



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

DÁRIO RYAN ARRUDA LOPES MOURÃO

**PROSPECÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE
NICOTIANA SP COMO ALTERNATIVA AOS ANTIBIÓTICOS CONVENCIONAIS**

FORTALEZA
2026

DÁRIO RYAN ARRUDA LOPES MOURÃO

PROSPECÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE *NICOTIANA*
SP COMO ALTERNATIVA AOS ANTIBIÓTICOS CONVENCIONAIS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica.
Área de concentração: Bioquímica vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas.

FORTALEZA

2026

DÁRIO RYAN ARRUDA LOPES MOURÃO

PROSPECÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE *NICOTIANA*
SP COMO ALTERNATIVA AOS ANTIBIÓTICOS CONVENCIONAIS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica vegetal.

Aprovado em: 24/02/2026

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dra. Denise Hissa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveiras
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, pela oportunidade de formação e pelo apoio ao meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu orientador, Professor Cleverson, pela disponibilidade constante, pelo apoio ao longo do desenvolvimento deste trabalho e pelas oportunidades proporcionadas. Agradeço também pela orientação segura, e pela confiança depositada em mim durante toda a trajetória.

Aos meus pais Maria do Socorro e Edson Mourão por sempre me apoiarem a estudar cada vez mais e serem ótimos exemplos de vida, não medindo esforços para que eu pudesse seguir meu próprio caminho.

Ao meu Irmão Italo por sempre ter ficado com o trabalho pesado e me possibilitado seguir meu caminho. Sempre tive muita admiração por você, herdou a melhor parte dos nossos pais.

Aos meus familiares, em especial aos meus tios Ruberval e Roderval, pelo exemplo que sempre representaram e pelos ensinamentos transmitidos ao longo da minha trajetória.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia e de Proteases Vegetais (LBPV) em especial: Ariel, Mariana, Viviane e Ricardo por sempre estarem presente e facilitar a jornada, compartilhar essa fase com vocês foi uma experiência muito gratificante.

Em especial ao meu amigo João Neto e a Doutora Queilane por sempre me ajudarem no que fosse possível e todos os debates e conversas sobre os mais variados temas, sem vocês o trabalho não teria recebido os elogios que recebeu.

Aos meus amigos desde a época do colégio — Welligton, Emanuel, Vitor, Felipe e Neto — pelos momentos de descontração, pelas conversas sinceras e pelas reflexões (nem sempre conclusivas).

Aos meus amigos da faculdade: Elisa e Caroline, do qual compartilhar a profissão e o amor pela pesquisa me fizeram seguir em frente.

E a minha Namorada Estefany, por sempre estar ao meu lado e me ajudar no que fosse necessário, por deixar a vida mais leve, não consigo descrever em palavras a importância que você teve neste momento da minha vida.

RESUMO

A resistência bacteriana aos antibióticos convencionais constitui um dos principais desafios da saúde pública, impulsionando a busca por novas estratégias terapêuticas. Nesse contexto, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) destacam-se como candidatos promissores devido à sua diversidade estrutural e aos mecanismos de ação distintos. Seis peptídeos naturais (Pep 1- 6) previamente identificados no néctar floral de uma espécie de *Nicotiana*, extraídos, purificados por técnicas cromatográficas e caracterizados por espectrometria de massas, foram avaliados quanto à atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, por meio de ensaios de concentração inibitória mínima (CIM). Entre eles, apenas o Pep6 (denominado posteriormente Nicotianin-I, NI) apresentou atividade inibitória e, embora moderada, foi selecionado como molécula modelo para modificações estruturais por desenho racional. As modificações originaram dois análogos bioinspirados, NI-A e NI-B, com atividade antibacteriana significativamente superior ao peptídeo precursor. Mecanicamente, NI-A apresentou maior permeabilização de membrana, especialmente contra *S. epidermidis*, enquanto NI-B induziu elevada produção de espécies reativas de oxigênio em *K. pneumoniae*, associada a danos morfológicos. Ambos demonstraram maior afinidade pela membrana bacteriana, atribuída ao fortalecimento das interações eletrostáticas. Estruturalmente, NI-A e NI-B adotaram conformação de α -hélice em ambientes miméticos de membrana e permaneceram desordenados em meio aquoso. Nos ensaios de hemólise, NI-A apresentou efeito dependente da concentração, enquanto NI-B não demonstrou hemólise significativa, indicando maior seletividade. Em conjunto, os resultados evidenciam que a modificação racional de peptídeos derivados do néctar de *Nicotiana* possibilitou a obtenção de análogos com maior eficácia antibacteriana e perfis diferenciados de toxicidade, reforçando seu potencial como protótipos para o desenvolvimento de novas terapias contra infecções bacterianas resistentes.

Palavras-chaves: mecanismos de ação; modificação racional; peptídeos antimicrobianos; resistência.

ABSTRACT

Bacterial resistance to conventional antibiotics is one of the main challenges facing public health, driving the search for new therapeutic strategies. In this context, antimicrobial peptides (AMPs) stand out as promising candidates due to their structural diversity and distinct mechanisms of action. Six natural peptides (Pep 1-6) previously identified in the floral nectar of a species of *Nicotiana*, extracted, purified by chromatographic techniques, and characterized by mass spectrometry, were evaluated for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* through inhibitory concentration assays. *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* using minimum inhibitory concentration (MIC) assays. Among them, only Pep6 (later named Nicotianin-I, NI) showed inhibitory activity and, although moderate, was selected as a model molecule for structural modifications by rational design. The modifications resulted in two bioinspired analogues, NI-A and NI-B, with significantly higher antibacterial activity than the precursor peptide. Mechanistically, NI-A showed greater membrane permeabilization, especially against *S. epidermidis*, while NI-B induced high production of reactive oxygen species in *K. pneumoniae*, associated with morphological damage. Both showed greater affinity for the bacterial membrane, attributed to the strengthening of electrostatic interactions. Structurally, NI-A and NI-B adopted an α -helix conformation in membrane-mimetic environments and remained disordered in aqueous media. In hemolysis assays, NI-A showed a concentration-dependent effect, while NI-B did not show significant hemolysis, indicating greater selectivity. Together, the results show that the rational modification of peptides derived from *Nicotiana* nectar made it possible to obtain analogues with greater antibacterial efficacy and differentiated toxicity profiles, reinforcing their potential as prototypes for the development of new therapies against resistant bacterial infections.

Keywords: mechanisms of action; rational modification; antimicrobial peptides (AMPs); resistance.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	8
2	HIPOTESE	10
3	OBJETIVOS	11
3.1	<i>Objetivo geral</i>	11
3.2	<i>Objetivos específicos</i>	11
4	REFERENCIAL TEORICO	12
4.1	Infecções bacterianas na saúde humana	12
4.1.1	<i>Infecções causadas por bactérias gram-positivas</i>	12
4.1.2	<i>Infecções causadas por bactérias gram-negativas</i>	13
4.2	Pesquisa e desenvolvimento de agentes antimicrobianos alternativos	15
4.3	Peptídeos antimicrobianos	16
4.3.1	<i>Peptídeos antimicrobianos características e propriedades</i>	16
4.3.2	<i>Mecanismos de ação dos PAMs sobre membranas bacterianas</i>	18
4.3.3	<i>Mecanismos de ação não relacionados a membrana</i>	20
4.3.4	<i>Nicotiana sp como fonte de PAMs</i>	22
4.3.5	<i>Desenho inteligente e modificações de peptídeos</i>	24
5	ARTIGO CIENTÍFICO	27
5.1	Introduction	29
5.2	Materials and methods	30
5.2.1	<i>Antimicrobial peptides (AMPs)</i>	30
5.2.2	<i>Rational design</i>	30
5.2.3	<i>Biological material</i>	31
5.2.4	<i>Antibacterial activity</i>	31
5.2.5	<i>Cell viability assay</i>	32
5.2.6	<i>Cell membrane integrity assay</i>	32
5.2.7	<i>Membrane zeta potential</i>	32
5.2.8	<i>Ultrastructural analysis</i>	33
5.2.9	<i>Circular dichroism (CD)</i>	33
5.2.10	<i>Reactive oxygen species (ROS) overproduction</i>	33
5.2.11	<i>Hemolysis assay</i>	34
5.2.12	<i>Statistical analysis</i>	34
5.3	Results	34
5.3.1	<i>Selection of the peptide with the highest antibacterial activity</i>	34
5.3.2	<i>Rational modification of the Nicotianin-I peptide</i>	36

5.3.3	<i>Antibacterial activity of the two new peptide analogues</i>	37
5.3.4	<i>Mechanisms of action of the peptide analogues</i>	38
5.3.4.1	<i>Zeta potential analysis</i>	38
5.3.4.2	<i>Membrane permeabilization and ROS production</i>	38
5.3.4.3	<i>SEM morphological analysis</i>	39
5.3.5	<i>Structural characterization of the peptide analogues</i>	40
5.3.5.1	<i>Helical wheel and structural models</i>	40
5.3.5.2	<i>Circular dichroism spectroscopy</i>	42
5.3.6	<i>Cytotoxicity of the modified peptides</i>	42
5.4	Discussion	43
5.5	Conclusion	46
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXO A - ARTIGO CIENTÍFICO II	62

1. INTRODUÇÃO GERAL

As doenças infecciosas representam um desafio crítico para a saúde global, especialmente em função do avanço da resistência bacteriana. Segundo novos levantamentos, em 2023, cerca de uma em cada seis infecções bacterianas confirmadas em laboratório eram resistentes aos antibióticos de uso corrente, e a resistência aumentou em mais de 40% das combinações de patógeno-antibiótico monitoradas entre 2018 e 2023, com uma expansão média anual entre 5 % e 15 % (WHO, 2025). Esse cenário de crescimento da resistência compromete a eficácia dos tratamentos disponíveis e contribui para maior morbimortalidade associada a infecções bacterianas resistentes, reforçando a necessidade de estratégias globais de vigilância e desenvolvimento de novas terapias (Kariuki, 2024).

No Brasil, a resistência bacteriana e suas complicações representam um importante problema de saúde pública, caracterizado por elevadas taxas de infecções associadas à assistência à saúde e por desfechos clínicos adversos significativos, especialmente em unidades de terapia intensiva (UTIs). Estudos multicêntricos recentes mostram uma prevalência elevada de infecções hospitalares adquiridas, com pneumonia e sepse como as apresentações mais frequentes, refletindo tanto o uso intensivo de antimicrobianos quanto a dificuldade no controle de infecções em ambientes de alta complexidade clínica (Machado et al., 2025). A disseminação de microrganismos Gram-negativos multirresistentes, por exemplo, está associada ao aumento da morbidade, do tempo de internação e do uso de terapias antimicrobianas de amplo espectro, evidenciando o impacto adverso da resistência no manejo terapêutico de pacientes críticos no país (Machado et al., 2025; Oliveira et al., 2025).

O impacto das infecções bacterianas na saúde humana vai além da mortalidade, afetando de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes e sobrecarregando os sistemas de saúde. Infecções associadas aos cuidados de saúde, como pneumonias, infecções do trato urinário, infecções de corrente sanguínea e infecções de feridas cirúrgicas, figuram entre as principais causas de complicações clínicas e prolongamento da internação hospitalar (Abban et al., 2023; Gidey et al., 2023).

Além do impacto clínico direto, as infecções bacterianas representam um ônus econômico substancial. Em nível global, infecções bacterianas resistentes estão associadas a aumentos significativos nos custos hospitalares e perda de produtividade laboral, com estimativas que chegam a centenas de bilhões de dólares em despesas hospitalares e impacto econômico geral sobre os sistemas de saúde e mercados de trabalho (Naylor et al., 2025). Estudos também indicam que, em unidades de terapia intensiva, infecções associadas à

assistência estão relacionadas ao aumento significativo dos custos de tratamento e do tempo de internação, especialmente quando envolvem bactérias multirresistentes (Barroso et al., 2023).

O avanço da resistência bacteriana tem sido impulsionado por diversos fatores inter-relacionados, entre os quais se destacam o uso excessivo e inadequado de antimicrobianos e a baixa conscientização da população. Esses problemas são agravados pela ausência de regulamentações rigorosas e pela fiscalização insuficiente por parte das autoridades competentes, o que favorece o uso indiscriminado desses agentes. Além disso, a escassez de investimentos em pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos limita severamente as opções terapêuticas disponíveis, tornando o enfrentamento das infecções resistentes um desafio crescente para a saúde pública (Bharadwaj et al., 2022; Ndaki et al., 2025).

A crescente resistência bacteriana aos antibióticos tradicionais é uma das mais sérias ameaças à saúde pública, exigindo soluções inovadoras e eficazes. Nesse cenário, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) despontam como alternativas promissoras, devido à sua ampla atividade contra diversos patógenos, incluindo cepas resistentes a múltiplas drogas (Bucataru; Ciobanasu, 2024). Esses compostos naturais, presentes como parte do sistema imunológico inato de vários organismos, são capazes de atuar rapidamente, desestabilizando as membranas celulares dos microrganismos, o que reduz significativamente o risco de resistência (Xuan et al., 2023). A exploração e o desenvolvimento de PAMs oferecem um caminho estratégico para enfrentar a crise da resistência antimicrobiana e preservar a eficácia dos tratamentos contra infecções (Li et al., 2022; Zhang; Xu; Dong, 2022).

Para além de sua eficácia antimicrobiana, os PAMs apresentam características que os tornam candidatos estratégicos para o desenvolvimento de novas terapias, como versatilidade estrutural, possibilidade de modificações. Essas propriedades permitem não apenas a ampliação do espectro de ação, mas também a otimização de parâmetros como estabilidade, seletividade e toxicidade. Nesse contexto, estudos voltados à prospecção, caracterização e engenharia de PAMs são fundamentais para superar limitações associadas à sua aplicação clínica e consolidar esses peptídeos como ferramentas viáveis no enfrentamento da resistência antimicrobiana (Li et al., 2022).

2. HIPÓTESE

A modificação racional de peptídeos antimicrobianos derivados de *Nicotiana* sp. direciona suas propriedades físico-químicas e conformacionais, resultando em estruturas mais estáveis e favoráveis à interação com membranas bacterianas. Essa interação promove o aumento da permeabilidade e a perda da integridade da membrana celular, levando a danos morfológicos, redução da viabilidade bacteriana e indução de espécies reativas de oxigênio. Paralelamente, essas modificações permitem modular a seletividade dos peptídeos, ampliando a atividade antimicrobiana com baixa toxicidade frente a células eucarióticas, refletida por um perfil hemolítico reduzido.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana de seis peptídeos identificados no néctar floral de *Nicotiana* sp. e o impacto do desenho racional aplicado ao peptídeo mais promissor sobre a atividade antimicrobiana, a conformação estrutural e os mecanismos de ação, a fim de aprimorar sua eficácia frente a bactérias patogênicas de relevância clínica e analisar sua seletividade e potencial hemolítico.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar um peptídeo do néctar floral de *Nicotiana* com melhor atividade antibacteriana para posterior modificação estrutural;
- Modular as propriedades do peptídeo antimicrobiano, tais como: aumento de carga líquida, momento hidrofóbico e índices de inibição microbiana.
- Determinar a atividade antimicrobiana dos novos peptídeos por meio da identificação das concentrações inibitórias mínimas (MIC₅₀ e MIC₁₀₀) frente a bactérias patogênicas de relevância clínica;
- Investigar os mecanismos de ação dos peptídeos, avaliando comparativamente danos à membrana celular, alterações morfológicas e a indução de espécies reativas de oxigênio;
- Identificar se a modificação racional promove alterações na estrutura secundária e estabilidade conformacional;
- Avaliar o potencial hemolítico dos peptídeos racionalmente modificados;
- Correlacionar as modificações racionais realizadas com os efeitos biológicos observados, integrando dados de estrutura secundária, interação com a superfície bacteriana e desempenho antimicrobiano.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Infecções bacterianas na saúde humana

4.1.1 Infecções causadas por bactérias Gram-positivas

As infecções bacterianas representam um dos maiores desafios à saúde humana, sendo provocadas por uma ampla gama de microrganismos que podem comprometer diversos sistemas do corpo, variando de manifestações leves, como infecções superficiais na pele, até condições graves e potencialmente fatais, como a septicemia. Entender os agentes causadores, os mecanismos de patogenicidade e as barreiras ao tratamento é essencial para combater essas doenças de maneira eficaz (Ahmed et al., 2024; Macesic; Uhlemann; Peleg, 2025)

Nessa perspectiva, as infecções causadas por bactérias Gram-positivas representam um significativo problema para a saúde humana, devido à sua ampla distribuição e capacidade de causar doenças em diversos contextos clínicos. Entre essas, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* destacam-se por sua relevância epidemiológica e pelas dificuldades enfrentadas em seu tratamento (Agra et al., 2023; Hefzy et al., 2023).

As bactérias da espécie *S. aureus* são conhecidas por serem altamente patogênicas, associadas a uma variedade de infecções, desde infecções cutâneas simples, como furúnculos e celulites, podendo evoluir para situações mais graves, como pneumonia, osteomielite, endocardite e sepse. Uma preocupação crescente com *S. aureus* é a emergência de cepas resistentes, sendo a mais comumente encontrada a resistente à meticilina (MRSA), as quais interferem severamente nas opções terapêuticas disponíveis. Essas cepas são prevalentes tanto em ambientes hospitalares quanto na comunidade, tornando sua gestão um desafio contínuo (Tong et al., 2015; Touaitia et al., 2025).

Paralelamente, a *S. epidermidis* deve ser compreendida não apenas como um contaminante ou microrganismo de baixa relevância clínica, mas como um patógeno oportunista capaz de causar infecções em diferentes cenários. Embora seja predominantemente associada à microbiota comensal da pele e das mucosas, essa espécie pode estar envolvida em infecções cutâneas superficiais, infecções de feridas, abscessos locais e, ocasionalmente, infecções do trato urinário, especialmente quando há ruptura das barreiras epiteliais. Em indivíduos com fatores predisponentes, como imunossupressão, doenças crônicas ou procedimentos invasivos prévios, *S. epidermidis* pode transitar de um microrganismo comensal para um agente infeccioso, evidenciando seu papel relevante na clínica humana e reforçando a necessidade de uma avaliação cuidadosa de sua patogenicidade (Burke; Zeden; O’Gara, 2024).

O *Staphylococcus epidermidis*, embora apresente menor virulência quando comparado ao *S. aureus*, destaca-se como um importante agente de infecções associadas a dispositivos médicos, incluindo cateteres, próteses articulares e válvulas cardíacas artificiais, sendo frequentemente subestimado quanto ao seu impacto clínico. Essa espécie possui elevada capacidade de formar biofilmes, estruturas complexas que conferem proteção contra agentes antimicrobianos e contra a resposta imune do hospedeiro. Embora *S. epidermidis* integre a microbiota normal da pele, sua translocação para sítios estéreis, especialmente em pacientes imunocomprometidos, pode resultar em infecções persistentes ou recorrentes (Cheung; Otto, 2025; Fernández-Calderón et al., 2025; Severn; Horswill, 2023).

4.1.2 Infecções causadas por bactérias Gram-negativas

Na continuidade dessa problemática, as infecções bacterianas causadas por bactérias Gram-negativas podem apresentar dificuldades terapêuticas equiparáveis, ou até superiores, às observadas em infecções por Gram-positivas, especialmente em função da presença de uma membrana externa complexa e de múltiplos mecanismos de resistência.

Nesse contexto, bactérias resistentes, como a *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC), configuram-se como um desafio global à saúde humana. Entre os patógenos Gram-negativos de maior relevância destacam-se *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, cada um contribuindo de forma distinta, porém crítica, para a carga global de doenças infecciosas (Falagas et al., 2025; Macesic; Uhlemann; Peleg, 2025).

No âmbito de tais patógenos, as infecções causadas por *K. pneumoniae* representam um desafio significativo à saúde humana, especialmente devido à sua alta virulência e resistência a múltiplos antimicrobianos. Esse patógeno oportunista é responsável por uma variedade de infecções graves, incluindo: pneumonias, infecções do trato urinário, septicemias e infecções de feridas cirúrgicas, sendo particularmente prevalente em ambientes hospitalares e em pacientes imunocomprometidos (Chawla; Piveteau; Sharma, 2025; Sá-Pessoa et al., 2025).

Uma das principais preocupações relacionadas a *K. pneumoniae* é a disseminação de cepas produtoras de carbapenemases (KPC), bem como o surgimento de linhagens que combinam resistência antimicrobiana e hipervirulência (CR-hvKp), fenômeno que agrava significativamente o manejo clínico dessas infecções. Essas cepas utilizam enzimas que conferem resistência aos carbapenêmicos, um dos grupos de antibióticos mais potentes disponíveis. A resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae* ocorre principalmente por meio da transferência horizontal de genes mediada por elementos genéticos móveis, como

plasmídeos, transposons e integrons, que carregam genes como *blaKPC*, *blaNDM* e *blaOXA-48*, responsáveis pela produção de carbapenemases capazes de inativar esses fármacos (Ding et al., 2023).

A transferência ocorre predominantemente via conjugação entre bactérias, o que facilita a disseminação da resistência. Além disso, alterações em porinas e bombas de efluxo podem contribuir para o mecanismo de resistência. Esse processo é agravado em ambientes hospitalares, onde o uso excessivo de antimicrobianos e a presença de biofilmes em superfícies médicas favorecem a seleção e a persistência dessas cepas resistentes (Hussein; AL-Kubaisy; Al-Ouqaili, 2024). Essa resistência limita significativamente as opções terapêuticas, elevando a mortalidade associada a infecções invasivas (Ding et al., 2023).

Ainda no contexto das bactérias Gram-negativas, *P. aeruginosa* destaca-se como um patógeno de grande relevância clínica e epidemiológica, uma vez que as infecções causadas por esse microrganismo representam um risco significativo à saúde humana (Chen, 2023). Essa preocupação está diretamente relacionada à sua elevada resistência intrínseca e adquirida a múltiplas classes de antimicrobianos, resultado de barreiras de permeabilidade da membrana externa, expressão de sistemas de efluxo e produção de enzimas inativadoras. Trata-se de um patógeno oportunista frequentemente associado a infecções nosocomiais, acometendo principalmente pacientes hospitalizados ou imunocomprometidos (Krūmiņa et al., 2026). *P. aeruginosa* é comumente implicada em quadros de pneumonia associada à ventilação mecânica, infecções do trato urinário, bacteremias, além de infecções de queimaduras e feridas cirúrgicas, condições que apresentam elevada morbidade, mortalidade e limitações terapêuticas (Li et al., 2024).

As formas de resistência de *P. aeruginosa* representam uma das características que mais preocupam na clínica, pois essa espécie combina resistência intrínseca, adquirida e adaptativa a múltiplos antimicrobianos, dificultando o tratamento de infecções graves. A resistência intrínseca de *P. aeruginosa* está associada a uma baixa permeabilidade da membrana externa, que limita a entrada de fármacos, à presença de sistemas de efluxo de amplo espectro capazes de expulsar antibióticos para fora da célula, e à produção de enzimas inativadoras de drogas, como as β -lactamases AmpC e outras classes que degradam antibióticos β -lactâmicos (Qin et al., 2022; Tenover; Nicolau; Gill, 2022).

Essa resistência natural e adquirida permite que a *P. aeruginosa* colonize ambientes hospitalares, onde encontra condições ideais para persistir e infectar pacientes vulneráveis, como aqueles em terapia intensiva ou com sistemas imunológicos debilitados. Essas barreiras

inatas também contribuem para a formação de biofilmes, prolongando as infecções e tornando-as mais difíceis de tratar (Verdial et al., 2023).

4.2 Pesquisa e desenvolvimento de agentes antimicrobianos alternativos

Historicamente, o desenvolvimento de antibióticos concentrou-se majoritariamente em um número limitado de alvos celulares, como a síntese da parede celular, a replicação do DNA, a transcrição e a tradução proteica. No entanto, a adaptação bacteriana a esses alvos, por meio de mutações, transferência horizontal de genes e regulação de sistemas de efluxo e permeabilidade, tem reduzido drasticamente a eficácia dessas terapias. Como consequência, observa-se uma desaceleração significativa na descoberta de novas classes de antibióticos verdadeiramente inovadoras, configurando o que muitos autores descrevem como uma “crise do pipeline antibiótico”(Skender, 2024).

Nesse contexto, a pesquisa científica desenvolvida por universidades e institutos de pesquisa assume papel fundamental, respondendo por grande parte das descobertas iniciais e das propostas inovadoras de agentes antimicrobianos (Stremlau; Slusher, 2025). Diferentemente de muitos esforços industriais, que frequentemente priorizam compostos com retorno financeiro mais rápido, a academia tem a flexibilidade de explorar abordagens mais arriscadas e de longo prazo, como moléculas bioativas naturais, peptídeos e análogos sintéticos, visando mecanismos de ação distintos e maior seletividade (Woo et al., 2023). Esse protagonismo acadêmico não apenas amplia o repertório de substâncias candidatas, como também fortalece as bases científicas necessárias para a translação desses compostos ao ambiente clínico (Iskandar et al., 2022; Slovenski et al., 2025).

Nesse cenário, compostos que apresentam mecanismos de ação rápidos, multifatoriais e menos suscetíveis ao desenvolvimento de resistência têm recebido atenção crescente da comunidade científica. Paralelamente, a prospecção de produtos derivados de fontes naturais tem se destacado como uma estratégia particularmente eficaz na busca por novos agentes antimicrobianos, uma vez que esses compostos resultam de longos processos evolutivos de interação entre organismos e microrganismos, frequentemente exibindo elevada diversidade estrutural e modos de ação distintos dos antibióticos convencionais (Matei; Visan, 2025). A exploração de metabólitos naturais e moléculas bioativas de origem vegetal, microbiana e animal tem ampliado significativamente o repertório de substâncias candidatas, oferecendo novas oportunidades para o desenvolvimento de terapias antimicrobianas mais eficazes,

seletivas e com menor propensão ao surgimento de resistência, consolidando-se como uma das principais direções da pesquisa antimicrobiana contemporânea (Guedes et al., 2024).

4.3 Peptídeos antimicrobianos

4.3.1 Características e propriedades

Diante do cenário demonstrado nos tópicos anteriores, torna-se evidente a necessidade de desenvolver alternativas aos antibióticos existentes. Estratégias promissoras incluem o uso de peptídeos antimicrobianos, que possuem mecanismos de ação distintos e menor propensão ao desenvolvimento de resistência, além de possibilitar a adoção de possíveis terapias combinadas que exploram o sinergismo entre diferentes compostos (Li et al., 2022)

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas bioativas naturalmente presentes em diversos organismos e, em geral, são oligopeptídeos com número relativamente curto de aminoácidos (tipicamente entre 10 e 50 aminoácidos), com carga líquida positiva (+2 a +9) e uma alta proporção de resíduos hidrofóbicos que lhes conferem caráter anfipático e facilitam a interação com membranas bacterianas (Marciano et al., 2025). Essas propriedades físico-químicas, tais como tamanho reduzido, rica presença de resíduos básicos (arginina, lisina) que proporcionam carga positiva, e aproximadamente 50% de resíduos hidrofóbicos são amplamente descritas como centrais para o reconhecimento e desestabilização da bicamada lipídica microbiana, sendo elementos essenciais para sua atividade antimicrobiana (Gan et al., 2021).

Eles são amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em diversos organismos como primeira linha de defesa contra infecções. Eles podem ser isolados de uma ampla variedade de organismos, como: bactérias, fungos, plantas, insetos e animais, onde desempenham um papel crucial na imunidade inata. Em microrganismos como bactérias e fungos, os PAMs atuam como agentes de competição no ambiente, ajudando a suprimir o crescimento de espécies rivais. Em plantas, esses peptídeos são frequentemente encontrados em sementes, flores e folhas, contribuindo para a proteção contra fitopatógenos (Li et al., 2021; Parra et al., 2022).

Em conjunto, essas características estruturais, funcionais e biológicas fundamentam o crescente interesse nos PAMs como agentes terapêuticos, uma vez que favorecem sua eficácia contra infecções bacterianas e fúngicas, inclusive aquelas causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais. Além disso, estudos recentes têm demonstrado o potencial desses peptídeos em outros contextos biológicos, como a atividade antitumoral,

ampliando ainda mais seu valor como moléculas bioativas de interesse farmacológico (Liu et al., 2023; Zhang; Xu; Dong, 2022).

Esse interesse, no entanto, não é recente, uma vez que as pesquisas envolvendo os PAMs remontam às primeiras décadas do desenvolvimento da terapia antimicrobiana e já se consolidaram como uma área de investigação com resultados consistentes. Um marco histórico nesse contexto foi a identificação da gramicidina, em 1939, a partir da bactéria do solo *Bacillus brevis*, a qual demonstrou atividade antibacteriana tanto *in vitro* quanto *in vivo*, especialmente contra bactérias Gram-positivas (Dubos, 1939). Desde então, o número de PAMs descritos na literatura cresceu de forma significativa, acompanhando o avanço das técnicas analíticas, computacionais e biotecnológicas aplicadas à descoberta e caracterização dessas moléculas (Nedyalkova et al., 2024).

Como consequência direta dessa expansão no número e na diversidade de PAMs identificados, tornou-se necessária a adoção de diferentes sistemas de classificação para organizar essas moléculas de acordo com múltiplos critérios, incluindo propriedades estruturais e funcionais. Sob o ponto de vista estrutural, os peptídeos antimicrobianos podem ser organizados em quatro grupos com base em sua estrutura secundária: PAMs com conformação de α -hélice; PAMs contendo folhas β ; PAMs que apresentam um loop estabilizado por uma única ligação dissulfeto ou por ciclização da cadeia peptídica, e PAMs curtos com conformações estendidas. Alguns desses peptídeos exibem exclusivamente estruturas de α -hélice ou folhas β , enquanto outros apresentam conformações mais complexas, combinando diferentes elementos estruturais (Huan et al., 2020; Mabrouk, 2022).

Essas características estruturais estão intimamente relacionadas à eficácia antimicrobiana dos PAMs, uma vez que condicionam suas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, sua interação com a membrana celular bacteriana. Já a presença de carga líquida positiva favorece a interação eletrostática inicial com superfícies bacterianas negativamente carregadas. Esse reconhecimento eletrostático inicial é um passo essencial para a aproximação e ancoragem do peptídeo à membrana-alvo, representando o primeiro evento no processo de ação antimicrobiana (Zhang; Xu; Dong, 2022).

Além disso, a hidrofobicidade dos PAMs facilita sua inserção na bicamada lipídica da membrana bacteriana, resultando em desestabilização ou formação de poros. Esse processo leva à perda de integridade da membrana, vazamento do conteúdo celular e, conseqüentemente, morte da bactéria. O tamanho curto dos PAMs também é vantajoso, pois permite maior flexibilidade estrutural, adaptando-se às diferentes composições de membranas celulares e

umentando sua capacidade de penetrar eficientemente em microrganismos-alvo (Bin Hafeez et al., 2021; Chen; Jiang, 2023).

Em síntese, os peptídeos antimicrobianos reúnem um conjunto de características que os posicionam como candidatos particularmente promissores no enfrentamento da resistência bacteriana. Seu mecanismo de ação, predominantemente baseado na interação direta com a membrana celular microbiana, envolve processos rápidos e multifatoriais que comprometem estruturas essenciais à sobrevivência dos patógenos, reduzindo significativamente a probabilidade de seleção de fenótipos resistentes. Além disso, a possibilidade de modulação racional de suas propriedades físico-químicas, aliada ao potencial de uso em terapias combinadas, amplia seu espectro de aplicação e eficácia clínica. Nesse contexto, os PAMs não devem ser compreendidos apenas como substitutos dos antibióticos convencionais, mas como uma nova classe terapêutica complementar, capaz de integrar estratégias inovadoras no combate às infecções bacterianas, especialmente aquelas causadas por microrganismos multirresistentes (Berger; Loewy, 2024; Ji et al., 2024).

4.3.2 Mecanismos de ação dos PAMs sobre membranas bacterianas

Como discutido no tópico anterior, os PAMs apresentam um conjunto de propriedades físico-químicas, como: carga líquida positiva, anfipaticidade, hidrofobicidade e tamanho variável que favorecem sua interação seletiva com as membranas de microrganismos. Essas características são determinantes para o mecanismo de ação predominante dessa classe de moléculas, o qual, na maioria dos casos, está associado à interação direta com a membrana celular bacteriana (Zhang et al., 2021).

O processo de ação dos PAMs geralmente se inicia com uma interação eletrostática entre a carga positiva do peptídeo e os componentes negativamente carregados da superfície bacteriana, como lipopolissacarídeos em bactérias Gram-negativas e ácidos teicóicos em bactérias Gram-positivas. Essa etapa inicial promove a aproximação e a adsorção do peptídeo à membrana, permitindo que regiões hidrofóbicas do PAM se insiram parcial ou totalmente na bicamada lipídica. A partir desse ponto, diferentes modelos de interação e desestabilização da membrana podem ocorrer, dependendo da sequência, conformação e concentração do peptídeo (Veizovic et al., 2022; Zhou; Pang, 2018).

No modelo “barrel-stave”, os PAMs, geralmente com estrutura predominantemente α -helicoidal e elevado grau de hidrofobicidade, inserem-se perpendicularmente à bicamada lipídica após a adsorção inicial à superfície celular. Nesse arranjo, múltiplos peptídeos se

organizam de maneira paralela entre si, formando um poro transmembranar bem definido, no qual as regiões hidrofóbicas do peptídeo interagem com os lipídios da membrana, enquanto as regiões hidrofílicas ficam voltadas para o lúmen do poro (Zheng et al., 2025).

Esse tipo de poro apresenta relativa estabilidade estrutural e permite o fluxo descontrolado de íons e pequenas moléculas, resultando na dissipação do potencial de membrana, colapso do gradiente eletroquímico e morte celular (Erriah et al., 2025). O modelo “barrel-stave” é menos frequente entre PAMs naturais, mas é classicamente associado a peptídeos altamente estruturados e hidrofóbicos, tendo um grande expoente como a alameticina (Tieleman; Berendsen; Sansom, 1999; Zheng et al., 2025).

Já o mecanismo de poro toroidal é frequentemente utilizado para explicar a ação de PAMs catiônicos anfipáticos. Ele se distingue do modelo “barrel-stave” pelo fato de que o canal não é composto apenas por peptídeos; em vez disso, a presença dessas moléculas provoca uma curvatura na bicamada lipídica, integrando os próprios lipídeos na arquitetura do poro (Bertelsen et al., 2023; Miyazaki; Shinoda, 2022). Nesse modelo, tanto os peptídeos quanto as cabeças polares dos fosfolipídios revestem o canal formado, resultando em uma estrutura mais dinâmica e transitória. A formação de poros toroidais leva ao aumento da permeabilidade da membrana, vazamento do conteúdo citoplasmático e perda da homeostase celular. Esse mecanismo é considerado altamente eficaz devido à sua rápida ação e baixa especificidade por um único alvo molecular (Has; Das, 2023).

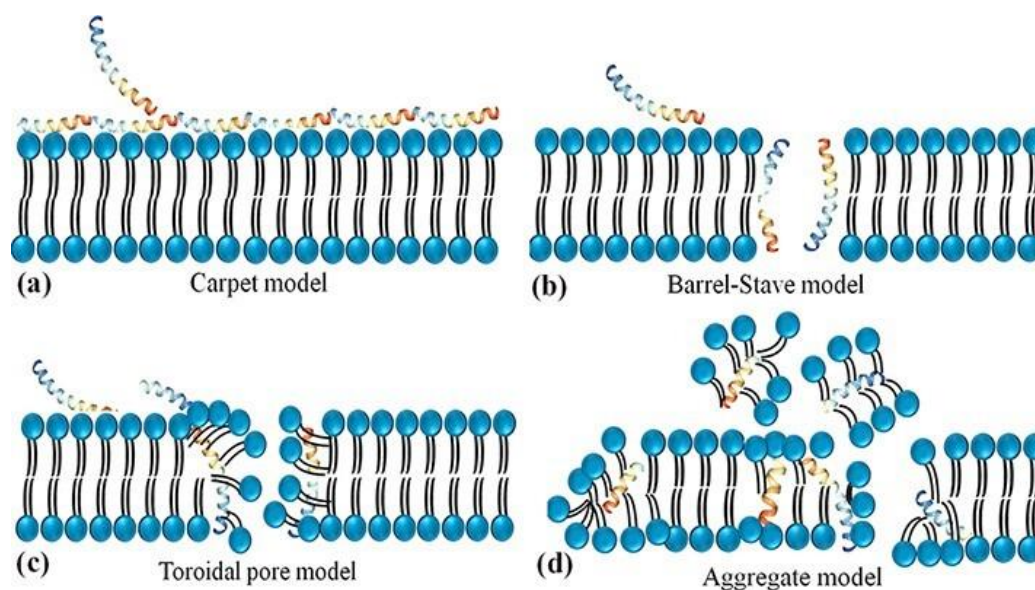
No modelo carpete, os peptídeos antimicrobianos (PAMs), geralmente catiônicos e anfipáticos, orientam-se paralelamente à superfície da membrana bacteriana e passam a recobri-la de maneira ampla e homogênea, formando uma disposição semelhante a um tapete. Nessa configuração, os peptídeos permanecem majoritariamente associados à superfície da bicamada, sem inserção profunda ou perpendicular na membrana (Kumar, 2025). O acúmulo progressivo de PAMs na superfície celular resulta em um aumento da concentração local, promovendo a desorganização do empacotamento lipídico por efeitos coletivos. Quando um limiar crítico é atingido, ocorre uma ruptura abrupta da membrana, levando à fragmentação, micelização ou solubilização da bicamada lipídica, de forma análoga à ação de detergentes. Diferentemente dos modelos baseados na formação de poros transmembranares, como os modelos “barrel-stave” e toroidal, o mecanismo carpete não envolve a formação de canais definidos, mas sim uma destruição global da integridade da membrana, culminando na lise celular (Kumar, 2025; Zhang et al., 2025).

Alternativamente, quando o acúmulo de PAMs ocorre de forma heterogênea, pode-se estabelecer o chamado modelo agregado. Nesse cenário, os peptídeos formam domínios ricos

em PAMs associados a lipídeos, originando agregados peptídeo-lipídeo que induzem defeitos locais na bicamada. Esses defeitos resultam em permeabilização transitória da membrana, perda do gradiente eletroquímico e comprometimento funcional da célula, sem necessariamente provocar lise imediata. Esse mecanismo favorece, inclusive, a translocação de peptídeos para o meio intracelular, ampliando o espectro de ação antimicrobiana (Ramazi et al., 2022).

A coexistência de múltiplos mecanismos de ação direcionados à membrana celular, envolvendo diferentes formas de interação e desestabilização da bicamada lipídica, confere aos peptídeos antimicrobianos uma atividade antimicrobiana rápida e multifatorial. Essa diversidade mecanística compromete simultaneamente funções essenciais da célula bacteriana, tornando os PAMs menos suscetíveis ao desenvolvimento de resistência e reforçando seu potencial como agentes terapêuticos frente a microrganismos patogênicos (Oliveira Júnior et al., 2025). A figura 1 mostra os quatro tipos de mecanismos de ação dos PAMs.

Figura 1: Representação esquemática dos mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos sobre a membrana bacteriana. (a) Modelo carpete. (b) Modelo barrel-stave. (c) Modelo de poro toroidal. (d) Modelo agregado.



Fonte: Ramazi et al (2022)

4.3.3 Mecanismos de ação não relacionados à membrana

Embora os peptídeos antimicrobianos (PAMs) sejam amplamente reconhecidos por sua atuação direta sobre a membrana dos microrganismos, essa não constitui sua única via de ação. Evidências demonstram que diversos PAMs são capazes de translocar a membrana celular sem

causar lise imediata, alcançando alvos intracelulares essenciais e desencadeando efeitos letais por diferentes mecanismos (Narasingappa; Vyas, 2024).

Uma vez no interior da célula, esses peptídeos podem interferir em processos biológicos fundamentais, como a síntese de ácidos nucleicos e proteínas, a atividade de enzimas metabólicas, a organização do citoesqueleto bacteriano e a homeostase redox. Embora tais mecanismos intracelulares sejam menos explorados quando comparados às interações membranares, eles contribuem de forma significativa para a eficácia antimicrobiana de determinados PAMs, além de ampliar a complexidade e a multifatorialidade de sua ação biológica (Kim; Min; Park, 2025).

Um dos mecanismos intracelulares mais bem caracterizados dos peptídeos antimicrobianos envolve a interação direta com ácidos nucleicos bacterianos. Peptídeos ricos em resíduos catiônicos apresentam elevada afinidade eletrostática por DNA e RNA, podendo interferir em processos essenciais como replicação, transcrição e tradução (Ma et al., 2024). Um exemplo clássico desse mecanismo é a buforina II, que transloca a membrana bacteriana sem provocar lise significativa e se acumula no citoplasma, onde se liga a DNA e RNA, resultando na inibição da síntese de ácidos nucleicos e na morte celular (Uyterhoeven et al., 2008). A interrupção desses processos centrais compromete diretamente a progressão do ciclo celular bacteriano, uma vez que a replicação do material genético e a expressão coordenada de proteínas são etapas indispensáveis para a divisão celular. Além disso, os PAMs podem afetar o ciclo celular de forma mais ampla ao interferirem em processos como a síntese de peptidoglicano, a segregação cromossômica e a formação do septo de divisão, levando ao bloqueio do crescimento celular e ao acúmulo de células inviáveis. Esses efeitos são característicos de peptídeos que, além de penetrar a célula, interagem de maneira simultânea com múltiplos alvos intracelulares (Du et al., 2025).

Outro mecanismo relevante corresponde à interferência na síntese proteica. Determinados PAMs atuam por meio da associação direta com ribossomos bacterianos ou com componentes envolvidos no processo de tradução, comprometendo a elongação da cadeia polipeptídica e induzindo falhas na leitura do código genético. Exemplares como a indolicidina exemplifica esse tipo de ação, uma vez que interage com ribossomos e ácidos nucleicos, levando à inibição da síntese proteica e à consequente desorganização de processos celulares dependentes de proteínas funcionais (De Pascale et al., 2025).

De forma integrada, esses mecanismos demonstram que a ação intracelular dos PAMs não depende de um único alvo específico, mas de uma combinação de interações que causam estresse fisiológico generalizado à célula bacteriana. Essa multifuncionalidade contribui para a

elevada eficácia antimicrobiana desses peptídeos e representa uma das principais razões pelas quais o desenvolvimento de resistência bacteriana aos PAMs ocorre de maneira mais lenta quando comparado aos antibióticos convencionais (Yang et al., 2024).

4.3.4 *Nicotiana sp* como fonte de PAMs

O gênero *Nicotiana*, popularmente conhecido como tabaco, pertence à família Solanaceae e compreende diversas espécies amplamente distribuídas e reconhecidas tanto por sua relevância econômica quanto por seu potencial biotecnológico. Além da produção de alcaloides e outros metabólitos secundários de interesse farmacológico e agrícola, espécies de *Nicotiana* têm sido descritas como fontes de moléculas bioativas com função defensiva (Li et al., 2024), incluindo peptídeos antimicrobianos (Parra et al., 2022). Essa diversidade química reflete estratégias evolutivas associadas à proteção contra microrganismos e herbívoros, despertando crescente interesse na exploração dessas plantas como reservatórios naturais de compostos com potencial terapêutico (Neto et al., 2025).

Os PAMs derivados de espécies do gênero *Nicotiana sp* apresentam notável potencial biotecnológico, uma vez que essas plantas são reconhecidas por sua ampla produção de compostos bioativos (Parra et al., 2022; Zou et al., 2021). Estudos recentes demonstram que os PAMs oriundos dessas espécies exibem atividade significativa contra diversos microrganismos, sobretudo fungos. No entanto, ainda há lacunas no conhecimento sobre sua eficácia contra organismos procarióticos, o que justifica investigações mais aprofundadas. A seleção dos PAMs de *Nicotiana sp* como foco deste estudo baseia-se em sua capacidade de comprometer a integridade das membranas microbianas e em sua comprovada ação antimicrobiana (Neto et al., 2025).

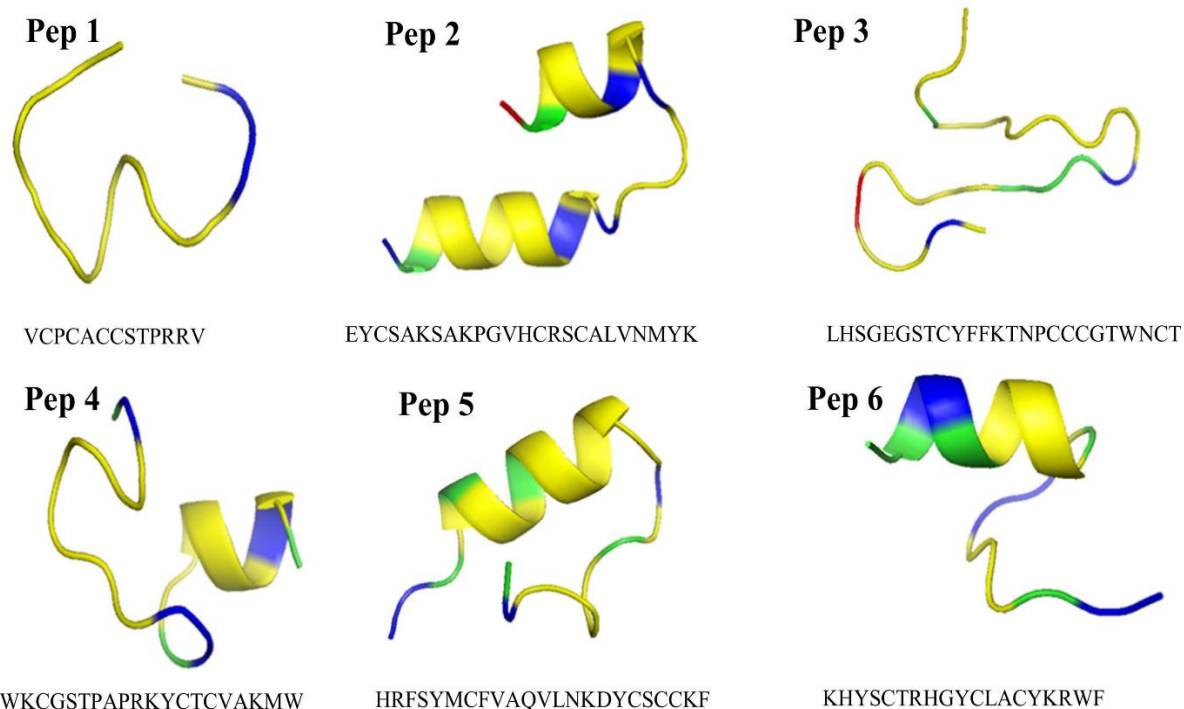
Particularmente, ganha destaque a descoberta de peptídeos presentes no néctar floral de *Nicotiana sp*, um fluido secretado pelas flores que tradicionalmente tem função atrativa para polinizadores (Parra et al., 2022; Silva et al., 2020). No entanto, além de seu papel ecológico, o néctar também atua como uma barreira química contra a colonização microbiana, sendo um reservatório natural de compostos bioativos, incluindo PAMs (Schmitt; Roy; Carter, 2021).

A presença desses peptídeos no néctar é de especial relevância, pois sugere um mecanismo de defesa precoce e localizado na planta, impedindo a contaminação por patógenos no ponto de entrada de agentes externos. Essa característica não apenas reforça o papel imunológico das secreções florais, mas também amplia o interesse biotecnológico por tais

peptídeos, dada sua origem sustentável, sua atividade específica e o potencial uso em formulações antimicrobianas naturais e seletivas (Parra et al., 2022).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) analisados neste trabalho foram inicialmente identificados a partir de estudos conduzidos por Parra et al. (2022), que investigaram o néctar floral de plantas de tabaco ornamental como uma fonte promissora de moléculas bioativas. Utilizando abordagens peptidômicas baseadas em LC-MS/MS, os autores identificaram aproximadamente 800 peptídeos presentes nesse fluido floral. A partir das sequências obtidas, foi realizada uma triagem *in silico* considerando parâmetros físico-químicos e funcionais, como carga líquida, hidrofobicidade, índice de Boman e similaridade com peptídeos antimicrobianos previamente descritos em bancos de dados especializados. Com base nessa análise preditiva, seis peptídeos que apresentaram o perfil mais promissor de atividade antimicrobiana foram selecionados e denominados Pep1, Pep2, Pep3, Pep4, Pep5 e Pep6. Esses candidatos foram inicialmente avaliados *in vitro* quanto à sua eficácia contra diferentes fitopatógenos, incluindo fungos e bactérias de relevância agrícola, como *Aspergillus niger* e *Penicillium digitatum*, confirmando seu potencial antimicrobiano. A figura 2 mostra as sequências e os modelos tridimensionais dos peptídeos (Pep1-Pep6), que foram usados no presente estudo.

Figura 2: Modelos tridimensionais de seis peptídeos identificados no néctar do tabaco ornamental. Os modelos foram construídos utilizando a ferramenta online PEPfold server 3.0.



Fonte: Parra et al (2022)

Posteriormente, esses PAMs foram investigados por Neto et al. (2025) quanto à sua atividade frente a fungos associados a infecções humanas, ampliando a compreensão de seu espectro biológico. No entanto, apesar dos avanços obtidos nesses estudos, ainda persiste uma lacuna relevante no que se refere à eficácia desses peptídeos contra bactérias envolvidas em infecções humanas. Nesse contexto, torna-se fundamental aprofundar a investigação de seu potencial antibacteriano, bem como avaliar se estratégias de desenho racional e modificações estruturais direcionadas podem ampliar sua atividade antimicrobiana e otimizar propriedades desejáveis para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

4.3.5 Desenho inteligente e modificações de peptídeos

O desenho e a modificação racional de peptídeos antimicrobianos constituem uma abordagem estratégica *in silico* que integra conhecimentos de bioinformática, biologia molecular e química para otimizar racionalmente as propriedades desses compostos, ampliando sua eficácia como agentes terapêuticos por meio da predição e modulação de parâmetros estruturais, físico-químicos e funcionais. Esse processo envolve a análise e modificação direcionada de características dos PAMs, como carga, hidrofobicidade, estabilidade e especificidade, com o objetivo de maximizar a atividade antimicrobiana e minimizar efeitos indesejados, como a toxicidade em células humanas (Mwangi et al., 2023).

Peptídeos antimicrobianos de ocorrência natural, embora eficazes contra uma ampla gama de microrganismos, frequentemente apresentam características indesejáveis que limitam sua aplicação clínica. Dentre essas limitações, destaca-se a instabilidade estrutural decorrente da suscetibilidade à degradação por proteases do hospedeiro, o que compromete sua meia-vida e eficácia *in vivo*. Além disso, muitos PAMs exibem baixa seletividade, podendo interagir tanto com células bacterianas quanto com células do hospedeiro, o que aumenta o risco de efeitos citotóxicos (Groover; Randall; Davies, 2024; Kim; Min; Park, 2025).

Outra limitação comum é a baixa hidrossolubilidade, que pode prejudicar a biodistribuição e a eficiência desses peptídeos em sistemas biológicos. Alguns PAMs também apresentam atividade hemolítica, causando danos às células sanguíneas e contribuindo para toxicidade indesejada. De modo geral, a toxicidade ao hospedeiro representa uma preocupação significativa, restringindo a aplicação clínica desses compostos a doses seguras, porém potencialmente menos eficazes (Robles-Loaiza et al., 2022).

Para superar as limitações associadas aos peptídeos antimicrobianos de ocorrência natural, torna-se fundamental a adoção de estratégias de modificação racional voltadas ao aprimoramento de suas propriedades físico-químicas e biológicas. Nesse contexto, ferramentas computacionais e bancos de dados especializados desempenham papel central no suporte ao desenho racional de novos PAMs. O APD6 (Antimicrobial Peptide Database), por exemplo, oferece uma base abrangente de sequências, estruturas e dados funcionais relacionados a peptídeos antimicrobianos, permitindo análises comparativas robustas e embasadas (Wang; Li; Wang, 2016). A exploração sistemática dessas informações possibilita a identificação de padrões estruturais e funcionais, auxiliando no desenho de novas variantes e na seleção de candidatos promissores com maior eficácia terapêutica e menor toxicidade (Wang, 2023).

Além dos bancos de dados, ferramentas de bioinformática específicas têm sido amplamente empregadas no desenho inteligente de peptídeos antimicrobianos. O HeliQuest, por exemplo, é utilizado para a análise de hélices α anfipáticas, permitindo a visualização da distribuição de resíduos hidrofóbicos e carregados ao longo da estrutura helicoidal, bem como o cálculo de parâmetros como hidrofobicidade média e momento hidrofóbico (Gautier et al., 2008; Karmakar; Das; Banerjee, 2024). Essas informações são fundamentais para orientar modificações racionais que favoreçam a interação seletiva dos PAMs com membranas bacterianas.

Considerando que a capacidade de interagir com a bicamada lipídica constitui um passo inicial para a permeabilização ou translocação através da membrana, ferramentas voltadas à predição da permeabilidade celular tornam-se complementares nesse contexto. Nesse sentido, o CellPPD destaca-se como um banco de dados e plataforma computacional voltado à predição e análise de peptídeos permeáveis à membrana celular, incorporando modelos baseados em aprendizado de máquina, sendo útil na avaliação do potencial de internalização celular e na seleção de sequências com propriedades desejáveis (Gautam et al., 2013; Kardani; Bolhassani, 2021).

Entre as estratégias viabilizadas por esse conjunto de abordagens estão as modificações dirigidas por similaridade estrutural, a seleção baseada em parâmetros desejáveis (carga, comprimento e hidrofobicidade) e o uso de algoritmos de aprendizado de máquina treinados com dados provenientes desses bancos e ferramentas. Dessa forma, o APD6, aliado a plataformas como HeliQuest e CellPPD, contribui não apenas para a compreensão da diversidade e funcionalidade dos PAMs, mas também se consolida como um suporte estratégico no desenvolvimento racional de novas moléculas com maior eficácia antimicrobiana (Marczak; Bocian; Łyskowski, 2025).

Adicionalmente, a modificação de resíduos específicos da sequência constitui uma estratégia relevante. A substituição de aminoácidos neutros por resíduos catiônicos, como lisina (K) e arginina (R), pode aumentar a carga positiva do peptídeo, favorecendo sua interação eletrostática com as membranas bacterianas, que apresentam carga negativa. O acréscimo de resíduos hidrofóbicos, como o triptofano (W), pode intensificar a capacidade do peptídeo de se inserir na bicamada lipídica bacteriana, potencializando sua atividade antimicrobiana (Xu et al., 2023).

A redução do comprimento da sequência de aminoácidos também representa uma modificação plausível, podendo contribuir para a diminuição dos custos de síntese e, dependendo da composição e da conformação resultante, modular a resistência à degradação enzimática. Além disso, a presença de resíduos de cisteína (C) possibilita a formação de pontes dissulfeto, as quais desempenham papel importante na estabilização da conformação tridimensional do peptídeo (Su et al., 2025; Yang et al., 2025).

Tais alterações são fundamentais para o sucesso e a aplicação prática dos PAMs no contexto terapêutico, especialmente diante do cenário atual, em que antibióticos convencionais têm apresentado eficácia reduzida em decorrência da crescente resistência desenvolvida por microrganismos patogênicos. A engenharia racional de peptídeos antimicrobianos não apenas aprimora sua eficácia e seletividade, como também amplia as possibilidades de contornar tanto os mecanismos de resistência bacteriana quanto limitações intrínsecas aos próprios peptídeos naturais (Yang et al., 2025).

A presente pesquisa propõe-se a contribuir para o avanço no estudo de peptídeos com ação antimicrobiana, apresentando uma alternativa promissora aos antibióticos convencionais. Para isso, serão avaliadas as capacidades antimicrobianas dos peptídeos selecionados, bem como as modificações estruturais necessárias para otimizar sua eficácia. O estudo empregará estratégias de desenho inteligente de peptídeos, apoiadas por previsões de bioinformática, e realizará ensaios *in vitro* com o objetivo de validar as melhorias estruturais e funcionais propostas. A dissertação será apresentada na forma de artigo científico.

ARTIGO CIENTÍFICO

Rational engineering of a floral nectar peptide generates enhanced antimicrobial analogues with different modes of action

Dário R.A.L. Mourão¹, João M.M. Neto¹, Queilane L.S. Chaves¹, Mariana F. Oliveira¹, Viviane O. Silva¹, Ariel F.N. Mesquita¹, Ubirajara M. Paz-Junior¹, Alexandre H. Sampaio², Rômulo F. Carneiro², Cleverson D.T. Freitas^{1*}.

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Pici Campus, Fortaleza-Ceará, Brazil. CEP 60440-554.

²Department of Fishing Engineering, Federal University of Ceará, Pici Campus, Fortaleza-Ceará, Brazil. CEP 60440-554.

*Corresponding author: Cleverson D.T. Freitas (cleversondiniz@ufc.br). Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Pici Campus, Building 907. Fortaleza-Ceará, Brazil. CEP 60440-554.

Abstract

Antibiotic resistance represents one of the most urgent challenges for global public health, driving the search for alternative antimicrobial strategies. In this context, antimicrobial peptides (AMPs) have emerged as promising candidates due to their structural versatility and diverse mechanisms of action. Here, we selected AMPs present in the floral nectar of *Nicotiana* sp. to identify molecules with antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Initial assays revealed Nicotianin-I (NI) as the most active natural peptide, albeit with modest antibacterial efficacy. NI was therefore selected as a model for rational design, leading to the generation of two bioinspired analogues (NI-A and NI-B). Both derivatives exhibited significantly increased antibacterial activity in a strain-dependent manner, as confirmed by planktonic growth inhibition and cell viability assays. Mechanistic analyses demonstrated that NI-A primarily disrupts bacterial membranes, while NI-B induces oxidative stress, revealing distinct modes of action. Structural characterization showed improved amphipathic organization and environment-dependent folding behavior, while hemolysis assays indicated that NI-B maintains low toxicity to human erythrocytes. Overall, these findings demonstrate that rational peptide engineering can transform a weak natural AMP into optimized derivatives with improved activity and defined mechanisms, reinforcing its potential as a strategy for developing new antimicrobial agents.

Keywords: Antimicrobial peptides (AMPs), Bacterial resistance, *Nicotiana* sp., Rational modification.

5.1 Introduction

Infectious diseases remain among the greatest challenges to global health. The latest report from the World Health Organization (WHO, 2024) highlights that antimicrobial resistance continues to expand, compromising the effectiveness of essential treatments. The inappropriate and excessive use of antibiotics further intensifies this scenario, and projections indicate that by 2050, infections caused by resistant bacteria may become increasingly difficult to treat without significant advances in the discovery of new therapeutic strategies (Kariuki, 2024).

In this context, antimicrobial peptides (AMPs) have emerged as promising alternatives to conventional antibiotics. These oligopeptides, generally cationic and enriched in hydrophobic residues, selectively interact with negatively charged bacterial membranes, leading to membrane destabilization and subsequent cell lysis (Chen; Lu, 2020; Li et al., 2022; Huan et al., 2020). Their remarkable structural diversity, which includes α -helices, β -sheets, and cyclic architectures, broadens their mechanisms of action and contributes to a lower probability of resistance development (Li et al., 2021; Luo; Song, 2021; Oliveira Júnior et al., 2025; Parra et al., 2022). Despite their strong therapeutic potential, many natural AMPs present important limitations, such as susceptibility to proteolytic degradation, low selectivity toward microbial over mammalian cells, restricted bioavailability, and high variability in biological activity (Kim; Min; Park, 2025).

To overcome these drawbacks, rational modification strategies have gained increasing attention. Approaches such as incorporation of D-amino acids, peptide cyclization, fine-tuning of net charge and hydrophobicity, and reduction of peptide length have been employed to enhance stability, potency, and selectivity while reducing synthesis costs (Lima et al., 2021; Marczak; Bocian; Łyskowski, 2025; Mwangi et al., 2023). As a result, AMPs represent not only viable candidates to address antimicrobial resistance, but also versatile molecular platforms for the design of innovative therapeutic agents (Bin Hafeez et al., 2021; Chen; Jiang, 2023).

Among plant-derived AMPs, the genus *Nicotiana* stands out due to production of bioactive compounds with substantial biotechnological relevance (Parra et al., 2022; Zou et al., 2021). Although several studies have reported significant antifungal activity for peptides from this genus, their antibacterial properties remain considerably underexplored. The AMPs investigated in this study were initially identified by Parra et al. (2022) among more than 700 peptide sequences from floral nectar of *Nicotiana* sp. These peptides were later evaluated for their activity against pathogenic yeasts by Neto et al. (2025). However, their potential

effectiveness against bacteria commonly associated with human infections remains unknown. Therefore, assessing the antibacterial activity of these *Nicotiana*-derived AMPs, as well as determining whether rational modifications can enhance their performance and optimize desired physicochemical properties, represents a strategic and timely opportunity in the ongoing battle against microbial resistance.

5.2 Materials and methods

5.2.1 Antimicrobial peptides (AMPs)

Six peptides, identified and characterized from floral nectar of ornamental tobacco (Parra et al., 2022; Neto et al., 2025), were tested against different bacteria species of clinical interest. All peptides were synthesized by Synpeptide Co. Ltd. (China) with purity above 95%, using solid-phase peptide chemistry. The purity of the peptides was determined by reversed-phase high-pressure liquid chromatography (RP-HPLC) and mass spectrometry. The peptides were Pep1 (VCPCACCSTPRRV), Pep2 (EYCSAKSAKPGVHCRSCALVNMYK), Pep3 (LHSGEGSTCYFFKTNPCCCGTWNCT), Pep4 (WKCGSTPAPRKYCTCVAKMW), Pep5 (HRFSYMCFVAQVLNKDYCSCCKF), and Nicotianin-I (KHYSCTRHYCY LACYKRWF).

5.2.2 Rational design

The rational design was performed through a stepwise sequence-optimization strategy based on biochemical criteria and bioinformatic predictions. Initially, the amino acid composition of known antimicrobial peptides was examined using the statistical data available in the Antimicrobial Peptide Database (APD; <https://aps.unmc.edu/statistic/statistics>). These data provided the relative frequency of each amino acid among natural AMPs and guided the identification of residues in the original sequence (Nicotianin-I) that were underrepresented in typical AMP profiles. To preserve the major biochemical features of Nicotianin-I — such as length, hydrophobicity, and net charge — rare or low-frequency residues were substituted with more abundant amino acids of similar physicochemical characteristics. Based on APD frequencies, histidine (H) residues were replaced by lysine (K), tyrosine (Y) by phenylalanine (F), and tryptophan (W) by phenylalanine (F). These targeted substitutions generated the first optimized sequence (KKFSCTRGRGFCLACFKRF), which showed improvements across all predictive tools used, including higher net charge and isoelectric point, enhanced predicted bioactivity, absence of predicted toxicity, and positive cell-penetrating and antimicrobial predictions (Table 1).

This modified peptide was then submitted to CellPPD: Designing of Cell Penetrating Peptides to further enhance its cell-penetrating capacity. The platform provided a list of single-point mutations and associated predictive scores. From these outputs, the sequence with the highest SVM score and strongest predicted penetrating activity was selected, resulting in peptide KKFSCTRRRFCLACFKRF. To refine the amphipathic profile of this peptide, a helical wheel projection was generated using HeliQuest program (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParamsV2.py>). The analysis revealed an arginine (R) located within a cluster of hydrophobic residues, disrupting the ideal distribution of hydrophobic and hydrophilic faces. To restore and enhance amphipathicity, this residue was replaced by tryptophan (W), increasing the hydrophobic moment, overall hydrophobicity, and predicted bioactivity (Supplementary Table 1). This modification yielded the next optimized sequence, KKFSCWRRFCLACFKRF. Finally, to derive a shorter peptide with retained functional properties, this optimized sequence was analyzed using the CellPPD Protein Scanning tool. The program generated nine truncated candidates, and the fragment with both predicted cell-penetrating activity and the highest SVM score was selected. This process resulted in the final optimized peptide (RRFCLACFKR). The two best peptides were selected [KKFSCTWRRFCLACFKRF (named NI-A) and RRFCLACFKR (named NI-B)], synthesized, and subsequently used in all further analyses. The original peptide Nicotianin-I (NI) was used as control.

5.2.3 Biological material

Staphylococcus epidermidis (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619) were obtained from the Plant Protease Biotechnology Laboratory at the Federal University of Ceará (UFC). The bacterial strains were cultured in Mueller–Hinton (MH) broth and incubated in a bacteriological oven at 37 °C for 12–24 h until they reached the exponential growth phase.

5.2.4 Antibacterial activity

Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by broth microdilution following the protocol of Oliveira et al. (2019), with minor adaptations. Bacterial strains were grown for 24 h in Mueller–Hinton broth and subsequently adjusted to 10⁸ CFU/mL in fresh medium (2-fold concentrated). Pep1–Pep5 were solubilized in 5% DMSO, while Nicotianin-I, NI-A, and NI-B were prepared in sterile water to ensure adequate solubility. In 96-well plates, 50 µL of bacterial suspension was mixed with 50 µL of peptide solution to final concentrations

starting at 200 μM and followed by seven serial dilutions. All conditions were tested in triplicate. Plates were incubated at 37 °C for 24 h, after which bacterial growth was assessed by measuring absorbance at 600 nm (OD₆₀₀) using a microplate reader (Epoch BioTek). Growth inhibition was calculated by comparing the optical density values of peptide-treated wells with those of the negative growth control (bacterial suspension in water without peptide). The percentage of inhibition was determined based on the difference in bacterial growth between the treated and untreated groups.

5.2.5 Cell viability assay

Cell viability was evaluated as described by Cherene et al. (2024), with modifications. After preparation of the bacterial suspensions, cells were incubated with peptides for 24 h at 37 °C. Wells corresponding to three peptide concentrations (200, 100, and 50 μM), along with controls, were then incubated in the dark for 3 h at 37 °C with 50 μL of MTT solution (5 mg/mL). Formazan crystals were solubilized with 100 μL of 100% DMSO, followed by gentle shaking. Absorbance was measured at 570 nm using a microplate reader (Epoch BioTek). Sterile water served as the negative control, while ciprofloxacin (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or erythromycin (0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), both diluted in sterile water, were used as positive controls.

5.2.6 Cell membrane integrity assay

Membrane integrity was assessed using propidium iodide (PI), a fluorescent dye that penetrates only cells with damaged membranes. Bacterial suspensions (50 μL) were mixed with 50 μL of peptide solutions, in triplicates, and incubated for 4 h at 37 °C in the dark. Sterile water served as the negative control. After incubation, samples were centrifuged (5,000 $\times g$, 5 min, 4 °C) and washed three times with 0.15 M saline to remove residual material. Cells were then incubated with PI (0,1mg/ml) for 30 min at 37 °C in the dark, followed by three additional washes. Pellets were resuspended in 50 μL of 0.15 M NaCl, and fluorescence was quantified using a Varioskan ALF microplate reader (Thermo Fisher Scientific) at 555 nm excitation and 615 nm emission (Boix-Lemonche; Lekka; Skerlavaj, 2020).

5.2.7 Membrane zeta potential

Zeta potential measurements were conducted using a Zetasizer Nano (Malvern Instruments, UK) with disposable cuvettes (10 mm optical path). Freshly-grown bacterial cultures (12 h) were diluted to $\sim 1.0 \times 10^6$ CFU/mL, centrifuged (5,000 $\times g$, 5 min), washed, and resuspended in 200 μM HEPES buffer. Suspensions were incubated with peptides (200 μM for

NI and NI-B; 50 μ M for NI-A). Untreated cells served as negative controls. After 5 min of incubation, ten consecutive measurements were recorded at 25 °C with 120 s intervals. A potential difference of 40 mV was applied, enabling calculation of zeta potential and assessment of peptide-induced alterations in bacterial surface charge (Dong et al., 2024).

5.2.8 Ultrastructural analysis

Ultrastructural alterations in bacterial cells were examined by scanning electron microscopy (SEM) following Da Silva Neto et al. (2022). Cultures of *S. epidermidis* and *K. pneumoniae* (5×10^5 CFU/mL) were incubated with Nicotianin-I, NI-A (only *S. epidermidis*), or NI-B (only *K. pneumoniae*) at concentrations ranging from 50 to 200 μ M for 24 h at 37 °C. After incubation, cells were washed ($5,000 \times g$, 4 °C, 5 min) with 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) three times. Pellets were fixed in 2.5% glutaraldehyde diluted in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2) for 16 h at 25 °C under gentle agitation. Samples were re-washed in phosphate buffer and dehydrated through graded ethanol (10–100%). Dehydrated samples were treated with a hexamethyldisilazane (HMDS): ethanol mixture (1:1) for 10 min, followed by 100% HMDS. Samples were mounted and transferred to glass slides, which were further gold-coated and analyzed using an Inspect S50 SEM (FEI).

5.2.9 Circular dichroism (CD)

Peptides were dissolved in different buffers at 100 μ M. CD spectra were at pH 3.0, 5.0, 7.0, and 9.0 or membrane-mimicking conditions (50% TFE, 2,2,2-Trifluoroethanol). Analyses were performed using a J-815 spectropolarimeter (Jasco International Co., Japan) with a 0.1-cm quartz cuvette, scanning from 190 to 240 nm. Each spectrum represented an average of four scans and was baseline-corrected using the corresponding condition (Almeida et al., 2020).

5.2.10 Reactive oxygen species (ROS) overproduction

Triplicates of bacterial suspensions (50 μ L) were incubated with 50 μ L of peptide solutions for 4 h at 37 °C in the dark. Samples were washed three times with 0.15 M NaCl, resuspended, and incubated with 50 μ L of DCFH-DA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, 0,1mg/ml) for 30 min at 37 °C in the dark. After an additional wash cycle, fluorescence was quantified using a Varioskan ALF microplate reader (Thermo Fisher Scientific) at 485 nm excitation and 525 nm emission. All experiments were performed in triplicate to ensure reproducibility (Aguiar et al., 2022).

5.2.11 Hemolysis assay

Hemolytic activity was evaluated following Maharjan et al. (2022). Human erythrocytes were obtained from the Blood Bank of Ceará (HEMOCE, Brazil). The cells were washed repeatedly with cold sterile PBS (2,000 × g, 5 min, 4 °C) until the supernatant was clear, and then the erythrocytes were standardized to 2% (v/v). The peptides were diluted in series starting at 200 μM. Triton X-100 at 0.2% was used as a positive negative control (100% hemolysis). For each condition, 200 μL of the erythrocyte suspension was incubated with 200 μL of each peptide (1.56 to 200 μM) at 37 °C for 1 h with shaking (100 rpm). The samples were centrifuged (2,000 × g, 10 min, 4 °C) and triplicates (100 μL) of the supernatant were transferred to 96-well plates. The absorbance was measured at 414 nm and hemolysis was calculated relative to the controls.

5.2.12 Statistical analysis

All experiments were performed using three independent biological replicates. Mean values were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Statistical analyses were conducted in GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Santa Clara, CA, USA). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

5.3 Results

5.3.1 Selection of the peptide with the highest antibacterial activity

The initial screening was performed using six natural peptides isolated from the floral nectar of ornamental tobacco and evaluated against four bacterial strains (*Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*). Overall, all peptides displayed low antibacterial activity, with inhibition values typically below 25% across most peptide–strain combinations. Among them, Nicotianin-I (NI) was the only peptide that consistently inhibited bacterial growth. NI reached 35% inhibition against *S. aureus* and 34% against *S. epidermidis*, while showing modest but detectable inhibition of Gram-negative bacteria (Fig. 1A). In contrast, the remaining five peptides exhibited only selective activity, often below 20%, and in several cases no measurable inhibition. Although NI's antibacterial effect was still modest, its reproducible performance — particularly against Gram-positive species — made it the most suitable candidate for structural optimization. Therefore, NI was

selected as the lead molecule for rational design, serving as the template for generating two new derivatives (NI-A and NI-B) aimed at enhancing antimicrobial activity.

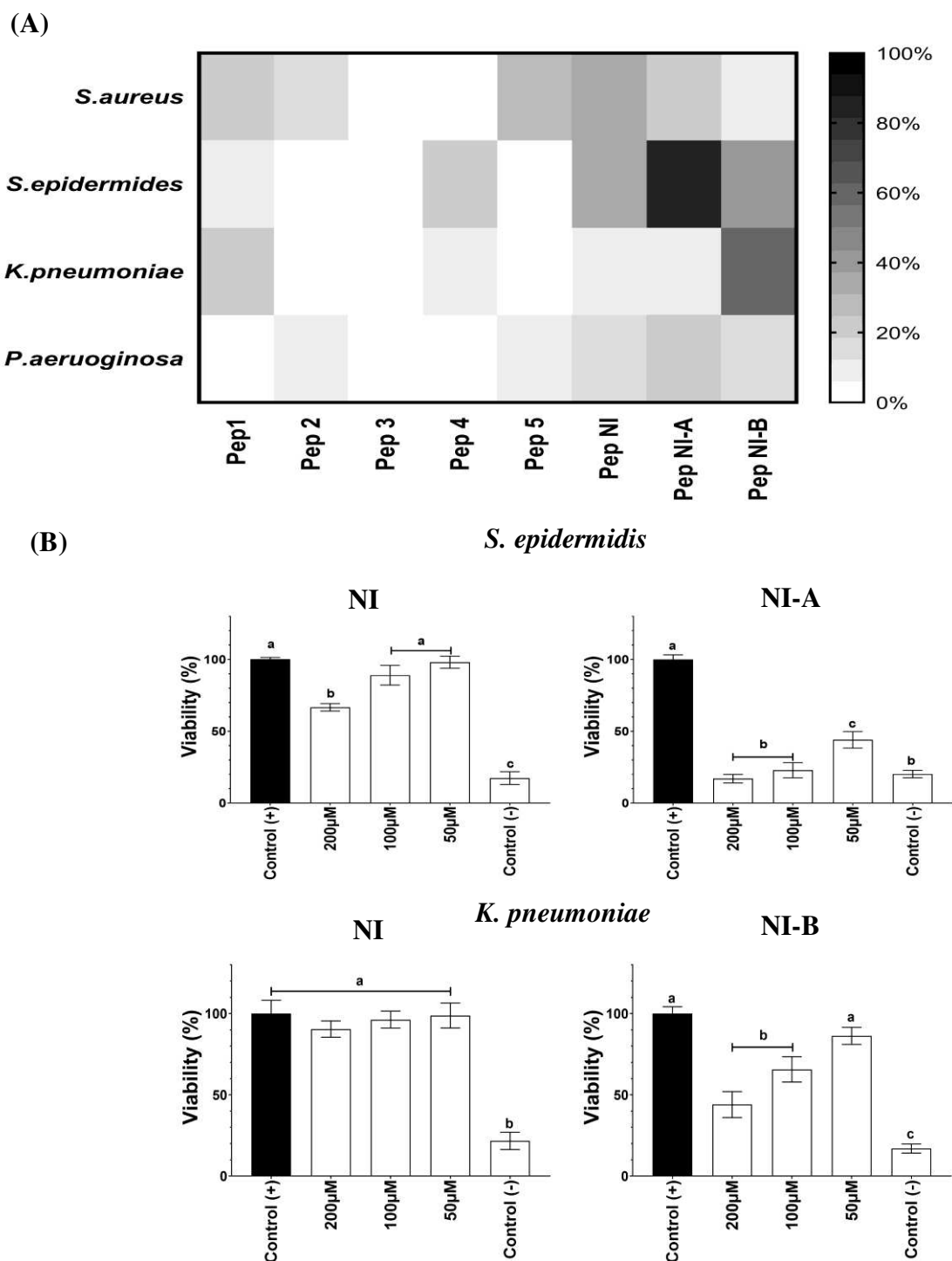


Fig. 1. Antimicrobial activity of nectar-derived peptides and their analogues. (A) Heatmap showing the inhibitory activity of five nectar peptides (Pep1–Pep5), Nicotianin-I (NI), and its two analogues (NI-A and NI-B) against four bacterial strains. For this assay, all peptides were tested at 200 μ M. Darker colors indicate higher inhibition, whereas lighter colors represent lower activity. (B) Cell viability (MTT) assay confirming the antimicrobial effects of the peptides at different concentrations. Sterile water served as the positive control, whereas erythromycin at 0,125 μ g/mL, (*Staphylococcus epidermidis*) and ciprofloxacin at 0,25 μ g/mL (*Klebsiella pneumoniae*) were used

as negative controls. Data are expressed as mean \pm standard deviation. Statistical significance was assessed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test; different letters denote significant differences ($p < 0.05$).

5.3.2 Rational modification of the Nicotianin-I peptide

In silico optimization resulted in the design of NI-A and NI-B, two synthetic analogues with markedly improved physicochemical properties compared to the parent peptide NI (Table 1). Both analogues exhibited increased isoelectric points and NI-A had higher net positive charge, characteristics associated with stronger interactions with negatively charged bacterial membranes. NI-A demonstrated substantially higher hydrophobicity and hydrophobic moment, indicating an enhanced amphipathic profile, a key determinant of membrane-active antimicrobial peptides. Furthermore, while NI was predicted to be toxic and lacked antimicrobial activity according to computational tools, NI-A and NI-B were classified as non-toxic and displayed predicted antibacterial, antifungal, and cell-penetrating properties. NI-A also presented the highest bioactivity score among the three peptides (Table 1). Collectively, these predictions suggest that the rational modifications introduced into NI-A and NI-B successfully improved structural and functional traits associated with AMP efficacy, supporting their selection for experimental evaluation.

Table 1. Some biochemical characteristics of the peptide Nicotianin-I (NI) and its two analogues (NI-A and NI-B).

Characteristics	KHYSCTRHGYCLACYKRW (NI)	KKFSCTWRRFCLACFKRF (NI-A)	RRFCLACFKR (NI-B)
Molecular mass ¹	2275.65 Da	2327.86	1299.62
pI ¹	9.36	10.34	10.79
Hydrophobicity ²	0.458	0.570	0.465
Hydrophobic moment ²	0.215	0.525	0.140
Net charge ²	+4	+6	+4
Boman index ³	2.37 kcal/mol	2.36 kcal/mol	3.5 kcal/mol
Bioactivity ⁴	0.831737	0.970374	0.797509
Toxic ⁵	Yes	Non	Non

Antigenic determinants ⁶	1	1	0
Cell penetrating peptide ⁷	Non	Yes	Yes
Hemolytic ⁸	Non	Non	Non
Antimicrobial ⁸	Non	Yes	Yes
Antibacterial ⁸	Non	Yes	Yes
Antifungal ⁸	Non	Yes	Yes

1-https://web.expasy.org/compute_pi/ ; 2-<https://heliquet.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>; 3-
<https://aps.unmc.edu/prediction/>; 4-<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>; 5-
<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/design.php>; 6-<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>; 7 -
http://crdd.osdd.net/raghava/cellppd/multi_pep.php; 8-<https://dbaasp.org/tools?page=linear-amp-prediction>.

5.3.3 Antibacterial activity of the two new peptide analogues

Experimental validation confirmed that NI-A and NI-B possess enhanced antibacterial properties relative to NI (Fig. 1A). NI demonstrated moderate inhibitory activity across the four bacterial strains tested: 35.5% for *S. aureus*, 34.4% for *S. epidermidis*, 7.75% for *K. pneumoniae*, and 16.4% for *P. aeruginosa*. In contrast, NI-A exhibited a pronounced improvement against *S. epidermidis*, reaching 86% inhibition, representing more than a two-fold increase relative to NI. Moreover, NI-A maintained comparable or slightly improved activity against *K. pneumoniae* (11%) and *P. aeruginosa* (22%). NI-B, although less broad in activity, showed a marked improvement against *K. pneumoniae*, increasing inhibition from 7.75% (NI) to 60%. Both analogues showed reduced activity against *S. aureus*, indicating that the modifications improved activity in a strain-dependent manner. Based on these results, the subsequent mechanistic and structural analyses were focused on *S. epidermidis* for NI-A and *K. pneumoniae* for NI-B, species for which each peptide demonstrated their highest activity.

These findings were corroborated by the cell viability assay (Fig. 1B). NI-A at 200 and 100 μ M reduced the metabolic activity of *S. epidermidis* by approximately 90%, consistent with its inhibitory effect in planktonic assays. For *K. pneumoniae*, NI-B at 100 μ M reduced viability by nearly 60%, matching the antibacterial pattern observed in Fig. 1A. Together, these results confirm the superior antibacterial performance of the designed analogues.

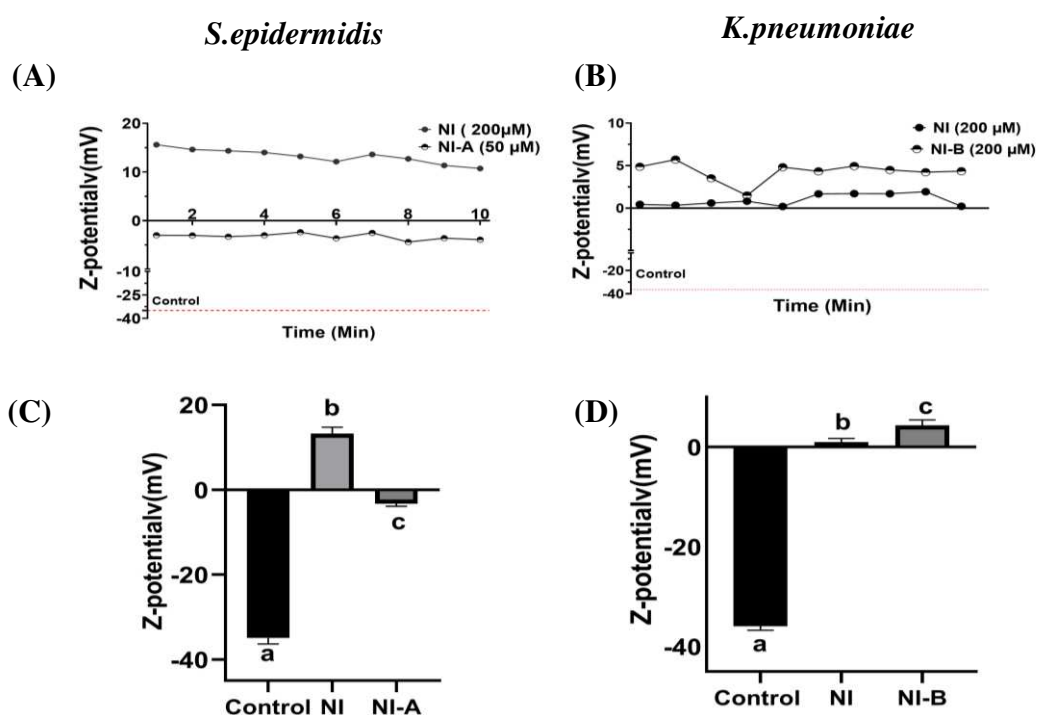
5.3.4 Mechanisms of action of the peptide analogues

5.3.4.1 Zeta potential analysis

Zeta potential measurements revealed strong electrostatic interactions between the peptides and bacterial surfaces. In *S. epidermidis*, NI (200 μ M) shifted the surface charge to positive values (+12 to +15 mV), indicating substantial peptide adsorption and membrane neutralization (Fig. 2A and C). NI-A produced a similar effect even at a four-fold lower concentration (50 μ M), bringing the zeta potential close to neutrality (–2 to –4 mV). In contrast, NI induced modest changes in *K. pneumoniae* (0 to +2 mV), consistent with its limited antibacterial activity. NI-B, however, produced a more pronounced positive shift (+3 to +5 mV), supporting its stronger affinity for the *K. pneumoniae* surface and aligning with its improved antibacterial effect (Fig. 2B and D).

5.3.4.2 Membrane permeabilization and ROS production

Propidium iodide (PI) assays demonstrated that both NI-A and NI-B compromised membrane integrity (Fig. 2E). NI-A caused significantly higher PI uptake in *S. epidermidis* than NI, indicating substantial membrane permeabilization. NI-B showed more moderate but still detectable effect in *K. pneumoniae*. DCF fluorescence assays revealed distinct patterns of oxidative stress (Fig. 2F). None of the peptides increased ROS levels in *S. epidermidis*, suggesting that membrane disruption is the primary mechanism for NI-A in this species. In *K. pneumoniae*, however, both NI and NI-B significantly elevated ROS levels, indicating that oxidative stress may contribute to bacterial killing in Gram-negative cells.



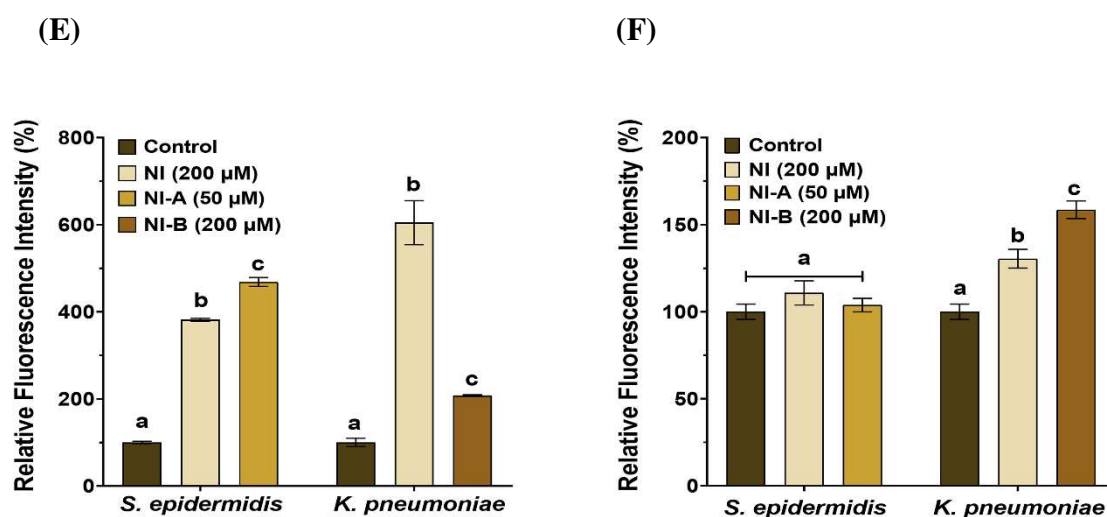


Fig. 2. Mechanism of action of Nicotianin-I (NI) and its two analogues on *Staphylococcus epidermidis* and *Klebsiella pneumoniae*. (A–B) Zeta potential profiles of bacterial suspensions exposed to NI and its two analogues. Ten consecutive measurements were recorded for each condition; values represent means from two independent experiments. (C–D) Bar-plot representation of mean zeta potential after 10 min of peptide exposure. (E) Membrane integrity assessed by propidium iodide fluorescence. (F) Intracellular oxidative stress assessed by DCFH-DA fluorescence. Sterile water was used as the negative control (E–F). Bars represent mean \pm standard deviation of three independent experiments. Different letters indicate statistically significant differences relative to the control ($p < 0.05$).

5.3.4.3 SEM morphological analysis

Scanning electron microscopy provided visual support for the membrane damage effects (Fig. 3). Control *K. pneumoniae* cells maintained smooth surfaces and intact morphology, often embedded in extracellular matrix. NI treatment caused only mild surface wrinkling, with most cells retaining structural integrity. By contrast, NI-B induced extensive morphological damage, including membrane collapse, cell deformation, and abundant debris, indicative of severe membrane disruption and lysis. Although SEM revealed only minor morphological changes in NI-treated cells, propidium iodide uptake indicated marked membrane permeabilization (Fig. 2E). This apparent discrepancy likely reflects the higher sensitivity of PI to subtle and transient membrane perturbations, such as nanoscale pore formation or localized lipid disorder, which are not detectable by SEM. Together, these results indicate that NI primarily impairs membrane function without causing immediate structural rupture, in contrast to NI-B, which induces severe and irreversible membrane damage.

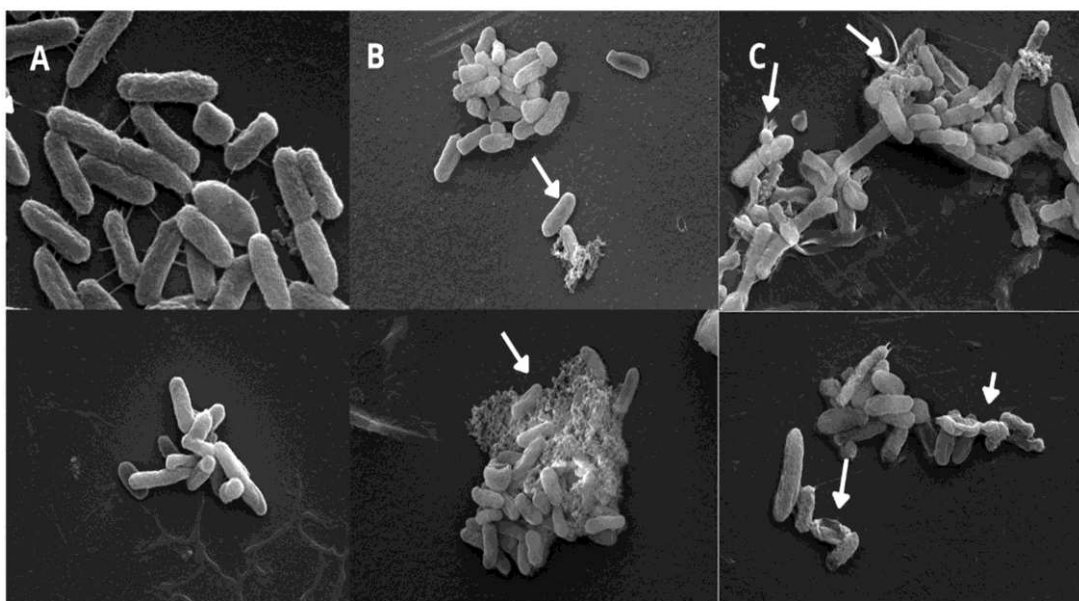


Fig. 3. Scanning electron microscopy (SEM) analysis of *Klebsiella pneumoniae* after peptide treatment. **(A)** Control (sterile water): cells appear aggregated, with smooth surfaces, well-defined contours, and evident extracellular matrix. **(B)** Nicotianin-I (NI): cells largely maintain structural integrity, showing intact or slightly wrinkled surfaces with minimal signs of lysis. **(C)** NI-B: extensive morphological damage characterized by abundant cellular debris, wrinkled and collapsed membranes, and the presence of budding or deformed structures.

5.3.5 Structural characterization of the peptide analogues

5.3.5.1 Helical wheel and structural models

Helical wheel projections highlighted distinct amphipathic profiles among NI and its analogues (Fig. 4). NI displayed a weakly defined amphipathic organization with irregular distribution of hydrophobic and cationic residues, corresponding to a low hydrophobic moment. NI-A exhibited a much more pronounced amphipathic pattern, with well-segregated hydrophobic and positively charged faces and a substantially higher hydrophobic moment (Table 1). NI-B, although shorter, retained a compact amphipathic arrangement with high charge density. Structural modeling showed that NI-A maintained a stable α -helical conformation similar to NI, consistent with its enhanced membrane activity, whereas NI-B adopted a more flexible and disordered conformation due to its reduced length.

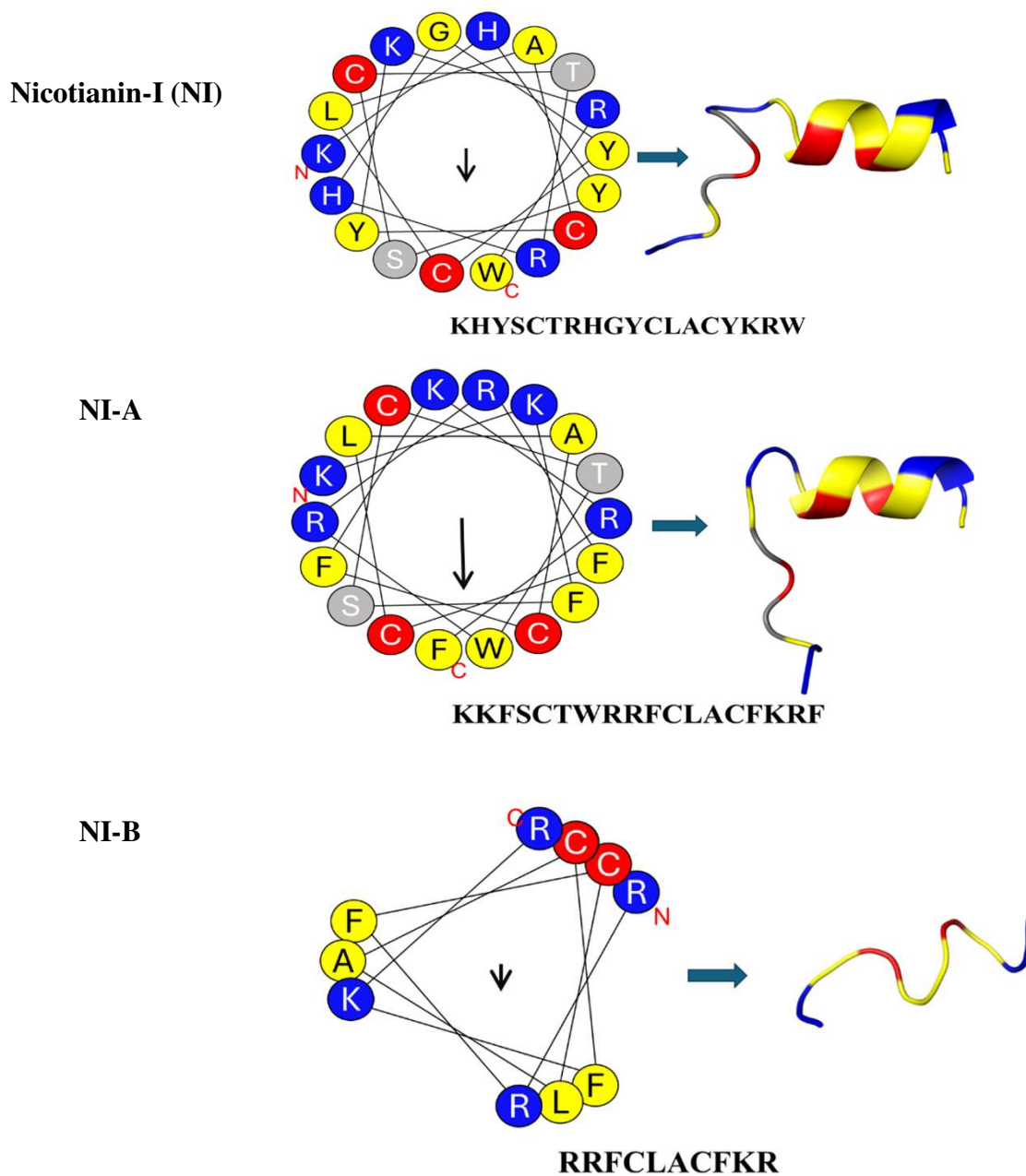


Fig. 4. Helical wheel projections and three-dimensional models of Nicotianin-I (NI) and its two analogues (NI-A and NI-B). Helical wheel projections were generated at physiological pH (7.0) using the HeliQuest program (<https://heliquet.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParamsV2.py>). The black arrow indicates the direction and magnitude of the hydrophobic moment. Amino acid residues are color-coded as follows: hydrophobic (yellow), positively charged (blue), uncharged polar (gray), and cysteine (red).

5.3.5.2 Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism analysis confirmed that both peptides remained largely unstructured in aqueous environments across different pH ranges (Fig. 5). Minor differences in ellipticity were observed, with NI-A showing a slightly more defined negative band near 205 nm. However, neither peptide exhibited the double minima at 208 and 222 nm characteristic of stable α -helical structures. In contrast, the presence of 50% TFE — an environment mimicking the hydrophobicity of biological membranes — induced marked structural changes. NI-A adopted a well-defined α -helix with clear minima at 208/222 nm, whereas NI-B displayed partial helical formation. These results align with the behavior typical of amphipathic AMPs, which remain disordered in water solution but undergo disorder-to-helix transitions upon contact with membrane-like environments.

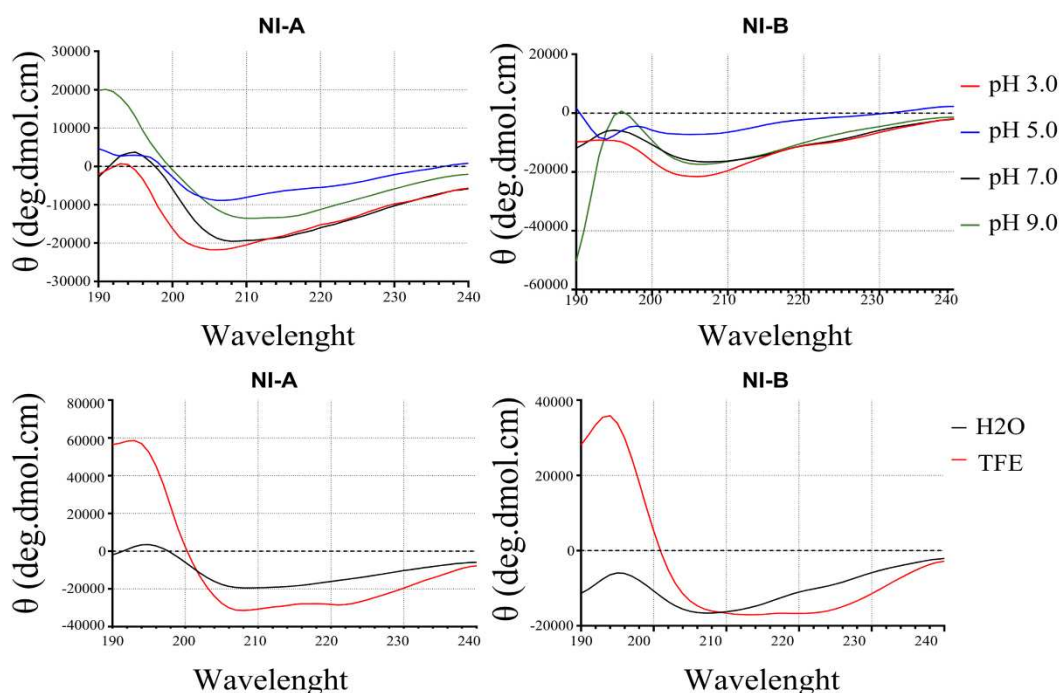


Fig. 5. Circular dichroism (CD) spectra of peptides NI-A and NI-B at different pH values and in the presence of 50% trifluoroethanol (TFE). The spectra are plotted as molar ellipticity versus wavelength (nm).

5.3.6 Cytotoxicity of the modified peptides

Hemolysis assays revealed distinct cytotoxicity profiles for the two analogues. NI-A exhibited concentration-dependent hemolysis, with detectable effects beginning at 1.56 μ M (5%) and reaching approximately 48% at 200 μ M. In contrast, NI-B displayed an exceptional

safe profile, with hemolysis values remaining between 3–4% across all tested concentrations and no statistically significant differences from the negative control.

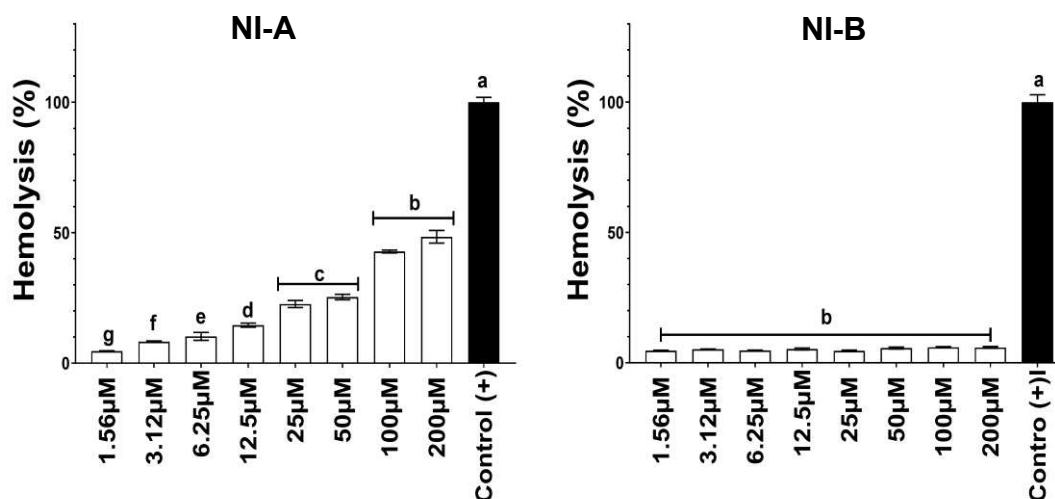


Fig. 6. Hemolysis assay results of peptides against human erythrocytes. Data are presented as mean \pm standard deviation. Triton 0.2% was used as the positive control (100%). Different letters indicate statistically significant differences compared with the negative control ($p < 0.05$).

5.4 Discussion

Among the six floral nectar-derived peptides initially evaluated, Nicotianin-I (NI) was the only molecule showing consistent inhibitory activity, particularly against *S. aureus* and *S. epidermidis*. Its physicochemical profile, including cationic charge, moderate hydrophobicity and amphipathic organization, is consistent with what the literature describes as decisive for the efficacy of antimicrobial peptides (Oliveira Júnior et al., 2025; Neto et al., 2025). Although its activity remained modest — as expected for many unrefined natural AMPs — NI’s antibacterial activity positioned it as a suitable template for further engineering. This strategy reflects a common trajectory in AMP development, where natural sequences serve as scaffolds for the design of more potent derivatives (Gagat et al., 2024; Ma et al., 2024).

The modified peptides NI-A and NI-B exhibited clear enhancements in physicochemical traits known to favor interactions with bacterial membranes. Computational analysis predicted increases in net positive charge, hydrophobicity, and amphipathicity — features closely associated with AMP potency (Mwangi et al., 2023). These predictions were validated experimentally. NI-A displayed more than a two-fold improvement in antibacterial activity

against *S. epidermidis*, while NI-B showed a striking increase in inhibition of *K. pneumoniae*. These findings are consistent with research showing that specific adjustments in charge, hydrophobicity, and amphipathicity can significantly increase the effectiveness of antimicrobial peptides, mainly by intensifying the initial interaction with bacterial surfaces and promoting subsequent membrane destabilization (Gagat et al., 2024). This strategy has gained prominence in contemporary research aimed at tackling antimicrobial resistance (AMR). A striking example is the study by Xiang et al (2022), who developed a rational framework for designing cationic (Arg-rich) and hydrophobic (Trp-rich) peptides targeted at combating multidrug-resistant pathogens from the ESKAPE group. The authors demonstrated that optimizing these physicochemical properties not only generated peptides with a broad spectrum of action but also maintained high efficacy against strains resistant to last-line antibiotics.

Mechanistic assays further revealed that the enhanced antibacterial activities of NI-A and NI-B arise from distinct modes of interaction with bacterial cells. NI-A efficiently approximated the surface charge of *S. epidermidis* to neutrality and caused pronounced membrane permeabilization, as evidenced by elevated PI uptake. Importantly, NI-A did not induce ROS production, indicating that its bactericidal effect is primarily mediated through membrane disruption rather than intracellular oxidative stress. In contrast, NI-B produced a consistent increase in zeta potential in *K. pneumoniae*, followed by measurable ROS generation. Despite only modest membrane permeabilization, NI-B caused extensive cellular damage visualized by SEM, suggesting that oxidative stress acts as a key driver of cell death in this Gram-negative species. Thus, NI-B can exert its bactericidal effect mainly through intracellular pathways, triggering intense oxidative stress. This may involve respiratory chain dysfunction, redox imbalance, or damage to essential proteins (Hong et al., 2019; Zhong et al., 2025) According to Narasingappa and Vyas (2024), AMPs can act by destabilizing the bacterial respiratory chain without causing immediate lysis. In this model, the peptide interacts with oxidative phosphorylation enzymes, causing electron leakage and the consequent uncontrolled generation of free radicals. Together, these findings underscore that rational design not only improves peptide potency but can also diversify the mechanisms through which peptides exert antibacterial action. The strain-dependent profiles and different mechanisms of action observed for the two analogues highlight the influence of membrane composition on peptide performance and emphasize that small modifications can redirect antimicrobial specificity (Lohan et al., 2023; Agrillo et al., 2025; Conde-Torres et al., 2024).

Structural characterization provided further insight into these functional differences. Helical wheel projections and molecular modeling revealed that NI-A possesses a well-defined amphipathic structure and retains the capacity to adopt a stable α -helical conformation, especially in environments that mimic membranes, as indicated by the presence of phenylalanine, leucine, tryptophan, and cysteine distributed in such a way as to reinforce the hydrophobic core (Fathi et al., 2024; Klousnitzer et al., 2024). In concordance, circular dichroism showed that NI-A remained largely unstructured in aqueous solution but transitioned to a canonical α -helix in the presence of TFE, reflecting a conditional folding mechanism typical of membrane-active AMPs (Conde-Torres et al., 2024; Putri et al., 2025). In NI-B, the drastic reduction in length and lower hydrophobic segregation resulted in a less organized structure, with partial amphipathicity and interruptions in the continuous hydrophobic regions, characteristics of peptides with low helical propensity (Mitra et al., 2024; Fathi et al., 2024). These structural elements were confirmed in the CD spectra of NI-B. Although NI-B acquired only partial ordering in TFE, its ability to function without robust secondary structure is consistent with several short AMPs that rely on conformational adaptability rather than stable helices (Balleza, 2025; Tang et al., 2023). In the study of Oliva et al (2022), the authors investigated the GK Y20 peptide and its reduced version, GK Y10, demonstrating that, even with a large difference in length, the short version retains the ability to adopt an α -helical conformation when interacting with model membranes. Like GK Y10, NI-B showed low helicity in aqueous solution but maintained functionality. This suggests that, as in the case of GK Y10, NI-B may depend on structural rearrangements induced by the membrane environment to exert its activity.

The hemolysis results reveal that the structural modifications implemented in the peptides produced distinct consequences for their biological selectivity. Although both modified peptides exhibit superior antimicrobial performance to NI for each target bacterium (*S. epidermidis* for NI-A and *K. pneumoniae* for NI-B), only NI-B managed to maintain this gain without significantly compromising the integrity of human erythrocytes cells, which reinforces that its hydrophobic reorganization favored a more specific interaction with bacterial membranes (Pirtskhalava et al., 2021). The hemolytic profile of NI-B was similar to that described by Neto et al. (2024) for the NI peptide, which showed low cytotoxicity up to 100 μ M. However, NI-B demonstrated slightly superior performance, maintaining minimal levels of hemolysis even at the highest concentration tested (200 μ M), indicating that its structural modifications increased selectivity for bacterial membranes without compromising the integrity

of human erythrocytes. On the other hand, the increase in hydrophobicity and amphipathicity in NI-A enhanced its antimicrobial activity at the cost of greater affinity for eukaryotic membranes, resulting in dose-dependent hemolysis.

More specifically, NI-A exhibited a marked increase in hydrophobicity (0.458 to 0.570), hydrophobic moment (0.215 to 0.525), and net positive charge (+4 to +6), indicating that the simultaneous amplification of amphipathic organization and electrostatic attraction likely intensified its nonspecific interaction with zwitterionic erythrocyte membranes. This set of modifications suggests that the peptide exceeded the hydrophobic–cationic balance associated with selectivity, shifting its behavior toward a more membranolytic and less discriminatory profile between bacterial and eukaryotic membranes. Thus, the data indicate that not merely the isolated increase of a single parameter, but rather the synergistic combination of elevated hydrophobicity, enhanced hydrophobic moment, and greater cationic density was determinant for the increased hemolysis observed. This pattern highlights a recurring challenge in the development of AMPs: optimizations aimed at potency may inadvertently increase cytotoxicity if they exceed the structural threshold necessary to ensure selectivity (Hollmann et al., 2016).

In general, the hemolysis results obtained for NI-A and NI-B accurately reflect the structural balance described in the literature for the rational improvement of antimicrobial peptides. The study conducted by Gagat et al. (2024) highlights that increases in hydrophobicity, positive charge, and amphipathic organization can intensify antimicrobial activity, but only when these parameters are adjusted within a "selectivity window" that prevents excessive interaction with eukaryotic membranes. In the present study, NI-A exceeds this limit; although its structural modification has enhanced its action against *S. epidermidis*, the gain in hydrophobicity has promoted a more aggressive insertion into the erythrocyte bilayer, resulting in progressive hemolysis. In contrast, the changes made to NI-B remained within this ideal range, enhancing its action against *K. pneumoniae* without inducing significant damage to human cells.

5.5 Conclusion

This study demonstrates that rational modification of the Nicotianin-I (NI) peptide can generate structurally distinct analogues with enhanced and strain-specific antibacterial activity. Targeted adjustments in charge, hydrophobicity, and spatial organization resulted in two

optimized peptides with divergent mechanisms of action. NI-A primarily exerted its antibacterial effect through pronounced membrane permeabilization, whereas NI-B acted mainly by inducing oxidative stress. Importantly, these functional gains were associated with different selectivity profiles: while increased amphipathicity improved NI-A activity, it also promoted hemolysis, whereas NI-B maintained strong antibacterial performance with minimal cytotoxicity. Together, these findings highlight the potential of rational peptide engineering to enhance AMP efficacy while emphasizing the need to balance potency and safety. Further studies addressing proteolytic stability, molecular determinants of ROS generation, membrane interaction dynamics, and *in vivo* efficacy will be essential to validate NI-derived peptides as viable antimicrobial candidates and to guide future optimization strategies.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Contributions

D.R.A.L. Mourão., J.M.M. Neto, Q.L.S.G. Chaves, M.F. Oliveira, V.O. Silva, A.F.N. Mesquita, U.M. Paz-Junior, A.H. Sampaio, R.F. Carneiro: Methodology and validation; C.D.T. Freitas: Conceptualization, project administration, funding acquisition. D.R.A.L. Mourão, J.M.M. Neto, R.F. Carneiro, and C.D.T Freitas: Data curation, formal analysis, writing - original draft, writing - review & editing.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISANO/Pró-Equipamentos CAPES and the following Brazilian agencies that supported this work: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

Referencias

- ALMEIDA, L. H. de O.; OLIVEIRA, C. F. R. de; RODRIGUES, M. de S.; NETO, S. M.; BOLETI, A. P. de A.; TAVEIRA, G. B.; MELLO, É. de O.; GOMES, V. M.; SANTOS, E. L. dos; CRUSCA, E.; FRANCO, O. L.; CARDOSO, M. H. e S.; MACEDO, M. L. R. Adepamycin: design, synthesis and biological properties of a new peptide with antimicrobial properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 691, p. 108487, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108487>
- AGRILLO, B.; AMBROSIO, M.; AMBROSIO, R. L.; GOGLIETTINO, M.; BALESTRIERI, M.; PORRITIELLO, A.; PERUZY, M. F.; MANCUSI, A.; NICOLAIS, L.; PALMIERI, G. Discovery of a Potent Antimicrobial Peptide Through Rational Design: A New Frontier in Pathogen Control. *Biomolecules*, v. 15, n. 7, p. 989, 2025. <https://doi.org/10.3390/biom15070989>
- AGUIAR, T. K. B.; NETO, N. A. S.; FREITAS, C. D. T.; SILVA, A. F. B.; BEZERRA, L. P.; MALVEIRA, E. A.; BRANCO, L. A. C.; MESQUITA, F. P.; GOLDMAN, G. H.; ALENCAR, L. M. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; SOUZA, P. F. N. Antifungal Potential of Synthetic Peptides against *Cryptococcus neoformans*: Mechanism of Action Studies Reveal Synthetic Peptides Induce Membrane–Pore Formation, DNA Degradation, and Apoptosis. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 8, p. 1678, 2022. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081678>
- BALLEZA, D. The Role of Flexibility in the Bioactivity of Short α -Helical Antimicrobial Peptides. *Antibiotics*, v. 14, n. 5, p. 422, 2025. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14050422>
- BIN HAFEEZ, A.; JIANG, X.; BERGEN, P. J.; ZHU, Y. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 21, p. 11691, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms222111691>
- BOIX-LEMONCHE, G.; LEKKA, M.; SKERLAVAJ, B. A Rapid Fluorescence-Based Microplate Assay to Investigate the Interaction of Membrane Active Antimicrobial Peptides with Whole Gram-Positive Bacteria. *Antibiotics*, v. 9, n. 2, p. 92, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020092>

- CHEN, C. H.; LU, T. K. Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 24, 2020. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010024>
- CHEN, N.; JIANG, C. Antimicrobial peptides: Structure, mechanism, and modification. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 255, p. 115377, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115377>
- CHERENE, M. B.; TAVEIRA, G. B.; ALMEIDA-SILVA, F.; SILVA, M. S.; CAVACO, M. C.; SILVA-FERREIRA, A. T.; PERALES, J. E. A.; CARVALHO, A. O.; VENÂNCIO, T. M.; MOTTA, O. V.; RODRIGUES, R.; CASTANHO, M. A. R. B.; GOMES, V. M. Structural and Biochemical Characterization of Three Antimicrobial Peptides from *Capsicum annuum* L. var. *annuum* Leaves for Anti-*Candida* Use. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 16, n. 4, p. 1270–1287, 2024. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10112-3>
- CONDE-TORRES, D.; CALVELO, M.; ROVIRA, C.; PIÑEIRO, Á.; GARCIA-FANDINO, R. Unlocking the specificity of antimicrobial peptide interactions for membrane-targeted therapies. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 25, p. 61–74, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2024.04.022>
- DA SILVA NETO, J. X.; DIAS, L. P.; LOPES DE SOUZA, L. A.; SILVA DA COSTA, H. P.; VASCONCELOS, I. M.; PEREIRA, M. L.; DE OLIVEIRA, J. T. A.; CARDOZO, C. J. P.; GONÇALVES MOURA, L. F. W.; DE SOUSA, J. S.; CARNEIRO, R. F.; LOPES, T. D. P.; BEZERRA DE SOUSA, D. de O. Insights into the structure and mechanism of action of the anti-candidal lectin Mo-CBP2 and evaluation of its synergistic effect and antibiofilm activity. **Process Biochemistry**, v. 121, p. 661–673, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.08.004>
- DONG, J.; ZHU, L.; SUN, Z.; MANDLAA; CHEN, Z. Purification and structural characterization of APTs, a novel antifungal peptide produced by *Lactobacillus paracasei* ALAC-4, and its inhibitory effect on *Candida albicans*. **LWT**, v. 199, p. 116077, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116077>
- FATHI, F.; ALIZADEH, B.; TABARZAD, M. V.; TABARZAD, M. Important structural features of antimicrobial peptides towards specific activity: Trends in the development of

- efficient therapeutics. **Bioorganic Chemistry**, v. 149, p. 107524, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107524>
- GAGAT, P.; OSTRÓWKA, M.; DUDA-MADEJ, A.; MACKIEWICZ, P. Enhancing Antimicrobial Peptide Activity through Modifications of Charge, Hydrophobicity, and Structure. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 19, p. 10821, 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms251910821>
- HOLLMANN, A.; MARTÍNEZ, M.; NOGUERA, M. E.; AUGUSTO, M. T.; DISALVO, A.; SANTOS, N. C.; SEMORILE, L.; MAFFÍA, P. C. Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide–membrane interactions of three related antimicrobial peptides. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 528–536, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.003>
- HONG, Y.; ZENG, J.; WANG, X.; DRLICA, K.; ZHAO, X. Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 116, n. 20, p. 10064–10071, 2019. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901730116>
- HUAN, Y.; KONG, Q.; MOU, H.; YI, H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
- KR, G.; BALENAHALLI NARASINGAPPA, R.; VISHNU VYAS, G. Unveiling mechanisms of antimicrobial peptide: Actions beyond the membranes disruption. **Heliyon**, v. 10, n. 19, p. e38079, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38079>
- KARIUKI, S. Global burden of antimicrobial resistance and forecasts to 2050. **The Lancet**, v. 404, n. 10459, p. 1172–1173, 2024. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01885-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01885-3)
- KIM, S. H.; MIN, Y.-H.; PARK, M. C. Antimicrobial Peptides: Current Status, Mechanisms of Action, and Strategies to Overcome Therapeutic Limitations. **Microorganisms**, v. 13, n. 11, p. 2574, 2025. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13112574>
- KLOUSNITZER, J.; XIANG, W.; POLYNICE, V. M.; DESLOUCHES, B. Comparative Properties of Helical and Linear Amphipathicity of Peptides Composed of Arginine, Tryptophan, and Valine. **Antibiotics**, v. 13, n. 10, p. 954, 2024. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13100954>

- LI, J.; HU, S.; JIAN, W.; XIE, C.; YANG, X. Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. **Botanical Studies**, v. 62, n. 1, p. 5, 2021. <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00312-x>
- LI, X.; ZUO, S.; WANG, B.; ZHANG, K.; WANG, Y. Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2675, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27092675>
- LIMA, P. G.; OLIVEIRA, J. T. A.; AMARAL, J. L.; FREITAS, C. D. T.; SOUZA, P. F. N. Synthetic antimicrobial peptides: Characteristics, design, and potential as alternative molecules to overcome microbial resistance. **Life Sciences**, v. 278, p. 119647, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119647>
- LOHAN, S.; KONSHINA, A. G.; EFREMOV, R. G.; MASLENNIKOV, I.; PARANG, K. Structure-Based Rational Design of Small α -Helical Peptides with Broad-Spectrum Activity against Multidrug-Resistant Pathogens. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, n. 1, p. 855–874, 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01708>
- LUO, Y.; SONG, Y. Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11401, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms222111401>
- MA, X.; WANG, Q.; REN, K.; XU, T.; ZHANG, Z.; XU, M.; RAO, Z.; ZHANG, X. A Review of Antimicrobial Peptides: Structure, Mechanism of Action, and Molecular Optimization Strategies. **Fermentation**, v. 10, n. 11, p. 540, 2024 a. <https://doi.org/10.3390/fermentation10110540>
- MAHARJAN, R.; KHAN, A. I.; NADEEM-UL-HAQUE, M.; MARESCA, M.; CHOUDHARY, M. I.; SHAHEEN, F.; SIMJEE, S. U. Serum Stable and Low Hemolytic Temporin-SHa Peptide Analogs Disrupt Cell Membrane of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 14, n. 2, p. 391–405, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09915-7>
- MARCZAK, B.; BOCIAN, A.; ŁYSKOWSKI, A. Antimicrobial Peptide Databases as the Guiding Resource in New Antimicrobial Agent Identification via Computational Methods. **Molecules**, v. 30, n. 6, p. 1318, 2025. <https://doi.org/10.3390/molecules30061318>
- MITRA, S.; CHANDERSEKHAR, B.; LI, Y.; COOPERSHLYAK, M.; MAHONEY, M. E.; EVANS, B.; KOENIG, R.; HALL, S. C. L.; KLÖSGEN, B.; HEINRICH, F.;

- DESLOUCHES, B.; TRISTRAM-NAGLE, S. Novel non-helical antimicrobial peptides insert into and fuse lipid model membranes. *Soft Matter*, v. 20, n. 20, p. 4088–4101, 2024. <https://doi.org/10.1039/D4SM00220B>
- MWANGI, J.; KAMAU, P.; THUKU, R.; LAI, R. Design Methods for Antimicrobial Peptides with Improved Performance. *Zoological Research*, v. 0, n. 0, p. 0–0, 2023. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2023.246>
- NETO, J. M. M.; AGUIAR, T. K. B.; OLIVEIRA, M. F.; CHAVES, Q. L. S. G.; MOURÃO, D. R. A. L.; SILVA, V. O.; NASCIMENTO, M. T. V.; CARNEIRO, R. F.; MARTINS, R. X.; FARIAS, D. F.; SOUSA, B. F.; SOUSA, J. S.; RAMOS, M. V.; FREITAS, C. D. T. Nicotianin-I: A Tobacco Floral Nectar Peptide with Anticandidal Activity. *ACS Omega*, 2025. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c10806>
- OLIVA, R.; CAMPANILE, M.; DEL VECCHIO, P.; PIZZO, E.; BOSSO, A.; WINTER, R.; PETRACCONE, L. The C-terminus of the GKY20 antimicrobial peptide, derived from human thrombin, plays a key role in its membrane perturbation capability. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 24, n. 13, p. 7994–8002, 2022. <https://doi.org/10.1039/D1CP05857F>
- OLIVEIRA JÚNIOR, N. G.; SOUZA, C. M.; BUCCINI, D. F.; CARDOSO, M. H.; FRANCO, O. L. Antimicrobial peptides: structure, functions and translational applications. *Nature Reviews Microbiology*, 2025 . <https://doi.org/10.1038/s41579-025-01200-y>
- OLIVEIRA, J. T. A.; SOUZA, P. F. N.; VASCONCELOS, I. M.; DIAS, L. P.; MARTINS, T. F.; VAN TILBURG, M. F.; GUEDES, M. I. F.; SOUSA, D. O. B. Mo-CBP3-PepI, Mo-CBP3-PepII, and Mo-CBP3-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability. *Biochimie*, v. 157, p. 10–21, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.10.016>
- PARRA, A. L. C.; FREITAS, C. D. T.; SOUZA, P. F. N.; VON ADERKAS, P.; BORCHERS, C. H.; BEATTIE, G. A.; SILVA, F. D. A.; THORNBURG, R. W. Ornamental tobacco floral nectar is a rich source of antimicrobial peptides. *Plant Science*, v. 324, p. 111427, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111427>
- PIRTSKHALAVA, M.; AMSTRONG, A. A.; GRIGOLAVA, M.; CHUBINIDZE, M.; ALIMBARASHVILI, E.; VISHNEPOLSKY, B.; GABRIELIAN, A.; ROSENTHAL, A.; HURT, D. E.; TARTAKOVSKY, M. DBAASP v3: database of antimicrobial/cytotoxic

- activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D288–D297, 2021. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa991>
- PUTRI, R. A.; HABIBIE, A.; DHAR, P.; KUCZERA, K.; SWASONO, R. T.; ROHMAN, M. S.; RAHARJO, T. J.; SIAHAAN, T. J. Design, Structural Stability, Membrane Binding, and Antibacterial Activity of Novel Antimicrobial Peptides Derived from Wuchuanin-A1. **Life**, v. 15, n. 10, p. 1568, 2025. <https://doi.org/10.3390/life15101568>
- TANG, Z. et al. Design and evaluation of tadpole-like conformational antimicrobial peptides. **Communications Biology**, v. 6, n. 1, p. 1177, 2023. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05560-0>
- XIANG, W.; CLEMENZA, P.; KLOUSNITZER, J.; CHEN, J.; QIN, W.; TRISTRAM-NAGLE, S.; DOI, Y.; DI, Y. P.; DESLOUCHES, B. Rational Framework for the Design of Trp- and Arg-Rich Peptide Antibiotics Against Multidrug-Resistant Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.889791>
- ZHONG, C.; HE, Y.; ZOU, J.; GAO, L.; WANG, J.; ZHU, J.; XUE, W.; GOU, S.; ZHANG, Y.; LIU, H.; NI, J. An antimicrobial peptide as a potential therapy for bacterial pneumonia that alleviates antimicrobial resistance. **Nature Communications**, v. 16, n. 1, p. 10488, 2025. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-65449-w>
- ZOU, X.; BK, A.; ABU-IZNEID, T.; AZIZ, A.; DEVNATH, P.; RAUF, A.; MITRA, S.; EMRAN, T. B.; MUJAWAH, A. A. H. Current advances of functional phytochemicals in *Nicotiana* plant and related potential value of tobacco processing waste: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 143, p. 112191, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112191>

REFERÊNCIAS

- AHMED, S. K.; HUSSEIN, S.; QURBANI, K.; IBRAHIM, R. H.; FAREEQ, A.; MAHMOOD, K. A.; MOHAMED, M. G. Antimicrobial resistance: impacts, challenges, and future prospects. **Journal of Medicine, Surgery, and Public Health**, [s. l.], v. 2, p. 100081, 2024.
- BARROSO, L. K. D.; MARTINS, B. C. C.; LIMA, F. W. B. de; SILVA, A. R. da; SOUSA, J. G. de; FONTELES, M. M. de F. The economic impact of healthcare-associated infections in hospitalization in intensive care units. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, Campinas, v. 23, n. 5, p. e13053, 2023. DOI: 10.25248/reas.e13053.2023.
- BERGER, I.; LOEWY, Z. G. Antimicrobial resistance and novel alternative approaches to conventional antibiotics. **Bacteria**, Basel, v. 3, n. 3, p. 171–182, 2024.
- BERTELSEN, M.; LACEY, M. M.; NICHOL, T.; MILLER, K. Mechanistic insight into the early stages of toroidal pore formation by the antimicrobial peptide Smp24. **Pharmaceutics**, Basel, v. 15, n. 10, p. 2399, 2023.
- BHARADWAJ, A.; RASTOGI, A.; PANDEY, S.; GUPTA, S.; SOHAL, J. S. Multidrug-resistant bacteria: their mechanism of action and prophylaxis. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2022, art. 5419874, 2022.
- BIN HAFEEZ, A.; JIANG, X.; BERGEN, P. J.; ZHU, Y. Antimicrobial peptides: an update on classifications and databases. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n. 21, p. 11691, 2021.
- BUCATARU, C.; CIOBANASU, C. Antimicrobial peptides: opportunities and challenges in overcoming resistance. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 286, p. 127822, 2024.
- BURKE, Ó.; ZEDEN, M. S.; O'GARA, J. P. The pathogenicity and virulence of the opportunistic pathogen *Staphylococcus epidermidis*. **Virulence**, Abingdon, v. 15, n. 1, 2024.
- CHAWLA, K.; PIVETEAU, P.; SHARMA, S. *Klebsiella pneumoniae*: a connecting link in the One Health concept. **Pathogens and Global Health**, Abingdon, v. 119, n. 5-6, p. 184–197, 2025.
- CHEN, N.; JIANG, C. Antimicrobial peptides: structure, mechanism, and modification. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 255, p. 115377, 2023.
- CHEN, Z. Mechanisms and clinical relevance of *Pseudomonas aeruginosa* heteroresistance. **Surgical Infections**, Larchmont, v. 24, n. 1, p. 27–38, 2023.
- CHEUNG, G. Y. C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis*—key to understanding biofilms, commensalism, and more. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 207, n. 9, 2025.
- CONDE-TORRES, D.; CALVELO, M.; ROVIRA, C.; PIÑEIRO, Á.; GARCIA-FANDINO, R. Unlocking the specificity of antimicrobial peptide interactions for membrane-targeted therapies. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, Amsterdam, v. 25, p. 61–74, 2024.

DE PASCALE, L.; D'AMORE, A.; DI STASI, A.; MORICI, M.; PACOR, S.; TOSSI, A.; PHAM, T. D.; FABBRETTI, A.; WILSON, D. N.; MARDIROSSIAN, M.; SCOCCHI, M. Testing antimicrobial peptides inhibiting protein synthesis in living *E. coli* and *K. pneumoniae* using bio-orthogonal non-canonical amino-acid tagging. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 16, 2025.

DING, L.; SHEN, S.; CHEN, J.; TIAN, Z.; SHI, Q.; HAN, R.; GUO, Y.; HU, F. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase variants: the new threat to global public health. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 36, n. 4, 2023.

DU, R.-L.; HUNG, C.-H.; LEUNG, A. S.-L.; DING, K.; KONG, W.-P.; WANG, Y.; LIANG, Z.-G.; CHAN, P.-H.; WONG, K.-Y. Development of broad-spectrum antimicrobial peptides through the conjugation of FtsZ-binding and cell-penetrating peptides. **ACS Infectious Diseases**, Washington, DC, v. 11, n. 8, p. 2190–2204, 2025.

DUBOS, R. J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 70, n. 1, p. 1–10, 1939.

ERRIAH, P.; PUAN, S. L.; YAHAYA, N. M.; WAN AHMAD KAMIL, W. N. I.; AMIN NORDIN, S.; MUHAMAD, A.; SABRI, S. Harnessing bacterial antimicrobial peptides: a comprehensive review on properties, mechanisms, applications, and challenges in combating antimicrobial resistance. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 136, n. 3, 2025.

FALAGAS, M. E.; ASIMOTOU, C.-M.; ZIDROU, M.; KONTOGIANNIS, D. S.; FILIPPOU, C. Global epidemiology and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Gram-negative clinical isolates: a review. **Microorganisms**, Basel, v. 13, n. 7, p. 1697, 2025.

FERNÁNDEZ-CALDERÓN, M. C.; FERNÁNDEZ-BABIANO, I.; NAVARRO-PÉREZ, M. L.; PAZOS-PACHECO, C.; CALVO-CANO, A. Biofilm formation and role of other pathogenic factors in the virulence of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 15, 2025.

GAN, B. H.; GAYNORD, J.; ROWE, S. M.; DEINGRUBER, T.; SPRING, D. R. The multifaceted nature of antimicrobial peptides: current synthetic chemistry approaches and future directions. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 50, n. 13, p. 7820–7880, 2021.

GAUTAM, A.; CHAUDHARY, K.; KUMAR, R.; SHARMA, A.; KAPOOR, P.; TYAGI, A.; RAGHAVA, G. P. S. In silico approaches for designing highly effective cell penetrating peptides. **Journal of Translational Medicine**, London, v. 11, n. 1, p. 74, 2013.

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

GIDEY, K.; GIDEY, M. T.; HAILU, B. Y.; GEBREAMLAK, Z. B.; NIRIAYO, Y. L. Clinical and economic burden of healthcare-associated infections: a prospective cohort study. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 18, n. 2, p. e0282141, 2023.

GROOVER, K. E.; RANDALL, J. R.; DAVIES, B. W. Development of a selective and stable antimicrobial peptide. **ACS Infectious Diseases**, Washington, DC, v. 10, n. 6, p. 2151–2160, 2024.

GUEDES, B. N.; KRAMBECK, K.; DURAZZO, A.; LUCARINI, M.; SANTINI, A.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FATHI, F.; SOUTO, E. B. Natural antibiotics against antimicrobial resistance: sources and bioinspired delivery systems. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 2753–2766, 2024.

HAS, C.; DAS, S. L. The functionality of membrane-inserting proteins and peptides: curvature sensing, generation, and pore formation. **The Journal of Membrane Biology**, New York, v. 256, n. 4-6, p. 343–372, 2023.

HEFZY, E. M.; RADWAN, T. E. E.; HOZAYEN, B. M. M.; MAHMOUD, E. E.; KHALIL, M. A. F. Antiseptics and mupirocin resistance in clinical, environmental, and colonizing coagulase-negative *Staphylococcus* isolates. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, London, v. 12, n. 1, p. 110, 2023.

HONG, Y.; ZENG, J.; WANG, X.; DRLICA, K.; ZHAO, X. Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 116, n. 20, p. 10064–10071, 2019.

HUAN, Y.; KONG, Q.; MOU, H.; YI, H. Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 11, 2020.

HUSSEIN, R. A.; AL-KUBAISY, S. H.; AL-OUQAILI, M. T. S. The influence of efflux pump, outer membrane permeability and β -lactamase production on the resistance profile of multi-, extensively and pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Infection and Public Health**, Riyadh, v. 17, n. 11, p. 102544, 2024.

ISKANDAR, K.; MURUGAIYAN, J.; HAMMOUDI HALAT, D.; HAGE, S. El; CHIBABHAI, V.; ADUKKADUKKAM, S.; ROQUES, C.; MOLINIER, L.; SALAMEH, P.; VAN DONGEN, M. Antibiotic discovery and resistance: the chase and the race. **Antibiotics**, Basel, v. 11, n. 2, p. 182, 2022.

JI, S.; AN, F.; ZHANG, T.; LOU, M.; GUO, J.; LIU, K.; ZHU, Y.; WU, J.; WU, R. Antimicrobial peptides: an alternative to traditional antibiotics. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 265, p. 116072, 2024.

K. R., G.; BALENAHALLI NARASINGAPPA, R.; VISHNU VYAS, G. Unveiling mechanisms of antimicrobial peptide: actions beyond membrane disruption. **Heliyon**, [s. l.], v. 10, n. 19, p. e38079, 2024.

KARDANI, K.; BOLHASSANI, A. Cppsite 2.0: an available database of experimentally validated cell-penetrating peptides predicting their secondary and tertiary structures. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 433, n. 11, p. 166703, 2021.

KARIUKI, S. Global burden of antimicrobial resistance and forecasts to 2050. **The Lancet**, London, v. 404, n. 10459, p. 1172–1173, 2024.

KARMAKAR, S.; DAS, S.; BANERJEE, K. K. Interaction of antimicrobial peptides with model membranes: a perspective towards new antibiotics. **The European Physical Journal Special Topics**, Berlin, v. 233, n. 21-22, p. 2981–2996, 2024.

KIM, S. H.; MIN, Y.-H.; PARK, M. C. Antimicrobial peptides: current status, mechanisms of action, and strategies to overcome therapeutic limitations. **Microorganisms**, Basel, v. 13, n. 11, p. 2574, 2025.

KOCSIS, B. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an update on epidemiology, detection and antibiotic resistance. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, Budapest, v. 70, n. 4, p. 278–287, 2023.

KRŪMIŅA, A.; ZELTIŅA, I.; SIMSONE, P.; EULITZ, E.; REINIS, A.; VĪKSNA, L. Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* resilience against antibiotic treatment and outlooks of emerging treatment strategies. **Medicina**, Basel, v. 62, n. 1, p. 163, 2026.

KUMAR, M.; BALLAMOOLE, K. K.; SHETTY, V. A.; RAO, R. S. P.; GOLLAPALLI, P. Perspective on integrated multi-omics approaches and constraint-based modeling to explore metabolic functionality on the evolution of bacterial antibiotic resistance. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 208, p. 107999, 2025.

KUMAR, R. Expanding horizon of antimicrobial peptides: mechanistic complexity and biomedical potential. **Exploration of Drug Science**, [*s. l.*], v. 3, 2025.

LI, J.; HU, S.; JIAN, W.; XIE, C.; YANG, X. Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. **Botanical Studies**, Taipei, v. 62, n. 1, p. 5, 2021.

LI, X.; ZUO, S.; WANG, B.; ZHANG, K.; WANG, Y. Antimicrobial mechanisms and clinical application prospects of antimicrobial peptides. **Molecules**, Basel, v. 27, n. 9, p. 2675, 2022.

LI, H.; LIU, Y.; GAO, W.; ZHU, J.; ZHANG, H.; WANG, Z.; LIU, C.; LI, X. Genome-wide characterization of small secreted peptides in *Nicotiana tabacum* and functional assessment of NtLTP25 in plant immunity. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 176, n. 4, 2024.

LI, Y.; ROBERTS, J. A.; WALKER, M. M.; ASLAN, A. T.; HARRIS, P. N. A.; SIME, F. B. The global epidemiology of ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, Amsterdam, v. 139, p. 78–85, 2024.

LIU, Q.; WANG, L.; HE, D.; WU, Y.; LIU, X.; YANG, Y.; CHEN, Z.; DONG, Z.; LUO, Y.; SONG, Y. Application value of antimicrobial peptides in gastrointestinal tumors. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 24, n. 23, p. 16718, 2023.

MA, X.; WANG, Q.; REN, K.; XU, T.; ZHANG, Z.; XU, M.; RAO, Z.; ZHANG, X. A review of antimicrobial peptides: structure, mechanism of action, and molecular optimization strategies. **Fermentation**, Basel, v. 10, n. 11, p. 540, 2024.

MACESIC, N.; UHLEMANN, A.-C.; PELEG, A. Y. Multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **The Lancet**, London, v. 405, n. 10474, p. 257–272, 2025.

MACHADO, L. G.; RESENDE, D. S.; CAMPOS, P. A. de; ROSSI, I.; FERREIRA, M. L.; BRAGA, I. A.; AIRES, C. A. M.; TENÓRIO, M. T. F.; GONTIJO-FILHO, P. P.; ROYER, S.; RIBAS, R. M. The burden of healthcare-associated infections in Brazil: multi-hospital point prevalence using a matched case-control study. **São Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 143, n. 2, 2025.

MARCIANO, C. L.; FÉLIX DE LIMA, J. V.; COUTO ROSA, M. S. do; NASCIMENTO, R. A. do; FERRAZ, A. de O.; SILVA, I. C. da; CHRYSOSTOMO-MASSARO, T. N.; ROSA-GARZON, N. G. da; CABRAL, H. A comprehensive overview of antimicrobial peptides: broad-spectrum activity, computational approaches, and applications. **Antibiotics**, Basel, v. 14, n. 11, p. 1115, 2025.

MARCZAK, B.; BOCIAN, A.; ŁYSKOWSKI, A. Antimicrobial peptide databases as the guiding resource in new antimicrobial agent identification via computational methods. **Molecules**, Basel, v. 30, n. 6, p. 1318, 2025.

MATEI, A. T.; VISAN, A. I. Mechanism, efficacy, and safety of natural antibiotics. **Antibiotics**, Basel, v. 14, n. 10, p. 981, 2025.

MIYAZAKI, Y.; SHINODA, W. Cooperative antimicrobial action of melittin on lipid membranes: a coarse-grained molecular dynamics study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Amsterdam, v. 1864, n. 9, p. 183955, 2022.

MWANGI, J.; KAMAU, P.; THUKU, R.; LAI, R. Design methods for antimicrobial peptides with improved performance. **Zoological Research**, Kunming, v. 44, 2023.

NAYLOR, N. R.; HASSO-AGOPSOWICZ, M.; KIM, C.; MA, Y.; FROST, I.; ABBAS, K.; AGUILAR, G.; FULLER, N.; ROBOTHAM, J. V.; JIT, M. The global economic burden of antibiotic-resistant infections and the potential impact of bacterial vaccines: a modelling study. **BMJ Global Health**, London, v. 10, n. 6, p. e016249, 2025.

NDAKI, P. M.; MWANGA, J. R.; MUSHI, M. F.; KONJE, E. T.; MWITA, S. M.; MSHANA, S. E. Drivers of inappropriate use of antibiotics among community members in low- and middle-income countries: a systematic review of qualitative studies. **BMC Public Health**, London, v. 25, n. 1, p. 705, 2025.

NEDYALKOVA, M.; PALUCH, A. S.; VECINI, D. P.; LATTUADA, M. Progress and future of the computational design of antimicrobial peptides (AMPs): bio-inspired functional molecules. **Digital Discovery**, Cambridge, v. 3, n. 1, p. 9–22, 2024.

OLIVEIRA, C. M. de; SCHUMACHER, D. M. F.; MELO DO NASCIMENTO, J. P.; FONTES, J. L. F. O impacto da resistência bacteriana na saúde pública e privada brasileira. **Revista FIMCA**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 24–29, 2025.

OLIVEIRA, J. T. A.; SOUZA, P. F. N.; VASCONCELOS, I. M.; DIAS, L. P.; MARTINS, T. F.; VAN TILBURG, M. F.; GUEDES, M. I. F.; SOUSA, D. O. B. Mo-CBP3-PepI, Mo-CBP3-PepII, and Mo-CBP3-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability. **Biochimie**, Paris, v. 157, p. 10–21, 2019.

OLIVEIRA JÚNIOR, N. G.; SOUZA, C. M.; BUCCINI, D. F.; CARDOSO, M. H.; FRANCO, O. L. Antimicrobial peptides: structure, functions and translational applications. **Nature Reviews Microbiology**, London, 2025

PARRA, A. L. C.; FREITAS, C. D. T.; SOUZA, P. F. N.; VON ADERKAS, P.; BORCHERS, C. H.; BEATTIE, G. A.; SILVA, F. D. A.; THORNBURG, R. W. Ornamental tobacco floral nectar is a rich source of antimicrobial peptides. **Plant Science**, Amsterdam, v. 324, p. 111427, 2022.

PUTRI, R. A.; HABIBIE, A.; DHAR, P.; KUCZERA, K.; SWASONO, R. T.; ROHMAN, M. S.; RAHARJO, T. J.; SIAHAAN, T. J. Design, structural stability, membrane binding, and antibacterial activity of novel antimicrobial peptides derived from Wuchuanin-A1. **Life**, Basel, v. 15, n. 10, p. 1568, 2025.

QIN, S.; XIAO, W.; ZHOU, C.; PU, Q.; DENG, X.; LAN, L.; LIANG, H.; SONG, X.; WU, M. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, London, v. 7, n. 1, p. 199, 2022.

RAMAZI, S.; MOHAMMADI, N.; ALLAHVERDI, A.; KHALILI, E.; ABDOLMALEKI, P. A review on antimicrobial peptides databases and the computational tools. **Database**, Oxford, v. 2022, 2022.

ROBLES-LOAIZA, A. A.; PINOS-TAMAYO, E. A.; MENDES, B.; ORTEGA-PILA, J. A.; PROAÑO-BOLAÑOS, C.; PLISSON, F.; TEIXEIRA, C.; GOMES, P.; ALMEIDA, J. R. Traditional and computational screening of non-toxic peptides and approaches to improving selectivity. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 15, n. 3, p. 323, 2022.

SÁ-PESSOA, J.; CALDERÓN-GONZÁLEZ, R.; LEE, A.; BENGOCHEA, J. A. *Klebsiella pneumoniae* emerging anti-immunology paradigms: from stealth to evasion. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 33, n. 5, p. 533–545, 2025.

SCHMITT, A.; ROY, R.; CARTER, C. J. Nectar antimicrobial compounds and their potential effects on pollinators. **Current Opinion in Insect Science**, Amsterdam, v. 44, p. 55–63, 2021.

SEVERN, M. M.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle in skin health and infection. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 21, n. 2, p. 97–111, 2023.

SILVA, F.; GUIRGIS, A.; VON ADERKAS, P.; BORCHERS, C. H.; THORNBURG, R. LC-MS/MS based comparative proteomics of floral nectars reveal different mechanisms involved in floral defense of *Nicotiana* spp., **Petunia hybrida** and **Datura stramonium**. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 213, p. 103618, 2020.

SKENDER, B. The demise of the antibiotic pipeline: the Bayer case. **Humanities and Social Sciences Communications**, London, v. 11, n. 1, p. 1069, 2024.

SLOVENSKI, I.; ALONSO RUIZ, A.; VIEIRA, M.; LARGE, K. E.; STROBEYKO, A.; LIU, Y.; MOON, S. Beyond resistance: alternative innovation models for global access and

stewardship of new antibiotics. **Humanities and Social Sciences Communications**, London, v. 12, n. 1, p. 2006, 2025.

STREMLAU, M.; SLUSHER, B. S. The potential of academic drug discovery: successes and challenges. **Expert Opinion on Drug Discovery**, Abingdon, v. 20, n. 9, p. 1093–1098, 2025.

SU, Z.; YU, H.; LV, T.; CHEN, Q.; LUO, H.; ZHANG, H. Progress in the classification, optimization, activity, and application of antimicrobial peptides. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 16, 2025.

TENOVER, F. C.; NICOLAU, D. P.; GILL, C. M. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*—an emerging challenge. **Emerging Microbes & Infections**, Abingdon, v. 11, n. 1, p. 811–814, 2022.

TIELEMAN, D. P.; BERENDSEN, H. J. C.; SANSOM, M. S. P. Surface binding of alamethicin stabilizes its helical structure: molecular dynamics simulations. **Biophysical Journal**, New York, v. 76, n. 6, p. 3186–3191, 1999.

TONG, S. Y. C.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, V. G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.

TOUAITIA, R.; MAIRI, A.; IBRAHIM, N. A.; BASHER, N. S.; IDRES, T.; TOUATI, A. *Staphylococcus aureus*: a review of the pathogenesis and virulence mechanisms. **Antibiotics**, Basel, v. 14, n. 5, p. 470, 2025.

UYTERHOEVEN, E. T.; BUTLER, C. H.; KO, D.; ELMORE, D. E. Investigating the nucleic acid interactions and antimicrobial mechanism of buforin II. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 582, n. 12, p. 1715–1718, 2008.

VEJZOVIC, D.; PILLER, P.; CORDFUNKE, R. A.; DRIJFHOUT, J. W.; EISENBERG, T.; LOHNER, K.; MALANOVIC, N. Where electrostatics matter: bacterial surface neutralization and membrane disruption by antimicrobial peptides SAAP-148 and OP-145. **Biomolecules**, Basel, v. 12, n. 9, p. 1252, 2022.

VERDIAL, C.; SERRANO, I.; TAVARES, L.; GIL, S.; OLIVEIRA, M. Mechanisms of antibiotic and biocide resistance that contribute to *Pseudomonas aeruginosa* persistence in the hospital environment. **Biomedicines**, Basel, v. 11, n. 4, p. 1221, 2023.

WANG, G. The antimicrobial peptide database is 20 years old: recent developments and future directions. **Protein Science**, Hoboken, v. 32, n. 10, 2023. DOI: 10.1002/pro.4778.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 44, n. D1, p. D1087–D1093, 2016.

WHO warns of widespread resistance to common antibiotics worldwide. common-antibiotics-worldwide. Acesso em: 5 fev. 2026.

WOO, S.; MARQUEZ, L.; CRANDALL, W. J.; RISENER, C. J.; QUAVE, C. L. Recent advances in the discovery of plant-derived antimicrobial natural products to combat

antimicrobial resistant pathogens: insights from 2018–2022. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 40, n. 7, p. 1271–1290, 2023.

XU, S. et al. Enhancing the stability of antimicrobial peptides: from design strategies to applications. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 475, p. 145923, 2023.

XUAN, J.; FENG, W.; WANG, J.; WANG, R.; ZHANG, B.; BO, L.; CHEN, Z.-S.; YANG, H.; SUN, L. Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. **Drug Resistance Updates**, Amsterdam, v. 68, p. 100954, 2023.

YANG, J.; ZHANG, J.; FENG, Z.; MA, Y. The role and mechanisms of antimicrobial peptides in overcoming multidrug-resistant bacteria. **Molecules**, Basel, v. 30, n. 1, p. 128, 2024.

YANG, R.; MA, X.; PENG, F.; WEN, J.; ALLAHOU, L. W.; WILLIAMS, G. R.; KNOWLES, J. C.; POMA, A. Advances in antimicrobial peptides: from mechanistic insights to chemical modifications. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 81, p. 108570, 2025.

ZHANG, H.; LV, J.; MA, Z.; MA, J.; CHEN, J. Advances in antimicrobial peptides: mechanisms, design innovations, and biomedical potential. **Molecules**, Basel, v. 30, n. 7, p. 1529, 2025.

ZHANG, Q.-Y.; YAN, Z.-B.; MENG, Y.-M.; HONG, X.-Y.; SHAO, G.; MA, J.-J.; CHENG, X.-R.; LIU, J.; KANG, J.; FU, C.-Y. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. **Military Medical Research**, London, v. 8, n. 1, p. 48, 2021.

ZHANG, R.; XU, L.; DONG, C. Antimicrobial peptides: an overview of their structure, function and mechanism of action. **Protein & Peptide Letters**, Sharjah, v. 29, n. 8, p. 641–650, 2022.

ZHENG, S.; TU, Y.; LI, B.; QU, G.; LI, A.; PENG, X.; LI, S.; SHAO, C. Antimicrobial peptide biological activity, delivery systems and clinical translation status and challenges. **Journal of Translational Medicine**, London, v. 23, n. 1, p. 292, 2025.

ZHONG, C.; HE, Y.; ZOU, J.; GAO, L.; WANG, J.; ZHU, J.; XUE, W.; GOU, S.; ZHANG, Y.; LIU, H.; NI, J. An antimicrobial peptide as a potential therapy for bacterial pneumonia that alleviates antimicrobial resistance. **Nature Communications**, London, v. 16, n. 1, p. 10488, 2025.

ZHOU, H. X.; PANG, X. Electrostatic interactions in protein structure, folding, binding, and condensation. *Chemical Reviews*, Washington, DC, v. 118, n. 4, p. 1691–1741, 2018.

ZOU, X. et al. Current advances of functional phytochemicals in *Nicotiana* plant and related potential value of tobacco processing waste: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Amsterdam, v. 143, p. 112191, 2021.

ANEXO A – ARTIGO CIENTÍFICO II

Artigo científico publicado na revista ACS OMEGA

Qualis: A2

Fator de Impacto: 4.3



Open Access

This article is licensed under [CC-BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

<http://pubs.acs.org/journal/acsodf>

Article

Nicotianin-I: A Tobacco Floral Nectar Peptide with Anticandidal Activity

João M. M. Neto, Tawanny K. B. Aguiar, Mariana F. Oliveira, Queilane L. S. G. Chaves, Dário R. A. L. Mourão, Viviane O. Silva, Maria T. V. Nascimento, Rômulo F. Carneiro, Rafael X. Martins, Davi F. Farias, Brandon F. Sousa, Jeanlex S. Sousa, Márcio V. Ramos, and Cleverson D. T. Freitas*

Cite This: *ACS Omega* 2025, 10, 20213–20225

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Multidrug-resistant microorganisms are major threats to society, leading to the necessity of alternative molecules to fight them back. Antimicrobial peptides (AMPs), especially those derived from plants, have become relevant for multiple reasons. Therefore, this study evaluated six peptides identified in the floral nectar of ornamental tobacco for their effectiveness against four clinically relevant yeast species (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, and *Candida tropicalis*). Pep6 (KHYSCTRHGYCLACYKRWF) was the only one that showed activity against all yeast species, with IC_{50} values ranging from $24 \pm 1.9 \mu\text{M}$ to $80 \pm 4.6 \mu\text{M}$. Pep6 (named nicotianin-I) was able to alter permeability or generate pores in the cell membranes of all microorganisms, in addition to inducing an overproduction of reactive oxygen species (ROS). Nicotianin-I adopted a structure similar to that of the polyproline II (PPII) helix in buffer and sodium dodecyl sulfate (SDS) and an α -helical pattern when subjected to a membrane mimetic environment (50% TFE). It demonstrated negligible hemolytic activity and no cytotoxic effects on murine fibroblast cells. Only at the highest concentration assessed ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$ or $42 \mu\text{M}$), nicotianin-I caused a 40% mortality rate in zebrafish embryos and delayed their hatching. This study demonstrates the potential of a novel peptide with anticandidal activity and opens the door to the rational design of new analogous peptides with improved properties.

