese química de peptídeos foi empregado para a produção dos peptídeos em quantidades suficientes para a realização dos ensaios propostos.

A técnica de RP-HPLC foi novamente empregada em etapa única para a purificação dos peptídeos obtidos após o processo de síntese em fase sólida (Figura 13). A pureza do material obtido e a confirmação das massas moleculares dos peptídeos sintéticos foi avaliada por espectrometria de massas tipo MALDI/TOF (resultados não apresentados).

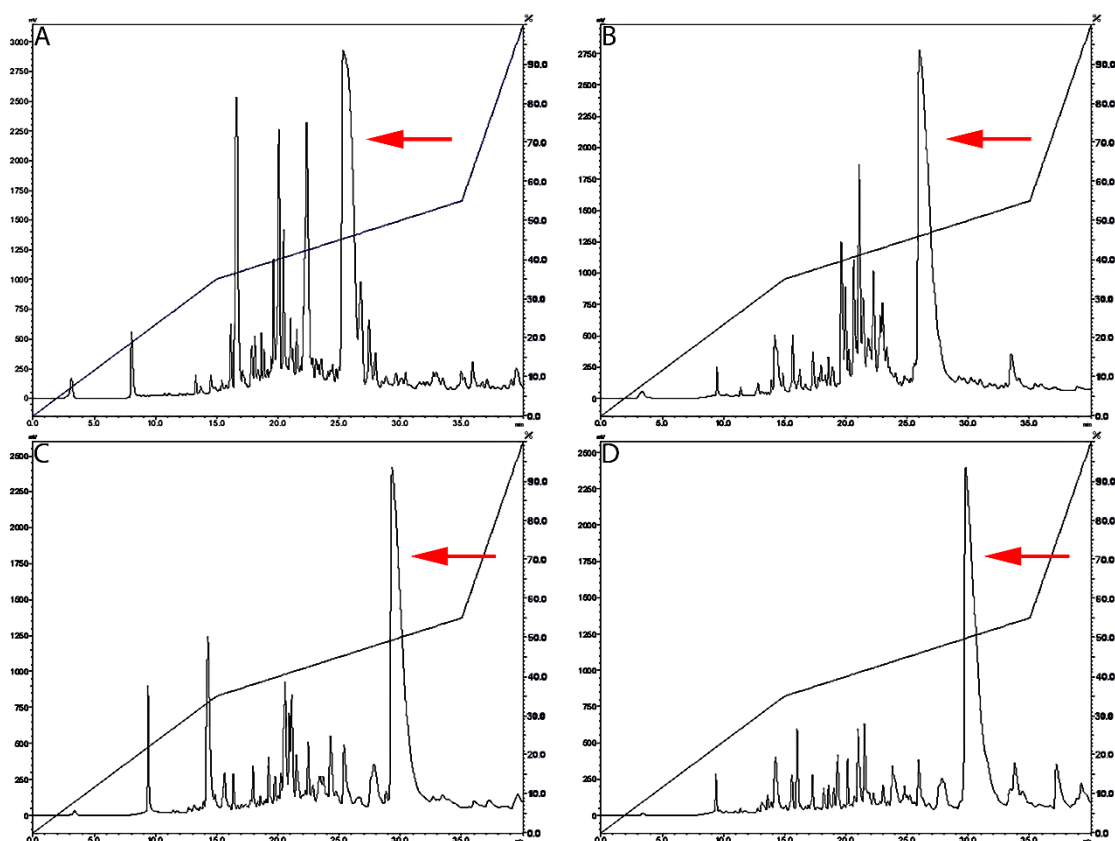


Figura 13. Perfis cromatográficos resultantes do processo de purificação dos peptídeos sintéticos. **A)** PEP1_N4; **B)** PEP2_N5; **C)** PEP4_6 e **D)** PEP5_N7. A purificação foi realizada em coluna C₁₈ (Vydac 218TP54 C₁₈, 5µm, 4,6 x 250 mm) e a eluição foi realizada com fluxo de 1mL/min e detecção espectrofotométrica em 216 nm utilizando gradiente de incremento da fase móvel B. As frações indicadas por setas representam os peptídeos de interesse. Outras frações presentes nas figuras podem corresponder a subprodutos e resquícios como proteções de cadeia lateral do procedimento de síntese manual.

Projeções em roda helicoidal dos peptídeos foram realizadas com o auxílio do *software* online *NetWheels* (Figura 14), revelando a presença de faces hidrofóbicas e hidrofílicas nos peptídeos, sendo que a face apolar em todos os peptídeos mostrou-se relativamente pequena.

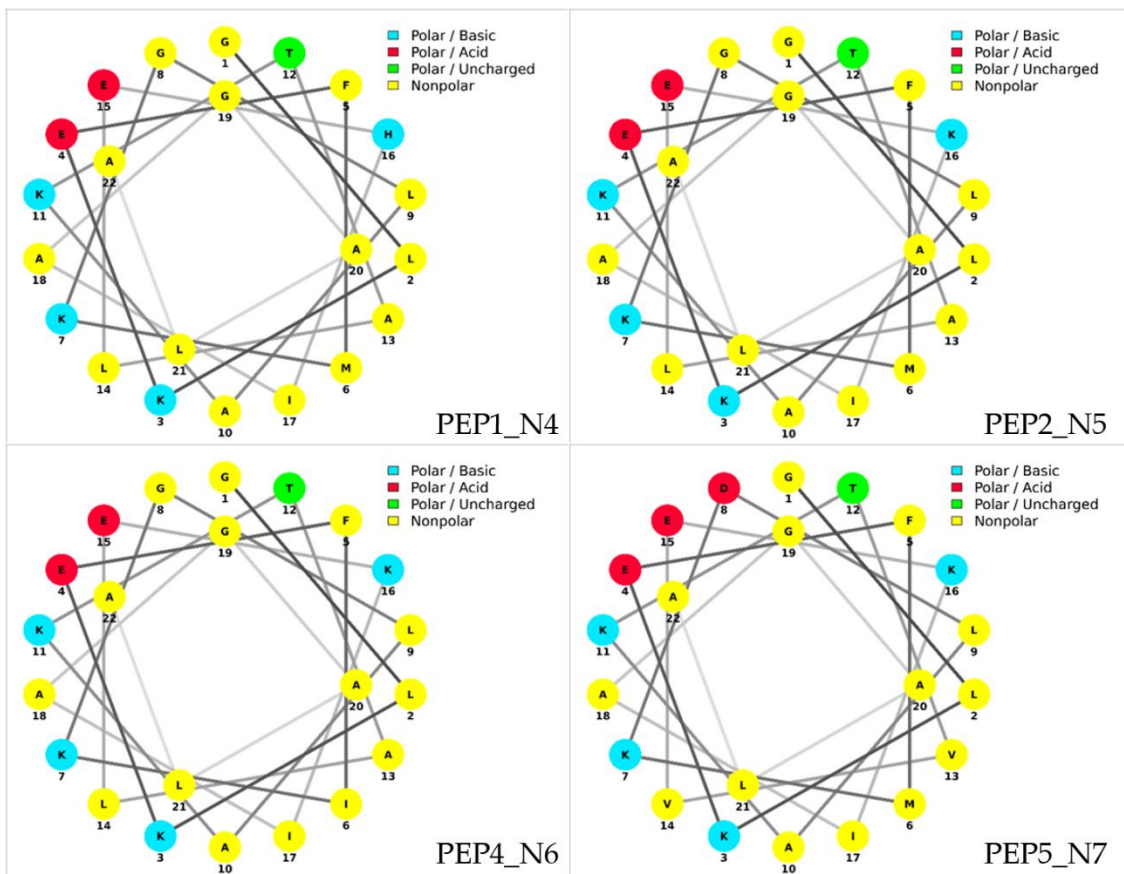


Figura 14. Projeções em roda helicoidal dos peptídeos antimicrobianos de *P. centralis* geradas pelo software online *NetWheels*.

As sequências dos peptídeos foram confrontadas com bancos de dados, com o emprego da ferramenta de busca *BLASTp*, com a finalidade de identificar possíveis similaridades com outros peptídeos já descritos. O principal resultado das buscas foram com os PAMs da família das nattererinas isoladas do anuro *Physalaemus nattereri* (Figuras 15, 16, 17 e 18). Os valores de identidade ao se comparar as nattererinas com os peptídeos de *P. centralis* ficaram entre 36,7 e 46,7% e os valores de similaridade variaram entre 50 e 56,7%.

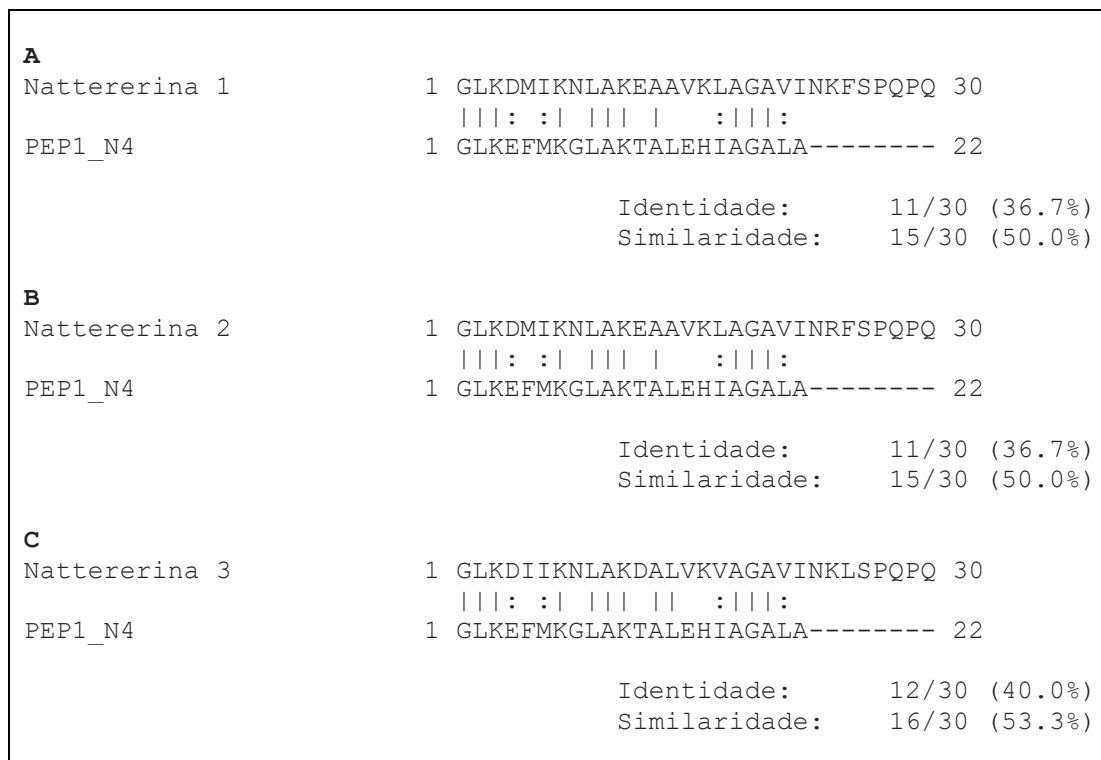


Figura 15. Alinhamento entre a sequência do peptídeo PEP1_N4, isolado da secreção cutânea de *P. centralis*, com as sequências dos peptídeos **(A)** nattererina 1, **(B)** nattererina 2 e **(C)** nattererina 3 de *P. nattereri*. Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10,0; Extend penalty: 0,5.

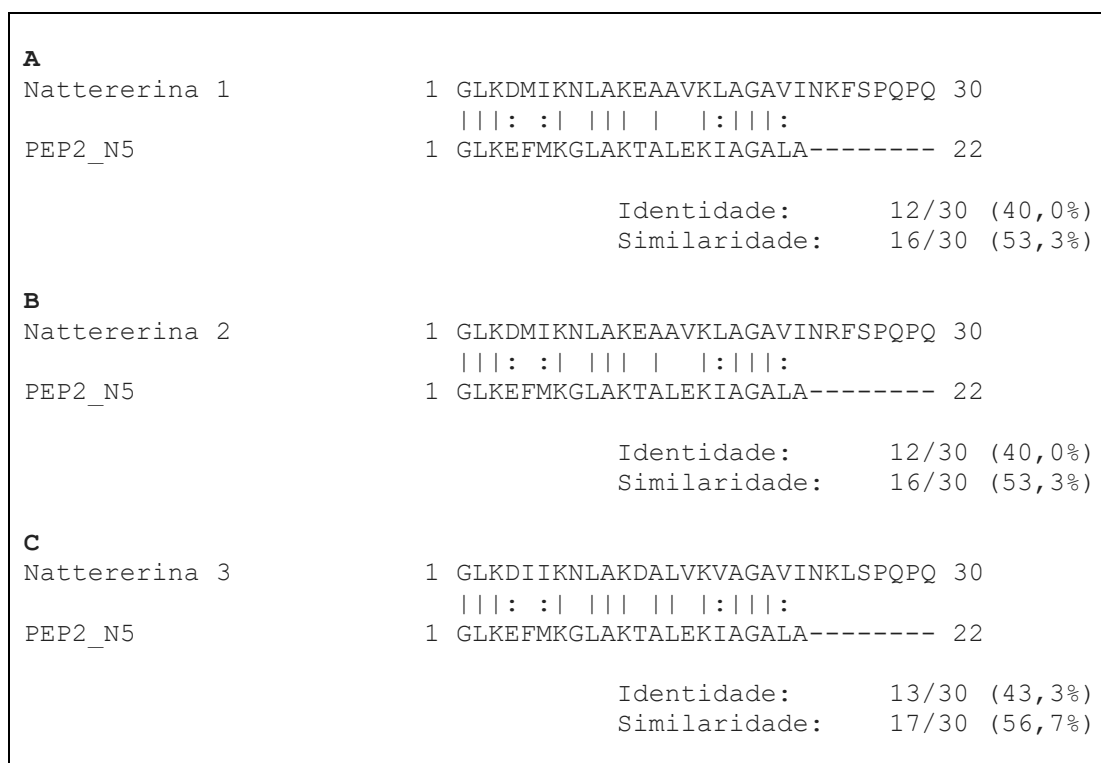


Figura 16. Alinhamento entre a sequência do peptídeo PEP2_N5, isolado da secreção cutânea de *P. centralis*, com as sequências dos peptídeos (A) nattererina 1, (B) nattererina 2 e (C) nattererina 3 de *P. nattereri*. Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10,0; Extend penalty: 0,5.

A	
Nattererina 1	1 GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINKFSPQPQ 30
	: : :
PEP4_N6	1 GLKEFIKGLAKTALEKIAGALA----- 22
	Identidade: 13/30 (43,3%)
	Similaridade: 16/30 (53,3%)
B	
Nattererina 2	1 GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINRFSPQPQ 30
	: : :
PEP4_N6	1 GLKEFIKGLAKTALEKIAGALA----- 22
	Identidade: 13/30 (43,3%)
	Similaridade: 16/30 (53,3%)
C	
Nattererina 3	1 GLKDIIKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ 30
	: : :
PEP4_N6	1 GLKEFIKGLAKTALEKIAGALA----- 22
	Identidade: 14/30 (46,7%)
	Similaridade: 17/30 (56,7%)

Figura 17. Alinhamento entre a sequência do peptídeo PEP4_N6, isolado da secreção cutânea de *P. centralis*, com as sequências dos peptídeos (A) nattererina 1, (B) nattererina 2 e (C) nattererina 3 de *P. nattereri*. Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10,0; Extend penalty: 0,5.

A	
Nattererina 1	1 GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINKFSPQPQ 30
	: : : : : : :
PEP5_N7	1 GLKEFMKDLAKTVVEKIAGALA----- 22
	Identidade: 11/30 (36,7%)
	Similaridade: 16/30 (53,3%)
B	
Nattererina 2	1 GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINRFSPQPQ 30
	:.. : : : : : :..
PEP5_N7	1 GLKEFMKDLAKTVVEKIAGALA----- 22
	Identidade: 11/30 (36,7%)
	Similaridade: 16/30 (53,3%)
C	
Nattererina 3	1 GLKDIIKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ 30
	: : : : : : : :
PEP5_N7	1 GLKEFMKDLAKTVVEKIAGALA----- 22
	Identidade: 11/30 (36,7%)
	Similaridade: 17/30 (56,7%)

Figura 18. Alinhamento entre a sequência do peptídeo PEP5_N7, isolado da secreção cutânea de *P. centralis*, com as sequências dos peptídeos (A) nattererina 1, (B) nattererina 2 e (C) nattererina 3 de *P. nattereri*. Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10,0; Extend penalty: 0,5.

Também foram realizadas comparações com outros PAMs recentemente isolados pelo nosso grupo de pesquisa. As sequências dos peptídeos Pc24 e Pc28 isolados de *Physalaemus cicada* (Baptista, 2019), espécie do mesmo gênero de *P. centralis*, foram comparadas a fim de se avaliar seus graus de identidade e de similaridade (Figuras 19, 20, 21 e 22).

A	
Pc24	1 GFRDNLKKIAKDMLGQIAGAVAEKPKSQ 29 :: : : :
PEP1_N4	1 GLKEFMKGLAKTALEHIAGALA----- 22
	Identidade: 10/29 (34,5%) Similaridade: 15/29 (51,7%)
B	
Pc28	1 GL---VSGIANT-LSGLLGRL- 17 : : :
PEP1 N4	1 GLKEFMKGLAKTALEHIAGALA 22
	Identidade: 8/22 (36,4%) Similaridade: 11/22 (50,0%)

Figura 19. Alinhamento entre a sequência do peptídeo PEP1_N4, isolado da secreção cutânea de *P. centralis*, com as sequências dos peptídeos (A) Pc24 e (B) Pc28 de *P. cicada*. Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10,0; Extend penalty: 0,5.

A	
Pc24	1 GFRDNLKKIAKDMLGQIAGAVAEKPKSQ 29 :: : : : :
PEP2_N5	1 GLKEFMKGLAKTALEKIAGALA----- 22
	Identidade: 10/29 (34,5%) Similaridade: 16/29 (55,2%)
B	
Pc28	1 GL---VSGIANT-LSGLLGRL- 17 : : :
PEP2_N5	1 GLKEFMKGLAKTALEKIAGALA 22
	Identidade: 8/22 (36,4%) Similaridade: 11/22 (50,0%)

Figura 20. Alinhamento entre a sequência do peptídeo PEP2_N5, isolado da secreção cutânea de *P. centralis*, com as sequências dos peptídeos (A) Pc24 e (B) Pc28 de *P. cicada*. Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10,0; Extend penalty: 0,5.

A	
Pc24	1 GFRDNLKКИAKDMLGQIAGAVAEKЛKPSQ 29 :: : : :
PEP4_N6	1 GLKEFMKGLAKTALEHIAGALA----- 22
	Identidade: 10/29 (34,5%) Similaridade: 15/29 (51,7%)
B	
Pc28	1 GL---VSGIANT-LSGLLGRL- 17 : : :
PEP4_N6	1 GLKEFMKGLAKTALEHIAGALA 22
	Identidade: 8/22 (36,4%) Similaridade: 11/22 (50,0%)

Figura 21. Alinhamento entre a sequência do peptídeo PEP4_N6, isolado da secreção cutânea de *P. centralis*, com as sequências dos peptídeos (A) Pc24 e (B) Pc28 de *P. cicada*. Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10,0; Extend penalty: 0,5.

A	
Pc24	1 GFRDNLKКИAKDMLGQIAGAVAEKЛKPSQ 29 :: : : :: : :
PEP5_N7	1 GLKEFMKDLAKTVVEKIAGALA----- 22
	Identidade: 9/29 (31,0%) Similaridade: 17/29 (58,6%)
B	
Pc28	1 -----GLVSGIANTLSGLLGRL 17 : :
PEP5_N7	1 GLKEFMKDLAKTVVEKIAGALA-- 22
	Identidade: 3/24 (12,5%) Similaridade: 6/24 (25,0%)

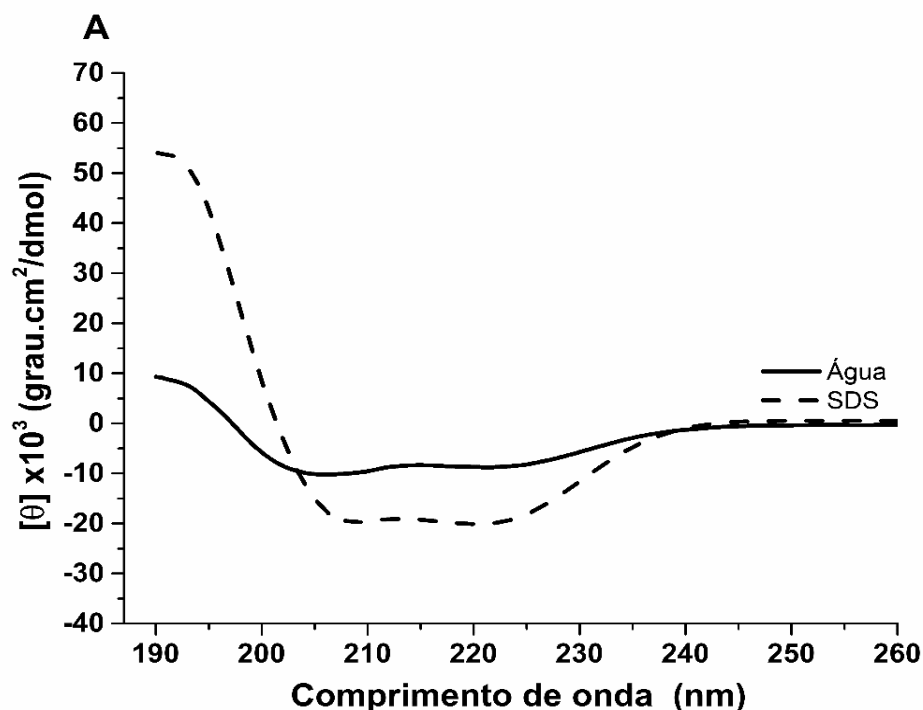
Figura 22. Alinhamento entre a sequência do peptídeo PEP5_N7, isolado da secreção cutânea de *P. centralis*, com as sequências dos peptídeos (A) Pc24 e (B) Pc28 de *P. cicada*. Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10,0; Extend penalty: 0,5.

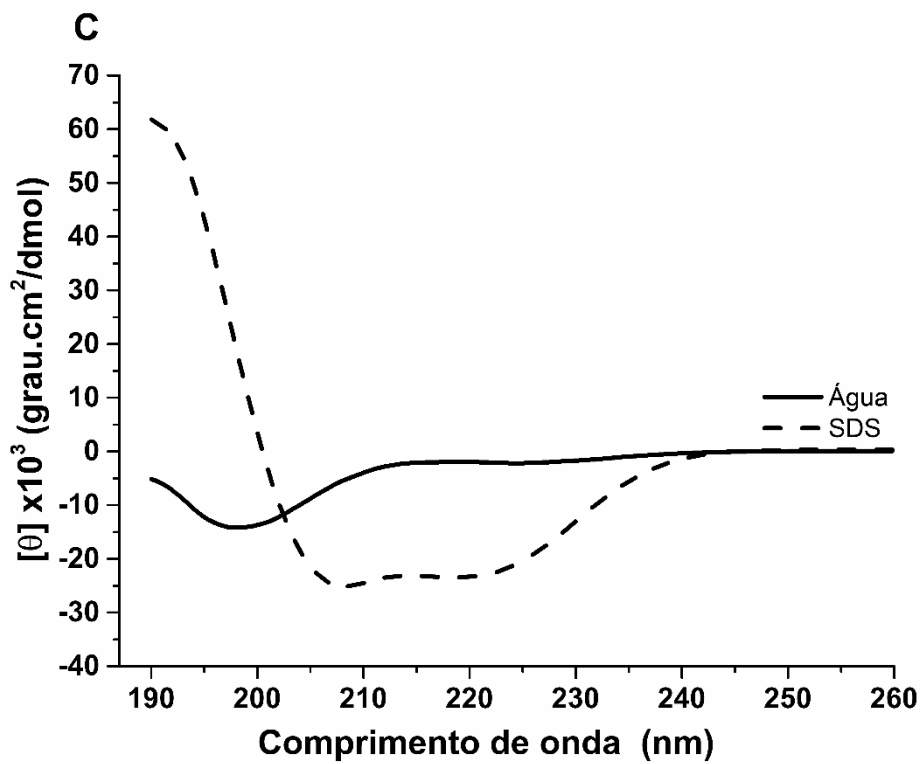
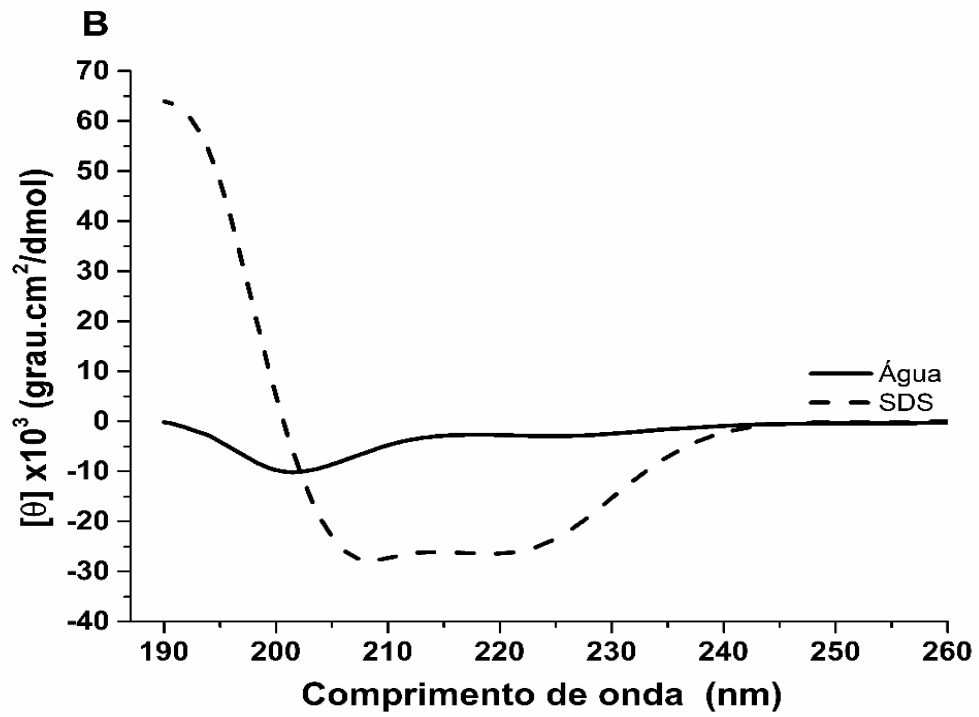
Análises por dicroísmo celular foram realizadas para os quatro peptídeos em meio aquoso e na presença de SDS, um detergente que forma micelas mimetizando um ambiente de membrana. O espectro dicroico do peptídeo PEP1_N4 em água a 25°C apresentou bandas dicroicas negativas em 208 e 222 nm (Figura 23A) típicas da presença de estruturas secundárias do tipo hélices. Já os espectros dicroicos dos peptídeos Pep2_N5, Pep4_N6 e Pep5_N7 apresentaram banda dicroica negativa em 200 nm em água a 25°C (Figuras 23B-D), característica de estrutura secundária

randômica.

Na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) ou trifluoretanol (TFE) alguns peptídeos tendem a se estruturar, assumindo principalmente uma conformação em α -hélice (Krittanai & Johnson, 2000). Os espectros dicróicos dos peptídeos PEP2_N5, PEP4_N6 e PEP5_N7 na presença de SDS 35 mM mostraram deslocamento da banda dicróica negativa da região de 200 nm para as regiões de 208 e 222 nm, com valores de $[\theta]_{208\text{nm}}$ variando entre -19.000 e -27.000 grau.cm²/dmol, com uma banda dicróica positiva em 190 nm. O peptídeo PEP1_N4 apresentou aumento expressivo de sinal na região de 208 nm de -10.000 para -19.000 grau.cm²/dmol e na região de 222 nm de -8.000 para -19.000 grau.cm²/dmol. Este resultado indica que, na presença de SDS, todos os peptídeos assumiram uma conformação com estrutura secundária predominante em α -hélice.

Estes resultados sugerem que os peptídeos de *P. centralis* apresentam alta tendência para se organizarem em α -hélice na presença de modelos de membranas biológicas, podendo, provavelmente serem capazes de atuar sobre as membranas de microrganismos patogênicos, funcionando como agentes antimicrobianos.





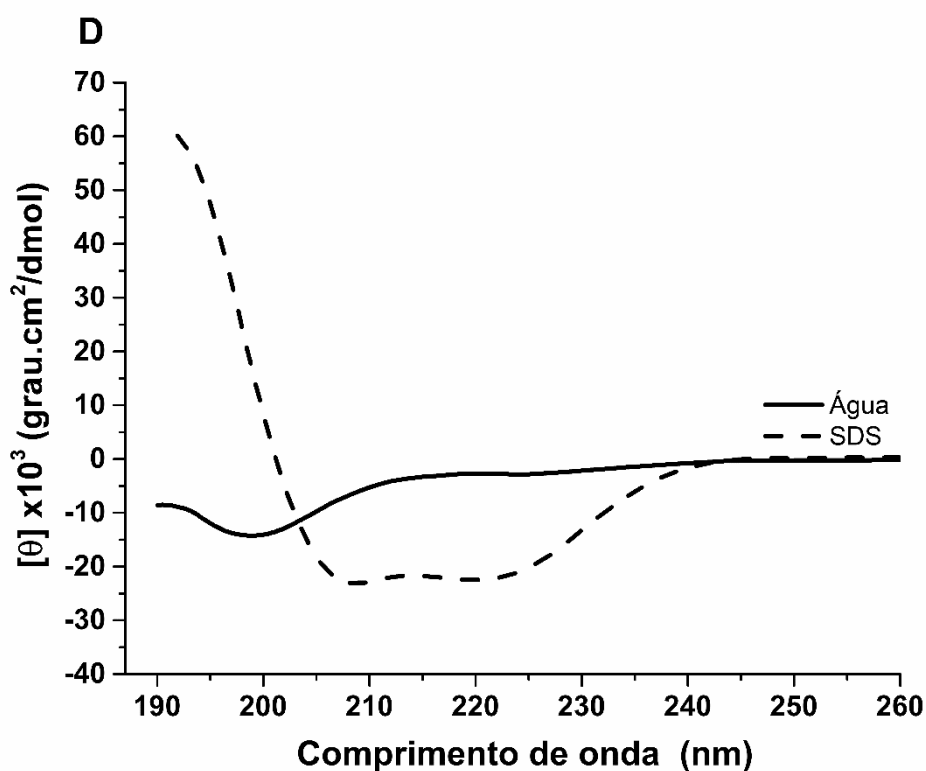


Figura 23. Espectros dicróicos na região distante da UV dos peptídeos de *P. centralis* em água (linha sólida) e em SDS 35 mM (linha pontilhada). (A) PEP1_N4; (B) PEP2_N5; (C) PEP4_N6 e (D) PEP5_N7.

A helicidade dos peptídeos PEP1_N4, PEP2_N5, PEP4_N6 e PEP5_N7 foi calculada considerando-se o valor da elipticidade molar $[\theta]_{208\text{nm}}$ na presença de SDS 35 mM (Tabela 3). Os peptídeos PEP2_N5 e PEP4_N6 apresentaram maior percentual de helicidade, com valores de 71% e 63%, respectivamente, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Conteúdo estimado de α -hélice (%) para os peptídeos antimicrobianos de *P. centralis* na presença de SDS 35 mM a 25°C.

α -Hélice (%)	
Peptídeos	SDS
Pep1_N4	55,2
Pep2_N5	71,8
Pep4_N6	63,4
Pep5_N7	61,3

Os peptídeos sintéticos também foram empregados em ensaios para avaliação de seus efeitos antimicrobianos e hemolíticos.

Os peptídeos mostraram-se bastante promissores, principalmente em se tratando

dos efeitos antimicrobianos sobre bactérias patogênicas Gram-negativas (Figuras 24, 25, 26, 27 e 28).

As concentrações inibitórias mínimas (MICs) para a bactéria *E. coli* foram iguais a 8 μM para o peptídeo PEP1_N4; 4 μM para o peptídeo PEP2_N5; 2 μM para PEP4_N6 e 32 μM para PEP5_N7 (Tabela 4). Os valores de MICs para o patógeno *K. pneumoniae* para os peptídeos PEP1_N4, PEP2_N5 e PEP5_N7 foi igual a 4 μM e de 2 μM para o peptídeo PEP4_N6. Dentre os quatro peptídeo, o peptídeo PEP4_N6 se mostrou mais ativo, inibindo o crescimento bacteriano dos dois patógenos na concentração de 2 μM (Tabela 4). As bactérias Gram-positivas e a levedura *C. albicans* se mostraram mais resistentes frente aos PAMs de *P. centralis* (Tabela 4).

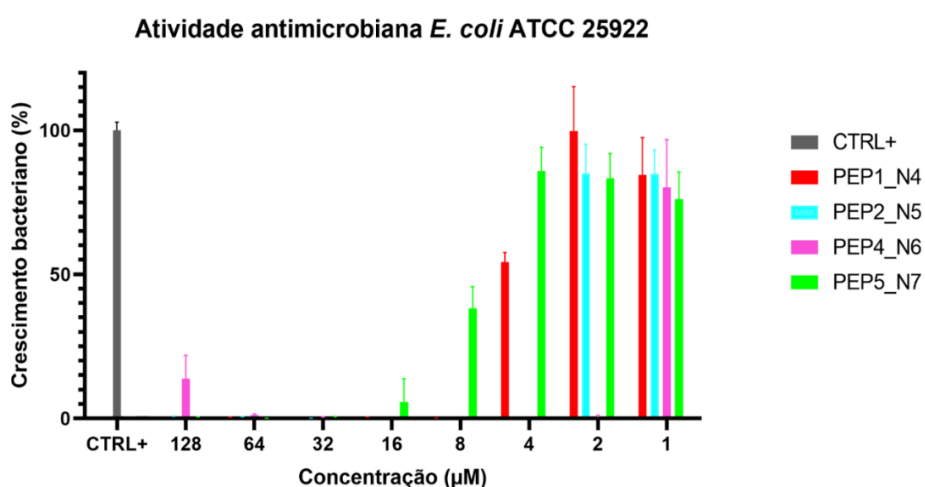


Figura 24. Efeito de concentrações decrescentes dos peptídeos isolados da secreção cutânea de *P. centralis* sobre o crescimento da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922).

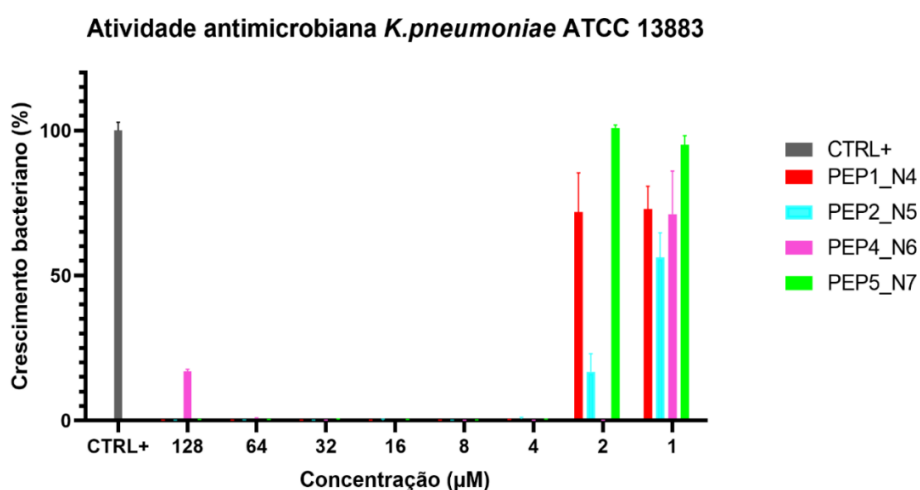


Figura 25. Efeito de concentrações decrescentes dos peptídeos isolados da secreção cutânea de *P. centralis* sobre o crescimento da bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13882).

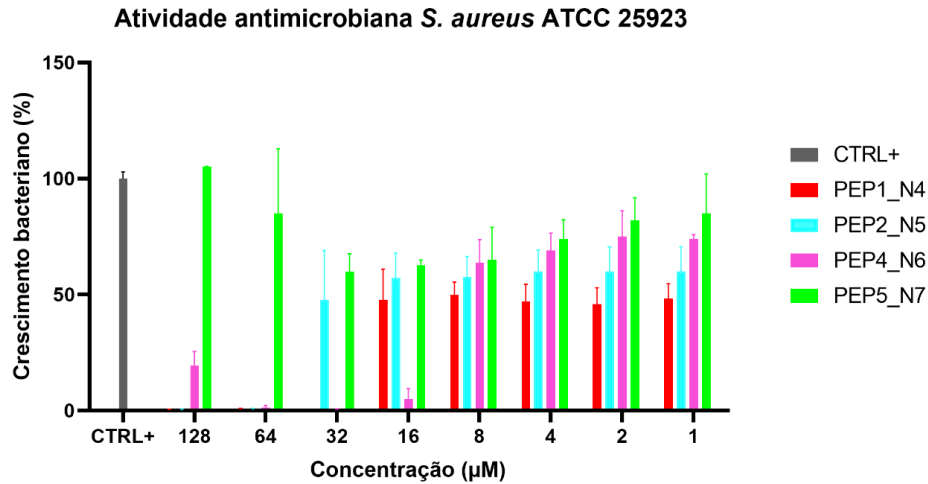


Figura 26. Efeito de concentrações decrescentes dos peptídeos isolados da secreção cutânea de *P. centralis* sobre o crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

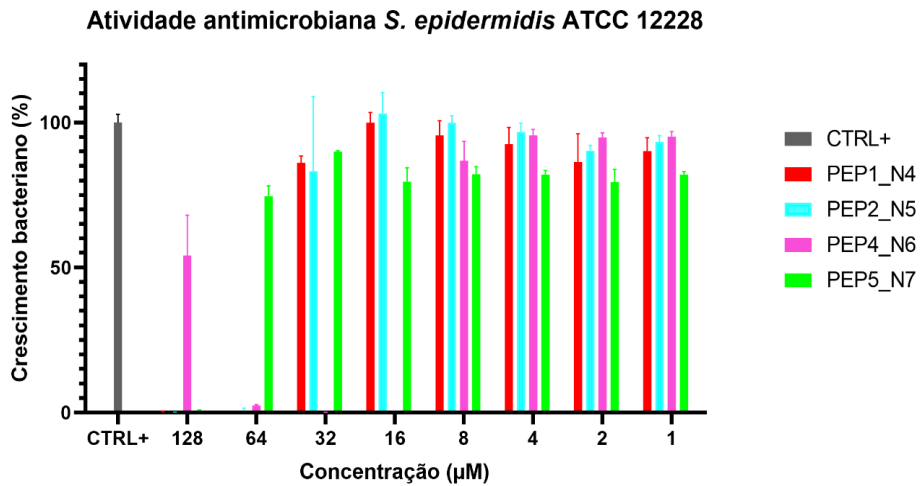


Figura 27. Efeito de concentrações decrescentes dos peptídeos isolados da secreção cutânea de *P. centralis* sobre o crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

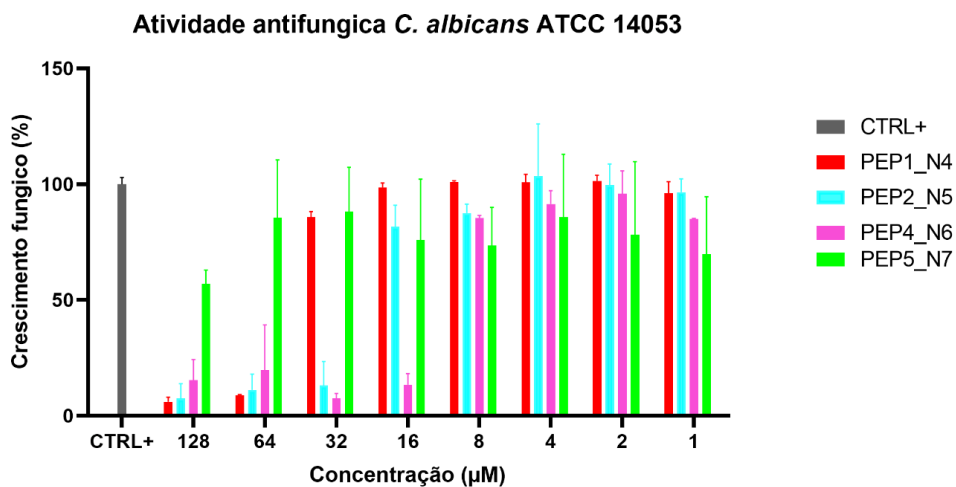


Figura 28. Efeito de concentrações decrescentes dos peptídeos isolados da secreção cutânea de *P. centralis* sobre o crescimento da levedura *Candida albicans* (ATCC 14053).

Tabela 4. Atividade antimicrobiana (MIC, μM) dos peptídeos isolados da secreção cutânea de *P. centralis* sobre microrganismos patogênicos.

Peptídeo	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Candida albicans</i>
PEP1_N4	8	4	32	64	>128
PEP2_N5	4	4	64	64	>128
PEP4_N6	2	2	ND ^a	ND ^a	>128
PEP5_N7	32	4	ND ^a	128	>128

^aND = Não foi possível determinar o valor do MIC, em razão da variação da inibição do crescimento nas diferentes concentrações empregadas dos peptídeos.

A avaliação da atividade hemolítica dos peptídeos (Figura 29) indicou que, mesmo nas concentrações mais altas utilizadas nos ensaios, a maioria dos peptídeos não causou mais que 20% de hemólise, exceto para o peptídeo PEP4_N6 que, na concentração de 128 μM (concentração máxima empregada), causou hemólise de aproximadamente 25%.

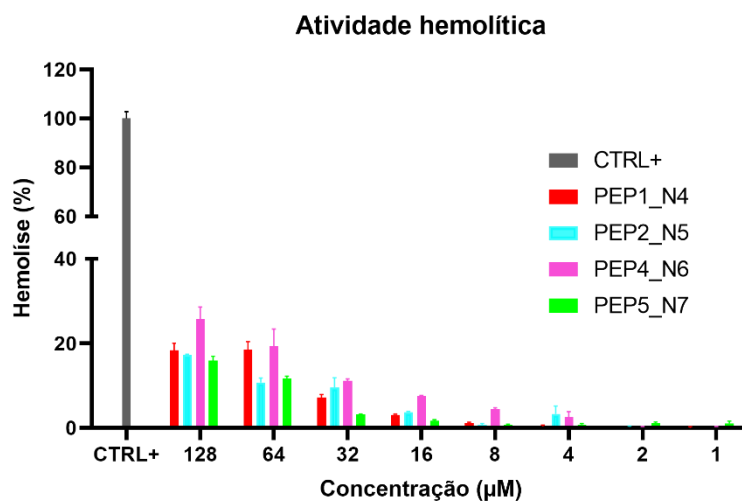


Figura 29. Efeito de concentrações decrescentes dos peptídeos isolados da secreção cutânea de *P. centralis* sobre eritrócitos humanos. O controle positivo corresponde a 100% de hemólise na presença do detergente Triton X-100.

6. Discussão

Peptídeos antimicrobianos presentes na pele de anuros exercem potente atividade contra bactérias resistentes a antibióticos, protozoários e fungos, devido às suas capacidades de permeabilizar as membranas dos patógenos ou inativar alvos intracelulares. A diversidade em compostos bioativos nessas secreções tem atraído muita atenção na busca por novos agentes terapêuticos (Nascimento *et al.*, 2003; Patocka *et al.*, 2019).

A secreção cutânea de anfíbios é amplamente usada na medicina secular chinesa e tem sido o foco de vários estudos nos últimos anos diante da atual crise dos antibióticos (Xu & Lai, 2015).

A secreção cutânea do anuro *P. centralis* se mostrou promissora ao revelar quatro novos peptídeos com atividade antimicrobiana. A caracterização estrutural de tais peptídeos mostra que essas moléculas seguem um padrão reconhecido na literatura para PAMs de anuros, como anfipaticidade e carga líquida positiva (Nascimento *et al.*, 2003).

Ensaio preliminares com as frações isoladas demonstravam atividades apenas contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*. Ensaio realizados empregando-se concentrações decrescentes dessas moléculas revelaram atividade não apenas contra bactérias Gram-negativas, mas também contra Gram-positivas.

O procedimento de purificação dos peptídeos usando RP-HPLC empregando-se colunas C₁₈ ocorreu em duas etapas. Inicialmente foi realizado o fracionamento cromatográfico da secreção bruta de *P. centralis* e, em seguida, fez-se necessária etapa adicional de recromatografia para a obtenção dos peptídeos purificados. Tal procedimento é amplamente empregado na literatura para a purificação de PAMs de anuros (Dourado *et al.*, 2007; Libério *et al.*, 2011).

Análises por espectrometria de massas do tipo MALDI/TOF confirmaram os níveis de pureza dos peptídeos como satisfatório para a etapa de sequenciamento químico. A síntese dos peptídeos em fase sólida com estratégia Fmoc ocorreu com eficiência, as massas moleculares dos produtos foram também confirmadas por espectrometria de massas, após procedimento em etapa única de cromatografia para purificação.

As estruturas primárias dos peptídeos de *P. centralis* foram comparados com alguns exemplares de PAMs já descritos na literatura, sendo que os maiores valores de

identidade e similaridade foram obtidos com os peptídeos da família das nattererinas, descritas por Martins (2005) e Honorato (2009). As nattererinas são PAMs isolados de *Physalaemus nattereri*, espécie pertencente ao mesmo gênero que *P. centralis*. Existe alta identidade entre as sequências dos quatro novos peptídeos descritos com as nattererinas. Três regiões mostraram-se bastante conservadas, resultando em valores de identidade entre 37,5 e 40% e de similaridade entre 50 e 53,3% para o PAM PEP1_N4 e as nattererinas 1, 2 e 3 (Figura 15). Para o peptídeo PEP2_N5, os valores de identidade ficaram entre 40 e 43,3% e de similaridade entre 53,3 e 56,7% (Figura 16). No caso do PAM PEP 4_N6, os valores de identidade ficaram entre 43,3 e 46,7% e de similaridade entre 53,3 e 56,7% (Figura 17). Finalmente, ao se comparar o peptídeo PEP5_N7 com as nattererinas, observou-se valores de identidade iguais a 36,7% para todas as comparações e de similaridade entre 53,3 e 56,7% (Figura 18).

Os PAMs de *P. centralis* também foram comparados com outros dois peptídeos antimicrobianos recentemente isolados da espécie *P. cicada* (Baptista, 2019). Os valores de identidade ao se comparar o PAM Pc24 com os peptídeos de *P. centralis* ficaram entre 31 e 34,5% e os valores de similaridade variaram entre 51,7 e 58,6%. Já ao se comparar o peptídeo Pc28 com os PAMs de *P. centralis*, os valores de identidade resultaram em valor igual a 36,4% para os peptídeos PEP1_N4, PEP2_N5 e PEP4_N6 e 12,5% para o peptídeo PEP5_N7. Já os valores de similaridade corresponderam a 50% para os três PAMs (PEP1_N4, PEP2_N5 e PEP4_N6) e igual a 25% para o peptídeo PEP5_N7 (Figuras 19, 20, 21 e 22).

Análises mais aprofundadas devem ser realizadas de modo a se determinar se os PAMs de *P. centralis* formam uma nova família de peptídeos antimicrobianos, mas é indiscutível que os peptídeos isolados das espécies *P. centralis*, *P. cicada* e *P. nattereri* estão intimamente relacionados.

As análises por dicroísmo circular evidenciaram o comportamento estrutural desses compostos ao entrar em contato com membranas plasmáticas simulada pela presença de SDS no meio. Curiosamente o PEP1_N4 em água já apresentou bandas dicroicas negativas em 208 e 222 nm, configurando a conformação de α -hélice independente da presença de SDS. Na presença do surfactante, os sinais em 208 e 222 nm foram acentuados. Todos peptídeos assumiram conformação em α -hélice na presença de SDS 35 mM. Tal comportamento é bastante comum em PAMs de anuros, onde a formação de estrutura em α -hélice na presença das membranas biológicas dos

microrganismos está intimamente relacionada com a capacidade de permeabilizar tais membranas (Zaslouff, 2002; Jenssen *et al.*, 2006).

Os PAMs de *P. centralis* exibiram efeitos antimicrobianos interessantes e, em alguns casos, superiores aos promovidos pelas nattererinas. Os PAMs PEP1_N4, PEP2_N5, PEP4_N6 e PEP5_N7 de *P. centralis* mostraram-se eficientes em inibir o crescimento de *E. coli* (ATCC 25922), exibindo valores de MICs iguais a 8, 4, 2 e 32 μM , respectivamente. Ao se comparar com os valores obtidos para as nattererinas (nattererina 1 e 2, 8 μM e nattererina 3, 4 μM), observa-se que o peptídeo PEP4_N6 foi mais ativo sobre esse patógeno (Almeida, 2018).

No caso da bactéria *K. pneumoniae* (ATCC 13888), o peptídeo PEP4_N6 teve efeito idêntico ao das nattererinas, com valor de MIC igual a 2 μM (Almeida, 2018).

Ao se analisar os efeitos sobre bactérias Gram-positivas, tanto os PAMs de *P. centralis* quanto as nattererinas exibiram menor atividade antimicrobiana, sendo que sobre a bactéria *S. aureus* (ATCC 25923), o PAM de *P. centralis* PEP1_N4 mostrou-se mais ativo, exibindo um valor de MIC igual a 32 μM enquanto a nattererina 2 apresentou valor de MIC igual a 64 μM e as nattererina 1 e 3 de 128 μM . Já as nattererinas mostraram-se mais eficientes sobre *S. epidermidis* (ATCC 12228) com valor de MIC igual a 16 μM para a nattererina 2 e 32 μM para as nattererinas 1 e 3. Tanto as nattererinas quanto os peptídeos de *P. centralis* mostraram-se pouco ativos sobre a levedura *C. albicans* (ATCC 14053) (Almeida, 2018).

Os valores de MIC apresentados para o peptídeo Pc24 são: 4, 16, >128, >128 e >128 μM para *E. coli* (ATCC 25922), *K. pneumoniae* (ATCC 13883), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228) e *C. albicans* (ATCC 14053), respectivamente e para Pc28: 32, 128, >128, 32 e 64 μM , seguindo a mesma sequência de patógenos acima descrita (Baptista, 2019). Tais peptídeos apresentam cargas +3 e +2, respectivamente, mostrando maior cationicidade em relação aos PAMs de *P. centralis*. Comparando os valores de MICs, pode-se observar que o peptídeo PEP1_N4 inibiu o crescimento em menores concentrações que o peptídeo Pc24, com exceção para a atividade sobre *E. coli*, onde Pc24 foi mais ativo. O peptídeo PEP2_N5 comparado ao PAM Pc24 inibiu o crescimento dos patógenos *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *S. epidermidis* em menores concentrações e o PAM PEP4_N6 inibiu o crescimento de todos microrganismos, (exceto *C. albicans*) em menores concentrações. Enquanto Pc24 exibiu melhores resultados sobre *E. coli*, o peptídeo PEP5_N7 teve melhor atuação sobre *K. pneumoniae*.

Em comparação com o peptídeo Pc28, os peptídeos de *P. centralis* se destacaram quanto ao seu efeito sobre a bactéria *K. pneumoniae*, uma vez que o peptídeo Pc28 foi praticamente inativo sobre esse patógeno (MIC = 128 μ M).

A atividade hemolítica dos peptídeos de *P. centralis* mostrou-se abaixo de 20% para as concentrações avaliadas, exceto para o peptídeo PEP_N6 que, na concentração máxima empregada de 128 μ M, causou hemólise de aproximadamente 25%. As atividades hemolíticas para os PAMs de *P. centralis* mostraram-se muito baixas, menores que 5%, na faixa de concentrações definidas para os MICs obtidos sobre a maioria dos patógenos testados.

Concluindo, o presente estudo revelou a presença de PAMs na secreção cutânea do do anuro *P. centralis* e evidenciou o possível potencial terapêutico dessas moléculas no tratamento de infecções por patógenos Gram-negativos.

7. Conclusões

No presente trabalho foram isolados quatro novos peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea do anuro *P. centralis*, denominados PEP1_N4, PEP2_N5, PEP4_N6 e PEP5_N7, que exibiram similaridade com outros PAMs já descritos para o gênero *Physalaemus*.

Os peptídeos de *P. centralis* apresentaram atividade antimicrobiana com valores de MIC variando de 2 a 32 μM contra bactérias Gram-negativas, porém revelaram-se menos ativos sobre bactérias Gram-positivas. Tais peptídeos exibiram atividade muito baixa sobre a levedura *C. albicans*.

Os peptídeos de *P. centralis* apresentaram baixa atividade hemolítica sobre eritrócitos humanos, sendo que os quatro exibiram taxa de hemólise abaixo de 10% até a concentração de 32 μM . Valendo destacar que os peptídeos PEP1_N4, PEP2_N5 e PEP5_N7 inibiram o crescimento da bactéria *K. pneumoniae* em 4 μM e o peptídeo PEP4_N6 inibiu o crescimento das bactérias Gram-negativas em 2 μM , concentração onde apresentaram taxa hemolítica próxima de 0%.

Todos os PAMs de *P. centralis* foram capazes de adotar conformação em α -hélice em ambiente membrana-mimético.

8. Perspectivas

A partir do isolamento de novos peptídeos antimicrobianos a partir da secreção cutânea do anuro *Physalaemus centralis*, pretende-se:

- ❖ Realizar ensaios complementares para avaliação de seus efeitos sobre organismos multirresistentes, como *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA);
- ❖ Avaliar os efeitos promovidos por tais peptídeos sobre membranas bacterianas por meio de análises de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica;
- ❖ Avaliar seus efeitos antiproliferativos e citotóxicos sobre diferentes linhagens de células de mamíferos, incluindo células tumorais e não-tumorais;
- ❖ Avaliar suas propriedades antivirais e antiparasitárias;
- ❖ Propor a síntese de análogos dos peptídeos a fim de aprimorar seus efeitos biológicos;
- ❖ Avaliar seus efeitos terapêuticos associados a outros antibióticos comercialmente disponíveis, tanto convencionais quanto antibióticos derivados de PAMs;
- ❖ Avaliar os efeitos dos PAMs de *P. centralis* em modelos animais *in vivo* de sepse, de infecções pulmonares e de infecções de pele;
- ❖ Propor e produzir diferentes sistemas de entrega contendo os PAMs de *P. centralis* de modo a otimizar seus efeitos biológicos e ampliar sua meia-vida em sistemas *in vivo*.

9. Referências Bibliográficas

Aitken, A.; Learmonth, M. Protein determination by UV absorption. In *The Protein Protocols Handbook* (ed. Walker, J.M.). *Humana Press*. **2002**, 3–6.

Almeida, D.G. Peptídeos antimicrobianos de anuros e seus análogos: propriedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitárias e citolíticas. Dissertação de Mestrado (Biologia Animal). **2018**. Universidade de Brasília.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. **1990**, *215*(3), 403-410.

Årdal, C.; Balasegaram, M.; Laxminarayan, R.; McAdams, D.; Outtersson, K.; Rex, J. H.; & Sumpradit, N. Antibiotic development — economic, regulatory and societal challenges. *Nat. Rev. Microbiol*. **2019**. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0293-3>.

Baptista, G.F. Peptídeos antimicrobianos da pele de *Physalaemus cicada* Bokermann, 1966 (Anura, Leiuperinae): identificação, purificação e propriedades. Dissertação de Mestrado (Biologia Animal). **2019**. Universidade de Brasília.

Blondelle, S. E.; Lohner, K.; Aguilar, M.-I. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr*. **1999**, *1462*, 89–108.

Bokermann, W. C. A. Sobre uma coleção de anfíbios do Brasil central, com a descrição de uma espécie nova de *Physalaemus*. *Brazilian Journal of Biology*. **1962**, *22*, 213-219.

Brandão, R.A.; Duar, B.A.; Brito, A.C., Sebben, A. *Physalaemus centralis* - Distribution extension. *Herpetological Review*. **1997**, *28*, 93.

Brasileiro, C. A.; Lucas, E. M.; Oyamaguchi, H. M.; Thomé, M. T. C.; Dixo, M. Anurans, Northern Tocantins River Basin, states of Tocantins and Maranhão, Brazil. *Check List*, *4*. **2008**. 185-197.

Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*. **2005**. *3*(3), 238–250.

Brusquetti, F.; Lavilla, E. Lista comentada de los anfíbios de Paraguay. *Cuadernos de Herpetologia*. **2006**. *20*, 3-79.

Carey, F. *Organic Chemistry*; 3th Ed. Cap. 27. *McGraw-Hill*, New York, **1996**.

Carvalho, A.C. Avaliação dos efeitos citotóxicos e antiproliferativos da secreção cutânea e de peptídeos do anuro *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1863). Tese de

Doutorado (Biologia Animal). **2015**. Universidade Brasília.

Chan, W.; White, P. Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach. Issue 222 of Practical Approach Series. *OUP Oxford*. **2000**.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; *Approved Standard—Sixth Edition*. CLSI document M7-A6. **2003**.

Conlon J. M.; Sonnevend A.; Jouenne T.; Coquet L.; Cosquerd.; Vaudry H.; Iwamuro S. A family of acyclic brevinin-1 peptides from the skin of the Ryukyu brown frog *Rana okinavana*. *Peptides*. **2005**, *26*(2), 185-190.

Cruz e Carvalho, A.; Márquez, C. A.; Azevedo, R. B.; Joanitti, G. A.; Pires Júnior, O. R.; Fontes, W.; Castro, M. S. Cytotoxic activity and antiproliferative effects of crude skin secretion from *Physalaemus nattereri* (Anura: Leptodactylidae) on *in vitro* melanoma cells. *Toxins*. **2015**, *7*(10), 3989-4005.

Dhople, V.; Krukemeyer, A.; Ramamoorthy, A. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr*. **2006**, *1758*, 1499–1512.

Dourado, F.S.; Leite, J. R. S. A.; Silva, L. P.; Melo, J. A. T.; Bloch, C.; Schwartz, E. F. Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus siphax*. *Toxicon*. **2007**, *50*, 572–580.

French, G. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2005**, *57*(10), 1514–1527.

Frost, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. *American Museum of Natural History*, New York, USA, **2020**. Acessível em <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>.

Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Protein Protocols Handbook* (ed. Walker, J.M.). *Humana Press*. **2005**.

Gautier, R.; Douguet, D.; Antony, B.; Drin, G. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics*. **2008**, *24*(18), 2101-2102.

Gomes, A.; Giri, B.; Saha, A.; Mishra, R.; Dasgupta, S. C.; Debnath, A.; Gomes, A. Bioactive molecules from amphibian skin: their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. *Indian J. Exp. Biol*. **2007**, *45*,

579e593.

Gordon, E. M.; Kerwin, J. F. Combinatorial chemistry and molecular diversity in drug discovery. *Wiley-Liss*. Nova Iorque. **1998**, p. 165.

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

Hancock, R. E. W.; & Sahl, H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, **2006**, *24*(12), 1551–1557.

Hernández-Aponte, C. A.; Silva-Sanchez, J.; Quintero- Hernández, V.; Rodríguez-Romero, A.; Balderas, C.; Possani, L. D.; Gurrola, G. B.; Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus*. *Toxicon*. **2011**, *57*(1), 84-92.

Hofer, U. The cost of antimicrobial resistance. *Nat Rev Microbiol*. **2019**, *17*, 3.

Honorato, C. T. Análise peptidômica da secreção cutânea do anuro *Eupemphix nattereri* com ênfase na prospecção de peptídeos antimicrobianos. Dissertação de Mestrado (Biologia Animal). **2009**. Universidade de Brasília.

Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R. E. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. **2006**, *19*(3), 491-511.

Kim, J. B.; Conlon, J. M.; Iwamuro, S.; Knoop, F. C. Antimicrobial peptides from the skin of the Japanese mountain brown frog, *Rana ornativentris*. *Journal of Peptide Research*. **2001**, *58*(5), 349–356.

Kokubum, M.; Menin, M. *Physalaemus centralis* - distribution extension. *Herpetological Review*. **2002**, *33*, 62.

Krittanaï, C.; Johnson, W. C. Relative order of helical propensity of amino acids changes with solvent environment. *Proteins*. **2000**, *39*, 132-141.

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*. **2018**, *8*(1), pii: E4.

Ladram, A.; Nicolas, P. Antimicrobial peptides from frog skin biodiversity and therapeutic promises. *Frontiers in Bioscience*. **2016**, *21*(7), 1341–1371.

Libério, M. S.; Joanitti, G. A.; Azevedo, R. B.; Cilli, E. M.; Zanotta, L. C.; Nascimento, A. C.; Sousa, M. V.; Pires Júnior, O. R.; Fontes, W.; Castro, M. S. Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus*

labyrinthicus on melanoma cells. *Amino Acids*. **2011**, *40*(1), 51-59.

Machado, A.; Liria, C. W.; Proti, P. B.; Remuzgo, C.; Miranda, M. T. M. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. *Química Nova*. **2004**, *27*(5), 781–789.

Marquardt, M.; Eifler-Lima, V. L. A síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados. *Química Nova*. **2001**, *24*(6), 846–855.

Martins, G. R. P. Peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea de *Physalaemus nattereri* (Anuro). Dissertação de Mestrado (Ciências da Saúde – Faculdade de Ciências da Saúde). **2005**. Universidade de Brasília.

Melo, M. N.; Ferre, R.; & Castanho, M. A. R. B. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nature Reviews Microbiology*. **2009**, *7*(3), 245–250.

Mól, A. R.; Castro, M. S.; Fontes, W. NetWheels: A web application to create high quality peptide helical wheel and net projections. *bioRxiv*. **2018**, 416347; doi: <https://doi.org/10.1101/416347>.

Morrisett, J. D.; David, J. S. K.; Pownall, H. J.; Gotto, A. M. Interaction of an apolipoprotein (apoLP-alanine) with phosphatidylcholine. *Biochemistry*. **1973**, *12*(7), 1290–1299.

Nascimento, A. C. C. Avaliação biológica da secreção cutânea da rã *Leptodactylus ocellatus*: peptídeos citolíticos e proteases. Tese de Doutorado (Biologia Animal). **2007**. Universidade de Brasília.

Nascimento, A. C.; Fontes, W.; Sebben, A.; Castro, M. S. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein Pept Lett*. **2003**, *10*(3), 227-238.

Nascimento, A. C.; Zanotta, L. C.; Kyaw, C. M.; Schwartz, E. N.; Schwartz, C. A.; Sebben, A.; Sousa, M. V.; Fontes, W.; Castro, M. S. Ocellatins: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). *Protein J*. **2004**, *23*(8), 501-508.

Nelson, D. L.; David, L.; Cox, M. M.; Lehninger, A. L. Lehninger Principles of Biochemistry; *W.H. Freeman and Company*: New York, NY, USA, **2013**.

Oliveira, D. M.; Lacerda, A. F. Antimicrobial peptides: biotechnology applied to human health. *Revista de Saúde da Faciplac*. **2014**, *1*(1).

Pace, N. R.; Smith, D. K.; Olsen, G. J.; James, B. D. Phylogenetic comparative analysis and the secondary structure of ribonuclease P RNA—A review. *Gene*. **1989**,

82, 65–75.

Park, C. B.; Kim, H. S.; Kim, S. C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun.* **1998**, *244*(1), 253-257.

Pasupuleti, M.; Schmidtchen, A.; Malmsten, M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical Reviews in Biotechnology.* **2011**, *32*(2), 143–171.

Patocka, J.; Nepovimova, E.; Klimova, B.; Wu, W.; Kuca, K.; Antimicrobial Peptides: Amphibian Host Defense Peptides. *Current Medicinal Chemistry.* **2019**, *26*, 5924.

Rademann, J.; Schmidt, R. R. A new method for the solid phase synthesis of oligosaccharides. *Tetrahedron Letters.* **1996**, *37*(23), 3989–3990.

Rice, P., Longden, I., Bleasby, A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics.* **2000**, *16*, 276-277.

Segalla, M. V.; Caramaschi, U.; Cruz, C. A. G.; Grant, T.; Haddad, C.; Júlio, De M. F.; Langone, J. A.; Garcia, P. C. De A. Brazilian amphibians: list of species. *Herpetologia Brasileira.* **2016**, *5*(2).

Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; Thompson, J. D.; Higgins, D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* **2011**, *7*, 539.

Singer, A. C.; Kirchhelle, C.; Roberts, A. P. (Inter)nationalising the antibiotic research and development pipeline. *The Lancet Infectious Diseases.* **2020**, *20*(1), PE54-E62.

Tavares, L. S.; Silva, C. S.; De Souza, V. C.; Da Silva, V. L.; Diniz, C. G.; Santos, M. O. Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides. *Front Microbiol.* **2013**, *4*, 412.

Tempone, A. G.; Melhem, M. De S. C.; Prado, F. O.; Motoie, G.; Hiramoto, R. M.; Antoniazzi, M. M.; Haddad, C. F. B.; Jared, C. Amphibian secretions for drug discovery studies: a search for new antiparasitic and antifungal compounds. *Letters in Drug Design and Discovery.* **2007**, *4*, 67-73.

Theuretzbacher, U.; Toney, J. H. Nature's clarion call of antibacterial resistance:

are we listening? *Curr. Opin. Invest. Drugs.* **2006**, *7*, 158–166.

Toke, O. Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers.* **2005**, *80(6)*, 717–735.

Toledo, R.C.; Jared C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* **1995**, *111(1)*, 1-29.

Tossi, A.; Tarantino, C.; Romeo, D. Design of synthetic antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity. *European Journal of Biochemistry.* **1997**, *250(2)*, 549–558.

Vikesland, P.; Garner, E.; Gupta, S.; Kang, S.; Mail Moskowitz, A.; Zhu, N.; Differential drivers of antimicrobial resistance across the world. *Accounts of Chemical Research.* **2019**, *52(4)*, 916-924.

Wake, D. B.; Koo, M. S. Amphibians. *Current Biology.* **2018**, *28*, R1221–R1242.

Wimley, W. C. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 905–917.

Wimley, W. C.; Hristova, K. Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. *The Journal of Membrane Biology.* **2011**, *239(1-2)*, 27–34.

Wu, X.; Wang, Z.; Li, X.; Fan, Y.; He, G.; Wan, Y.; Yu, C.; Tang, J.; Li, M.; Zhang, X.; Zhang, H.; Xiang, R.; Pan, Y.; Liu, Yan.; Lu, L.; Yang, L. *In vitro* and *in vivo* activities of antimicrobial peptides developed using an amino acid-based activity prediction method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **2014**, *58(9)*, 5342–5349.

Xiao X. H.; Miao H. M.; Xu Y. G.; Zhang J. Y.; Chai L. H.; Xu J. J. Analysis of skin and secretions of Dybowski's frogs (*Rana dybowskii*) exposed to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* identifies immune response proteins. *Vet J.* **2014**, *200(1)*: 127-132.

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

Yeaman, M. R. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews.* **2003**, *55(1)*, 27–55.

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