



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

***“CARACTERIZACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y
EL EFECTO HEMOLÍTICO DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS
FILOSEPTINAS CC1 Y SP3”***

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: LIDIA ROSA BRÍÑOLES VILLALVA

TUTORA: PhD. CAROLINA DEL CARMEN PROAÑO BOLAÑOS

Napo – Ecuador

2024

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, LIDIA ROSA BRIÑOLES VILLALVA, con documento de identidad número 172486149-5, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en el presente documento son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 28 de febrero de 2024



Lidia Rosa Briñoles Villalva
C.I. 172486149-5

AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, LIDIA ROSA BRIÑOLES VILLALVA, con documento de identidad número 172486149-5, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: Caracterización de actividad antimicrobiana y el efecto hemolítico de péptidos sintéticos filoseptinas CC1 y SP3, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Tena, 28 de febrero de 2024



Lidia Rosa Briñoles Villalva

C.I. 172486149-5

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular Titulado: "Caracterización de la actividad antimicrobiana y el efecto hemolítico de péptidos sintéticos filoseptinas CC1 y SP3" en la modalidad: tesis, fue realizado por: Lidia Rosa Briñoles Villalva, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 28 de febrero de 2024



Carolina del Carmen Proaño Bolaños

C.I: 171481876-0

DEDICATORIA

A mi padre en el cielo y a mi madre aquí en la tierra; Gracias por siempre apoyarme e impulsarme a hacer mejor las cosas a pesar de mis inseguridades.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a la Universidad Regional Amazónica Ikiam y al Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica por permitirme el acceso a las instalaciones y recursos necesarios para llevar a cabo este proyecto de investigación.

Además, agradezco a la Dra. Carolina Proaño por su orientación, disponibilidad y por proporcionar los recursos necesarios para llevar a cabo todas las actividades experimentales de este proyecto, así como por ser parte de mi desarrollo profesional.

También deseo reconocer de manera muy especial a Giovanna Morán, técnica del Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica, por su ayuda inestimable en la utilización de materiales y equipos para la obtención de resultados significativos.

Asimismo, quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi familia por su apoyo y cariño, los cuales han sido fundamentales para alcanzar muchas de mis metas académicas y personales. En especial, quiero agradecer a mi madre, Gloria Villalba, quien es una gran mujer, madre y amiga a la vez. Ella me motivó realmente a seguir mi carrera universitaria, me ha dado aliento cuando ya no lo tenía y nunca se dio por vencida conmigo. A ella quiero agradecerle por lo que soy y por lo que he logrado hasta ahora.

Adicionalmente, quiero expresar mi sincero agradecimiento a mi tío, Lenin Villalba, por ser mi sólido respaldo emocional, iluminando mis días con su ingenio y estando presente en cada momento, tanto en los desafíos como en las alegrías. Su figura ha sido invaluable como guía y apoyo paternal.

Por último, pero no menos importante, quiero expresar mi gratitud hacia mis amigos Michelle, Jairo, Dennis, Mariana, Dominic, y Dayana, quienes me han apoyado en todo, por las alegrías, y tristezas compartidas a lo largo de nuestra carrera universitaria.

TABLA DE CONTENIDOS

CARÁTULA	
DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS	vi
TABLA DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema	4
1.3. Justificación de la investigación.....	4
1.4. Objetivos de la investigación	5
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	7
2.1. Análisis bioinformático.	7
2.2. Purificación y síntesis de péptidos filoseptina CC1 y SP3 mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.....	7
2.3. Identificación de masas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS.....	7
2.4. Verificación de pureza del péptido con HPLC en fase reversa.....	8
2.5. Liofilización de los péptidos purificados	8
2.6. Ensayo de concentración inhibitoria mínima (CIM)	8
2.7. Ensayo de hemólisis.....	9
2.8. Permeabilidad de la membrana bacteriana utilizando microscopía fluorescente.	10
2.9. Índice de selectividad de los péptidos filoseptina CC1 y SP3.	10
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS	12
3.1. Análisis Bioinformático.....	12
3.2. Purificación y síntesis de péptidos filoseptina CC1 y SP3 mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.	13

3.3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima	15
3.4. Hemólisis.....	16
3.5. Permeabilidad de la membrana bacteriana utilizando microscopía fluorescente.....	17
3.6. Índice de selectividad de los péptidos filoseptina CC1 y SP3.	18
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.....	20
4.1. Análisis bioinformático de los péptidos sintéticos PLS-CC1 y PLS-SP3.....	20
4.2. Actividad biológica y hemolítica de los péptidos sintéticos PLS-CC1 y PLS-SP3.....	20
4.3. Permeabilidad de la membrana bacteriana.....	23
4.4. Índice de selectividad de los péptidos filoseptina CC1 y SP3.	24
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-3: Propiedades físico químicas de los péptidos sintéticos filoseptina CC1 y SP3.	12
Tabla 2-3: Comparación de la secuencia de aminoácidos de PLS-CC1 con otros péptidos pertenecientes a la familia filoseptina de acuerdo a BLAST/p (proteína-proteína) en la base de datos UniProt.	13
Tabla 3-3: Comparación de la secuencia de aminoácidos de PLS-SP3 con otros péptidos de acuerdo a BLAST/p (proteína-proteína) en la base de datos UniProt.	13
Tabla 4-3: Índice de selectividad de los péptidos filoseptina CC1 y SP3.	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-3:	Verificación de pureza mediante HPLC de las filoseptinas sintetizadas, a) representa la pureza de la filoseptina CC1, y b) pureza de la filoseptina SP3. Identificación de la masa/carga mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS, c) pertenece a la PLS-CC1, y d) corresponde a la PLS-SP3.....	14
Figura 2-3:	Verificación de pureza de las filoseptinas sintetizadas mediante HPLC, a) representa la pureza de la filoseptina CC1, y b) pureza de la filoseptina SP3. Identificación de la masa/carga mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS, c) pertenece a la PLS-CC1, y d) corresponde a la PLS-SP3.	15
Figura 3-3:	Concentración inhibitoria mínima de los péptidos PLS-CC1 y PLS-SP3 contra <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> , <i>K. pneumoniae</i> y <i>E. faecalis</i> . MHB (Mueller Hinton Broth) corresponde al blanco (sin crecimiento bacteriano) y DMSO (Dimetilsulfóxido) al control negativo (con crecimiento). a) pertenece a PLS-CC1 y b) pertenece a PLS-SP3.	16
Figura 4-3:	Actividad hemolítica de los péptidos sintéticos PLS-CC1 y PLS-SP3. C (+) corresponde al control positivo (Triton X-100) y C (-) al control negativo (PBS). En la parte superior de las barras se presentan los porcentajes de hemólisis para cada concentración y controles. a) pertenece a PLS-CC1 y b) PLS-SP3.....	16
Figura 5-3:	Microscopía fluorescente de los péptidos PLS-CC1 y PLS-SP3 contra <i>S. aureus</i> . El control positivo es ampicilina y el control negativo es DMSO.....	18

RESUMEN

Las filoseptinas son péptidos antimicrobianos de 15 a 18 aminoácidos, secretados por la piel de anfibios de la familia *Phyllomedusidae*. Estos péptidos podrían ser utilizados con fines terapéuticos debido a su potente actividad contra microorganismos como bacterias y hongos. En el presente estudio, se llevó a cabo la caracterización funcional de la filoseptina CC1 y SP3, provenientes de las especies *Cruziohyla calcarifer* y *Agalychnis spurrelli*, respectivamente. Como primer paso, se realizó un análisis bioinformático para obtener las características fisicoquímicas y analizar las similitudes en las secuencias con otros péptidos. Los resultados de este análisis demostraron que los péptidos filoseptina CC1 y SP3 son péptidos catiónicos con carga neta +1 y +2, respectivamente. Estas filoseptinas comparten una prolina conservada en la sexta posición, la secuencia N-terminal FL-, y una amidación en el C-terminal. En cuanto a la actividad antimicrobiana, la filoseptina CC1 mostró una concentración inhibitoria mínima contra *Staphylococcus aureus* de 8,23 μ M y contra *Candida albicans* de 32,93 μ M, mientras que el péptido filoseptina SP3 inhibió el crecimiento de las bacterias Gram positivas *S. aureus* a una concentración de 12,83 μ M y *E. faecalis* a 51,43 μ M. En relación a los ensayos de citotoxicidad, se encontró que el péptido filoseptina CC1 no presentó actividad hemolítica en las concentraciones que inhibió a *S. aureus* y *C. albicans*, a diferencia de la filoseptina SP3 quien presentó una actividad hemolítica baja (2.5 – 8.8%) en las concentraciones inhibitorias mínimas. Estos hallazgos sugieren el potencial de los péptidos filoseptinas como agentes terapéuticos contra infecciones microbianas, con la filoseptina CC1 mostrando una actividad antimicrobiana prometedora y sin citotoxicidad, lo que la hace un candidato atractivo para futuros estudios terapéuticos.

Palabras clave: filoseptinas, *Cruziohyla calcarifer*, *Agalychnis spurrelli* actividad antimicrobial, citotoxicidad, hidrofobicidad, bacterias Gram positivas

ABSTRACT

Phylloseptins are antimicrobial peptides consisting of 15 to 18 amino acids, secreted by the skin of amphibians belonging to the *Phyllomedusidae* family. These peptides could be used for therapeutic purposes due to their potent activity against microorganisms such as bacteria and fungi. In the present study, the functional characterization of phylloseptin CC1 and SP3, derived from the species *Cruziohyla calcarifer* and *Agalychnis spurrelli*, respectively, was conducted. As a first step, a bioinformatic analysis was conducted to obtain the physicochemical characteristics and analyze similarities in sequences with other peptides. The results of this analysis demonstrated that the phylloseptin peptides CC1 and SP3 are cationic peptides with net charges of +1 and +2, respectively. These phylloseptins share a conserved proline at the sixth position, the N-terminal sequence FL-, and amidation at the C-terminal. Regarding antimicrobial activity, phylloseptin CC1 exhibited a minimum inhibitory concentration against *Staphylococcus aureus* of 8.23 μM and against *Candida albicans* of 32.93 μM , while phylloseptin SP3 inhibited the growth of Gram-positive bacteria *S. aureus* at a concentration of 12.83 μM and *E. faecalis* at 51.43 μM . In cytotoxicity assays, it was found that phylloseptin CC1 did not exhibit hemolytic activity at the concentrations inhibiting *S. aureus* and *C. albicans*, unlike phylloseptin SP3, which showed low hemolytic activity (2.5 – 8.8%) at minimum inhibitory concentrations. These findings suggest the potential of phylloseptin peptides as therapeutic agents against microbial infections, with phylloseptin CC1 demonstrating promising antimicrobial activity without cytotoxicity, making it an attractive candidate for future therapeutic studies.

Keywords: phylloseptins, *Cruziohyla calcarifer*, *Agalychnis spurrelli*, antimicrobial activity, cytotoxicity, hydrophobicity, Gram positive bacteria.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1 Secreciones de la piel de anfibios.

Los anfibios viven en entornos que favorecen el crecimiento de bacterias y hongos que podrían ser patógenos [1]. Sin embargo, estos animales han desarrollado un sistema de defensa en su piel que los protege de la invasión de estos microorganismos [2]. Este mecanismo se basa en componentes bioactivos presentes en las secreciones de su piel [1]. Las glándulas exócrinas dérmicas de los anfibios son las encargadas de producir y liberar una variedad de hormonas, y péptidos bioactivos en la superficie de su piel, para su propia protección [1,3]

Los péptidos de la piel de anfibios muestran diferencias en su secuencia y función, y han llamado la atención por sus posibles aplicaciones biomédicas [4]. Entre las aplicaciones más relevantes hasta la fecha, se encuentran los péptidos antimicrobianos (AMP) que han demostrado actividad: cicatrizante, antimicrobiano, anticancerígena, y antiinflamatoria, entre otros[5,6]. Los AMPs se consideran como alternativas en el tratamiento contra microorganismos resistentes a los fármacos convencionales, entre otras posibles aplicaciones terapéuticas [7].

1.1.2. Péptidos antimicrobianos: estructura y mecanismos de acción

La mayoría de los péptidos antimicrobianos son catiónicos y las secuencias de aminoácidos son cortas, generalmente compuestos por 8 a 45 residuos [1]. La estructura secundaria que adquieren estos péptidos es esencial para su función antimicrobiana [8]. La mayoría de ellos adoptan una estructura plegada, formando hélices alfa o láminas beta, que les confiere estabilidad y les permite interactuar específicamente con las membranas de las células microbianas [9]. Los péptidos antimicrobianos también pueden clasificarse en dos categorías principales según su actividad: los AMPs intracelularmente activos y los AMPs activos de membrana [6].

Los AMPs intracelularmente activos, describen el "modelo de canal agregado", es la interacción principal dentro de la célula bacteriana. En este modelo, los AMPs generan

poros transitorios en la membrana, lo que facilita su penetración intracelular [6]. Estos poros permiten que los AMPs ingresen a la célula bacteriana, donde pueden interferir con diversos blancos, como enzimas autolíticas, síntesis de ADN o proteínas, e incluso unirse al ADN [9]. Esta actividad intracelular contribuye a la muerte de las células bacterianas [6,9].

Por otro lado, los AMPs activos de membrana, actúan mediante el "modelo de alfombra" y el "modelo del barril", actuando principalmente en la superficie de la membrana bacteriana [9]. En el modelo de alfombra, los AMPs se distribuyen en la superficie de la membrana y forman micelas, lo que conduce al colapso de la membrana y la creación de poros [10]. En el modelo del barril, los AMPs se unen a la membrana desde el exterior y forman una estructura de barril alrededor de un poro, causando también la pérdida de componentes intracelulares y el desequilibrio osmótico que resulta en la muerte celular [6,10].

1.1.3. *Agalychnis spurrelli* y *Cruziohyla calcarifer* como fuentes potenciales de péptidos antimicrobianos.

Agalychnis spurrelli y *Cruziohyla calcarifer* son dos especies de ranas en las que se han descubierto varios péptidos como las medusinas, cruzioseptinas, y dermaseptinas, que han demostrado tener actividad contra bacterias, en especial contra *S. aureus* y *E. coli* [11,12]. No obstante, las filoseptinas son otro tipo AMPs encontradas recientemente en estas especies [13].

Las filoseptinas (PLS) tienen entre 15 y 20 residuos de aminoácidos altamente conservados y pertenecen a la familia de péptidos anfipáticos lineales [12]. Todas las filoseptinas contienen histidinas en las posiciones 7 y 18, así como una terminación carboxi-amidada [14]. Aunque comparten similitudes en sus dominios N-terminales, los últimos seis residuos de las filoseptinas presentan variaciones significativas. También poseen configuraciones α -hélice y su estructura y función sugieren una adaptación para enfrentar diversos patógenos en su entorno microbiano [12,14].

En 2005, Leite, J. R. y colaboradores, reportaron una nueva familia de péptidos antimicrobianos llamadas filoseptinas (PLS 1 - 6), encontradas en las secreciones de dos especies de *Phyllomedusa* (*P. oreades* y *P. hypochondrialis*) donde el PLS-1, demostró tener actividad inhibitoria contra bacterias patógenas como *P. aeruginosa*, *E.*

coli, *E. faecalis* y *S. aureus*, y también tuvo mínimo efecto en glóbulos rojos como ocurrió con la PLS-2 [15]. Mientras que las PLS-4 y 5 tuvieron actividad anti *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de chagas [15]. De igual manera las PLS-3 tienen una potente actividad contra una amplia variedad de microorganismos, incluyendo bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas, y hongos. Además, posee un bajo potencial citotóxico contra células humanas [14].

La secuencia del péptido maduro de PLS-3 tiene entre el 71 - 76% de similitud con el primer péptido de la familia filoseptinas descubierto en las secreciones de la piel de *Cruziophyla calcarifer*, llamado filoseptina CC1. Además, presenta propiedades fisicoquímicas, alfa hélice, hidrofobicidad y momento hidrofóbico similares [datos no publicados]. Debido a su alta similitud estructural, se presume que la filoseptina CC1 de *Cruziophyla calcarifer* también tiene propiedades antimicrobianas por descubrir.

La especie *Agalychnis spurrelli* también posee péptidos de la familia filoseptina y el primero fue denominado filoseptina SP1, que tuvo similitud con los péptidos filoseptina H13 de *P. hypochondrialis* y filoseptinas S1 de *P. sauvagii* [13]. Estudios demuestran que el péptido filoseptina SP1 tuvo un alto efecto en glóbulos rojos y también demostró actividad contra bacterias Gram negativas y Gram positivas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Candida albicans* [13]. En esta misma especie se han encontrado dos tipos más de filoseptinas que aún no se han publicado.

El péptido PLS-PT de *Phyllomedusa tarsius*, siendo una filoseptina sin amidación, demostró inicialmente una baja actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y *C. albicans*, además de exhibir una actividad hemolítica débil en eritrocitos de caballo [16]. Con el fin de mejorar la potencia de su actividad antimicrobiana y superar desafíos como la toxicidad para las células eucariotas y una corta vida media *in vivo*, se diseñaron y posteriormente investigaron análogos de PLS-PT [16]. Estos análogos (PLS-PT1 y PLS-PT2) exhibieron una actividad antimicrobiana mejorada de espectro más amplio. PLS-PT1, por ejemplo, mostró una inhibición potenciada de 4 veces contra *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, mientras que PLS-PT2 exhibió una actividad inhibitoria mejorada contra los organismos de referencia, aumentando la inhibición 32 veces, especialmente contra *C. albicans* [16].

1.2. Planteamiento del problema

Las enfermedades infecciosas a nivel mundial abarcan una amplia gama de enfermedades causadas por diferentes bacterias, virus, hongos y parásitos. En 2020, el informe del Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos y de su Uso (GLASS) reveló una creciente amenaza de resistencia antibiótica a nivel global. Dado que las bacterias desarrollan resistencia a los antimicrobianos, como los antibióticos, se están presentando problemas significativos en la atención médica. Este problema se manifiesta en varias dimensiones [17]:

- **Resistencia en Bacterias Mortales:** El informe muestra niveles preocupantes de resistencia en bacterias que causan septicemia en hospitales, como *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter* spp. [18]. La resistencia a los antibióticos de último espectro, como los carbapenémicos, está aumentando, lo que amenaza la capacidad de tratar infecciones potencialmente mortales [19].
- **Resistencia en Infecciones Comunes:** Las infecciones bacterianas comunes, como la gonorrea y las infecciones de las vías urinarias causadas por *E. coli*, también están desarrollando resistencia a los tratamientos [17,18]. Más del 60% de las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* son resistentes a la ciprofloxacina, un antibiótico oral común. Además, más del 20% de las cepas de *E. coli* son resistentes tanto a los tratamientos de primera línea como a los de segunda línea [18].

Solis, M. B. y colaboradores en 2022, realizaron una búsqueda sistemática de información sobre la resistencia a los antibióticos en *Escherichia coli* comunitaria en infecciones del tracto urinario (ITU) en Ecuador. Encontrando que, durante el período de enero a diciembre de 2020, se llevaron a cabo 9831 urocultivos, de los cuales 4209 (42,81%) fueron positivos, y 1134 mostraron flora mixta (11,53%). Entre las bacterias aisladas con resistencia a antibióticos, prevaleció *Escherichia coli* con un 79,38%, seguida de *Klebsiella pneumoniae* (7,1%) y *Enterococcus faecalis* (4,56%), además de otras cepas menos comunes [20].

1.3. Justificación de la investigación

La resistencia antimicrobiana es una emergencia global de salud pública [19]. Las bacterias resistentes a los antibióticos están en constante aumento, lo que reduce la

eficacia de los tratamientos convencionales [7]. Esto se traduce en infecciones más difíciles de tratar, un aumento en las tasas de morbilidad y mortalidad, y un aumento en los costos de atención médica [17]. A pesar de la creciente amenaza de resistencia antimicrobiana, la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos han disminuido significativamente en las últimas décadas. Esto se debe en parte a la complejidad y al alto costo de desarrollar nuevos fármacos [21]. Los péptidos de anfibios representan una fuente potencialmente rica de nuevos agentes antimicrobianos que podrían ayudar a abordar esta brecha en el arsenal de antibióticos [22].

Las secreciones de anfibios contienen una amplia variedad de péptidos con propiedades antimicrobianas, como son las filoseptinas [15]. Estos péptidos tienen la capacidad de atacar a las bacterias de manera selectiva y a menudo son eficaces contra cepas resistentes a múltiples antibióticos [23]. Tienden a tener modos de acción múltiples y complejos, actuando directamente sobre la membrana bacteriana, lo que hace que sea más difícil para las bacterias desarrollar resistencia a ellos [10].

La investigación de péptidos de la familia de las filoseptinas provenientes de la piel de anfibios representa una línea de estudio esencial en el contexto de las bacterias resistentes a los antibióticos debido a su potencial antimicrobiano, la posibilidad de desarrollar nuevas terapias, la menor probabilidad de resistencia, y la conservación de la biodiversidad, tratando de garantizar no solo la preservación de las especies de anfibios, sino también la protección de la diversidad genética y el equilibrio ecológico de los ecosistemas donde habitan. Este potencial hace que su investigación sea crucial en la búsqueda de alternativas efectivas para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes.

1.4. Objetivos de la investigación

1.4.1. Objetivo general

- Determinar la actividad antimicrobiana y el efecto hemolítico de los péptidos sintéticos filoseptina CC1 y SP3

1.4.2. Objetivos específicos

- Analizar las propiedades fisicoquímicas y estructura secundaria de las

secuencias de filoseptina CC1 y filoseptina SP3, empleando herramientas bioinformáticas.

- Determinar la concentración mínima inhibitoria de los péptidos filoseptina CC1 y SP3 contra *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *K. pneumoniae* y *E. faecalis*.
- Determinar la toxicidad de los péptidos sintéticos filoseptina CC1 y SP3 contra los glóbulos rojos mediante ensayos hemolíticos.
- Evaluar el impacto de los péptidos filoseptina CC1 y SP3 en la permeabilidad de la membrana bacteriana mediante microscopia fluorescente.
- Determinar la selectividad de los péptidos filoseptina CC1 y SP3 para uso terapéutico mediante el cálculo del índice de selectividad.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Análisis bioinformático.

Los péptidos sintéticos y sus secuencias fueron donados por el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Regional Amazónica Ikiam. Estos fueron sintetizados utilizando la técnica de síntesis en fase sólida con el grupo protector Fmoc y un sintetizador automático de péptidos (Liberty Blue, CEM) por el mismo laboratorio.

Se analizó la secuencia de nucleótidos y se llevó a cabo la predicción de la estructura secundaria y terciaria utilizando I-Tasser, y se calcularon las propiedades fisicoquímicas de los péptidos mediante HeliQuest y Peptide Property Calculator v.3.1. Además, se compararon las secuencias de nucleótidos con la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) empleando la herramienta de Blast/p.

2.2. Purificación y síntesis de péptidos filoseptina CC1 y SP3 mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Se disolvieron 10 mg de los péptidos sintéticos filoseptinas CC1 y SP3 respectivamente en 1 mL de solución A (99,90 % H₂O + 0,1 % ácido trifluoroacético (TFA) v/v) y se mezclaron en un vórtex. Se filtró a través de una membrana de 0,45 µm y se inyectaron 100 µL de muestra en el HPLC (Detector UV/Visible 2489, bombas binarias 1525) de la marca Waters utilizando una columna semipreparativa XBridge peptide BEH 5µm, C-18, 300 Å (10x150mm) para cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC. Se utilizó un gradiente de elución del 10 % al 100 % de la solución B (99,90 % acetonitrilo + TFA 0,1 % v/v) durante 55 minutos con un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 214 nm. Las fracciones se recogieron en tubos de vidrio de 5 mL de manera manual y por pico.

2.3. Identificación de masas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS

Se identificó la masa/carga (m/z) mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS (iD Plus Axima Confidence, Shimadzu). Primero se colocó 1 µL de matriz CHCA 98% (ácido α-ciano-4-hidroxicinámico) 10 mg/ml en la placa de MALDI-TOF MS de 48 pocillos y se dejó secar totalmente. Luego, se añadió 1 µL de cada fracción obtenida en la

sección 2.2 y se dejó secar. Después, se colocaron las placas en el espectrómetro de masas MALDI-TOF MS y el péptido PLS-CC1 se analizó en un rango de 1800 a 2000 Da, mientras que el péptido PLS-SP3 se analizó en un rango de 1450 a 1620, en modo reflectrón, con la siguiente configuración: *profile* =200, *power* = 40, *shots*= 2, *peak width*= 5, *smoothing*= 20, *peak detection method*= thershod – 25 % centroid, y *theshold type*= 0,300. También, se calculó el error relativo (ppm) en de la medición de las masas en el MALDI-TOF MS, empleando la siguiente formula:

$$\text{Error Relativo} = \frac{\text{Valor teórico m/z} - \text{Valor experimental m/z}}{\text{Valor teórico m/z}} \times 10^6$$

2.4. Verificación de pureza del péptido con HPLC en fase reversa

La pureza de los péptidos filoseptina CC1 y SP3 se verificó con HPLC en fase reversa, para lo cual se inyectaron 60 µL de los péptidos sintéticos purificados en el HPLC (Detector UV/Visible 2489, bombas binarias 1525) de la marca Waters utilizando una columna analítica Jupiter 5 µm, C-18, 300 Å (4.6 x 250 nm). Se empleó un gradiente de elución del 10 % al 100 % de la solución B (99,90 % acetonitrilo + TFA 0,1 % v/v) durante 45 minutos con un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 214 nm.

2.5. Liofilización de los péptidos purificados

Después de asegurar la presencia y pureza > 90% de los péptidos, se procedió a su liofilización. Para ello, las muestras se congelaron a -80 °C durante 24 horas. Seguidamente, se introdujeron en nitrógeno líquido durante media hora y se taparon con parafilm. Posteriormente, se colocaron en el liofilizador (BenchTop Pro 9L, Omnitronics) a -80 °C y 21 mTorr durante 5 días. Finalmente, se conservaron a 20°C.

2.6. Ensayo de concentración inhibitoria mínima (CIM)

Se determinó la concentración inhibitoria mínima de los péptidos purificados contra las bacterias *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922 y la levadura *C. albicans* ATCC 10231 *Enterococcus faecalis*, así como contra los aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistente a la ampicilina. Se realizaron diluciones seriadas de los péptidos filoseptina CC1 y SP3 respectivamente en dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener

concentraciones de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 y 1×10^2 mg/L (μ M). Cada microorganismo en su fase logarítmica fue diluido en MHB para alcanzar una concentración de 1×10^6 (UFC)/mL para bacterias y 1×10^5 (UFC)/mL para la levadura. Para verificar esto, se dispense 20 μ L de diluciones seriadas 1×10^{-2} , 1×10^{-3} y 1×10^{-4} con PBS 1X de los microorganismos diluidos en placas con agar Mueller Hinton (MHA) y después de 24 h de incubación a 37 °C se calculó la Unidad Formadora de Colonias por mililitro UFC/mL utilizando la fórmula:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \frac{\text{Número de colonias} * \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen inoculado (mL)}}$$

Luego, se colocaron 2 μ L de cada dilución del péptido y 198 μ L del microorganismo en una placa estéril de 96 pocillos. Se emplearon 2 μ L de DMSO en 198 μ L de microorganismo como control negativo y 200 μ L de caldo Mueller Hinton Broth (MHB) como blanco sin crecimiento bacteriano. Se realizaron 5 réplicas por cada concentración del péptido y se repitió el experimento dos veces para confirmar los resultados. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 h para promover el crecimiento de los microorganismos y se midió la absorbancia a 560 nm en el lector de placas (GloMax, Promega).

2.7. Ensayo de hemólisis

El ensayo de hemólisis se llevó a cabo para determinar la actividad hemolítica de los péptidos sintéticos filoseptina CC1 y SP3. Se utilizó una solución al 4 % de glóbulos rojos humanos heparinizados en PBS 1X y las mismas concentraciones obtenidas por diluciones seriadas del péptido sintético en los ensayos CIM. Se colocaron 200 μ L de la solución de glóbulos rojos al 4 % y se añadieron 200 μ L de cada dilución del péptido sintético en tubos de 1,5 mL. Como control negativo se utilizaron 200 μ L de la solución de glóbulos rojos al 4% con 200 μ L de PBS 1X sin péptido y como control positivo se añadieron 200 μ L de la solución de glóbulos rojos al 4 % con 5 μ L de tritón X-100 y 195 μ L de PBS 1 X. Se realizó 1 réplica de cada tratamiento y se incubaron a 37°C durante 2h. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a placas de 96 pocillos. La lectura se realizó a 560 nm en un lector de placas (GloMax, Promega). El porcentaje de hemólisis se calculó utilizando la fórmula:

$$\%Hemólisis = \frac{A - A_0}{A_x - A_0} \times 100$$

Dónde A es la OD de las muestras con la concentración del péptido filoseptina CC1 y SP3, A_0 es la OD del control negativo y A_x es la OD del control positivo.

2.8. Permeabilidad de la membrana bacteriana utilizando microscopía fluorescente.

Se llevó a cabo una tinción utilizando Sytox Green a una concentración de 5 μ M y DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a 5 μ M en las muestras de los péptidos sintéticos PLS-CC1 y PLS-SP3 obtenidos de los ensayos de concentración inhibitoria mínima (CIM). Se utilizaron microorganismos en su fase exponencial. Se colocaron 2 μ L de cada dilución del péptido y 198 μ L del microorganismo en un tubo de 1,5 mL. Se emplearon 2 μ L de DMSO en 198 μ L de microorganismo como control negativo y 2 μ L de ampicilina (0,1 g/mL) en 198 μ L de microorganismo como control positivo. Los tubos de 1,5 mL se incubaron a 37 °C durante 2h. Luego, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante para poder lavar el pellet con 200 μ L de PBS 1X y se centrifugó nuevamente a 3000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se procedió a colocar 200 μ L de DAPI y se dejó por 15 min en completa oscuridad. Transcurrido los 15 min, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. Luego, se colocaron 200 μ L de Sytox Green a cada muestra por 10 min en completa oscuridad. Finalmente, se centrifugaron los tubos a 3000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se realizó un último lavado de cada muestra con PBS 1X, se centrifugó, se descartó el sobrenadante, y se resuspendió el pellet. Las bacterias teñidas se observaron bajo microscopía de fluorescencia (Microscopio vertical, Nikon Eclipse Ni U) utilizando el objetivo de 100X con aceite de inmersión.

2.9. Índice de selectividad de los péptidos filoseptina CC1 y SP3.

El índice de selectividad se calculó para representar la especificidad del péptido antimicrobiano. La selectividad para las bacterias versus los glóbulos rojos se determinó con la siguiente formula:

$$SI = \frac{HC_{50}}{CIM_{50}}$$

Donde, HC_{50} es la concentración que produce el 50% de hemólisis y CIM_{50} es la concentración mínima del péptido al 50% de inhibición contra los diferentes

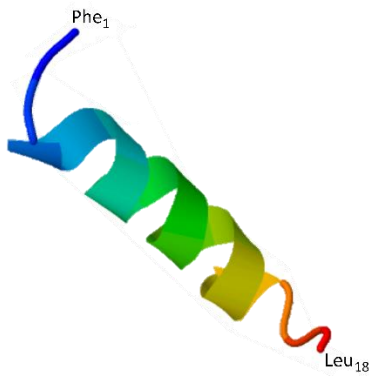
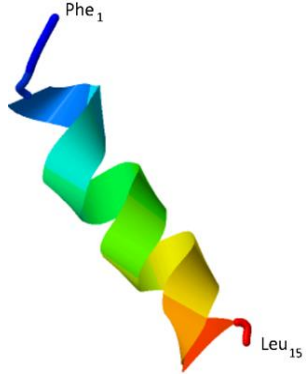
microorganismos empleados [24].

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1. Análisis Bioinformático.

Utilizando Peptide property calculator v.3.1 se encontró que la masa molecular teórica del péptido filoseptina CC1 es 1943,135 Da. y de la filoseptina SP3 es 1567,981Da. También, se calcularon los valores de hidrofobicidad, que fueron 0.894 y 0.917 respectivamente, calculados mediante HeliQuest. Además, se utilizó el software I-Tassser para la predicción de las estructuras secundarias en 3D de los péptidos, donde PLS-CC1 tiene 72.22 % y PLS-SP3 el 53.33 % de hélices alfas (Tabla 1-3).

Tabla 1-3: Propiedades físico químicas de los péptidos sintéticos filoseptina CC1 y SP3.

Parámetros	Filoseptina CC1	Filoseptina SP3
Secuencia	FLHLIPHVISALSNL _a	FLGIIPVAISALSRL _a
Número de aminoácidos	18	15
Masa teórica en Dalton	1943,143	1567,981
% de aminoácidos básicos	11.11	6.67
% de aminoácidos neutros	27.78	26.67
% de aminoácidos ácidos	0	0
% de aminoácidos hidrofóbicos	61.11	66.67
% de hélice alfa	72.22	53.33
Carga neta z	+1	+2
Hidrofobicidad H	0.894	0.917
Momento hidrofóbico μ H	0.420	0.488
Estructura secundaria		

Elaborado por: Briñoles, 2024

También se realizó una alineación de secuencias con los péptidos PLS-CC1 (Tabla 2-

3) y PLS-SP3 (Tabla 3-3) respectivamente, utilizando Blats/p y limitando la búsqueda a anfibios (taxid:8292). De estos datos, solo se escogieron los 10 primeros resultados por cada péptido para conservar el valor E ≤1.

Tabla 2-3: Comparación de la secuencia de aminoácidos de PLS-CC1 con otros péptidos pertenecientes a la familia filoseptina de acuerdo a BLAST/p (proteína-proteína) en la base de datos UniProt.

# Acceso	Péptido	Especie	Secuencia																							
	PLS-CC1	<i>Cruziohyla calcarifer</i>	1	F	L	H	L	I	P	H	V	I	S	A	I				S	A	L	S	N	L	1	
A0A5P9K461.1	PLS-SP1	<i>Agalychnis spurrelli</i>	46	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	P	H	V	V	N	.	.	.	.	6	
P86619.1	PLS-J6	<i>Phasmahyla jandaia</i>	1	.	.	S	.	.	.	.	A	.	.	.	.							I	A	.	1	
P84568.1	PLS-H3	<i>Pithecopus hypochondrialis</i>	1	.	.	S	.	.	.	.	A	.	N	.	V							.	A	.	1	
P86614.1	PLS-J1	<i>Phasmahyla jandaia</i>	1	.	.	S	.	.	.	.	A	.	N	.	.							.	I	A	.	1
P86620.1	PLS-J7	<i>Phasmahyla jandaia</i>	1	.	.	S	.	.	.	.	A	.	.	.	.							.	I	A	D	1
P86616.1	PLS-J3	<i>Phasmahyla jandaia</i>	1	.	.	S	.	.	.	.	A	.	N	.	.							.	I	A	.	1
P86618.1	PLS-J5	<i>Phasmahyla jandaia</i>	1	.	.	S	.	.	.	.	A	.	.	.	.							.	I	A	.	1
P86615.1	PLS-J2	<i>Phasmahyla jandaia</i>	1	.	.	S	.	.	.	.	A	.	N	.	.							.	I	A	D	1
P85447.1	PLS-8	<i>Phyllomedusa tomoptema</i>	1	.	.	S	.	.	.	.	A	.	N	.	V							.	.	.	.	1
P84904.1	PLS-H10	<i>Pithecopus hypochondrialis</i>	1	.	.	S	.	.	.	.	A	.	N	.	V							.	.	.	.	1

. = aminoácidos conservados, _=gaps añadidos para maximizar la alineación, subrayado = las regiones variables

Elaborado por: Briñoles, 2023

Con respecto al péptido PLS-SP3, la alineación de secuencias encontró mayor similitud con medusinas, algunas de estas anteriormente eran llamadas filoseptinas.

Tabla 3-3: Comparación de la secuencia de aminoácidos de PLS-SP3 con otros péptidos de acuerdo a BLAST/p (proteína-proteína) en la base de datos UniProt.

# Acceso	Péptido	Especie	Secuencia																		
	PLS-SP3	<i>Agalychnis spurrelli</i>	1	F	L	G	I	P	V	_	_	_	A	I	S	A	L	S	R	L	15
COHLE1.1	MDS-TR1	<i>Phyllomedusa trinitatis</i>	2	_	.	.	M	.	.	.	A	I	T	.	.	.	.	.	K	.	18
F7UI88.1	MDS-S1	<i>Phyllomedusa sauvagii</i>	50	_	.	.	M	.	.	.	A	I	S	.	.	.	.	.	K	.	66
A0A1M4BLT1.1	MDS-PT	<i>Phyllomedusa tarsius</i>	50	_	.	.	M	.	.	.	A	I	T	.	.	.	.	.	K	.	66
L0P402.1	MDS-H1	<i>Pithecopus hypochondrialis</i>	50	_	.	.	M	.	.	.	A	I	S	.	.	.	.	.	K	.	66
P86609.1	PjP5-1	<i>Phasmahyla jandaia</i>	2	_	.	.	M	.	.	.	_	_	_	.	.	.	.	_	_	_	11
P0DQK9.1	MDS-L1	<i>Agalychnis lemur</i>	2	_	.	.	M	.	.	.	L	A	I	S	.	.	.	.	K	.	18
L0P3K3.1	MDS-DA1	<i>Agalychnis dacnicolor</i>	51	_	.	.	M	.	.	.	L	_	_	.	.	.	.	I	.	S	64
L0P329.1	MDS-C1	<i>Agalychnis callidryas</i>	51	_	.	.	M	.	.	.	L	A	I	S	.	.	.	.	K	.	67
A0A5Q0MU22.1	MDS-AS	<i>Agalychnis spurrelli</i>	51	_	.	.	M	.	.	.	L	A	I	S	.	.	.	.	K	.	67
P84939.1	PLS-Az6	<i>Phithecopus azureus</i>	1	.	.	S	L	.	.	A	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	13

. = aminoácidos conservados, _=gaps añadidos para maximizar la alineación, subrayado = las regiones variables

Elaborado por: Briñoles, 2024

3.2. Purificación y síntesis de péptidos filoseptina CC1 y SP3 mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Se utilizaron 98,7 mg de péptido PLS-CC1 y 123,5mg de PLS-SP3 previamente

sintetizados por el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Regional Amazónica Ikiam con purezas iniciales de 56 % y 49 %, obtenida por RP-HPLC y las masas monoisotópicas experimentales de 1945.180 y 1568.966 Da., respectivamente, obtenidas mediante MALDI-TOF MS (Figura 1-3). El error relativo en la medición de la masa molecular para PLS-CC1 fue de -533.396 ppm en relación a la masa monoisotópica teórica de 1944.143 Da. y para PLS-SP3 de 14.659 ppm en relación a la masa monoisotópica teórica de 1568.989.

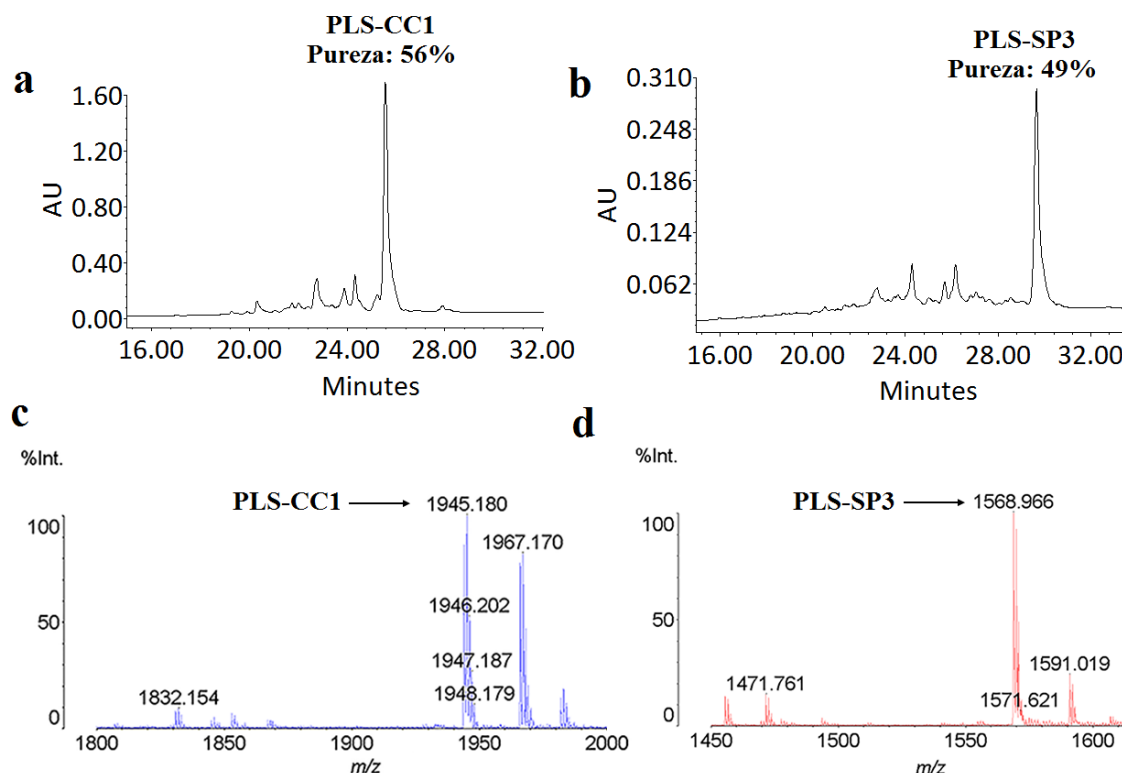


Figura 1-3: Verificación de pureza mediante HPLC de las filoseptinas sintetizadas, **a)** representa la pureza de la filoseptina CC1, y **b)** pureza de la filoseptina SP3. Identificación de la masa/carga mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS, **c)** pertenece a la PLS-CC1, y **d)** corresponde a la PLS-SP3.

Elaborado por: Briñoles, 2024.

Se logró obtener una cantidad de 15.7 mg de péptido PLS-CC1 y 14.5mg de PLS-SP3, con purezas de 96 y 98 %, purificadas mediante cromatografía líquida y analizadas por MALDI-TOF MS, visualizando las masas moleculares $[M + H^+] = 1944.110$ y 1568.948 Da., respectivamente (Figura 2). El error relativo en la medición de la masa para PLS-CC1 fue de 16.974 ppm en relación a la masa monoisotópica teórica de 1944.143 Da., y en PLS-SP3 fue de 26.131 ppm en relación a la masa teórica de 1568.989 Da. En PLS-CC1 la formación de aductos, como el sodio (Na) presento un error de -2.541 ppm con respecto a su masa teórica 1967.133 Da., y para el potasio (K) fue de -585.910 ppm en relación a su masa teórica de 1983.241 Da., mientras que los aductos de PLS-SP3

tuvieron un error relativo en la medición de las masas de -623.124 y -670.361 ppm en relación a sus masas teóricas de 1591.979 y 1608.087 Da., para Na y K, respectivamente.

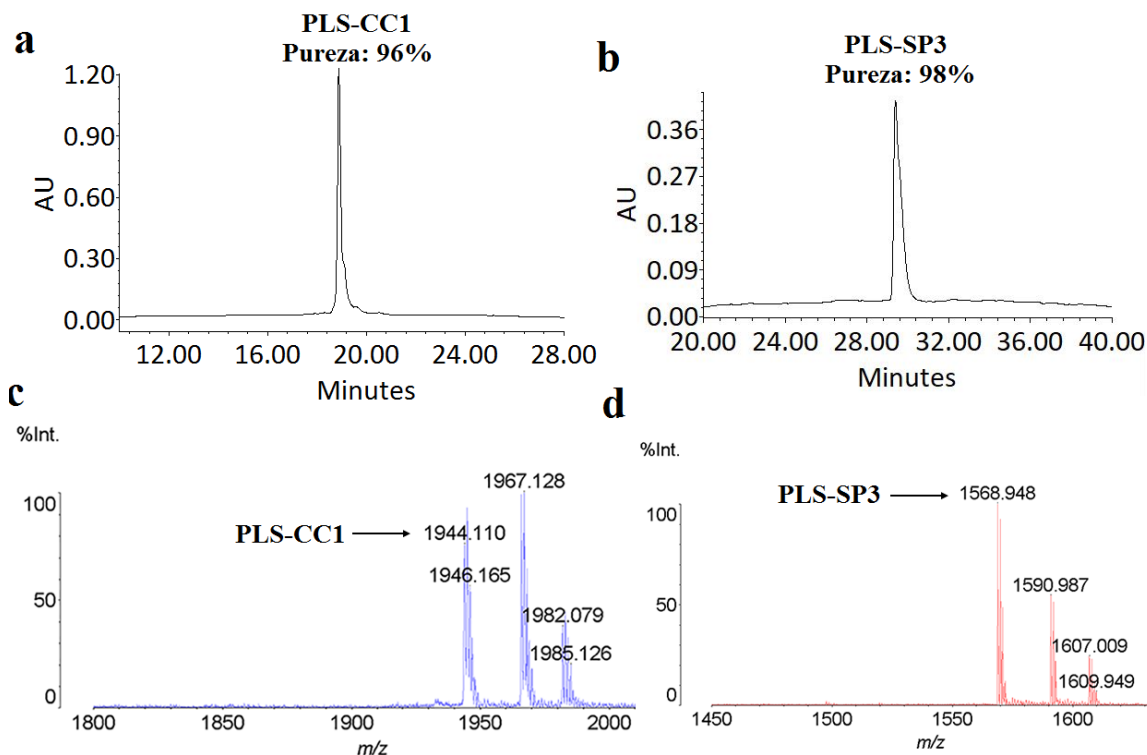


Figura 2-3: Verificación de pureza de las filoseptinas sintetizadas mediante HPLC, **a)** representa la pureza de la filoseptina CC1, y **b)** pureza de la filoseptina SP3. Identificación de la masa/carga mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS, **c)** pertenece a la PLS-CC1, y **d)** corresponde a la PLS-SP3.

Elaborado por: Briñoles, 2024

3.3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima

El péptido PLS-CC1 con 96 % de pureza presentó actividad inhibitoria mínima contra una bacteria Gram positivas, *S. aureus* a la concentración 8,23 μM (16 mg/L) y contra *C. albicans* a 32,93 μM (64 mg/L). Mientras que el péptido PLS-SP3 con 98 % de pureza mostró tener actividad inhibitoria contra las bacterias Gram positivas como *S. aureus* a 12,83 μM (32 mg/L) y *E. faecalis* a 51,43 μM (128 mg/L) respectivamente (Figura 3-3).

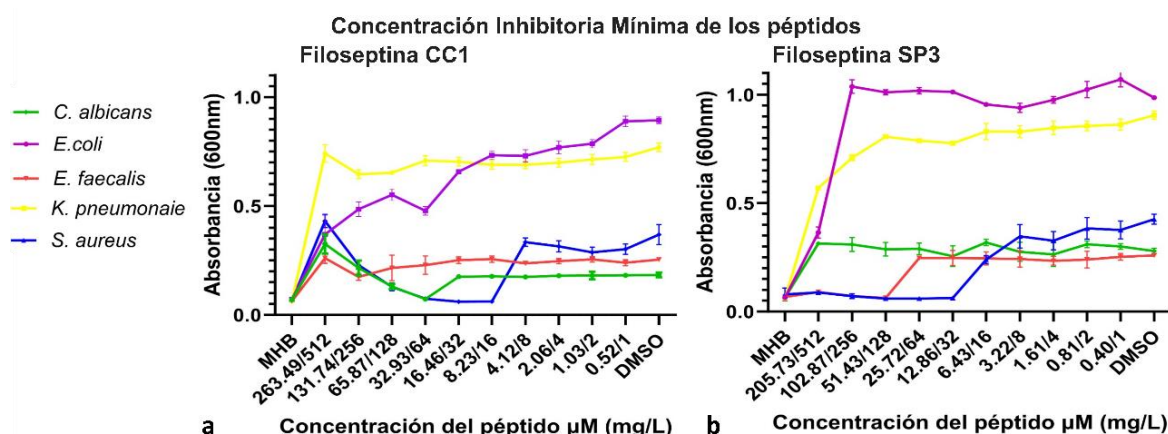


Figura 3-3: Concentración inhibitoria mínima de los péptidos PLS-CC1 y PLS-SP3 contra *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *K. pneumoniae* y *E. faecalis*. MHB (Mueller Hinton Broth) corresponde al blanco (sin crecimiento bacteriano) y DMSO (Dimetilsulfóxido) al control negativo (con crecimiento). a) pertenece a PLS-CC1 y b) pertenece a PLS-SP3.

Elaborado por: Briñoles, 2024.

3.4. Hemólisis

El péptido PLS-CC1 no presentó actividad hemolítica en las concentraciones de 18,08 μM (64 mg/L) y 4,51 μM (16 mg/L), mismas que tuvieron actividad contra *C. albicans* y *S. aureus* en los ensayos CIM. Mientras que el péptido PLS-SP3 presentó baja actividad hemolítica (2,5 %) en 12,86 μM (32mg/L) y (8,8 %) 51,43 μM (128 mg/L), concentraciones en las que hubo actividad contra *S. aureus* y *E. faecalis* respectivamente (Figura 4-3).

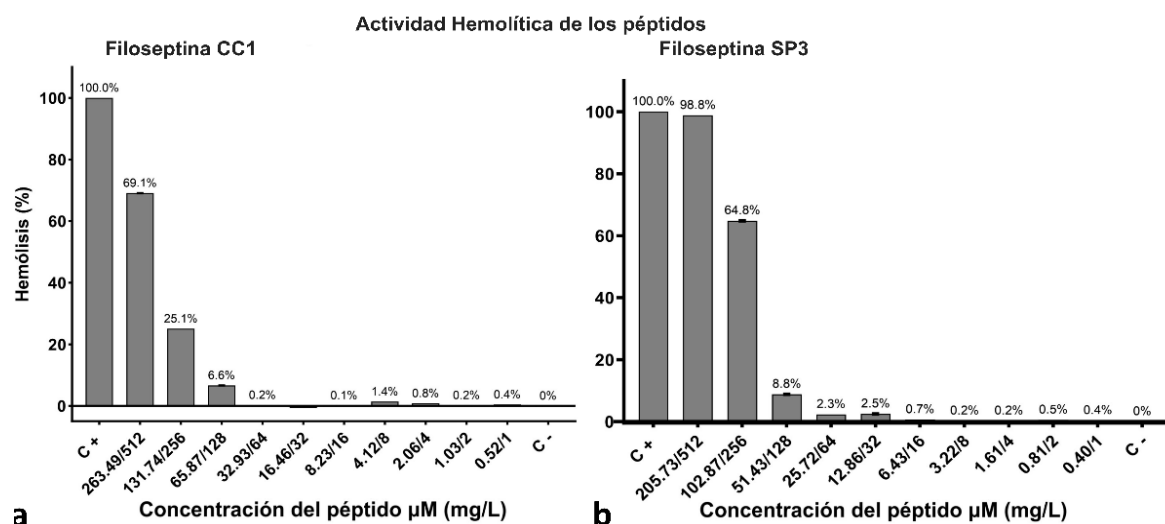


Figura 4-3: Actividad hemolítica de los péptidos sintéticos PLS-CC1 y PLS-SP3. C (+) corresponde al control positivo (Triton X-100) y C (-) al control negativo (PBS). En la parte superior de las barras se presentan los porcentajes de hemólisis para cada concentración y controles. a) pertenece

a PLS-CC1 y b) PLS-SP3.

Elaborado por: Briñoles, 2024.

3.5. Permeabilidad de la membrana bacteriana utilizando microscopía fluorescente.

La acción bactericida de las concentraciones de los péptidos sintéticos PLS-CC1 y PLS-SP3, obtenidas de los ensayos CIM contra *S. aureus*, fue confirmada mediante la técnica de fluorescencia utilizando Sytox Green y DAPI. Durante el ensayo, se pudo observar que la mayoría de las células de esta bacteria se tiñeron de color verde con las CIM de PLS-CC1 y PLS-SP3, lo cual indica alteraciones en la pared celular. Para validar estos resultados, se incluyó un control positivo utilizando ampicilina para asegurar el daño en las células de *S. aureus*, donde se observó una similar mayoría de células bacterianas teñidas con el colorante Sytox Green (Figura 5-3).

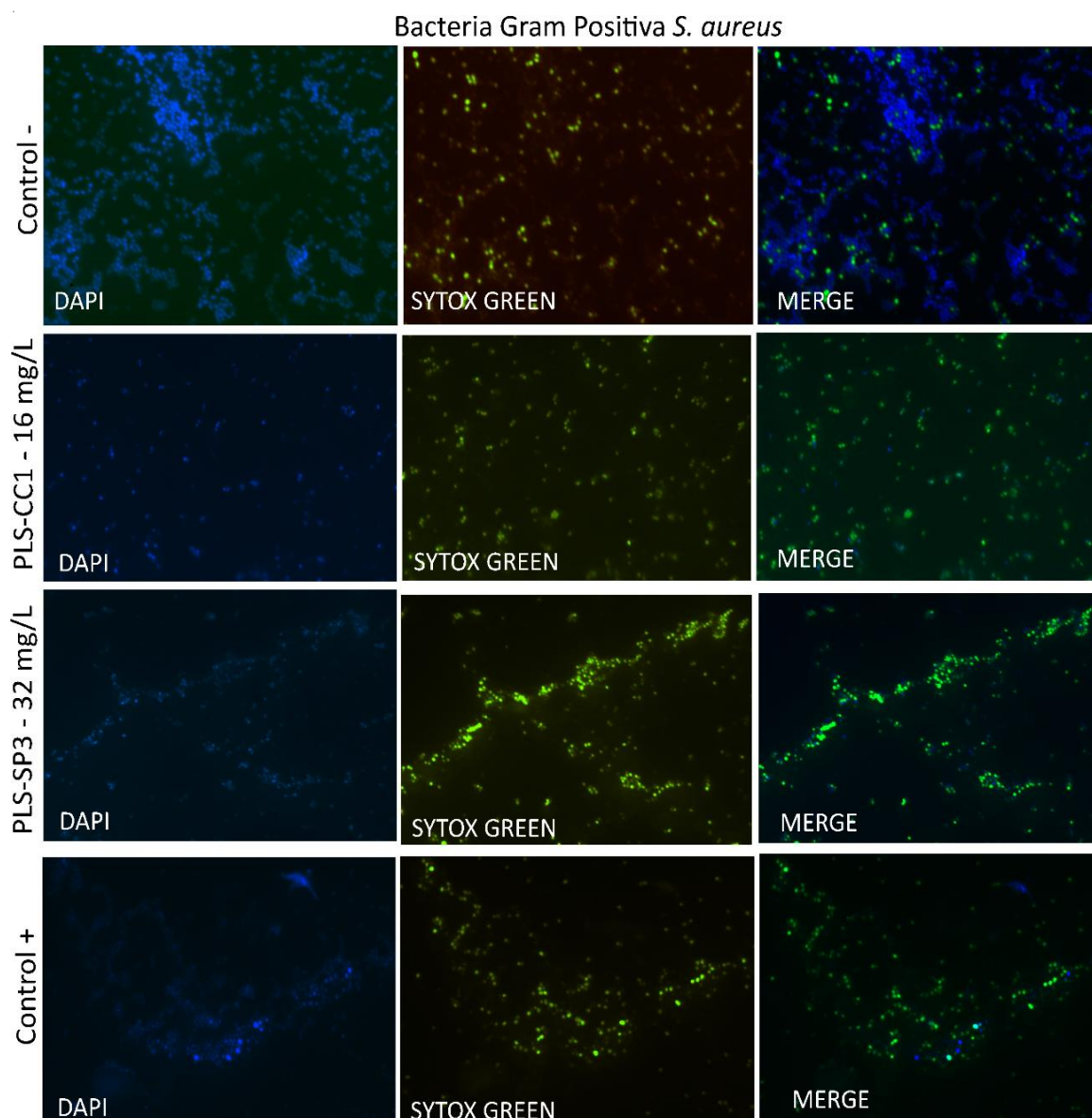


Figura 5-3: Microscopía fluorescente de los péptidos PLS-CC1 y PLS-SP3 contra *S. aureus*. El control positivo es ampicilina y el control negativo es DMSO.

Elaborado por: Briñoles, 2024

3.6. Índice de selectividad de los péptidos filoseptina CC1 y SP3.

Se realizó el índice de selectividad (SI) para ambos péptidos para caracterizar mejor su posible uso terapéutico. La actividad hemolítica sobre los eritrocitos humanos fue evaluados más a fondo mediante la determinación de HC_{50}/CIM_{50} valores y cálculo de índices de selectividad. Primero, en nuestras condiciones experimentales, se descubrió que PLS-CC1 y PLS-SP3 ejercen una fuerte actividad hemolítica contra los glóbulos rojos con un HC_{50} de 190,66 y 104,11 μ M resultante en un SI de 46,333 y 16,191, respectivamente, contra *S. aureus* (Tabla 4-3). El peptido PLS-SP3 tuvo un IS de 11,580

contra la levadura *C. albicans*.

Tabla 4-3: Índice de selectividad de los péptidos filoseptina CC1 y SP3.

Péptido	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
Filoseptina CC1	46,333	-	11,580
Filoseptina SP3	16,191	4,048	-

Elaborado por: Briñoles, 2024.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis bioinformático de los péptidos sintéticos PLS-CC1 y PLS-SP3.

Los péptidos PLS-CC1 y PLS-SP3 comparten entre sí características físico químicas similares como el momento hidrofóbico (0.420 y 0.488 μH), el porcentaje de residuos hidrofóbicos (61 - 66 %). También, se encontró que el péptido PLS-CC1 de la especie *C. calcarifer* comparte 73 % de identidad con el péptido filoseptina SP1 (PLS-SP1) de la especie *A. spurrelli* con un valor E más bajo ($5\text{e-}06$) y una cobertura de 100 %. El valor E representa la probabilidad de que un alineamiento con una puntuación determinada se produzca por casualidad. Esto quiere decir que cuanto menor sea el valor E, más significativo será el alineamiento [25]. La alineación de secuencia del péptido PLS-CC1 con las demás filoseptinas muestran sustituciones de 4 y 5 aminoácidos respectivamente, pero comparten el N-secuencia terminal FL-, una H en la posición 7 y la amidación C-terminal, que son las principales características de filoseptinas [15]. Las sustituciones en la secuencia de aminoácidos pueden variar la actividad biológica que tiene cada uno de los péptidos [26]

Con respecto al péptido PLS-SP3 de *A. spurrelli*, este compartió 71 % de identidad con el péptido medusina TR1 de la especie *P. trinitatis* con el valor E más bajo (0.025) y cobertura de 93 %. Todas las similitudes de este péptido son péptidos medusinas provenientes de diferentes especies y algunas de estas, eran conocidas anteriormente como filoseptinas. Cabe recalcar que el péptido filoseptina SP3 comparte el N-secuencia terminal FL-, y la amidación C-terminal, que son las características de filoseptinas [15].

4.2. Actividad biológica y hemolítica de los péptidos sintéticos PLS-CC1 y PLS-SP3.

Findlay, B. y colaboradores en 2010, mencionan que las bacterias Gram negativas se caracterizan por poseer una membrana externa adicional y postulan que los péptidos catiónicos interactúan con la superficie altamente negativa de dicha membrana [22]. Este proceso conlleva el desplazamiento de iones de magnesio, responsables de neutralizar parcialmente la carga negativa, predominante en el lipopolisacárido glicolípido aniónico que ocupa la monocapa externa de la membrana externa [27]. La

elevada carga negativa es, entonces, mitigada por el péptido catiónico, ya sea mediante una fuerte unión al lipopolisacárido o neutralizando la carga en un área específica de la membrana externa y la inserción y translocación del péptido a través de la bicapa resultan fundamentales para la interacción con la membrana externa que sirve como mecanismo selectivo contra bacterias Gram negativas [22,28].

Cuando los péptidos antimicrobianos, como PLS-CC1 con carga +1 y PLS-SP3 con carga +2, superan la membrana externa o la gruesa pared celular de bacterias Gram positivas, se aproximan a la membrana citoplasmática [29]. La carga positiva de los péptidos catiónicos les permite interactuar con la superficie aniónica de la membrana citoplasmática, mientras que su hidrofobicidad les permite insertarse en la interfaz de grupos hidrofílicos y cadenas aciladas de fosfolípidos [22,28].

Las propiedades fisicoquímicas de los péptidos antimicrobianos que le permiten acoplarse a la membrana bacteriana son la carga, la anfipaticidad, la hidrofobicidad y la capacidad de unión al hidrogeno [22]. Esto, debido a que el péptido experimenta un cambio estructural al momento de entrar en contacto con la membrana bacteriana y este cambio resulta en una anfipaticidad por la segregación de residuos apolares y polares permitiendo la perturbación de la membrana [30]. La hidrofobicidad es necesaria para la inserción y alteración de la membrana debido a que la existencia de aminoácidos hidrófobos refuerza la participación en las membranas [31]. En el caso de las bacterias Gram positivas, la base de datos de péptidos antimicrobianos alberga una amplia variedad de péptidos de distintas especies y una proporción considerable de estos péptidos exhiben actividad específica contra bacterias Gram positivas, presentando entre 60 a 70 % de residuos hidrófobos, como es el caso de PLS-CC1, con un 61 %, y PLS-SP3, con un 66 % de tales residuos, facilitando la translocación de los péptidos a través de la membrana externa de la bacteria [28]. No obstante, se concuerda en que la carga positiva del péptido es crucial para la unión inicial a la superficie de la membrana bacteriana [29].

En este caso, el péptido PLS-CC1 con 61 % de aminoácidos hidrofóbicos y carga neta +1 presentó actividad contra *S. aureus* (CIM 16.46 μ M), y *C. albicans* (CIM 32.63 μ M), pero no contra *E. faecalis* (bacteria Gram positiva al igual que *S. aureus*). Este péptido no exhibió actividad hemolítica (0.1 – 0.2%) respectivamente en las concentraciones que presentan inhibición. Mientras que, el péptido PLS-SP3 posee un porcentaje de residuos hidrofóbicos de 66 % y una carga neta +2 que le proporcionó la actividad

contra bacterias Gram positivas como *S. aureus* (CIM 12.86 μM) y *E. faecalis* (CIM 51.43 μM). A diferencia del péptido PLS-CC1, el péptido PLS-SP3 presentó un bajo efecto hemolítico (2.5 – 8.8 %). La diferencia en la carga neta, composición de aminoácidos y toxicidad selectiva entre los péptidos PLS-CC1 y PLS-SP3 podría ser determinante en la variación de sus actividades antimicrobianas. Aunque ambos péptidos tienen una carga neta positiva, la magnitud de esta carga difiere, siendo +1 para PLS-CC1 y +2 para PLS-SP3. Esta variación en la carga puede influir en la interacción con las membranas celulares de microorganismos, afectando la eficacia antimicrobiana [26]. Además, la composición específica de aminoácidos en las secuencias de ambos péptidos puede determinar su afinidad por diferentes componentes celulares, contribuyendo a la selectividad contra bacterias Gram positivas específicas [32]. Por otra parte, la toxicidad selectiva, representada por la actividad hemolítica, también diverge entre los péptidos. La presencia de aminoácidos particulares y su disposición en la estructura de los péptidos puede influir en la interacción con las células hospedadoras, lo que se traduce en distintos niveles de toxicidad [33]. En conjunto, estas variaciones en la carga neta, composición de aminoácidos y toxicidad selectiva contribuyen a las diferencias observadas en las actividades antimicrobianas de PLS-CC1 y PLS-SP3, incluso cuando comparten similitudes en otras características.

La actividad del péptido catiónico PLS-CC1 contra microorganismos como *S. aureus* y *C. albicans* puede estar relacionada con la composición de la membrana celular de estos microorganismos. Los polisacáridos presentes en la estructura celular, como el manano, glucano y quitina en el caso de *C. albicans*, al ser cargados negativamente, pueden atraer a los péptidos catiónicos, facilitando su unión a la membrana celular [34]. Lo mismo ocurre en la pared celular de *S. aureus*, que posee peptidoglucanos cargados negativamente y ácido teicoico, que es un polímero de carga negativa que puede interactuar con los péptidos catiónicos a través de interacciones electrostáticas [35]. Estas interacciones pueden perturbar la integridad de la membrana, llevando a la permeabilización y, en última instancia, a la muerte de los microorganismos [32]. Por otro lado, *E. faecalis* tiene una pared celular con antígenos del grupo D y una gran cantidad de mureína y ácido teicoico, lo que podría dificultar la interacción con el péptido PLS-CC1 [36]. El estudio de Li et al. (2019) menciona que los péptidos antimicrobianos pueden tener diferentes mecanismos de acción contra diferentes microorganismos, lo que podría explicar la selectividad del péptido contra *S. aureus* y *C. albicans*, pero no contra *E. faecalis* [10]. Además, la presencia de otros

componentes en el medio de cultivo, como los nutrientes, el pH y la presencia de iones, pueden influir en la actividad de los péptidos. En especial la presencia de iones en el medio de cultivo, que pueden afectar la carga de los péptidos y su capacidad para interactuar con la membrana celular de los microorganismos [37].

La evaluación de la actividad hemolítica desempeña un papel crucial en la determinación de la toxicidad de los péptidos antimicrobianos PLS-CC1 y PLS-SP3, siendo un factor determinante para su potencial aplicación terapéutica en humanos. La capacidad de un péptido antimicrobiano de no ser hemolítico implica su habilidad para atacar selectivamente las membranas de los microorganismos, preservando la integridad de las membranas de los glóbulos rojos [33,38]. En este estudio, los resultados revelaron una actividad hemolítica nula y baja para PLS-CC1 y PLS-SP3, respectivamente, posicionándolos como prometedores candidatos terapéuticos. La evaluación de hemólisis representa la medida inicial más comúnmente empleada al evaluar péptidos antimicrobianos destinados a combatir patógenos humanos y bacterias estándar [39,40].

4.3. Permeabilidad de la membrana bacteriana.

Los resultados del CIM de los péptidos PLS-CC1 y PLS-SP3 contra *S. aureus* se evaluaron utilizando DAPI y Sytox Green. En este caso, ambos péptidos mostraron una actividad similar, como se evidenció por la presencia predominante del tinte Sytox Green (Figura 5-3). Este tinte es impermeable a las células vivas, pero puede penetrar en células con membranas comprometidas, como células muertas o bacterias con membranas dañadas, donde se une al ADN y emite fluorescencia verde [41]. Estos resultados de las concentraciones de los péptidos son similares al control positivo con ampicilina, que confirma la actividad contra *S. aureus*. Se comprueba así la actividad que estos péptidos tienen contra *S. aureus*. Por otro lado, el tinte DAPI se une al ADN y emite fluorescencia; las bacterias que no están comprometidas se tiñen de color azul [42], como se observa en el control negativo con DMSO, para bacterias vivas.

En un ensayo de permeabilidad, cuando hay actividad bactericida que resulta en daño en la membrana bacteriana, estos tintes pueden penetrar en las bacterias, unirse al ADN y emitir fluorescencia, lo que indica la presencia de bacterias con membranas comprometidas o dañadas. Por lo tanto, la presencia de fluorescencia causada por la unión de estos tintes al ADN bacteriano en un ensayo de permeabilidad indica la

permeabilización de la membrana bacteriana, lo que sugiere actividad bactericida [43,44].

4.4. Índice de selectividad de los péptidos filoseptina CC1 y SP3.

El péptido filoseptina CC1 exhibió un índice de selectividad de 46.333 contra *S. aureus* y 11.580 contra *C. albicans*. Por otro lado, el péptido filoseptina SP3 mostró un índice de selectividad de 4.048 contra *E. faecalis* y 16.191 contra *S. aureus*. Estos resultados indican una diferencia significativa en la selectividad de los péptidos contra los microorganismos evaluados. Los péptidos filoseptina CC1 y SP3 muestran índices de selectividad relativamente altos, lo que sugiere una mayor especificidad en su actividad antimicrobiana.

Según Indrayanto y colaboradores en 2021, mencionan criterios de aceptación del índice de selectividad (SI) para muestras bioactivas. Por ejemplo, se propuso un valor mínimo de $SI \geq 10$ para considerar una muestra bioactiva selectiva. Se destacó que un SI mayor a 10 es deseable para un índice terapéutico efectivo [45]. Los resultados obtenidos para el péptido PLS-CC1 y PLS-SP3 contra *S.aureus* (46.333 – 16.577) muestra que cumplen con este criterio de aceptación, lo que respalda su potencial como agentes antimicrobianos selectivos.

Es importante tener en cuenta que la interpretación de los valores de SI varía entre diferentes publicaciones. Por ejemplo, según Famuyide y colaboradores en 2019, si un $SI > 1$ podría considerarse como indicativo de actividad bioactiva y no tóxica [46], mientras que otros investigadores, como Nogueira y Estólio do Rosário, sugieren que el SI no debería ser inferior a 2[47]. Esta variabilidad en los criterios de aceptación del SI destaca la necesidad de realizar más investigaciones para determinar el valor mínimo aceptable de SI y mejorar la selectividad de las muestras bioactivas [45].

En comparación con los valores de SI mencionados, se observa que los péptidos filoseptina CC1 y SP3 exhiben índices de selectividad significativamente altos, lo que sugiere una mayor especificidad en su actividad antimicrobiana. Estos resultados respaldan la utilidad potencial de los péptidos como agentes antimicrobianos selectivos y destacan la importancia de considerar el SI en la evaluación de la actividad bioactiva de diversas muestras.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La presente investigación se centró en la evaluación de los péptidos PLS-CC1 y PLS-SP3, descubiertos recientemente en dos especies de anfibios. Se constató que PLS-CC1 comparte un 73 % de identidad con péptidos de la familia filoseptina, mientras que PLS-SP3 exhibe un 71 % de similitud con péptidos de la familia medusinas. El análisis bioinformático reveló que tanto PLS-CC1 como PLS-SP3 poseen una estructura α -hélice anfipática, con un porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos superior al 61% y cargas netas de +1 y +2, respectivamente. Estas características fisicoquímicas son cruciales para comprender el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos, específicamente de las filoseptinas CC1 y SP3 en este contexto. La integración de datos experimentales y bioinformáticos proporciona una visión comprehensiva de las propiedades estructurales y funcionales de estos péptidos, abriendo perspectivas para futuras investigaciones y el diseño racional de agentes antimicrobianos innovadores basados en péptidos.

En esta investigación, se demuestra que los péptidos PLS-CC1 y PLS-SP3 podrían ser agentes terapéuticos novedosos. Por su actividad contra microorganismos de importancia mundial como lo son *S. aureus*, *E. faecalis* y *C. albicans*. También, por su baja o nula actividad hemolítica. Sin embargo, es necesario realizar más ensayos sobre el mecanismo de acción de estos péptidos, comparar la eficacia con otros antibióticos comerciales para evaluar la selectividad de estos y determinar su capacidad para atacar selectivamente a las bacterias patógenas sin afectar negativamente a las células huésped. Esta comparación proporcionaría información valiosa sobre la capacidad relativa de los péptidos para combatir microorganismos en comparación con tratamientos estándar ampliamente utilizados.

Además, analizar las características físico-químicas asociadas con la actividad antimicrobiana permitiría identificar las propiedades específicas de los péptidos que podrían influir en su selectividad. Esto podría incluir aspectos como la carga neta, la composición de aminoácidos, la estructura tridimensional y la interacción con las membranas celulares. En última instancia, entender cómo estas características se relacionan con la eficacia y la selectividad de los péptidos podría guiar el diseño de péptidos antimicrobianos más efectivos y específicos en el futuro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Savage B, Maldonado H, May U, Vahatupa M, Barker H, Badiani R, et al. Systemically administered wound-homing peptide accelerates wound healing by modulating syndecan-4 function. *Journal of Orthopaedic Research*. 2017;35. Available: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1546533/v1>
2. Hancock RE. Cationic peptides: Effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infectious Diseases*. 2001. doi:10.1016/S1473-3099(01)00092-5
3. Nascimento AC, Fontes W, Sebben A, Castro M. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein Pept Lett*. 2003;10: 227–238. doi:10.2174/0929866033478933
4. Skibbska A, Perlikowska R. Signal Peptides - Promising Ingredients in Cosmetics. *Curr Protein Pept Sci*. 2021;22: 716–728. doi:10.2174/1389203722666210812121129
5. Wojciech Kamysz. Are antimicrobial peptides an alternative for conventional antibiotics? *Nucl Med Rev Cent East Eur*. 2005;8: 78–86. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15977155/#full-view-affiliation-1>
6. Kordi M, Borzouyi Z, Chitsaz S, Asmaei M hadi, Salami R, Tabarzad M. Antimicrobial peptides with anticancer activity: Today status, trends and their computational design. *Arch Biochem Biophys*. 2023;733. doi:10.1016/J.ABB.2022.109484
7. Ghosh C, Sarkar P, Issa R, Halder J. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends Microbiol*. 2019;27: 323–338. doi:10.1016/J.TIM.2018.12.010
8. Sumi CD, Yang BW, Yeo IC, Hahm YT. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Can J Microbiol*. 2015;61: 93–103. doi:10.1139/CJM-2014-0613
9. Huang Y, Huang J, Chen Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function. *Protein and Cell*. 2010. doi:10.1007/s13238-010-0004-3
10. Li X, Zuo S, Wang B, Zhang K, Wang Y. Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. *Molecules*. 2022;27. doi:10.3390/MOLECULES27092675
11. Kang HK, Kim C, Seo CH, Park Y. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *Journal of Microbiology*. 2017;55. doi:10.1007/s12275-017-6452-1
12. Proaño-Bolaños C, Zhou M, Wang L, Coloma LA, Chen T, Shaw C. Peptidomic approach identifies cruzioseptins, a new family of potent antimicrobial peptides in the splendid leaf frog, *Cruziohyla calcarifer*. *J Proteomics*. 2016;146. doi:10.1016/j.jprot.2016.06.017
13. Proaño-Bolaños C, Blasco-Zúñiga A, Almeida JR, Wang L, Llumiquinga MA, Rivera M, et al. Unravelling the skin secretion peptides of the gliding leaf frog, *Agalychnis saltator* (hylidae). *Biomolecules*. 2019;9. doi:10.3390/biom9110667
14. Abdel-Wahab YHA, Power GJ, Platt PR, Woodhams DC, Rollins-Smith LA, Conlon JM. A peptide of the phylloseptin family from the skin of the frog *Hylomantis lemur* (Phyllomedusinae) with potent in vitro and in vivo insulin-releasing activity. *Peptides (NY)*. 2008;29. doi:10.1016/j.peptides.2008.09.006
15. Leite JRSA, Silva LP, Rodrigues MIS, Prates M V., Brand GD, Lacava BM, et al. Phylloseptins: A novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides (NY)*. 2005;26. doi:10.1016/j.peptides.2004.11.002
16. Gao Y, Wu D, Xi X, Wu Y, Ma C, Zhou M, et al. Identification and characterisation of the antimicrobial peptide, phylloseptin-PT, from the skin secretion of *Phyllomedusa tarsius*, and comparison of activity with designed, cationicity-enhanced analogues and diastereomers. *Molecules*. 2016;21. doi:10.3390/molecules21121667

17. Organización Panamericana de la Salud. Un informe pone de relieve el aumento de la resistencia a los antibióticos en infecciones bacterianas que afectan al ser humano y la necesidad de mejorar los datos al respecto. 2022. Available: <https://www.paho.org/es/noticias/9-12-2022-informe-pone-relieve-aumento-resistencia-antibioticos-infecciones-bacterianas>
18. Vaca S, Cruz S, Iñiguez S. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en el personal de salud de un Hospital de Especialidades en Quito-Ecuador. *Revista San Gregorio*. 2021;1.
19. Maldonado N, Castro B, Berrio I, Manjarrés M, Robledo C, Robledo J. Resistencia a ertapenem en 2 instituciones hospitalarias de alto nivel de complejidad: microbiología, epidemiología y factores de riesgo. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35: 511–515. doi:10.1016/J.EIMC.2015.11.009
20. Solís MB, Romo S, Granja M, Sarasti JJ, Paz y Miño A, Zurita J. Infección comunitaria del tracto urinario por *Escherichia coli* en la era de resistencia antibiótica en Ecuador. *Metro Ciencia*. 2022;30: 37–48. doi:10.47464/metrociencia/vol30/1/2022/37-48
21. Aracil-García B, Oteo-Iglesias J, Cuevas-Lobato Ó, Lara-Fuella N, Pérez-Grajera I, Fernández-Romero S, et al. Rápido aumento de la resistencia a cefalosporinas de 3a generación, imipenem y de la corresponsencia en 7.140 aislados de *Klebsiella pneumoniae* en hemocultivos (2010-2014) según datos de EARS-Net en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35: 480–486. doi:10.1016/J.EIMC.2016.06.007
22. Findlay B, Zhanel GG, Schweizer F. Cationic Amphiphiles, a New Generation of Antimicrobials Inspired by the Natural Antimicrobial Peptide Scaffold. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54: 4049. doi:10.1128/AAC.00530-10
23. Ranade SS, Ramalingam R. In silico study on pH-based alanine scanning of Phylloseptin-2 helps determine potential mutant sites for futuristic therapeutic analogues. *Mol Simul*. 2020;46. doi:10.1080/08927022.2020.1804563
24. Casanova M, Maresca M, Poncin I, Point V, Olleik H, Boidin-Wichlacz C, et al. Promising antibacterial efficacy of arenicin peptides against the emerging opportunistic pathogen *Mycobacterium abscessus*. *J Biomed Sci*. 2024;31. doi:10.1186/s12929-024-01007-8
25. Lobo I. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). *Nature Education*. O'Reilly; 2008.
26. Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*. 2018;8. doi:10.3390/BIOM8010004
27. Liu J, Wu Q, Li L, Xi X, Wu D, Zhou M, et al. Discovery of phylloseptins that defense against gram-positive bacteria and inhibit the proliferation of the non-small cell lung cancer cell line, from the skin secretions of phyllomedusa frogs. *Molecules*. 2017;22. doi:10.3390/molecules22091428
28. Malanovic N, Lohner K. Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals*. 2016;9. doi:10.3390/PH9030059
29. Malanovic N, Lohner K, Wang G. Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. 2016 [cited 18 Dec 2023]. doi:10.3390/ph9030059
30. Melo MN, Ferre R, Castanho MARB. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7: 245–250. doi:10.1038/NRMICRO2095
31. Liu Y, Du Q, Ma C, Xi X, Wang L, Zhou M, et al. Structure–activity relationship of an antimicrobial peptide, phylloseptin-PHA: Balance of hydrophobicity and charge determines the selectivity of bioactivities. *Drug Des Devel Ther*. 2019;13. doi:10.2147/DDDT.S191072
32. Assoni L, Milani B, Carvalho MR, Nepomuceno LN, Waz NT, Guerra MES, et al. Resistance

- Mechanisms to Antimicrobial Peptides in Gram-Positive Bacteria. *Front Microbiol.* 2020;11. doi:10.3389/FMICB.2020.593215
33. Greco I, Molchanova N, Holmedal E, Jenssen H, Hummel BD, Watts JL, et al. Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Sci Rep.* 2020;10. doi:10.1038/s41598-020-69995-9
 34. Algunas consideraciones sobre *Candida Albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta Odontol Venez.* 2002;40: 9–17. Available: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652002000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 35. Hurtado MP, de la Parte MA, Brito A. *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.* 2002;22: 112–118. Available: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562002000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 36. Rouchon CN, Harris J, Zubair-Nizami Z, Weinstein AJ, Roky M, Frank KL. The Cationic Antimicrobial Peptide Activity of Lysozyme Reduces Viable *Enterococcus faecalis* Cells in Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022;66. doi:10.1128/AAC.02339-21
 37. Peterson E, Kaur P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front Microbiol.* 2018;9: 426686. doi:10.3389/FMICB.2018.02928/BIBTEX
 38. Kravchenko S V, Domnin PA, Grishin SY, Vershinin NA, Gurina E V, Zakharova AA, et al. Enhancing the Antimicrobial Properties of Peptides through Cell-Penetrating Peptide Conjugation: A Comprehensive Assessment. *Int J Mol Sci.* 2023;24. doi:10.3390/ijms242316723
 39. Wolfgang MC, Martin Dozois C, Schmelcher M, Zurich E, Mahlapuu margitmahlapuu M, Mahlapuu M, et al. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* | www.frontiersin.org. 2016;6: 194. doi:10.3389/fcimb.2016.00194
 40. Moghadam MT, Mojtahedi A, Moghaddam MM, Fasihi-Ramandi M, Mirnejad R. Rescuing humanity by antimicrobial peptides against colistin-resistant bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2022. doi:10.1007/s00253-022-11940-z
 41. Lebaron P, Catala P, Parthuisot N. Effectiveness of SYTOX green stain for bacterial viability assessment. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64: 2697–2700. doi:10.1128/AEM.64.7.2697-2700.1998/ASSET/E4F8ACF0-F024-415E-944F-2241390067B6/ASSETS/GRAPHIC/AM0780074003.JPEG
 42. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotechnic & Histochemistry.* 1995;70: 220–233. doi:10.3109/10520299509108199
 43. Chung PY, Khanum R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *J Microbiol Immunol Infect.* 2017;50: 405–410. doi:10.1016/J.JMII.2016.12.005
 44. Vineeth Kumar T, Asha R, George S. Investigations on the membrane interaction of C-terminally amidated esculentin-2 HYba1 and 2 peptides against bacteria. *Anim Biotechnol.* 2021;32: 137–146. doi:10.1080/10495398.2019.1668402
 45. Indrayanto G, Putra GS, Suhud F. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol.* 2021;46: 273–307. doi:10.1016/BS.PODRM.2020.07.005
 46. Famuyide IM, Aro AO, Fasina FO, Eloff JN, McGaw LJ. Antibacterial and antibiofilm activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated south African *Eugenia* and *Syzygium* (Myrtaceae)

species and their selectivity indices. BMC Complement Altern Med. 2019;19: 1–13. doi:10.1186/S12906-019-2547-Z/FIGURES/3

47. Nogueira F, Rosário VE do. Methods for assessment of antimalarial activity in the different phases of the Plasmodium life cycle. Rev Panamazonica Saude. 2010;1: 109–124. doi:10.5123/S2176-62232010000300015