



ATIVIDADE ANTIBIOFILME DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS BOTRAMP14 E CROTAMP14 CONTRA BIOFILME DE *Staphylococcus aureus* E *Klebsiella pneumoniae*

Dhiego L. Carrijo¹; Nilton A. S. Neto²; Nelson G. de Oliveira Júnior³; Octávio L. Franco³.

¹Biomedicina - Universidade Católica de Brasília;

²Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular - Universidade de Brasília, Brasília;

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia - Universidade Católica de Brasília.

E-mail: dhiego.carrijo@a.ucb.br; niltonararipeneto@gmail.com; juroyal@gmail.com; ocfranco@gmail.com.

RESUMO

A resistência antimicrobiana (RAM) constitui um importante desafio à saúde pública, agravado pelo uso indiscriminado de antibióticos e pela formação de biofilmes, que dificultam a ação dos antimicrobianos e favorecem infecções persistentes. Nesse contexto, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) destacam-se como alternativas promissoras devido à sua ação eficaz e amplo espectro. Este estudo avaliou a atividade antibiofilme dos peptídeos BotrAMP14 e CrotAMP14, derivados de catelicidinas presentes na peçonha de serpentes, frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. Os resultados indicaram aumento da atividade a partir de 8 µM. Contra *S. aureus*, ambos apresentaram inibição ≥50%, superior ao controle com Gentamicina. Contra *K. pneumoniae*, o CrotAMP iniciou atividade em 8 µM e apresentou maior inibição que BotrAMP e Colistina, cuja atividade foi mais evidente em 16 µM. Os resultados sugerem atividade antibiofilme dose-dependente e potencial antimicrobiano dos peptídeos.

Palavras-chave: Biofilme. Peptídeos antimicrobianos. Bactérias clínicas.

INTRODUÇÃO

A dificuldade no tratamento de infecções bacterianas era ainda mais evidente na era pré-antibiótica, quando essas infecções apresentavam maior impacto na mortalidade por não haver uma resposta efetiva contra essas enfermidades. Somente na década de 1940, com a descoberta acidental da penicilina por Alexander Fleming em 1928, iniciou-se a era de ouro dos antibacterianos, seguida pelo desenvolvimento de diversas classes, como β-lactâmicos, quinolonas, rifamicinas, tetraciclina e sulfonamidas (Christensen, 2021; Uddin et al., 2021).

Todavia, com o uso intensivo de antimicrobianos na saúde, agricultura e pecuária aumentou a pressão seletiva sobre esses organismos, favorecendo o surgimento e a disseminação da resistência antimicrobiana (RAM) (Muteeb et al., 2023). Desde a década de 70, a descoberta de novos antibióticos tornou-se limitada, estimulando a busca por alternativas, como bacteriófagos e peptídeos antimicrobianos, embora ainda existam limitações para sua aplicação clínica (Uddin et al., 2021). Em 2019, cerca de 5 milhões de mortes foram associadas à RAM, com tendência de aumento até 2050 sem medidas de controle (Anderson, 2022; Ho et al., 2025).

Os biofilmes bacterianos são macroestruturas compostas por comunidades de microrganismos envoltas por uma matriz de exopolissacarídeos (EPS), presentes em superfícies hospitalares, tecidos, alimentos e ambientes naturais. Essa estrutura protege as células contra condições adversas, antimicrobianos e resposta imune do hospedeiro, favorecendo infecções persistentes e contribuindo para a resistência aos tratamentos (Zhao, Sun e Liu, 2023; Peng et al., 2023).



Entre os principais patógenos formadores de biofilme destacam-se *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. Seus mecanismos de evasão imunológica favorecem sua persistência e resistência, como produção de moléculas e toxinas (Fayisa e Tuli, 2023; Cheung, Bae e Otto, 2021). Já *K. pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa encapsulada e oportunista, associada à hipervirulência, hipermucoviscosidade, produção de sideróforos e formação de biofilmes, características que aumentam sua capacidade de causar infecções (Li et al., 2024; Xu et al., 2024).

Como alternativa ao uso de antibióticos convencionais, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são alternativas promissoras por conta de suas características moleculares. PAMs são pequenas moléculas de natureza aminoacídica, compostas por cadeias de 12 a 50 aminoácidos que participam da imunidade inata de diversos organismos e podem apresentar propriedades antimicrobianas, imunomoduladoras, anticancerígenas e cicatrizantes. Entre suas vantagens estão o amplo espectro de ação, baixa toxicidade, estabilidade térmica e solubilidade (Luo; Song, 2021).

As catelicidinas são peptídeos sintéticos catiônicos encontrados em diversos organismos e possuem atividade antimicrobiana e imunomoduladora. Seu mecanismo envolve principalmente a interação com membranas microbianas, promovendo sua permeabilização por diferentes mecanismos, incluindo formação de poros e desorganização da membrana (Guerra et al., 2024; Yoon et al., 2024). Entre as catelicidinas sintéticas destacam-se BotrAMP14 e CrotAMP14, derivados de peptídeos encontrados nas peçonhas de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus terrificus*, a batroxicidina e a crotalicidina, respectivamente (Oliveira et al., 2020).

OBJETIVO

Avaliar a atividade antibiofilme dos peptídeos BotrAMP14 e CrotAMP14 frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, investigando sua capacidade de inibir a formação e promover a erradicação de biofilmes, comparando sua eficácia com antibióticos convencionais.

MÉTODO

Foram utilizadas cepas de *Klebsiella pneumoniae* isolado clínico 001450421 e *Staphylococcus aureus* isolado clínico 7133623. Para preparo do inóculo, as cepas foram cultivadas em ágar MH a 37 °C por um período *overnight*. Em seguida, três colônias foram transferidas para caldo MH e incubadas *overnight* (37 °C, 200 rpm). As culturas resultantes foram diluídas 1:100 em meio basal (fosfato de potássio 62 mM, 7 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM de MgSO_4 , 10 μM de FeSO_4 e 0,4% de glicose, pH 7,0).

O ensaio foi conduzido em placas de 96 poços. Em cada poço, foram adicionados 50 μL da suspensão bacteriana diluída e 50 μL dos peptídeos BotrAMP14 ou CrotAMP14, em concentrações variando de 64 μM a 0,5 μM , em triplicata. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para avaliar a formação do biofilme na presença dos peptídeos.

Após a incubação, os poços foram lavados três vezes com solução salina para remoção das células planctônicas. O biofilme foi fixado com 100 μL de etanol absoluto por 15 minutos, seco a 37 °C e posteriormente corado com 200 μL de cristal violeta 0,1% por 20 minutos. Em seguida, foi feita outra lavagem para retirar o excesso de cristal violeta e o corante aderido foi solubilizado com 200 μL de ácido acético 30% para quantificação. A leitura da densidade óptica foi realizada em 600 nm em leitor de microplacas BioTek PowerWave HT.

RESULTADOS

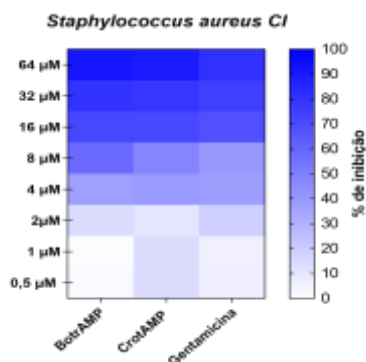
A atividade de inibição dos peptídeos BotrAMP e CrotAMP foi avaliada frente aos isolados clínicos (*Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*) em diferentes concentrações, utilizando gentamicina e colistina, respectivamente, como antimicrobianos de referência. Conforme



apresentado na Figura 1, ambos os peptídeos apresentaram maior percentual de inibição de *S. aureus* nas concentrações mais elevadas e manutenção de atividade mesmo em concentrações reduzidas. O BotrAMP apresentou aproximadamente 90% de inibição em 64 μ M, mantendo atividade superior a 50% até 8 μ M, evidenciando efeitos antimicrobianos em concentrações mais baixas. O CrotAMP apresentou comportamento semelhante, embora com redução gradual nas concentrações intermediárias. Em baixas concentrações (≤ 2 μ M), a atividade dos peptídeos foi reduzida, indicando comportamento dependente da concentração.

Figura 1

Percentual de inibição de *Staphylococcus aureus* CI 7133623 pelo BotrAMP14, CrotAMP14 e gentamicina em diferentes concentrações.



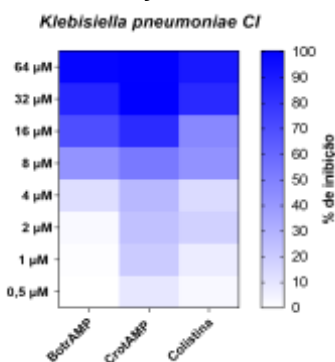
Nota. A intensidade da coloração representa o percentual de inibição, variando de 0% (branco) a 100% (azul).

Fonte: Criado pelo autor

Para *K. pneumoniae*, observou-se um perfil de inibição mais pronunciado para o CrotAMP, conforme demonstrado na Figura 2. O peptídeo apresentou aproximadamente 100% de inibição em 32 e 64 μ M, mantendo atividade superior à observada para o BotrAMP e a colistina nas concentrações de 8 a 2 μ M. Esse comportamento evidencia a capacidade de manter uma atividade expressiva mesmo diante da redução da concentração. O BotrAMP também apresentou elevada atividade nas maiores concentrações, atingindo aproximadamente 100% em 64 μ M, porém sua inibição diminuiu de forma mais acentuada nas concentrações inferiores. A colistina apresentou perfil intermediário, com maior atividade nas concentrações de 32 e 64 μ M e redução progressiva em concentrações menores.

Figura 2

Percentual de inibição de *Klebsiella pneumoniae* CI 001450421 pelo BotrAMP14, CrotAMP14 e colistina em diferentes concentrações.





Nota. A intensidade da coloração representa o percentual de inibição, variando de 0% (branco) a 100% (azul).

Fonte: Criado pelo próprio autor.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstram comportamento predominantemente concentração-dependente, com maior atividade dos peptídeos nas concentrações elevadas e manutenção de atividade relevante em concentrações intermediárias. Destaca-se o CrotAMP14 frente a *K. pneumoniae*, que apresentou elevada atividade inibitória e desempenho superior ao BotrAMP14 e à colistina em concentrações intermediárias, evidenciando capacidade de manter sua ação mesmo com redução da concentração. Frente a *S. aureus*, ambos os peptídeos apresentaram atividade semelhante, especialmente nas maiores concentrações. Esses achados reforçam o potencial dos PAMs como alternativas aos antimicrobianos convencionais no contexto da resistência antimicrobiana e dos biofilmes bacterianos. Entretanto, os resultados ainda não permitem avaliar a capacidade de erradicação de biofilmes previamente formados. Assim, a continuidade dos ensaios de erradicação permitirá verificar a ação dos peptídeos sobre biofilmes estabelecidos, complementando os resultados de inibição e contribuindo para uma avaliação mais abrangente de seu potencial antibiofilme.

REFERÊNCIAS

- Baran, A., Kwiatkowska, A., & Potocki, L. (2023). Antibiotics and bacterial resistance—A short story of an endless arms race. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5777. <https://doi.org/10.3390/ijms24065777>
- Ho, C. S., Wong, C. T. H., Aung, T. T., Lakshminarayanan, R., Mehta, J. S., Rauz, S., McNally, A., Kintses, B., Peacock, S. J., de la Fuente-Nunez, C., Hancock, R. E. W., & Ting, D. S. J. (2025). Antimicrobial resistance: A concise update. *The Lancet Microbe*, 6(1), 100947. <https://doi.org/10.1016/j.lanmic.2024.07.010>
- Lima, P. G., Oliveira, J. T. A., Amaral, J. L., Freitas, C. D. T., & Souza, P. F. N. (2021). Synthetic antimicrobial peptides: Characteristics, design, and potential as alternative molecules to overcome microbial resistance. *Life Sciences*, 278, 119647. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119647>
- Oliveira Júnior, N. G., Souza, C. M., Buccini, D. F., Cardoso, M. H., & Franco, O. L. (2025). Antimicrobial peptides: Structure, functions and translational applications. *Nature Reviews Microbiology*, 23(11), 687–700. <https://doi.org/10.1038/s41579-025-01200-y>

Financiamento: Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico. Universidade Católica de Brasília.