

Actividad antibacteriana de péptidos derivados de la hemocianina de *Achatina fulica* frente a
Pseudomonas aeruginosa

María Camila Acevedo Murillo

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Director

William Fernando Hidalgo Bucheli

Doctor en Química

Codirector

Andrés Esteban Pereira Patiño

Doctor en Ciencias Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2025

Dedicatoria

A las mujeres en la ciencia, que resisten y crean, incluso sin aplausos.

A mí, que lo soñé, lo trabajé y lo logré, con todo y miedo.

A los que sí. A los que siempre.

Agradecimientos

A mi madre, María Elena Murillo, por ser mi mayor ejemplo de amor, fortaleza y entrega.

A Martha Cecilia Espitia, mi segunda madre, por acompañarme con firmeza, generosidad y una fe constante en mí.

A Mafe y Alejo, por ser luz, risa y apoyo en los momentos clave. Este camino fue más amable y bonito gracias a ustedes.

Al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) de la Universidad Industrial de Santander, por brindarme el espacio, los recursos y el acompañamiento necesarios para la ejecución del proyecto.

Agradezco profundamente al profesor William Fernando Hidalgo, director de este trabajo, y a Andrés Esteban Pereira, codirector, por su orientación constante, su rigurosa lectura crítica y su valiosa guía científica durante todas las etapas del proceso.

Reconozco especialmente la colaboración del profesor Libardo Andrés Suárez y de los estudiantes de las carreras de Microbiología y Biología del GIBIM, quienes me brindaron apoyo fundamental en la parte experimental, en la toma de datos y en el manejo de procedimientos técnicos esenciales para el avance del estudio.

A la Universidad Industrial de Santander, en especial a la Escuela de Química, gracias por el acceso a la literatura científica, la formación rigurosa y el respaldo académico que me permitieron sustentar y fortalecer esta investigación.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	13
1. Objetivos	15
1.1 Objetivo General	15
1.2 Objetivos Específicos	15
2. Marco teórico	16
2.1 Los antibióticos y la resistencia antimicrobiana	16
2.2 Péptidos Antimicrobianos (PAMs)	17
2.2.1 Propiedades que determinan la actividad y especificidad de los PAMs.	18
2.2.1.1 Carga	18
2.2.1.2 Hidrofobicidad	19
2.2.1.3 Anfipaticidad y momento hidrofóbico	19
2.2.1.4 Conformación	19
2.2.1.5 Longitud	21
2.2.2 Mecanismos de acción de los PAMs: actividades antimicrobianas.	21
2.2.3 Clasificación de los PAMs	26
2.2.3.1 En función de las fuentes	26
2.2.3.2 En función de la estructura	27
2.2.3.3 En función de las secuencias	27
2.2.3.4 En función de su actividad.	27
2.3 Péptidos derivados de la hemocianina de la secreción mucosa de moluscos.	28
2.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30

2.5	Uso de herramientas bioinformáticas para la predicción de propiedades fisicoquímicas de péptidos.....	32
2.6	Uso de herramientas bioinformáticas para el modelamiento de la estructura secundaria de péptidos.....	35
3.	Metodología.....	37
3.1	Predicción de propiedades fisicoquímicas de los péptidos.....	37
3.1.1	Selección y obtención de las secuencias.....	37
3.1.2	Predicción de propiedades fisicoquímicas.....	38
3.2	Modelado de la estructura secundaria de los péptidos.....	38
3.2.1	Modelado estructural con PEP-FOLD 3.5.....	38
3.2.2	Visualización y análisis de estructuras con PyMOL.....	39
3.3	Determinación del porcentaje de inhibición de los péptidos frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	39
3.3.1	Cepa bacteriana y medios de cultivo.....	39
3.3.2	Determinación de la actividad antibacteriana.....	40
3.3.3	Control microbiológico de contaminación cruzada.....	41
3.4	Análisis estadístico.....	42
4.	Resultados y discusión.....	43
4.1	Propiedades fisicoquímicas de los péptidos.....	43
4.2	Estructura secundaria de los péptidos.....	46
4.2.1	Modelado estructural.....	46
4.2.2	Visualización estructural.....	51
4.3	Actividad antibacteriana.....	55

5. Conclusiones	64
6. Recomendaciones	65
Referencias Bibliográficas	67
Apéndices.....	106

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Principales mecanismos de acción de antibióticos y ejemplos representativos.</i>	16
Tabla 2. <i>Secuencias de los péptidos estudiados.</i>	38
Tabla 3. <i>Características fisicoquímicas de los péptidos estudiados.</i>	43
Tabla 4. <i>Parámetros estructurales de los modelos peptídicos predichos por PEP-FOLD3.5.</i>	46
Tabla 5. <i>Resumen de propiedades fisicoquímicas, estructurales y actividad antibacteriana de los péptidos evaluados frente a P. aeruginosa ATCC 27853.</i>	57

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. <i>Diversidad estructural de los PAMs</i>	20
Figura 2. <i>Mecanismos de acción líticos de los PAMs</i>	22
Figura 3. <i>Mecanismos de acción no líticos de los PAMs</i>	24
Figura 4. <i>Clasificación de los PAMs</i>	26
Figura 5. <i>Representación gráfica del modelado estructural y la disposición anfipática de los péptidos</i>	51
Figura 6. <i>Actividad antibacteriana de PAMs frente a P. aeruginosa ATCC 27853 durante 24h</i> . 56	
Figura 7. <i>Réplica 1 del ensayo en agar MH con diluciones seriadas de los péptidos 4712 y 4732 frente a P. aeruginosa ATCC 27853 y control de crecimiento</i>	59

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A. Resultados obtenidos del servidor ProtParam.	106
Apéndice B. Resultados obtenidos del servidor PEP-FOLD3.5.....	111
Apéndice C. Cromatogramas de HPLC y espectros de masas de los péptidos estudiados.....	121
Apéndice D. Resultados obtenidos del servidor HeliQuest.	126
Apéndice E. Espectros de dicroísmo circular de péptidos derivados de hemocianina.	129
Apéndice F. Lecturas de absorbancia durante ensayos de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> en presencia de los péptidos antimicrobianos.....	129
Apéndice G. Resultados del análisis del área bajo la curva de crecimiento (AUC) obtenidos del software GraphPad Prism v10.	138
Apéndice H. Resultados de las predicciones de actividad antibacteriana de los péptidos frente a <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 obtenidos de DBAASP.....	140
Apéndice I. Resultados del análisis estadístico realizado en el software GraphPad Prism v10.	142

Glosario

A. fulica: *Achatina fulica*.

APD: *Antimicrobial Peptide Database*, base de datos de péptidos antimicrobianos.

ATCC: *American Type Culture Collection*, institución que conserva cepas bacterianas estándar.

AUC: *Area Under the Curve*, área bajo la curva.

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

Da: dalton, unidad de masa atómica.

DBAASP: *Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides*, base de datos de actividad antimicrobiana y estructura de péptidos.

EE. UU.: Estados Unidos.

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

FDA: *Food and Drug Administration*, agencia reguladora de medicamentos y alimentos.

GRAVY: *grand average of hydropathy*, valor promedio de hidropatía.

LPS: lipopolisacárido.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PA: *Pseudomonas aeruginosa*.

PAMs: péptidos antimicrobianos.

PBS: *Phosphate-Buffered Saline*, solución salina tamponada.

PDB: *Protein Data Bank*, base de datos de estructuras tridimensionales de proteínas y péptidos.

pI: punto isoeléctrico.

PM: Peso Molecular.

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*, detergente aniónico que mimetiza ambientes de membrana.

Resumen

Título: Actividad antibacteriana de péptidos derivados de la hemocianina de *Achatina fulica* frente a *Pseudomonas aeruginosa**

Autor: María Camila Acevedo Murillo**

Palabras Clave: Péptidos antimicrobianos, Hemocianinas, *Achatina fulica*, *Pseudomonas aeruginosa*, Resistencia bacteriana, Concentración Mínima Inhibitoria, Modelado estructural, Bioinformática.

Descripción:

La creciente resistencia bacteriana a los antibióticos ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, entre ellas el uso de péptidos antimicrobianos (PAMs). En este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana de cinco péptidos sintéticos (4405, 4712, 4732, 4738 y 4743), derivados de la hemocianina de *Achatina fulica*, frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, una cepa de alta prioridad en salud pública dada su alta resistencia. Inicialmente, se predijeron propiedades fisicoquímicas clave de los péptidos, como peso molecular, carga neta, punto isoeléctrico e índice de hidrofobicidad, utilizando herramientas bioinformáticas especializadas. Posteriormente, se modelaron sus estructuras secundarias con la plataforma PEP-FOLD 3.5 para explorar su conformación tridimensional. Finalmente, se determinó el porcentaje de inhibición mediante el método de microdilución en caldo, observándose efectos inhibitorios parciales sobre el crecimiento bacteriano. La CMI se estimó $>40 \mu\text{M}$ para el péptido 4405 y $>50 \mu\text{M}$ para los péptidos 4712, 4732, 4738 y 4743. Este estudio contribuye al conocimiento sobre péptidos derivados de hemocianina como posibles agentes terapéuticos frente a bacterias resistentes, y destaca la importancia de integrar herramientas *in silico* con ensayos microbiológicos en la caracterización de compuestos bioactivos.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Programa de Química. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Doctor en Química. Codirector: Andrés Esteban Pereira Patiño. Doctor en Ciencias Biomédicas.

Abstract

Title: Antibacterial activity of peptides derived from *Achatina fulica* hemocyanin against *Pseudomonas aeruginosa**

Author(s): María Camila Acevedo Murillo**

Key Words: Antimicrobial peptides, Hemocyanins, *Achatina fulica*, *Pseudomonas aeruginosa*, Minimum Inhibitory Concentration, Structural modeling, Bioinformatics.

Description:

The growing bacterial resistance to antibiotics has driven the search for new therapeutic strategies, including the use of antimicrobial peptides (AMPs). This study evaluated the antibacterial activity of five synthetic peptides (4405, 4712, 4732, 4738, and 4743), derived from the hemocyanin of *Achatina fulica*, against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, a high-priority public health strain due to its high resistance. First, key physicochemical properties of the peptides, such as molecular weight, net charge, isoelectric point, and hydrophobicity index, were predicted using specialized bioinformatic tools. Then, their secondary structures were modeled using the PEP-FOLD 3.5 platform to explore their three-dimensional conformation. Finally, the percentage of inhibition was determined using the broth microdilution method, observing partial inhibitory effects on bacterial growth. The MIC was estimated to be >40 μM for peptide 4405 and >50 μM for peptides 4712, 4732, 4738, and 4743. This study contributes to the understanding of hemocyanin-derived peptides as potential therapeutic agents against resistant bacteria and highlights the importance of integrating *in silico* approaches with microbiological assays in the characterization of bioactive compounds.

* Degree Work

** Sciences Faculty. School Chemistry. Chemistry Program. Advisor: William Fernando Hidalgo Bucheli. Ph.D. in Chemistry. Co-advisor: Andrés Esteban Pereira Patiño. Ph.D. in Biomedical Sciences.

Introducción

Sin medidas preventivas, la resistencia bacteriana a los antibióticos podría convertirse en la principal causa de muerte a nivel mundial para 2050 (Murray et al., 2022). Se estima que las muertes directamente relacionadas con la resistencia antimicrobiana aumentaron a más de 1,2 millones en 2019 y se prevé que alcancen aproximadamente 10 millones al año para 2050 si no se toman medidas suficientes para controlarla (Murray et al., 2022). Durante varias décadas, las bacterias que causan infecciones comunes o graves han mostrado resistencia en diferentes niveles a cada nuevo antibiótico que se ha introducido en el mercado (Prestinaci et al., 2015), por lo que, en el 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado que la resistencia a los antimicrobianos es una de las 10 principales amenazas de salud pública a las que se enfrenta la humanidad (OMS, 2021).

Con el aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales, la prevención y el tratamiento de las infecciones bacterianas resistentes se vuelven más urgentes. Aunque los antibióticos solían ser efectivos contra la mayoría de las infecciones bacterianas, la resistencia a los antimicrobianos ha disminuido su eficacia. Por tanto, es crucial buscar alternativas efectivas (Xuan et al., 2023). Los Péptidos Antimicrobianos (PAMs) han emergido como nuevos candidatos a fármacos con gran rapidez. Se han identificado PAMs en casi todos los organismos, exhibiendo una diversidad estructural y funcional notable (Xuan et al., 2023). Algunos PAMs han demostrado propiedades antibacterianas amplias y un gran potencial en el tratamiento clínico de infecciones por patógenos y cicatrización de heridas (Florin et al., 2017; Wadhwa et al., 2017). Existen casos prometedores de PAMs en el mercado, y otros están siendo evaluados en ensayos clínicos (Fox, 2013), lo que abre la posibilidad de introducir nuevos medicamentos basados en PAMs en diversas

áreas (Xuan et al., 2023). Se han caracterizado y descrito más de 3000 PAMs provenientes de diversas fuentes biológicas (Ramazi et al., 2022), incluyendo moluscos (Nantararat et al., 2019; Pereira et al., 2025), insectos (Dutta et al., 2019; Mylonakis et al., 2016), anfibios (Conlon & Mechkarska, 2014), plantas (Tang et al., 2018) y microorganismos (Cao et al., 2018).

Estudios han demostrado las propiedades antimicrobianas y *antibiofilm* de la secreción mucosa de *Achatina fulica* (Pereira et al., 2025; Suárez et al., 2021). Por ejemplo, los péptidos 4397, 4398 y 4405, derivados de la hemocianina de *A. fulica*, exhibieron actividad inhibidora frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (Pereira et al., 2025). Por otro lado, otros estudios han identificado péptidos bioactivos como APAP-1 mod, APAP-2 mod y APAP-3 mod, derivados del peptidoma presente en el moco de *A. fulica*, con actividad antibacteriana contra la bacteria patógena Gram positiva *Propionibacterium acnes* (Chalongkulasak et al., 2022).

Este trabajo se enfocó en evaluar la actividad antibacteriana de péptidos derivados de la hemocianina de *A. fulica* frente a la bacteria aeróbica Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa*. El porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano se determinó mediante el método de microdilución en caldo según el protocolo estándar adaptado del CLSI-M07-A11. Los datos de absorbancia se analizaron estadísticamente utilizando el software GraphPad Prism v10, evaluando la normalidad con las pruebas de D'Agostino & Pearson, de Shapiro–Wilk, y comparando las medianas entre tratamientos mediante la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis. Además, se realizó la predicción de algunas propiedades fisicoquímicas de los péptidos mediante la herramienta bioinformática ProtParam a través del servidor ExPASy de la base de datos UniProt. También se llevó a cabo el modelamiento de las estructuras secundarias utilizando el servidor PEP-FOLD v3.5 y el visualizador PyMOL v3.1.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana de los péptidos sintéticos 4405, 4712, 4732, 4738 y 4743 derivados de la hemocianina de *A. fulica* frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

1.2 Objetivos Específicos

- Predecir propiedades fisicoquímicas, tales como peso molecular en Daltons (Da), carga neta, punto isoeléctrico (pI) e índice de hidrofobicidad de los péptidos derivados de la hemocianina de *A. fulica*.
- Modelar la estructura secundaria de los péptidos mediante la herramienta PEP-FOLD v3.5.
- Determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en presencia de los péptidos derivados de la hemocianina de *A. fulica* mediante ensayos de microdilución en caldo.

2. Marco teórico

2.1 Los antibióticos y la resistencia antimicrobiana

Los antibióticos son un avance en la medicina que ha tenido un impacto profundo en la historia de la humanidad. Su descubrimiento marcó un punto de inflexión crucial y ha resultado en la salvación de innumerables vidas a lo largo del tiempo (Davies & Davies, 2010). Conocemos a los antibióticos como una sustancia química que tiene la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de microorganismos, especialmente bacterias. Los antibióticos ejercen su efecto mediante distintos mecanismos, los cuales se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1.

Principales mecanismos de acción de antibióticos y ejemplos representativos.

Mecanismo de acción	Antibiótico representativo	Descripción del efecto	Referencia
Inhibición de la síntesis de la pared celular.	Penicilina	Bloquea la formación de la pared celular bacteriana, debilitando su estructura y favoreciendo la lisis.	(Cho et al., 2014; Sarkar et al., 2017; Zaman et al., 2017)
Interferencia con la síntesis de proteínas.	Tetraciclina	Inhibe la síntesis de proteínas bacterianas, impidiendo la reproducción y función celular.	(Jeong & Rhee Paeng, 2012; Kapoor et al., 2017; F. Nguyen et al., 2014)
Daño al material genético.	Quinolonas	Causan daño al ADN bacteriano, lo que conduce a la muerte celular o a la incapacidad de replicarse.	(Bush et al., 2020; Kapoor et al., 2017)
Inhibición de rutas metabólicas específicas.	Sulfametoxazol	Bloquea vías metabólicas esenciales, privando a la bacteria de nutrientes y energía necesarios para su supervivencia.	(Venkatesan et al., 2023; Zaman et al., 2017)

Lamentablemente, el uso extendido e irracional de los antibióticos ha generado una rápida proliferación de variantes bacterianas resistentes a ellos. Hoy en día, uno de los desafíos más

críticos en el ámbito de la salud pública consiste en encontrar estrategias efectivas para abordar el problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales. La resistencia a los antimicrobianos es un problema complejo, y la falta de comprensión sobre sus procesos ha limitado los avances en su prevención y control. En algunos casos, las cepas resistentes también pueden ser más virulentas y transmitirse más fácilmente, por lo que la resistencia antimicrobiana puede considerarse un factor de virulencia (Aggarwal et al., 2024; Davies & Davies, 2010; Zaman et al., 2017).

2.2 Péptidos Antimicrobianos (PAMs)

Los PAMs son una variedad de péptidos de tamaño reducido, típicamente constituidos por 12 a 50 unidades de aminoácidos, tienen una carga neta positiva que varía entre +2 y +11, su tamaño oscila entre 2 y 9 kDa, están compuestos principalmente por residuos hidrofóbicos, que suelen representar alrededor del 50% y se encuentran presentes en todos los dominios de la vida como parte integral de los mecanismos de defensa del organismo huésped (Yount & Yeaman, 2013).

Los PAMs se consideran una alternativa prometedora a los antibióticos convencionales por su efecto amplio y letal contra bacterias. No obstante, en la última década, hemos empezado a comprender que estos péptidos, al ser cationes anfipáticos, desempeñan diversas funciones biológicas más allá de su actividad antimicrobiana, incluyendo roles inmunomoduladores, propiedades antitumorales y capacidad para acelerar la curación de heridas (Ahmed & Hammami, 2019; J. Wang et al., 2019). De hecho, su capacidad para actuar en múltiples frentes es lo que hace a los PAMs tan atractivos (Raheem & Straus, 2019).

Los PAMs presentan diversos mecanismos de acción, cuya comprensión completa aún representa un desafío debido a su variabilidad y a ciertas limitaciones técnicas evidenciadas en estudios recientes (Kumar et al., 2018; Le et al., 2017).

Además de combatir microbios, se investigan sus efectos antiinflamatorios, anticancerígenos y otras acciones biológicas (Kumar et al., 2018). Esta amplia gama de actividad de los PAMs se debe a la diversidad en sus características. Se clasifican principalmente según: a) propiedades como la carga (catiónicos, aniónicos y neutros), hidrofobicidad (hidrófilos, hidrófobos y anfipáticos), y estructura secundaria (hélice alfa, láminas beta y estructuras extendidas/aleatorias); b) origen (naturales y sintéticos); c) funciones biológicas (antimicrobianos, antivirales, antiparasitarios); y d) objetivos potenciales (péptidos que afectan y no afectan a la membrana) (Hancock, 2001).

2.2.1 Propiedades que determinan la actividad y especificidad de los PAMs.

Aunque los PAMs difieren ampliamente en secuencia, estructura y origen, comparten varias características que son casi universales entre ellos.

2.2.1.1 Carga. La mayoría de los PAMs con actividad antimicrobiana son catiónicos, con cargas netas entre +2 y +11 a pH fisiológico y longitudes de 10 a 50 aminoácidos (Lei et al., 2019; Mookherjee et al., 2020). Esta carga positiva, conferida por residuos como lisina, arginina o histidina, permite su interacción electrostática con componentes aniónicos de la membrana microbiana, como los lipopolisacáridos, facilitando su inserción mediante estructuras anfipáticas (Mookherjee et al., 2020). La relación entre carga y actividad antimicrobiana ha sido documentada (Dathe et al., 2001; Gagnon et al., 2017; Hong et al., 2001; Z. Jiang et al., 2008). En contraste, los PAMs aniónicos, con cargas entre -1 y -7 y longitudes de 5 a 70 aminoácidos, muestran menor actividad (Harris et al., 2011). Se cree que su mecanismo involucra la absorción bacteriana de los

péptidos y de zinc, aunque aún no se comprende del todo (Brogden et al., 1996; Fales-Williams et al., 2002; Harris et al., 2009).

2.2.1.2 Hidrofobicidad. Esta propiedad, esencial en todos los PAMs, influye en su capacidad para alterar la permeabilidad de la membrana (Lee et al., 2015), se mide por el porcentaje de residuos hidrofóbicos como valina, leucina, isoleucina, alanina, metionina, fenilalanina, tirosina y triptófano, que suele representar cerca del 50% en estos péptidos (Chen et al., 2007; Yin et al., 2012). La interacción hidrofóbica es clave para su unión a membranas; niveles bajos limitan esta interacción con membranas neutras, afectando su selectividad (Tachi et al., 2002). Sin embargo, una hidrofobicidad excesiva puede favorecer la formación de dímeros, reducir la actividad antimicrobiana y aumentar la toxicidad en células de mamíferos (Chen et al., 2007; Yin et al., 2012).

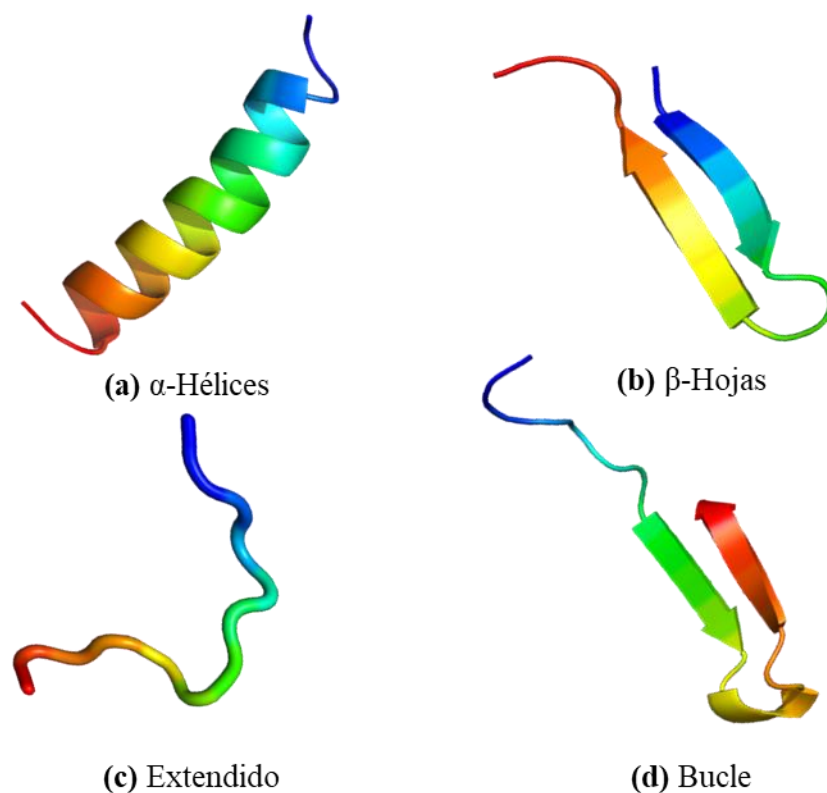
2.2.1.3 Anfipaticidad y momento hidrofóbico. La anfipaticidad se refiere a la proporción y organización de regiones hidrofóbicas e hidrofílicas en los PAMs, tanto en su secuencia primaria como en su estructura secundaria (Mihajlovic & Lazaridis, 2012; Takahashi et al., 2010; Yeaman & Yount, 2003). Al interactuar con membranas bacterianas, muchos PAMs adoptan estructuras como la hélice α anfipática, en la que residuos dispuestos cada 3-4 posiciones permiten una alineación eficiente con la membrana (Dathe et al., 1997; Yount & Yeaman, 2013). La anfipaticidad puede cuantificarse mediante el momento hidrofóbico, que considera la hidrofobicidad de los aminoácidos en una hélice ideal (Yeaman & Yount, 2003). Este parámetro se correlaciona directamente con la actividad antimicrobiana y hemolítica del péptido (Edwards et al., 2016; T. H. Lee et al., 2015).

2.2.1.4 Conformación. Al interactuar con las membranas, los PAMs pueden adoptar estructuras secundarias como hélices α , láminas β , estructuras extendidas y bucles, siendo las dos

primeras las más frecuentes (Hancock, 1997; Nguyen et al., 2011). Las hélices α se forman cuando los péptidos entran en contacto con trifluoroetanol, detergentes o tensioactivos que superan la concentración micelar crítica, como el SDS, así como con micelas y liposomas (Blondelle et al., 1999; Brogden, 2005). Generalmente, los PAMs lineales carecen de estructura definida en solución acuosa, pero sufren reorganización conformacional al insertarse en las membranas. Esta interacción es esencial, especialmente en los PAMs que actúan intracelularmente, ya que deben atravesar la membrana bacteriana para ejercer su efecto (Haney et al., 2019).

Figura 1.

Diversidad estructural de los PAMs.



Nota. (a) 2-Magainina adopta una conformación típica α -helicoidal (<https://doi.org/10.2210/pdb2mag/pdb>). (b) Gomesin es un péptido de β hojas y estabilizado por

enlaces disulfuro (<https://doi.org/10.2210/pdb1KFP/pdb>). **(c)** La indolicidina es un PAM con una estructura de extensión lineal (<https://doi.org/10.2210/pdb1G89/pdb>). **(d)** La tanatina contiene un bucle básico corto distintivo creado a través de una formación de enlace disulfuro entre los residuos Cys11 y Cys18 en el C-terminal (<https://doi.org/10.2210/pdb8TFV/pdb>). Las figuras se realizaron con ayuda del visor PyMOL.

2.2.1.5 Longitud. La longitud del péptido es un factor clave en su actividad antimicrobiana, ya que se requieren más de 7-8 aminoácidos para formar una estructura anfipática con regiones hidrofóbicas e hidrofílicas opuestas (Westerhoff et al., 1989). En particular, los PAMs que actúan según el modelo de barril necesitan al menos 8 aminoácidos si adoptan estructuras de lámina β , y hasta 22 en el caso de hélices α para ser funcionales (Subbalakshmi et al., 1999).

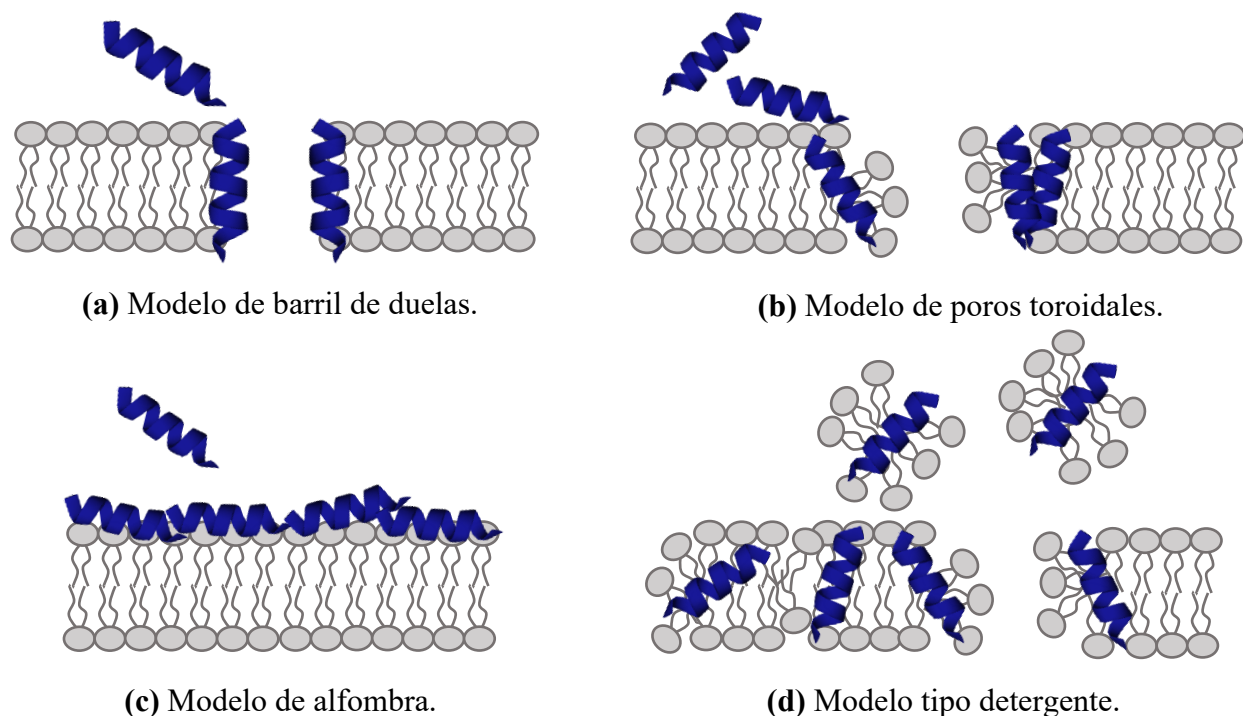
2.2.2 Mecanismos de acción de los PAMs: actividades antimicrobianas.

Aunque inicialmente se pensaba que los PAMs actuaban únicamente por lisis de membrana, hoy se reconocen otros mecanismos (Ulm et al., 2012). Su actividad antimicrobiana se ejerce principalmente de dos formas: mediante la eliminación directa de los patógenos o a través de la modulación de la respuesta inmunitaria. En cuanto a la eliminación directa, esta puede lograrse a través de la desestabilización de la membrana celular o mediante la interferencia con procesos intracelulares esenciales, como la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Kumar et al., 2018).

Dentro de los mecanismos de acción de los PAMs, se pueden clasificar en dos grandes grupos: mecanismos líticos, que involucran la disrupción directa de la membrana celular, y mecanismos no líticos, en los que se afectan procesos intracelulares sin comprometer directamente la integridad de la membrana.

Figura 2.

Mecanismos de acción líticos de los PAMs.



Nota. Adatado de (Kumar et al., 2018; Raheem & Straus, 2019).

Entre los mecanismos líticos más reconocidos se encuentran el modelo de barril de duela, en el que los péptidos se insertan en la bicapa lipídica formando canales transmembrana con sus regiones hidrofílicas hacia el interior del poro, y el modelo de poro toroidal, en el que los péptidos inducen curvaturas en la membrana al interactuar con los lípidos, formando canales rodeados por lípidos y péptidos. Otros modelos incluyen el modelo de alfombra, donde los péptidos se alinean paralelamente sobre la superficie de la membrana hasta alcanzar una concentración crítica que provoca su desorganización, y el modelo tipo detergente, en el cual los PAMs alteran la

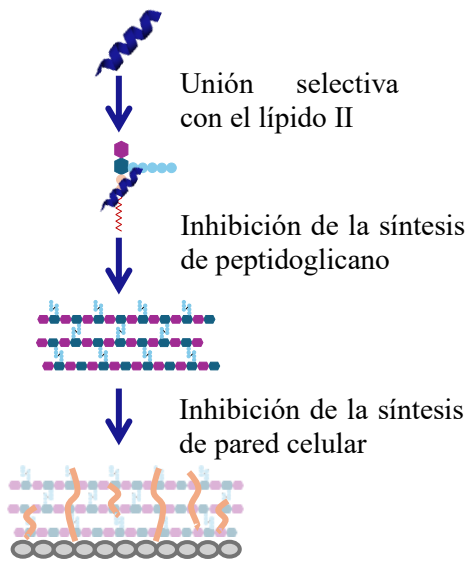
organización de los fosfolípidos, aumentando la fluidez y provocando la ruptura de la membrana en estructuras tipo micela (Figura 2) (Ciumac et al., 2019).

En los mecanismos no líticos, uno de los más relevantes en esta categoría es la inhibición de la síntesis de la pared celular, donde el peptidoglicano y su precursor, el lípido II, son elementos clave. Algunos PAMs, como la bacitracina y la vancomicina, actúan uniéndose al lípido II, bloqueando su incorporación y, con ello, evitando la formación adecuada de la pared bacteriana (Koch, 2003; Münch & Sahl, 2015). Este tipo de acción no implica necesariamente una lisis directa de la membrana plasmática, sino que genera un debilitamiento progresivo de la estructura celular. Además, otros péptidos, como el hexapéptido RWRWRW-NH₂, pueden interferir con procesos intracelulares específicos, como la localización de la enzima MurG, lo cual afecta la síntesis de la pared desde el interior de la célula y compromete aún más su integridad estructural (Wenzel et al., 2014). Asimismo, algunos PAMs logran translocarse al interior celular sin inducir lisis, lo que les permite interferir directamente en procesos intracelulares clave. Se han propuesto varios modelos para explicar esta translocación, entre ellos la formación de agujeros transitorios inducidos por PAMs ricos en prolina, la unión inicial con cambios de brechas en el modelo Shai-Matsuzaki-Huang, y la capacidad de ciertos péptidos de cruzar la membrana bajo estrés en el modelo de poros toroidales desordenados (Luo & Song, 2021; Scocchi et al., 2011). Otros modelos sugieren la formación de áreas rígidas que generan defectos para el paso de los péptidos en la translocación directa por inestabilidad de la membrana, así como la entrada por aumento de la fluidez de la membrana en el modelo de alfombra. Estos mecanismos requieren condiciones específicas, como gradientes de pH y potencial transmembrana (Figura 3) (Magzoub et al., 2005; Terrone et al., 2003).

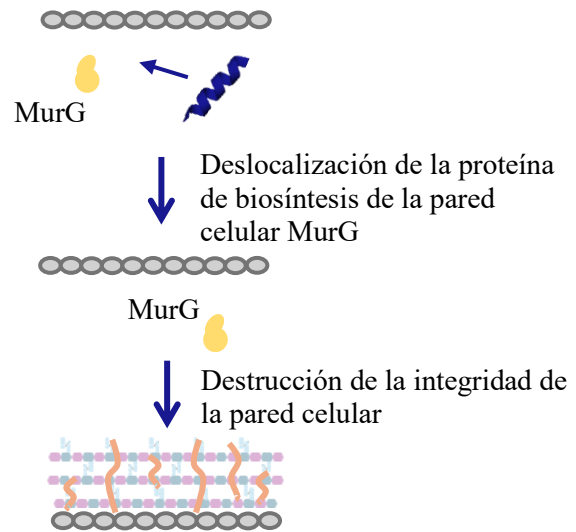
Al ingresar a la célula, los PAMs, pueden alterar procesos vitales como replicación, transcripción y traducción, afectando ácidos nucleicos, proteínas, orgánulos y sistemas enzimáticos, impactando el ciclo celular y el metabolismo energético (Graf & Wilson, 2019; Ulvatne et al., 2004). Su acción es diversa, no solo influyendo en la membrana celular, sino también interactuando con componentes internos celulares, lo que sugiere la posibilidad de combinarse con estas moléculas. Se han propuesto distintas explicaciones para la acción intracelular de los PAMs. Una de ellas sugiere que, en concentraciones elevadas, estos péptidos pueden atravesar la membrana y establecer interacciones directas con componentes intracelulares como el ADN y los polisomas 70S, afectando procesos como la síntesis proteica y la replicación (Zhu et al., 2019). La segunda explicación destaca que la investigación actual se basa en estudios de laboratorio que no replican completamente los entornos reales del cuerpo, ya que estos péptidos se adaptan a estímulos externos, ajustando su comportamiento según diferentes condiciones para mantener la homeostasis interna (Aguiar Camelo et al., 2024; Harnedy-Rothwell et al., 2021; Xiao et al., 2025).

Figura 3.

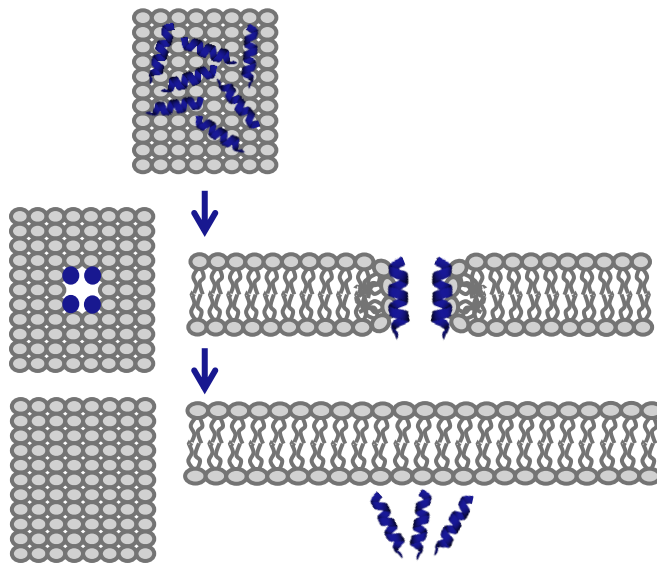
Mecanismos de acción no líticos de los PAMs.



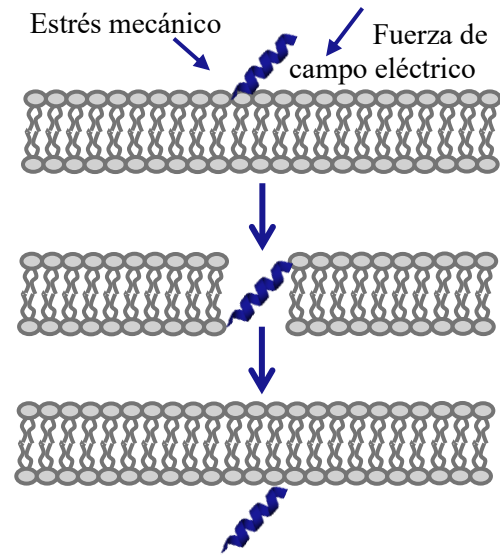
(a) Bloqueo de lípido II.



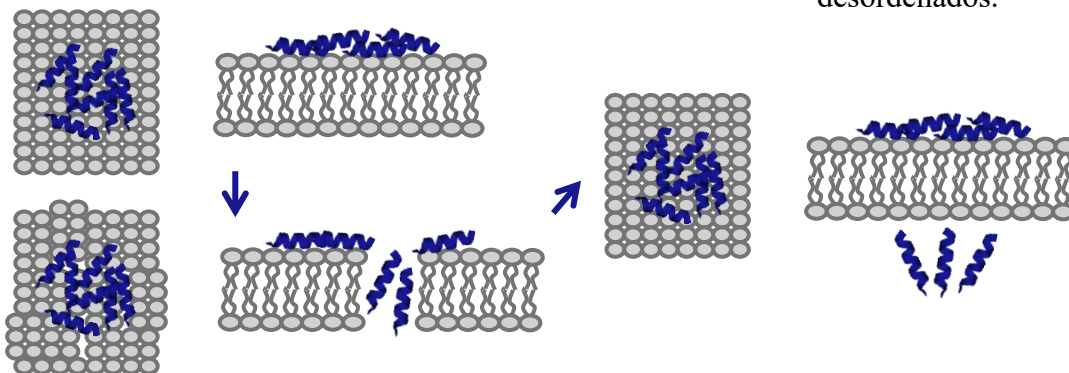
(b) Inhibición de MurG.



(c) Modelo de Shai-Matsusaki-Huang.



(d) Modelo de poros toroidales desordenados.



(e) Modelo de efecto en el límite de la fase lipídica.

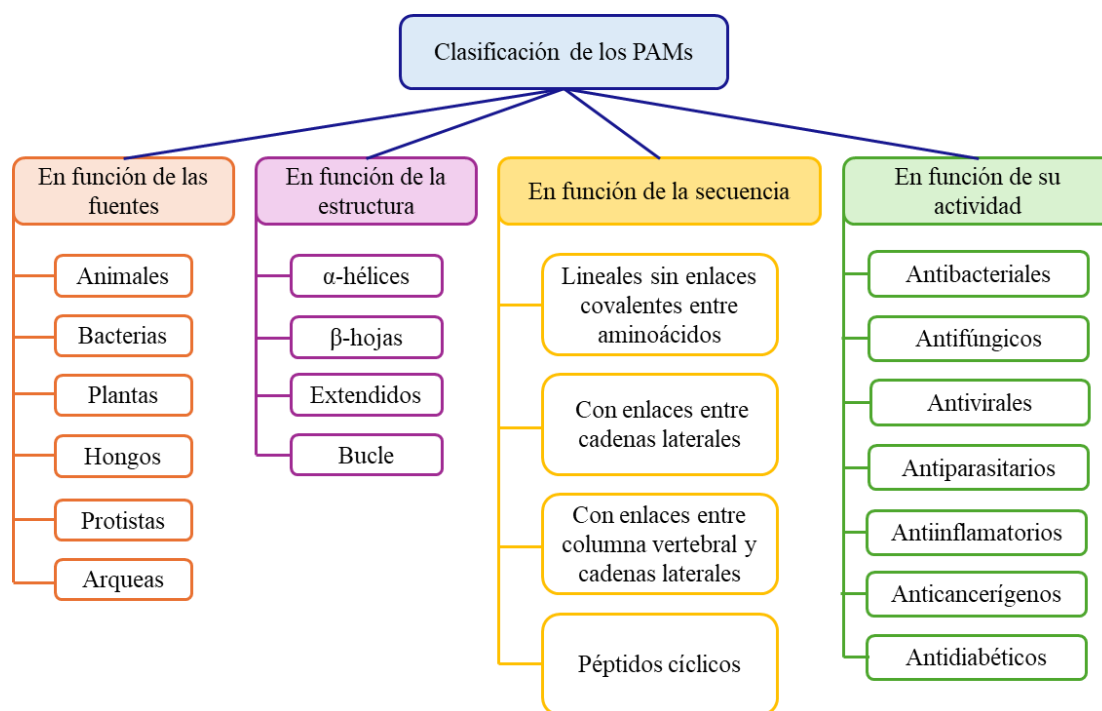
Nota. Adaptado de (Luo & Song, 2021).

2.2.3 Clasificación de los PAMs.

Los PAMs pueden clasificarse según distintos criterios, entre los que destacan su fuente de origen, estructura secundaria, secuencia y actividad biológica

Figura 4.

Clasificación de los PAMs.



Nota. Adaptado de (Wang et al., 2016).

2.2.3.1 En función de las fuentes. De acuerdo con la Base de Datos de Péptidos Antimicrobianos (APD), se han identificado un total de 3324 péptidos antimicrobianos, que incluyen tanto péptidos sintéticos como naturales, distribuidos entre seis reinos: animales (2446),

bacterias (391), plantas (364), hongos (22), protistas (8) y arqueas (5) (Wang et al., 2016). Sin embargo, dado que el objetivo del proyecto se centra en el estudio de péptidos antimicrobianos de origen molusco, en la sección 2.3 se aborda de manera específica este tema, con especial énfasis en los péptidos derivados de la hemocianina obtenida de la secreción mucosa de moluscos.

2.2.3.2 En función de la estructura. Los PAMs se dividen en cuatro categorías principales: α -helicoidales, de hoja β , extendidos y de bucle flexible. Los α -helicoidales, como las catelicidinas humanas o las magaininas, son típicamente lineales y actúan perturbando membranas (Diamond et al., 2009; Zhang & Gallo, 2016). Los de hoja β , como las defensinas y taquilepsinas, se estabilizan mediante enlaces disulfuro, lo que les confiere resistencia proteolítica (Kumar et al., 2018; Powers & Hancock, 2003). Los extendidos, ricos en residuos como glicina o triptófano, interactúan con lípidos de membrana mediante enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, con ejemplos como las histatinas y la indolicidina (Oppenheim et al., 1988; Powers & Hancock, 2003; Selsted et al., 1992). Finalmente, los de bucle, como la tanatina, presentan enlaces que restringen su estructura y exhiben potente actividad antimicrobiana (Dash & Bhattacharjya, 2021; Fehlbauer et al., 1996).

2.2.3.3 En función de las secuencias. El sistema de clasificación universal (UC) los agrupa en cuatro clases: lineales sin enlaces covalentes (Clase I, UCLL), con enlaces entre cadenas laterales como los disulfuros (Clase II, UCSS), con enlaces entre columna vertebral y cadenas laterales (Clase III, UCSB), y cíclicos con uniones entre terminales N y C (Clase IV, UCBB) (Wang, 2012, 2015; Wang et al., 2016).

2.2.3.4 En función de su actividad. Los PAMs abarcan un amplio rango de acciones biológicas, destacándose las actividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitaria y antitumoral. Ejemplos relevantes incluyen la nisina (antibacteriana), el AurH1 (antifúngica), el

Epi-1 (antiviral), las temporinas-SHd (antiparasitarias) y la tritripticina (antitumoral). (Abbassi et al., 2013; Arias et al., 2020; Huang et al., 2018; C. Li et al., 2019; Madanchi et al., 2019).

2.3 Péptidos derivados de la hemocianina de la secreción mucosa de moluscos.

El filo *Mollusca*, segundo en diversidad biológica con más de 150,000 especies, habita una gran variedad de ecosistemas, predominando en ambientes marinos, donde representan una cuarta parte de las especies conocidas (Benkendorff, 2010; Bouchet, 2006). Esta biodiversidad se refleja en una notable riqueza química (Ahmad et al., 2018; Benkendorff, 2010; Dang et al., 2015), clave para su éxito evolutivo frente a ambientes microbianos. Su sistema inmune innato, con componentes como hemocianinas (Hc) y PAMs, les proporciona una defensa eficaz (Benkendorff, 2010; Coutellec & Caquet, 2017; Hooper et al., 2007). Además, emplean compuestos químicos para funciones ecológicas y comportamentales, como defensa, comunicación o depredación (Benkendorff et al., 2001; Bornancin et al., 2017; Cummins et al., 2006; M. Jiang et al., 2019). Los metabolitos bioactivos identificados en moluscos pueden ser de origen endógeno, dietario o producido por simbiontes (Ciavatta et al., 2017) y han demostrado propiedades antimicrobianas (Benkendorff et al., 2005; Defer et al., 2009; Dolashka et al., 2016), anticancerígenas (Esmaeelian et al., 2018; Gesheva et al., 2014; Vine et al., 2007), antiinflamatorias (Ahmad et al., 2017, 2018; Liang et al., 2018), cicatrizantes (Badiu et al., 2010) e inmunogénicas (Gesheva et al., 2015; Theilacker et al., 2003). Actualmente, 19 compuestos de moluscos están en la cartera clínica farmacéutica marina mundial, y cuatro han sido aprobados por la FDA (Abadines et al., 2019).

Desde la antigua Grecia, donde se usaba el moco de caracol para reducir inflamaciones y signos de envejecimiento, este ha sido valorado por sus propiedades (Ekin, 2018). Hoy en día, el moco de caracol sigue siendo un ingrediente popular en productos de cuidado de la piel, con un

mercado en crecimiento que se espera alcance cerca de 770 millones de dólares para 2025 (Coherent Market Insights, 2023).

Entre las especies de caracoles, *Achatina fulica* destaca no solo por su relevancia en el ámbito comercial, sino también por su impacto ecológico. Originaria del este de África, se ha extendido a más de 60 países y es considerada una de las 100 especies exóticas invasoras más dañinas del mundo por su impacto en la agricultura, los ecosistemas, la salud humana y la economía (Clout & De Poorter, 2005). Esta especie secreta glicoproteínas con efectos biológicos, entre ellos, propiedades antibacterianas. Una de estas, denominada achacin, ha demostrado capacidad bactericida frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas al dañar sus membranas (Nantararat et al., 2019).

La hemocianina es una proteína transportadora de oxígeno presente en la hemolinfa de moluscos y artrópodos, con un papel análogo al de la hemoglobina en humanos. Se encuentra exclusivamente en estos dos filos: en todos los cefalópodos y en los decápodos, como los cangrejos y camarones (Burmester, 2001; Chiumiento et al., 2020). Su potencial como molécula bioactiva frente a microorganismos patógenos ha despertado interés hace poco, especialmente en estudios con crustáceos y arácnidos (Coates & Nairn, 2014; S. Y. Lee et al., 2003). Un ejemplo es la rondonina, un péptido antifúngico derivado de la subunidad “d” de la hemocianina de la tarántula *Eurypelma californicum*, que inhibe el crecimiento de *Candida albicans* (Riciluca et al., 2012).

En un estudio realizado por (Pereira et al., 2016), se llevó a cabo la caracterización física y bioquímica de la secreción mucosa de *A. fulica*, observándose una notable actividad antimicrobiana en la secreción completa. Más adelante, (Suárez et al., 2021), evaluaron fracciones semipurificadas, identificando una fuerte actividad antimicrobiana y capacidad de inhibición del *biofilm* en la fracción de péptidos >30 kDa. El análisis de secuencias reveló que estos péptidos

derivaban de la hemocianina, lo que permitió enfocar el estudio hacia esta proteína. Con base en estos hallazgos, (Pereira et al., 2025) aplicaron un diseño racional para seleccionar 20 péptidos específicos, sintetizarlos y evaluar su actividad antimicrobiana. Este enfoque no solo confirmó la actividad de los péptidos derivados de hemocianina, sino que permitió optimizar sus propiedades para potenciales aplicaciones terapéuticas.

Estos estudios, en conjunto, destacan el potencial de los péptidos derivados de la hemocianina de *A. fulica* como agentes antimicrobianos. La investigación ha demostrado que no solo tienen actividad antimicrobiana significativa, sino también la capacidad de inhibir la formación de *biofilms*, lo cual es crucial en la lucha contra infecciones bacterianas resistentes. Sin embargo, estos péptidos no han sido probados frente a bacterias Gram negativas distintas a *Escherichia coli*. Por lo tanto, se propone llevar a cabo la evaluación de la actividad antibacteriana de 5 de los péptidos derivados de la hemocianina de *A. fulica* frente a la bacteria Gram negativa *P. aeruginosa*.

2.4 *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa (PA) es un microorganismo oportunista que causa infecciones graves y persistentes en pacientes inmunocomprometidos, incluyendo aquellos con EPOC (García-Núñez et al., 2017), fibrosis quística (Rossi et al., 2021; Winstanley et al., 2016) y heridas cutáneas (Sinha et al., 2023). Es además una causa frecuente de infecciones nosocomiales, especialmente en unidades de cuidados intensivos, donde se asocia a neumonía vinculada a la ventilación mecánica (Fernández-Barat et al., 2017; Kubes & Fridkin, 2019). Su capacidad para formar *biofilm* le permite resistir ambientes hostiles, incluso con baja concentración de oxígeno, favoreciendo su persistencia (Cendra & Torrents, 2021; Riquelme et al., 2020). El tratamiento de estas infecciones es complejo debido a su rápida capacidad de mutación y resistencia a múltiples antibióticos

(Blomquist & Nix, 2020; Botelho et al., 2019; Jangra et al., 2022). Por ello, la OMS la ha clasificado como una amenaza bacteriana “crítica”, destacando la urgencia de desarrollar nuevas estrategias antimicrobianas para su control (Botelho et al., 2019; Tacconelli et al., 2018).

Morfológicamente, PA es un bacilo Gram negativo, aeróbico, no esporulado, con flagelos polares que le otorgan motilidad y quimiotaxis (Palleroni, 2005; Solano-Gálvez et al., 2019). PA crece entre 20 y 43 °C, sobrevive en ambientes con alta salinidad y prefiere condiciones aeróbicas, aunque también tolera medios ácidos. No fermenta lactosa, utiliza acetato y amoníaco como fuentes de carbono, y obtiene energía mediante la oxidación de azúcares. Además, es positiva para oxidasa y catalasa, puede degradar glucosa y transformar nitrógeno en nitrito o gas (Palleroni, 2005; Strateva & Yordanov, 2009).

La infección inducida por PA progresa en tres fases: adhesión y colonización del huésped, invasión tisular local y, finalmente, diseminación sistémica. PA emplea diversos mecanismos para adaptarse al entorno hostil del hospedero y resistir tratamientos antimicrobianos, entre los cuales destacan la formación de *biofilm* y la estructura de su membrana externa, especialmente el lipopolisacárido (LPS) (Liao et al., 2022; Vidaillac & Chotirmall, 2021).

El *biofilm* favorece la persistencia bacteriana y disminuye la eficacia de los antimicrobianos, mediante una regulación compleja que involucra señales como el c-di-GMP y componentes como el LPS. Esto da lugar a poblaciones heterogéneas y fenotipos tolerantes, dificultando su erradicación (Barken et al., 2008; Hall & Mah, 2017; Stewart & Franklin, 2008; Webster et al., 2021).

El LPS, presente en todas las cepas de PA, actúa como barrera estructural y participa en la evasión inmune, adhesión a superficies y formación de *biofilm*, funciones que dependen de su interacción con otros elementos de la matriz (Alshalchi & Anderson, 2015; Chambers et al., 2017;

King et al., 2009; Murphy et al., 2014). Su fracción más variable, el O-polisacárido (OPS), juega un papel esencial en la tolerancia al estrés y en la resistencia a agentes antimicrobianos (Park et al., 2022).

2.5 Uso de herramientas bioinformáticas para la predicción de propiedades fisicoquímicas de péptidos.

Tradicionalmente, el aislamiento y caracterización de PAMs se han llevado a cabo mediante métodos *in vivo* o *in vitro*, procesos que, aunque efectivos, requieren una cantidad considerable de tiempo y recursos.

En contraste, las herramientas bioinformáticas han emergido como una alternativa eficiente y económica. Estas permiten predecir con precisión propiedades fisicoquímicas y potencial actividad biológica de los péptidos mediante modelos *in silico* (Agrawal et al., 2018; Dos Santos et al., 2023; Kaur et al., 2020). Este enfoque no solo optimiza el proceso de investigación, sino que también permite dirigir los esfuerzos hacia la secuenciación y síntesis de péptidos con mayor probabilidad de ejercer la acción biológica deseada (Y. Li et al., 2019). Así, la bioinformática se ha consolidado como un recurso fundamental en el descubrimiento de péptidos bioactivos con aplicaciones en salud y biotecnología (Wei et al., 2022).

Estudios recientes han demostrado que las propiedades biológicas de los péptidos dependen de una interacción dinámica entre factores como la hidrofobicidad, carga eléctrica, masa molecular, momento hidrofóbico (Fjell et al., 2011) y otros atributos fisicoquímicos. Estos elementos, en conjunto, ofrecen un marco valioso para clasificar, predecir y diseñar péptidos con funciones específicas (Akbar et al., 2020; Manavalan et al., 2017). Además, la predicción de estas propiedades no solo permite entender su comportamiento molecular, sino también inferir

actividades biológicas clave, como su potencial antimicrobiano frente a bacterias patógenas o su capacidad antifúngica contra infecciones micóticas (Fjell et al., 2011).

Existen numerosas herramientas computacionales diseñadas para calcular las propiedades fisicoquímicas de los péptidos. Entre las más utilizadas destacan las plataformas en línea, como ExPASy (Artimo et al., 2012), APD (Wang et al., 2016), Peptide Tools (desarrollada por Peptide 2.0 Inc., Chantilly, VA, EE. UU. <https://www.peptide2.com/>) e IPC 2.0 (Kozlowski, 2021). Por otro lado, las aplicaciones de escritorio, como EMBOSS (Lamprecht et al., 2011), aunque potentes, son menos frecuentes en comparación con las soluciones basadas en la web. Además, en los últimos años, ha crecido el uso de paquetes de código abierto en lenguajes de programación como R (Osorio et al., 2015), Python (Kozlowski, 2016) y Perl (Stajich, 2007), los cuales ofrecen flexibilidad y personalización para el análisis de péptidos.

ExPASy (*Expert Protein Analysis System*) es una plataforma bioinformática integral desarrollada por el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) que se ha convertido en un recurso esencial para investigadores en el campo de la proteómica y la biología molecular. Desde su lanzamiento en 1993, ExPASy ha evolucionado para ofrecer una amplia gama de herramientas y bases de datos especializadas en el análisis de proteínas y péptidos. Entre sus funcionalidades destacan la predicción de propiedades fisicoquímicas, como el peso molecular, el punto isoeléctrico y la hidrofobicidad, así como la identificación de dominios funcionales y modificaciones postraduccionales (Appel et al., 1994; Gasteiger et al., 2003).

La plataforma integra recursos como SWISS-2DPAGE, PROSITE, ENZYME y SWISS-MODEL, lo que permite a los usuarios realizar análisis estructurales, funcionales y comparativos de proteínas de manera eficiente (Artimo et al., 2012). Además, ExPASy ofrece acceso a

herramientas como ProtParam, que calcula parámetros fisicoquímicos clave, y PeptideCutter, que predice sitios de corte en péptidos (Gasteiger et al., 2005).

ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) es una herramienta que calcula diversas propiedades fisicoquímicas de una proteína directamente a partir de su secuencia. No requiere información adicional sobre la proteína, ya que puede analizar tanto secuencias en bruto como entradas de Swiss-Prot/TrEMBL mediante su número de acceso o ID. ProtParam proporciona una amplia gama de parámetros, entre los que se incluyen:

- **Peso molecular (Mw):** se calcula sumando las masas atómicas de todos los átomos que la componen. ProtParam utiliza las masas atómicas promedio de los elementos basándose en la composición de aminoácidos de la secuencia excluyendo el peso de una molécula de agua (18.015 Da) por cada enlace peptídico formado (Gasteiger et al., 2005).
- **Punto isoelectrico (pI):** es el pH al que una proteína tiene carga neta cero. ProtParam calcula el pI considerando los grupos ionizables de los aminoácidos (terminales y cadenas laterales, como lisina, arginina, ácido glutámico y aspártico). Utiliza un algoritmo iterativo que equilibra las cargas positivas y negativas, basándose en los valores de pKa de estos grupos (Bjellqvist et al., 1993; Gasteiger et al., 2005).
- **Coeficiente de extinción:** estima la absorción de luz de una proteína, útil en su purificación por espectrofotometría. ProtParam calcula dos valores: uno con cisteína como cistina y otro sin cistina, basándose en la contribución de tirosina, triptófano y cistina, bajo condiciones específicas (pH 6.5, 6.0 M de clorhidrato de guanidinio, buffer de fosfato 0.02 M) (Gill & Von Hippel, 1989).

- Vida media *in vivo*: predice el tiempo de degradación de la mitad de la proteína en células humanas, de levadura o *E. coli*, basándose en el residuo N-terminal, según la "regla del N-terminal" (N-end rule), que vincula este residuo con la degradación mediada por ubiquitina (Bachmair et al., 1986; Tobias et al., 1991; Varshavsky, 1996).
- Índice de inestabilidad: predice la estabilidad *in vitro*: valores <40 indican estabilidad, mientras que >40 sugieren inestabilidad. Basado en análisis estadísticos de dipéptidos en proteínas estables e inestables (Guruprasad et al., 1990).
- Índice alifático: mide la proporción de cadenas laterales alifáticas (alanina, valina, isoleucina, leucina), relacionada con la termoestabilidad de proteínas globulares. Se calcula usando coeficientes que comparan el volumen de estos residuos con la alanina (Ikai, 1980).
- GRAVY (promedio general de hidropaticidad): calculado a partir de los valores de hidropatía de los aminoácidos, proporciona una medida de la hidropaticidad global de la proteína (Kyte & Doolittle, 1982).

2.6 Uso de herramientas bioinformáticas para el modelamiento de la estructura secundaria de péptidos.

Gracias a los avances en las técnicas de secuenciación, ahora se dispone de un extenso repertorio de secuencias peptídicas, tanto experimentales como teóricas. Solo en procariotas se han identificado más de 1.8 millones de secuencias potenciales, muchas de las cuales aún no tienen estructura definida. (Rey et al., 2014). En paralelo, el diseño racional de péptidos orientados a interacciones proteína-proteína (London et al., 2013; Whitehead et al., 2013) y proteína-membrana

(H. Yin & Flynn, 2016) ha ganado interés como estrategia para desarrollar moléculas bioactivas con funciones específicas (Donsky & Wolfson, 2011; Wichapong et al., 2016).

Descifrar la arquitectura molecular de proteínas y péptidos es fundamental para desentrañar sus roles biológicos (Varadi et al., 2021). Técnicas fisicoquímicas avanzadas, como la cristalografía de rayos X y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), han sido pilares en la elucidación de estructuras tridimensionales (3D) (Kendrew et al., 1958; Mishra & Coutinho, 2020). Sin embargo, estos métodos no están exentos de desafíos: requieren tiempos de procesamiento prolongados y suelen implicar costos elevados, lo que limita su aplicabilidad en ciertos contextos.

En este sentido, las herramientas computacionales se han vuelto esenciales para descifrar la estructura de los péptidos y entender cómo interactúan con las proteínas (Vanhee et al., 2011).

Actualmente existen múltiples herramientas bioinformáticas para el modelado estructural de péptidos. Algunas como CycloPS permiten diseñar péptidos cíclicos (Duffy et al., 2011), mientras que otras, como PEPStr, PEPStrMod (Singh et al., 2015), PEP-FOLD (Maupetit et al., 2009; Thévenet et al., 2012) y PEPLook (Beaufays et al., 2012), predicen la estructura tridimensional desde la secuencia primaria. Entre estas, PEP-FOLD ha evolucionado significativamente, permitiendo modelar péptidos lineales y cíclicos de hasta 50 residuos, incluso con enlaces disulfuro (Lamiable et al., 2016) y estudiar sus interacciones con proteínas (Chopra et al., 2011; Gupta et al., 2009).

El análisis estructural se complementa con herramientas de visualización molecular como VMD, ChimeraX y PyMOL (Delano, 2002; Humphrey et al., 1996; Pettersen et al., 2004) siendo esta última ampliamente usada por su capacidad para representar estructuras moleculares y generar imágenes y animaciones de alta calidad (Goodsell & Jenkinson, 2018; Martinez et al., 2019).

PyMOL permite importar archivos PDB, visualizar estructuras secundarias y terciarias, y analizar interacciones moleculares clave como enlaces iónicos o puentes de hidrógeno (Delano, 2002; Lill & Danielson, 2011; Sousa et al., 2006). Además, su compatibilidad con scripts en Python lo convierte en una herramienta versátil y adaptable a distintas necesidades de investigación (Cock et al., 2009).

3. Metodología

3.1 Predicción de propiedades fisicoquímicas de los péptidos

3.1.1 Selección y obtención de las secuencias

Para el desarrollo de este estudio, se emplearon los péptidos 4405, 4712, 4732, 4738 y 4743, disponibles en el Laboratorio del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología GIBIM (Edificio de Investigaciones de la Facultad de Ciencias EDIC, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia). Estos péptidos fueron previamente diseñados y sintetizados en un estudio realizado por (Pereira et al., 2025), utilizando una estrategia de diseño racional *in silico* con el objetivo de optimizar su potencial antimicrobiano.

Las secuencias peptídicas derivan de hemocianinas presentes en la secreción mucosa de *A. fulica* (Suárez et al., 2021). Dentro de estos, el péptido 4712 es un análogo del péptido 4398, en el cual se implementaron sustituciones de alanina mediante un *alanine scan*, mientras que los péptidos 4732, 4738 y 4743 son análogos del péptido 4405, diseñados con modificaciones similares (Pereira et al., 2025).

Tabla 2.*Secuencias de los péptidos estudiados.*

Péptido	Secuencia	Observaciones
4405	ILYVVQLIQALKKKKG	Péptido nativo
4712	LFKKIVTNVFNKANL	Análogo del péptido 4398
4732	ILAVVQLIQALKKKKG	
4738	ILYVVQLIAALKKKKG	Análogos del péptido 4405
4743	ILYVVQLIQALKKKA	

3.1.2 Predicción de propiedades fisicoquímicas

La predicción de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos seleccionados se llevó a cabo por medio de cálculos *in silico* para la predicción de parámetros tales como: peso molecular (Da), carga neta, punto isoeléctrico (pI), índice GRAVY (Gran Promedio de Hidropaticidad) e índice de inestabilidad.

Para ello, se empleó la herramienta ProtParam, disponible en la plataforma ExPASy (Swiss Institute of Bioinformatics, <https://web.expasy.org/protparam/>, acceso libre) (Gasteiger et al., 2005). Las secuencias de los péptidos se ingresaron directamente en formato de aminoácidos.

3.2 Modelado de la estructura secundaria de los péptidos**3.2.1 Modelado estructural con PEP-FOLD 3.5**

Para realizar el modelado de la estructura secundaria de los péptidos, se utilizó el servidor PEP-FOLD v3.5 (Université Paris Diderot, <https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>, acceso libre) (Lamiable et al., 2016).

Las secuencias de aminoácidos de los péptidos se introdujeron en la plataforma PEP-FOLD 3.5 utilizando su interfaz web. Para cada péptido, se seleccionó el modelo de predicción de *nov*, el cual emplea el algoritmo sOPEP para evaluar la estabilidad estructural. Como parte de los parámetros opcionales, se asignó una etiqueta identificativa a cada péptido, la cual se reflejó en los nombres de los archivos de salida. Dado que los péptidos analizados son de longitud corta, se configuró el número de simulaciones en 100, un valor adecuado para garantizar la generación de trayectorias subóptimas suficientes (Lamiable et al., 2016). El servidor produjo múltiples modelos tridimensionales para cada secuencia, basados en la optimización de la energía libre y las interacciones moleculares. Finalmente, se seleccionó el modelo con el menor valor de energía libre, ya que este representa la conformación más estable y biológicamente relevante.

3.2.2 Visualización y análisis de estructuras con PyMOL

Los modelos tridimensionales generados por PEP-FOLD 3.5 se exportaron en formato PDB y se visualizaron utilizando el software PyMOL v3.1 (Schrödinger, LLC, <https://pymol.org/>, licencia educativa) (Delano, 2002).

En PyMOL, las estructuras se representaron mediante diagramas de cintas (ribbon diagrams), una técnica que permite resaltar los elementos de la estructura secundaria, como hélices alfa (α), láminas beta (β) y regiones desordenadas. Esta representación facilitó la identificación de la disposición espacial de los residuos y la organización general de los péptidos.

3.3 Determinación del porcentaje de inhibición de los péptidos frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

3.3.1 Cepa bacteriana y medios de cultivo

La cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 fue adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA).

Los medios de cultivo utilizados, como Luria Bertani (LB), Mueller-Hinton (MH), Infusión Cerebro Corazón (BHI), peptona y agar bacteriológico, fueron adquiridos de la marca OXOID (Hampshire, Reino Unido). La solución amortiguadora de fosfato salino (PBS), empleada como disolvente para los péptidos, fue preparada siguiendo una metodología estandarizada en el laboratorio GIBIM, utilizando reactivos suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). Las microplacas de 96 pozos de polipropileno de fondo plano, con tapa, fueron proporcionadas por la empresa Biologix (Kansas, EE. UU.). Para todos los ensayos biológicos, se utilizó agua ultrapura MilliQ con una resistividad de 18.2 Ω , obtenida mediante el equipo Smart 2 Pure (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.).

3.3.2 Determinación de la actividad antibacteriana

La evaluación de la actividad antibacteriana se llevó a cabo mediante ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano, calculando el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de los péptidos frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853. Para ello, se utilizó la técnica de microdilución en caldo, siguiendo las directrices establecidas por el CLSI M07-A10-2015 (CLSI, 2015) pero adaptadas para estos compuestos específicos, como se describió en un estudio anterior (Cruz et al., 2017).

Para evaluar la actividad antibacteriana de los péptidos, se preparó inicialmente un cultivo en estado planctónico del microorganismo, el cual se incubó durante 24 horas. A partir de este, se realizó un preinóculo en caldo LB, manteniéndolo en reposo durante 12 horas a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una concentración bacteriana adecuada, que osciló entre 10^5 y 10^6 UFC/mL. Posteriormente, se llevó a cabo la cinética de crecimiento del cultivo utilizando microplacas de 96 pozos (fondo plano), añadiendo 100 μ L del inóculo bacteriano junto con 100 μ L de diluciones de los péptidos disueltos en PBS a concentraciones finales de 40 μ M para el péptido 4405 y 50 μ M

para los péptidos 4712, 4732, 4738 y 4743. En otros pozos, se depositó 100 µL del inóculo bacteriano junto con 100 µL de PBS para el control de crecimiento. El microorganismo se incubó durante 8 horas a 37 °C y 200 rpm, midiendo la absorbancia cada hora mediante un espectrofotómetro tipo lector de microplacas Sky Multiskan (Thermo Labsystems Inc., Beverly, MA, EE. UU.), utilizando una longitud de onda de 595 nm.

El porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = \left(1 - \frac{\Delta Abs_{trat}}{\Delta Abs_{ctrl}}\right) \times 100$$

Donde:

- ΔAbs_{trat} corresponde a la variación en la absorbancia de la bacteria en presencia del péptido evaluado, determinada como $Abs_{t=8h}(trat) - Abs_{t=0h}(trat)$.
- ΔAbs_{ctrl} corresponde a la variación en la absorbancia del control de crecimiento, determinada como $Abs_{t=8h}(ctrl) - Abs_{t=0h}(ctrl)$.

Adicionalmente, se calculó el área bajo la curva de crecimiento (AUC) a partir de los datos de absorbancia obtenidos a 8 h y 24 h, utilizando el software GraphPad Prism v10 para Windows (software GraphPad, San Diego. CA, EE. UU., <https://www.graphpad.com/features>, licencia comercial). Este parámetro integra en un solo valor la cinética bacteriana completa, facilitando la comparación del efecto global de cada péptido sobre el control crecimiento (Ram et al., 2019; Smith et al., 2024).

3.3.3 Control microbiológico de contaminación cruzada

Para verificar la identidad de la cepa bacteriana en los pozos experimentales y prevenir posibles contaminaciones cruzadas durante el seguimiento de curvas de crecimiento de *P. aeruginosa*, se implementó una estrategia adicional basada en el conteo por goteo sobre placas de

agar MH. Este procedimiento se adaptó de la metodología descrita por (Corral-Lugo et al., 2012) a las condiciones específicas del presente estudio, y se aplicó como herramienta de control microbiológico complementario a las lecturas turbidimétricas. Al finalizar la incubación de 24 horas, se tomaron 100 μL del contenido de los pozos correspondientes a los péptidos 4712 y 4732 (seleccionados por su mayor inhibición relativa) y del control de crecimiento. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta 10^{-7} y se inocularon 10 μL de las diluciones 10^{-3} a 10^{-7} sobre placas de agar Mueller-Hinton en triplicado, incubándolas a 37 °C durante 18–24 horas. Aunque inicialmente se planteó como una vía para estimar unidades formadoras de colonia (UFC), el crecimiento bacteriano fue tan denso que impidió la cuantificación precisa, debido a la coalescencia de colonias incluso en las diluciones más altas. No obstante, las placas fueron fotodocumentadas como evidencia visual con ayuda del sistema ChemiDoc™ MP (Bio-Rad).

3.4 Análisis estadístico

Todos los ensayos se llevaron a cabo con un mínimo de tres réplicas biológicas independientes. Los datos de absorbancia obtenidos se analizaron mediante el software GraphPad Prism v10 para Windows (software GraphPad, San Diego. CA, EE. UU., <https://www.graphpad.com/features>, licencia comercial). La normalidad de los datos se verificó aplicando las pruebas de D'Agostino & Pearson y de Shapiro–Wilk. Los datos no cumplieron consistentemente con el supuesto de normalidad, por lo que se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis para comparar las medianas entre tratamientos, el nivel de significancia considerado fue de $\alpha = 0.05$. Asimismo, se incorporaron controles de crecimiento bacteriano y un control negativo en cada experimento, con el fin de garantizar la fiabilidad y validez de los procedimientos realizados.

4. Resultados y discusión

4.1 Propiedades fisicoquímicas de los péptidos

Los resultados obtenidos para cada parámetro, calculados utilizando el software bioinformático ProtParam de la plataforma ExPASy, se resumen en la Tabla 3.

La predicción de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos se realizó tomando como referencia su secuencia primaria. Es importante señalar que la verificación experimental de la secuencia primaria y la masa molecular fue realizada en un estudio previo mediante espectrometría de masas, donde se confirmó la secuencia de los péptidos sintetizados. En dicho estudio, la relación masa/carga (m/z) y los iones moleculares obtenidos experimentalmente coincidieron con los valores teóricos calculados (Pereira et al., 2025) (Apéndice C).

Tabla 3.

Características fisicoquímicas de los péptidos estudiados.

Péptido	Secuencia	Carga neta	P.I	PM [Da]	GRAVY	I.I
4405	ILYVVQLIQALKKKKG	+3	10	1714.2	0.68	10.8
4712	LFKKIVTNVFNKANL	+3	10.3	1749.1	0.33	-11.9
4732	ILAVVQLIQALKKKKG	+3	10.3	1622.1	0.89	10.8
4738	ILYVVQLIAALKKKKG	+3	10	1657.1	1.03	10.8
4743	ILYVVQLIQALKKKA	+3	10	1728.2	0.83	16.5

Nota. P.I: Punto isoeléctrico. PM: peso molecular. GRAVY: índice de hidrofobicidad. I.I: Índice de Inestabilidad.

Los péptidos analizados muestran un peso molecular que oscila entre 1622,1 Da y 1749,1 Da. Estas diferencias en la masa molecular pueden tener implicaciones importantes en la estabilidad y biodisponibilidad de los péptidos en sistemas biológicos, ya que se ha reportado que péptidos con pesos moleculares menores tienden a presentar una mayor facilidad de difusión y penetración en tejidos (Wang et al., 2016; Zhang et al., 2021).

Todos los péptidos muestran una carga neta de +3 a pH fisiológico (pH 7). Esto indica una naturaleza catiónica que se puede atribuir principalmente a la presencia de residuos de lisina (K) en sus secuencias, aminoácido que posee el grupo funcional amino ($-NH_2$) con capacidad de protonarse a pH fisiológico, confiriéndole una carga positiva. La ausencia de residuos de aminoácidos ácidos como ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E) en cantidades significativas también contribuye a la naturaleza catiónica de estos péptidos, ya que no hay grupos con carga negativa que puedan neutralizar el efecto de los residuos básicos presentes. Esta carga positiva es un factor determinante en la actividad antibacteriana de los péptidos, ya que facilita su interacción con la membrana bacteriana, la cual está cargada negativamente debido a la presencia de fosfolípidos aniónicos (fosfatidilglicerol, cardiolipina) en bacterias Gram positivas y lipopolisacáridos en bacterias Gram negativas. Varias investigaciones han evidenciado una relación directa entre la carga neta de los PAMs y su capacidad para ejercer actividad antibacteriana (Dathe et al., 2001; Gagnon et al., 2017; Hong et al., 2001; Z. Jiang et al., 2008; Lei et al., 2019; Lyu et al., 2016).

Como se observa en la Tabla 3, el punto isoelectrico (pI) de los péptidos se sitúa en un rango de 10,00 a 10,30, lo que sugiere que, en condiciones fisiológicas, estos péptidos se encuentran predominantemente en su forma protonada y cargada positivamente.

La hidrofobicidad es un factor clave en la actividad antibacteriana de los péptidos, ya que determina su capacidad para interactuar e insertarse en la bicapa lipídica de las membranas bacterianas. Se ha demostrado que la hidrofobicidad, al igual que la carga, aumenta la actividad contra las membranas celulares microbianas en varios estudios (Lee et al., 2016; Tachi et al., 2002). El análisis de hidrofobicidad, evaluado mediante el índice GRAVY (*Grand Average of Hydropathy*), reveló valores positivos para todos los péptidos estudiados, lo que indica una naturaleza predominantemente hidrofóbica esto debido a que los péptidos evaluados contienen residuos hidrofóbicos como isoleucina (I), leucina (L), valina (V) y alanina (A), lo que favorece su afinidad por ambientes lipídicos. Los péptidos 4405, 4732, 4738 y 4743 comparten una región central hidrofóbica (ILYVVQLI), lo que sugiere una fuerte interacción con membranas. El péptido 4738 registró el valor más alto (1,033), con una sustitución de alanina por leucina en la posición 9, muestra mayor hidrofobicidad que 4405 y 4732, debido a la mayor contribución hidrofóbica de la leucina. Por su parte, el péptido 4743 presenta una modificación en el extremo C-terminal (K → A), reduciendo su carga global, pero aumentando su afinidad lipídica. En contraste, el péptido 4712, el cual mostró el valor más bajo (0,33), tiene un patrón alternante de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos, lo que resulta en una menor hidrofobicidad y, probablemente, una menor capacidad de inserción en la membrana.

Los péptidos analizados en la tabla 3 muestran variabilidad en el índice de inestabilidad, reflejando diferencias en su estabilidad estructural y posible vida media en medios biológicos. En particular, los péptidos 4405, 4732 y 4738 presentan valores de inestabilidad en un rango cercano a 10,85, lo que indica una alta estabilidad estructural, lo que sugiere que pueden mantener su estructura funcional en condiciones biológicas sin degradarse rápidamente. Esto puede atribuirse a la presencia de residuos como leucina (L), valina (V) e isoleucina (I), los cuales en estudios han

mostrado formar cúmulos hidrofóbicos que excluyen agua y estabilizan tanto la estructura secundaria como las interacciones internas, reduciendo la probabilidad de degradación proteolítica (Catalano et al., 2023; Kathuria et al., 2016; Zhu et al., 1993). Por otro lado, el péptido 4712 muestra un índice de inestabilidad negativo (-11,90), lo que indica una alta estabilidad en solución, este resultado es relevante, ya que podría indicar que este péptido tiene una mayor vida media en el medio biológico, lo que podría favorecer una interacción prolongada con la membrana bacteriana y, potencialmente, una mayor eficacia antibacteriana (Powell et al., 1992). Esto puede deberse a la disposición específica de sus residuos hidrofóbicos e hidrofílicos, que favorecen interacciones internas que estabilizan la estructura.

4.2 Estructura secundaria de los péptidos

4.2.1 Modelado estructural

Se obtuvieron tres modelos para los péptidos 4405, 4738 y 4743, mientras que para los péptidos 4712 y 4732 se generaron hasta cinco modelos de cada uno. De estos, se seleccionaron aquellos con los valores de energía más bajos, ya que representan las conformaciones más estables y biológicamente relevantes.

Para optimizar el análisis y reducir las opciones, la Tabla 4 muestra solo los tres modelos con menor energía sOPEP (*Optimized Potential for Efficient structure Prediction*) de cada péptido. Este parámetro indica la estabilidad conformacional: cuanto menor sea su valor, mayor será la estabilidad del modelo (Maupetit et al., 2007, 2010).

Tabla 4.

Parámetros estructurales de los modelos peptídicos predichos por PEP-FOLD3.5.

Péptido	Modelo	sOPEP	Avg	GDT	Max	q	TM
4405	4405-model1	-29.0549	0.965	0.994	0.990	0.978	0.897
	4405-model2	-25.5373	0.805	0.886	0.862	0.785	0.687
	4405-model3	-23.0228	0.772	0.866	0.796	0.746	0.681
4712	4712-model1	-22.6806	0.947	0.996	0.992	0.978	0.821
	4712-model2	-22.5948	0.955	0.997	0.994	0.979	0.850
	4712-model3	-22.5792	0.958	0.999	0.995	0.984	0.855
4732	4732-model1	-28.7101	0.972	0.999	0.997	0.988	0.905
	4732-model2	-28.6199	0.955	0.999	0.994	0.981	0.844
	4732-model3	-28.6032	0.973	0.999	0.997	0.988	0.907
4738	4738-model1	-30.0396	0.963	0.992	0.987	0.976	0.895
	4738-model2	-26.7266	0.794	0.867	0.844	0.743	0.723
	4738-model3	-24.2104	0.771	0.867	0.798	0.732	0.688
4743	4743-model1	-29.4719	0.954	0.991	0.985	0.969	0.869
	4743-model2	-26.1803	0.827	0.889	0.868	0.794	0.757
	4743-model3	-25.3885	0.831	0.904	0.865	0.810	0.745

Nota. Se incluyen los 3 modelos con menor energía sOPEP para cada péptido evaluado. sOPEP: energía de potencial que indica la estabilidad del modelo predicho (Maupetit et al., 2007, 2010). Avg: promedio general de similitud estructural entre el modelo central del clúster y los demás modelos. GDT (*Global Distance Test*): métrica de similitud estructural que compara residuos en modelos diferentes (Z. Wang et al., 2009). Max: valor máximo observado entre las comparaciones estructurales dentro del clúster. q (*Quality score*): medida de calidad global del modelo. TM

(*Template Modeling score*): similitud estructural entre dos modelos, normalmente, entre un modelo y la estructura de referencia o consenso del clúster (Zhang & Skolnick, 2004).

La predicción de las estructuras peptídicas mediante PEP-FOLD v3.5 reveló patrones conformacionales estrechamente vinculados a sus secuencias, destacando cómo sustituciones aparentemente menores pueden influir en la estabilidad y geometría molecular. Los resultados mostraron que, en general, los modelos convergieron hacia conformaciones energéticamente favorables, aunque con diferencias sutiles pero significativas entre ellos. Entre los cinco péptidos analizados, el 4732 emergió como el más estable, con un modelo que combinó un bajo valor de sOPEP (-28.7101) con parámetros de calidad excepcionales (GDT: 0.999, q: 0.988). La sustitución de tirosina (Y) por alanina (A) en la posición 3 implica una diferencia importante en términos de polaridad y capacidad de interacción por enlaces de hidrógeno, ya que la tirosina posee un grupo fenólico que puede participar activamente en interacciones con el medio acuoso o con otras cadenas laterales. Esta diferencia química puede explicar por qué el modelo 1 del péptido 4732 exhibió un mejor perfil estructural en comparación con los modelos del péptido 4405 que, si bien presentaron buena estabilidad, mostraron valores ligeramente inferiores en métricas de calidad estructural.

Por otro lado, el péptido 4712, con su alta densidad de residuos cargados y polares especialmente lisinas (K) y asparaginas (N), mostró una tendencia hacia estructuras más abiertas y dinámicas menos propensa a formar estructuras helicoidales compactas, como lo reflejan sus valores de TM (0,821), ligeramente inferiores a los de péptidos más hidrofóbicos. Esto era esperable, ya que, según (Doig & Baldwin, 1995), la presencia de residuos cargados como lisina puede afectar negativamente la estabilidad de estructuras secundarias, como las hélices, debido a

la repulsión electrostática entre cargas del mismo signo y a la interacción desfavorable con el solvente, lo que en conjunto dificulta la formación de estructuras compactas. Sin embargo, su modelo 3 (sOPEP: -22.5792, q: 0.984) demostró que, aun en estas condiciones, el péptido puede alcanzar conformaciones bien plegadas, aunque probablemente con mayor flexibilidad global.

Un caso particularmente ilustrativo fue el del péptido 4738, donde la pérdida de residuos polares frente al 4405, el reemplazo de una glutamina (Q) en posición 9 por alanina (A), resultó en una disminución notable en la calidad estructural de algunos modelos (GDT: 0.867, TM: 0.723). Esta observación refuerza la importancia de los puentes de hidrógeno internos en el mantenimiento de la estabilidad peptídica, ya que la cadena lateral de glutamina actuaría como un elemento organizador clave (Rhys et al., 2012; Roy & Dannenberg, 2011). No obstante, el modelo 1 de este péptido (sOPEP: -30.0396, GDT: 0.992) mostró que, en ciertas conformaciones, la alanina puede compensar esta falta mediante interacciones hidrofóbicas locales, lo que subraya la plasticidad estructural que pueden tener los péptidos.

Finalmente, la comparación entre los péptidos 4405 y 4743, que difieren solo en la sustitución de una glicina (G) C-terminal por alanina (A), ofreció información valiosa sobre el papel de la flexibilidad en el plegamiento. Mientras que la glicina permite una mayor adaptabilidad conformacional, la alanina introduce restricciones estereoquímicas que, en este caso, parecen haber mejorado ligeramente la estabilidad del modelo (Chakrabarty et al., 1994). Sin embargo, esta ganancia en rigidez podría tener un costo funcional, ya que la flexibilidad de la glicina suele ser crítica en interacciones moleculares. Estudios recientes con péptidos derivado de colágeno han demostrado que la sustitución de una glicina por alanina puede afectar significativamente la flexibilidad local de la cadena peptídica, así como modificar los patrones de enlaces de hidrógeno, incluso cuando el cambio ocurre en una única posición (Röder, 2022).

Al comparar los tres modelos generados por péptido, se identificó que, en términos generales, el modelo 1 exhibió mayor estabilidad y coherencia estructural, evidenciando una convergencia rápida del algoritmo hacia conformaciones de alta calidad. Sin embargo, esta tendencia no fue uniforme. En péptidos como el 4712 y el 4732, el modelo 3 registró indicadores estructurales (TM, GDT, q) igualmente superiores o comparables a los del modelo 1. Asimismo, en el péptido 4743, pese a que el modelo 1 conservó la mejor calidad global, el modelo 3 alcanzó valores cercanos, subrayando la relevancia de considerar no únicamente la energía de los modelos, sino también múltiples métricas de precisión estructural para la selección óptima de la conformación. Esta práctica ha sido respaldada en estudios de modelado estructural, donde se enfatiza que la evaluación de modelos debe incluir tanto criterios energéticos como métricas de ajuste estructural global para asegurar una representación confiable de la conformación (Ciemny et al., 2018; Jamroz et al., 2013).

Estos hallazgos no solo validan la capacidad de PEP-FOLD v3.5 para discriminar entre variantes peptídicas con diferencias mínimas, sino que también proporcionan un marco interpretativo para entender cómo cambios puntuales en la secuencia pueden modular la estructura. La superioridad del péptido 4732 en términos de estabilidad y coherencia estructural lo posiciona como un candidato prometedor para estudios posteriores, aunque la influencia de factores dinámicos, como la flexibilidad observada en el 4712 o la dependencia de puentes de hidrógeno en el 4738, no debe subestimarse. Estos resultados sientan las bases para exploraciones más profundas, incluyendo simulaciones de dinámica molecular y ensayos biológicos que correlacionen estas características estructurales con actividad antibacteriana.

4.2.2 Visualización estructural

Con el fin de ilustrar y analizar la conformación estructural de los péptidos, se presenta en la Figura 5 un resumen visual del modelado realizado. Se desarrolló un análisis estructural completo basado en mapas de probabilidad de estructura secundaria obtenidos de PEP-FOLD v3.5 (Lamiable et al., 2016), visualización tridimensional de los modelos seleccionados en PyMOL (Delano, 2002) y ruedas helicoidales realizadas en HeliQuest (CNRS, <https://heliquet.ipmc.cnrs.fr/>, acceso libre) (Gautier et al., 2008). Esta integración permitió evaluar la tendencia a adoptar estructuras helicoidales, la disposición de residuos en el espacio y el perfil anfipático de cada péptido.

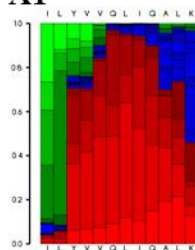
Los mapas de probabilidad generados por PEP-FOLD 3.5 mostraron que los péptidos 4405, 4732, 4738 y 4743 presentan una alta propensión a adoptar conformaciones helicoidales a lo largo de la región central de su secuencia, mientras que sus extremos terminales mostraron mayor proporción de estructuras desordenadas o extendidas. Esta conformación helicoidal se visualizó en los modelos 3D en PyMOL como hélices α continuas y estables. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que esta representación puede sobrestimar la estabilidad real en solución, por lo que se complementó el análisis con representaciones bidimensionales de probabilidad y propiedades fisicoquímicas específicas.

Figura 5.

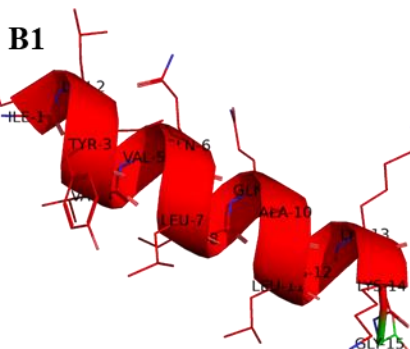
Representación gráfica del modelado estructural y la disposición anfipática de los péptidos.

4405: $_1\text{ILYVVQLIQALKKKKG}_{15}$

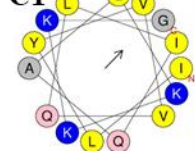
A1



B1



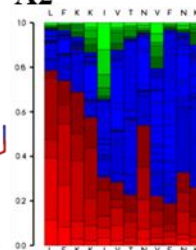
C1



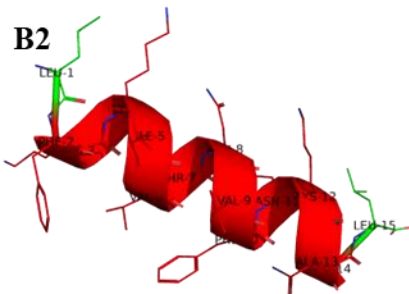
Hidrofobicidad (H): 0.600
Momento hidrofóbico (μH): 0.332

4712: $_1\text{LFKKIVTNVFNKANL}_{15}$

A2

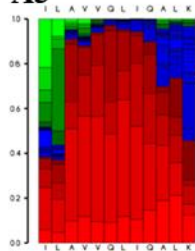


B2

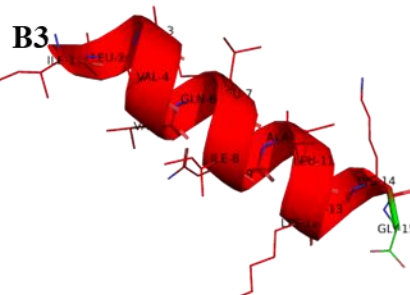


4732: $_1\text{ILAVVQLIQALKKKKG}_{15}$

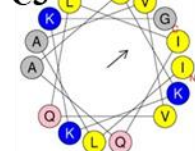
A3



B3



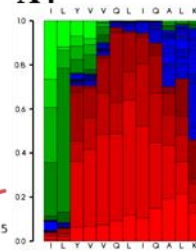
C3



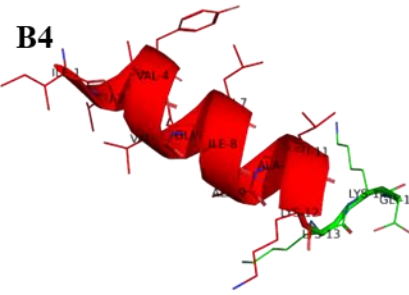
Hidrofobicidad (H): 0.557
Momento hidrofóbico (μH): 0.351

4738: $_1\text{ILYVVQLIAALKKKKG}_{15}$

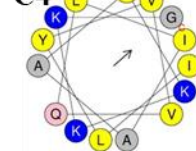
A4



B4



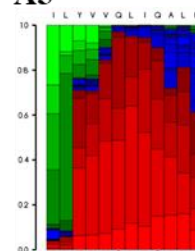
C4



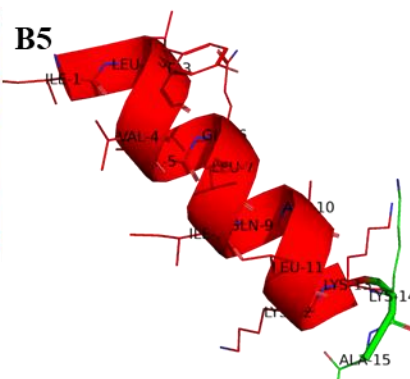
Hidrofobicidad (H): 0.635
Momento hidrofóbico (μH): 0.312

4743: $_1\text{ILYVVQLIQALKKKA}_{15}$

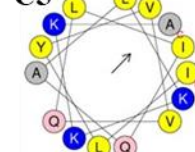
A5



B5



C5



Hidrofobicidad (H): 0.621
Momento hidrofóbico (μH): 0.352

Nota. (A1-A5) Mapas de probabilidad de estructura secundaria generados por PEP-FOLD 3.5 para

los péptidos 4405, 4712, 4732, 4738 y 4743, respectivamente. Los colores representan la probabilidad conformacional por residuo: rojo para hélice α , verde para estructura extendida y azul para regiones desordenadas. **(B1-B5)** Modelos tridimensionales predichos de cada péptido visualizados en PyMOL, seleccionados con base en los parámetros energéticos y estructurales más favorables. Se utilizó la opción de coloreado predeterminado según la estructura secundaria: rojo para hélice α y verde para regiones desordenadas o sin estructura secundaria definida. **(C1, C3-C5)** Ruedas helicoidales generadas para los péptidos con estructura helicoidal estable (4405, 4732, 4738 y 4743), mostrando la distribución de residuos en proyección 2D a lo largo de la hélice. Los residuos cargados (K) se muestran en azul, los hidrofóbicos (I, L, Y, V) en amarillo, los neutros pequeños (A, G) en gris y los polares sin carga (Q) en rosado. Se indican los valores de hidrofobicidad (H) y momento hidrofóbico (μH) para cada péptido. El péptido 4712 no se representa mediante rueda helicoidal debido a que el mapa de probabilidades de PEP-FOLD no indicó una hélice continua, aunque el modelo tridimensional muestra una estructura helicoidal aparente.

En contraste, el péptido 4712 presentó una menor proporción de contenido helicoidal en los mapas de probabilidad, lo que se reflejó en una estructura tridimensional más flexible, con interrupciones en la hélice. Esta observación es coherente con sus propiedades fisicoquímicas, como la alta densidad de residuos polares y cargados, que pueden interferir con el mantenimiento de una hélice α estable. Por esta razón, no se construyó una rueda helicoidal para este péptido, ya que su secuencia no mostró una organización suficientemente definida que justificara una proyección anfipática idealizada.

El análisis mediante HeliQuest reveló una orientación clara de los residuos hidrofóbicos en las ruedas helicoidales de los péptidos 4405, 4732, 4738 y 4743, con valores del momento hidrofóbico (μH) estimados entre 155° y 165° (Apéndice D). Este valor se obtiene proyectando cada residuo en incrementos de 100° por posición y sumando vectores según su hidrofobicidad, siguiendo el modelo propuesto originalmente por (Eisenberg et al., 1982) el cual define el momento hidrofóbico como una medida direccional de la distribución de residuos en hélices α anfipáticas. La literatura demuestra que tanto el valor de μH como la orientación del ángulo polar son determinantes en la interacción de péptidos con membranas; en particular, (Jin et al., 2005) mostraron que péptidos que presentan similares rangos de μH tienen una mayor capacidad para inducir permeabilización selectiva de membranas bacterianas. Además, estudios posteriores (Taniguchi et al., 2017) han evidenciado que aumentos en el momento hidrofóbico, incluso mediante un solo reemplazo de leucina por arginina, mejoran la actividad antimicrobiana sin incrementar la citotoxicidad. Finalmente, (Pedron et al., 2017) demostraron que la optimización de la hidrofobicidad y la distribución de cargas en análogos del péptido VmCT1 mejora su eficacia antimicrobiana, reforzando la importancia de una arquitectura helicoidal organizada para favorecer la interacción con membranas.

Esta organización espacial evidenciada en los resultados, con una cara hidrofóbica bien definida y densidad de carga moderada en la cara opuesta, sugiere una orientación favorable para la interacción con membranas lipídicas, reforzando el potencial antimicrobiano de los péptidos estudiados. La proyección espacial reveló además que las variaciones en la continuidad de la cara hidrofóbica y la densidad de carga superficial pueden modular su capacidad de inserción o su mecanismo de acción. Estas ruedas también reflejaron pequeñas diferencias estructurales relevantes, ya que modificaciones en residuos específicos (como la sustitución de un aminoácido

aromático por uno alifático, o de un residuo polar por uno hidrofóbico) alteraron la distribución de la cara apolar y, por ende, el momento hidrofóbico. En el péptido 4743, por ejemplo, la sustitución de una glicina terminal por alanina no solo incrementó la rigidez estructural en el extremo C-terminal, sino que generó una mayor definición en la orientación del vector hidrofóbico, favoreciendo potencialmente su interacción dirigida con la membrana.

Para respaldar las predicciones *in silico*, se consideraron valores experimentales de contenido helicoidal obtenidos por dicroísmo circular (CD) en estudios previos (Pereira et al., 2025) (Apéndice E). En particular, los péptidos 4405, 4738 y 4743 mostraron contenidos helicoidales del 21%, 53% y 68%, respectivamente, lo que evidencia una menor estabilidad conformacional en solución que la predicha, especialmente en ausencia de interacciones con membranas. Estos datos apoyan la necesidad de integrar diferentes metodologías para una interpretación más realista del comportamiento estructural.

En conjunto, los análisis estructurales integrados indican que los péptidos estudiados presentan arquitecturas secundarias coherentes con un posible mecanismo de acción antimicrobiano. La presencia de hélices α estables, la orientación anfipática y la propensión a interactuar con membranas son características clave que respaldan su potencial bioactivo.

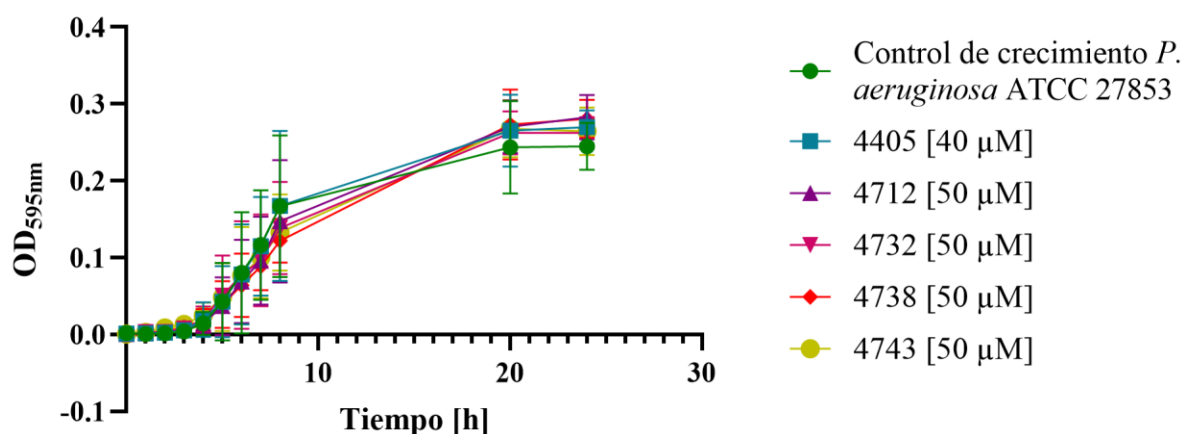
4.3 Actividad antibacteriana

La evaluación de la actividad antibacteriana de los péptidos estudiados frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 evidenció efectos inhibitorios parciales, sin alcanzar una inhibición significativa en las condiciones experimentales. Durante el monitoreo de crecimiento bacteriano a 8 y 24 horas, se observó que algunos péptidos generaron reducciones moderadas en la densidad óptica, especialmente en las primeras horas de exposición. Sin embargo, estas disminuciones no se tradujeron en una inhibición sostenida ni significativa que permitiera establecer una CMI o un

porcentaje de inhibición superior al 50%. Con base en los resultados, se estima que la CMI del péptido 4405 es $>40 \mu\text{M}$ y $>50 \mu\text{M}$ para los péptidos 4712, 4732, 4738 y 4743.

Figura 6.

*Actividad antibacteriana de PAMs frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 durante 24h.*



Nota. Curvas de crecimiento obtenidas a partir del promedio de tres réplicas biológicas independientes $\pm$ error estándar (barras verticales). Los datos fueron procesados en GraphPad Prism v10 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis ($\alpha = 0.05$), corroborándose la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos.

Durante las primeras ocho horas, los porcentajes de inhibición fueron: para el péptido 4738 [50 μM] de 26.01 %, para el péptido 4743 [50 μM] de 19.81 %, para el péptido 4732 [50 μM] de 16.30 %, y para el péptido 4712 [50 μM] de 11.23 %, mientras que 4405 [40 μM] no evidenció actividad inhibidora apreciable. A las 24 horas, las curvas de crecimiento bacteriano correspondientes a todos los tratamientos tendieron a igualarse con la del control de crecimiento,

lo cual indica que el efecto inhibidor inicial no fue sostenido en el tiempo (Figura 6). Esta misma tendencia se confirmó mediante el análisis del área bajo la curva de crecimiento (AUC) (Apéndice G), el cual mostró reducciones comparables a los porcentajes de inhibición obtenidos en la cinética de 0–8 h. Sin embargo, al extender el análisis a 24 horas, los valores de AUC de todos los tratamientos fueron similares al del control, confirmando que el efecto inhibidor inicial fue transitorio y no se mantuvo en el tiempo. Esta tendencia puede analizarse en conjunto con las características estructurales y fisicoquímicas de los péptidos, como se resume en la Tabla 5.

Tabla 5.

Resumen de propiedades fisicoquímicas, estructurales y actividad antibacteriana de los péptidos evaluados frente a P. aeruginosa ATCC 27853.

Péptido	Secuencia	Concentración (μM)	% Inhibición [8h]	Carga neta	Estructura secundaria	μH
4405	ILYVVQLIQALKKKKG	40	0,00	+3	Hélice α parcial	0,332
4712	LFKKIVTNVFNKANL	50	11,23	+3	Hélice α débil	-
4732	ILAVVQLIQALKKKKG	50	16,30	+3	Hélice α estable	0,351
4738	ILYVVQLIAALKKKKG	50	26,01	+3	Hélice α estable	0,312
4743	ILYVVQLIQALKKKA	50	19,81	+3	Hélice α estable	0,352

Nota. El porcentaje de inhibición corresponde al cálculo realizado a las 8 h de exposición respecto al control de crecimiento. El momento hidrofóbico (μH) fue obtenido mediante análisis *in silico* previo.

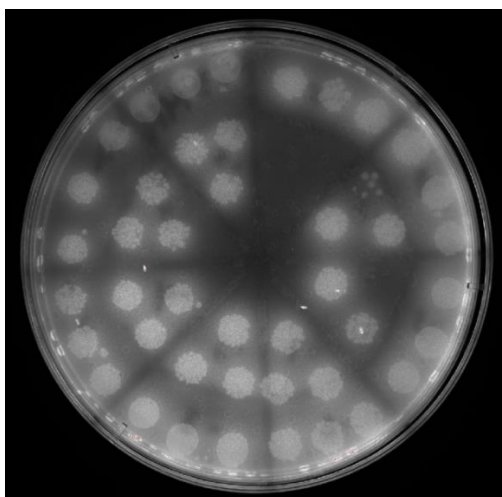
Durante la etapa final del experimento se evidenció la formación visible de *biofilm*, particularmente en los pozos del control de crecimiento, incluso bajo condiciones de agitación. En los pozos tratados con los péptidos, la formación de *biofilm* fue menos evidente, lo que sugiere que además de afectar el crecimiento planctónico, los PAMs podrían estar interfiriendo parcialmente en la transición hacia el estado sésil. Este hallazgo resulta coherente con la biología de *P. aeruginosa*, una bacteria oportunista ampliamente reconocida por su capacidad de formar *biofilm* como mecanismo de persistencia, protección y resistencia frente a agentes antimicrobianos (Cendra & Torrents, 2021). La producción de *biofilm* no solo limita el acceso de los péptidos a las células viables, sino que también introduce una heterogeneidad fenotípica en la población bacteriana, dificultando su erradicación mediante compuestos de acción directa (Hall & Mah, 2017; Stewart & Franklin, 2008). Esta diversidad fenotípica incluye subpoblaciones persistentes más tolerantes a los tratamientos antimicrobianos, lo que representa una barrera adicional a la eficacia terapéutica de moléculas como los péptidos antimicrobianos. Esto podría explicar por qué, a pesar de observarse cierta inhibición del crecimiento planctónico a 8 horas, el efecto se perdió a las 24 horas, probablemente debido a la transición de las bacterias hacia un estado *biofilm* más resistente.

Como medida complementaria y de respaldo a las lecturas turbidimétricas, se implementó un control microbiológico por siembra en agar Mueller-Hinton a partir del contenido de los pozos seleccionados. Esta estrategia permitió verificar visualmente el crecimiento bacteriano y descartar posibles contaminaciones cruzadas durante el ensayo (Figura 7). Adicionalmente, la identidad de *P. aeruginosa* fue verificada a través de la observación de fluorescencia verde característica bajo iluminación tenue, una propiedad bien documentada de esta cepa y asociada principalmente a la producción de piocianina y pioverdina (Lau et al., 2004; Rada & Leto, 2013). Esta observación

respaldó que el crecimiento registrado durante el ensayo correspondía efectivamente a la bacteria objetivo, y no a una contaminación externa, reforzando así la validez de los datos obtenidos por medición turbidimétrica.

Figura 7.

*Réplica 1 del ensayo en agar MH con diluciones seriadas de los péptidos 4712 y 4732 frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 y control de crecimiento.*



Nota. La imagen fue capturada con un sistema ChemiDoc™ MP (Bio-Rad) utilizando la modalidad SYBR Green, 24 horas después de la incubación a 37 °C. El crecimiento bacteriano fue abundante en todas las condiciones, lo que impidió el conteo por unidades formadoras de colonias (UFC), pero permitió confirmar la viabilidad bacteriana y la ausencia de contaminaciones.

De manera adicional, se utilizó la herramienta de predicción de la base de datos DBAASP (*Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides*, <http://dbaasp.org>, acceso libre) para predecir la actividad de los péptidos contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Pirtskhalava et al., 2021). En las tres modalidades analizadas, la mayoría de los péptidos evaluados obtuvieron valores

predictivos bajos o fueron clasificados como no activos, aunque el péptido 4712 presentó un valor positivo moderado en la salida por agrupación (PPV ≈ 0.73) (Apéndice H). Estas predicciones respaldan la clasificación de baja actividad observada experimentalmente y coinciden con los mecanismos de defensa intrínsecos de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y con la recuperación del crecimiento y formación de *biofilm* registradas.

Debe resaltarse que las predicciones dadas por DBAASP presentan limitaciones, pues se basan en umbrales de CMI reportados en la literatura y no consideran factores experimentales como la degradación de los péptidos, la presencia de sales o la formación de *biofilm*. Por ello, aunque se confirma una actividad limitada frente a *P. aeruginosa*, no debe descartarse que los péptidos puedan mostrar mayor efecto en condiciones diferentes (mayores concentraciones, modificaciones estructurales o combinaciones sinérgicas).

Desde el punto de vista estructural, los péptidos que mostraron mayor actividad (4738, 4743 y 4732) presentaron propiedades fisicoquímicas favorables, como cargas netas positivas +3, estructuras helicoidales estables y momentos hidrofóbicos moderados (≈ 0.30 - 0.45). Estas características promueven la interacción con membranas bacterianas y se consideran fundamentales para la actividad de los péptidos antimicrobianos, como ha sido descrito ampliamente en la literatura (Fjell et al., 2011; Nguyen et al., 2011). En particular, la carga positiva favorece la atracción electrostática hacia las membranas bacterianas, mientras que la estructura helicoidal facilita la inserción en la bicapa lipídica. No obstante, en el contexto de una bacteria Gram negativa como *P. aeruginosa*, estas propiedades pueden ser insuficientes por sí solas para superar la barrera estructural del lipopolisacárido (LPS) en la membrana externa, la presencia de bombas de expulsión activa y la capacidad de generar proteasas que inactiven péptidos externos (Breidenstein et al., 2011; Moradali et al., 2017).

Este comportamiento también ha sido observado en estudios previos con péptidos derivados de hemocianina. Por ejemplo, (Zhuang et al., 2015) identificaron péptidos antimicrobianos derivados de hemocianina en crustáceos, en el cual se reportó una actividad dosis-dependiente frente a bacterias Gram negativas, aunque limitada frente a bacteria altamente adaptativas. A su vez, (Hancock & Sahl, 2006) han señalado que *P. aeruginosa* representa un desafío particular para los PAMs, ya que combina múltiples mecanismos de resistencia y una plasticidad fenotípica que le permite transitar rápidamente entre estados sensibles y tolerantes. En particular, se ha descrito que esta bacteria puede activar sistemas de señalización específicos, como el sistema de dos componentes CprRS, que le permite modificar la composición del lipopolisacárido (LPS) y desarrollar una resistencia adaptativa frente a péptidos catiónicos (Fernández et al., 2012). En nuestro caso, el *biofilm* observado al finalizar la incubación respalda esta dinámica de transición adaptativa, ampliamente documentada como un factor crítico en la tolerancia a los tratamientos (Hall & Mah, 2017).

En contraste, el péptido 4405, que no mostró actividad antibacteriana en las condiciones evaluadas, presentó una estructura helicoidal parcial, momento hidrofóbico $<0,35$ y una concentración inferior ($40 \mu\text{M}$), lo cual podría explicar su bajo desempeño. Estos resultados sugieren que, aunque ciertas características estructurales se asocian a una mayor eficacia, la actividad antimicrobiana efectiva también depende del tipo de microorganismo, su estado fisiológico y sus mecanismos de resistencia intrínsecos.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que los péptidos 4732, 4738 y 4743 poseen un potencial antimicrobiano limitado, principalmente frente a la forma planctónica de *P. aeruginosa*. Sin embargo, no lograron inhibir de manera sostenida el crecimiento ni prevenir la formación de *biofilm*, por lo cual se recomienda su evaluación a concentraciones más altas,

combinaciones sinérgicas, o modificaciones estructurales que favorezcan su estabilidad y penetración. Asimismo, la inclusión de observaciones visuales y ensayos complementarios contribuyó a validar los resultados y a generar hipótesis sólidas sobre los posibles mecanismos que limitaron la eficacia de estos péptidos frente a un patógeno altamente resistente.

Comparativamente, péptidos como Lynronne-1, Lynronne-2 y Lynronne-3, derivados del microbioma ruminal, han mostrado CMI's contra cepas clínicas de *P. aeruginosa* entre 4-512 µg/mL, con efecto *antibiofilm* significativo y buena tolerancia en células humanas, lo que sugiere una actividad más robusta que la observada en este estudio (Mulkern et al., 2022). Además, Esc(1-21)-1c, un péptido derivado de la piel de rana ha demostrado no solo actividad directa contra *P. aeruginosa*, sino también reducción de la expresión de la bomba de eflujo MexAB-OprM, lo que aumenta la susceptibilidad bacteriana a antibióticos convencionales (Canè et al., 2023). Otro péptido, Esc(1-21), mostró capacidad de actuar contra *biofilm* preformado de *P. aeruginosa* ATCC 27853 a varias veces su CMI, manteniendo buena actividad incluso en medios con variaciones de pH (Loffredo et al., 2024).

Los resultados de este estudio podrían haber sido limitados por varios factores que también se mencionan en la literatura reciente. En primer lugar, la degradación proteolítica: muchos péptidos sin modificaciones estructurales protectoras (como modificaciones con aminoácidos D, residuos Cys o estructuras cíclicas) se degradan rápidamente en medios biológicos, reduciendo su efecto sostenido. Por ejemplo, la versión enantiomérica de pleurocidina exhibe una resistencia significativamente mayor frente a proteasas comparada con la versión L-ordinaria (Lee & Lee, 2008).

En segundo lugar, la inestabilidad de la estructura activa también puede disminuir la eficacia. Si la conformación que favorece la actividad (hélice α , hoja β , etc.) no se adopta

eficazmente en solución, su efecto será menor; pleurocidina en solución acuosa se describe como *random coil*, pero adopta hélice al interactuar con ambientes tipo membrana (micelas o TFE) (Syvitski et al., 2005). También, otros péptidos catiónicos muestran disminución de su actividad en presencia de altas concentraciones de sales, lo que sugiere que la carga y ambiente iónico pueden alterar estructura y función (Wei et al., 2007).

En tercer lugar, la difusión y penetración en *biofilms* representa una barrera crítica. La matriz extracelular puede impedir que el péptido llegue a células viables, además de posibles interacciones con componentes del *biofilm* que lo atrapan o inactivan. Por ejemplo, el Péptido K6 fue capaz de eliminar *biofilm* mixto de *P. aeruginosa* y *S. aureus* a concentraciones de 8-16 μM , superando la capacidad de antibióticos convencionales para *biofilm* bajo las mismas condiciones (Chou et al., 2023).

En cuarto lugar, la relación concentración-tiempo suele ser determinante. Mientras que la inhibición del crecimiento planctónico se logra al alcanzar la CMI, para afectar *biofilms* se requieren concentraciones superiores y exposiciones más prolongadas como lo muestra el caso del péptido K6 (Chou et al., 2023), el péptido Esc(1-21) en condiciones preformadas de *biofilm* (Loffredo et al., 2024) y además lo señalado en la revisión reciente sobre estabilidad de PAMs (Xu et al., 2023).

Finalmente, los mecanismos de resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* también limitan la acción de los PAMs. En particular, se ha descrito que análogos como Esc(1-21)-1c pueden modular parcialmente la sobreexpresión de la bomba de eflujo MexAB-OprM, mejorando la sensibilidad bacteriana a antibióticos convencionales (Canè et al., 2023). Por otro lado, la modificación de la superficie bacteriana constituye otra estrategia relevante: cambios en la composición del lipopolisacárido (LPS) y la estabilización por cationes divalentes reducen la interacción

electrostática y, en consecuencia, la afinidad de los péptidos catiónicos hacia la membrana bacteriana (Huan et al., 2020; Xu et al., 2023).

Por lo tanto, los péptidos evaluados en este estudio podrían mejorar su desempeño si se consideran: (i) modificaciones estructurales para aumentar la resistencia proteolítica y favorecer conformaciones estables activas; (ii) ajuste de la concentración y del tiempo de exposición para lograr acción sostenida; (iii) evaluación específica de actividad *antibiofilm*, tanto en formación como en *biofilm* preformado, y bajo condiciones más cercanas a las clínicas (por ejemplo con variaciones de pH y en presencia de sales).

5. Conclusiones

Los cinco péptidos sintéticos evaluados, derivados de la hemocianina de *Achatina fulica*, no mostraron efecto inhibitor frente al crecimiento planctónico de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, siendo la CMI mayor a 50 μ M.

A nivel *in silico*, todos los péptidos presentaron propiedades fisicoquímicas compatibles con una potencial actividad antimicrobiana, como carga neta positiva, puntos isoeléctricos superiores a 9 y regiones hidrofóbicas que favorecerían la interacción con membranas bacterianas. El modelado estructural predijo una alta proporción de conformaciones helicoidales estables en los péptidos 4405, 4732, 4738 y 4743, lo que podría estar asociado con mecanismos de acción dirigidos a la membrana bacteriana. Sin embargo, estas características estructurales no se tradujeron en una actividad antimicrobiana eficaz en los ensayos *in vitro*.

Los resultados sugieren que existe una correlación limitada entre las propiedades predichas y la actividad observada, posiblemente debido a factores como la resistencia intrínseca de *P.*

aeruginosa, en la que mecanismos como la formación de *biofilm* podrían estar implicados, aunque este aspecto no fue evaluado de manera directa en el estudio.

En términos generales, los hallazgos permiten concluir que, si bien los péptidos derivados de la hemocianina de *A. fulica* presentan características estructurales favorables y han mostrado actividad frente a otras bacterias, su eficacia contra *P. aeruginosa* fue limitada, posiblemente debido a las particularidades fisiológicas de este patógeno. No obstante, estos resultados no descartan su potencial frente a otros microorganismos ni la posibilidad de optimizar su diseño para mejorar su actividad antimicrobiana.

6. Recomendaciones

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación, se plantean recomendaciones que pueden enriquecer la comprensión del potencial antimicrobiano de los péptidos derivados de hemocianina, así como proyectar sus aplicaciones en futuros estudios.

En primer lugar, se sugiere continuar con la exploración de péptidos derivados de hemocianina mediante estudios más profundos de relación estructura-función, especialmente aquellos enfocados en su interacción con membranas bacterianas. Esto permitiría validar con mayor precisión el rol de propiedades como la hidrofobicidad, el momento dipolar y la distribución de cargas en su actividad antimicrobiana.

También se recomienda realizar pruebas complementarias que permitan determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) y evaluar la capacidad de inhibición de *biofilm*, ya que estos análisis aportan información clave sobre la eficacia frente a formas de crecimiento bacteriano clínicamente relevantes. Asimismo, sería

importante ampliar los ensayos a una mayor variedad de cepas multirresistentes, con el fin de conocer mejor el espectro de actividad de los péptidos y fortalecer la evidencia sobre su aplicabilidad en contextos clínicos o biotecnológicos.

En ese sentido, se recomienda evaluar la citotoxicidad en líneas celulares humanas para valorar su viabilidad como agentes terapéuticos. Además, se sugiere estudiar la estabilidad de los péptidos en solución, especialmente en presencia de sales o variaciones de pH, ya que estos factores pueden afectar significativamente su actividad antimicrobiana. Este tipo de análisis es esencial para comprender su comportamiento en condiciones fisiológicas y su viabilidad como agentes antimicrobianos en entornos reales.

Referencias Bibliográficas

- Abadines, I. B., Le, K., Newman, D. J., Glaser, K. B., & Mayer, A. M. (2019). The Marine Pharmacology and Pharmaceuticals Pipeline in 2018. *The FASEB Journal*, 33(S1), 504.1. https://doi.org/10.1096/FASEBJ.2019.33.1_SUPPLEMENT.504.1
- Abbassi, F., Raja, Z., Oury, B., Gazanion, E., Piesse, C., Sereno, D., Nicolas, P., Foulon, T., & Ladram, A. (2013). Antibacterial and leishmanicidal activities of temporin-SHd, a 17-residue long membrane-damaging peptide. *Biochimie*, 95(2), 388–399. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2012.10.015>
- Aggarwal, R., Mahajan, P., Pandiya, S., Bajaj, A., Verma, S. K., Yadav, P., Kharat, A. S., Khan, A. U., Dua, M., & Johri, A. K. (2024). Antibiotic resistance: a global crisis, problems and solutions. *Critical Reviews in Microbiology*, 50(5), 896–921. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2024.2313024>
- Agrawal, P., Bhalla, S., Chaudhary, K., Kumar, R., Sharma, M., & Raghava, G. P. S. (2018). In silico approach for prediction of antifungal peptides. *Frontiers in Microbiology*, 9(323). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00323>
- Aguiar Camelo, A. J. F., Fortunato de Medeiros, W., Da Silva-Maia, J. K., Leal Bezerra, I. W., Piuvezam, G., & De Araújo Morais, A. H. (2024). Peptides Evaluated In Silico, In Vitro, and In Vivo as Therapeutic Tools for Obesity: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(17), 9646. <https://doi.org/10.3390/ijms25179646>

- Ahmad, T. B., Liu, L., Kotiw, M., & Benkendorff, K. (2018). Review of anti-inflammatory, immune-modulatory and wound healing properties of molluscs. *Journal of Ethnopharmacology*, 210(210), 156–178. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2017.08.008>
- Ahmad, T. B., Rudd, D., Benkendorff, K., Mahdi, L. K., Pratt, K. A., Dooley, L., Wei, C., & Kotiw, M. (2017). Brominated indoles from a marine mollusc inhibit inflammation in a murine model of acute lung injury. *PLoS One*, 12(10), e0186904. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0186904>
- Ahmed, T. A. E., & Hammami, R. (2019). Recent insights into structure–function relationships of antimicrobial peptides. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), e12546. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12546>
- Akbar, S., Hayat, M., Tahir, M., & Chong, K. T. (2020). cACP-2LFS: Classification of Anticancer Peptides Using Sequential Discriminative Model of KSAAP and Two-Level Feature Selection Approach. *IEEE Access*, 8, 131939–131948. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2020.3009125>
- Alshalchi, S. A., & Anderson, G. G. (2015). Expression of the lipopolysaccharide biosynthesis gene lpxD affects biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Microbiology*, 197(2), 135–145. <https://doi.org/10.1007/S00203-014-1030-Y>
- Appel, R. D., Bairoch, A., & Hochstrasser, D. F. (1994). A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(6), 258–260. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(94\)90153-8](https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90153-8)
- Arias, M., Haney, E. F., Hilchie, A. L., Corcoran, J. A., Hyndman, M. E., Hancock, R. E. W., & Vogel, H. J. (2020). Selective anticancer activity of synthetic peptides derived from

- the host defence peptide tritrypticin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(8), 183228. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2020.183228>
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., De Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., ... Stockinger, H. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), W597–W603. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS400>
- Bachmair, A., Finley, D., & Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, 234(4773), 179–186. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.3018930>
- Badiu, D. L., Luque, R., Dumitrescu, E., Craciun, A., & Dinca, D. (2010). Amino acids from *Mytilus galloprovincialis* (L.) and *Rapana venosa* molluscs accelerate skin wounds healing via enhancement of dermal and epidermal neoformation. *The Protein Journal*, 29(2), 81–92. <https://doi.org/10.1007/S10930-009-9225-9>
- Barken, K. B., Pamp, S. J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J. J., Klausen, M., Givskov, M., Whitchurch, C. B., Engel, J. N., & Tolker-Nielsen, T. (2008). Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 10(9), 2331–2343. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2008.01658.X>
- Beaufays, J., Lins, L., Thomas, A., & Brasseur, R. (2012). In silico predictions of 3D structures of linear and cyclic peptides with natural and non-proteinogenic residues. *Journal of Peptide Science*, 18(1), 17–24. <https://doi.org/10.1002/PSC.1410>

- Benkendorff, K. (2010). Molluscan biological and chemical diversity: secondary metabolites and medicinal resources produced by marine molluscs. *Biological Reviews*, 85(4), 757–775. <https://doi.org/10.1111/J.1469-185X.2010.00124.X>
- Benkendorff, K., Davis, A. R., & Bremner, J. B. (2001). Chemical defense in the egg masses of benthic invertebrates: an assessment of antibacterial activity in 39 mollusks and 4 polychaetes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(2), 109–118. <https://doi.org/10.1006/JIPA.2001.5047>
- Benkendorff, K., Davis, A. R., Rogers, C. N., & Bremner, J. B. (2005). Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 316(1), 29–44. <https://doi.org/10.1016/J.JEMBE.2004.10.001>
- Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J., Frutiger, S., & Hochstrasser, D. (1993). The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *ELECTROPHORESIS*, 14(1), 1023–1031. <https://doi.org/10.1002/ELPS.11501401163>
- Blomquist, K. C., & Nix, D. E. (2020). A Critical Evaluation of Newer β -Lactam Antibiotics for Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Annals of Pharmacotherapy*, 55(8), 1010–1024. <https://doi.org/10.1177/1060028020974003>
- Blondelle, S. E., Lohner, K., & Aguilar, M. I. (1999). Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1462(1–2), 89–108. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00202-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00202-3)

- Bornancin, L., Bonnard, I., Mills, S. C., & Banaigs, B. (2017). Chemical mediation as a structuring element in marine gastropod predator-prey interactions. *Natural Product Reports*, 34(6), 644–676. <https://doi.org/10.1039/C6NP00097E>
- Botelho, J., Grosso, F., & Peixe, L. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates*, 44, 100640. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2019.07.002>
- Bouchet, P. (2006). The magnitude of marine biodiversity. En C. M. Duarte (Ed.), *The Exploration of Marine Biodiversity: Scientific and Technological Challenges* (pp. 31–64). Fundación BBVA.
- Breidenstein, E. B. M., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, 19(8), 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO1098>
- Brogden, K. A., De Lucca, A. J., Bland, J., & Elliott, S. (1996). Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(1), 412–416. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.1.412>
- Burmester, T. (2001). Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily. *Molecular Biology and Evolution*, 18(2), 184–195. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A003792>

- Bush, N. G., Diez-Santos, I., Abbott, L. R., & Maxwell, A. (2020). Quinolones: Mechanism, lethality and their contributions to antibiotic resistance. *Molecules*, 25(23). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25235662>
- Canè, C., Casciaro, B., Di Somma, A., Loffredo, M. R., Puglisi, E., Battaglia, G., Mellini, M., Cappiello, F., Rampioni, G., Leoni, L., Amoresano, A., Duilio, A., & Mangoni, M. L. (2023). The antimicrobial peptide Esc(1-21)-1c increases susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to conventional antibiotics by decreasing the expression of the MexAB-OprM efflux pump. *Frontiers in Chemistry*, 11, 1271153. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2023.1271153>
- Cao, J., De La Fuente-Nunez, C., Ou, R. W., Torres, M. D. T., Pande, S. G., Sinskey, A. J., & Lu, T. K. (2018). Yeast-Based Synthetic Biology Platform for Antimicrobial Peptide Production. *ACS Synthetic Biology*, 7(3), 896–902. <https://doi.org/10.1021/ACSSYNBIO.7B00396>
- Catalano, C., Herrington, N. B., Safo, M. K., & Kellogg, G. E. (2023). 3D interaction homology: The hydrophobic residues alanine, isoleucine, leucine, proline and valine play different structural roles in soluble and membrane proteins. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10, 1116868. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2023.1116868>
- Cendra, M. del M., & Torrents, E. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their partners in crime. *Biotechnology Advances*, 49, 107734. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2021.107734>
- Chakrabartty, A., Kortemme, T., & Baldwin, R. L. (1994). Helix propensities of the amino acids measured in alanine-based peptides without helix-stabilizing side-chain interactions. *Protein Science*, 3(5), 843–852. <https://doi.org/10.1002/PRO.5560030514>

- Chalongkulasak, S., E-Kobon, T., & Chumnanpuen, P. (2022). Prediction of Antibacterial Peptides against *Propionibacterium acnes* from the Peptidomes of *Achatina fulica* Mucus Fractions. *Molecules*, 27(7), 2290. <https://doi.org/10.3390/molecules27072290>
- Chambers, J. R., Cherny, K. E., & Sauer, K. (2017). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Dispersed Cells to Antimicrobial Agents Is Dependent on the Dispersion Cue and Class of the Antimicrobial Agent Used. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(12), e00846-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00846-17>
- Chen, Y., Guarnieri, M. T., Vasil, A. I., Vasil, M. L., Mant, C. T., & Hodges, R. S. (2007). Role of Peptide Hydrophobicity in the Mechanism of Action of α -Helical Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1398–1406. <https://doi.org/10.1128/AAC.00925-06>
- Chiumiento, I. R., Ituarte, S., Sun, J., Qiu, J. W., Heras, H., & Dreon, M. S. (2020). Hemocyanin of the caenogastropod *Pomacea canaliculata* exhibits evolutionary differences among gastropod clades. *PLoS One*, 15(1), e0228325. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0228325>
- Cho, H., Uehara, T., & Bernhardt, T. G. (2014). Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell*, 159(6), 1300–1311. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.017>
- Chopra, N., Agarwal, S., Verma, S., Bhatnagar, S., & Bhatnagar, R. (2011). Modeling of the structure and interactions of the *B. anthracis* antitoxin, MoxX: deletion mutant studies highlight its modular structure and repressor function. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 25(3), 275–291. <https://doi.org/10.1007/S10822-011-9419-Z>

- Chou, S., Guo, H., Zingl, F. G., Zhang, S., Toska, J., Xu, B., Chen, Y., Chen, P., Waldor, M. K., Zhao, W., Mekalanos, J. J., & Mou, X. (2023). Synthetic peptides that form nanostructured micelles have potent antibiotic and antibiofilm activity against polymicrobial infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(4), e2219679120. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2219679120>
- Ciavatta, M. L., Lefranc, F., Carbone, M., Mollo, E., Gavagnin, M., Betancourt, T., Dasari, R., Kornienko, A., & Kiss, R. (2017). Marine Mollusk-Derived Agents with Antiproliferative Activity as Promising Anticancer Agents to Overcome Chemotherapy Resistance. *Medicinal Research Reviews*, 37(4), 702–801. <https://doi.org/10.1002/MED.21423>
- Ciemny, M., Kurcinski, M., Kamel, K., Kolinski, A., Alam, N., Schueler-Furman, O., & Kmiecik, S. (2018). Protein–peptide docking: opportunities and challenges. *Drug Discovery Today*, 23(8), 1530–1537. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.05.006>
- Ciumac, D., Gong, H., Hu, X., & Lu, J. R. (2019). Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 537, 163–185. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.103>
- Clout, M. N., & De Poorter, M. (2005). International Initiatives Against Invasive Alien Species. *Weed Technology*, 19(3), 523–527. <https://doi.org/10.1614/WT-04-126.1>
- CLSI. (2015). *M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition*. www.clsi.org.
- Coates, C. J., & Nairn, J. (2014). Diverse immune functions of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology*, 45(1), 43–55. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2014.01.021>

- Cock, P. J. A., Antao, T., Chang, J. T., Chapman, B. A., Cox, C. J., Dalke, A., Friedberg, I., Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B., & De Hoon, M. J. L. (2009). Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, 25(11), 1422–1423. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP163>
- Coherent Market Insights. (2023). *Snail beauty products market was valued at US\$ 749.4 Mn in 2025*. <https://www.coherentmarketinsights.com/press-release/global-snail-beauty-products-market-to-surpass-us-7695-million-by-2025-754>
- Conlon, M. J., & Mechkarska, M. (2014). Host-defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family pipidae. *Pharmaceuticals*, 7(1), 58–77. <https://doi.org/10.3390/PH7010058>
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., Pazos-Rojas, L. A., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R. D., & Muñoz-Rojas, J. (2012). Quantification of cultivable bacteria by the “Massive Stamping Drop Plate” method. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 147–156.
- Coutellec, M., & Caquet, T. (2017). Gastropod ecophysiological response to stress. En S. Saleuddin & S. Mukai (Eds.), *Physiology of Molluscs: A Collection of Selected Reviews* (Vol. 1, pp. 303–396). Apple Academic Press, CRC Press.
- Cruz, J., Flórez, J., Torres, R., Urquiza, M., Gutiérrez, J. A., Guzmán, F., & Ortiz, C. C. (2017). Antimicrobial activity of a new synthetic peptide loaded in polylactic acid or poly (lactic-co-glycolic) acid nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Nanotechnology*, 28(13), 135102. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa5f63>

- Cummins, S. F., Nichols, A. E., Schein, C. H., & Nagle, G. T. (2006). Newly identified water-borne protein pheromones interact with attractin to stimulate mate attraction in *Aplysia*. *Peptides*, 27(3), 597–606. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2005.08.026>
- Dang, V. T., Benkendorff, K., Green, T., & Speck, P. (2015). Marine Snails and Slugs: a Great Place To Look for Antiviral Drugs. *Journal of Virology*, 89(16), 8114–8118. <https://doi.org/10.1128/JVI.00287-15>
- Dash, R., & Bhattacharjya, S. (2021). Thanatin: An emerging host defense antimicrobial peptide with multiple modes of action. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1522. <https://doi.org/10.3390/ijms22041522>
- Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., & Bienert, M. (2001). Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Letters*, 501(2–3), 146–150. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02648-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02648-5)
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- Defer, D., Bourgougnon, N., & Fleury, Y. (2009). Screening for antibacterial and antiviral activities in three bivalve and two gastropod marine molluscs. *Aquaculture*, 293(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2009.03.047>
- Delano, W. L. (2002). PyMOL: An Open-Source Molecular Graphics Tool. *CCP4 Newsletter on Protein Crystallography*, 40, 82–92.
- Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A., & Kisich, K. O. (2009). The Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Host Defense. *Current Pharmaceutical Design*, 15(21), 2377–2392. <https://doi.org/10.2174/138161209788682325>

- Doig, A. J., & Baldwin, R. L. (1995). N- and C-capping preferences for all 20 amino acids in α -helical peptides. *Protein Science*, 4(7), 1325–1336.
<https://doi.org/10.1002/PRO.5560040708>
- Dolashka, P., Dolashki, A., Van Beeumen, J., Floetenmeyer, M., Velkova, L., Stevanovic, S., & Voelter, W. (2016). Antimicrobial Activity of Molluscan Hemocyanins from *Helix* and *Rapana* Snails. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(3), 263–270.
<https://doi.org/10.2174/1389201016666150907113435>
- Donsky, E., & Wolfson, Haim. J. (2011). PepCrawler: a fast RRT-based algorithm for high-resolution refinement and binding affinity estimation of peptide inhibitors. *Bioinformatics*, 27(20), 2836–2842.
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTR498>
- Dos Santos, S. R., Miranda, A., & Da Silva Junior, P. I. (2023). Ovipin: A New Antimicrobial Peptide from Chicken Eggs *Gallus Gallus*. *BioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2021.09.28.462162>
- Duffy, F. J., Verniere, M., Devocelle, M., Bernard, E., Shields, D. C., & Chubb, A. J. (2011). CycloPs: Generating virtual libraries of cyclized and constrained peptides including nonnatural amino acids. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(4), 829–836. <https://doi.org/10.1021/CI100431R>
- Dutta, P., Sahu, R. K., Dey, T., Lahkar, M. D., Manna, P., & Kalita, J. (2019). Beneficial role of insect-derived bioactive components against inflammation and its associated complications (colitis and arthritis) and cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 313, 108824. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2019.108824>

- Edwards, I. A., Elliott, A. G., Kavanagh, A. M., Zuegg, J., Blaskovich, M. A. T., & Cooper, M. A. (2016). Contribution of amphipathicity and hydrophobicity to the antimicrobial activity and cytotoxicity of β -hairpin peptides. *ACS Infectious Diseases*, 2(6), 442–450. <https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.6B00045>
- Eisenberg, D., Weiss, R. M., & Terwilliger, T. C. (1982). The helical hydrophobic moment: A measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*, 299(5881), 371–374. <https://doi.org/10.1038/299371A0>
- Ekin, ihsan. (2018). Molluscs: Their Usage as Nutrition, Medicine, Aphrodisiac, Cosmetic, Jewelry, Cowry, Pearl, Accessory and So on from the History to Today. *Middle East Journal of Science*, 4(1), 45–51. <https://doi.org/10.23884/mejs.2018.4.1.06>
- Esmacelian, B., Benkendorff, K., Le Leu, R. K., & Abbott, C. A. (2018). Simultaneous Assessment of the Efficacy and Toxicity of Marine Mollusc-Derived Brominated Indoles in an In Vivo Model for Early Stage Colon Cancer. *Integrative Cancer Therapies*, 17(2), 248–262. <https://doi.org/10.1177/1534735417699880>
- Fales-Williams, A. J., Brogden, K. A., Huffman, E., Gallup, J. M., & Ackermann, M. R. (2002). Cellular Distribution of Anionic Antimicrobial Peptide in Normal Lung and during Acute Pulmonary Inflammation. *Veterinary Pathology*, 39(6), 706–711. <https://doi.org/10.1354/VP.39-6-706>
- Fehlbaum, P., Bulet, P., Chernysh, S., Briand, J. P., Roussel, J. P., Letellier, L., Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (1996). Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), 1221–1225. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1221>

- Fernández, L., Jenssen, H., Bains, M., Wiegand, I., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. W. (2012). The Two-Component System CprRS Senses Cationic Peptides and Triggers Adaptive Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Independently of ParRS. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(12), 6212–6222. <https://doi.org/10.1128/AAC.01530-12>
- Fernández-Barat, L., Ferrer, M., De Rosa, F., Gabarrús, A., Esperatti, M., Terraneo, S., Rinaudo, M., Li Bassi, G., & Torres, A. (2017). Intensive care unit-acquired pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* with and without multidrug resistance. *The Journal of Infection*, 74(2), 142–152. <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2016.11.008>
- Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E. W., & Schneider, G. (2011). Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(1), 37–51. <https://doi.org/10.1038/nrd3591>
- Florin, T., Maracci, C., Graf, M., Karki, P., Klepacki, D., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vázquez-Laslop, N., Wilson, D. N., Rodnina, M. V., & Mankin, A. S. (2017). An antimicrobial peptide that inhibits translation by trapping release factors on the ribosome. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(9), 752–757. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3439>
- Fox, J. L. (2013). Antimicrobial peptides stage a comeback. *Nature Biotechnology*, 31(5), 379–382. <https://doi.org/10.1038/NBT.2572>
- Gagnon, M. C., Strandberg, E., Grau-Campistany, A., Wadhwani, P., Reichert, J., Bürck, J., Rabanal, F., Auger, M., Paquin, J. F., & Ulrich, A. S. (2017). Influence of the Length and Charge on the Activity of α -Helical Amphipathic Antimicrobial Peptides. *Biochemistry*, 56(11), 1680–1695. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.6B01071>

- Garcia-Núñez, M., Marti, S., Puig, C., Perez-Brocal, V., Millares, L., Santos, S., Ardanuy, C., Moya, A., Linãres, J., & Monsó, E. (2017). Bronchial microbiome, PA biofilm-forming capacity and exacerbation in severe COPD patients colonized by *P. aeruginosa*. *Future Microbiology*, 12, 379–392. <https://doi.org/10.2217/FMB-2016-0127>
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3784–3788. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKG563>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. En J. M. Walker (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571–607). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., & Drin, G. (2008). HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics*, 24(18), 2101–2102. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTN392>
- Gesheva, V., Chausheva, S., Mihaylova, N., Manoylov, I., Doumanova, L., Idakieva, K., & Tchorbanov, A. (2014). Anti-cancer properties of gastropodan hemocyanins in murine model of colon carcinoma. *BMC Immunology*, 15, 34. <https://doi.org/10.1186/S12865-014-0034-3>
- Gesheva, V., Chausheva, S., Stefanova, N., Mihaylova, N., Doumanova, L., Idakieva, K., & Tchorbanov, A. (2015). Helix pomatia hemocyanin - a novel bio-adjuvant for viral and bacterial antigens. *International Immunopharmacology*, 26(1), 162–168. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2015.03.011>

- Gill, S. C., & Von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, 182(2), 319–326.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90602-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90602-7)
- Goodsell, D. S., & Jenkinson, J. (2018). Molecular Illustration in Research and Education: Past, Present, and Future. *Journal of Molecular Biology*, 430(21), 3969–3981.
<https://doi.org/10.1016/J.JMB.2018.04.043>
- Graf, M., & Wilson, D. N. (2019). Intracellular Antimicrobial Peptides Targeting the Protein Synthesis Machinery. En K. Matsuzaki (Ed.), *Antimicrobial Peptides. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1117, pp. 73–89). Springer Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_6
- Gupta, S. K., Singh, A., Srivastava, M., Gupta, S. K., & Akhoun, B. A. (2009). In silico DNA vaccine designing against human papillomavirus (HPV) causing cervical cancer. *Vaccine*, 28(1), 120–131. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2009.09.095>
- Guruprasad, K., Reddy, B. V. B., & Pandit, M. W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering*, 4(2), 155–161.
<https://doi.org/10.1093/PROTEIN/4.2.155>
- Hall, C. W., & Mah, T.-F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 276–301. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX010>
- Hancock, R. E. W. (1997). Peptide antibiotics. *The Lancet*, 349(9049), 418–422.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)80051-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)80051-7)

- Hancock, R. E. W. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet. Infectious Diseases*, 1(3), 156–164.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00092-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00092-5)
- Hancock, R. E. W., & Sahl, H.-G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24(12), 1551–1557.
<https://doi.org/10.1038/NBT1267>
- Haney, E. F., Straus, S. K., & Hancock, R. E. W. (2019). Reassessing the host defense peptide landscape. *Frontiers in Chemistry*, 7, 43. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2019.00043>
- Harnedy-Rothwell, P. A., McLaughlin, C. M., Le Gouic, A. V., Mullen, C., Parthasarathy, V., Allsopp, P. J., McSorley, E. M., FitzGerald, R. J., & O’Harte, F. P. M. (2021). In Vitro and In Vivo Effects of *Palmaria palmata* Derived Peptides on Glucose Metabolism. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27, 1667–1676.
<https://doi.org/10.1007/S10989-021-10199-8>
- Harris, F., Dennison, S. R., & Phoenix, D. A. (2009). Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. *Current Protein & Peptide Science*, 10(6), 585–606.
<https://doi.org/10.2174/138920309789630589>
- Harris, F., Dennison, S. R., & Phoenix, D. A. (2011). Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms and their Mechanisms of Action. *Current Chemical Biology*, 5(2), 142–153. <https://doi.org/10.2174/2212796811105020142>
- Hong, S. Y., Park, T. G., & Lee, K. H. (2001). The effect of charge increase on the specificity and activity of a short antimicrobial peptide. *Peptides*, 22(10), 1669–1674.
[https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00502-2](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00502-2)

- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Handler, J., & Benkendorff, K. (2007). Stress and immune responses in abalone: limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish & Shellfish Immunology*, 22(4), 363–379. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2006.06.009>
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*, 11, 582779. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.582779>
- Huang, H.-N., Pan, C.-Y., & Chen, J.-Y. (2018). Grouper (*Epinephelus coioides*) antimicrobial peptide epinecidin-1 exhibits antiviral activity against foot-and-mouth disease virus in vitro. *Peptides*, 106, 91–95. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2018.07.003>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Ikai, A. (1980). Thermostability and Aliphatic Index of Globular Proteins. *The Journal of Biochemistry*, 88(6), 1895–1898.
- Jamroz, M., Kolinski, A., & Kmiecik, S. (2013). CABS-flex: Server for fast simulation of protein structure fluctuations. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), W427–W430. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT332>
- Jangra, V., Sharma, N., & Chhillar, A. K. (2022). Therapeutic approaches for combating *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbes and Infection*, 24(4), 104950. <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2022.104950>

- Jeong, S., & Rhee Paeng, I. (2012). Sensitivity and selectivity on aptamer-based assay: The determination of tetracycline residue in bovine milk. *The Scientific World Journal*, 2012, 159456. <https://doi.org/10.1100/2012/159456>
- Jiang, M., Zhao, C., Yan, R., Li, J., Song, W., Peng, R., Han, Q., & Jiang, X. (2019). Continuous Inking Affects the Biological and Biochemical Responses of Cuttlefish *Sepia pharaonis*. *Frontiers in Physiology*, 10, 1429. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2019.01429>
- Jiang, Z., Vasil, A. I., Hale, J. D., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2008). Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 90(3), 369–383. <https://doi.org/10.1002/BIP.20911>
- Jin, Y., Hammer, J., Pate, M., Zhang, Y., Zhu, F., Zmuda, E., & Blazyk, J. (2005). Antimicrobial Activities and Structures of Two Linear Cationic Peptide Families with Various Amphipathic β -Sheet and α -Helical Potentials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(12), 4957–4964. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.12.4957-4964.2005>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, 33(3), 300–305. https://doi.org/10.4103/JOACP.JOACP_349_15
- Kathuria, S. V., Chan, Y. H., Nobrega, R. P., Özen, A., & Matthews, C. R. (2016). Clusters of isoleucine, leucine, and valine side chains define cores of stability in high-energy states of globular proteins: Sequence determinants of structure and stability. *Protein Science*, 25(3), 662–675. <https://doi.org/10.1002/PRO.2860>

- Kaur, A., Pati, K. P., Pati, A. M., & Nagpal, A. K. (2020). Physico-chemical characterization and topological analysis of pathogenesis-related proteins from *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* using in-silico approaches. *PloS One*, 15(9), e0239836. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239836>
- Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H., & Phillips, D. C. (1958). A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature*, 181(4610), 662–666. <https://doi.org/10.1038/181662A0>
- King, J. D., Kocíncová, D., Westman, E. L., & Lam, J. S. (2009). Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immunity*, 15(5), 261–312. <https://doi.org/10.1177/1753425909106436>
- Koch, A. L. (2003). Bacterial wall as target for attack: past, present, and future research. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4), 673–687. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.673-687.2003>
- Kozłowski, L. P. (2016). IPC - Isoelectric Point Calculator. *Biology Direct*, 11(1), 55. <https://doi.org/10.1186/S13062-016-0159-9>
- Kozłowski, L. P. (2021). IPC 2.0: prediction of isoelectric point and pKa dissociation constants. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W285–W292. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB295>
- Kubes, J. N., & Fridkin, S. K. (2019). Factors affecting the geographic variability of antibiotic-resistant healthcare-associated infections in the United States using the CDC Antibiotic Resistance Patient Safety Atlas. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 40(5), 597–599. <https://doi.org/10.1017/ICE.2019.64>

- Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Lamiable, A., Thévenet, P., Rey, J., Vavrusa, M., Derreumaux, P., & Tufféry, P. (2016). PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W449–W454. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW329>
- Lamprecht, A.-L., Naujokat, S., Margaria, T., & Steffen, B. (2011). Semantics-based composition of EMBOSS services. *Journal of Biomedical Semantics*, 2(1), S5. <https://doi.org/10.1186/2041-1480-2-S1-S5>
- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*, 10(12), 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002>
- Le, C. F., Fang, C. M., & Sekaran, S. D. (2017). Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4), e02340-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02340-16>
- Lee, J., & Lee, D. G. (2008). Structure-antimicrobial activity relationship between pleurocidin and its enantiomer. *Experimental & Molecular Medicine*, 40(4), 370–376. <https://doi.org/10.3858/EMM.2008.40.4.370>

- Lee, S. Y., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2003). Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 7927–7933. <https://doi.org/10.1074/JBC.M209239200>
- Lee, T. H., Hall, K. N., & Aguilar, M.-I. (2015). Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(1), 25–39. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150703121700>
- Lee, T.-H., N. Hall, K., & Aguilar, M.-I. (2016). Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(1), 25–39. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150703121700>
- Lei, J., Sun, L. C., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D. H., & He, Q. Y. (2019). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*, 11(7), 3919–3931. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6684887/>
- Li, C., Zhu, C., Ren, B., Yin, X., Shim, S. H., Gao, Y., Zhu, J., Zhao, P., Liu, C., Yu, R., Xia, X., & Zhang, L. (2019). Two optimized antimicrobial peptides with therapeutic potential for clinical antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 183, 111686. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.111686>
- Li, Y., Huang, C., Ding, L., Li, Z., Pan, Y., & Gao, X. (2019). Deep learning in bioinformatics: Introduction, application, and perspective in the big data era. *Methods*, 166, 4–21. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2019.04.008>

- Liang, X., Wang, J., Guan, R., Zhao, L., Li, D., Long, Z., Yang, Q., Xu, J., Wang, Z., Xie, J., & Lu, W. (2018). Limax extract ameliorates cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease in mice. *International Immunopharmacology*, 54, 210–220. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2017.11.004>
- Liao, C., Huang, X., Wang, Q., Yao, D., & Lu, W. (2022). Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 926758. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.926758>
- Lill, M. A., & Danielson, M. L. (2011). Computer-aided drug design platform using PyMOL. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 25(1), 13–19. <https://doi.org/10.1007/S10822-010-9395-8>
- Loffredo, M. R., Cappiello, F., Cappella, G., Capuozzo, E., Torrini, L., Diaco, F., Di, Y. P., Mangoni, M. L., & Casciaro, B. (2024). The pH-Insensitive Antimicrobial and Antibiofilm Activities of the Frog Skin Derived Peptide Esc(1-21): Promising Features for Novel Anti-Infective Drugs. *Antibiotics* 2024, 13(8), 701. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS13080701>
- London, N., Raveh, B., & Schueler-Furman, O. (2013). Peptide docking and structure-based characterization of peptide binding: from knowledge to know-how. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(6), 894–902. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2013.07.006>
- Luo, Y., & Song, Y. (2021). Mechanism of antimicrobial peptides: Antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities. *International Journal of Molecular Sciences* 22(21), 11401. <https://doi.org/10.3390/ijms222111401>

- Lyu, Y., Yang, Y., Lyu, X., Dong, N., & Shan, A. (2016). Antimicrobial activity, improved cell selectivity and mode of action of short PMAP-36-derived peptides against bacteria and Candida. *Scientific Reports*, 6, 27258. <https://doi.org/10.1038/SREP27258>
- Madanchi, H., Shoushtari, M., Kashani, H. H., & Sardari, S. (2019). Antimicrobial peptides of the vaginal innate immunity and their role in the fight against sexually transmitted diseases. *New Microbes and New Infections*, 34, 100627. <https://doi.org/10.1016/J.NMNI.2019.100627>
- Magzoub, M., Pramanik, A., & Gräslund, A. (2005). Modeling the endosomal escape of cell-penetrating peptides: transmembrane pH gradient driven translocation across phospholipid bilayers. *Biochemistry*, 44(45), 14890–14897. <https://doi.org/10.1021/bi051356w>
- Manavalan, B., Basith, S., Shin, T. H., Choi, S., Kim, M. O., & Lee, G. (2017). MLACP: Machine-learning-based prediction of anticancer peptides. *Oncotarget*, 8(44), 77121–77136. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.20365>
- Martinez, X., Krone, M., Alharbi, N., Rose, A. S., Laramée, R. S., O'Donoghue, S., Baaden, M., & Chavent, M. (2019). Molecular Graphics: Bridging Structural Biologists and Computer Scientists. *Structure*, 27(11), 1617–1623. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2019.09.001>
- Maupetit, J., Derreumaux, P., & Tuffery, P. (2009). PEP-FOLD: an online resource for de novo peptide structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 37(W1), W498. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKP323>

- Maupetit, J., Derreumaux, P., & Tufféry, P. (2010). A fast method for large-scale de novo peptide and miniprotein structure prediction. *Journal of Computational Chemistry*, 31(4), 726–738. <https://doi.org/10.1002/JCC.21365>
- Maupetit, J., Tuffery, P., & Derreumaux, P. (2007). A coarse-grained protein force field for folding and structure prediction. *Proteins*, 69(2), 394–408. <https://doi.org/10.1002/PROT.21505>
- Mihajlovic, M., & Lazaridis, T. (2012). Charge distribution and imperfect amphipathicity affect pore formation by antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(5), 1274–1283. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2012.01.016>
- Mishra, N., & Coutinho, E. (2020). NMR in structural determination of proteins and peptides. *Journal of Pharmaceutical Sciences & Technology Management*, 4(1), 22–33.
- Mookherjee, N., Anderson, M. A., Haagsman, H. P., & Davidson, D. J. (2020). Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(5), 311–332. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0058-8>
- Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 39. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2017.00039>
- Mulkern, A. J., Oyama, L. B., Cookson, A. R., Creevey, C. J., Wilkinson, T. J., Olleik, H., Maresca, M., da Silva, G. C., Fontes, P. P., Bazzolli, D. M. S., Mantovani, H. C., Damaris, B. F., Mur, L. A. J., & Huws, S. A. (2022). Microbiome-derived antimicrobial peptides offer therapeutic solutions for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 8(1), 70. <https://doi.org/10.1038/S41522-022-00332-W>

- Münch, D., & Sahl, H.-G. (2015). Structural variations of the cell wall precursor lipid II in Gram-positive bacteria-Impact on binding and efficacy of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(11 Pt B), 3062–2071. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.04.014>
- Murphy, K., Park, A. J., Hao, Y., Brewer, D., Lam, J. S., & Khursigaraa, C. M. (2014). Influence of O polysaccharides on biofilm development and outer membrane vesicle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 196(7), 1306–1317. <https://doi.org/10.1128/JB.01463-13>
- Murray, C. J. L., Shunji Ikuta, K., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., & Han, C. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Mylonakis, E., Podsiadlowski, L., Muhammed, M., & Vilcinskas, A. (2016). Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B*, 371(1695), 20150290. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2015.0290>
- Nantarat, N., Tragoolpua, Y., & Gunama, P. (2019). Antibacterial Activity of the Mucus Extract from the Giant African Snail (*Lissachatina fulica*) and Golden Apple Snail (*Pomacea canaliculata*) Against Pathogenic Bacteria Causing Skin Diseases. *Tropical Natural History*, 19(2), 103–112. <https://doi.org/10.58837/tnh.19.2.150872>.
- Nguyen, F., Starosta, A. L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., & Wilson, D. N. (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological Chemistry*, 395(5), 559–575. <https://doi.org/10.1515/HSZ-2013-0292>,

- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464–472. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2011.05.001>
- Organizaciòn Mundial de la Salud (OMS). (2021). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Oppenheim, F. G., Xu, T., McMillian, F. M., Levitz, S. M., Diamond, R. D., Offner, G. D., & Troxler, R. F. (1988). Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry*, 263(16), 7472–7477. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68522-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68522-9)
- Osorio, D., Rondón-Villarreal, P., & Torres, R. (2015). Peptides: A package for data mining of antimicrobial peptides. *The R Journal*, 7(1), 4–14. <https://doi.org/10.32614/RJ-2015-001>
- Palleroni, N. J. (2005). *Pseudomonas*. En D. J. Brenner, N. R. Krieg, & J. T. Staley (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria* (2nd ed., Vol. 2, pp. 323–378). Springer US. <https://doi.org/10.1007/0-387-29298-5>
- Park, W. S., Lee, J., Na, G., Park, S., Seo, S.-K., Choi, J. S., Jung, W.-K., & Choi, I.-W. (2022). Benzyl Isothiocyanate Attenuates Inflammasome Activation in *Pseudomonas aeruginosa* LPS-Stimulated THP-1 Cells and Exerts Regulation through the MAPKs/NF- κ B Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1228. <https://doi.org/10.3390/IJMS23031228>

- Pedron, C. N., Torres, M. D. T., Lima, J. A. da S., Silva, P. I., Silva, F. D., & Oliveira, V. X. (2017). Novel designed VmCT1 analogs with increased antimicrobial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 126, 456–463. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2016.11.040>
- Pereira, A., Rey, A., Lopez R, J., Castro O, J., & Uribe D, N. (2016). Caracterización físico-química y actividad antimicrobiana de la secreción mucosa de *Achatina fulica*. *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud*, 48(2), 188–195. <https://doi.org/10.18273/revsal.v48n2-2016003>
- Pereira, A., Suárez, L., Roman, T., Guzmán, F., Sierra, L., Rincón-Orozco, B., & Hidalgo, W. (2025). *Achatina fulica* haemocyanin-derived peptides as novel antimicrobial agents. *Biochimie*, 231, 84–97. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2024.12.007>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/JCC.20084>
- Pirtskhalava, M., Amstrong, A. A., Grigolava, M., Chubinidze, M., Alimbarashvili, E., Vishnepolsky, B., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D. E., & Tartakovsky, M. (2021). DBAASP v3: database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D288–D297. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA991>
- Powell, M. F., Grey, H., Gaeta, F., Sette, A., & Colón, S. (1992). Peptide stability in drug development: A comparison of peptide reactivity in different biological media. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81(8), 731–735. <https://doi.org/10.1002/jps.2600810802>

- Powers, J.-P. S., & Hancock, R. E. W. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24(11), 1681–1691.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.08.023>
- Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 109(7), 309–318.
<https://doi.org/10.1179/2047773215Y.00000000030>
- Rada, B., & Leto, T. L. (2013). Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends in Microbiology*, 21(2), 73–81.
<https://doi.org/10.1016/J.TIM.2012.10.004>
- Raheem, N., & Straus, S. K. (2019). Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2866.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02866>
- Ram, Y., Dellus-Gur, E., Bibi, M., Karkare, K., Obolski, U., Feldman, M. W., Cooper, T. F., Berman, J., & Hadany, L. (2019). Predicting microbial growth in a mixed culture from growth curve data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(29), 14698–14707. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1902217116>
- Ramazi, S., Mohammadi, N., Allahverdi, A., Khalili, E., & Abdolmaleki, P. (2022). A review on antimicrobial peptides databases and the computational tools. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2022, baac011.
<https://doi.org/10.1093/DATABASE/BAAC011>
- Rey, J., Deschavanne, P., & Tuffery, P. (2014). BactPepDB: a database of predicted peptides from a exhaustive survey of complete prokaryote genomes. *Database: The Journal of*

- Biological Databases and Curation*, 2014, bau106.
<https://doi.org/10.1093/DATABASE/BAU106>
- Rhys, N. H., Soper, A. K., & Dougan, L. (2012). The hydrogen-bonding ability of the amino acid glutamine revealed by neutron diffraction experiments. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(45), 13308–13319. <https://doi.org/10.1021/JP307442F>
- Riciluca, K. C. T., Sayegh, R. S. R., Melo, R. L., & Silva, P. I. (2012). Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. *Results in Immunology*, 2, 66–71. <https://doi.org/10.1016/J.RINIM.2012.03.001>
- Riquelme, S. A., Liimatta, K., Wong Fok Lung, T., Fields, B., Ahn, D., Chen, D., Lozano, C., Sáenz, Y., Uhlemann, A. C., Kahl, B. C., Britto, C. J., DiMango, E., & Prince, A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* utilizes host-derived itaconate to redirect its metabolism to promote biofilm formation. *Cell Metabolism*, 31(6), 1091-1106.e6. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2020.04.017>
- Röder, K. (2022). The effects of glycine to alanine mutations on the structure of GPO collagen model peptides. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 24(3), 1610–1619. <https://doi.org/10.1039/D1CP04775B>
- Rossi, E., La Rosa, R., Bartell, J. A., Marvig, R. L., Haagenzen, J. A. J., Sommer, L. M., Molin, S., & Johansen, H. K. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nature Reviews Microbiology*, 19(5), 331–342. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00477-5>
- Roy, D., & Dannenberg, J. J. (2011). The effects of regularly spaced glutamine substitutions on alpha-helical peptide structures: A DFT/ONIOM study. *Chemical Physics Letters*, 512(4–6), 255–257. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2011.07.024>

- Sarkar, P., Yarlagadda, V., Ghosh, C., & Haldar, J. (2017). A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics. *MedChemComm*, 8(3), 516–533. <https://doi.org/10.1039/C6MD00585C>
- Scocchi, M., Tossi, A., & Gennaro, R. (2011). Proline-rich antimicrobial peptides: Converging to a non-lytic mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(13), 2317–2330. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0721-7>
- Selsted, M. E., Novotny, M. J., Morris, W. L., Tang, Y. Q., Smith, W., & Cullor, J. S. (1992). Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 267(7), 4292–4295. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)42830-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)42830-x)
- Singh, S., Singh, H., Tuknait, A., Chaudhary, K., Singh, B., Kumaran, S., & Raghava, G. P. S. (2015). PEPstrMOD: structure prediction of peptides containing natural, non-natural and modified residues. *Biology Direct*, 10(1), 73. <https://doi.org/10.1186/S13062-015-0103-4>
- Sinha, M., Ghosh, N., Wijesinghe, D. S., Mathew-Steiner, S. S., Das, A., Singh, K., El Masry, M., Khanna, S., Inoue, H., Yamazaki, K., Kawada, M., Gordillo, G. M., Roy, S., & Sen, C. K. (2023). Pseudomonas Aeruginosa Theft Biofilm Require Host Lipids of Cutaneous Wound. *Annals of Surgery*, 277(3), E634–E647. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000005252>
- Smith, T. P., Clegg, T., Ransome, E., Martin-Lilley, T., Rosindell, J., Woodward, G., Pawar, S., & Bell, T. (2024). High-throughput characterization of bacterial responses to complex mixtures of chemical pollutants. *Nature Microbiology*, 9(4), 938–948. <https://doi.org/10.1038/S41564-024-01626-9>

- Solano-Gálvez, S., Paz Zarza, V., Mangwani Mordani, S., Martínez Maldonado, A., Álvarez Hernández, D., & Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena Infectol*, 36(2), 180–189. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180>
- Sousa, S. F., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2006). Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins*, 65(1), 15–26. <https://doi.org/10.1002/PROT.21082>
- Stajich, J. E. (2007). An Introduction to BioPerl. *Methods in Molecular Biology*, 406, 535–548. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-535-0_26
- Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 199–210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
- Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - A phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58(9), 1133–1148. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>
- Suárez, L., Pereira, A., Hidalgo, W., & Uribe, N. (2021). Antibacterial, antibiofilm and anti-virulence activity of biactive fractions from mucus secretion of giant african snail *achatina fulica* against *staphylococcus aureus* strains. *Antibiotics*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121548>
- Subbalakshmi, C., Nagaraj, R., & Sitaram, N. (1999). Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity. *FEBS Letters*, 448(1), 62–66. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00328-2)
- Syvitski, R. T., Burton, I., Mattatall, N. R., Douglas, S. E., & Jakeman, D. L. (2005). Structural characterization of the antimicrobial peptide pleurocidin from winter flounder. *Biochemistry*, 44(19), 7282–7293. <https://doi.org/10.1021/BI0504005>

- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., ... Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tachi, T., Epand, R. F., Epand, R. M., & Matsuzaki, K. (2002). Position-dependent hydrophobicity of the antimicrobial magainin peptide affects the mode of peptide-lipid interactions and selective toxicity. *Biochemistry*, 41(34), 10723–10731. <https://doi.org/10.1021/BI0256983>
- Takahashi, D., Shukla, S. K., Prakash, O., & Zhang, G. (2010). Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie*, 92(9), 1236–1241. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2010.02.023>
- Tang, S. S., Prodhan, Z. H., Biswas, S. K., Le, C. F., & Sekaran, S. D. (2018). Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation, and purification. *Phytochemistry*, 154, 94–105. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2018.07.002>
- Taniguchi, M., Ochiai, A., Toyoda, R., Sato, T., Saitoh, E., Kato, T., & Tanaka, T. (2017). Effects of arginine and leucine substitutions on anti-endotoxic activities and mechanisms of action of cationic and amphipathic antimicrobial octadecapeptide from rice α -amylase. *Journal of Peptide Science*, 23(3), 252–260. <https://doi.org/10.1002/PSC.2983>
- Terrone, D., Leung, S., Sang, W., Roudaia, L., & Silvius, J. R. (2003). Penetratin and Related Cell-Penetrating Cationic Peptides Can Translocate Across Lipid Bilayers in the

- Presence of a Transbilayer Potential. *Biochemistry*, 42(47), 13787–13799.
<https://doi.org/10.1021/bi035293y>
- Thakur, A., Sharma, A., Alajangi, H. K., Jaiswal, P. K., Lim, Y. beom, Singh, G., & Barnwal, R. P. (2022). In pursuit of next-generation therapeutics: Antimicrobial peptides against superbugs, their sources, mechanism of action, nanotechnology-based delivery, and clinical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 218, 135–156. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.07.103>
- Theilacker, C., Coleman, F. T., Mueschenborn, S., Llosa, N., Grout, M., & Pier, G. B. (2003). Construction and Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Mucoid Exopolysaccharide-Alginate Conjugate Vaccine. *Infection and Immunity*, 71(7), 3875–3884. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.3875-3884.2003>
- Thévenet, P., Shen, Y., Maupetit, J., Guyon, F., Derreumaux, P., & Tufféry, P. (2012). PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), W288. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS419>
- Tobias, J. W., Shrader, T. E., Rocap, G., & Varshavsky, A. (1991). The N-end rule in bacteria. *Science*, 254(5036), 1374–1377. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1962196>
- Ulm, H., Wilmes, M., Shai, Y., & Sahl, H. G. (2012). Antimicrobial Host Defensins – Specific Antibiotic Activities and Innate Defense Modulation. *Frontiers in Immunology*, 3, 249. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2012.00249>
- Ulvatne, H., Samuelsen, Ø., Haukland, H. H., Krämer, M., & Vorland, L. H. (2004). Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in *Escherichia coli* and

- Bacillus subtilis. *FEMS Microbiology Letters*, 237(2), 377–384.
<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.001>
- Vanhee, P., van der Sloot, A. M., Verschueren, E., Serrano, L., Rousseau, F., & Schymkowitz, J. (2011). Computational design of peptide ligands. *Trends in Biotechnology*, 29(5), 231–239. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2011.01.004>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Zidek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., ... Velankar, S. (2021). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB1061>
- Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22), 12142–12149. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.22.12142>
- Venkatesan, M., Fruci, M., Verellen, L. A., Skarina, T., Mesa, N., Flick, R., Pham, C., Mahadevan, R., Stogios, P. J., & Savchenko, A. (2023). Molecular mechanism of plasmid-borne resistance to sulfonamide antibiotics. *Nature Communications*, 14(1), 4031. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39778-7>
- Vidaillac, C., & Chotirmall, S. H. (2021). Pseudomonas aeruginosa in bronchiectasis: infection, inflammation, and therapies. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 15(5), 649–662. <https://doi.org/10.1080/17476348.2021.1906225>

Vine, K. L., Locke, J. M., Ranson, M., Benkendorff, K., Pyne, S. G., & Bremner, J. B. (2007).

In vitro cytotoxicity evaluation of some substituted isatin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(2), 931–938. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2006.10.035>

Vishnepolsky, B., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D. E., Tartakovsky, M., Managadze, G., Grigolava, M., Makhatadze, G. I., & Pirtskhalava, M. (2018). Predictive Model of Linear Antimicrobial Peptides Active against Gram-Negative Bacteria. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 58(5), 1141–1151. <https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.8B00118>

Vishnepolsky, B., Grigolava, M., Managadze, G., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D. E., Tartakovsky, M., & Pirtskhalava, M. (2022). Comparative analysis of machine learning algorithms on the microbial strain-specific AMP prediction. *Briefings in Bioinformatics*, 23(4), 1–11. <https://doi.org/10.1093/BIB/BBAC233>

Wadhwa, A., Mallapragada, S., & Agrawal, P. (2017). Antimicrobial peptides: The miraculous biological molecules. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 21(6), 434–438. https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_325_16

Wang, G. (2012). Post-Translational Modifications of Natural Antimicrobial Peptides and Strategies for Peptide Engineering. *Current Biotechnology*, 1(1), 72–79. <https://doi.org/10.2174/2211550111201010072>

Wang, G. (2015). Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1268, 43–66. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2285-7_3

- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1087–D1093. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV1278>
- Wang, J., Dou, X., Song, J., Lyu, Y., Zhu, X., Xu, L., Li, W., & Shan, A. (2019). Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. *Medicinal Research Reviews*, 39(3), 831–859. <https://doi.org/10.1002/med.21542>
- Wang, Z., Tegge, A. N., & Cheng, J. (2009). Evaluating the absolute quality of a single protein model using structural features and support vector machines. *Proteins*, 75(3), 638–647. <https://doi.org/10.1002/PROT.22275>
- Webster, S. S., Lee, C. K., Schmidt, W. C., Wong, G. C. L., & O'Toole, G. A. (2021). Interaction between the type 4 pili machinery and a diguanylate cyclase fine-tune c-di-GMP levels during early biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(26), e2105566118. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2105566118>
- Wei, G. X., Campagna, A. N., & Bobek, L. A. (2007). Factors affecting antimicrobial activity of MUC7 12-mer, a human salivary mucin-derived peptide. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 6, 14. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-6-14>
- Wei, L., Ye, X., Sakurai, T., Mu, Z., & Wei, L. (2022). ToxIBTL: prediction of peptide toxicity based on information bottleneck and transfer learning. *Bioinformatics*, 38(6), 1514–1524. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTAC006>
- Wenzel, M., Chiriac, A. I., Otto, A., Zweytick, D., May, C., Schumacher, C., Gust, R., Bauke Albada, H., Penkova, M., Krämer, U., Erdmann, R., Metzler-Nolte, N., Straus, S. K., Bremer, E., Becher, D., Brötz-Oesterhelt, H., Sahl, H.-G., & Bandow, J. E. (2014). Small

- cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), E1409–E1418. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319900111>
- Westerhoff, H. V., Juretic, D., Hendler, R. W., & Zasloff, M. (1989). Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(17), 6597–6601. <https://doi.org/10.1073/PNAS.86.17.6597>
- Whitehead, T. A., Baker, D., & Fleishman, S. J. (2013). Computational design of novel protein binders and experimental affinity maturation. *Methods in Enzymology*, 523, 1–19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394292-0.00001-1>
- Wichapong, K., Alard, J. E., Ortega-Gomez, A., Weber, C., Hackeng, T. M., Soehnlein, O., & Nicolaes, G. A. F. (2016). Structure-Based Design of Peptidic Inhibitors of the Interaction between CC Chemokine Ligand 5 (CCL5) and Human Neutrophil Peptides 1 (HNP1). *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(9), 4289–4301. <https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.5B01952>
- Winstanley, C., O'Brien, S., & Brockhurst, M. A. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. *Trends in Microbiology*, 24(5), 327–337. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2016.01.008>
- Xiao, W., Jiang, W., Chen, Z., Huang, Y., Mao, J., Zheng, W., Hu, Y., & Shi, J. (2025). Advance in peptide-based drug development: delivery platforms, therapeutics and vaccines. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10, 74. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02107-5>
- Xu, S., Tan, P., Tang, Q., Wang, T., Ding, Y., Fu, H., Zhang, Y., Zhou, C., Song, M., Tang, Q., Sun, Z., & Ma, X. (2023). Enhancing the stability of antimicrobial peptides: From

- design strategies to applications. *Chemical Engineering Journal*, 475, 145923. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2023.145923>
- Xuan, J., Feng, W., Wang, J., Wang, R., Zhang, B., Bo, L., Chen, Z. S., Yang, H., & Sun, L. (2023). Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 68, 100954. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2023.100954>
- Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27–55. <https://doi.org/10.1124/PR.55.1.2>
- Yin, H., & Flynn, A. D. (2016). Drugging Membrane Protein Interactions. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 18, 51-76. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOENG-092115-025322>
- Yin, L., Edwards, M. A., Li, J., Yip, C. M., & Deber, C. M. (2012). Roles of Hydrophobicity and Charge Distribution of Cationic Antimicrobial Peptides in Peptide-Membrane Interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(10), 7738-7745. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.303602>
- Yount, N. Y., & Yeaman, M. R. (2013). Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277(1), 127–138. <https://doi.org/10.1111/NYAS.12005>
- Zaman, S. Bin, Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., & Hossain, N. (2017). A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*, 9(6), e1403. <https://doi.org/10.7759/CUREUS.1403>
- Zhang, L., & Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1), R14–R19. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>

- Zhang, Q. Y., Yan, Z. Bin, Meng, Y. M., Hong, X. Y., Shao, G., Ma, J. J., Cheng, X. R., Liu, J., Kang, J., & Fu, C. Y. (2021). Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research*, 8(1), 48. <https://doi.org/10.1186/S40779-021-00343-2>
- Zhang, Y., & Skolnick, J. (2004). Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. *Proteins*, 57(4), 702–710. <https://doi.org/10.1002/PROT.20264>
- Zhu, B.-Y., Zhou, M. E., Kay, C. M., & Hodges, R. S. (1993). Packing and hydrophobicity effects on protein folding and stability: effects of beta-branched amino acids, valine and isoleucine, on the formation and stability of two-stranded alpha-helical coiled coils/leucine zippers. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 2(3), 383–394. <https://doi.org/10.1002/PRO.5560020310>
- Zhu, Y., Mohapatra, S., & Weisshaar, J. C. (2019). Rigidification of the Escherichia coli cytoplasm by the human antimicrobial peptide LL-37 revealed by superresolution fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(3), 1017–1026. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814924116>
- Zhuang, J., Coates, C. J., Zhu, H., Zhu, P., Wu, Z., & Xie, L. (2015). Identification of candidate antimicrobial peptides derived from abalone hemocyanin. *Developmental & Comparative Immunology*, 49(1), 96–102. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2014.11.008>

Apéndices

Apéndice A. Resultados obtenidos del servidor ProtParam.

ProtParam - Results

User-provided sequence:

10
ILYVWQLIQA LKKKG

[\[Documentation / Reference\]](#)

Number of amino acids: 15
Theoretical pI: 10.00
Molecular weight: 1714.17

Amino acid composition:

Ala (A)	1	6.7%
Arg (R)	0	0.0%
Asn (N)	0	0.0%
Asp (D)	0	0.0%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	2	13.3%
Glu (E)	0	0.0%
Gly (G)	1	6.7%
His (H)	0	0.0%
Ile (I)	2	13.3%
Leu (L)	3	20.0%
Lys (K)	3	20.0%
Met (M)	0	0.0%
Phe (F)	0	0.0%
Pro (P)	0	0.0%
Ser (S)	0	0.0%
Thr (T)	0	0.0%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	1	6.7%
Val (V)	2	13.3%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 0
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 3

Atomic composition:

Carbon	C	82
Hydrogen	H	144
Nitrogen	N	20
Oxygen	O	19
Sulfur	S	0

Formula: $C_{82}H_{144}N_{20}O_{19}$
Total number of atoms: 265

Extinction coefficients:

This protein does not contain any Trp residues. Experience shows that this could result in more than 10% error in the computed extinction coefficient. Extinction coefficients are in units of $M^{-1} cm^{-1}$, at 280 nm measured in water.
Ext. coefficient 1490
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.869

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is I (Ile).
The estimated half-life is: 20 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
30 min (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 10.85
This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 175.33

Grand average of hydropathicity (GRAVY): 0.680

ProtParam - Results

User-provided sequence:

¹⁰
LFKKIVTNVF NKANL

[\[Documentation / Reference\]](#)

Number of amino acids: 15

Theoretical pI: 10.30

Molecular weight: 1749.13

Amino acid composition: CSV format

Ala (A)	1	6.7%
Arg (R)	0	0.0%
Asn (N)	3	20.0%
Asp (D)	0	0.0%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	0	0.0%
Glu (E)	0	0.0%
Gly (G)	0	0.0%
His (H)	0	0.0%
Ile (I)	1	6.7%
Leu (L)	2	13.3%
Lys (K)	3	20.0%
Met (M)	0	0.0%
Phe (F)	2	13.3%
Pro (P)	0	0.0%
Ser (S)	0	0.0%
Thr (T)	1	6.7%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	0	0.0%
Val (V)	2	13.3%
Pro (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 0

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 3

Atomic composition:

Carbon	C	83
Hydrogen	H	137
Nitrogen	N	21
Oxygen	O	20
Sulfur	S	0

Formula: C₈₃H₁₃₇N₂₁O₂₀

Total number of atoms: 261

Extinction coefficients:

As there are no Trp, Tyr or Cys in the region considered, your protein should not be visible by UV spectrophotometry.

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is L (Leu).

The estimated half-life is: 5.5 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

3 min (yeast, in vivo).

2 min (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be -11.90

This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 123.33

Grand average of hydropathicity (GRAVY):0.333

ProtParam - Results

User-provided sequence:

10
ILAVVQLIQA LKKKG

[\[Documentation / Reference\]](#)

Number of amino acids: 15

Theoretical pI: 10.30

Molecular weight: 1622.07

Amino acid composition: [CSV format](#)

Ala (A)	2	13.3%
Arg (R)	0	0.0%
Asn (N)	0	0.0%
Asp (D)	0	0.0%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	2	13.3%
Glu (E)	0	0.0%
Gly (G)	1	6.7%
His (H)	0	0.0%
Ile (I)	2	13.3%
Leu (L)	3	20.0%
Lys (K)	3	20.0%
Met (M)	0	0.0%
Phe (F)	0	0.0%
Pro (P)	0	0.0%
Ser (S)	0	0.0%
Thr (T)	0	0.0%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	0	0.0%
Val (V)	2	13.3%
PyI (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 0

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 3

Atomic composition:

Carbon	C	76
Hydrogen	H	140
Nitrogen	N	20
Oxygen	O	18
Sulfur	S	0

Formula: $C_{76}H_{140}N_{20}O_{18}$

Total number of atoms: 254

Extinction coefficients:

As there are no Trp, Tyr or Cys in the region considered, your protein should not be visible by UV spectrophotometry.

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is I (Ile).

The estimated half-life is: 20 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

30 min (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 10.85

This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 182.00

Grand average of hydropathicity (GRAVY): 0.887

ProtParam - Results**User-provided sequence:**

10
ILYVVQLIAA LKKKG

[\[Documentation / Reference\]](#)

Number of amino acids: 15
Theoretical pI: 10.00
Molecular weight: 1657.12

Amino acid composition: [CSV format](#)

Ala (A)	2	13.3%
Arg (R)	0	0.0%
Asn (N)	0	0.0%
Asp (D)	0	0.0%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	1	6.7%
Glu (E)	0	0.0%
Gly (G)	1	6.7%
His (H)	0	0.0%
Ile (I)	2	13.3%
Leu (L)	3	20.0%
Lys (K)	3	20.0%
Met (M)	0	0.0%
Phe (F)	0	0.0%
Pro (P)	0	0.0%
Ser (S)	0	0.0%
Thr (T)	0	0.0%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	1	6.7%
Val (V)	2	13.3%
PyL (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 0
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 3

Atomic composition:

Carbon	C	80
Hydrogen	H	141
Nitrogen	N	19
Oxygen	O	18
Sulfur	S	0

Formula: $C_{80}H_{141}N_{19}O_{18}$
Total number of atoms: 258

Extinction coefficients:

This protein does not contain any Trp residues. Experience shows that this could result in more than 10% error in the computed extinction coefficient. Extinction coefficients are in units of $M^{-1} cm^{-1}$, at 280 nm measured in water.
Ext. coefficient 1490
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.899

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is I (Ile).
The estimated half-life is: 20 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
30 min (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 10.85
This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 182.00

Grand average of hydropathicity (GRAVY):1.033

ProtParam - Results**User-provided sequence:**

10
ILYVVQLIQA LKKKA

[\[Documentation / Reference\]](#)

Number of amino acids: 15
Theoretical pI: 10.00
Molecular weight: 1728.19

Amino acid composition:

Ala (A)	2	13.3%
Arg (R)	0	0.0%
Asn (N)	0	0.0%
Asp (D)	0	0.0%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	2	13.3%
Glu (E)	0	0.0%
Gly (G)	0	0.0%
His (H)	0	0.0%
Ile (I)	2	13.3%
Leu (L)	3	20.0%
Lys (K)	3	20.0%
Met (M)	0	0.0%
Phe (F)	0	0.0%
Pro (P)	0	0.0%
Ser (S)	0	0.0%
Thr (T)	0	0.0%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	1	6.7%
Val (V)	2	13.3%
Pro (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 0
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 3

Atomic composition:

Carbon	C	83
Hydrogen	H	146
Nitrogen	N	20
Oxygen	O	19
Sulfur	S	0

Formula: $C_{83}H_{146}N_{20}O_{19}$
Total number of atoms: 268

Extinction coefficients:

This protein does not contain any Trp residues. Experience shows that this could result in more than 10% error in the computed extinction coefficient. Extinction coefficients are in units of $M^{-1} cm^{-1}$, at 280 nm measured in water.
Ext. coefficient 1490
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.862

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is I (Ile).
The estimated half-life is: 20 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
30 min (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 16.51
This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 182.00

Grand average of hydropathicity (GRAVY): 0.827

Apéndice B. Resultados obtenidos del servidor PEP-FOLD3.5.

Péptido 4405

Download archive of all models [here](#)

#	file	sOPEP	avg	gdt	max	q	tm
# cluster 1 - Size: 95							
	4405-model1	-29.0549	0.965	0.994	0.990	0.978	0.897
	4405-model1.1	-28.9806	0.958	0.994	0.989	0.975	0.876
	4405-model1.2	-28.9547	0.960	0.994	0.989	0.977	0.881
	4405-model1.3	-28.9189	0.965	0.994	0.990	0.979	0.897
	4405-model1.4	-28.9145	0.959	0.994	0.989	0.978	0.876
	4405-model1.5	-28.9066	0.962	0.994	0.989	0.975	0.889
	4405-model1.6	-28.8731	0.967	0.994	0.990	0.979	0.904
	4405-model1.7	-28.848	0.968	0.994	0.990	0.979	0.909
	4405-model1.8	-28.8365	0.960	0.994	0.989	0.977	0.879
	4405-model1.9	-28.8356	0.965	0.994	0.990	0.978	0.899
	4405-model1.10	-28.825	0.955	0.994	0.989	0.975	0.862
	4405-model1.11	-28.8066	0.957	0.994	0.989	0.978	0.866
	4405-model1.12	-28.8049	0.961	0.994	0.989	0.979	0.880
	4405-model1.13	-28.7862	0.968	0.994	0.990	0.979	0.908
	4405-model1.14	-28.7842	0.965	0.994	0.989	0.980	0.895
	4405-model1.15	-28.7781	0.965	0.994	0.989	0.977	0.897
	4405-model1.16	-28.7756	0.965	0.994	0.989	0.979	0.897
	4405-model1.17	-28.7739	0.961	0.994	0.989	0.977	0.886
	4405-model1.18	-28.7714	0.960	0.994	0.989	0.977	0.878
	4405-model1.19	-28.7701	0.968	0.994	0.990	0.980	0.910
	4405-model1.20	-28.7661	0.967	0.994	0.990	0.979	0.906
	4405-model1.21	-28.7577	0.961	0.994	0.989	0.979	0.882
	4405-model1.22	-28.7568	0.968	0.994	0.990	0.980	0.908
	4405-model1.23	-28.7536	0.960	0.994	0.989	0.978	0.880
	4405-model1.24	-28.7522	0.962	0.994	0.989	0.977	0.887
	4405-model1.25	-28.7517	0.912	0.977	0.967	0.915	0.788
	4405-model1.26	-28.7503	0.959	0.994	0.989	0.977	0.878
	4405-model1.27	-28.7465	0.958	0.994	0.989	0.975	0.876
	4405-model1.28	-28.7433	0.960	0.994	0.989	0.977	0.879
	4405-model1.29	-28.74	0.968	0.994	0.990	0.978	0.909
	4405-model1.30	-28.7394	0.959	0.994	0.989	0.976	0.877
	4405-model1.31	-28.7242	0.960	0.994	0.989	0.977	0.881
	4405-model1.32	-28.7193	0.969	0.994	0.990	0.980	0.910
	4405-model1.33	-28.7167	0.959	0.994	0.989	0.976	0.877
	4405-model1.34	-28.7087	0.969	0.994	0.990	0.981	0.913
	4405-model1.35	-28.7069	0.962	0.994	0.989	0.979	0.885
	4405-model1.36	-28.6993	0.967	0.994	0.990	0.980	0.907
	4405-model1.37	-28.6965	0.965	0.994	0.990	0.978	0.899
	4405-model1.38	-28.6939	0.945	0.994	0.987	0.972	0.827
	4405-model1.39	-28.6938	0.963	0.994	0.989	0.979	0.891
	4405-model1.40	-28.6865	0.963	0.994	0.989	0.977	0.892
	4405-model1.41	-28.6778	0.962	0.994	0.989	0.976	0.887
	4405-model1.42	-28.6767	0.954	0.994	0.988	0.976	0.858
	4405-model1.43	-28.6761	0.964	0.994	0.990	0.980	0.893
	4405-model1.44	-28.6761	0.941	0.994	0.987	0.974	0.809
	4405-model1.45	-28.6742	0.965	0.994	0.989	0.979	0.897
	4405-model1.46	-28.6729	0.971	0.994	0.990	0.981	0.920
	4405-model1.47	-28.6715	0.965	0.994	0.990	0.978	0.899
	4405-model1.48	-28.6643	0.962	0.994	0.989	0.977	0.888
	4405-model1.49	-28.6639	0.965	0.994	0.989	0.977	0.901
	4405-model1.50	-28.6609	0.960	0.994	0.989	0.976	0.881
	4405-model1.51	-28.6609	0.958	0.994	0.989	0.978	0.869
	4405-model1.52	-28.6574	0.966	0.994	0.990	0.980	0.899
	4405-model1.53	-28.6573	0.967	0.994	0.990	0.978	0.907
	4405-model1.54	-28.6559	0.946	0.994	0.987	0.973	0.828
	4405-model1.55	-28.6557	0.960	0.994	0.989	0.976	0.883
	4405-model1.56	-28.6496	0.951	0.994	0.988	0.972	0.850
	4405-model1.57	-28.648	0.958	0.994	0.989	0.977	0.872
	4405-model1.58	-28.645	0.953	0.994	0.988	0.973	0.856
	4405-model1.59	-28.6447	0.954	0.994	0.988	0.973	0.862
	4405-model1.60	-28.6374	0.955	0.994	0.989	0.976	0.861
	4405-model1.61	-28.6321	0.961	0.994	0.989	0.977	0.884
	4405-model1.62	-28.6307	0.952	0.994	0.988	0.974	0.853
	4405-model1.63	-28.6304	0.965	0.994	0.989	0.978	0.901
	4405-model1.64	-28.6298	0.958	0.994	0.988	0.976	0.873
	4405-model1.65	-28.6275	0.955	0.994	0.988	0.974	0.862
	4405-model1.66	-28.6261	0.943	0.994	0.987	0.971	0.822
	4405-model1.67	-28.6234	0.956	0.994	0.988	0.977	0.865
	4405-model1.68	-28.6223	0.964	0.994	0.990	0.978	0.893
	4405-model1.69	-28.6218	0.956	0.994	0.988	0.976	0.865
	4405-model1.70	-28.6157	0.969	0.994	0.990	0.980	0.911
	4405-model1.71	-28.6142	0.923	0.971	0.966	0.921	0.831
	4405-model1.72	-28.6136	0.962	0.994	0.989	0.978	0.888
	4405-model1.73	-28.6133	0.960	0.994	0.989	0.976	0.883
	4405-model1.74	-28.6096	0.960	0.994	0.989	0.977	0.881
	4405-model1.75	-28.6032	0.964	0.994	0.989	0.979	0.894
	4405-model1.76	-28.599	0.958	0.994	0.989	0.978	0.872
	4405-model1.77	-28.5976	0.960	0.994	0.989	0.979	0.878
	4405-model1.78	-28.5879	0.969	0.994	0.990	0.980	0.910

```

4405-model1.71 -28.6142 0.923 0.971 0.966 0.921 0.831
4405-model1.72 -28.6136 0.962 0.994 0.989 0.978 0.888
4405-model1.73 -28.6133 0.960 0.994 0.989 0.976 0.883
4405-model1.74 -28.6096 0.960 0.994 0.989 0.977 0.881
4405-model1.75 -28.6032 0.964 0.994 0.989 0.979 0.894
4405-model1.76 -28.599 0.958 0.994 0.989 0.978 0.872
4405-model1.77 -28.5976 0.960 0.994 0.989 0.979 0.878
4405-model1.78 -28.5879 0.969 0.994 0.990 0.980 0.910
4405-model1.79 -28.5827 0.960 0.994 0.989 0.976 0.881
4405-model1.80 -28.5777 0.964 0.994 0.989 0.980 0.894
4405-model1.81 -28.5776 0.945 0.994 0.987 0.970 0.829
4405-model1.82 -28.5759 0.954 0.994 0.988 0.974 0.859
4405-model1.83 -28.5581 0.959 0.994 0.989 0.974 0.881
4405-model1.84 -28.5577 0.967 0.994 0.990 0.980 0.903
4405-model1.85 -28.5559 0.950 0.994 0.987 0.974 0.846
4405-model1.86 -28.5463 0.957 0.994 0.989 0.975 0.869
4405-model1.87 -28.5427 0.967 0.994 0.990 0.980 0.906
4405-model1.88 -28.528 0.965 0.994 0.990 0.978 0.897
4405-model1.89 -28.5176 0.959 0.994 0.989 0.977 0.878
4405-model1.90 -28.4929 0.966 0.994 0.990 0.979 0.900
4405-model1.91 -28.4871 0.966 0.994 0.990 0.979 0.902
4405-model1.92 -28.4283 0.959 0.994 0.989 0.976 0.876
4405-model1.93 -28.4136 0.949 0.994 0.988 0.974 0.842
4405-model1.94 -28.402 0.944 0.994 0.987 0.970 0.824

# cluster 2 - Size: 4
4405-model2 -25.5373 0.805 0.886 0.862 0.785 0.687
4405-model2.1 -25.5151 0.823 0.886 0.865 0.793 0.750
4405-model2.2 -24.705 0.804 0.883 0.861 0.766 0.707
4405-model2.3 -24.5349 0.823 0.917 0.862 0.821 0.692

# cluster 3 - Size: 1
4405-model3 -23.0228 0.772 0.866 0.796 0.746 0.681

```

Péptido 4712

Download archive of all models [here](#)

```

# file soPEP avg gdt max q tm
# cluster 1 - Size: 7
4712-model1 -22.6806 0.947 0.996 0.992 0.978 0.821
4712-model1.1 -22.5376 0.945 0.995 0.991 0.970 0.823
4712-model1.2 -22.5259 0.947 0.996 0.992 0.978 0.823
4712-model1.3 -22.4365 0.938 0.995 0.990 0.966 0.802
4712-model1.4 -22.3547 0.937 0.995 0.990 0.975 0.786
4712-model1.5 -22.2701 0.939 0.995 0.990 0.971 0.799
4712-model1.6 -22.1733 0.946 0.995 0.991 0.971 0.828

# cluster 2 - Size: 4
4712-model2 -22.5948 0.955 0.997 0.994 0.979 0.850
4712-model2.1 -22.5077 0.953 0.999 0.994 0.979 0.839
4712-model2.2 -22.356 0.943 0.997 0.992 0.977 0.806

```

```

4712-model2.3 -22.3514 0.950 0.999 0.994 0.981 0.825
# cluster 3 - Size: 5
4712-model3 -22.5792 0.958 0.999 0.995 0.984 0.855
4712-model3.1 -22.5074 0.956 0.999 0.995 0.982 0.846
4712-model3.2 -22.4359 0.941 0.999 0.992 0.979 0.796
4712-model3.3 -22.2923 0.949 1.000 0.994 0.982 0.820
4712-model3.4 -21.9757 0.951 0.999 0.994 0.977 0.834
# cluster 4 - Size: 8
4712-model4 -22.5688 0.949 0.996 0.992 0.977 0.830
4712-model4.1 -22.552 0.957 0.998 0.994 0.983 0.851
4712-model4.2 -22.3333 0.937 0.996 0.991 0.965 0.798
4712-model4.3 -22.2154 0.947 0.997 0.993 0.980 0.820
4712-model4.4 -22.1687 0.937 0.994 0.989 0.971 0.792
4712-model4.5 -22.1238 0.951 0.996 0.993 0.979 0.837
4712-model4.6 -22.0614 0.951 0.995 0.992 0.975 0.840
4712-model4.7 -21.8755 0.937 0.994 0.989 0.972 0.792
# cluster 5 - Size: 11
4712-model5 -22.5226 0.949 0.997 0.993 0.977 0.828
4712-model5.1 -22.4932 0.940 0.999 0.992 0.974 0.792
4712-model5.2 -22.4423 0.952 1.000 0.994 0.982 0.833
4712-model5.3 -22.4382 0.959 1.000 0.995 0.985 0.857
4712-model5.4 -22.4085 0.955 1.000 0.995 0.984 0.842
4712-model5.5 -22.3769 0.951 0.999 0.994 0.983 0.827
4712-model5.6 -22.3669 0.943 0.999 0.993 0.979 0.801
4712-model5.7 -22.3234 0.962 1.000 0.996 0.986 0.865
4712-model5.8 -22.3075 0.948 0.998 0.993 0.979 0.823
4712-model5.9 -22.2866 0.942 0.999 0.993 0.972 0.805
4712-model5.10 -22.181 0.945 1.000 0.993 0.971 0.814
# cluster 6 - Size: 6
4712-model6 -22.5107 0.955 0.996 0.993 0.978 0.852
4712-model6.1 -22.4848 0.949 0.997 0.992 0.980 0.828
4712-model6.2 -22.4247 0.950 0.995 0.992 0.975 0.839
4712-model6.3 -22.41 0.926 0.994 0.989 0.970 0.752
4712-model6.4 -22.4028 0.930 0.995 0.989 0.971 0.765
4712-model6.5 -22.213 0.944 0.996 0.992 0.975 0.813
# cluster 7 - Size: 6
4712-model7 -22.5026 0.948 0.999 0.993 0.976 0.823
4712-model7.1 -22.5001 0.924 0.999 0.990 0.965 0.741
4712-model7.2 -22.4009 0.938 0.998 0.992 0.973 0.791
4712-model7.3 -22.3783 0.918 0.997 0.988 0.961 0.727
4712-model7.4 -22.2087 0.938 0.998 0.992 0.972 0.791
4712-model7.5 -22.1389 0.945 0.998 0.993 0.972 0.815
# cluster 8 - Size: 3
4712-model8 -22.4761 0.931 0.992 0.986 0.959 0.786
4712-model8.1 -22.4446 0.932 0.991 0.986 0.962 0.789
4712-model8.2 -22.0069 0.928 0.988 0.984 0.966 0.772

```

```
# cluster 9 - Size: 6
4712-model9 -22.4731 0.954 0.997 0.994 0.978 0.849
4712-model9.1 -22.4082 0.951 0.996 0.993 0.977 0.840
4712-model9.2 -22.2901 0.954 0.997 0.993 0.977 0.849
4712-model9.3 -22.172 0.940 0.995 0.991 0.972 0.801
4712-model9.4 -22.1516 0.938 0.994 0.990 0.971 0.797
4712-model9.5 -21.9321 0.925 0.994 0.988 0.964 0.753

# cluster 10 - Size: 3
4712-model10 -22.4479 0.938 1.000 0.992 0.979 0.780
4712-model10.1 -22.2645 0.933 1.000 0.991 0.972 0.770
4712-model10.2 -22.2313 0.923 1.000 0.990 0.967 0.736

# cluster 11 - Size: 6
4712-model11 -22.4114 0.950 0.998 0.993 0.981 0.827
4712-model11.1 -22.3424 0.948 0.997 0.993 0.980 0.822
4712-model11.2 -22.1126 0.946 0.996 0.991 0.978 0.820
4712-model11.3 -22.0062 0.940 0.996 0.991 0.974 0.799
4712-model11.4 -22.0045 0.946 0.997 0.992 0.979 0.817
4712-model11.5 -21.9361 0.939 0.995 0.990 0.966 0.806

# cluster 12 - Size: 7
4712-model12 -22.4044 0.955 0.999 0.994 0.980 0.845
4712-model12.1 -22.3655 0.959 0.999 0.995 0.982 0.859
4712-model12.2 -22.3488 0.959 0.999 0.995 0.983 0.858
4712-model12.3 -22.3463 0.958 0.999 0.995 0.985 0.855
4712-model12.4 -22.2501 0.960 0.999 0.995 0.986 0.861
4712-model12.5 -22.234 0.956 0.999 0.995 0.979 0.852
4712-model12.6 -22.1183 0.955 0.997 0.994 0.978 0.852

# cluster 13 - Size: 6
4712-model13 -22.3764 0.954 0.999 0.994 0.983 0.839
4712-model13.1 -22.3191 0.949 0.998 0.993 0.982 0.822
4712-model13.2 -22.2869 0.950 0.999 0.994 0.982 0.826
4712-model13.3 -22.2055 0.951 0.999 0.994 0.982 0.830
4712-model13.4 -22.1407 0.945 0.998 0.993 0.979 0.809
4712-model13.5 -21.9906 0.942 0.998 0.991 0.975 0.803

# cluster 14 - Size: 3
4712-model14 -22.3312 0.920 0.996 0.989 0.965 0.732
4712-model14.1 -22.2968 0.944 0.994 0.990 0.978 0.816
4712-model14.2 -22.2587 0.926 0.992 0.986 0.967 0.761

# cluster 15 - Size: 4
4712-model15 -22.3239 0.946 0.997 0.992 0.976 0.818
4712-model15.1 -22.3231 0.947 0.996 0.992 0.975 0.823
4712-model15.2 -22.2318 0.915 0.995 0.987 0.965 0.713
4712-model15.3 -21.9543 0.938 0.996 0.991 0.975 0.791

# cluster 16 - Size: 7
4712-model16 -22.3135 0.947 1.000 0.994 0.982 0.813
4712-model16.1 -22.2997 0.954 1.000 0.995 0.983 0.839
4712-model16.2 -22.2498 0.945 0.999 0.993 0.980 0.809
4712-model16.3 -22.0613 0.953 1.000 0.994 0.982 0.836
```

```

4712-model16.4 -22.0613 0.953 1.000 0.994 0.982 0.835
4712-model16.5 -22.0607 0.958 0.999 0.995 0.984 0.855
4712-model16.6 -21.9281 0.940 0.999 0.992 0.979 0.791
# cluster 17 - Size: 4
4712-model17 -22.2631 0.925 1.000 0.990 0.972 0.739
4712-model17.1 -22.2405 0.949 1.000 0.994 0.978 0.823
4712-model17.2 -22.2207 0.940 0.999 0.992 0.977 0.790
4712-model17.3 -22.1287 0.944 0.999 0.992 0.975 0.810
# cluster 18 - Size: 2
4712-model18 -22.2565 0.950 0.998 0.994 0.975 0.833
4712-model18.1 -22.1104 0.945 0.999 0.993 0.980 0.806
# cluster 19 - Size: 1
4712-model19 -22.2004 0.925 0.996 0.989 0.967 0.748
# cluster 20 - Size: 1
4712-model20 -21.7826 0.910 0.990 0.983 0.957 0.708

```

Péptido 4732

Download archive of all models [here](#)

#	file	sOPEP	avg	gdt	max	q	tm
# cluster 1 - Size: 15							
	4732-model1	-28.7101	0.972	0.999	0.997	0.988	0.905
	4732-model1.1	-28.6338	0.975	0.999	0.997	0.990	0.915
	4732-model1.2	-28.6258	0.969	0.999	0.996	0.987	0.893
	4732-model1.3	-28.4802	0.975	0.999	0.997	0.991	0.913
	4732-model1.4	-28.4719	0.970	0.999	0.997	0.986	0.897
	4732-model1.5	-28.4604	0.969	0.999	0.997	0.989	0.893
	4732-model1.6	-28.4553	0.972	0.999	0.997	0.989	0.901
	4732-model1.7	-28.4374	0.973	0.999	0.997	0.989	0.908
	4732-model1.8	-28.4322	0.972	0.999	0.997	0.989	0.901
	4732-model1.9	-28.4038	0.966	0.999	0.996	0.987	0.882
	4732-model1.10	-28.3615	0.972	0.999	0.997	0.988	0.903
	4732-model1.11	-28.3588	0.969	0.999	0.997	0.987	0.892
	4732-model1.12	-28.3514	0.971	0.999	0.997	0.988	0.900
	4732-model1.13	-28.2887	0.972	0.999	0.997	0.990	0.903
	4732-model1.14	-28.2566	0.969	0.999	0.996	0.989	0.890
# cluster 2 - Size: 6							
	4732-model2	-28.6199	0.955	0.999	0.994	0.981	0.844
	4732-model2.1	-28.5578	0.959	0.999	0.994	0.984	0.859
	4732-model2.2	-28.4903	0.949	0.999	0.993	0.980	0.823
	4732-model2.3	-28.4776	0.965	0.999	0.996	0.986	0.880
	4732-model2.4	-28.4537	0.960	0.999	0.995	0.987	0.859
	4732-model2.5	-28.3556	0.958	0.999	0.994	0.984	0.853
# cluster 3 - Size: 8							
	4732-model3	-28.6032	0.973	0.999	0.997	0.988	0.907
	4732-model3.1	-28.5624	0.973	0.999	0.997	0.988	0.906

```

4732-model13.2 -28.5451 0.970 0.999 0.996 0.985 0.899
4732-model13.3 -28.4481 0.963 0.999 0.996 0.983 0.873
4732-model13.4 -28.4065 0.974 0.999 0.997 0.989 0.911
4732-model13.5 -28.3928 0.974 0.999 0.997 0.988 0.911
4732-model13.6 -28.3504 0.974 0.999 0.996 0.988 0.912
4732-model13.7 -28.3499 0.967 0.999 0.996 0.987 0.885

# cluster 4 - Size: 11
4732-model14 -28.6032 0.965 0.999 0.996 0.986 0.880
4732-model14.1 -28.5064 0.964 0.999 0.996 0.984 0.879
4732-model14.2 -28.4943 0.963 0.999 0.996 0.984 0.875
4732-model14.3 -28.4651 0.963 0.999 0.995 0.984 0.875
4732-model14.4 -28.4631 0.970 0.999 0.997 0.989 0.896
4732-model14.5 -28.4221 0.970 0.999 0.996 0.988 0.895
4732-model14.6 -28.3876 0.968 0.999 0.996 0.985 0.893
4732-model14.7 -28.3791 0.962 0.999 0.995 0.988 0.868
4732-model14.8 -28.3595 0.970 0.999 0.996 0.989 0.895
4732-model14.9 -28.3532 0.966 0.999 0.996 0.985 0.884
4732-model14.10 -28.3498 0.969 0.999 0.996 0.985 0.894

# cluster 5 - Size: 5
4732-model15 -28.6017 0.964 0.999 0.996 0.988 0.871
4732-model15.1 -28.5744 0.973 0.999 0.997 0.988 0.908
4732-model15.2 -28.3431 0.972 0.999 0.997 0.984 0.907
4732-model15.3 -28.3372 0.950 0.999 0.993 0.978 0.830
4732-model15.4 -28.2672 0.965 0.999 0.996 0.986 0.878

# cluster 6 - Size: 8
4732-model16 -28.5764 0.977 0.999 0.997 0.991 0.918
4732-model16.1 -28.5515 0.969 0.999 0.996 0.989 0.890
4732-model16.2 -28.5515 0.969 0.999 0.996 0.989 0.889
4732-model16.3 -28.4881 0.957 0.999 0.995 0.982 0.850
4732-model16.4 -28.453 0.976 0.999 0.997 0.991 0.916
4732-model16.5 -28.3426 0.968 0.999 0.996 0.987 0.888
4732-model16.6 -28.3333 0.957 0.999 0.995 0.985 0.849
4732-model16.7 -28.2732 0.976 0.999 0.997 0.990 0.918

# cluster 7 - Size: 14
4732-model17 -28.5666 0.976 0.999 0.997 0.987 0.921
4732-model17.1 -28.5268 0.974 0.999 0.997 0.988 0.913
4732-model17.2 -28.5208 0.968 0.999 0.996 0.983 0.892
4732-model17.3 -28.4802 0.966 0.999 0.996 0.985 0.883
4732-model17.4 -28.4342 0.973 0.999 0.996 0.988 0.908
4732-model17.5 -28.4008 0.974 0.999 0.997 0.988 0.913
4732-model17.6 -28.3655 0.973 0.999 0.997 0.989 0.908
4732-model17.7 -28.3655 0.970 0.999 0.996 0.988 0.896
4732-model17.8 -28.3652 0.970 0.999 0.996 0.988 0.896
4732-model17.9 -28.354 0.974 0.999 0.996 0.989 0.913
4732-model17.10 -28.316 0.975 0.999 0.997 0.989 0.916
4732-model17.11 -28.3037 0.974 0.999 0.996 0.989 0.914
4732-model17.12 -28.2929 0.974 0.999 0.997 0.989 0.913
4732-model17.13 -28.2653 0.960 0.999 0.995 0.981 0.865

```

```

# cluster 8 - Size: 8
4732-model18 -28.56 0.971 0.999 0.997 0.988 0.901
4732-model18.1 -28.5185 0.974 0.999 0.997 0.989 0.909
4732-model18.2 -28.4891 0.975 0.999 0.997 0.989 0.915
4732-model18.3 -28.4808 0.977 0.999 0.997 0.991 0.919
4732-model18.4 -28.4314 0.977 0.999 0.997 0.991 0.921
4732-model18.5 -28.3861 0.974 0.999 0.997 0.987 0.911
4732-model18.6 -28.3342 0.970 0.999 0.997 0.987 0.899
4732-model18.7 -28.3202 0.977 0.999 0.997 0.989 0.923

# cluster 9 - Size: 11
4732-model19 -28.5496 0.966 0.999 0.996 0.987 0.883
4732-model19.1 -28.5191 0.975 0.999 0.997 0.989 0.915
4732-model19.2 -28.4689 0.974 0.999 0.997 0.989 0.912
4732-model19.3 -28.4679 0.973 0.999 0.997 0.989 0.906
4732-model19.4 -28.4497 0.973 0.999 0.997 0.989 0.905
4732-model19.5 -28.4371 0.972 0.999 0.996 0.988 0.902
4732-model19.6 -28.4178 0.972 0.999 0.997 0.988 0.903
4732-model19.7 -28.3355 0.967 0.999 0.996 0.987 0.886
4732-model19.8 -28.3174 0.974 0.999 0.997 0.988 0.910
4732-model19.9 -28.2961 0.972 0.999 0.997 0.988 0.902
4732-model19.10 -28.295 0.968 0.999 0.996 0.989 0.889

# cluster 10 - Size: 6
4732-model110 -28.5053 0.967 0.999 0.996 0.986 0.886
4732-model110.1 -28.423 0.964 0.999 0.995 0.986 0.876
4732-model110.2 -28.397 0.964 0.999 0.995 0.987 0.876
4732-model110.3 -28.3579 0.966 0.999 0.996 0.988 0.881
4732-model110.4 -28.2992 0.953 0.999 0.994 0.984 0.835
4732-model110.5 -28.2588 0.968 0.999 0.996 0.987 0.891

# cluster 11 - Size: 3
4732-model111 -28.47 0.966 0.999 0.996 0.987 0.883
4732-model111.1 -28.4088 0.963 0.999 0.996 0.987 0.871
4732-model111.2 -28.3484 0.965 0.999 0.996 0.987 0.877

# cluster 12 - Size: 4
4732-model112 -28.4242 0.939 0.981 0.978 0.938 0.859
4732-model112.1 -28.4198 0.939 0.981 0.978 0.936 0.861
4732-model112.2 -28.3688 0.939 0.983 0.979 0.940 0.853
4732-model112.3 -28.3535 0.936 0.983 0.979 0.939 0.842

# cluster 13 - Size: 1
4732-model113 -28.3675 0.954 0.999 0.995 0.982 0.840

```

Péptido 4738

Download archive of all models [here](#)

```
#
# file soPEP avg gdt max q tm
# cluster 1 - Size: 94
4738-model1 -30.0396 0.963 0.992 0.987 0.976 0.895
4738-model1.1 -30.0203 0.960 0.992 0.987 0.974 0.888
4738-model1.2 -29.9743 0.959 0.992 0.987 0.972 0.884
4738-model1.3 -29.9659 0.956 0.992 0.987 0.976 0.869
4738-model1.4 -29.9535 0.953 0.992 0.987 0.972 0.862
4738-model1.5 -29.9432 0.960 0.992 0.987 0.976 0.883
4738-model1.6 -29.905 0.963 0.992 0.987 0.977 0.897
4738-model1.7 -29.8969 0.959 0.992 0.987 0.975 0.882
4738-model1.8 -29.8668 0.960 0.992 0.987 0.975 0.887
4738-model1.9 -29.8668 0.960 0.992 0.987 0.975 0.886
4738-model1.10 -29.8648 0.960 0.992 0.987 0.975 0.887
4738-model1.11 -29.8565 0.958 0.992 0.987 0.974 0.877
4738-model1.12 -29.8482 0.956 0.992 0.987 0.972 0.874
4738-model1.13 -29.8336 0.962 0.992 0.987 0.976 0.891
4738-model1.14 -29.8221 0.959 0.992 0.986 0.974 0.882
4738-model1.15 -29.8137 0.966 0.992 0.988 0.977 0.905
4738-model1.16 -29.8136 0.921 0.976 0.969 0.923 0.816
4738-model1.17 -29.8072 0.957 0.992 0.987 0.972 0.879
4738-model1.18 -29.8072 0.957 0.992 0.986 0.972 0.876
4738-model1.19 -29.8065 0.954 0.992 0.986 0.972 0.866
4738-model1.20 -29.8061 0.965 0.992 0.988 0.976 0.902
4738-model1.21 -29.7973 0.960 0.992 0.987 0.975 0.887
4738-model1.22 -29.797 0.959 0.992 0.987 0.974 0.884
4738-model1.23 -29.7819 0.959 0.992 0.987 0.974 0.882
4738-model1.24 -29.7784 0.961 0.992 0.987 0.975 0.891
4738-model1.25 -29.7759 0.958 0.992 0.987 0.976 0.877
4738-model1.26 -29.7755 0.957 0.992 0.987 0.975 0.875
4738-model1.27 -29.7702 0.962 0.992 0.987 0.973 0.895
4738-model1.28 -29.7701 0.958 0.992 0.987 0.976 0.875
4738-model1.29 -29.7683 0.949 0.992 0.986 0.970 0.847
4738-model1.30 -29.7672 0.946 0.992 0.985 0.973 0.832
4738-model1.31 -29.7664 0.958 0.992 0.987 0.974 0.877
4738-model1.32 -29.7617 0.955 0.992 0.987 0.972 0.868
4738-model1.33 -29.7565 0.960 0.992 0.987 0.974 0.888
4738-model1.34 -29.7534 0.957 0.992 0.987 0.973 0.877
4738-model1.35 -29.7534 0.952 0.992 0.986 0.971 0.859
4738-model1.36 -29.746 0.965 0.992 0.987 0.977 0.902
4738-model1.37 -29.7438 0.954 0.992 0.986 0.974 0.863
```

```
4738-model1.38 -29.7419 0.955 0.992 0.986 0.973 0.867
4738-model1.39 -29.7395 0.964 0.992 0.988 0.976 0.899
4738-model1.40 -29.7395 0.961 0.992 0.987 0.976 0.889
4738-model1.41 -29.7366 0.960 0.992 0.987 0.974 0.887
4738-model1.42 -29.732 0.959 0.992 0.987 0.974 0.881
4738-model1.43 -29.7301 0.960 0.992 0.987 0.976 0.883
4738-model1.44 -29.7276 0.949 0.992 0.985 0.969 0.850
4738-model1.45 -29.7244 0.959 0.992 0.987 0.974 0.883
4738-model1.46 -29.7234 0.953 0.991 0.986 0.974 0.860
4738-model1.47 -29.7209 0.959 0.991 0.987 0.972 0.884
4738-model1.48 -29.7184 0.941 0.992 0.985 0.968 0.821
4738-model1.49 -29.7177 0.959 0.992 0.987 0.975 0.883
4738-model1.50 -29.7165 0.951 0.992 0.986 0.973 0.855
4738-model1.51 -29.7161 0.957 0.992 0.986 0.973 0.876
4738-model1.52 -29.7044 0.940 0.989 0.981 0.962 0.828
4738-model1.53 -29.7012 0.959 0.992 0.987 0.975 0.883
4738-model1.54 -29.6985 0.961 0.992 0.987 0.975 0.890
4738-model1.55 -29.6968 0.957 0.992 0.987 0.973 0.877
4738-model1.56 -29.6922 0.956 0.992 0.986 0.972 0.874
4738-model1.57 -29.6919 0.959 0.992 0.987 0.974 0.883
4738-model1.58 -29.688 0.959 0.992 0.987 0.974 0.885
4738-model1.59 -29.6851 0.948 0.992 0.985 0.971 0.844
4738-model1.60 -29.6737 0.962 0.992 0.987 0.976 0.893
4738-model1.61 -29.6719 0.944 0.992 0.984 0.969 0.830
4738-model1.62 -29.6715 0.954 0.992 0.986 0.974 0.862
4738-model1.63 -29.6705 0.959 0.992 0.987 0.974 0.884
4738-model1.64 -29.663 0.959 0.992 0.987 0.974 0.884
4738-model1.65 -29.6629 0.959 0.992 0.987 0.974 0.885
4738-model1.66 -29.6546 0.943 0.991 0.985 0.972 0.825
4738-model1.67 -29.6529 0.950 0.992 0.986 0.972 0.852
4738-model1.68 -29.6522 0.963 0.992 0.987 0.977 0.897
4738-model1.69 -29.6501 0.960 0.992 0.987 0.977 0.884
4738-model1.70 -29.6489 0.954 0.992 0.987 0.973 0.863
4738-model1.71 -29.6439 0.962 0.992 0.987 0.977 0.892
4738-model1.72 -29.6439 0.942 0.992 0.985 0.973 0.818
4738-model1.73 -29.6428 0.963 0.992 0.987 0.976 0.895
4738-model1.74 -29.6375 0.950 0.992 0.986 0.969 0.853
4738-model1.75 -29.6369 0.957 0.992 0.987 0.974 0.874
4738-model1.76 -29.634 0.960 0.992 0.987 0.977 0.886
4738-model1.77 -29.6336 0.951 0.992 0.986 0.972 0.856
4738-model1.78 -29.6228 0.937 0.992 0.984 0.968 0.802
4738-model1.79 -29.6225 0.962 0.992 0.987 0.977 0.893
```

```

4738-model1.80 -29.6213 0.957 0.992 0.987 0.974 0.875
4738-model1.81 -29.6028 0.958 0.992 0.987 0.974 0.879
4738-model1.82 -29.5877 0.949 0.992 0.986 0.967 0.851
4738-model1.83 -29.5873 0.956 0.992 0.987 0.973 0.874
4738-model1.84 -29.5832 0.953 0.992 0.986 0.971 0.862
4738-model1.85 -29.5825 0.959 0.992 0.987 0.974 0.884
4738-model1.86 -29.5767 0.957 0.992 0.987 0.974 0.877
4738-model1.87 -29.5727 0.960 0.992 0.987 0.975 0.885
4738-model1.88 -29.5542 0.953 0.992 0.986 0.971 0.863
4738-model1.89 -29.5535 0.956 0.992 0.987 0.972 0.872
4738-model1.90 -29.5521 0.914 0.973 0.966 0.918 0.799
4738-model1.91 -29.5487 0.946 0.992 0.985 0.970 0.837
4738-model1.92 -29.5032 0.961 0.992 0.987 0.975 0.888
4738-model1.93 -29.1289 0.948 0.992 0.985 0.974 0.840
# cluster 2 - Size: 4
4738-model12 -26.7266 0.794 0.867 0.844 0.743 0.723
4738-model12.1 -26.4475 0.818 0.886 0.864 0.789 0.731
4738-model12.2 -26.2302 0.809 0.886 0.864 0.786 0.701
4738-model12.3 -26.0499 0.822 0.897 0.865 0.796 0.729
# cluster 3 - Size: 2
4738-model13 -24.2104 0.771 0.867 0.798 0.732 0.688
4738-model13.1 -23.8843 0.775 0.866 0.798 0.744 0.692

```

Péptido 4743

Download archive of all models [here](#)

```

# file soPEP avg gdt max q tm
# cluster 1 - Size: 93
4743-model1 -29.4719 0.954 0.991 0.985 0.969 0.869
4743-model1.1 -29.437 0.961 0.992 0.986 0.973 0.892
4743-model1.2 -29.4285 0.947 0.991 0.984 0.970 0.840
4743-model1.3 -29.2879 0.957 0.992 0.986 0.973 0.879
4743-model1.4 -29.2843 0.955 0.992 0.986 0.971 0.870
4743-model1.5 -29.2799 0.964 0.992 0.987 0.975 0.902
4743-model1.6 -29.2754 0.955 0.992 0.986 0.970 0.872
4743-model1.7 -29.2723 0.958 0.992 0.986 0.974 0.882
4743-model1.8 -29.2688 0.964 0.992 0.987 0.975 0.902
4743-model1.9 -29.2566 0.959 0.992 0.986 0.973 0.883
4743-model1.10 -29.2549 0.961 0.992 0.987 0.974 0.893
4743-model1.11 -29.2493 0.962 0.992 0.986 0.975 0.895
4743-model1.12 -29.2358 0.960 0.992 0.986 0.972 0.892
4743-model1.13 -29.2341 0.963 0.992 0.987 0.976 0.896
4743-model1.14 -29.2185 0.963 0.992 0.987 0.975 0.899
4743-model1.15 -29.2147 0.963 0.992 0.987 0.975 0.898
4743-model1.16 -29.2109 0.961 0.992 0.986 0.973 0.893
4743-model1.17 -29.205 0.953 0.991 0.985 0.971 0.867
4743-model1.18 -29.2009 0.951 0.992 0.986 0.970 0.857
4743-model1.19 -29.2005 0.958 0.992 0.986 0.974 0.879

```

[4743-model1.20](#) -29.1996 0.945 0.992 0.985 0.970 0.832
[4743-model1.21](#) -29.193 0.960 0.992 0.986 0.974 0.888
[4743-model1.22](#) -29.1913 0.963 0.992 0.986 0.974 0.900
[4743-model1.23](#) -29.1849 0.959 0.992 0.986 0.972 0.886
[4743-model1.24](#) -29.1836 0.961 0.992 0.987 0.976 0.891
[4743-model1.25](#) -29.1825 0.958 0.992 0.986 0.972 0.882
[4743-model1.26](#) -29.1791 0.959 0.992 0.986 0.973 0.884
[4743-model1.27](#) -29.1721 0.962 0.992 0.987 0.974 0.895
[4743-model1.28](#) -29.1707 0.946 0.992 0.984 0.969 0.841
[4743-model1.29](#) -29.1703 0.951 0.992 0.986 0.974 0.854
[4743-model1.30](#) -29.1617 0.952 0.992 0.986 0.972 0.860
[4743-model1.31](#) -29.1547 0.962 0.992 0.986 0.975 0.894
[4743-model1.32](#) -29.1499 0.960 0.992 0.986 0.974 0.889
[4743-model1.33](#) -29.1487 0.957 0.992 0.986 0.972 0.879
[4743-model1.34](#) -29.1473 0.947 0.991 0.984 0.968 0.843
[4743-model1.35](#) -29.1426 0.954 0.992 0.985 0.971 0.869
[4743-model1.36](#) -29.1334 0.954 0.992 0.986 0.974 0.866
[4743-model1.37](#) -29.1303 0.954 0.991 0.985 0.970 0.870
[4743-model1.38](#) -29.1275 0.962 0.992 0.987 0.974 0.895
[4743-model1.39](#) -29.1232 0.959 0.992 0.986 0.972 0.887
[4743-model1.40](#) -29.1224 0.955 0.992 0.986 0.972 0.872
[4743-model1.41](#) -29.1215 0.950 0.992 0.985 0.973 0.850
[4743-model1.42](#) -29.1163 0.959 0.992 0.986 0.973 0.885
[4743-model1.43](#) -29.1162 0.962 0.992 0.987 0.973 0.896
[4743-model1.44](#) -29.1132 0.955 0.992 0.986 0.973 0.870
[4743-model1.45](#) -29.1119 0.952 0.992 0.985 0.972 0.859
[4743-model1.46](#) -29.1054 0.965 0.992 0.987 0.977 0.904
[4743-model1.47](#) -29.1049 0.948 0.991 0.984 0.968 0.849
[4743-model1.48](#) -29.1031 0.958 0.991 0.985 0.970 0.888
[4743-model1.49](#) -29.1027 0.944 0.991 0.984 0.968 0.833
[4743-model1.50](#) -29.1016 0.951 0.992 0.985 0.972 0.855
[4743-model1.51](#) -29.0978 0.953 0.992 0.986 0.972 0.862
[4743-model1.52](#) -29.0946 0.958 0.992 0.987 0.973 0.880
[4743-model1.53](#) -29.0913 0.956 0.992 0.986 0.971 0.877
[4743-model1.54](#) -29.0862 0.943 0.991 0.983 0.968 0.829
[4743-model1.55](#) -29.0838 0.957 0.992 0.986 0.973 0.877
[4743-model1.56](#) -29.08 0.954 0.991 0.985 0.969 0.870
[4743-model1.57](#) -29.0792 0.961 0.992 0.987 0.974 0.893
[4743-model1.58](#) -29.0788 0.957 0.992 0.986 0.974 0.877
[4743-model1.59](#) -29.0772 0.956 0.992 0.986 0.972 0.874
[4743-model1.60](#) -29.077 0.946 0.991 0.984 0.970 0.840
[4743-model1.61](#) -29.077 0.946 0.991 0.984 0.970 0.838
[4743-model1.62](#) -29.0729 0.941 0.991 0.983 0.967 0.823
[4743-model1.63](#) -29.0712 0.963 0.992 0.987 0.974 0.899
[4743-model1.64](#) -29.07 0.954 0.992 0.986 0.968 0.869
[4743-model1.65](#) -29.0609 0.963 0.992 0.986 0.974 0.899
[4743-model1.66](#) -29.0474 0.960 0.992 0.986 0.974 0.888
[4743-model1.67](#) -29.0467 0.956 0.991 0.985 0.971 0.877

```

4743-model1.68 -29.0409 0.961 0.992 0.987 0.974 0.890
4743-model1.69 -29.0381 0.947 0.991 0.985 0.971 0.844
4743-model1.70 -29.0305 0.957 0.992 0.986 0.972 0.876
4743-model1.71 -29.0267 0.958 0.991 0.986 0.972 0.885
4743-model1.72 -29.0263 0.962 0.992 0.986 0.974 0.897
4743-model1.73 -29.0254 0.950 0.990 0.985 0.971 0.855
4743-model1.74 -29.0253 0.962 0.992 0.987 0.976 0.893
4743-model1.75 -29.0239 0.962 0.992 0.987 0.976 0.893
4743-model1.76 -29.0219 0.953 0.992 0.986 0.970 0.863
4743-model1.77 -29.0218 0.952 0.992 0.986 0.974 0.857
4743-model1.78 -29.021 0.960 0.992 0.987 0.976 0.886
4743-model1.79 -29.0198 0.952 0.991 0.985 0.970 0.863
4743-model1.80 -29.0109 0.931 0.987 0.980 0.953 0.805
4743-model1.81 -29.0073 0.942 0.991 0.984 0.968 0.826
4743-model1.82 -29.0067 0.958 0.992 0.986 0.970 0.882
4743-model1.83 -29.0039 0.956 0.991 0.985 0.972 0.873
4743-model1.84 -28.9999 0.943 0.991 0.983 0.966 0.830
4743-model1.85 -28.9949 0.951 0.992 0.985 0.971 0.856
4743-model1.86 -28.9826 0.943 0.992 0.985 0.970 0.826
4743-model1.87 -28.9727 0.962 0.992 0.987 0.976 0.893
4743-model1.88 -28.949 0.963 0.992 0.987 0.974 0.898
4743-model1.89 -28.9475 0.959 0.992 0.986 0.973 0.886
4743-model1.90 -28.9339 0.946 0.992 0.985 0.973 0.835
4743-model1.91 -28.9201 0.952 0.992 0.986 0.973 0.857
4743-model1.92 -28.92 0.952 0.992 0.986 0.972 0.858

# cluster 2 - Size: 5
4743-model12 -26.1803 0.827 0.889 0.868 0.794 0.757
4743-model12.1 -25.9455 0.823 0.886 0.867 0.790 0.748
4743-model12.2 -25.9164 0.822 0.889 0.867 0.792 0.739
4743-model12.3 -25.7326 0.835 0.889 0.869 0.802 0.779
4743-model12.4 -24.9171 0.810 0.882 0.864 0.781 0.712

# cluster 3 - Size: 1
4743-model13 -25.3885 0.831 0.904 0.865 0.810 0.745

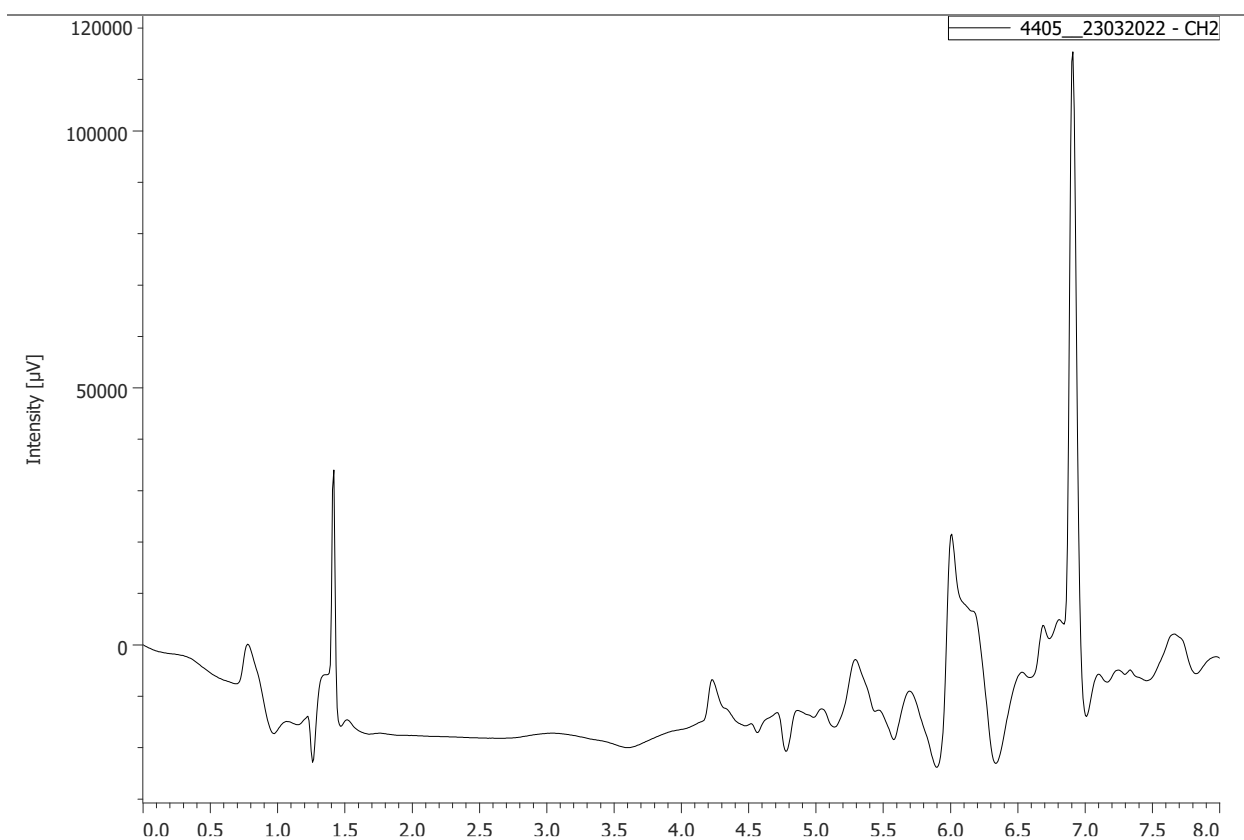
# cluster 4 - Size: 1
4743-model14 -23.1444 0.767 0.865 0.795 0.723 0.685

```

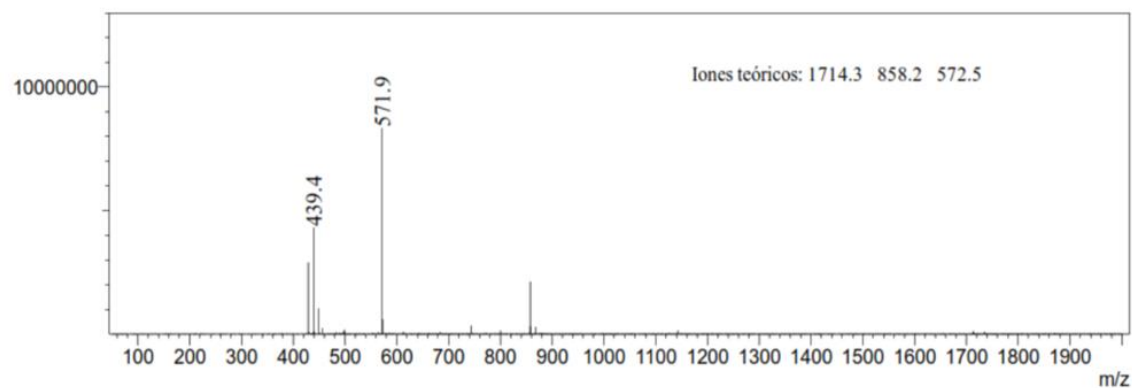
Apéndice C. Cromatogramas de HPLC y espectros de masas de los péptidos estudiados.

Estos resultados fueron reportados por (Pereira et al., 2025).

Péptido:	4405
Peso molecular:	1714.39

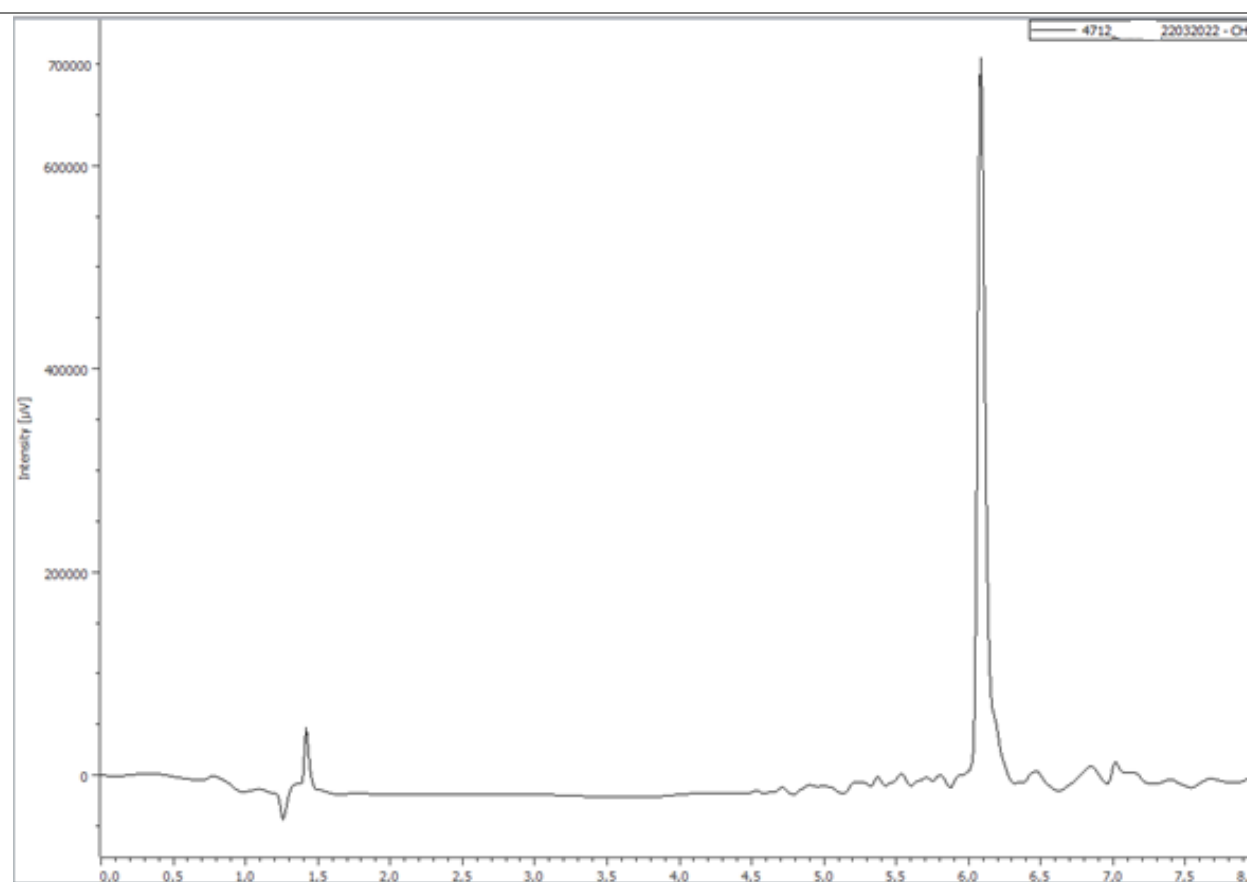


Peak#:1 R.Time:6.031(Scan#:) MassPeaks:1272 BasePeak:571.9(8340305)
 Spectrum Mode:Averaged 6.017-6.050(362-364)
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

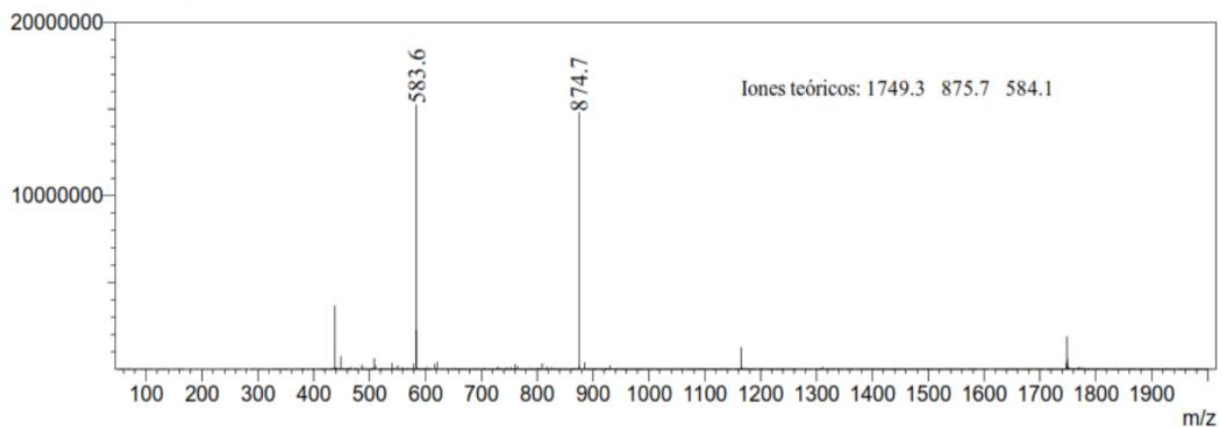


Péptido: 4712

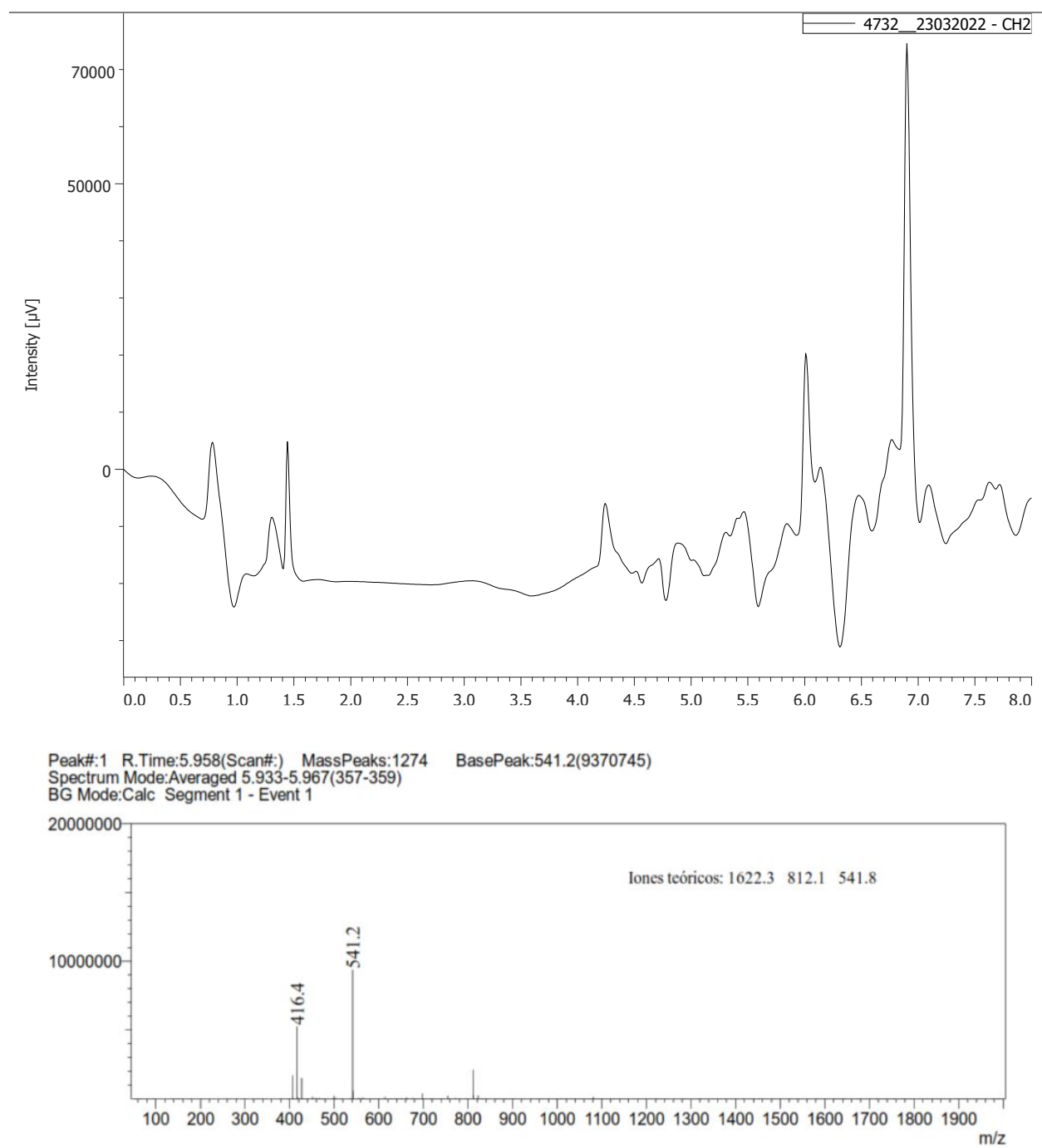
Peso molecular: 1749.34



Peak#:1 R.Time:5.355(Scan#:) MassPeaks:1559 BasePeak:583.6(15257251)
Spectrum Mode:Averaged 5.333-5.367(321-323)
BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

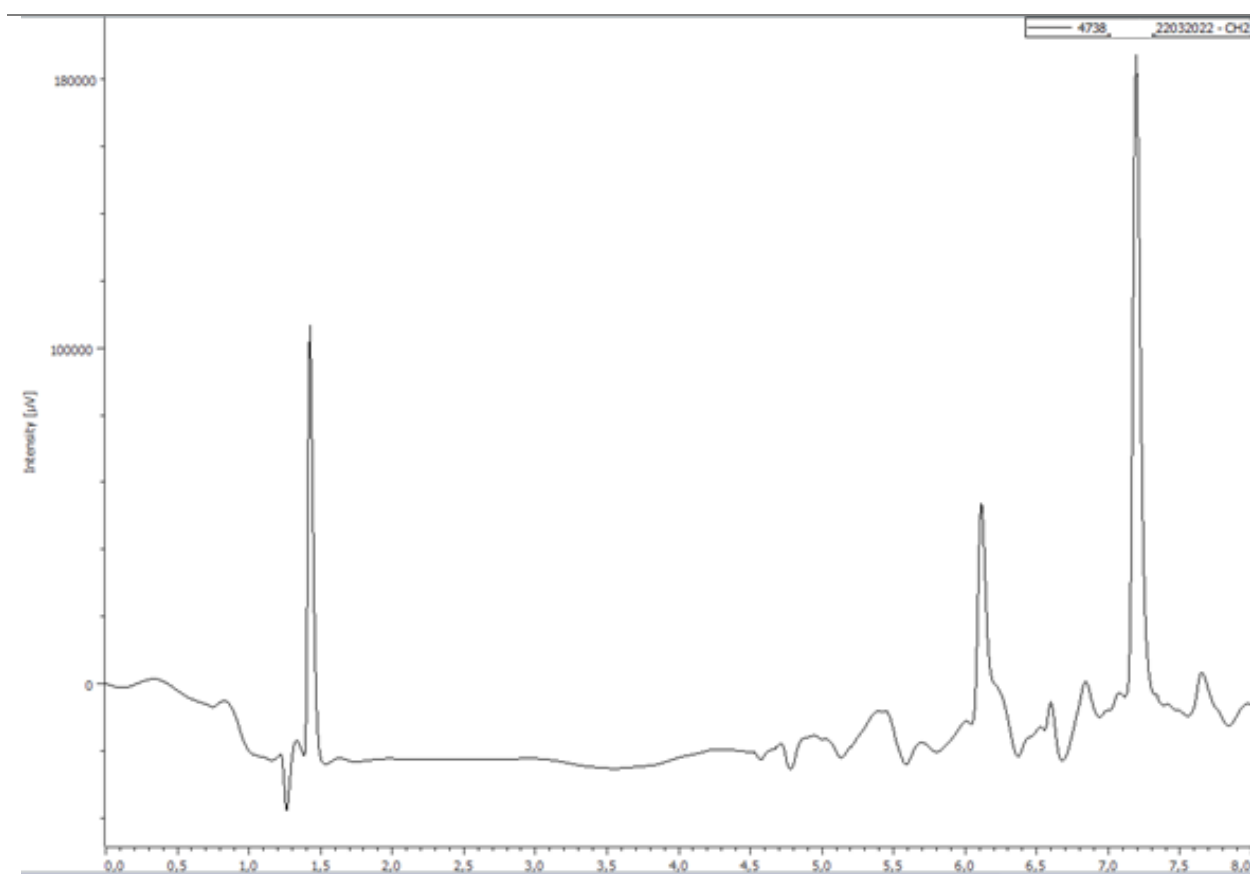


Péptido:	4732
Peso molecular:	1622.19

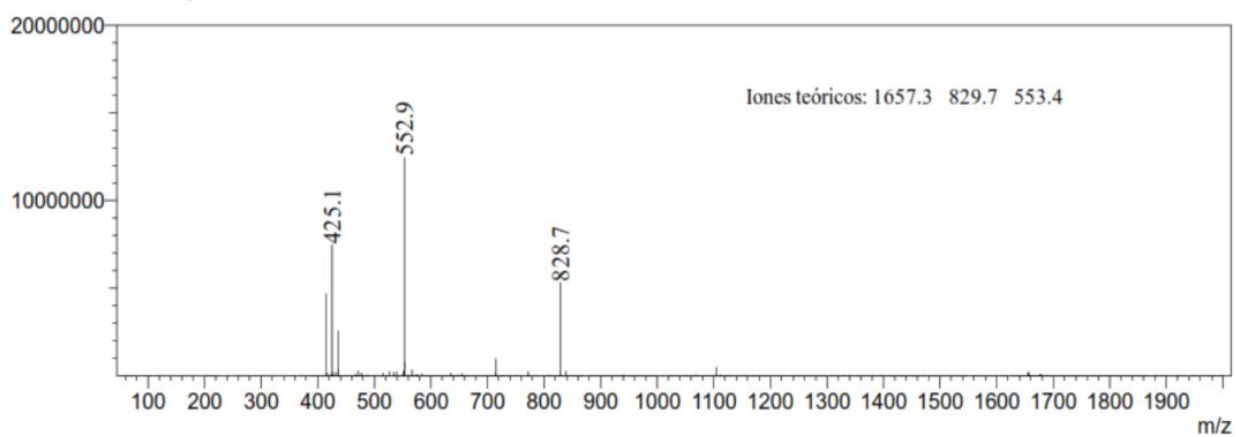


Péptido: 4738

Peso molecular: 1657.33

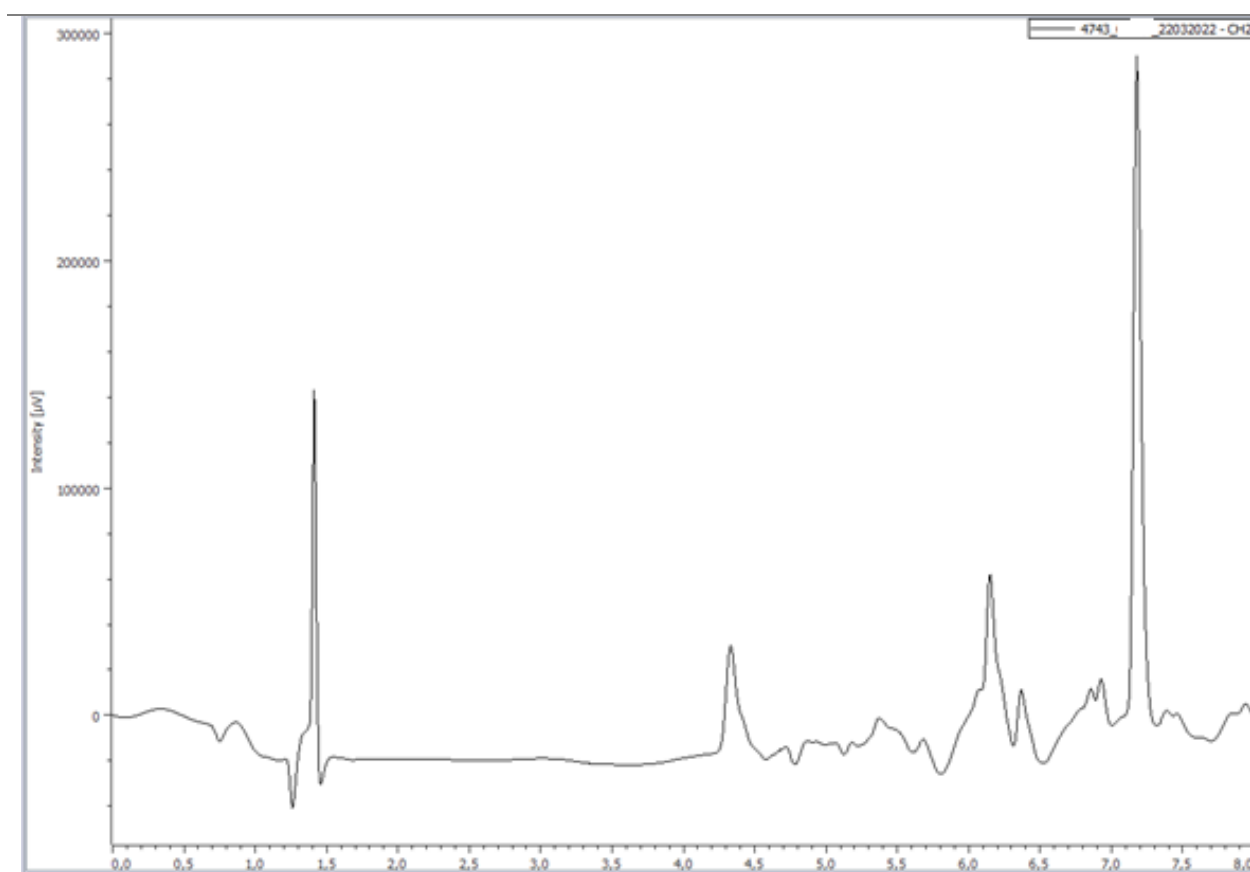


Peak#:1 R.Time:6.099(Scan#:) MassPeaks:1379 BasePeak:552.9(12473348)
Spectrum Mode:Averaged 6.083-6.117(366-368)
BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

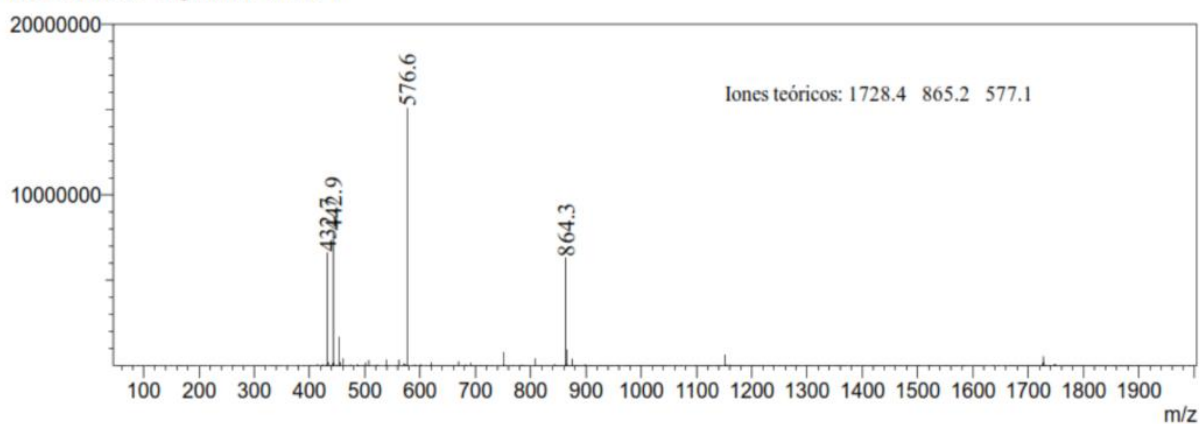


Péptido: 4743

Peso molecular: 1728.41



Peak#:1 R.Time:6.181(Scan#:) MassPeaks:1294 BasePeak:576.6(15105672)
Spectrum Mode:Averaged 6.167-6.200(371-373)
BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1



Apéndice D. Resultados obtenidos del servidor HeliQuest.

Péptido 4405



Helix type: alpha
Full sequence:
ILYVVQLIQALKKKG
Sequence length: 15 a.a.
Analysis window: 15 a.a.

¹ILYVVQLIQALKKKG₁₅

Physico-chemical properties

Hydrophobicity <H>

0.600

Hydrophobic moment <μH>

0.332

Net charge *z*

3

Polar residues + GLY

Polar residues + GLY (n / %)

6 / 40.00

Uncharged residues + GLY

GLN 2, GLY 1

Charged residues

LYS 3,

Hydrophobic face : none

[Manual mutation](#)

Nonpolar residues

Nonpolar residues (n / %)

9 / 60.00

Aromatic residues

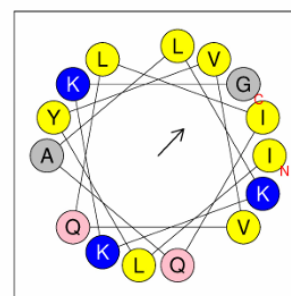
TYR 1,

Special residues

CYS 0, PRO 0

[GA mutation](#)

Click to enlarge



Péptido 4732



Helix type: alpha
Full sequence:
ILAVVQLIQALKKKG
Sequence length: 15 a.a.
Analysis window: 15 a.a.

¹ILAVVQLIQALKKKG₁₅

Physico-chemical properties

Hydrophobicity <H>

0.557

Hydrophobic moment <μH>

0.351

Net charge *z*

3

Polar residues + GLY

Polar residues + GLY (n / %)

6 / 40.00

Uncharged residues + GLY

GLN 2, GLY 1

Charged residues

LYS 3,

Hydrophobic face : none

[Manual mutation](#)

Nonpolar residues

Nonpolar residues (n / %)

9 / 60.00

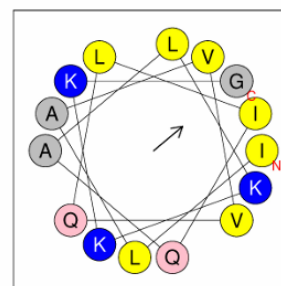
Aromatic residues

Special residues

CYS 0, PRO 0

[GA mutation](#)

Click to enlarge



Péptido 4738



Helix type: alpha
 Full sequence:
 ILYVVQLIAALKKKG
 Sequence length: 15 a.a.
 Analysis window: 15 a.a.

¹ILYVVQLIAALKKKG₁₅

Physico-chemical properties

Hydrophobicity <H>

0.635

Hydrophobic moment <μH>

0.312

Net charge *z*

3

Polar residues + GLY

Polar residues + GLY (n / %)

5 / 33.33

Uncharged residues + GLY

GLN 1, GLY 1

Charged residues

LYS 3,

Hydrophobic face : none

[Manual mutation](#)

Nonpolar residues

Nonpolar residues (n / %)

10 / 66.67

Aromatic residues

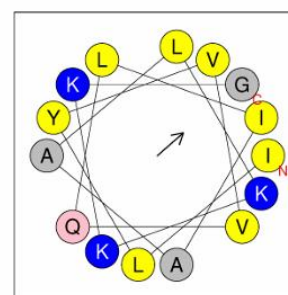
TYR 1,

Special residues

CYS 0, PRO 0

[GA mutation](#)

Click to enlarge



Péptido 4743



Helix type: alpha
 Full sequence:
 ILYVVQLIQALKKKA
 Sequence length: 15 a.a.
 Analysis window: 15 a.a.

¹ILYVVQLIQALKKKA₁₅

Physico-chemical properties

Hydrophobicity <H>

0.621

Hydrophobic moment <μH>

0.352

Net charge *z*

3

Polar residues + GLY

Polar residues + GLY (n / %)

5 / 33.33

Uncharged residues + GLY

GLN 2, GLY 0

Charged residues

LYS 3,

Hydrophobic face : none

[Manual mutation](#)

Nonpolar residues

Nonpolar residues (n / %)

10 / 66.67

Aromatic residues

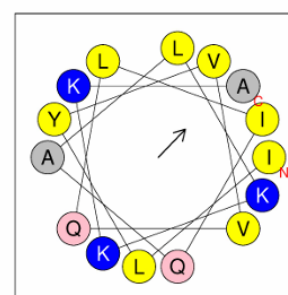
TYR 1,

Special residues

CYS 0, PRO 0

[GA mutation](#)

Click to enlarge

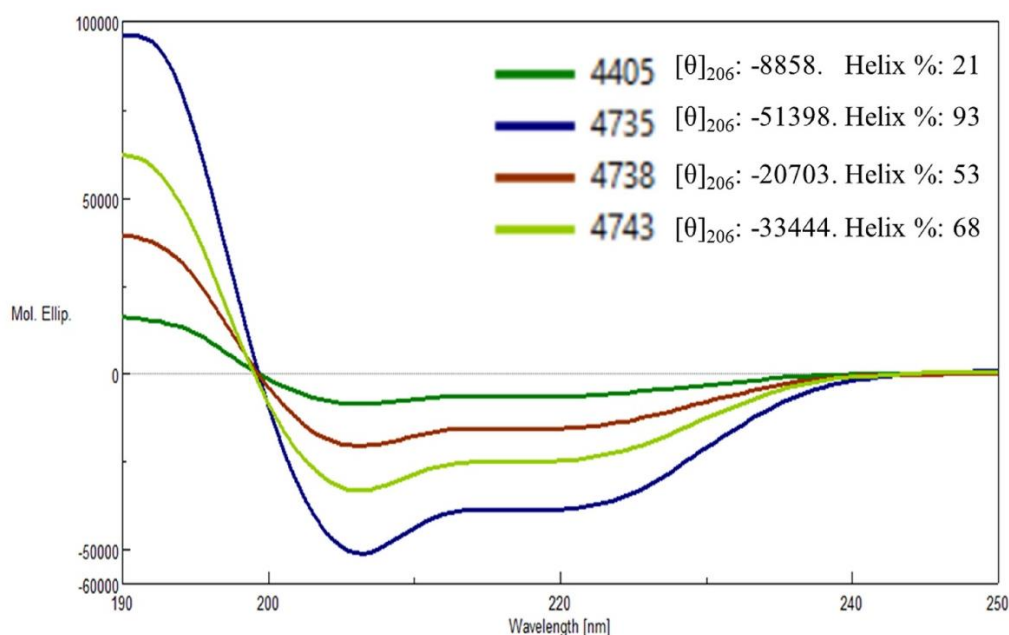


Apéndice E. Espectros de dicroísmo circular de péptidos derivados de hemocianina.

En la figura A1 se presenta los espectros de dicroísmo circular reportados por (Pereira et al., 2025) para péptidos derivados de la hemocianina de *Achatina fulica*. Estos resultados experimentales fueron tomados como referencia para respaldar las predicciones estructurales realizadas *in silico* de los péptidos 4405, 4738 y 4743.

Figura A1.

Espectros de dicroísmo circular.



Nota. Los espectros de CD se determinaron en presencia de 30 % (v/v) TFE en H₂O. El porcentaje de hélice se determina mediante el software CDpro utilizando el algoritmo Contin y la base de datos SP37A. Adaptado de (Pereira et al., 2025).

Apéndice F. Lecturas de absorbancia durante ensayos de crecimiento de *P. aeruginosa* en presencia de los péptidos antimicrobianos.

A continuación, se presentan los datos obtenidos en cada medición turbidimétrica durante los ensayos de crecimiento de *P. aeruginosa* en presencia de los péptidos antimicrobianos evaluados. Estos datos fueron empleados para calcular la cinética de crecimiento bacteriano y evaluar la actividad antibacteriana de cada péptido.

Figura B1.

Posición de los péptidos en la microplaca.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		4405	4405	4405	Blanco	Blanco	Blanco					
C		4712	4712	4712	Blanco	Blanco	Blanco	Control de crecimiento	Control de crecimiento	Control de crecimiento		
D		4732	4732	4732	Blanco	Blanco	Blanco	Control negativo	Control negativo	Control negativo		
E		4738	4738	4738	Blanco	Blanco	Blanco	Control negativo	Control negativo	Control negativo		
F		4743	4743	4743	Blanco	Blanco	Blanco					
G												
H												

Figura B2.

*Primera réplica biológica *P. aeruginosa* ATCC 27853.*

Hora 0												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0497	0,0505	0,0534	0,0517	0,0498	0,0502					
C		0,0528	0,0554	0,0517	0,0507	0,0548	0,0507	0,0500	0,0497	0,0506		
D		0,0560	0,0542	0,0524	0,0558	0,0540	0,0531	0,0491	0,0495	0,0525		
E		0,0500	0,0504	0,0512	0,0520	0,0525	0,0548	0,0508	0,0508	0,0506		
F		0,0507	0,0520	0,0605	0,0554	0,0522	0,0506					
G												
H												
Hora 1												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0515	0,0503	0,0533	0,0535	0,0495	0,0501					
C		0,0535	0,0535	0,0519	0,0506	0,0511	0,0501	0,0498	0,0494	0,0504		

D		0,0667	0,0570	0,0588	0,0561	0,0538	0,0553	0,0497	0,0495	0,0487		
E		0,0570	0,0540	0,0596	0,0574	0,0573	0,0575	0,0511	0,0508	0,0516		
F		0,0639	0,0549	0,0530	0,0528	0,0550	0,0500					
G												
H												
Hora 2												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0529	0,0510	0,0540	0,0541	0,0496	0,0503					
C		0,0545	0,0574	0,0531	0,0515	0,0510	0,0501	0,0504	0,0501	0,0513		
D		0,0681	0,0608	0,0636	0,0665	0,0625	0,0563	0,0502	0,0498	0,0487		
E		0,0597	0,0564	0,0615	0,0586	0,0579	0,0587	0,0508	0,0508	0,0517		
F		0,0753	0,0576	0,0554	0,0547	0,0565	0,0510					
G												
H												
Hora 3												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0542	0,0525	0,0554	0,0546	0,0495	0,0503					
C		0,0567	0,0578	0,0546	0,0522	0,0509	0,0504	0,0519	0,0516	0,0527		
D		0,0725	0,0654	0,0682	0,0639	0,0694	0,0583	0,0503	0,0495	0,0491		
E		0,0643	0,0598	0,0659	0,0590	0,0579	0,0599	0,0510	0,0507	0,0515		
F		0,0814	0,0648	0,0599	0,0549	0,0571	0,0533					
G												
H												
Hora 4												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0576	0,0568	0,0587	0,0560	0,0495	0,0504					
C		0,0612	0,0621	0,0594	0,0532	0,0511	0,0507	0,0546	0,0543	0,0559		
D		0,0804	0,0704	0,0750	0,0679	0,0631	0,0605	0,0494	0,0495	0,0488		
E		0,0727	0,0672	0,0737	0,0597	0,0580	0,0621	0,0509	0,0510	0,0513		
F		0,0928	0,0781	0,0681	0,0546	0,0586	0,0540					
G												
H												
Hora 5												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0677	0,0682	0,0685	0,0558	0,0492	0,0501					
C		0,0725	0,0703	0,0644	0,0523	0,0520	0,0506	0,0641	0,0611	0,0657		
D		0,1006	0,0799	0,0834	0,0682	0,0555	0,0616	0,0491	0,0492	0,0486		
E		0,0813	0,0791	0,0813	0,0601	0,0580	0,0605	0,0508	0,0510	0,0510		

[illegible]

H												
Hora 24												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,3079	0,3415	0,3371	0,0592	0,0499	0,0507					
C		0,3166	0,2824	0,3338	0,0573	0,0555	0,0541	0,3317	0,2984	0,3621		
D		0,3427	0,3764	0,2840	0,0897	0,0705	0,0852	0,0572	0,0504	0,3821		
E		0,3407	0,3855	0,3991	0,0700	0,0643	0,0646	0,0566	0,0517	0,0512		
F		0,3189	0,3667	0,3527	0,0638	0,0630	0,0536					
G												
H												

Figura B3.

Segunda réplica biológica P. aeruginosa ATCC 27853.

Hora 0												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0477	0,0509	0,0514	0,0477	0,0496	0,0499					
C		0,0539	0,0515	0,0529	0,0521	0,0526	0,0528	0,0501	0,0507	0,0484		
D		0,0565	0,0576	0,0572	0,0573	0,0554	0,0576	0,0486	0,0492	0,0490		
E		0,0591	0,0578	0,0618	0,0601	0,0605	0,0605	0,0505	0,0503	0,0510		
F		0,0509	0,0512	0,0508	0,0519	0,0496	0,0510					
G												
H												
Hora 1												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0488	0,0507	0,0510	0,0476	0,0491	0,0491					
C		0,0534	0,0534	0,0548	0,0527	0,0525	0,0532	0,0497	0,0499	0,0493		
D		0,0589	0,0613	0,0639	0,0670	0,0553	0,0561	0,0489	0,0490	0,0486		
E		0,0609	0,0779	0,0838	0,0807	0,0787	0,0599	0,0502	0,0498	0,0695		
F		0,0573	0,0535	0,0557	0,0530	0,0524	0,0508					
G												
H												
Hora 2												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0509	0,0528	0,0531	0,0477	0,0491	0,0492					
C		0,0556	0,0567	0,0576	0,0532	0,0539	0,0533	0,0512	0,0515	0,0517		

D		0,0656	0,0648	0,0693	0,0674	0,0548	0,0559	0,0491	0,0491	0,0485		
E		0,0679	0,0858	0,0935	0,0798	0,0804	0,0609	0,0498	0,0499	0,0714		
F		0,0656	0,0606	0,0570	0,0544	0,0560	0,0522					
G												
H												
Hora 3												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0563	0,0587	0,0588	0,0479	0,0491	0,0492					
C		0,0604	0,0625	0,0645	0,0541	0,0548	0,0534	0,0562	0,0563	0,0577		
D		0,0772	0,0764	0,0772	0,0740	0,0571	0,0567	0,0493	0,0498	0,0487		
E		0,0783	0,0947	0,1094	0,0796	0,0819	0,0609	0,0500	0,0500	0,0628		
F		0,0912	0,0727	0,0655	0,0544	0,0580	0,0524					
G												
H												
Hora 4												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0916	0,0952	0,0965	0,0483	0,0491	0,0493					
C		0,0750	0,0827	0,0916	0,0542	0,0548	0,0548	0,0772	0,0750	0,0922		
D		0,1002	0,1027	0,1076	0,0800	0,0570	0,0571	0,0495	0,0515	0,0489		
E		0,1031	0,1160	0,1121	0,0801	0,0827	0,0617	0,0501	0,0511	0,0586		
F		0,1030	0,0877	0,1032	0,0570	0,0587	0,0530					
G												
H												
Hora 5												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,1360	0,1504	0,1493	0,0487	0,0491	0,0490					
C		0,1445	0,1419	0,1176	0,0534	0,0548	0,0540	0,1533	0,1562	0,1408		
D		0,1490	0,1884	0,1829	0,0769	0,0555	0,0573	0,0492	0,0497	0,0488		
E		0,1588	0,1484	0,1391	0,0802	0,0830	0,0613	0,0500	0,0513	0,0546		
F		0,1524	0,1470	0,1695	0,0574	0,0616	0,0515					
G												
H												
Hora 6												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,1838	0,2012	0,2206	0,0479	0,0491	0,0490					
C		0,1990	0,1962	0,1622	0,0546	0,0547	0,0541	0,2334	0,2279	0,2003		
D		0,1949	0,2419	0,2322	0,0815	0,0559	0,0576	0,0496	0,0497	0,0488		
E		0,2083	0,1787	0,1725	0,0804	0,0834	0,0608	0,0502	0,0509	0,0537		

H												
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Figura B4.*Tercera réplica biológica P. aeruginosa ATCC 27853.*

Hora 0												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0520	0,0509	0,0504	0,0492	0,0482	0,0495					
C		0,0492	0,0497	0,0510	0,0491	0,0497	0,0498	0,0489	0,0493	0,0494		
D		0,0526	0,0524	0,0588	0,0532	0,0551	0,0541	0,0487	0,0488	0,0503		
E		0,0534	0,0536	0,0563	0,0534	0,0544	0,0545	0,0495	0,0499	0,0542		
F		0,0510	0,0510	0,0516	0,0552	0,0513	0,0500					
G												
H												
Hora 1												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0496	0,0505	0,0502	0,0482	0,0480	0,0495					
C		0,0502	0,0509	0,0510	0,0498	0,0499	0,0498	0,0491	0,0496	0,0496		
D		0,0522	0,0539	0,0542	0,0522	0,0521	0,0524	0,0484	0,0483	0,0488		
E		0,0528	0,0557	0,0552	0,0563	0,0551	0,0552	0,0498	0,0501	0,0502		
F		0,0517	0,0524	0,0527	0,0548	0,0505	0,0507					
G												
H												
Hora 2												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0509	0,0511	0,0513	0,0489	0,0484	0,0496					
C		0,0514	0,0529	0,0524	0,0506	0,0506	0,0507	0,0497	0,0502	0,0503		
D		0,0547	0,0565	0,0560	0,0573	0,0592	0,0535	0,0488	0,0489	0,0505		
E		0,0527	0,0579	0,0583	0,0558	0,0559	0,0543	0,0503	0,0500	0,0503		
F		0,0770	0,0539	0,0529	0,0522	0,0508	0,0506					
G												
H												
Hora 3												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0526	0,0527	0,0532	0,0483	0,0485	0,0500					
C		0,0536	0,0558	0,0544	0,0514	0,0514	0,0511	0,0509	0,0514	0,0516		

D		0,0544	0,0586	0,0563	0,0539	0,0520	0,0521	0,0487	0,0523	0,0493		
E		0,0553	0,0622	0,0646	0,0565	0,0560	0,0595	0,0505	0,0500	0,0505		
F		0,0544	0,0555	0,0550	0,0522	0,0507	0,0505					
G												
H												
Hora 4												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0550	0,0558	0,0559	0,0486	0,0485	0,0506					
C		0,0566	0,0589	0,0576	0,0527	0,0519	0,0517	0,0539	0,0547	0,0547		
D		0,0574	0,0622	0,0598	0,0533	0,0521	0,0521	0,0487	0,0490	0,0486		
E		0,0598	0,0686	0,0708	0,0566	0,0561	0,0598	0,0507	0,0510	0,0502		
F		0,0587	0,0613	0,0590	0,0522	0,0508	0,0505					
G												
H												
Hora 5												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0648	0,0642	0,0648	0,0480	0,0489	0,0507					
C		0,0644	0,0664	0,0664	0,0530	0,0526	0,0523	0,0604	0,0614	0,0614		
D		0,0644	0,0713	0,0676	0,0538	0,0523	0,0525	0,0487	0,0487	0,0489		
E		0,0704	0,0814	0,0855	0,0568	0,0566	0,0596	0,0500	0,0500	0,0500		
F		0,0684	0,0717	0,0676	0,0523	0,0508	0,0507					
G												
H												
Hora 6												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,0902	0,0817	0,0859	0,0479	0,0482	0,0506					
C		0,0820	0,0861	0,0861	0,0525	0,0529	0,0519	0,0774	0,0805	0,0802		
D		0,0798	0,0911	0,0902	0,0530	0,0520	0,0519	0,0485	0,0485	0,0483		
E		0,0860	0,0930	0,0981	0,0567	0,0560	0,0586	0,0497	0,0495	0,0495		
F		0,0860	0,0950	0,0842	0,0521	0,0506	0,0507					
G												
H												
Hora 7												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,1186	0,1058	0,1136	0,0480	0,0484	0,0498					
C		0,1055	0,1122	0,1142	0,0527	0,0531	0,0524	0,1013	0,1125	0,1075		
D		0,1053	0,1141	0,1218	0,0533	0,0523	0,0519	0,0488	0,0487	0,0658		
E		0,1122	0,1288	0,1454	0,0577	0,0570	0,0581	0,0500	0,0497	0,0503		

F		0,1165	0,1232	0,1102	0,0521	0,0506	0,0508					
G												
H												
Hora 8												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,1484	0,1332	0,1390	0,0481	0,0491	0,0497					
C		0,1479	0,1356	0,1693	0,0526	0,0540	0,0527	0,1294	0,1443	0,1395		
D		0,1372	0,1658	0,1576	0,0533	0,0523	0,0523	0,0491	0,0488	0,0548		
E		0,1458	0,1650	0,1774	0,0577	0,0573	0,0578	0,0501	0,0500	0,0503		
F		0,1434	0,1654	0,1376	0,0532	0,0507	0,0511					
G												
H												
Hora 20												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,2946	0,2371	0,2467	0,0477	0,0477	0,0485					
C		0,2710	0,2734	0,3383	0,0515	0,0536	0,0526	0,2165	0,2400	0,2265		
D		0,2644	0,3176	0,2685	0,0517	0,0532	0,0533	0,0483	0,0480	0,2147		
E		0,2532	0,3281	0,3423	0,0585	0,0585	0,0588	0,2088	0,0499	0,0497		
F		0,3334	0,3461	0,2761	0,0602	0,0508	0,0524					
G												
H												
Hora 24												
OD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,3126	0,2655	0,3032	0,0477	0,0480	0,0483					
C		0,3142	0,3115	0,3730	0,0525	0,0540	0,0529	0,2468	0,3003	0,2685		
D		0,2800	0,3287	0,2920	0,0515	0,0517	0,0524	0,0482	0,0483	0,2530		
E		0,2799	0,3479	0,3573	0,0581	0,0580	0,0566	0,2452	0,0494	0,0498		
F		0,3459	0,3601	0,2888	0,0571	0,0509	0,0518					
G												
H												

Apéndice G. Resultados del análisis del área bajo la curva de crecimiento (AUC) obtenidos del software GraphPad Prism v10.

Mediciones de absorbancias de 0h a 8h

AUC		A	B	C	D	E	F
		Control de crecimiento PA	4405 [40 µM]	4712 [50 µM]	4732 [50 µM]	4738 [50 µM]	4743 [50 µM]
1	Baseline	0	0	0	0	0	0
2							
3	Total Area	0.3443	0.3479	0.3004	0.3265	0.2840	0.3405
4	Std. Error	0.09583	0.08892	0.07410	0.08169	0.04653	0.07210
5	95% Confidence Interval	0.1564 to 0.5321	0.1736 to 0.5222	0.1552 to 0.4457	0.1664 to 0.4866	0.1928 to 0.3752	0.1992 to 0.4818
6							
7	Total Peak Area	0.3443	0.3479	0.3004	0.3265	0.2840	0.3405
8	Std. Error	0.09583	0.08892	0.07410	0.08169	0.04653	0.07210
9	95% Confidence Interval	0.1564 to 0.5321	0.1736 to 0.5222	0.1552 to 0.4457	0.1664 to 0.4866	0.1928 to 0.3752	0.1992 to 0.4818
10							
11	Number of Peaks	1	1	1	1	1	1
12							
13	Peak 1						
14	First X	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
15	Last X	8.000	8.000	8.000	8.000	8.000	8.000
16	Peak X	8.000	8.000	8.000	8.000	8.000	8.000
17	Peak Y	0.1668	0.1673	0.1471	0.1384	0.1221	0.1326
18	Area	0.3443	0.3479	0.3004	0.3265	0.2840	0.3405
19	Std. Error	0.09583	0.08892	0.07410	0.08169	0.04653	0.07210
20	95% Confidence Interval	0.1564 to 0.5321	0.1736 to 0.5222	0.1552 to 0.4457	0.1664 to 0.4866	0.1928 to 0.3752	0.1992 to 0.4818
21	%Area	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Mediciones de absorbancia de 0h a 24h

AUC		A	B	C	D	E	F
		Control de crecimiento PA	4405 [40 µM]	4712 [50 µM]	4732 [50 µM]	4738 [50 µM]	4743 [50 µM]
1	Baseline	0	0	0	0	0	0
2							
3	Total Area	3.784	4.013	3.911	3.780	3.764	3.808
4	Std. Error	0.6809	0.6633	0.5333	0.4135	0.3407	0.3911
5	95% Confidence Interval	2.450 to 5.119	2.713 to 5.313	2.866 to 4.957	2.969 to 4.590	3.096 to 4.432	3.041 to 4.575
6							
7	Total Peak Area	3.784	4.013	3.911	3.780	3.764	3.808
8	Std. Error	0.6809	0.6633	0.5333	0.4135	0.3407	0.3911
9	95% Confidence Interval	2.450 to 5.119	2.713 to 5.313	2.866 to 4.957	2.969 to 4.590	3.096 to 4.432	3.041 to 4.575
10							
11	Number of Peaks	1	1	1	1	1	1
12							
13	Peak 1						
14	First X	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
15	Last X	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00
16	Peak X	24.00	24.00	24.00	20.00	24.00	20.00
17	Peak Y	0.2447	0.2698	0.2826	0.2623	0.2807	0.2679
18	Area	3.784	4.013	3.911	3.780	3.764	3.808
19	Std. Error	0.6809	0.6633	0.5333	0.4135	0.3407	0.3911
20	95% Confidence Interval	2.450 to 5.119	2.713 to 5.313	2.866 to 4.957	2.969 to 4.590	3.096 to 4.432	3.041 to 4.575
21	%Area	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Apéndice H. Resultados de las predicciones de actividad antibacteriana de los péptidos frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 obtenidos de DBAASP.

DBAASP cuenta con tres herramientas principales para la predicción de péptidos antibacterianos:

1. Se emplea un algoritmo de predicción de PAM específico para cada cepa, descrito en (Vishnepolsky et al., 2022). El modelo clasifica los péptidos como activos cuando presentan una CIM < 25 µg/mL y como no activos cuando la CIM > 100 µg/mL. Cabe destacar que la herramienta acepta únicamente secuencias de hasta 30 aminoácidos de longitud.

DBAASP
Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides

Home Search Tools Statistics API About

PROPERTY CALCULATION LINEAR AMP PREDICTION SYNERGY PREDICTION

Prediction of general antimicrobial activity

Antibacterial peptide prediction

Strain-specific antibacterial prediction based on ML approaches and data on AMP sequences.

The tool is based on strain-specific AMP prediction algorithm described in Briefings in Bioinformatics, 23, bbac233; <https://doi.org/10.1093/bib/bbac233>. The species can be selected from the drop-down menu. Active peptides are defined as having MIC < 25 µg/ml and Non-Active peptides as having MIC > 100 µg/ml. The length of the peptide should not exceed 30 amino acids.

Species:

- Escherichia coli ATCC 25922
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853**
- Klebsiella pneumoniae
- Staphylococcus aureus ATCC 25923

ID	Strain Type	Class	Predictive value
4405	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Not Active	0.81
4712	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Not Active	0.62
4732	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Not Active	0.64
4738	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Not Active	0.74
4743	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Not Active	0.76

2. Se predice el potencial antibacteriano de péptidos lineales frente a especies específicas (Vishnepolsky et al., 2018). Clasifica como activos los péptidos con MIC < 25 µg/mL y como no activos los que presentan MIC > 100 µg/mL, aceptando secuencias de hasta 30 aminoácidos. El

modelo genera un valor predictivo positivo (PPV) o un valor predictivo negativo (NVP) según la clasificación obtenida.

Prediction of general antimicrobial activity

Antibacterial peptide prediction

Strain-specific antibacterial prediction based on ML approaches and data on AMP sequences.

Strain-specific antibacterial prediction based on "clusterization" approach and data on peptide sequences

This is a tool for predicting the antimicrobial potential of Linear AMPs against particular species described in J. Chem. Inf. Model. 2018, 58, 1141-1151. Active peptides are defined as having MIC<25 µg/ml and Non-Active peptides as having MIC>100 µg/ml. The species can be selected from the drop-down menu. The length of the peptide should not exceed 30 amino acids. The server produces one of the two predictive values: positive predictive value (PPV) for peptides predicted as active and negative predictive value (NPV) for peptides predicted as not active.

Species:

- Escherichia coli ATCC 25922
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853**
- Klebsiella pneumoniae
- Staphylococcus aureus ATCC 25923

ID	Strain Type	Class	Predictive value (Type)
4405	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Not Active	0.68 (NPV)
4712	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Active	0.73 (PPV)
4732	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Not Active	0.68 (NPV)
4738	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Not Active	0.68 (NPV)
4743	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Not Active	0.68 (NPV)

3. Se emplea un algoritmo basado en información genómica de cepas microbianas específicas y es descrito en (Vishnepolsky et al., 2022). Clasifica como activos los péptidos con MIC<25 µg/mL y como no activos aquellos con MIC>100 µg/mL. La herramienta admite únicamente secuencias de hasta 30 aminoácidos.

DBAASP
Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides

[Home](#)
[Search](#)
[Tools](#)
[Statistics](#)
[API](#)
[About](#)

[PROPERTY CALCULATION](#)
[LINEAR AMP PREDICTION](#)
[SYNERGY PREDICTION](#)

Prediction of general antimicrobial activity

Antibacterial peptide prediction

Strain-specific antibacterial prediction based on ML approaches and data on AMP sequences.

Strain-specific antibacterial prediction based on "clusterization" approach and data on peptide sequences

Strain-specific antibacterial prediction based on ML approaches and data on peptide sequences and bacterial genomes

The prediction algorithm of the tool uses information on the genomic sequences of specific microbial strains and described in Briefings in Bioinformatics, 23, bbac233; <https://doi.org/10.1093/bib/bbac23>. Active peptide exhibits MIC<25 µg/ml, and Non-Active peptide exhibits MIC>100 µg/ml. Active peptides are defined as having MIC<25 µg/ml and Non-Active peptides as having MIC>100 µg/ml. The genome of query microbial strain can be selected in several ways: from the drop-down menu, through GenBank ID or can be uploaded by the user. The length of the peptide should not exceed 30 amino acids.

Strains:

Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603

Salmonella typhimurium ATCC 14028

ID	Strain Type	Class	Predictive value
4405	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Not Active	1
4712	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Not Active	0.782
4732	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Not Active	0.997
4738	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Not Active	1
4743	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Not Active	1

Apéndice I. Resultados del análisis estadístico realizado en el software GraphPad Prism v10.

Mediciones de absorbancia de 0h a 8h

Normality and Lognormality Tests		A	B	C	D	E	F
Tabular results		Control de crecimiento PA	4405 [40 µM]	4712 [50 µM]	4732 [50 µM]	4738 [50 µM]	4743 [50 µM]
1	Test for normal distribution						
2	D'Agostino & Pearson test						
3	K2	2.844	3.098	3.455	1.800	2.073	1.650
4	P value	0.2413	0.2124	0.1777	0.4067	0.3547	0.4381
5	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
6	P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns
7							
8	Shapiro-Wilk test						
9	W	0.8076	0.8161	0.8155	0.8495	0.8537	0.8723
10	P value	0.0249	0.0311	0.0306	0.0736	0.0819	0.1301
11	Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	No	Yes	Yes	Yes
12	P value summary	*	*	*	ns	ns	ns
13							
14	Number of values	9	9	9	9	9	9

Kruskal-Wallis test		
ANOVA results		
1	Table Analyzed	Abs (0h - 8h)
2		
3	Kruskal-Wallis test	
4	P value	0.9982
5	Exact or approximate P value?	Approximate
6	P value summary	ns
7	Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
8	Number of groups	6
9	Kruskal-Wallis statistic	0.2673
10		
11	Data summary	
12	Number of treatments (columns)	6
13	Number of values (total)	54

Mediciones de absorbancia de 0h a 24h

Normality and Lognormality Tests		A	B	C	D	E	F
Tabular results		Control de crecimiento PA	4405 [40 µM]	4712 [50 µM]	4732 [50 µM]	4738 [50 µM]	4743 [50 µM]
1	Test for normal distribution						
2	D'Agostino & Pearson test						
3	K2	2.110	2.400	3.511	3.149	4.619	3.512
4	P value	0.3482	0.3013	0.1729	0.2071	0.0993	0.1727
5	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
6	P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns
7							
8	Shapiro-Wilk test						
9	W	0.8152	0.8088	0.7840	0.8004	0.7676	0.8023
10	P value	0.0149	0.0123	0.0058	0.0095	0.0035	0.0101
11	Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	No	No	No	No
12	P value summary	*	*	**	**	**	*
13							
14	Number of values	11	11	11	11	11	11

Kruskal-Wallis test		
ANOVA results		
1	Table Analyzed	Abs (0h - 24h)
2		
3	Kruskal-Wallis test	
4	P value	0.9998
5	Exact or approximate P value?	Approximate
6	P value summary	ns
7	Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
8	Number of groups	6
9	Kruskal-Wallis statistic	0.09806
10		
11	Data summary	
12	Number of treatments (columns)	6
13	Number of values (total)	66