



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**

**Identificação e caracterização de peptídeos ativos sobre
bactérias patogênicas isolados da pele
do anuro *Boana raniceps* (Cope, 1862)**

**Autor: Gabriel Gonçalves de Freitas
Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro**

**Brasília/DF
2020**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Identificação e caracterização de peptídeos ativos sobre
bactérias patogênicas isolados da pele
do anuro *Boana raniceps* (Cope, 1862)**

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

Autor: Gabriel Gonçalves de Freitas
Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Brasília/DF
2020



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Gabriel Gonçalves de Freitas

**Identificação e caracterização de peptídeos ativos sobre
bactérias patogênicas isolados da pele
do anuro *Boana raniceps* (Cope, 1862)**

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Mariana S. Castro

Presidente

Departamento de Ciências Fisiológicas/IB

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Membro Titular

Departamento de Biologia Celular/IB

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Marcos Rodrigo Alborghetti

Membro Titular

Faculdade de Medicina

Universidade de Brasília

Agradeço primeiramente a Deus, por ter sido meu amparo nas horas de angústia, e gostaria dedicar este trabalho aos meus pais Laercio dos Reis de Freitas e Maria Gonçalves de Freitas, que junto com minha família deram carinho e apoio nessa etapa de minha vida. Também gostaria de dedicar este trabalho às pessoas com quem convivi ao longo desses anos e ao apoio e compreensão de todos.

AGRADECIMENTOS

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

À minha orientadora, Profa. Dra. Mariana de Souza Castro, que me aceitou como orientando, pela orientação, pelo ensinamento, paciência e ajuda indispensável durante o decorrer do mestrado.

Ao Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior, pela co-orientação durante o mestrado, pelo auxílio na coleta e extração das amostras, pelos ensinamentos durante a minha formação.

Aos meus pais Laercio dos Reis de Freitas e Maria Gonçalves de Freitas, aos meus irmãos Daniel Gonçalves de Freitas e Miguel Gonçalves de Freitas, que sempre me apoiaram durante minha formação acadêmica.

Aos doutorandos Carlos José Correia de Santana e Gislene Ferreira Baptista, pelos ensinamentos e ajuda inestimável durante a realização do presente trabalho.

Aos alunos e colegas de Mestrado João Martins e Brunna Oliveira, pelo auxílio e ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Aos meus grandes amigos Daniel Ferreira, Sabrina Sara, Vinicius Santos, Francielly Telles e Kleonys Santos, que me deram amparo e motivação durante os anos de mestrado.

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

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

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

APOIO FINANCEIRO

A dissertação de mestrado intitulada “Identificação e caracterização de peptídeos ativos sobre bactérias patogênicas isolados da pele do anuro *Boana raniceps* (Cope, 1862)” desenvolvida por Gabriel Gonçalves de Freitas 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. 0193.001736/2017), da CAPES (por meio da concessão de bolsa de estudos – mestrado), da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

RESUMO

O número de microrganismos patogênicos multirresistentes vem crescendo nos últimos anos devido ao uso inadequado dos antibióticos comerciais atualmente disponíveis, sendo assim necessária a busca de novas drogas que possam atuar como agentes antimicrobianos. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm se mostrado como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas. As glândulas serosas da pele dos anuros são uma rica fonte de peptídeos antimicrobianos e antiparasitários. O presente projeto teve como objetivo isolar, purificar e caracterizar química e biologicamente peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Boana raniceps*. A secreção cutânea de *B. raniceps* foi fracionada por RP-HPLC empregando coluna C₁₈ onde foram identificados e purificados sete peptídeos antimicrobianos. Os peptídeos isolados foram submetidos a sequenciamento químico por degradação de Edman e análises de similaridade revelaram que o peptídeo Br18 corresponde a um fragmento da Figainina 2 e os demais correspondem às Raniseptinas 3, 6, 7 e 8 previamente identificadas a partir de uma biblioteca de cDNAs gerada para essa espécie. Finalmente, o peptídeo Br17 corresponde a uma nova Raniseptina com alta similaridade com as Raniseptinas 10 e 6, sendo que o peptídeo Br17 apresenta uma deleção dos dois resíduos de aminoácidos da porção N-terminal em relação às Raniseptinas citadas. Após uma avaliação preliminar, as Raniseptinas 3 e 6 foram sintetizadas quimicamente e suas propriedades antimicrobianas e hemolíticas foram avaliadas. As duas Raniseptinas sintetizadas mostraram-se bastante ativas exibindo mesmos valores de MIC sobre as bactérias Gram-negativas: *E. coli* (MIC = 2 µM) e *K. pneumoniae* (MIC = 1 µM). No caso das bactérias Gram-positivas testadas, os peptídeos mostraram-se menos ativos, sendo que a Rsp-3 exibiu valores de MIC iguais a 4 e 8 µM para *S. aureus* e *S. epidermidis*, respectivamente, enquanto a Rsp-6 mostrou-se menos efetiva sobre a bactéria *S. aureus* exibindo um valor de MIC igual a 32 µM. Ambos os peptídeos não foram capazes de inibir completamente o crescimento da levedura *C. albicans*, mesmo na maior concentração empregada (128 µM). As Raniseptinas 3 e 6 revelaram-se pouco hemolíticas, promovendo menos de 5% de hemólise nas concentrações onde a atividade antibacteriana foi relevante (entre 2 e 8 µM). O presente estudo reforça o potencial terapêutico dos peptídeos antimicrobianos presentes nas secreções cutâneas dos anuros que, quando explorados adequadamente, podem ser úteis no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

Palavras-chave: anuros; *Boana raniceps*; secreção cutânea; purificação; propriedades antimicrobianas.

ABSTRACT

The number of multidrug-resistant pathogenic microorganisms has been growing in recent years due to the inadequate use of currently available commercial antibiotics, making it necessary to search for new drugs that can act as antimicrobial agents. Antimicrobial peptides (AMPs) have been shown to be a promising alternative for the development of new antimicrobial drugs. The serous glands in the skin of anurans are a rich source of antimicrobial and antiparasitic peptides. This project aimed to isolate, purify and characterize chemically and biologically antimicrobial peptides present in the cutaneous secretion of the anuran *Boana raniceps*. The skin secretion of *B. raniceps* was fractionated by RP-HPLC using a C₁₈ column where seven antimicrobial peptides were identified and purified. The isolated peptides were subjected to chemical sequencing by Edman degradation and similarity searches revealed that the peptide Br18 corresponds to a fragment of Figainin 2 and the others correspond to Raniseptins 3, 6, 7 and 8 previously identified from a library of cDNAs generated for that species. Finally, the Br17 peptide corresponds to a new Raniseptin with high similarity to the Raniseptins 10 and 6, with the Br17 peptide showing a deletion of the two amino acid residues of the N-terminal portion in relation to the aforementioned Raniseptins. After a preliminary evaluation, Raniseptins 3 and 6 were chemically synthesized and their antimicrobial and hemolytic properties were evaluated. The two Raniseptins synthesized were shown to be very active exhibiting the same MIC values on Gram-negative bacteria: *E. coli* (MIC = 2 µM) and *K. pneumoniae* (MIC = 1 µM). In the case of the Gram-positive bacteria tested, the peptides were less active, with Rsp-3 showing MIC values of 4 and 8 µM on *S. aureus* and *S. epidermidis*, respectively, while Rsp-6 is less effective on *S. aureus* exhibiting a MIC value of 32 µM. Both peptides were not able to completely inhibit the growth of the yeast *C. albicans*, even at the highest concentration used (128 µM). Raniseptins 3 and 6 proved to be low hemolytic, promoting less than 5% of hemolysis at concentrations where antibacterial activity was relevant (between 2 and 8 µM). The present study reinforces the therapeutic potential of antimicrobial peptides present in the skin secretions of anurans which, when properly explored, can be useful in the development of new antimicrobial agents.

Keywords: anurans; *Boana raniceps*; skin secretion; purification; antimicrobial properties.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Anfíbios.....	17
1.2. Hylidae.....	19
1.3. Hilídeos e seus compostos ativos.....	20
1.4. <i>Boana raniceps</i>	21
1.5. Resistência antimicrobiana e peptídeos antimicrobianos.....	22
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS E METAS.....	31
3.1. Objetivo Geral.....	31
3.2. Metas Estabelecidas.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. Coleta e obtenção da secreção cutânea de <i>B. raniceps</i>	32
4.2. Fracionamento cromatográfico da secreção bruta de <i>B. raniceps</i>	32
4.3. Purificação dos peptídeos antimicrobianos de <i>B. raniceps</i>	32
4.4. Análises por espectrometria de massas.....	33
4.5. Sequenciamento químico dos peptídeos antimicrobianos de <i>B. raniceps</i>	33
4.6. Análises computacionais.....	33
4.7. Análises por dicroísmo circular dos peptídeos antimicrobianos de <i>B. raniceps</i>	34
4.8. Síntese química dos peptídeos Rsp-3 e Rsp-6.....	34
4.9. Quantificação dos peptídeos.....	37
4.10. Determinação da atividade antimicrobiana dos peptídeos Rsp-3 e Rsp-6 sobre bactérias patogênicas.....	37
4.11. Determinação da atividade antimicrobiana dos peptídeos Rsp-3 e Rsp-6 sobre a levedura patogênica <i>Candida albicans</i>	38
4.12. Determinação da atividade hemolítica dos peptídeos Rsp-3 e Rsp-6.....	38
5. RESULTADOS.....	39
5.1. Purificação dos peptídeos antimicrobianos de <i>B. raniceps</i>	39
5.2. Análises por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF.....	39
5.3. Caracterização estrutural dos peptídeos antimicrobianos de <i>B. raniceps</i>	43
5.4. Características físico-químicas dos peptídeos antimicrobianos de <i>B. raniceps</i>	45
5.5. Análises estruturais por simulação computacional e por dicroísmo circular.....	46

5.6. Síntese química dos peptídeos Rsp-3 e Rsp-6.....	49
5.7. Efeitos antimicrobianos e hemolíticos dos peptídeos Rsp-3 e Rsp-6.....	51
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÃO.....	57
8. PERSPECTIVAS.....	58
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração de um corte vertical do tegumento de um anuro.....	18
Figura 2. Biossíntese de peptídeos provenientes da secreção cutânea de anuros.....	21
Figura 3. Distribuição geográfica da espécie <i>Boana raniceps</i> e, em vermelho, indicada a localização de Brasília/DF (IUCN 2019) (à esquerda). Padrão de coloração mais comum na espécie (A) e as listras na parte interna das coxas e região inguinal (B).....	22
Figura 4. Mecanismos de resistência bacteriana às drogas.....	23
Figura 5. Efeitos biológicos dos PAMs.....	24
Figura 6. Tipos de estruturas secundárias observadas em peptídeos antimicrobianos.....	25
Figura 7. Modelo de <i>barrel-steve</i>	27
Figura 8. Modelo do poro toroidal.....	27
Figura 9. Modelo <i>carpet-like</i>	28
Figura 10. Modelo <i>Shai-Matsuzaki-Huang</i> (SMH).....	29
Figura 11. Fluxograma do procedimento de síntese química de peptídeos em fase sólida.....	36
Figura 12. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção bruta de <i>B. raniceps</i> , empregando-se coluna C ₁₈ (Shim-pack VP-ODS, No. 2122095, 4,6 x 150 mm, 5 µm) com fluxo de 1 mL/min e detecção ao UV em 216 nm.....	39
Figura 13. Espectro de massas do tipo MALDI-TOF da fração 17 exibindo um componente principal com massa molecular protonada [M+H] ⁺ de 2.936,6 Da.....	40
Figura 14. Espectro de massas do tipo MALDI-TOF da fração 18 exibindo um componente principal com massa molecular protonada [M+H] ⁺ de 2.746,5 Da, podendo-se observar a presença de adutos de sódio e potássio.....	40
Figura 15. Espectro de massas do tipo MALDI-TOF da fração 19 exibindo um componente principal com massa molecular protonada [M+H] ⁺ de 3.137,5 Da.....	41
Figura 16. Espectro de massas do tipo MALDI-TOF da fração 20 exibindo um componente principal com massa molecular protonada [M+H] ⁺ de 3.087,5 Da.....	41
Figura 17. Espectro de massas do tipo MALDI-TOF da fração 21 exibindo um componente principal com massa molecular protonada [M+H] ⁺ de 3.087,4 Da.....	42
Figura 18. Espectro de massas do tipo MALDI-TOF da fração 22.1 exibindo um	

componente principal com massa molecular protonada $[M+H]^+$ de 3.120,5 Da.....	42
Figura 19. Espectro de massas do tipo MALDI-TOF da fração 22.2 exibindo um componente principal com massa molecular protonada $[M+H]^+$ de 2.959,7 Da.....	43
Figura 20. Alinhamento múltiplo das sequências dos peptídeos de <i>B. raniceps</i> isolados no presente trabalho.....	44
Figura 21. Alinhamento da sequência do peptídeo Br18 com a sequência da Figainina 2.....	45
Figura 22. Projeções em roda helicoidal (Schiffer-Edmundson) das Raniseptinas Br17, 3, 6, 7 e 8 e do fragmento da Figainina 2 (Br18).....	46
Figura 23. Modelos teóricos tridimensionais das Raniseptinas Br17, 3, 6, 7 e 8 e do fragmento da Figainina 2 (Br18) gerados pelo site I-TASSER.....	47
Figura 24. Análise da formação de estruturas secundárias por meio de dicroísmo circular dos peptídeos de <i>B. raniceps</i> isolados no presente trabalho. (A) Br17, (B) Fng-2 frag. (Br18), (C) Rsp-7, (D) Rsp-8, (E) Rsp-6 e (F) Rsp-3.....	48
Figura 25. Perfil cromatográfico típico resultante da purificação do peptídeo antimicrobiano sintético Rsp-6, empregando-se coluna C ₁₈ (Shim-pack VP-ODS, No. 2122095, 4,6 x 150 mm, 5 μm) com fluxo de 1 mL/min e detecção ao UV em 216 nm.....	50
Figura 26. Perfil cromatográfico típico resultante da purificação do peptídeo antimicrobiano sintético Rsp-3, empregando-se coluna C ₁₈ (Shim-pack VP-ODS, No. 2122095, 4,6 x 150 mm, 5 μm) com fluxo de 1 mL/min e detecção ao UV em 216 nm.....	50
Figura 27. Atividade hemolítica dos peptídeos antimicrobianos Rsp-3 e Rsp-6 sobre eritrócitos humanos.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características físico-químicas dos peptídeos antimicrobianos de <i>B. raniceps</i>	45
Tabela 2. Conteúdo de α -hélice (%) dos peptídeos antimicrobianos de <i>B. raniceps</i> na presença de SDS 35 mM a 25 °C.....	48
Tabela 3. Atividade antimicrobiana (MIC, μ M) dos peptídeos Rsp-3 e Rsp-6 sobre microrganismos patogênicos.....	51

SIGLAS E ABREVIACOES

IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza
Rsp	Raniseptina
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
TLR	Receptores do tipo <i>Toll</i>
LPS	Lipossacarídeo
LTA	Ácido lipoteicóico
MAVS	Proteína mitocondrial de sinalização antiviral
SMH	Modelo de Shai-Matsuzaki-Huang
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Associated Laser Desorption Ionization – Time of Flight</i>
HPLC	<i>High Performace Liquid Chromatography</i>
CMI	Concentração inibitória mínima
HC ₅₀	Concentração hemolítica 50%
mA	Miliamper
TFA	Ácido trifluoracético
DC	Dicroísmo circular
Fmoc	Cloroformiato de 9-fluorenilmetila
DCM	Diclorometano
DMF	Dimetilformamida
KCN	Cianeto de potássio
HBTU	1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurôniohexafluorofosfato
DIPEA	N,N'-diisopropiletilamina
TIS	Triisopropilsilano
nm	Nanômetro
µM	Micromolar
µL	Microlitro
mmol	Milimolar

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CFU	Unidade formadora de colônia
APD3	<i>Antimicrobial Peptide Database</i>
Da	Daltons
HCCA	Ácido alfa-ciano-4-hidroxinâmico
GRAVY	Índice médio de hidropaticidade
SDS	Dodecil sulfato de sódio
tBu	t-Butila
Boc	t-Butiloxicarbonila
Trt	Tritila

TABELA DE AMINOÁCIDOS

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

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anfíbios

A classe Amphibia é composta por três ordens distintas, a Anura com representantes conhecidos como rãs, pererecas e sapos com aproximadamente 7.173 espécies descritas, a ordem Caudata conhecida por ter como representantes as salamandras e os tritões, com aproximadamente 741 espécies, e a ordem Gymnophiona, as cecílias e as cobras-cegas, com aproximadamente 214 espécies descritas, totalizando 7.960 espécies descritas como indicado por Frost (2020). O Brasil apresenta o maior número de espécies de anfíbios e sua fauna compreende cerca de 1.080 indivíduos, divididas em 1.039 espécies de anuros, 36 espécies de gymnophionas e 5 espécies conhecidas de caudatas (AmphibiaWeb, IUCN 2019).

A classe Amphibia constitui um grupo de animais com capacidade limitada de defesa, tornando-se vulneráveis tanto ao meio ambiente quanto a predadores. Assim, esses animais evoluíram apresentando adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais voltadas para a defesa (Gomes *et al.*, 2007; Nacif-Marçal *et al.*, 2015). Uma das principais características dos anfíbios é seu tegumento epitelial especializado, que realiza grande parte das trocas gasosas de oxigênio e gás carbônico com o meio ambiente e devido a isso dependem de habitat muito úmido. Além disso, seu tegumento ainda é capaz de realizar trocas de solutos, osmorregulação, regulação de temperatura corporal e defesa contra predadores e microrganismos (Sebben *et al.*, 1993; König *et al.*, 2015).

Esses animais possuem duas fases em seu ciclo de vida, sendo uma delas obrigatoriamente na água, denominada fase larval, onde os girinos realizam a respiração branquial, pulmonar e cutânea, que pode ser realizada em conjunto ou separadamente; já durante a fase adulta, os anfíbios podem ocupar tanto o meio terrestre quanto o aquático, porém durante sua fase de reprodução eles necessitam obrigatoriamente da água (Storer, 1974; Sebben *et al.*, 1993; Duellman & Trueb, 1994).

Os anuros apresentam dois tipos distintos de glândulas, sendo elas as glândulas mucosas que são responsáveis pela produção do muco que por sua vez mantém o tegumento úmido e escorregadio através da produção de mucinas e as glândulas granulosas ou serosas, que são responsáveis pela produção, armazenamento e excreção das substâncias tóxicas e nocivas, (Figura 1). Essas substâncias apresentam funções fisiológicas de proteção contra microrganismos e predadores. Na ausência desta proteção, sua pele é facilmente infectada por fungos e bactérias (Sebben *et al.*, 1993; Toledo & Jared, 1995; Popov *et al.*, 2019).

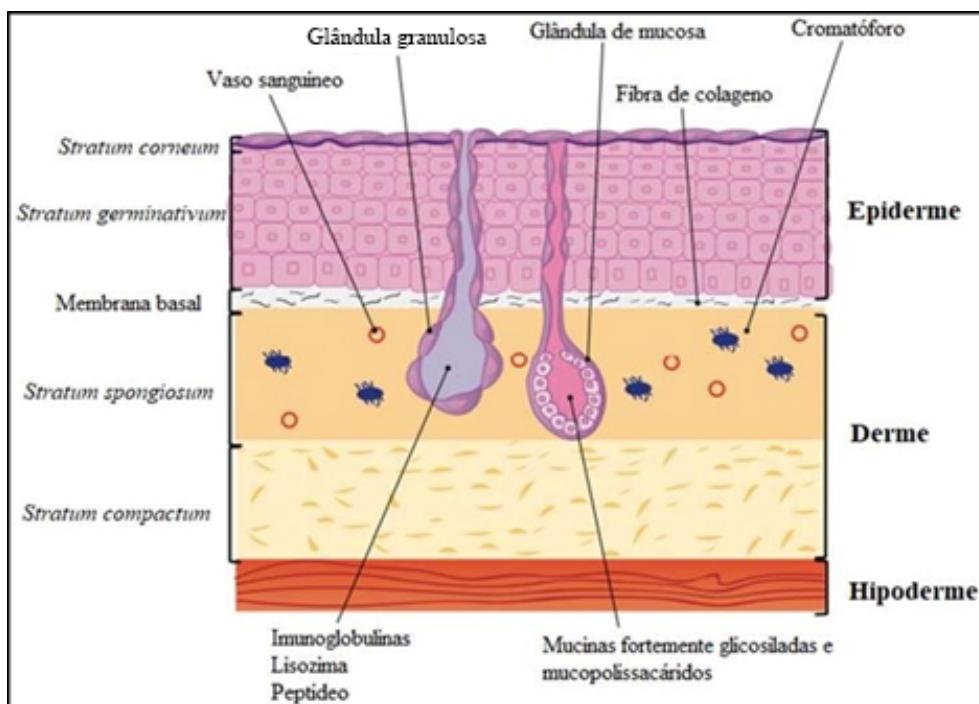


Figura 1. Ilustração de um corte vertical do tegumento de um anuro. A epiderme é composta pelo *Stratum corneum* seguida por uma camada mais basal, o *Stratum germinativum*. A derme é composta pelos *Stratum spongiosum* e *Stratum compactum*, sendo que é no *Stratum spongiosum* que ficam localizados os cromatóforos, responsáveis pela coloração dos anfíbios, e as glândulas granulosas e mucosas (Demori *et al.*, 2019).

As glândulas mucosas estão distribuídas em toda a superfície da pele dos anuros. Produzem e secretam substâncias ricas em compostos mucopolissacarídicos, denominadas mucinas, que se espalham por toda superfície da pele, mantendo-a úmida, permeável tanto à água quanto à troca de gases. Tais compostos ainda regulam a temperatura corporal. As glândulas mucosas são anatomicamente menores e numericamente maiores, cerca de dez glândulas mucosas para cada glândula granulosa (Toledo & Jared, 1995).

As glândulas granulosas ou serosas são menos numerosas, porém sintetizam, armazenam e expelem grande parte das substâncias tóxicas e nocivas encontradas na secreção cutânea dos anfíbios. A liberação do conteúdo ocorre através da contração dos miócitos inervados por fibras simpáticas que envolvem as glândulas. Essa liberação é ocasionada por estresse e/ou injúria (lesão) do tegumento dos anfíbios. As glândulas serosas são capazes de produzir substâncias com efeitos fisiológicos diversos, como aminas biogênicas, esteroides, alcaloides, bufodienolídeos, além de peptídeos e proteínas, com ação vasoconstritora, cardiotoxica, neurotóxica, miotóxica, alucinógena ou anestésica, dentre outras. Um dos grupos de compostos mais estudados são os peptídeos com ação antimicrobiana (Simmaco *et al.*, 1998; Toledo & Jared, 1995; Nascimento *et al.*, 2003; Nacif-Marçal *et al.*, 2015).

As glândulas granulosas são divididas em três grupos e são classificadas de acordo com a região em que se localizam como, por exemplo, as parotóides que se localizam no dorso do animal logo após aos ouvidos, as lombares que se localizam na região inguinal do animal e as peitorais. A distribuição dessas glândulas está relacionada com a necessidade de defesa do animal contra possíveis predadores e inimigos naturais que tentam mordê-los ou engoli-los, sendo que essa distinção é bastante perceptível nos Bufonidae (Duellman & Trueb, 1994; Toledo & Jared, 1995).

1.2. Hylidae

A família Hylidae popularmente conhecida como hilídeos, *treefrogs* ou pererecas (do termo em tupi: *pere' reg*, “ir aos saltos”) é composta por 726 espécies, que foram agrupadas em sete subfamílias distintas. Esses animais ocorrem em áreas temperadas, principalmente nas Américas, Austrália, Ásia e Europa (Duellman *et al.*, 1997; Frost 2020). Os hilídeos representam uma das famílias mais diversas em números de espécies e grande parte desses animais são arborícolas, mas alguns indivíduos são aquáticos ou até fossoriais. Esses animais possuem certas características morfológicas como, por exemplo, cintura peitoral com o formato arcífero, esterno desenvolvido, maxilas e pré-maxilas com odontóides e uma cartilagem entre a última e a penúltima falanges dos dedos e, principalmente, as ventosas arredondadas nas pontas dos dígitos. Algumas dessas características podem ser bastante reduzidas ou ausentes no caso dos hilídeos não arborícolas (Caramaschi & Cruz, 2002; Wiens *et al.*, 2010; Dornelles *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2015). Porém certas características são determinantes para sua identificação, como cabeça ligeiramente grande, olhos localizados lateralmente e direcionados para frente, patas posteriores longas que lhes permitem saltar grandes distâncias, já o tamanho do corpo pode variar de 17 a 140 mm (Vieira, 2004).

Em 2005, Faivovich e colaboradores fizeram uma reavaliação de alguns grupos taxonômicos da família Hylidae e, baseando-se em dados moleculares, eles propuseram a revalidação do gênero *Hypsiboas*, a criação de novos gêneros e o rearranjo de espécies existentes (Faivovich *et al.*, 2005). Algumas espécies do grupo fenético *Hyla* foram realocadas para o gênero *Hypsiboas*, tais como os grupos *Hyla geographica* e *Hyla albopunctatus*, sendo que nesse último encontra-se incluída a espécie *Hypsiboas raniceps* (Faivovich *et al.*, 2005). Mais recentemente, Dubois e colaboradores avaliaram que tanto o gênero *Hypsiboas* quanto o gênero *Boana* representam grupos plenos e não sinônimos de *Hyla* e que, de acordo com as normas taxonômicas, *Hyla* encontra-se dentro do subgrupo *Boana*, logo as espécies foram realocadas no gênero *Boana* (Dubois *et al.*, 2017).

1.3. Hilídeos e seus compostos ativos

Os hilídeos são conhecidos como importante fonte de diversos tipos de peptídeos antimicrobianos (PAMs), com características bastante conservadas (Almeida *et al.*, 2015; Nacif-Marçal *et al.*, 2015). Os peptídeos antimicrobianos encontrados nas famílias Hylidae e Ranidae são sintetizados a partir de uma única família de polipeptídios precursores, que são expressos por um RNA mensageiro característico, com regiões extremamente conservadas. Tais características sugerem que os indivíduos dentro dessas famílias apresentam um ancestral em comum (Vanhoye *et al.*, 2003, Nicolas & El Amri, 2009; Nacif-Marçal *et al.*, 2015).

Na secreção cutânea das espécies da família Hylidae também podem ser encontradas aminas biogênicas, tais como histamina e serotonina. Dentre os PAMs encontrados no tegumento dos hilídeos, encontram-se peptídeos pertencentes ao grupo das Figaininas (Fng), que apresentam alta similaridade com os peptídeos do grupo das Hylinas (Castro *et al.*, 2009; Barbosa, 2010). Estas moléculas apresentam a região N-terminal de seus peptídeos maduros bastante conservada e compostas por Phe, Ile, Gly, Ala e Ile. Outra característica interessante é fato de ambos os grupos de PAMs apresentarem uma elevada atividade antimicrobiana, como demonstrado para o peptídeo Raniseptina-B1 1 da secreção de *B. lundii* descrita por Araújo (2018) e para a Hylina-a1 descrita por Castro e colaboradores (2009).

Outros PAMs de hilídeos são as Pseudinas, quatro peptídeos isolados da secreção do perereca sul-americana *Pseudis paradoxa*, os quais apresentam uma elevada similaridade com as Magaininas e as Dermaseptinas (Olson III *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2011). Essa família de peptídeos exibiu uma maior atividade sobre bactérias Gram-negativas como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* e *K. pneumoniae*, incluindo linhagens resistentes. Entretanto foi observado que o peptídeo Pseudina-2 estimula a secreção de insulina da linha de células beta clonais e nesta atividade está envolvido um mecanismo independente de Ca^{+2} (Abdel-Wahab *et al.*, 2008).

No grupo das Frenatinas foram encontrados cinco peptídeos antimicrobianos descritos nas espécies *Litoria infrafronata* e *Sphaenorhynchus lacteus*, ambas pertencentes ao grupo dos hilídeos. Esses peptídeos apresentam alta similaridade com outros seis grupos de peptídeos antimicrobianos descritos para a subfamília Pelodryadinae como as Aureinas, Caerinas, Citropinas e Maculatinas, todas descritas para anfíbios da região Australo-Papua (Conlon *et al.*, 2014). Outro grupo de peptídeos antimicrobianos são as Hylaseptinas (Hsp) presentes na pele da perereca amazônica *Boana punctatus*, sendo descritas nove sequências ao todo, entretanto até o presente momento apenas a Hylaseptin P1 (HSP1) foi identificada e isolada da secreção bruta por Prates e colaboradores (2004).

Os PAMs de anuros sofrem modificações pós-traducionais. Uma das modificações mais comuns em peptídeos antimicrobianos (PAMs) é a presença do grupo amida na região C-terminal (amidação). A presença do grupamento amida na região C-terminal influencia diretamente na carga líquida positiva dos peptídeos, o que provavelmente tem um efeito direto em sua atividade biológica, aumentando seu efeito citolítico. Algumas modificações que também são encontrados nos peptídeos antimicrobianos são a fosforilação que é a inserção de um grupamento de fosfato e a glicosilação que é a inserção de um sacarídeo nas cadeias de aminoácidos (Castro *et al.*, 2009; König *et al.*, 2015) (Figura 2).

Devido à diversidade de atividades biológicas, os peptídeos secretados por anfíbios tem sido amplamente estudados durante os últimos anos, tanto por grupos acadêmicos quanto por farmacêuticos, devido seu grande potencial como fármacos (Chen *et al.*, 2005).

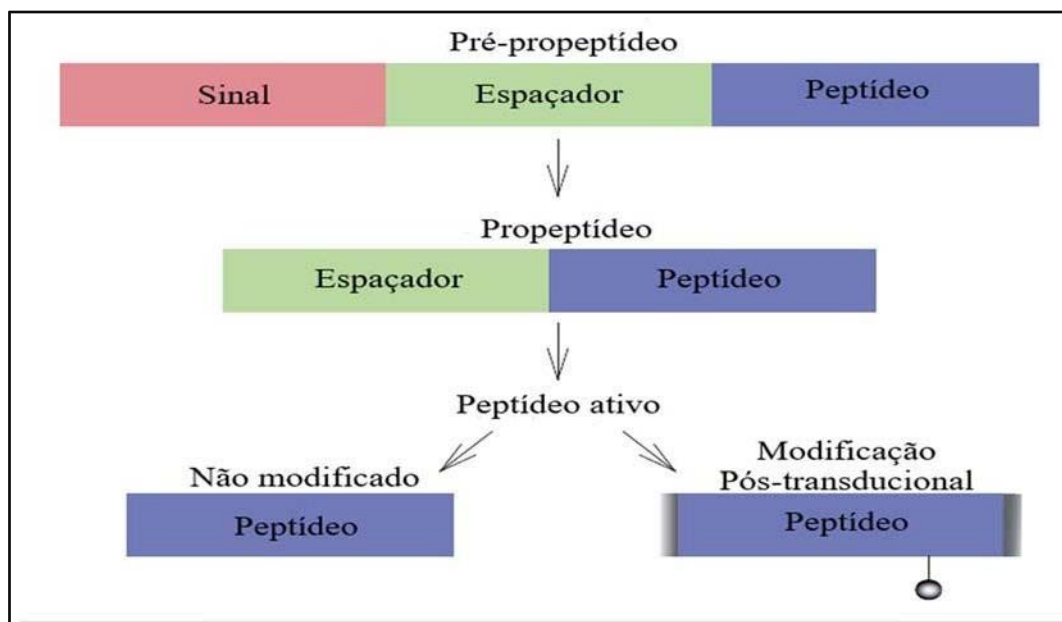


Figura 2. Biossíntese de peptídeos provenientes da secreção cutânea de anuros. Alguns exemplos de modificações pós-transducionais são a piroglutaminação da região N-terminal e a amidação da região C-terminal (König *et al.*, 2015).

1.4. *Boana raniceps*

A espécie *Boana raniceps* (Cope, 1862) é um hilídeo neotropical de porte moderado, de aproximadamente 10 centímetros. Esses animais podem ser comumente encontrados na região do Cerrado e da Caatinga, e sua distribuição ocorre desde o sul da Colômbia e norte da Guiana Francesa até o nordeste da Argentina (Figura 3). Essa espécie é tipicamente de habitats de mata densa, podendo ser observadas e encontradas embaixo de folhagens e galhos, ou até mesmo

vegetações rasteiras perto de lagos e lagoas, incluindo bancos de areias nas margens de grandes rios (Popov *et al.*, 2019; AmphibiaWeb). Apresenta corpo e membros esguios, com um padrão de coloração amarelo-claro e listras escuras, porém pode apresentar outras colorações dependendo da região. Uma de suas características morfológicas mais marcantes é a presença de listra nas coxas e região inguinal (Faivovich *et al.*, 2005).



Figura 3. Distribuição geográfica da espécie *Boana raniceps* e, em vermelho, está indicada a localização de Brasília/DF (IUCN 2019) (à esquerda). Padrão de coloração mais comum na espécie (A) e as listras na parte interna das coxas e região inguinal (B). Fotos: Robson W. Ávila e Paul Smith, respectivamente.

1.5. Resistência antimicrobiana e peptídeos antimicrobianos

Nos últimos anos tem se visto o surgimento de bactérias resistentes a vários antibióticos, e dentre os fatores responsáveis por tal fenômeno está o uso indiscriminados dos antibióticos naturais quanto de seus derivados (Nascimento *et al.*, 2003). Alguns microrganismos apresentam mecanismos para evitar a penetração dos antimicrobianos, além de enzimas que degradam os fármacos (Figura 4). Pode-se perceber a ação desse mecanismos de resistências aos antibióticos em infecções que antigamente eram tratáveis e que atualmente são refratárias ao tratamento, como as infecções causadas por cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e, até mesmo, linhagens de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a todos os 26 carbapenêmicos conhecidos (Spellberg *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2016).

Sabe-se que a atividade biológica é determinada pela características físico-químicas tanto das membranas microbianas quanto dos peptídeos. A compreensão desses fatores é bastante relevante para o desenho de peptídeos com maior potência e especificidade (Lee *et al.*, 2016). A combinação das múltiplas vias de atividade bactericida ou a potencialização dos

efeitos bactericidas diminuiria a chance de seleção de resistência aos peptídeos antimicrobianos em bactérias (Le *et al.*, 2017).

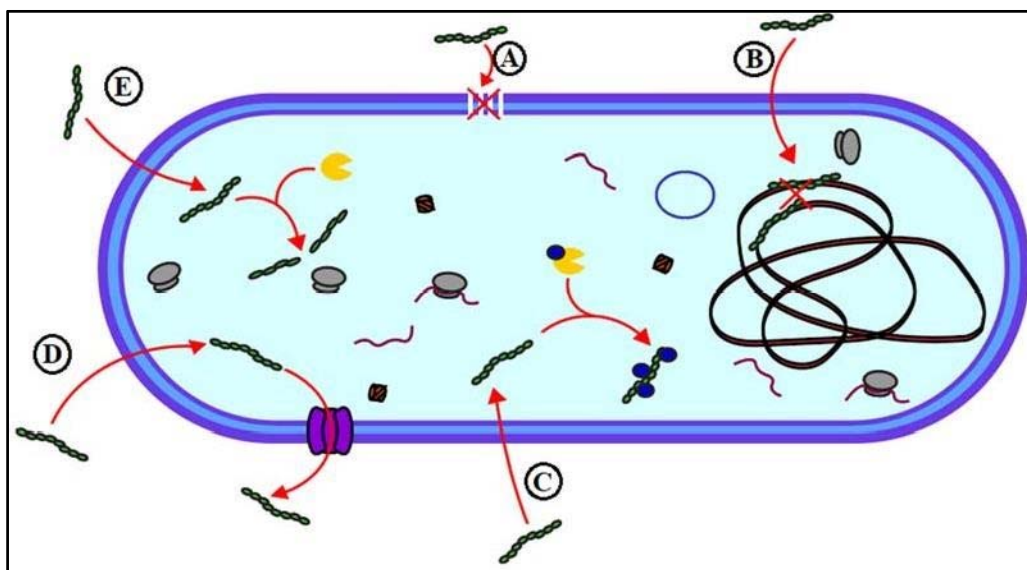


Figura 4. Mecanismos de resistência bacteriana às drogas. **A)** Inibição ou alteração da permeabilidade ou formação de poros da membrana; **B)** Inibição da ação genotóxica; **C)** Alteração do fármaco por ação enzimática; **D)** Ação de bomba de efluxo e **E)** Degradação do fármaco por ação enzimática (Imagem de Gabriel G. de Freitas).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) derivados de animais e plantas têm chamado bastante atenção dos pesquisadores, pois esses peptídeos fazem parte do sistema imune inato dos organismos e representam a primeira linha de defesa contra os microrganismos patogênicos (Nacif-Marçal *et al.*, 2015). Os anuros apresentam uma pele com uma gama de peptídeos antimicrobiano de amplo espectro, incluindo peptídeos ativos sobre bactérias multirresistentes aos antibióticos convencionais, sendo considerados como uma das mais ricas e diversificadas fontes naturais de peptídeos antimicrobianos (Nacif-Marçal *et al.*, 2015; Nizet, 2006).

As secreções dos anfíbios são constituídas de grandes quantidades de peptídeos biologicamente ativos que são armazenados e secretados por glândulas granulosas, que as expõem quando ocorre a lesão ou injúria do tegumento (Barra & Simmaco, 2005). Os anuros possuem um sistema imune inato que proporciona uma resposta rápida de liberação de peptídeos presentes em suas glândulas, que atuam contra uma gama de microrganismos oportunistas presentes em seu tegumento e, de certa forma, contra alguns predadores devido à sua atividade citolítica sobre células normais de mamíferos (Duellman & Trueb, 1994; Barra & Simmaco, 2005; Conlon, 2011).

Os peptídeos antimicrobianos são moléculas que podem variar em tamanho, sequência,

carga líquida, hidrofobicidade, estrutura tridimensional e espectro de ação (Duda Jr. *et al.*, 2002; Juarez *et al.*, 2003; Brand, 2007). São moléculas pequenas com massa molecular variando de 1 a 3 kDa e que, em sua grande maioria, são carregados positivamente (catiônicos) (Brand, 2007; Conlon, 2011).

Esses peptídeos são capazes de induzir suas atividades diretamente nos “alvos” através da interação com a membrana biológica dos patógenos ou, de maneira indireta, agindo sobre o sistema imune por meio da modulação de citocinas (Figura 5). Geralmente, os PAMs possuem carga líquida positiva entre +2 e +6 em pH 7,0 e cerca de 50% dos resíduos de aminoácidos presentes em suas cadeias peptídicas são hidrofóbicos (Duda Jr *et al.*, 2002; Juarez *et al.*, 2003; Brand, 2007; Conlon, 2011).

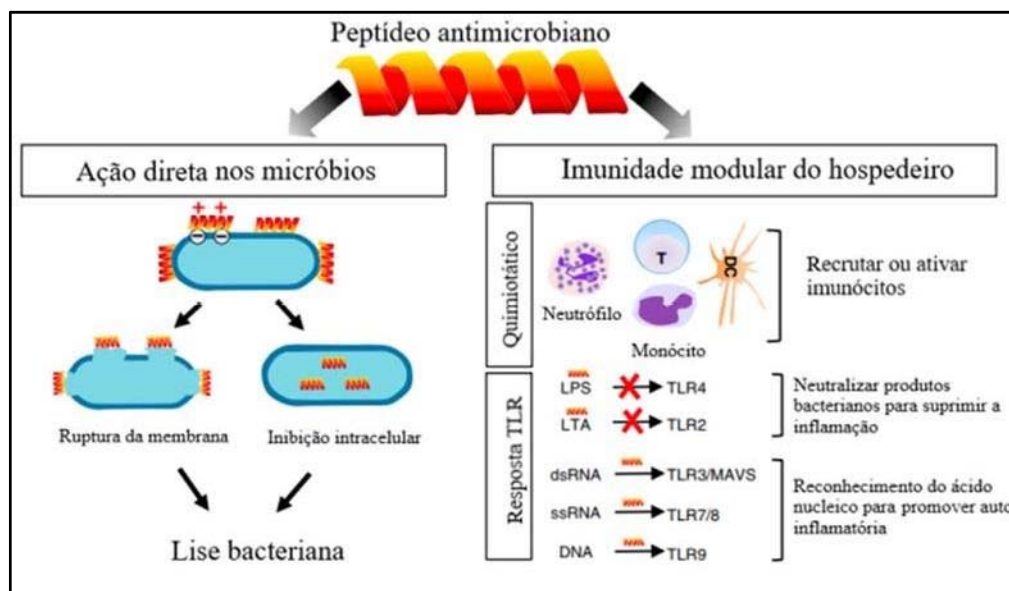


Figura 5. Efeitos biológicos dos PAMs. Os PAMs ligam-se às membranas bacterianas através de interações eletrostáticas, tanto para romper a membrana quanto para entrar na bactéria para inibir alguma função intracelular. Alguns PAMs também modulam a imunidade do hospedeiro através do recrutamento / ativação de imunócitos ou mediando o reconhecimento de receptores do tipo Toll (TLR) a produtos microbianos e ácidos nucleicos liberados com dano tecidual. DC, células dendríticas; LPS, lipopolissacarídeo; LTA, ácido lipoteicoico; MAVS, proteína mitocondrial de sinalização antiviral (Figura modificada de Zhang & Gallo, 2016).

Vários mecanismos de ação já foram propostos para explicar suas atividades e suas especificidades sobre os microrganismos (Brogden, 2005; Jenssen *et al.*, 2006; Hale & Hancock, 2007; Travkova *et al.*, 2017). Devido a sua composição e a sua estrutura secundária, os PAMs podem ser agrupados de acordo com tais características, como por exemplo, as Magaininas e as Dermaseptinas, que apresentam estruturas lineares; outros PAMs podem ser ricos em cisteínas como a *Esculentina*, ou ricos em aminoácidos específicos, como glicina,

prolina, arginina e histidina. Alguns PAMs podem apresentar estruturas em forma de α -hélice, folhas- β ou podem apresentar ambas as conformações, além de formas estendidas (Figura 6) (Mojsoska & Jenssen, 2015).

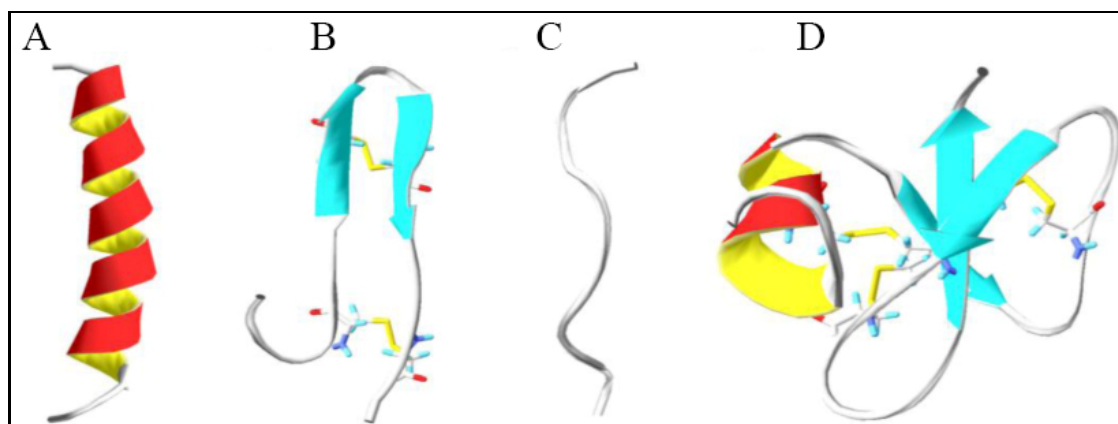


Figura 6. Tipos de estruturas secundárias observadas em peptídeos antimicrobianos. A) α -hélice, exemplo: Catelicidina humana LL-37, B) folhas- β , exemplo: Polifemusina, C) estendida, exemplo: Indolicidina e D) mista, exemplo: β -defensina-2 humana (Mojsoska & Jenssen, 2015).

Os peptídeos antimicrobianos, de forma geral, atuam produzindo perturbações na membrana bacteriana por meio de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, levando à formação de poros e desestabilização de membranas biológicas. Os aminoácidos com anéis aromáticos como o Trp também podem auxiliar o peptídeo a ancorar na membrana além de promoverem a curvatura da membrana (Kim & Cha, 2010; Wang, 2017). Essa interação é devido à presença de fosfolipídios que proporcionam uma carga negativa à membrana das bactérias, como o fosfatidilglicerol, fosfatidilserina e a cardiolipina. As bactérias ainda possuem outros tipos de fosfolipídios, tais como os lipopolissacarídeos para as Gram-negativas, e ácidos teicoicos e teicurônicos para as Gram-positivas, ocasionando um aumento da carga negativa. Assim, peptídeos antimicrobianos catiônicos interagem com a membrana das bactérias causando sua desestabilização e ocasionando a morte do organismo (Matsuzaki *et al.*, 1991; Mojsoska & Jenssen, 2015). Alguns desses peptídeos antimicrobianos somente adquirem estruturação como, por exemplo, em α -hélice, quando em contato com a membrana bacteriana (Bechinger & Lohner, 2006).

Vários modelos de interações peptídeo/membrana já foram propostos para explicar como, após a fixação inicial, os peptídeos antimicrobianos interagem com a membrana bacteriana induzindo seus efeitos deletérios (Jenssen *et al.*, 2006). Em todos os modelos até agora postulados, os peptídeos antimicrobianos interagem com as “cabeças lipídicas” ou grupo hidrofílico carregado negativamente na superfície da membrana bacteriana (Jenssen *et al.*,

2006). Os peptídeos interagem paralelamente à bicamada lipídica, quando em baixa razão peptídeo/membrana, porém quando a razão peptídeo/membrana começa a aumentar os peptídeos se orientam perpendicularmente à membrana e se inserem na bicamada, formando poros transmembranares (Brogden, 2005).

Quando avaliamos as estruturas secundárias apresentadas pelos PAMs, pode-se identificar quatro famílias: α -hélices, folhas- β , misturas entre estruturas $\alpha\beta$ (aleatórias) e estruturas não $\alpha\beta$ (estendidas), como já demonstrado na Figura 6 (Mojsoska & Jenssen, 2015). Os peptídeos que apresentam estruturas em α -hélices interagem com a membrana e a degradam através da formação de poros ou por meio de tapete, entretanto os peptídeos ricos em Prolina inibem a síntese proteica por meio da interação com os ribossomos (Wang, 2017). Os peptídeos antimicrobianos que apresentam estruturas em folhas- β podem atuar de diversas maneiras, promovendo a inibição da síntese da parede celular e inibição de componentes lipídicos na membrana (Wang, 2017).

Um dos modelos postulados para a ação dos PAMs é conhecido como *barrel-stave*. Este modelo sugere que, após a interação dos peptídeos antimicrobianos com a membrana bacteriana, ocorre o alinhamento perpendicular dos peptídeos ocasionando a formação de poros ou canais transmembranares. Os peptídeos antimicrobianos inserem suas cadeias hidrofóbicas em direção ao centro hidrofóbico da membrana, enquanto que as cadeias hidrofílicas se voltam para dentro (Brogden, 2005; Jenssen *et al.*, 2006; Hale & Hancock, 2007; Travkova *et al.*, 2017) (Figura 7). O modelo *barrel-stave* prevê que a formação do poro ou canal terá um tamanho consistente, porém isso não é verdade para maior parte dos peptídeos antimicrobianos, devido ao fato que a formação dos poros é irregular tanto para tamanho quanto para seletividade. Outro fator que altera a formação dos poros é a composição lipídica, podendo modular o equilíbrio da agregação peptídica e o número de peptídeos agregados (Brogden, 2005; Jenssen *et al.*, 2006; Hale & Hancock, 2007; Travkova *et al.*, 2017).

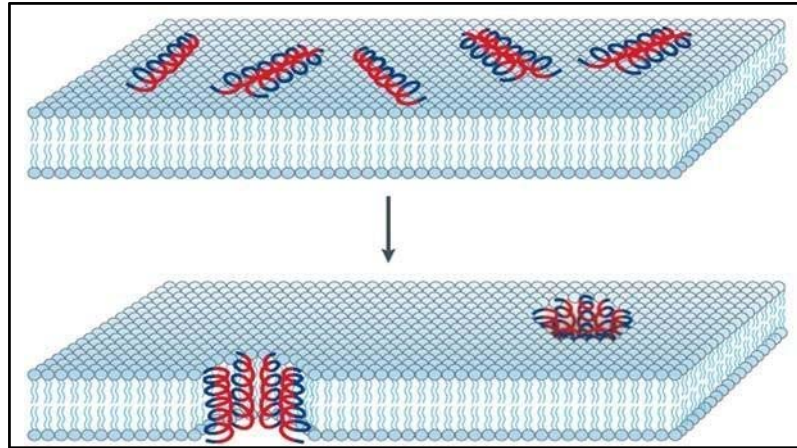


Figura 7. Modelo de *barrel-stave*. Os peptídeos agregados se inserem na membrana bacteriana de modo que as faces hidrofóbicas se alinham com a região hidrofóbica da membrana e as faces hidrofílicas formam a região interior, resultando na formação dos poros (Figura modificada de Brogden, 2005).

No modelo do poro toroidal, as interações peptídeo/membrana mostram-se mais forte. Nesse modelo, os peptídeos antimicrobianos agregam-se e se inserem em direção perpendicular da membrana bacteriana para a formação dos poros, bastante semelhante a formação do poro *barrel-stave*, porém este modelo se diferencia pelo fato de que a membrana bacteriana se curva para dentro do poro. Os peptídeos antimicrobianos só se inserem na membrana logo após atingirem o limiar de concentração, até então eles ficam dispersos perpendicularmente na membrana (Brogden, 2005; Travkova *et al.*, 2017) (Figura 8).

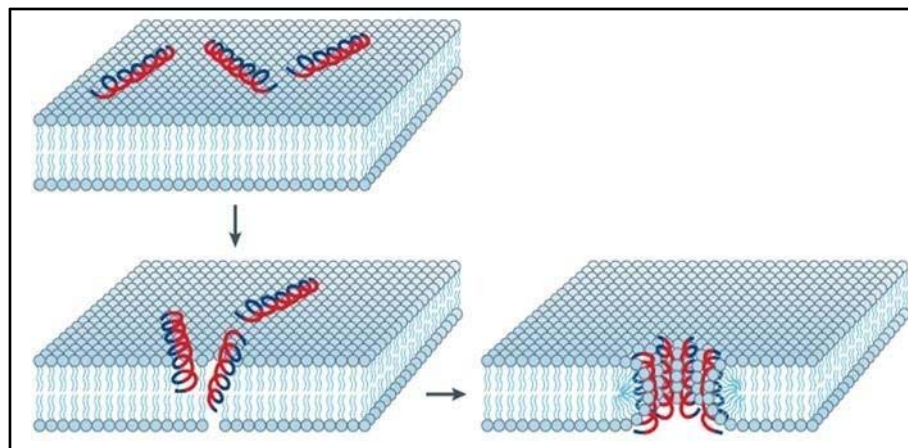


Figura 8. Modelo do poro toroidal. Neste modelo, os peptídeos agregados se inserem e induzem a membrana bacteriana a se curvar em direção ao centro (Figura modificada de Brogden, 2005).

O modelo *carpete* (*carpet-like*) foi primeiramente postulado por Pouny e colaboradores (1992) ao estudarem as Dermaseptinas. Os peptídeos antimicrobianos que atuam por esse mecanismo se acumulam e cobrem a superfície da membrana bacteriana, de modo semelhante a um tapete. Quando em altas concentrações, os peptídeos causam a permeabilização e desintegração da membrana levando à formação de micelas, de maneira semelhante aos detergentes (Shai & Oren, 2001; Brogden, 2005; Travkova *et al.*, 2017) (Figura 9).

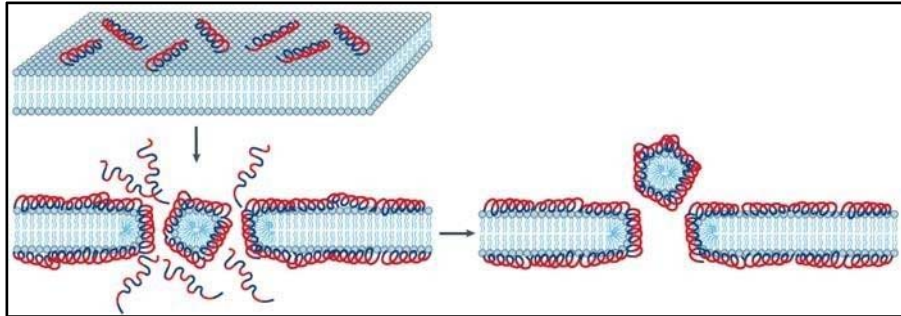


Figura 9. Modelo *carpet-like*. Neste modelo, os peptídeos se agrupam sobre a membrana bacteriana e, quando em concentrações elevadas, eles rompem a membrana ocasionando a formação de micelas (Figura modificada de Brogden, 2005).

O modelo *Shai-Matsuzaki-Huang* (SMH) leva à formação do carpete e de poro através da adesão dos peptídeos na membrana bacteriana e a formação dos poros leva os peptídeos a interagirem com alvos intracelulares (Shai, 1999) (Figura 10). Acredita-se que esse modelo seja o tipo de interação da maior parte dos peptídeos antimicrobianos, uma das razões que levam os pesquisadores a acreditarem no modelo SMH é o fato dele favorecer a entrada de peptídeos dentro da célula alvo (Zaslöff, 2002; Rinaldi, 2002).

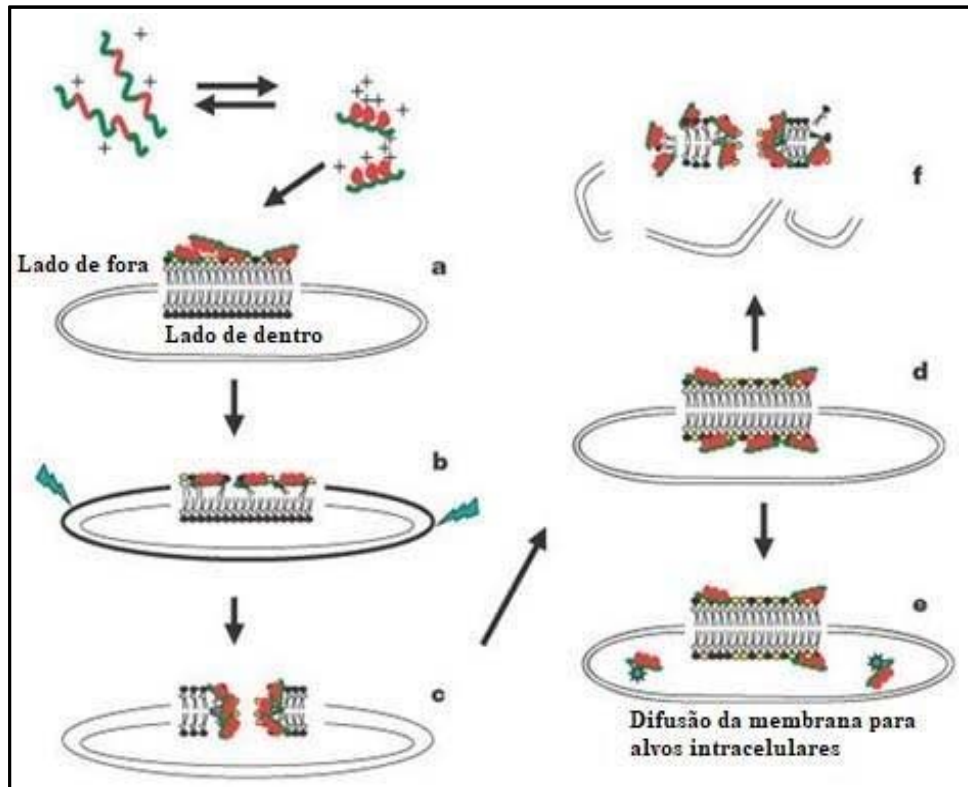


Figura 10. Modelo *Shai-Matsuzaki-Huang* (SMH). a) formação do carpete na membrana externa, b) integração do peptídeo na membrana levando à diminuição da membrana externa, resultando em tensão dentro na bicamada, c) formação de poros transitórios, d) transporte dos peptídeos antimicrobianos para dentro da célula alvo, e) difusão dos peptídeos para alvos intracelulares e f) colapso e fragmentação da membrana bacteriana levando à lise (Zaslöff, 2002).

2. JUSTIFICATIVA

O uso indiscriminado ou inadequado dos antibióticos comerciais existentes promoveu a emergência de resistência microbiana em diferentes patógenos até então de fácil tratamento. Pesquisadores tem buscado substâncias com ação antibiótica que possam atuar como novos medicamentos ou auxiliar os já existentes contra os patógenos multiresistentes.

As secreções cutâneas dos anfíbios apresentam grandes quantidades de substâncias com as mais diversas atividades biológicas, dentre as quais encontra-se aminas biogênicas, alcaloides e peptídeos com ação antimicrobiana, sendo que esses animais têm demonstrado grande potencial para busca de novas moléculas biologicamente ativas.

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são provenientes do sistema imune inato de diversos tipos de animais e atuam como a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores. Devido a essa atividade são potenciais candidatos para desenvolvimentos de novos fármacos para o combate a patógenos comuns e até multirresistentes.

O Brasil possui a maior fauna de anfíbios existente que, no entanto, é pouco explorada. Diante desse cenário, o grupo de pesquisa em Toxinologia da Universidade de Brasília vem se dedicando à busca de novos peptídeos antimicrobianos, principalmente aqueles presentes na secreção cutânea de anuros da fauna brasileira, visando o desenvolvimento de novos fármacos com potencial terapêutico.

3. OBJETIVOS E METAS

3.1. Objetivo Geral

Identificar, isolar, purificar e caracterizar química e biologicamente peptídeos antimicrobianos inéditos presentes na secreção cutânea do anuro *Boana raniceps*.

3.2. Metas Estabelecidas

- 3.2.1. Fracionamento da secreção bruta e purificação dos peptídeos antimicrobianos empregando cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C₁₈;
- 3.2.2. Análise dos peptídeos antimicrobianos de *B. raniceps* por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF;
- 3.2.3. Determinação das estruturas primárias dos peptídeos antimicrobianos de *B. raniceps*;
- 3.2.4. Análises de similaridade dos peptídeos antimicrobianos de *B. raniceps* com outros peptídeos antimicrobianos já identificados;
- 3.2.5. Síntese química dos peptídeos antimicrobianos de *B. raniceps*;
- 3.2.6. Avaliação dos efeitos antimicrobianos dos peptídeos antimicrobianos de *B. raniceps* sobre diferentes microrganismos patogênicos (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Candida albicans* ATCC 14053);
- 3.2.7. Avaliação dos efeitos citolíticos dos peptídeos antimicrobianos de *B. raniceps* sobre eritrócitos humanos;
- 3.2.8. Determinação dos componentes de estrutura secundária dos peptídeos antimicrobianos de *B. raniceps* empregando a técnica de dicroísmo circular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta e obtenção da secreção cutânea de *B. raniceps*

A coleta dos espécimes adultos machos foi realizada por meio de busca ativa, durante a noite com auxílio de lanternas. As coletas foram realizadas no município de Monte Alegre de Goiás (Goiás, divisa com Tocantins), na fazenda Nossa Senhora Aparecida sob a licença SISBIO número 65054-1. A secreção cutânea foi obtida por meio de estimulação elétrica moderada de corrente contínua de até 50 V com baixa amperagem, em torno de 500 mA. A secreção liberada foi coletada por meio de lavagem do corpo do animal com água Milli-Q, em seguida, congelada, liofilizada e armazenada a -20°C até o momento do uso.

4.2. Fracionamento cromatográfico da secreção bruta de *B. raniceps*

A secreção cutânea bruta de *B. raniceps* liofilizada foi dissolvida em alíquotas a 10 mg/mL em TFA 0,12% (v/v). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 13.000 x g durante 5 min. Alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram injetadas em coluna de fase reversa C₁₈ (Shim-pack VP-ODS, No. 2122095, 4,6 x 150 mm, 5 µm), com fluxo de 1 mL/min.

Inicialmente, a coluna foi equilibrada com TFA 0,12% (v/v) durante 15 min. Após a aplicação da amostra foi realizada uma corrida padronizada com gradiente crescente de 0-25% de TFA 0,12% (v/v) em acetonitrila em 5 min, de 25-45% em 25 min e, finalmente, de 45-70% em 40 min. A eluição das frações foi monitorada ao ultravioleta (UV) em 216 e 280 nm e as frações manualmente coletadas em tubos de prolipropileno e, em seguida, secas a vácuo e armazenadas a -20°C.

4.3. Purificação dos peptídeos antimicrobianos de *B. raniceps*

As frações cromatográficas de interesse foram coletadas e recromatografadas para purificação dos peptídeos antimicrobianos. Alíquotas (5 mg) foram dissolvidas em 1 mL de TFA 0,12% (v/v) e centrifugadas a 13.000 x g durante 5 min. O sobrenadante (100 µL) foi coletado e injetado em coluna de fase reversa C₁₈ (Kinetex 5µ XB-C18 100 Å, No. 00G-4605-E0, 4,6 x 250 mm), com fluxo de 1 mL/min.

A eluição foi realizada empregando-se gradiente de 0-35% de TFA 0,12% (v/v) em acetonitrila em 10 min e de 35-45% de TFA 0,12% (v/v) em acetonitrila em 40 min. A eluição dos peptídeos foi monitorada ao ultravioleta (UV) em 216 e 280 nm e as frações manualmente coletadas em tubos de polipropileno e, em seguida, secas a vácuo e armazenadas a -20°C.

4.4. Análises por espectrometria de massas

As frações cromatográficas resultantes do fracionamento da secreção bruta de *B. raniceps* e os peptídeos purificados foram analisados por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF em equipamento modelo AutoFlex II, (Bruker, Alemanha). As amostras foram ressuspendidas em TFA a 0,12% (v/v) em acetonitrila 50% (v/v) e 1 µL das amostras foram aplicadas em placa de aço inoxidável seguido da aplicação de 1 µL de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (20 mg/mL). A matriz foi diluída em TFA a 0,12% (v/v) em acetonitrila 50% (v/v). As amostras foram analisadas no modo refletido positivo, sendo a faixa m/z analisada de 1000 a 5000. A calibração foi realizada com o padrão *Peptide Calibration Standard II*, contendo os seguintes peptídeos: Bradicinina(1-7)_{[M+H]⁺}_mono (757,399 Da), Angiotensina_I_{[M+H]⁺}_mono (1.046,5418 Da), Angiotensina_II_{[M+H]⁺}_mono (1.296,6848 Da), Substância_P_{[M+H]⁺}_mono (1.347,7354 Da), Bombesina_{[M+H]⁺}_mono (1.619,8223 Da), ACTH_clip(1-17)_{[M+H]⁺}_mono (2.093,0862 Da), ACTH_clip(18-39)_{[M+H]⁺}_mono (2.465,1983 Da) e Somatostatina(28)_{[M+H]⁺}_mono (3.147,4710 Da).

4.5. Sequenciamento químico dos peptídeos antimicrobianos de *B. raniceps*

Os peptídeos purificados foram submetidos a sequenciamento químico por degradação de Edman, utilizando-se um sequenciador de peptídeos e proteínas automático modelo PSSQ 33A (Shimadzu, Japão). O equipamento foi previamente calibrado com uma mistura padrão de PTH-aminoácidos.

4.6. Análises computacionais

As estruturas primárias dos peptídeos foram analisadas empregando-se Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) e o banco APD3 (*Antimicrobial Peptide Database*, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), com o intuito de se determinar o grau de identidade e similaridade com outros peptídeos já caracterizados e disponíveis em bancos de dados.

Para a busca via Blastp foi utilizado o banco de dados de sequências proteicas não-redundante (nr), com abrangência para os organismos Anfíbios (taxid:8292). O alinhamento múltiplo das sequências dos peptídeos foi feito com o emprego da ferramenta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Para predições de seus componentes de estruturas secundária e de suas características físico-químicas foram utilizadas as seguintes ferramentas: SOPMA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr>), NetWheels (<http://tools.alanmol.com.br/NetWheels/>), I-TASSER

(<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) e o programa UCSF Chimera versão 1.13.

4.7. Análise por dicroísmo circular dos peptídeos antimicrobianos de *B. raniceps*

A análise da conformação dos peptídeos nativos foi conduzida a partir de medidas de dicroísmo circular (DC) realizadas em um espectropolarímetro do tipo Jasco, modelo J-815 (Jasco instrumentos, Japão), equipado com um sistema que controla a temperatura do tipo *Peltier*, acoplado a uma bomba de água (Jasco instrumentos, Japão). Os peptídeos Br17 (0,21 mg/mL), Fng-2 frag (Br18) (0,13 mg/mL), Rsp-1 (0,12 mg/mL), Rsp-8 (0,43 mg/mL), Rsp-7 (0,15 mg/mL), Rsp-6 (0,13 mg/mL) e Rsp-3 (0,13 mg/mL) foram analisados em uma cubeta de quartzo de 0,05 cm, na presença de água ou de dodecil sulfato de sódio (SDS) 35 mM (m/v) a 25 °C. Dez medidas consecutivas foram realizadas na região distante do UV visível (190-260 nm) e a média final entre os espectros coletados foi calculada. Os espectros finais foram considerados após subtração dos espectros referentes as linhas de base da água e do SDS 35 mM (m/v). 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 ($\text{grau.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) em $\lambda_{208\text{nm}}$ baseado na equação 1 (Morriset *et al.*, 1973).

$$fH = \frac{([\theta]_{208} - 4,000)}{(-33,000 - 4,000)} eq(1)$$

4.8. Síntese química dos peptídeos Rsp-3 e Rsp-6

A síntese foi realizada em uma concentração de 0,15 mmol.L⁻¹. Inicialmente, 0,300 mg de resina Fmoc-Gln(Trt)-Wang (0,5 mmol) (Sigma-ALDRICH), foi pesado e a resina inchada com diclorometano (DCM). A resina já imersa em diclorometano foi submetida à agitação constante por 30 min, conforme o protocolo postulado por Chan & White (2000) (Figura 11).

Após o término da preparação da resina, a mesma foi lavada três vezes com dimetilformamida (DMF) e diclorometano. O aminoácido acoplado à resina apresenta o seu N-terminal protegido pelo grupo de proteção lateral Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonil). Para realizar a desproteção da cadeia lateral foram realizados dois ciclos de desproteção utilizando 4-metilpiperdina e DMF (1:4), cada ciclo com duração de 15 min e sob agitação constante. Ao término da reação de desproteção, a resina foi lavada três vezes com DMF e DMC, ficando o resíduo de aminoácido fixado à resina com seu N-terminal livre para um novo acoplamento.

Para se avaliar a efetividade da desproteção foi realizado o teste de Kaiser, que consiste em avaliar qualitativamente se a resina apresenta um N-terminal livre. Nesse teste são usadas três soluções: 5% de ninidrina em etanol (m/v), 80% de fenol em etanol (m/v) e KCN em piridina (2 ml de KCN 0,001 M em 98 mL de piridina). Grãos da resina foram coletados e imersos em gotas das soluções e, posteriormente, aquecidos a 120 °C. Após o procedimento, a coloração resultante azul escuro confirma a desproteção da porção N-terminal.

Para o acoplamento dos aminoácidos foram utilizados os reagentes de acoplamento HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 – tetrametilurôniohexafluorofosfato) e DIPEA (N,N'-diisopropiletilamina). As quantidades dos aminoácidos a serem adicionados sequencialmente foram pesadas ao equivalente de 0,15 mmol de resina. O reagente HBTU foi pesado (227,6 mg) e acrescentado ao meio de reação. Para solubilização dos reagentes foi acrescentado ao meio 2 mL de DMF e, em seguida, 139 µL de DIPEA. Para cada acoplamento foi necessário um tempo de reação de 1 h sob agitação constante. Após cada acoplamento, o teste de Kaiser foi novamente realizado para verificação da efetividade da desproteção.

Para a clivagem do peptídeo antimicrobiano da resina foi utilizado 9,5 ml TFA (ácido trifluoroacético), 250 µL TIS (triisopropilsilano) e 250 µL H₂O resultando na proporção 9,5/0,25/0,25 (v/v). A resina foi solubilizada nessa solução durante 1h e 30 min. Em seguida, as amostras foram filtradas e evaporadas em argônio.

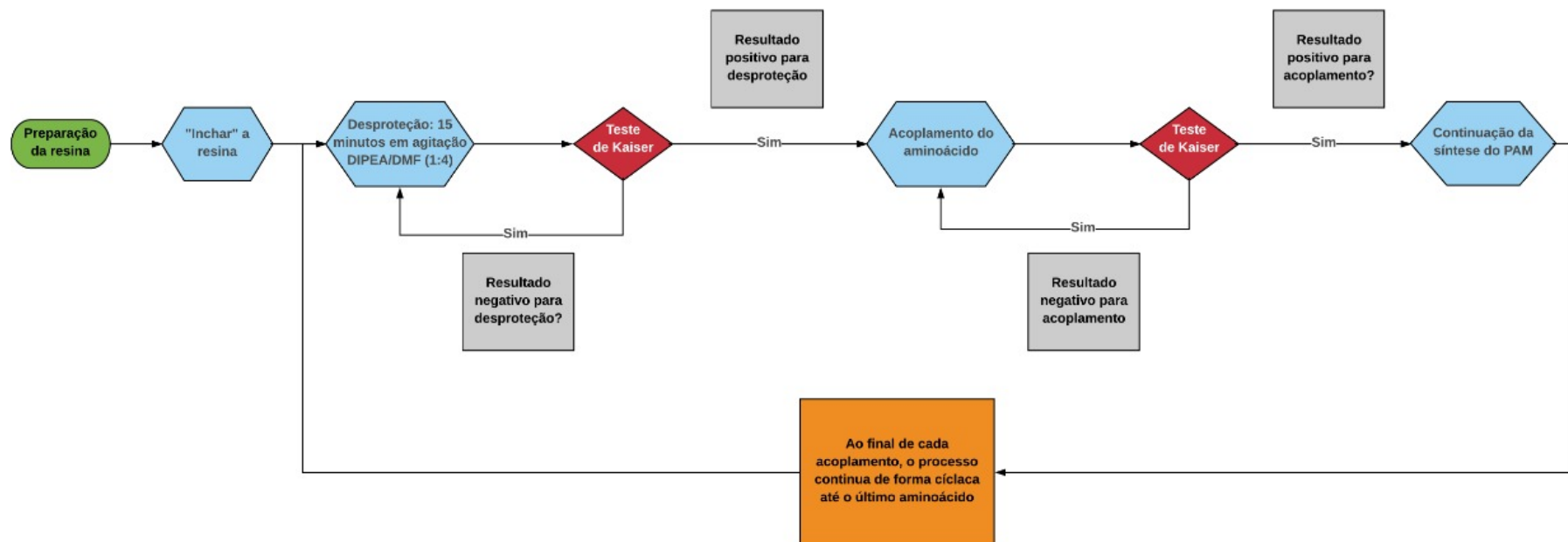


Figura 11. Fluxograma do procedimento de síntese química de peptídeos em fase sólida, de acordo com a metodologia estabelecida por Chan & White (2000).

4.9. Quantificação dos peptídeos

Os peptídeos foram dosados em espectrofotômetro (UV-M51, Bel Photonics, Brasil) com leituras nos comprimentos de onda de 205, 215 e 225 nm (Aitken e Learmonth, 2002) de acordo com a metodologia de Murphy & Kies, 1960. As concentrações dos peptídeos em µg/mL foi estimada empregando-se as equações descritas abaixo:

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

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

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

As soluções estoques foram diluídas em uma proporção de 1:20 e alíquotas de 700 µL de cada peptídeo foram submetidas a leitura por espectrofotômetro. Após as leituras, as amostras foram secas em concentrador a vácuo (SC 100, Thermo Scientific, EUA) e armazenadas a -20 °C até o momento de sua utilização.

4.10. Determinação da atividade antimicrobiana dos peptídeos Rsp-3 e Rsp-6 sobre bactérias patogênicas

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos peptídeos sintéticos Rsp-3 e Rsp-6 foram utilizadas duas bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883) e duas Gram-positivas (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Foram inoculados 200 µL das linhagens selecionadas em 6,8 mL de meio líquido Muller-Hinton e incubados, sob agitação constante, durante 24 h a 37 °C. Após o período de incubação, foram realizadas leituras a 625 nm em espectrofotômetro (UV-VIS SPECTROPHOTOMETER UV-MS1), para avaliação da densidade óptica. As suspensões foram diluídas e ajustadas entre 0,08-0,1 de absorvância. Em seguida, os inóculos foram diluídos na proporção de 1:200 para todas as bactérias testadas (adaptado da norma CLSI, 2005). Para avaliação dos valores de MIC foram empregadas alíquotas de 50 µL (concentração inicial: 256 µM) previamente filtradas em filtros de 0,22 µm (Millex GV, Millipore, Merck). As amostras foram diluídas em série e incubadas com 50 µL da suspensão de bactéria (preparadas como descrito acima), durante um período de 24 h a 37 °C. Após a incubação, foi feita a leitura do crescimento bacteriano a 620 nm em leitora de microplacas

Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA).

4.11. Determinação da atividade antimicrobiana dos peptídeos Rsp-3 e Rsp-6 sobre a levedura patogênica *Candida albicans*

Para os teste antifúngicos foi utilizada a levedura *C. albicans* ATCC 14053. Aliquotas de 200 µL da suspensão fúngica foi ressuspensa em 6,8 mL de meio BHI (*Brain Heart Infusion*) e mantida sob agitação constante durante 20 h a 37 °C em tubo de 15 mL. Após a incubação, foi realizada a leitura da densidade óptica a 620 nm e ajustada para 0,08 – 0,1. Em seguida, a suspensão foi diluída em meio BHI na proporção de 1:2000 (adaptado da norma CLSI, 2005).

Aliquotas de 50 µL (na concentração inicial: 256 µM) foram filtradas em filtros de 0,22 µm (Millex GV, Millipore, Merck), diluídas em série e misturadas com 50 µL da suspensão fúngica contendo aproximadamente 5×10^2 CFUs em poços de placas de 96 poços. Em seguida, a placa foi incubada por 22 h a 37 °C. Após o período da incubação, as placas foram lidas a 620 nm em leitora de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA). Os controles para inibição de crescimento e crescimento pleno foram formaldeído 0,8% (v/v) e água Milli Q incubados com a suspensão de *C. albicans*.

4.12. Determinação da atividade hemolítica dos peptídeos Rsp-3 e Rsp-6

Para o ensaio para avaliação da atividade hemolítica foi empregado o método descrito por Onuma e colaboradores (1999) com modificações. Eritrócitos humanos O⁺ de um doador saudável foram centrifugados e lavados quatro vezes com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 contendo NaCl 150 mM (tampão-salina) para remoção total de plasma. Em seguida, foi preparada uma suspensão a 1% (v/v) de eritrócitos.

Aliquotas de 100 µL dos peptídeos foram ressuspensos em tampão-salina na concentração inicial de 256 µM e diluídos em série em tubos de 1,5 mL. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foi misturada às amostras e os tubos foram incubados por 60 min à temperatura ambiente. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 2.000 x g por 3 min. Aliquotas de 100 µL de cada sobrenadante foram transferidas para os poços de uma placa de 96 poços de fundo chato (Kasvi, Brasil) e foi realizada leitura espectrofotométria a 405 nm em leitora de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA). Utilizou-se 100 µL da suspensão de eritrócitos a 1% (v/v) incubada com 100 µL de Triton X-100 1% (v/v) como referência de 100% de hemólise e 100 µL de suspensão de eritrócitos a 1% (v/v) incubada com 100 µL de tampão-salina como referência de 0% de hemólise.

5. RESULTADOS

5.1. Purificação dos peptídeos antimicrobianos de *B. raniceps*

O perfil cromatográfico obtido com o fracionamento da secreção cutânea de *B. raniceps* resultou na eluição de 32 frações cromatográficas, sendo que destas 6 demonstraram atividade antimicrobiana (Figura 12).

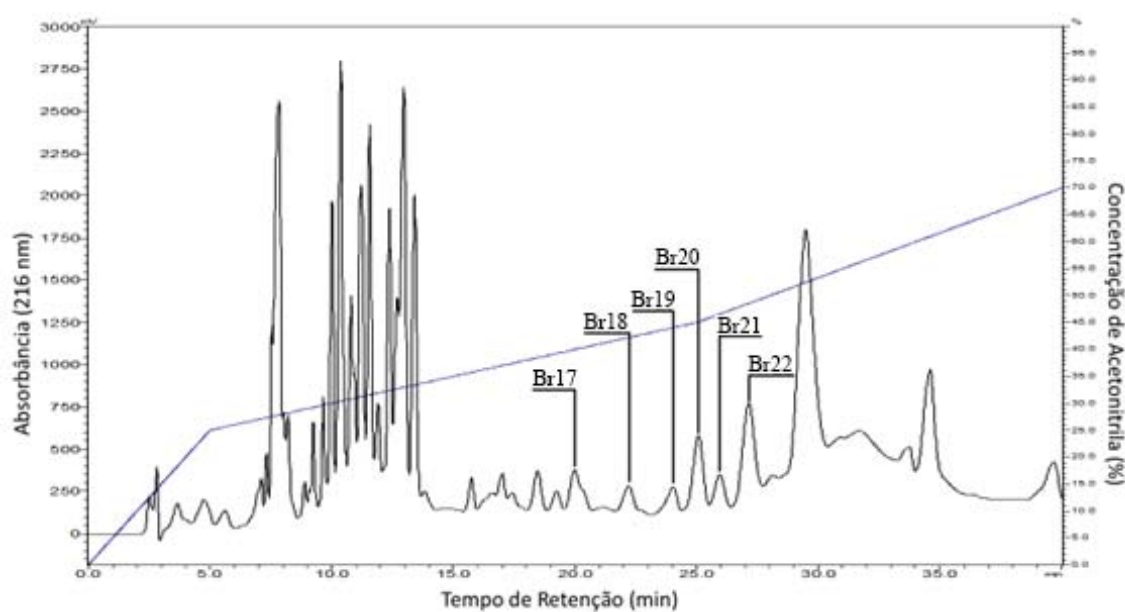


Figura 12. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção bruta de *B. raniceps*, empregando-se coluna C₁₈ (Shim-pack VP-ODS, No. 2122095, 4,6 x 150 mm, 5 µm) com fluxo de 1 mL/min e detecção ao UV em 216 nm. Em destaque, as frações com atividade antimicrobiana que foram caracterizadas no presente estudo.

5.2. Análises por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF

As frações que exibiram atividade antimicrobiana foram analisadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. A fração 17 exibiu um componente principal com massa molecular monoisotópica protonada $[M+H]^+$ de 2.936,6 Da (Figura 13); a fração 18 apresentou um componente principal com massa molecular monoisotópica protonada $[M+H]^+$ de 2.746,5 Da (Figura 14); já a fração 19 apresentou um componente principal com massa molecular monoisotópica protonada $[M+H]^+$ de 3.137,5 Da, equivalente à massa molecular da Ranaseptina 1 (Rsp-1) descrita por Magalhães e colaboradores (2008) (Figura 15). As frações 20 e 21 apresentaram componentes semelhantes com alteração em apenas um resíduo (vide item 5.3), com massas moleculares de 3.087,5 e 3.087,4 Da, respectivamente (Figura 16 e 17). A fração 22 apresentou em sua composição dois componentes com massas moleculares monoisotópicas distintas, sendo que o componente principal exibiu massa monoisotópica protonada $[M+H]^+$ de 3.120,5 (Figura 18), que foi denominado fração 22.1 e o outro

componente com massa molecular monoisotópica protonada $[M+H]^+$ de 2.959,7 Da, denominado fração 22.2 (Figura 19), após procedimento de recromatografia.

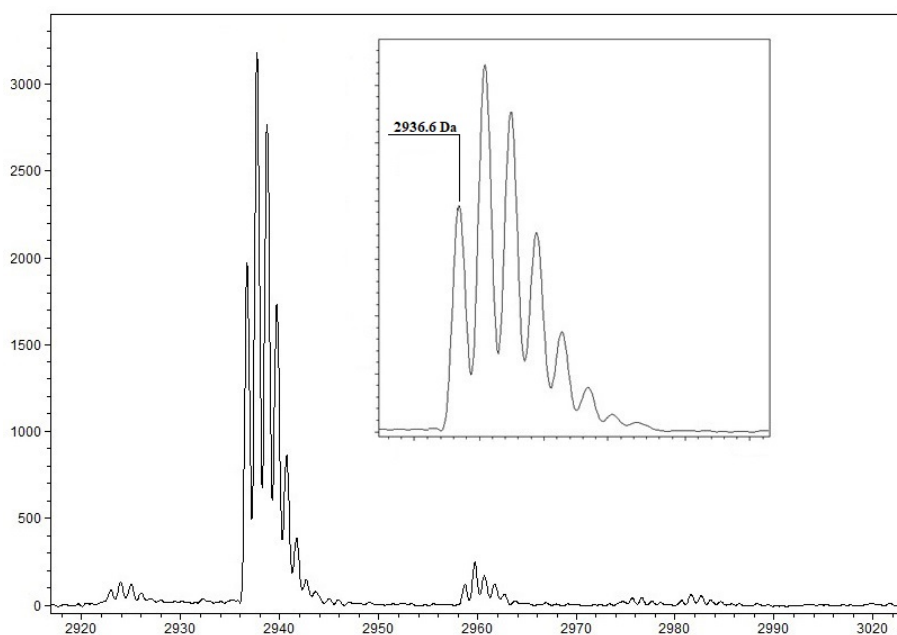


Figura 13. Espectro de massas do tipo MALDI-TOF da fração 17 exibindo um componente principal com massa molecular protonada $[M+H]^+$ de 2.936,6 Da. A análise foi realizada em equipamento modelo AutoFlex II, (Bruker, Alemanha), aplicando-se 1 μ L de matriz HCCA a 20 mg/mL.

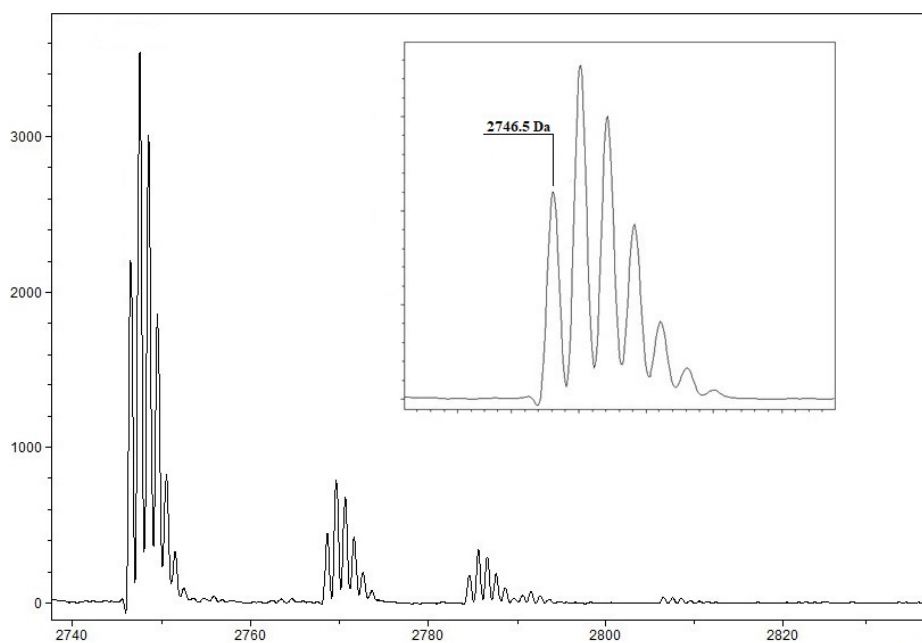


Figura 14. Espectro de massas do tipo MALDI-TOF da fração 18 exibindo um componente principal com massa molecular protonada $[M+H]^+$ de 2.746,5 Da. A análise foi realizada em equipamento modelo AutoFlex II, (Bruker, Alemanha), aplicando-se 1 μ L de matriz HCCA a 20 mg/mL.

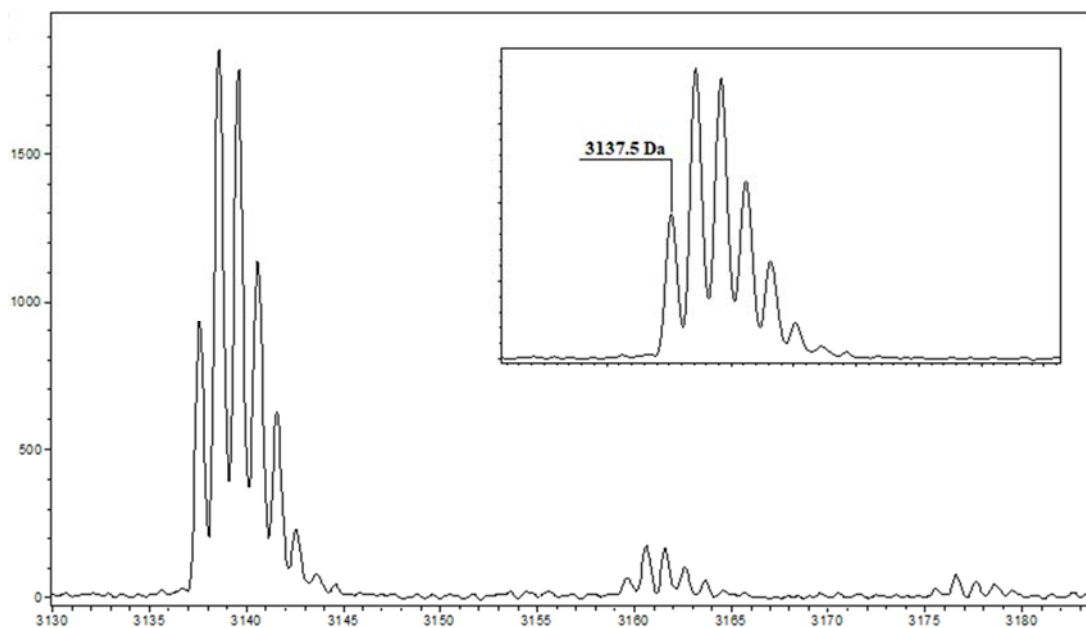


Figura 15. Espectro de massas do tipo MALDI-TOF da fração 19 exibindo um componente principal com massa molecular protonada $[M+H]^+$ de 3.137,5 Da. A análise foi realizada em equipamento modelo AutoFlex II, (Bruker, Alemanha), aplicando-se 1 μ L de matriz HCCA a 20 mg/mL.

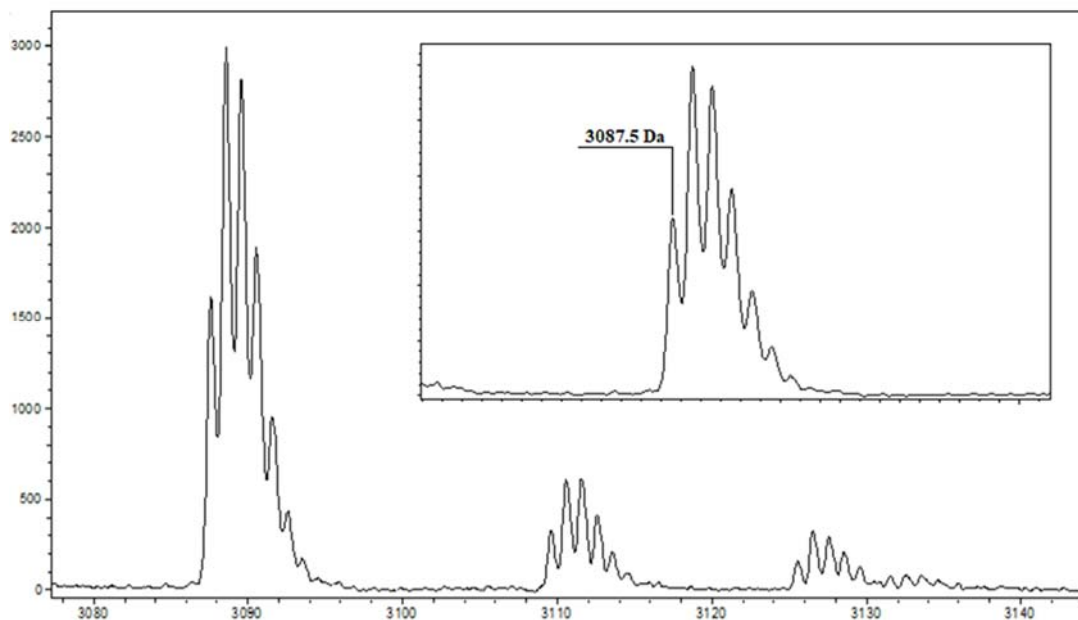


Figura 16. Espectro de massas do tipo MALDI-TOF da fração 20 exibindo um componente principal com massa molecular protonada $[M+H]^+$ de 3.087,5 Da. A análise foi realizada em equipamento modelo AutoFlex II, (Bruker, Alemanha), aplicando-se 1 μ L de matriz HCCA a 20 mg/mL.

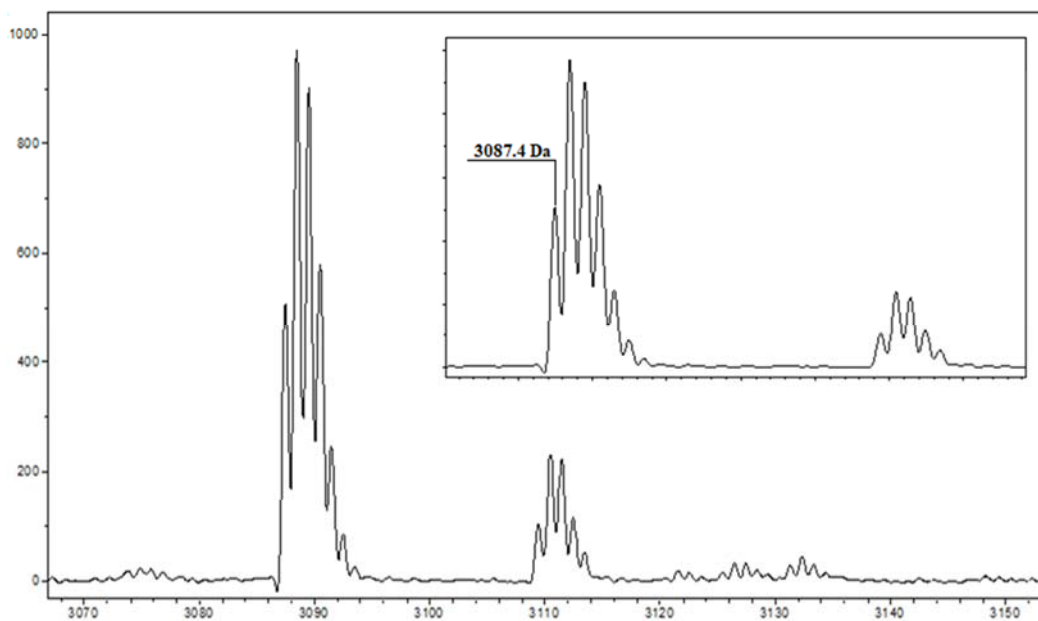


Figura 17. Espectro de massas do tipo MALDI-TOF da fração 21 exibindo um componente principal com massa molecular protonada $[M+H]^+$ de 3.087,4 Da. A análise foi realizada em equipamento modelo AutoFlex II, (Bruker, Alemanha), aplicando-se 1 μ L de matriz HCCA a 20 mg/mL.

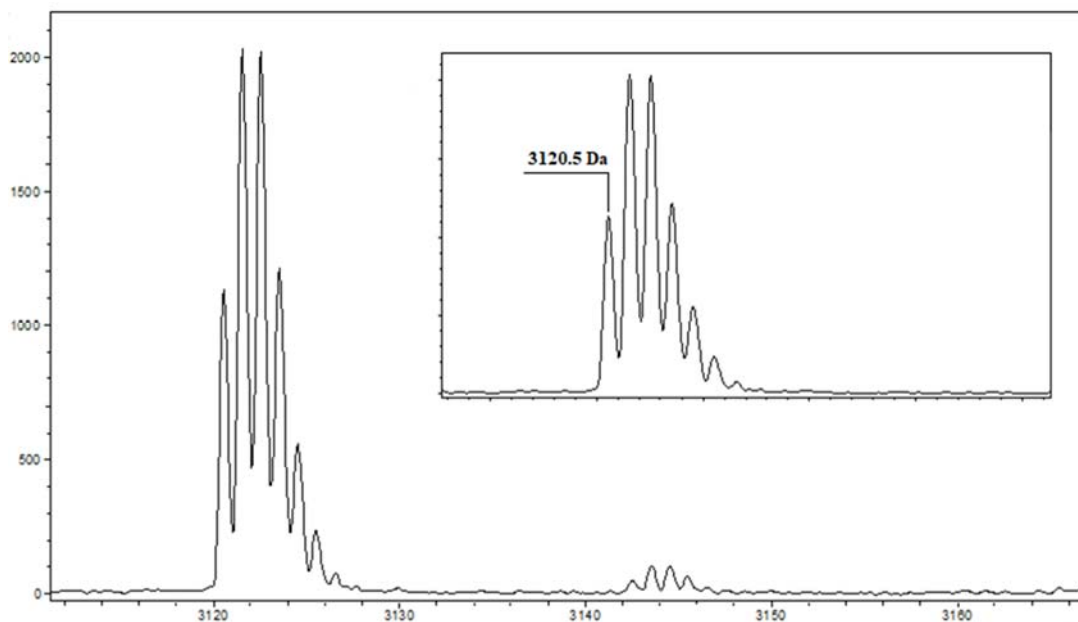


Figura 18. Espectro de massas do tipo MALDI-TOF da fração 22.1 exibindo um componente principal com massa molecular protonada $[M+H]^+$ de 3.120,5 Da. A análise foi realizada em equipamento modelo AutoFlex II, (Bruker, Alemanha), aplicando-se 1 μ L de matriz HCCA a 20 mg/mL.

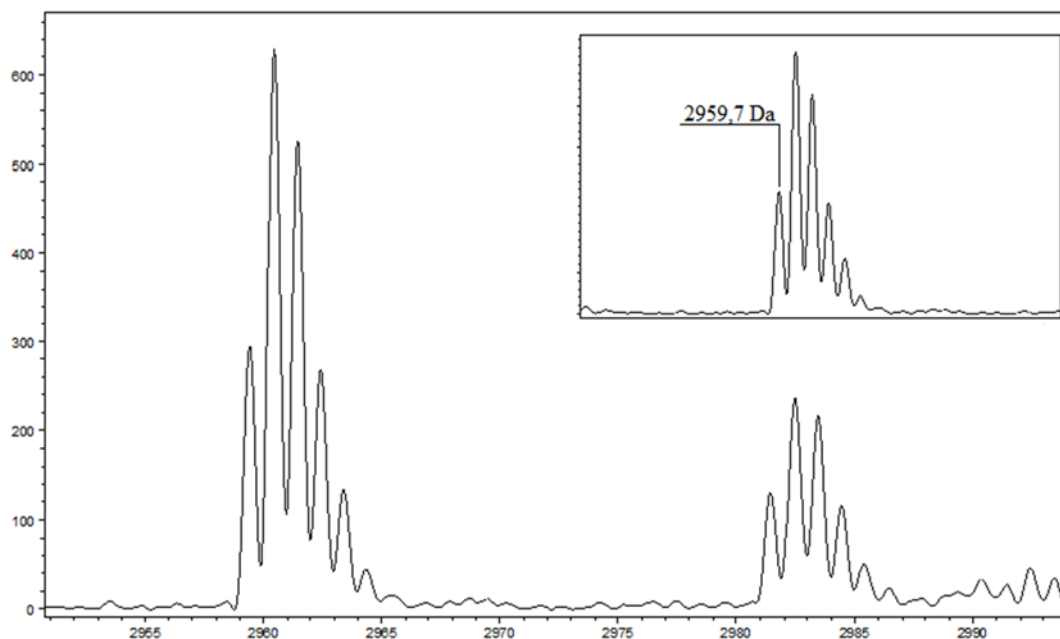


Figura 19. Espectro de massas do tipo MALDI-TOF da fração 22.2 exibindo um componente principal com massa molecular protonada $[M+H]^+$ de 2.959,7 Da. A análise foi realizada em equipamento modelo AutoFlex II, (Bruker, Alemanha), aplicando-se 1 μ L de matriz HCCA a 20 mg/mL.

5.3. Caracterização estrutural dos peptídeos antimicrobianos de *B. raniceps*

Os peptídeos nativos purificados foram submetidos a sequenciamento químico por degradação de Edman. O primeiro peptídeo, denominado Br17, apresentou uma sequência de 27 resíduos de aminoácidos: $^1\text{LDKLSIGKVVVGKVAIGVVKNYLNPRQ}^{27}$ com correspondência com a massa molecular determinada experimentalmente. O segundo peptídeo apresentou uma sequência de 26 resíduos de aminoácidos: $^1\text{GAILKIGHALAKTVLPMVTNAFKPKQ}^{26}$ também exibindo correspondência com a massa molecular determinada experimentalmente. Para os demais peptídeos foram obtidas sequências parciais, visto que as massas moleculares calculadas a partir das sequências obtidas por degradação de Edman mostraram-se inferiores às massas moleculares determinadas experimentalmente para cada um desses peptídeos. Os peptídeos denominados Br20 e Br21 apresentaram sequências parciais com 24 resíduos de aminoácidos: $^1\text{ALLDKLKSLGKVVVGKVAIGVAQH}^{24}$ e $^1\text{ALLDKLKSLGKVVVGKVALGVAQH}^{24}$ com uma única alteração na posição 18, com a substituição de um resíduo de isoleucina por leucina, aminoácidos isobáricos, justificando-se as mesmas massas moleculares observadas para esses dois peptídeos por MALDI-TOF MS (Figuras 17 e 18). E, por último, os peptídeos denominados Br22.1 e Br22.2 que apresentaram sequências parciais distintas com 25 e 24

resíduos de aminoácidos cada: ¹ALLDKLKSLGKVVVGKVALGVVQNYL²⁵ e ¹AWLDKLSIGKVVVGKVAIGVAKNL²⁴.

As buscas por similaridade foram realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTp e também o banco de sequências APD3. A sequência do peptídeo Br17 apresentou valores de identidade de 82.8% e de similaridade de 93,1% com os PAMs Raniseptina 10 (Rsp-10) e Raniseptina 6 (Rsp-6), sendo que o peptídeo Br17 apresenta uma deleção dos dois resíduos de aminoácidos da porção N-terminal.

As sequências obtidas para os peptídeos Br20 e Br21 exibiram identidade com os peptídeos antimicrobianos Raniseptina 8 e 7 (Rsp-8 e 7), respectivamente, sendo que a Raniseptina 8 apresenta na posição 18 uma isoleucina e a Raniseptina 7 apresenta uma leucina nessa mesma posição. Tendo em vista as massas moleculares observadas experimentalmente para esses dois peptídeos, pode-se afirmar que eles correspondem às Raniseptinas 8 e 7, respectivamente, descritas por Magalhães e colaboradores (2008).

Já o peptídeo Br22.1 corresponde à Raniseptina 6 (Rsp-6) e o peptídeo denominado Br22.2 à Raniseptina 3 (Rsp-3), considerando-se novamente as massas moleculares experimentais observados para esses peptídeos o que permitiu estabelecer as suas estruturas primárias por completo (Figura 20).

O peptídeo Br18 corresponde a um fragmento da Figainina 2 (Fgn-2), na qual os dois resíduos da porção N-terminal foram removidos (Figura 21). As Figaininas foram descritas por Barbosa e colaboradores (2010) a partir do banco de cDNAs gerado com RNAs obtidos da pele de *B. raniceps*, sendo que a Figainina 2 foi recentemente isolada e caracterizada por Santana e colaboradores (2020).

Rsp-8 (Br20)	ALLDKLKS LGKVVGKVAIGVAQH YLNPQQ	29
Rsp-7 (Br21)	ALLDKLKS LGKVVGKVALGVAQH YLNPQQ	29
Rsp-6 (Br22.1)	ALLDKLKS LGKVVGKVALGVVQNYLNP RQ	29
Rsp-3 (Br22.2)	AWLDKLS IGKVVGKVAIGVAKNLLNPQ-	28
	* *****:*****:** :: **:	

Figura 20. Alinhamento múltiplo das sequências dos peptídeos de *B. raniceps* isolados no presente trabalho. Os asteriscos (*) indicam resíduos de aminoácidos idênticos e os dois pontos (:), substituições conservativas. Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos estão indicados em vermelho, os ácidos em azul, os básicos em roxo, os polares (N, Q, S, T) em verde, prolina em laranja, glicina em preto e aromáticos em bege.

Br18	1	--GAILKIGHALAKTVLPMVTNAFKPKQ	26
Figainina 2	1	FLGAILKIGHALAKTVLPMVTNAFKPKQ	28

Figura 21. Alinhamento da sequência do peptídeo Br18 com a sequência da Figainina 2. Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos estão indicados em **vermelho**, os ácidos em **azul**, os básicos em **roxo**, os polares (N, Q, S, T) em **verde**, prolina em **laranja**, glicina em preto e aromáticos em **bege**.

5.4. Características físico-químicas dos peptídeos antimicrobianos de *B. raniceps*

As análises computacionais permitiram observar que o peptídeo Br17 possui uma face hidrofóbica relativamente longa composta pelos resíduos Val, Ile, Pro, Val, Val, Leu, Tyr e Ala e seu índice médio de hidropaticidade (GRAVY) mostrou ser igual a 0,011. Já o fragmento da Figainina 2 (Br18) também exibiu uma face hidrofóbica longa composta pelos resíduos Ile, Pro, Met, Leu, Ile, Ala e Val e seu índice médio de hidropaticidade mostrou ser igual a 0,365. Os peptídeos Rsp-8 e 7 apresentaram uma face hidrofóbica longa, compostas por Val, Leu, Pro, Leu, Val, Val, Leu, Tyr e Ala, entretanto quanto avaliamos seu índice médio de hidropaticidade, observamos que o peptídeo Rsp-8 foi igual a 0,155; já o peptídeo Rsp-7 apresentou um índice médio de hidropaticidade igual a 0,131. O peptídeo Rsp-6 apresentou a face hidrofóbica composta pela mesmas sequências do peptídeos Rsp-8 e 7, entretanto o seu índice médio de hidropaticidade apresentou diferenciação sendo igual a 0,169. O peptídeo Rsp-3 apresentou uma face hidrofóbica bastante longa composta por Val, Ile, Pro, Trp, Val, Val, Leu e Ala e um índice médio de hidropaticidade de 0,300 (Tabela 1).

Tabela 1. Características físico-químicas dos peptídeos antimicrobianos de *B. raniceps*.

Peptídeo	Face hidrofóbica	Carga líquida	GRAVY
Br17	VIPVVLYA	+5	0,011
Fng-2 (frag)	IPMLIAV	+4	0,365
Rsp-8	VLPLVVLYA	+3	0,155
Rsp-7	VLPLVVLYA	+3	0,131
Rsp-6	VLPLVVLYA	+4	0,169
Rsp-3	VIPWVLLA	+4	0,300

GRAVY: Índice médio de hidropaticidade.

5.5. Análises estruturais por simulação computacional e por difração circular

As análises das projeções em roda helicoidal permitiram observar que os peptídeos antimicrobianos de *B. raniceps* apresentam tendência à formação de α -hélices anfipáticas (Figura 22). Os peptídeos antimicrobianos isolados apresentaram carga líquida variando de +3 a +5, onde as Raniseptinas 7 e 8 apresentaram cargas líquidas semelhantes (+3), já as Raniseptinas 3 e 6, além do fragmento da Figainina 2 (Br18), apresentaram carga líquida igual a +4 e, por último, a Raniseptina Br17 que apresentou carga líquida igual a +5.

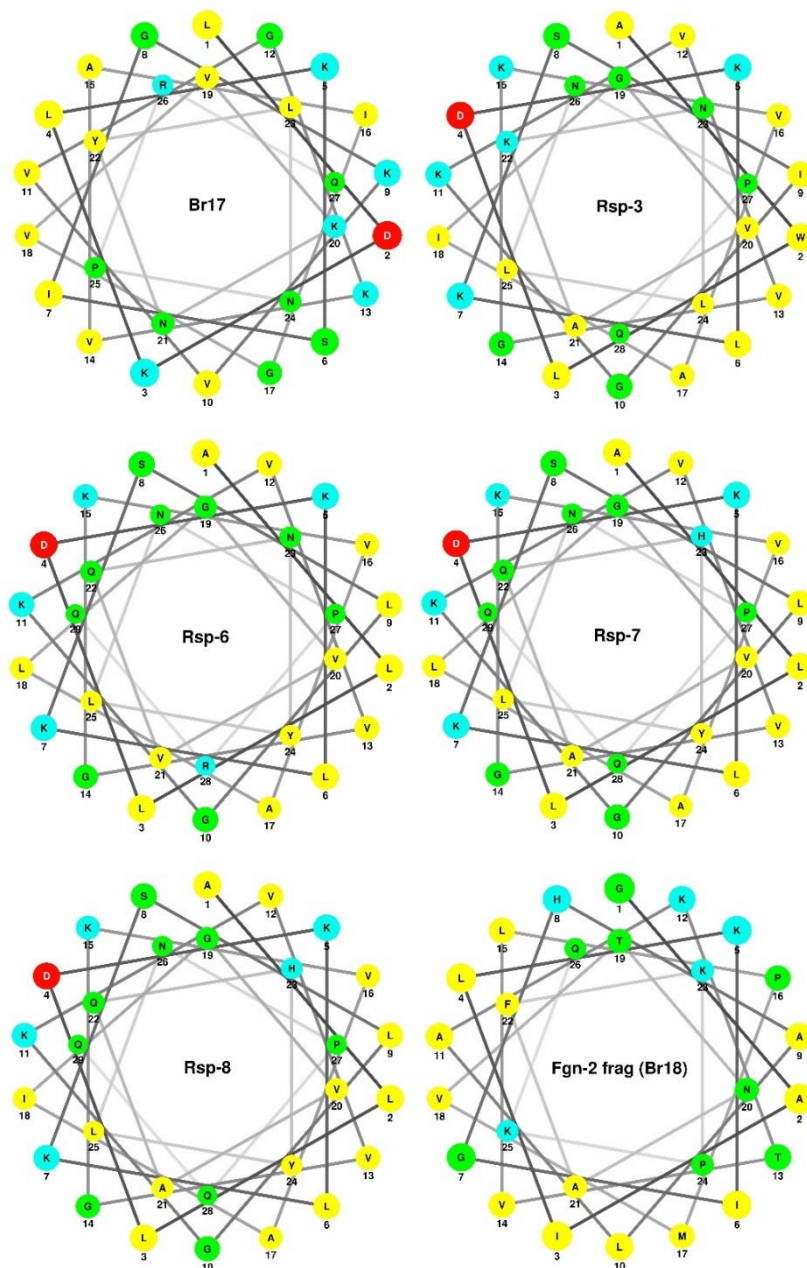


Figura 22. Projeções em roda helicoidal (Schiffer-Edmundson) das Raniseptinas Br17, 3, 6, 7 e 8 e do fragmento da Figainina 2 (Br18). Cores: resíduos básicos em magenta; não-polares (hidrofóbicos) em amarelo; ácidos em vermelho e polares/sem carga em verde.

A predição da estrutura secundária por análises computacionais, como I-TASSER, permitiu observar que todos os peptídeos antimicrobianos apresentam estruturas secundárias semelhantes (Figura 23), com tendência à formação de α -hélices.

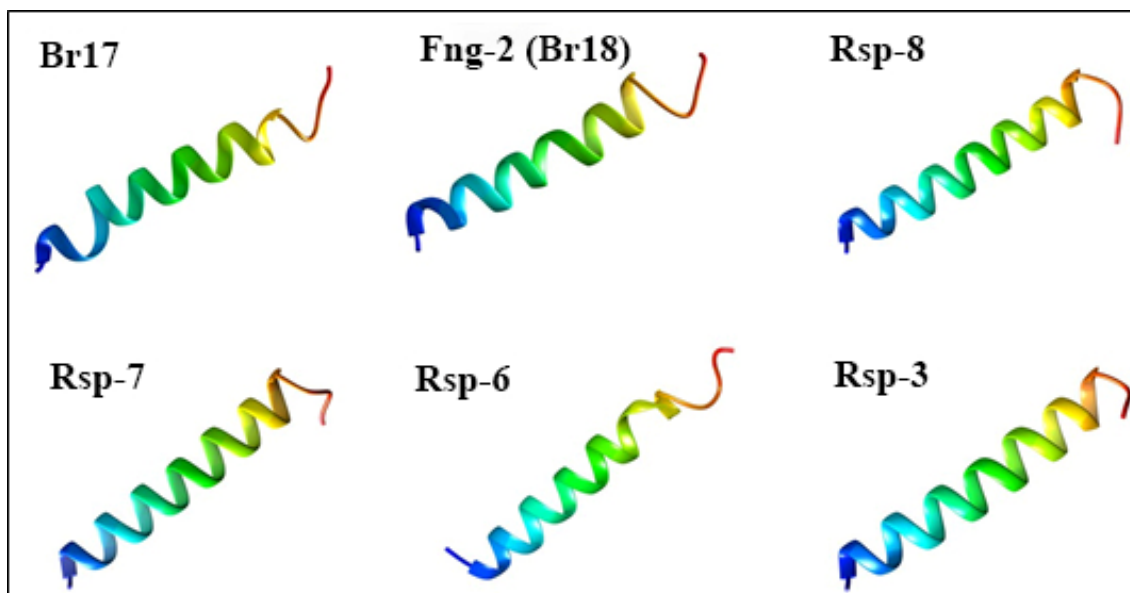


Figura 23. Modelos teóricos tridimensionais das Raniseptinas Br17, 3, 6, 7 e 8 e do fragmento da Figainina 2 (Br18) gerados pelo site I-TASSER. Em azul, a região mais eletronegativa (N-terminal) e, em vermelho, a região eletropositiva (C-terminal).

As análises experimentais por dicroísmo circular revelaram que todas as Raniseptinas aqui descritas adotam conformação em α -hélice, provavelmente pela composição de sua estrutura primária semelhante. O perfil dos espectros dicroicos dos peptídeos obtidos em água a 25 °C apresentaram majoritariamente uma banda dicroica negativa em 200 nm. Essas análises revelaram que todos os peptídeos estudados apresentaram estruturas do tipo desordenada em solução aquosa (Figura 24), sendo que, na presença de micelas de SDS (dodecil sulfato de sódio), os peptídeos tenderam a se estruturar, assumindo principalmente uma conformação em α -hélice (Krittani & Johnson, 2000). Os espectros dicroicos dos peptídeos na presença de SDS 35 mM mostraram deslocamento expressivo da banda dicroica negativa de 200 nm para as regiões de 208 e 222 nm, com valores de $[\theta]_{208\text{nm}}$ variando entre -16.000 e -31.000 grau.cm²/dmol, e uma banda dicroica positiva em 190 nm. Este resultado mostra que, na presença de SDS, os peptídeos assumiram conformação predominantemente em α -hélice.

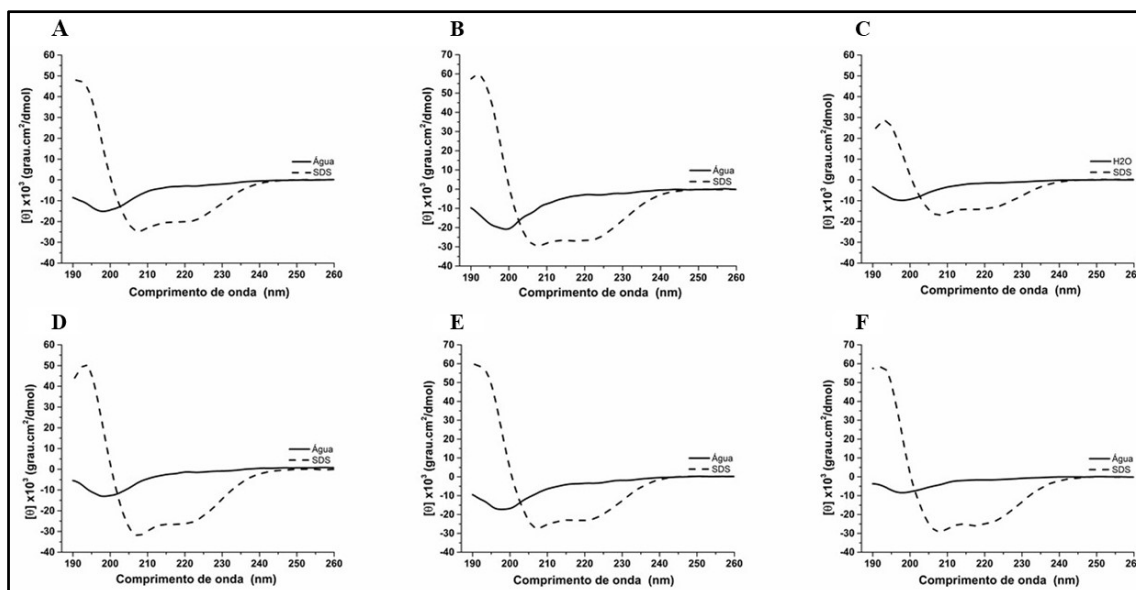


Figura 24. Análise da formação de estruturas secundárias por meio de dicroísmo circular dos peptídeos de *B. raniceps* isolados no presente trabalho. (A) Br17, (B) Fng-2 frag. (Br18), (C) Rsp-7, (D) Rsp-8, (E) Rsp-6 e (F) Rsp-3. Os espectros dicroicos foram obtidos de 190 a 260 nm, em meio aquoso e na presença de SDS 35 mM.

A helicidade dos peptídeos foi calculada considerando o valor da elipticidade molar a 208 nm na presença de SDS 35 mM (Tabela 1). Dos seis peptídeos analisados por DC, os peptídeos Fng-2 (Br18), Rsp-7 e 3 apresentaram maior percentual de helicidade, destacando-se a Raniseptina 7 que apresentou maior helicidade na presença de SDS com percentual de α -hélice de 97%, conforme apresentado na Tabela 2. Estes resultados sugerem que os peptídeos Fng-2 frag. (Br18), Rsp-7 e 3 apresentam alto potencial para assumirem estruturação helicoidal na presença de membranas biológicas, podendo, portanto, serem testados como agentes antimicrobianos contra microrganismos patogênicos.

Tabela 2. Conteúdo de α -hélice (%) dos peptídeos antimicrobianos de *B. raniceps* na presença de SDS 35 mM a 25 °C.

Peptídeo	α -Hélice (%)
Br17	77,3
Fng-2 frag (Br1)	90,0
Rsp-8	56,4
Rsp-7	97,0
Rsp-6	84,0
Rsp-3	89,0

5.6. Síntese química dos peptídeos Rsp-3 e Rsp-6

De modo a se avançar na caracterização biológica dos peptídeos de *B. raniceps* isolados no presente trabalho, duas Raniseptinas foram selecionadas para síntese química manual após uma avaliação prévia, onde foram avaliadas algumas características físico-química como a extensão da face hidrofóbica, a carga líquida e valor do índice GRAVY, sendo selecionadas as Raniseptinas 3 e 6 (Rsp-3 e Rsp-6).

A síntese foi realizada manualmente em fase sólida, utilizando-se resina Wang (0,5 mmol), com o resíduo de Gln previamente acoplado (Fmoc-Gln(Trt)-Wang).

Após a síntese das Raniseptinas, foi realizada uma etapa de clivagem para remoção dos peptídeos da resina, sendo que ao término da clivagem, a solução passou por um filtro para remoção da resina, além de contaminantes como, por exemplo, os reagentes que atuaram como antioxidantes e os protetores de cadeias laterais tBu (t-butila), Boc (t-butiloxicarbonila) e trt (tritila).

A análise dos perfis cromatográficos gerados durante a purificação da Raniseptina 6 não evidenciou a presença de fragmentos peptídicos, uma vez que, observou-se a presença de apenas uma fração abundante. Entretanto, alguns componentes utilizados durante a etapa de clivagem ou subprodutos da síntese ainda se mostraram presentes nas cromatografias, o que é esperado para esse processo (Figura 25). No caso da Raniseptina 3 foi observada a presença de duas frações de intensidade alta, sendo que a maior correspondeu ao peptídeo de interesse (Figura 26). O pico de menor intensidade foi considerado um fragmento peptídico devido a sua massa molecular monoisotópica e essa fração também foi coletada manualmente e armazenada para futura avaliação de suas propriedades biológicas.

Análises por espectrometria de massas foram realizadas com os peptídeos sintéticos purificados para confirmação da qualidade dos produtos produzidos, por meio da comparação das massas moleculares obtidas experimentalmente com as massas moleculares teóricas esperadas para cada um dos peptídeos (insertos nas Figuras 25 e 26).

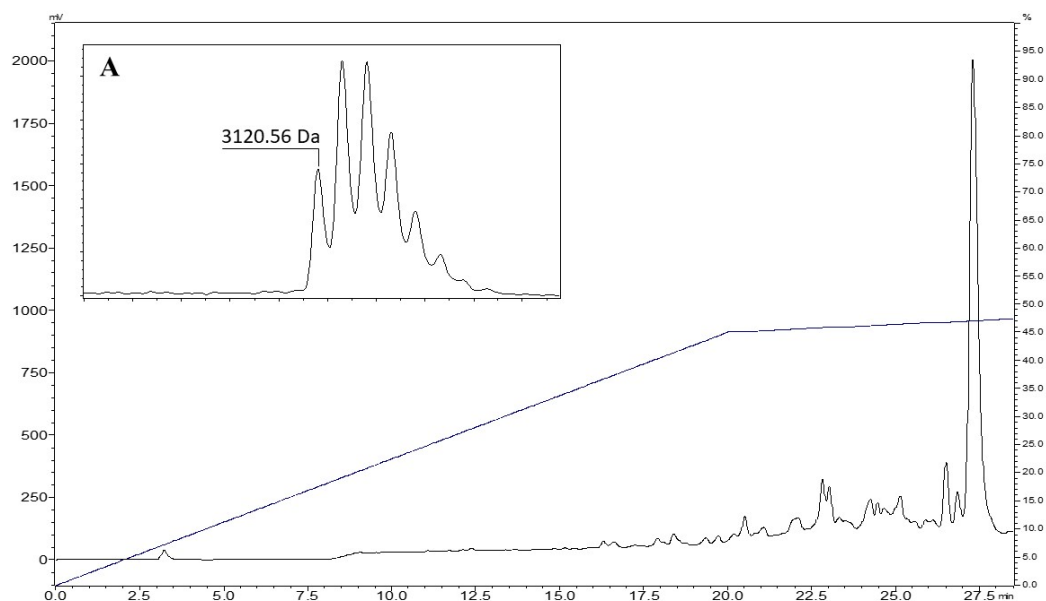


Figura 25. Perfil cromatográfico típico resultante da purificação do peptídeo antimicrobiano sintético Rsp-6, empregando-se coluna C₁₈ (Shim-pack VP-ODS, No. 2122095, 4,6 x 150 mm, 5 μm) com fluxo de 1 mL/min e detecção ao UV em 216 nm. Na parte superior (inserto), observa-se o componente principal com massa molecular monoisotópica protonada [M+H]⁺ de 3120.56 Da. A análise foi realizada em equipamento modelo AutoFlex II, (Bruker, Alemanha), aplicando-se 1 μL de matriz HCCA a 20 mg/mL.

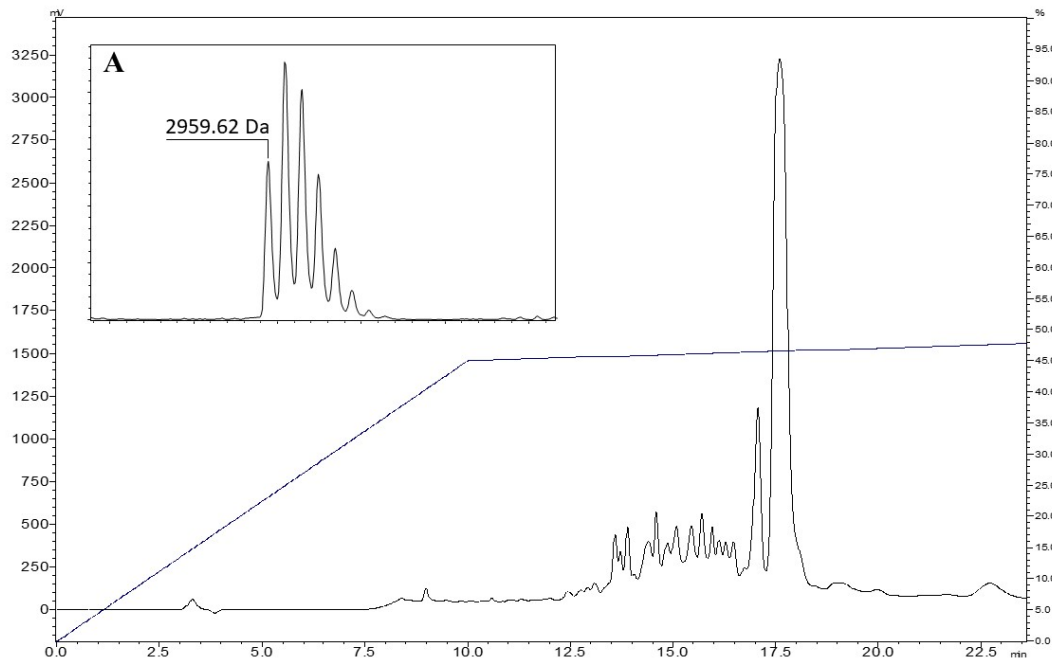


Figura 26. Perfil cromatográfico típico resultante da purificação do peptídeo antimicrobiano sintético Rsp-3, empregando-se coluna C₁₈ (Shim-pack VP-ODS, No. 2122095, 4,6 x 150 mm, 5 μm) com fluxo de 1 mL/min e detecção ao UV em 216 nm. Na parte superior (inserto), observa-se o componente principal com massa molecular monoisotópica protonada [M+H]⁺ de 2959.62 Da. A análise foi realizada em equipamento modelo AutoFlex II, (Bruker, Alemanha), aplicando-se 1 μL de matriz HCCA a 20 mg/mL.

5.7. Efeitos antimicrobianos e hemolíticos dos peptídeos Rsp-3 e Rsp-6

Os peptídeos antimicrobianos sintéticos Rsp-3 e 6 foram testados contra quatro espécies bacterianas e uma espécie de levedura, além de eritrócitos humanos.

Ambos os peptídeos mostraram-se bastante efetivos na inibição do crescimento das bactérias Gram-negativas testadas (*E. coli* e *K. pneumoniae*), com valores de MIC iguais a 2 e 1 μM , respectivamente (Tabela 3). A atividade inibitória foi um pouco menor sobre os patógenos Gram-positivos *S. aureus* e *S. epidermidis*, sendo que a Rsp-3 exibiu MICs de 4 e 8 μM , respectivamente, para tais bactérias (Tabela 3). Já o peptídeo antimicrobiano Rsp-6 mostrou-se também ativo sobre esses microrganismos exibindo valores de MIC iguais a 32 e 8 μM para *S. aureus* e *S. epidermidis*, respectivamente (Tabela 3). Ambos os peptídeos não foram capazes de inibir completamente o crescimento da levedura *C. albicans*, mesmo na maior concentração empregada (128 μM). Ainda assim, foi observado que ambos foram capazes de inibir acentuadamente o crescimento dessa levedura nessa concentração (Tabela 3).

Os peptídeos Rsp-3 e 6 apresentaram alta seletividade sobre bactérias, sendo preferencialmente ativos sobre bactérias Gram-negativas. O peptídeo Rsp-3 demonstrou também atividade antimicrobiana significativa sobre as bactérias Gram-positivas (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade antimicrobiana (MIC, μM) dos peptídeos Rsp-3 e Rsp-6 sobre microrganismos patogênicos.

	Peptídeo	
	Rsp-3	Rsp-6
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	2	2
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	1	1
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	4	32
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 1223)	8	8
<i>C. albicans</i> (ATCC 14053)	>128	>128

Em relação à capacidade de lisar eritrócitos humanos, os peptídeos não apresentaram atividade hemolítica elevada, mesmo quando testados nas maiores concentrações, ficando abaixo de 5% de hemólise nas concentrações onde a atividade antibacteriana foi relevante (entre 2 e 8 μM) (Figura 27).

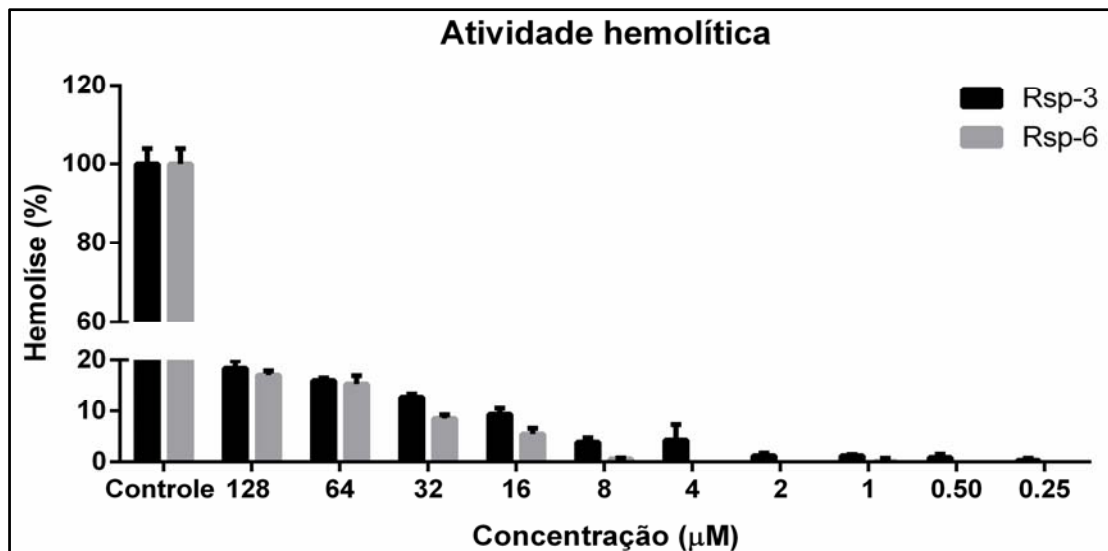


Figura 27. Atividade hemolítica dos peptídeos antimicrobianos Rsp-3 e Rsp-6 sobre eritrócitos humanos.

6. DISCUSSÃO

A secreção cutânea dos anfíbios apresenta grande variedade de substâncias e esses compostos podem ser mais ou menos expressos de acordo com certas variáveis como, por exemplo, alimentação, época do ano (chuvoso ou seco), ciclo ou fase do desenvolvimento do indivíduo e até a localidade dos espécimes coletados. Para o gênero *Boana* pouco são os peptídeos antimicrobianos isolados e caracterizados até o momento, dentre eles as Hylaseptinas encontradas na secreção de *B. punctata* (Prates *et al.*, 2004), as Cinerascetinas encontradas em *B. cinerascens* (Almeida *et al.*, 2015), a Hylina-a1 isolada de *B. albopunctatus* (Castro *et al.*, 2009), os PAMs Raniseptina 1 e Raniseptina-BI 1 encontradas em *B. raniceps* e *B. lundii*, respectivamente (Magalhães *et al.*, 2008; Araújo, 2018) e a Figainina 2 isolada da secreção cutânea de *B. raniceps* (Santana *et al.*, 2020).

O perfil cromatográfico de *B. raniceps* exibiu alta complexidade em sua composição apresentando 32 frações cromatográficas, onde as frações de interesse exibiram um comportamento hidrofóbico sendo eluídas a partir de 40% de acetonitrila (Figura 12). Em geral, peptídeos antimicrobianos são bastante hidrofóbicos com apenas poucas exceções. Geralmente, frações cromatográficas que eluem em tempo de retenção maior, apresentam carga líquida positiva menor, o que está relacionado diretamente com sua perda de atividade hemolítica, além de perda de atividade antimicrobiana (Castro *et al.*, 2009). As frações de interesse apresentaram uma baixa intensidade na leitura ao ultravioleta em 216 nm, podendo estar relacionado com a baixa quantidade desses peptídeos nessa secreção. Esse baixo rendimento dificultou o avanço dos estudos com esses peptídeos, o que também foi perceptível no estudo desenvolvido por Magalhães e colaboradores (2008).

A hidrofobicidade dessas moléculas é resultante da presença de aminoácidos com características bastante apolares como Ile, Val, Phe, Tyr e Trp. Já a sua cationicidade está relacionada com a presença de aminoácidos carregados positivamente (Lys e Arg) (Bechinger & Gorr, 2017). Ao se analisar a estrutura primária dos peptídeos isolados no presente estudo é possível observar que esses peptídeos possuem uma alta porcentagem de resíduos hidrofóbicos e básicos, justificando seus aspectos físico-químicos como tempo de retenção elevado, carga líquida positiva e hidrofobicidade alta. De acordo com Kyte & Doolittle (1982), é possível avaliar o grau de hidrofobicidade através da determinação do índice médio de hidropaticidade (GRAVY), que é calculado como a soma dos valores de hidropaticidade de todos os aminoácidos dividida pelo número de resíduos na sequência, resultando em valores positivos para moléculas hidrofóbicas.

As estruturas primárias dos peptídeos isolados no presente trabalho apresentaram similaridade com PAMs das famílias das Raniseptinas e Figaininas previamente identificadas a partir de estudos com bibliotecas de cDNA feitas a partir de RNAs isolados da pele de *B. raniceps* (Magalhães *et al.*, 2008; Barbosa, 2010), onde o peptídeo Br17 exibiu alta taxa de similaridade com as Raniseptinas 6 e 10, sendo que o peptídeo Br17 não apresenta os dois resíduos N-terminais (AL na Raniseptina 6 e AW na Raniseptina 10). Os peptídeos Br20, Br21, Br22.1 e Br22.2 correspondem às Raniseptinas 8, 7, 6 e 3 respectivamente (Figura 20).

Finalmente, o peptídeo Br18 corresponde a um fragmento da Figainina 2 com perda de dois resíduos da porção N-terminal (Figura 21).

Os peptídeos antimicrobianos, na sua grande maioria, apresentam variações únicas em suas sequências de aminoácidos, com modificações na extensão da cadeia peptídica até modificações pós-traducionais. Para a família Hylidae é comum que os peptídeos maduros variem entre 18 e 34 resíduos, assim como ocorre com as Raniseptinas, Figaininas e Hylinas (Gomes *et al.*, 2007; Nicolas & El Amri, 2009; Nacif-Marçal *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). A estrutura geral dos precursores é altamente conservada, estando presente uma região que corresponde ao peptídeo sinal, sendo essa a mais conservada, principalmente para peptídeos antimicrobianos de anfíbios da família Hylidae, como demonstrado por Nicola e colaboradores (2003). Outra região conservada é a região denominada sinal de intervenção que apresenta pouca alteração em sua composição, seguida de locais de clivagem compostos por Lys e Arg (Wang *et al.*, 2016).

Magalhães e colaboradores (2008), quando analisaram a biblioteca de cDNAs da pele de *B. raniceps*, descreveram nove Raniseptinas distintas, sendo cinco pertencentes à família A com a porção N-terminal iniciando-se por AWL e quatro pertencentes à família B com a porção N-terminal iniciando-se por ALL. Entretanto, apenas a Raniseptina 1 foi isolada e caracterizada por esse grupo, sendo que devido à quantidade limitada de amostra foi realizada a síntese química da mesma. A Raniseptina 1 apresentou valores de MICs significativamente baixos para as mesmas bactérias testadas nesse trabalho, sendo que para *E. coli* (ATCC 25922) o valor do MIC foi igual a 5 μ M e para *S. aureus* (ATCC 29313) foi igual a 20 μ M.

Barbosa e colaboradores (2010) identificaram outros doze precursores de peptídeos antimicrobianos da pele de *B. raniceps*, dentre eles cinco Raniseptinas pertencentes à família A e sete peptídeos pertencentes à família B.

O peptídeo Rsp-3 apresentou atividade antimicrobiana similar à Raniseptina-1 descrita por Magalhães e colaboradores (2008), sendo também mais efetivo sobre bactérias Gram-negativas, como *E. coli* (MIC = 2 μ M) e *K. pneumoniae* (MIC = 1 μ M). O PAM Rsp-6

exibiu atividade antimicrobiana idêntica a da Rsp-3 sobre as bactérias Gram-negativas testadas, embora tenha se mostrado menos efetivo sobre a bactéria Gram-positiva *S. aureus*. Acredita-se que tal seletividade observada para os PAMs possa estar relacionada com as diferenças existentes na constituição das membranas de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Neelay *et al.*, 2017; Santana *et al.*, 2020). Outro fator que pode ter influência na atividade antimicrobiana observada para as duas Ranisptinas está associado ao fato da Rsp-3 apresentar uma face hidrofóbica maior que a Rsp-6 o que pode justificar uma ação mais efetiva sobre um espectro maior de bactérias (Wang, 2017). A cationicidade não parece ser um fator determinante para a seletividade desses dois peptídeos, uma vez que apresentam a mesma carga líquida (+4).

Alguns peptídeos descritos para o gênero *Boana* apresentam maior efetividade sobre bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*, como a Hylina a1 (Castro *et al.*, 2009) que exibiu MIC igual a 8 μ M, Cinerascetina 01 (Almeida *et al.*, 2015) com MIC igual a 10 μ M, a Hylina b3 e a Hylina b4, descritas por Araújo (2018), com valores de MIC iguais a 8 e 16 μ M, respectivamente. Outros peptídeos encontrados em hílideos também demonstram maior ação contra bactérias Gram-positivas como as Brevininas (MIC = 2,5-10 μ M) (Wang *et al.*, 2016) e as Esculentinas (MIC = 2,5-5 μ M) (Wang *et al.*, 2016).

As Raniseptinas testadas promoveram inibição parcial do crescimento da levedura *C. albicans*, sendo que no intervalo de concentrações de 128 a 16 μ M inibiram mais de 50% do crescimento desse fungo. Peptídeos com atividade sobre a levedura *C. albicans* já foram descritos como a Raniseptina-B1 1 descrita por Araújo e colaboradores (2018) que exibiu valor de MIC igual a 16 μ M e a Cinerascetina 01 com 10 μ M.

Os efeitos citolíticos dos peptídeos antimicrobianos estão relacionados com suas propriedades catiônicas, sendo esse efeito devido à sua interação com as moléculas de ácido siálico presentes na superfície dos eritrócitos (Blondelle *et al.*, 1999). O ácido siálico é carregado negativamente, o que favorece a interação com peptídeos com carga líquida mais elevadas. De maneira geral, peptídeos antimicrobianos apresentam carga líquida positiva, variando entre +4 e +7, com poucas exceções representadas por peptídeos com carga líquida negativa, sendo que apenas 15 foram descritos na secreção de anfíbios (Helynck *et al.*, 1993; Blondelle *et al.*, 1995; Dennison *et al.*, 2018). A carga líquida positiva dessas moléculas está diretamente relacionada com a proporção entre aminoácidos básicos, como His, Lys e Arg, e aminoácidos ácidos (Asp e Glu) presentes nessas moléculas (Bechinger & Gorr, 2017). No caso dos peptídeos Rsp-3 e 6, ambos apresentam cinco resíduos positivos em suas sequências balanceados por um resíduo de Asp, resultando em uma carga líquida igual a +4. Embora a

cationicidade seja um fator importante para a atividade citolítica sobre eritrócitos humanos, os peptídeos Rsp-3 e 6 promoveram menos de 20% de hemólise mesmo na concentração mais alta empregada (128 μM), diferente do observado para a Figainina 2 e a Hylina a1, que apresentaram valores de HC_{50} iguais a 48,9 e 18,6 μM , respectivamente (Santana *et al.*, 2020; Castro *et al.*, 2009).

Concluindo, os peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea de *Boana raniceps* exibiram propriedades antimicrobianas terapeuticamente interessantes, podendo contribuir para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos de modo a combater a atual crise no tratamento de infecções por microrganismos resistentes, reforçando a necessidade de se avançar na exploração, para fins farmacêuticos, da biodiversidade brasileira de anuros.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo foram identificados e isolados sete peptídeos com propriedades antimicrobianas da secreção cutânea do anuro *Boana raniceps*. Os peptídeos isolados foram submetidos a sequenciamento químico por degradação de Edman e análises de similaridade revelaram que o peptídeo Br18 corresponde a um fragmento da Figainina 2 e os demais correspondem às Raniseptinas 3, 6, 7 e 8 previamente identificadas a partir de uma biblioteca de cDNAs gerada para essa espécie. Finalmente o peptídeo Br17 corresponde a uma nova Raniseptina com alta similaridade com os PAMs Raniseptinas 10 e 6, sendo que o peptídeo Br17 apresenta uma deleção dos dois resíduos de aminoácidos da terminação N-terminal em relação às Raniseptinas citadas.

As Raniseptinas 3 e 6 foram sintetizados quimicamente e suas propriedades antimicrobianas e hemolíticas foram avaliadas.

As duas Raniseptinas sintetizadas mostraram-se bastante ativas exibindo mesmos valores de MIC sobre as bactérias Gram-negativas: *E. coli* (MIC = 2 µM) e *K. pneumoniae* (MIC = 1 µM). No caso das bactérias Gram-positivas testadas, os peptídeos mostraram-se menos ativos, sendo que a Rsp-3 exibiu valores de MIC iguais a 4 e 8 µM para *S. aureus* e *S. epidermidis*, respectivamente, enquanto a Rsp-6 mostrou-se menos efetiva sobre a bactéria *S. aureus* exibindo um valor de MIC igual a 32 µM.

Ambos os peptídeos não foram capazes de inibir completamente o crescimento da levedura *C. albicans*, mesmo na maior concentração empregada (128 µM).

As Raniseptinas 3 e 6 revelaram-se pouco hemolíticas, promovendo menos de 5% de hemólise nas concentrações onde a atividade antibacteriana foi relevante (entre 2 e 8 µM).

O presente estudo reforça o potencial terapêutico dos peptídeos antimicrobianos presentes nas secreções cutâneas dos anuros que, quando explorados adequadamente, podem ser úteis ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas futuras desse trabalho, destacamos:

1. Produzir por síntese química os demais peptídeos identificados no presente estudo para avançar na caracterização de suas propriedades biológicas;
2. Avaliar as propriedades antimicrobianas e hemolíticas dos demais peptídeos identificados no presente estudo;
3. Avaliar as propriedades antimicrobianas dos PAMs identificados no presente estudo por meio da realização de ensaios complementares de inibição avaliando seus efeitos sobre microrganismos multirresistentes, como *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA);
4. Avaliar o potencial terapêutico dos peptídeos identificados no presente estudo em combinação com outras drogas antibióticas comercialmente disponíveis;
5. Avaliar os efeitos dos peptídeos identificados no presente estudo sobre os microrganismos sensíveis com o emprego de técnicas de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica;
6. Avaliar os efeitos antiproliferativos e citotóxicos dos peptídeos identificados no presente estudo sobre linhagens de células tumorais, como linhagens de células de câncer de mama (MCF-7) e células de melanoma murino (B16F10);
7. Avaliar o potencial antiparasitário dos peptídeos identificados no presente estudo sobre protozoários de interesse médico e veterinário, como *Leishmania* sp., *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*;
8. Avaliar o potencial antiviral dos peptídeos identificados no presente estudo sobre arbovírus emergentes como os vírus da febre chikungunya, da febre amarela, da dengue e Zika vírus.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Wahab, Y. H., Power, G. J., Ng, M. T., Flatt, P. R., Conlon, J. M. (2008). Insulin-releasing properties of the frog skin peptide pseudin-2 and its [Lys18]-substituted analogue. *Biol. Chem.*, 389(2), 143-148.
- Aitken A, Learmonth M (2002) Protein determination by UV absorption. In: Walker JM, editor. *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press. pp. 3–6.
- Almeida, R. A., Gordo, M., Silva, F., Araújo, R. C. D., Ramada, M. H., Abrão, F. Y., Costa, T. O. G., Koolen, H. H. F., de Souza, A. D. L. Bloch Jr., C. (2015). Cinerascetins, new peptides from *Hypsiboas cinerascens*: MALDI LIFT-TOF-MS/MS de novo sequence and imaging analysis. *J. Braz. Chem. Soc.*, 26(11), 2290-2297.
- AmphibiaWeb. (2002). AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. AmphibiaWeb.< <https://amphibiaweb.org/> > Acesso em: 15 Fev. 2019.
- Araújo, N. O. (2018). Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea do anuro *Boana lundii* (Burmeister, 1856). 56 folhas. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade de Brasília, Brasília.
- Barbosa, E. A. (2010). Avaliação da transcrição, expressão e indução de genes que codificam peptídeos antimicrobianos em *Hypsiboas raniceps* por ferramentas de biologia molecular e espectrometria de massa. 92 folhas. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular), Universidade de Brasília, Brasília.
- Barra, D., Simmaco, M. (1995). Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends Biotechnol.*, 13(6), 205-209.
- Bechinger, B., Lohner, K. (2006). Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1758(9), 1529-1539.
- Bechinger, B., Gorr, S. U. (2017). Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance. *J. Dent. Res.*, 96(3), 254-260.
- Blondelle, S. E., Lohner, K., Aguilar, M. I. (1999). Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462(1-2), 89-108.

- Blondelle, S. E., Takahashi, E., Dinh, K. T., Houghten, R. A. (1995). The antimicrobial activity of hexapeptides derived from synthetic combinatorial libraries. *J. Appl. Bacteriol.*, 78(1), 39-46.
- Brand, G. D. (2007). Estratégias para prospecção e predição de peptídeos bioativos. 219 folhas. Tese (Doutorado em Biologia Animal), Universidade de Brasília, Brasília.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3(3), 238-250.
- Caramaschi, U., Cruz, C. A. G. (2002). *Phyllomedusa*: taxonomic status, habits, and biology (Amphibia, Anura, Hylidae). *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 1(1), 5-10.
- Castro, M. S., Ferreira, T. C. G., Cilli, E. M., Crusca Jr., E., Mendes-Giannini, M. J. S., Sebben, A., Ricart, C. A., Sousa, M. V., Fontes, W. (2009). Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). *Peptides*, 30(2), 291-296.
- Chan, W., White, P. (2000). *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, OUP Oxford.
- Chen, T., Walker, B., Zhou, M., Shaw, C. (2005). Dermatoxin and phylloxin from the waxy monkey frog, *Phyllomedusa sauvagei*: cloning of precursor cDNAs and structural characterization from lyophilized skin secretion. *Regul. Pept.*, 129(1-3), 103-108.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: Norma aprovada, Sexta Edição - M7 - A6. Pennsylvania: CLSI, 2005. v. 23, n. 2. Tradução pela ANVISA com permissão do CLSI.
- Conlon, J. M. (2011). Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. *Cell. Mol. Life Sci.*, 68(13), 2303-2315.
- Conlon, J. M., Mechkarska, M., Radosavljevic, G., Attoub, S., King, J. D., Lukic, M. L., McClean, S. (2014). A family of antimicrobial and immunomodulatory peptides related to the frenatins from skin secretions of the Orinoco lime frog *Sphaenorhynchus lacteus* (Hylidae). *Peptides*, 56, 132-140.

- Demori, I., Rashed, Z. E., Corradino, V., Catalano, A., Rovegno, L., Queirolo, L., Salvidio, S., Biggi, E., Zanotti-Russo, M., Canesi, L., Grasseli, E., Catenazzi, A. (2019). Peptides for skin protection and healing in amphibians. *Molecules*, 24(2), pii: E347.
- Dennison, S. R., Harris, F., Mura, M., Phoenix, D. A. (2018). An atlas of anionic antimicrobial peptides from amphibians. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 19(8), 823-838.
- Dornelles, M. F., Marques, M. D. G. B., Renner, M. F. (2010). Revisão sobre toxinas de Anura (Tetrapoda, Lissamphibia) e suas aplicações biotecnológicas. *Ciência em Movimento*, 12(24), 103-113.
- Dubois, A. (2017). The nomenclatural status of *Hysaplesia*, *Hylaplesia*, *Dendrobates* and related nomina (Amphibia, Anura), with general comments on zoological nomenclature and its governance, as well as on taxonomic databases and websites. *Bionomina*, 11(1), 1-48.
- Duda Jr., T. F., Vanhoye, D., Nicolas, P. (2002). Roles of diversifying selection and coordinated evolution in the evolution of amphibian antimicrobial peptides. *Mol. Biol. Evol.*, 19(6), 858-864.
- Duellman, W. E., Trueb, L. (1994). *Biology of Amphibians*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, United States.
- Duellman, W. E., Riva, I. D. L., Wild, E. R. (1997). Frogs of the *Hyla arntata* and *Hyla pulchella* groups in the Andes of South America, with definitions and analyses of phylogenetic relationships of Andean groups of *Hyla*. *Scientific Papers*, 3, 1-41.
- Faivovich, J., Haddad, C. F., Garcia, P. C., Frost, D. R., Campbell, J. A., Wheeler, W. C. (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyliinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 17(suppl), 1-240.
- Frost, D. (2020). Amphibian species of the world 6.0: An online reference. American Museum of Natural History. <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>>
- Gomes, A., Giri, B., Saha, A., Mishra, R., Dasgupta, S. C., Debnath, A., Gomes, A. (2007). Bioactive molecules from amphibian skin: their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. *Indian J. Exp. Biol.*, 45, 579-593.

- Hale, J. D., Hancock, R. E. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.*, 5(6), 951-959.
- Helynck, G., Dubertret, C., Mayaux, J. F., Leboul, J. (1993). Isolation of RP 71955, a new anti-HIV-1 peptide secondary metabolite. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 46(11), 1756-1757.
- The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-1 <<https://www.iucnredlist.org/search?query=Hypsiboas%20raniceps&searchType=species>> Acesso em: 18 Fev. 2019
- Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R. E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 19(3), 491-511.
- Juarez, J., Bradstock, K. F., Gottlieb, D. J., Bendall, L. J. (2003). Effects of inhibitors of the chemokine receptor CXCR4 on acute lymphoblastic leukemia cells in vitro. *Leukemia*, 17, 1294–1300.
- Kim, Y. S., Cha, H. J. (2010). Disperse distribution of cationic amino acids on hydrophilic surface of helical wheel enhances antimicrobial peptide activity. *Biotechnol. Bioeng.*, 107(2), 216-223.
- König, E., Bininda-Emonds, O. R., Shaw, C. (2015). The diversity and evolution of anuran skin peptides. *Peptides*, 63, 96-117.
- Krittanai, C., Johnson Jr., W. C. (2000). The relative order of helical propensity of amino acids changes with solvent environment. *Proteins*, 39(2), 132-141.
- Kyte, J., Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157(1), 105-132.
- Le, C. F., Fang, C. M., Sekaran, S. D. (2017). Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 61(4), pii: e02340-16.
- Lee, T. H., N Hall, K., Aguilar, M. I. (2016). Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: a focus on the role of membrane structure. *Curr. Top. Med. Chem.*, 16(1), 25-39.
- Magalhães, B. S., Melo, J. T. A., Leite, J. R. S. A., Silva, L. P., Prates., M. V.,

Vinecky, F., Barbosa, E. A., Verly, R. R., Mehta, A., Nicoli, J. R., Bemquerer, M. P., Andrade, A. C., Bloch Jr., C. (2008). Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 377, 1057–1061.

- Matsuzaki, K., Harada, M., Funakoshi, S., Fujii, N., Miyajima, K. (1991). Physicochemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1063(1), 162-170.

- Mojsoska, B., Jenssen, H. (2015). Peptides and peptidomimetics for antimicrobial drug design. *Pharmaceuticals (Basel)*, 8(3), 366-415.

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

- Murphy, J. B., Kies, M. W. (1960). Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. *Biochim. Biophys. Acta*, 45, 382-384.

- Nacif-Marçal, L., Pereira, G. R., Abranches, M. V., Costa, N. C., Cardoso, S. A., de Paula, S. O., Feio, R. N., Honda, E. R., Oliveira, L. L. (2015). Identification and characterization of an antimicrobial peptide of *Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824) (Amphibia, Hylidae). *Toxicon*, 99, 16-22.

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

- Neelay, O. P., Peterson, C. A., Snavelly, M. E., Brown, T. C., TecleMariam, A. F., Campbell, J. A., Blake, A. M., Schneider, S. C., Cremeens, M. E. (2017). Antimicrobial peptides interact with peptidoglycan. *J. Mol. Struct.*, 1146, 329-336.

- Nicolas, P., El Amri, C. (2009). The dermaseptin superfamily: a gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1788(8), 1537-1550.

- Nicolas, P., Vanhoye, D., Amiche, M. (2003). Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides. *Peptides*, 24(11), 1669-1680.

- Nizet, V. (2006). Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 8(1), 11-26.

- Olson III, L., Soto, A. M., Knoop, F. C., Conlon, J. M. (2001). Pseudin-2: an antimicrobial peptide with low hemolytic activity from the skin of the paradoxical frog. *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, 288(4), 1001-1005.
- Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasolofonirina, N., Ratsimaloto, M, Naoki, H., Yasumoto, T. (1999). Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon*, 37(1), 55- 65.
- Pace, N. R., Smith, D. K., Olsen, G. J., James, B. D. (1989). Phylogenetic comparative analysis and the secondary structure of ribonuclease P RNA—a review. *Gene*, 82(1), 65-75.
- Park, S. C., Kim, J. Y., Jeong, C., Yoo, S., Hahm, K. S., Park, Y. (2011). A plausible mode of action of pseudin-2, an antimicrobial peptide from *Pseudis paradoxa*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1808(1), 171-182.
- Popov, C. S., Magalhães, B. S., Goodfellow, B. J., Bocca, A. L., Pereira, D. M., Andrade, P. B., Rezende, T. M. (2019). Host-defense peptides AC12, DK16 and RC11 with immunomodulatory activity isolated from *Hypsiboas raniceps* skin secretion. *Peptides*, 113, 11-21.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., Shai, Y. (1992) Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*, 31(49), 12416-12423.
- Prates, M. V., Sforça, M. L., Regis, W. C., Leite, J. R., Silva, L. P., Pertinhez, T. A., Araújo, A. L., Azevedo, R. B., Spisni, A., Bloch Jr., C. (2004). The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of anuram *Hyla punctata*. *J. Biol. Chem.*, 279(13):13018-13026.
- Rinaldi, A. C. (2002). Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario: Commentary. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6(6), 799-804.
- Santana, C. J. C., Magalhães, A. C. M., Prías-Márquez, C. A., Falico, D. A., dos Santos Jr., A. C. M., Lima, B. D.; Ricart, C. A. O.; de Pilger, D. R. B.,Rafaela Milan Bonotto , Moraes, C. B., Freitas-Júnior, L. H., Álvares, A. C. M., Freitas, S. M., Luz, I. S., Pires Jr., O. R., Fontes, W., Castro, M. S. (2020) Biological properties of a novel multifunctional host

defense peptide from the skin secretion of the Chaco tree frog, *Boana raniceps*. *Biomolecules* (in press).

- Sebben, A., Schwartz, C. A., Cruz, J. D. S. (1993). Defesa química dos anfíbios. *Ciência Hoje*, 15(87), 25-33.
- Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462(1-2), 55-70.
- Shai, Y., Oren, Z. (2001). From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides*, 22(10), 1629-1641.
- Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D. (1998). Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us?. *Biolpolymers*, 47(6), 435-450.
- Spellberg, B., Powers, J. H., Brass, E. P., Miller, L. G., Edwards Jr., J. E. (2004). Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin. Infect. Dis.*, 38(9), 1279-1286.
- Storer, T. I., Usinger, R. L., Stebbins, R. C., Nybakken, J. W. (1974). *Zoologia Geral*. 6ª Edição. Cia. Editora Nacional, Brasil.
- Toledo, R. D., Jared, C. (1995). Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Com. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 111(1), 1-29.
- Travkova, O. G., Moehwald, H., Brezesinski, G. (2017). The interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 247, 521-532.
- Vanhoye, D., Bruston, F., Nicolas, P., Amiche, M. (2003). Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *Eur. J. Biochem.*, 270(9), 2068-2081.
- Vieira, S. C. (2004). Caracterização cromossômica de espécies do grupo de *Hyla polytaenia* (Anura, Hylidae). 67 folhas, Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade de Brasília, Brasília.
- Wang, G. (2017). *Antimicrobial peptides: discovery, design and novel*

therapeutic strategies. Cabi, 2nd. Edition, USA.

- Wang, Y., Zhang, Y., Lee, W. H., Yang, X., Zhang, Y. (2016). Novel peptides from skins of amphibians showed broad-spectrum antimicrobial activities. *Chem. Biol. Drug Des.*, 87(3), 419-424.
- Wiens, J. J., Kuczynski, C. A., Hua, X., Moen, D. S. (2010). An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 55(3), 871-882.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389-395.
- Zhang, L. J., Gallo, R. L. (2016) Antimicrobial peptides. *Curr Biol.*, 26(1), R14-9.