

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL - UFMS

FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO
CENTRO-OESTE - PPGSD

SUELLEN RODRIGUES RAMALHO

**PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO SINTÉTICO DERIVADO DE INIBIDOR DE PEPTIDASE:
SÍNTESE, ANÁLISE ESTRUTURAL E ENSAIOS BIOLÓGICOS**

CAMPO GRANDE
2023

SUELLEN RODRIGUES RAMALHO

**PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO SINTÉTICO DERIVADO DE INIBIDOR DE PEPTIDASE:
SÍNTESE, ANÁLISE ESTRUTURAL E ENSAIOS BIOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: Tecnologia em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo
Coorientadora: Profa. Dra. Janaina de Cássia Sardi Orlandi

CAMPO GRANDE
2023

SUELLEN RODRIGUES RAMALHO

**PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO SINTÉTICO DERIVADO DE INIBIDOR DE PEPTIDASE:
SÍNTESE, ANÁLISE ESTRUTURAL E ENSAIOS BIOLÓGICOS****Banca examinadora:****Nota/conceito:**

Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo – FACFAN – UFMS

Dra. Danielle Bogo – FACFAN – UFMS

Dr. Valter Aragão do Nascimento – FAMED – UFMS

Dra. Elizabete Souza Cândido – UCDB

Dra. Kamila de Sousa Gomes – ISI BIOMASSA

Dra. Rita de Cássia Avellaneda Guimarães – FACFAN – UFMS

Dra. Luciana Miyagusku – FACFAN – UFMS

AVALIAÇÃO FINAL: (X) APROVADA

() REPROVADA



Ata de Defesa de Tese
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
Doutorado

Aos seis dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e três, às oito horas, na Videoconferência (à distância), da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Maria Ligia Rodrigues Macedo (UFMS), Danielle Bogo (UFMS), Elizabete Souza Cândido (UCDB), Kamila de Sousa Gomes (ISI) e Valter Aragao do Nascimento (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **SUELLEN RODRIGUES RAMALHO**, CPF 02528455100, Área de concentração em Tecnologia e Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título **"PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO SINTÉTICO DERIVADO DE INIBIDOR DE PEPTIDASE: SÍNTESE, ANÁLISE ESTRUTURAL E ENSAIOS BIOLÓGICOS"** e orientação de Maria Ligia Rodrigues Macedo. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AVALIAÇÃO
Dra. Maria Ligia Rodrigues Macedo (Interno)		APROVADA
Dra. Danielle Bogo (Interno)		Aprovada
Dra. Elizabete Souza Cândido (Externo)		APROVADA
Dra. Kamila de Sousa Gomes (Externo)		APROVADA
Dr. Luciana Miyagasku (Externo) (Suplente)		
Dra. Rita de Cassia Avellaneda Guimaraes (Interno) (Suplente)		
Dr. Valter Aragao do Nascimento (Interno)		Aprovada

RESULTADO FINAL:

Aprovação Aprovação com revisão Reprovação

OBSERVAÇÕES:

A aluna apresentou de forma coerente e coesa todo seu trabalho, e dentro do tempo previsto.
Cumprindo com todos os requisitos exigidos pelo programa, sendo assim aprovada.
Com conceito A.

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:
 Presidente da Banca Examinadora
 Aluna

Obrigada, meu Jesus Misericordioso,
por me dar muito mais do que eu preciso,
e por me abençoar muito mais do que eu mereço.

Dedico este trabalho à minha família, os quais devo meu amor incondicional. A minha mãe Gláucia Ethel, que na sua função de professora, foi a minha primeira grande inspiração de disciplina. A minha mãe me ensinou. Minha mãe docente desde os 18 anos, atuou na rede pública, federal e privada e foi a minha primeira professora. Ela é a responsável. E como todo bom mestre, era otimista a respeito do futuro do seu aluno e queria o melhor para ele. Foi ela que deixou claro para mim que a educação era o caminho. Sempre me incentivou - e, nos momentos de indisciplina, obrigou - a escutar, respeitar e aprender com meus professores. Esse foi provavelmente o ensinamento mais importante da minha vida. A confiança irrestrita na educação foi o que pavimentou minha trajetória, abrindo as portas para cada uma das minhas realizações. Sei também que o doutorado é um sonho dela, adiado tantas vezes pela necessidade do nosso cuidado. Sonho esse que se concretizou comigo. Fico feliz em poder te dar esse orgulho. Enfrentamos juntas dois meses de UTI por conta de uma diverticulite, e logo após uma pandemia. Confesso que por essas e outras situações quis desistir, essa é uma palavra desconhecida no seu vocabulário. E mesmo na dor ela sempre, sempre me deu forças para seguir no caminho para que honrasse os planos de DEUS. Dedico este trabalho também a minha irmã Gabriela, meu Pai Roberto, a minha avó Neuza e as minhas tias que sempre me guiaram no caminho da fé, obrigada pelo zelo e cuidado todos esses anos comigo. Amo vocês de todo meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, pelas bênçãos que sempre me concedem e pelas grandes oportunidades oferecidas ao longo de minha vida.

Aos meus queridos e amados pais Glaucia Ethel e Roberto Ramalho, ao meu pai, que mesmo com 33 anos, ainda me pergunta se tomei suco de laranja, se quero um dinheiro para lanche, por nunca medirem esforços para que eu pudesse estudar, mesmo com tão pouco, o pouco se tornou muito e pude chegar até aqui. Por sempre terem me dado suporte incondicional para que eu buscasse meus objetivos. A minha irmã, pelo apoio incondicional, compreensão e incentivo constantes. Obrigada por cuidarem tão bem de mim. Amo vocês.

Sou eternamente grata à Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo, pela oportunidade, orientação, compreensão e incentivo durante todos esses anos, por confiar na minha competência nesses 8 anos de laboratório e me dar toda a liberdade necessária para a execução deste estudo, por me acolher em seu laboratório e por tantas vezes me ensinar com suas palavras, que devemos acreditar, quando nem eu mais acreditava em mim. Quando eu mais precisei por questões de saúde, com a minha mãe, você sempre me acolheu, apoiou. Logo quando cheguei no LPPFB você me chamava de “Sorriso”, daquele dia em diante eu sabia que estava no lugar certo. Deus sempre nos guia para o melhor caminho, para aqueles que fazem o bem, a graça sempre acontece, e ele me guiou até aqui. Obrigada por tantas outras coisas que talvez você nem se lembre, mas tenho um coração muito agradecido por tudo. Além das conversas e ensinamentos relacionados não somente à ciência, mas também à vida. Muito obrigada!

A grande família do LPPFB (ou que já foram um dia) pelo convívio, amizade, ajuda e paciência e especialmente pelos cafés, risadas diárias, além das reuniões de troca de experiências e conhecimento. Aos meus amigos e companheiros do laboratório Luís Henrique, Claudiane, Camila pela convivência agradável, grande amizade, e auxílio durante os experimentos vocês são incríveis e moram no meu coração para sempre, como adoro dar risada com vocês, aprendi muito com vocês nesses anos, tanto na academia quanto na vida, muito obrigada pelo carinho e de poder compartilhar uma grande amizade. À Carol e César, já não estão aqui no laboratório, mas que são grandes parceiros e amigos, além dos meus primeiros ensinamentos no LPPFB. A Ana Cristina (Cris) com sua elegância e educação, me deu vários conselhos, desde o começo me disse que estávamos entre amigos, obrigada pelo seu apoio e carinho durante todos esses anos. Vocês tornaram tudo mais possível, fácil e divertido.

A todos os meus queridos amigos de vida, pelas infinitas conversas, discussões, experiências e reflexões por todo apoio e carinho nessa jornada árdua, talvez nada disso seria possível sem as nossas conversas, estudos, corridas, saidinhas regado a boas risadas e longas conversas.

A todos aqueles professores, pesquisadores e colaboradores, que puderam transmitir um pouco do seu conhecimento durante todo o período do doutorado. E a todos que contribuíram direta ou indiretamente durante essa caminhada. Aos professores membros da banca de qualificação, que aceitaram o convite e dedicaram-se a leitura desse trabalho.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste especialmente ao Ademir pela dedicação, eficiência e disponibilidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste (PPGSD) e a UFMS por ter a oportunidade de ter participado dessas renomadas instituições. Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES, FUNDECT e FINEP, por apoiarem e cederem recursos para a realização desta pesquisa no laboratório.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, que sempre foi minha casa e onde construí grande amizades.

A Deus por me permitir chegar até aqui.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Martin Luther King

RESUMO

A relação estabelecida entre os microrganismos causadores de doenças e a humanidade vem de longa data, sendo as bactérias um dos principais agentes causadores de doenças humanas, cujo controle pode ser feito por meio do uso de antibióticos. No entanto, com o passar do tempo houve o surgimento e o aumento da resistência bacteriana ao uso de tais medicamentos, fato este que tem se tornado uma preocupação crescente. Os relatos de infecções e óbitos por bactérias resistentes aos antimicrobianos existentes vêm crescendo diariamente no mundo e a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem alertado sobre a importância do desenvolvimento de novos fármacos efetivos contra as denominadas superbactérias resistentes. A descoberta de novos agentes a partir de plantas conduziu ao isolamento de muitas substâncias que ainda hoje são utilizadas clinicamente ou então serviram como protótipo para a síntese de novas moléculas bioativas. Neste cenário, a elaboração de novas estratégias para o combate à resistência microbiana tem recebido maior atenção, e os peptídeos antimicrobianos (PAMS) surgem como uma perspectiva promissora de trabalho. Neste estudo, o peptídeo obtido foi testado em diferentes modelos computacionais visando a predição de possíveis efeitos antibacterianos. O peptídeo sintético, denominado IKR18, foi bioinspirado na sequência de aminoácidos do inibidor de tripsina de *Inga laurina* (ILTI) através de simulações *in silico*. IKR18 mostrou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) para *S. aureus* foi de 1 μM e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 1 μM . A cepa MRSA sofreu efeito bactericida no mesmo CIM de 2 μM . A atividade peptídica contra isolados de *Acinetobacter baumannii* também foi analisada, mostrando ação bactericida na concentração de 1 μM . O peptídeo inibiu o crescimento de biofilme da cepa resistente a metilina. Estudos de Dicroísmo Circular (CD) revelaram que IKR18 assume uma estrutura alfa-helicoidal na presença de ambiente mimético de membrana. O mecanismo de ação IKR18 envolve danos na membrana da bactéria, conforme demonstrado pela captação de *Sytox green* e cristal violeta. Além disso, IKR18 apresentou efeitos sinérgicos e aditivos em combinação com os antibióticos vancomicina e ciprofloxacina. IKR18 também apresentou atividade antibiofilme em menor concentração e maior eficiência comparado aos antibióticos comerciais. O envolvimento na morte direta das bactérias avaliadas, foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura. O potencial anti-infeccioso de IKR18 foi demonstrado no modelo de *Galleria mellonella* infectado com *S. aureus*, MRSA e *A. baumannii*. O novo peptídeo bioinspirado, IKR18, provou ser eficaz no controle da infecção bacteriana, abrindo oportunidades para o desenvolvimento de novos ensaios, incluindo modelos pré-clínicos.

Palavras-chave: peptídeos antimicrobianos, desenho computacional, anti-infecção, modelo de infecção, bactéria, MRSA.

ABSTRACT

Since a long time, the disease-causing microorganisms and humanity relationship is well-known established. Bacteria is one of the main agents for causing diseases in humans, which can be controlled through the use of antibiotics. On the other hand, over time, the emergence and increasing of bacterial resistance to such drugs has become a growing concern. Reports of infections and deaths from antimicrobial-resistant bacteria are growing daily in the world and WHO has warned about the importance of developing new effective drugs against these superbacteriae. The discovery of new agents from plants led to the isolation of many substances that are still used clinically today or as prototypes for the synthesis of bioactive molecules. Thus, the development of new strategies for combating this growing resistance has received greater attention, and antimicrobial peptides (AMP) emerge as a work perspective, in addition to being involved in innate immunity. They are promising tools for the development of new antibiotics. As dynamic as pharmaceutical companies are, the search for new antimicrobial has not accompanied the development of multidrug resistance. In this study, we described the design of IKR18, a PAM that, through *in silico* simulations, was bioinspired in the amino acid sequence of the trypsin inhibitor *Inga laurina* (ILTI). The peptide obtained was tested in different computational models aiming at predicting possible antibacterial effects, considering synthesis for future tests, with the perspective that these agents act as new weapons against the constant evolution of bacterial resistance. IKR18 showed antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In addition, our results showed that MIC for *S. aureus* (MSSA) was 1 μM and MBC 1 μM . In contrast, MRSA underwent bactericidal effect at the same MIC (2 μM). Peptide activity against *Acinetobacter baumannii* infectious isolates was also analyzed, showing bactericidal action at a concentration of 1 μM . The peptide was also able to inhibit all tested strains biofilm growth. CD studies revealed that IKR18 assumes an alpha-helical structure in the presence of a membrane mimetic environment. IKR18 mechanism of action involves damage to the bacterial membrane, as demonstrated by Sytox green and violet crystal uptake. Furthermore, IKR18 showed synergistic and additive effects in combination with vancomycin and ciprofloxacin. The peptide showed antibiofilm activity, in concentration and efficiency compared to commercial antibiotics, involving the direct killing of bacteria, confirmed by scanning electron microscopy. The IKR18 anti-infective was demonstrated with the *Galleria mellonella* model infected with MSSA, MRSA and *A. baumannii*. To sum up, the new bioinspired peptide, IKR18, proved to be effective in controlling bacterial infection, opening opportunities for the development of new assays, including preclinical models.

Keywords: antimicrobial peptides, computational design, bacteria, antibiofilm, infection model, anti-infective, MRSA.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Previsão no mapa mundi da mortalidade anual atribuível a resistência a antibióticos em 2050.....22
- Figura 2. Linha do tempo da descoberta dos antibióticos, apresentando o ano da descoberta e o desenvolvimento da resistência relatada em cada antibiótico.....25
- Figura 3. Alvos antibacterianos de agentes terapêuticos convencionais e mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias a esses antibióticos.....30
- Figura 4. Formação de biofilme e *quorum sensing*. Esta figura mostra cinco etapas em um ciclo de vida do biofilme e os fatores associados que participam do desenvolvimento do biofilme. O biofilme começa a partir da adesão inicial da bactéria e depois se desenvolve em uma adesão irreversível. Durante esses dois períodos, DNA extracelular, proteases, proteínas da superfície celular ou proteínas associadas ao biofilme estão envolvidas na iniciação do biofilme. Nas etapas seguintes, o EPS é gerado e o biofilme se torna maduro. Um mecanismo de comunicação célula-célula, chamado *quorum sensing* (QS), desempenha um papel importante nas duas últimas etapas da formação do biofilme.....32
- Figura 5. Classes estruturais tridimensionais, representadas por diferentes peptídeos antimicrobianos: A) α -hélice: Magainina (LONG-MEI; TIAN-TIAN; XIU-QING, 2015) B) Estendida: Indolicidina (BATISTA ARAUJO; SASTRE DE SOUZA; LORENZON, 2022) C) Estrutura mista: Protegrin-3 (USACHEV; EFIMOV; KOLOSOVA; KLOCHKOVA *et al.*, 2015) e D) Folha- β : β -defensina 3 (DHOPLE; KRUKEMEYER; RAMAMOORTHY, 2006).....35
- Figura 6. Ilustração esquemática dos eventos que ocorrem na membrana citoplasmática bacteriana após adsorção do PAM.....38
- Figura 7. *Inga laurina*: (A). árvore, (B e C) fruto verde, (D) sementes. Fonte: (A, B) biologia da paisagem (www.biologiadapaisagem.com.br); (C, D) clickmudas (www.clickmudas.com.br).....43
- Figura 8. Insetos-praga utilizados no estudo. (A, B) adulto de *Galeria mellonella*; (C e D). larva *G. mellonella*.....46
- Figura 9. Diagrama da roda helicoidal do peptídeo IKR18 Resíduos hidrofílicos são representados como círculos, resíduos hidrofóbicos como losangos e os potencialmente carregados positivamente como pentágonos. Cores: o resíduo mais hidrofóbico é verde e a quantidade de verde está diminuindo proporcionalmente à hidrofobicidade, com hidrofobicidade zero codificada como amarelo. Os resíduos potencialmente carregados são azul claro. (A) Sequência parental – sem modificação e (B) sequência modificada através das ferramentas computacionais (IKR18)60
- Figura 10. Estrutura tridimensional do peptídeo IKR18 predita pelo software *I-TASSER*....61
- Figura 11. Diagrama de Ramachandram (A). Os pontos azuis e a área em vermelho representam os ângulos em regiões permitidas. A região em marrom representa adicionalmente favorável e a região em amarelo generosamente favorável. Gráfico Z-score

- (B), revela o índice de qualidade da estrutura presente na região em RMN, destacado em ponto preto.....61
- Figura 12. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo IKR18 a 30 uM em PBS (■) e na presença de 50% TFE (●) (v/v) e de 50 mM SDS (▲) a 30°C.....63
- Figura 13. Espectro de dicroísmo circular do peptídeo IKR18 a 30 uM na presença de POPG/POPC na relação peptídeo:lipídio de 1:20 a 30°C.....64
- Figura 14. Efeito bactericida de IKR18. O peptídeo, vancomicina ou ciprofloxacina foram usados para obter curvas de tempo de morte. As cepas MSSA (A), MRSA (B) e *A. baumannii* (C) foram incubadas no vamos do CBM durante 120 min. Os resultados são apresentados como UFC.mL⁻¹.....67
- Figura 15. Porcentagem de captação do cristal violeta das cepas MSSA, MRSA e *A. baumannii* com o tratamento do peptídeo IKR18. Controle corresponde a bactéria incubada sem tratamento. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Tukey, com $p < 0,05$68
- Figura 16. Captação de Sytox green por bactérias tratadas com IKR18. A fluorescência foi determinada para MSSA (A), MRSA (B) e *A. baumannii* (C) expostos a IKR18 em CBM. Os ensaios foram realizados em triplicado.....69
- Figura 17. Efeito de IKR18 na inibição da formação de biofilme. Análises quantitativas (UFC.ml⁻¹) de biofilmes controle e biofilmes tratados com IKR18 e antibióticos contra MSSA (a), MRSA (b) e *A. baumannii* (c). Os efeitos foram analisados em MIC e 10x MIC. A análise anova foi seguida pelo pós-teste de tukey ($p < 0,05$) e letras diferentes indicam diferença estatística.....71
- Figura 18. Efeitos do IKR18 na erradicação de biofilmes maduros. Análises quantitativas (UFC.mL⁻¹) de biofilmes controle e biofilmes tratados com IKR18 e antibióticos contra MSSA (A), MRSA (B) e *A. baumannii* (C). Os efeitos foram analisados em MIC e 10X MIC. A análise ANOVA foi seguida pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) e letras diferentes indicam diferença estatística.....73
- Figura 19. Fotomicrografias eletrônicas de varredura (5.000 x) mostrando biofilme de *S. aureus* resistente à metilicina. Células não tratadas (A), tratadas com vancomicina (B) e tratadas com IKR18 (C). Imagem detalhada (15.000 x) (D) do biofilme IKR18 tratado com MRSA.....74
- Figura 20. Fotomicrografias eletrônicas de varredura (5.000 x) mostrando o biofilme de *A. baumannii*. Células não tratadas (A), tratadas com ciprofloxacina (B) e tratadas com IKR18 (C). Imagem detalhada (15.000 x) (D) de biofilme tratado com IKR18 *A. baumannii*.....75
- Figura 21. Ensaio de toxicidade. Porcentagem de sobrevivência ao longo do tempo de larvas de *G. mellonella* injetadas com IKR18 em doses de 400 a 1 μ M.....77
- Figura 22. Ensaio de toxicidade. Porcentagem de sobrevivência ao longo do tempo de larvas de *G. mellonella* injetadas com IKR18 em doses de 400 a 1 μ M.....78

Figura 23. Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectada com MSSA (A), MRSA (B) e *A. baumannii* (C).....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características físico-químicas e estruturais da sequência do peptídeo IKR18 determinada pelo programa APD.....	58
Tabela 2. Resultado da análise de validação da estrutura do peptídeo IKR18 pelo programa Prochek e Prosa-Web.....	61
Tabela 3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) pelo tratamento com o peptídeo IKR18.....	64
Tabela 4. Avaliação da combinação entre IKR18, vancomicina e ciprofloxacina para inibir a formação de cepas de MSSA, MRSA e <i>A. baumannii</i> . Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF).....	69

LISTA DE ANEXOS

Anexo I. Comprovante de cadastro no Sisgen das espécies utilizadas nesta pesquisa.....	I
Anexo II. Declaração de trâmite processual do pedido de patente emitido pelo Núcleo de Inovação Tecnológica (AGINOVA), Agência UFMS.....	II
Anexo III. Protocolo do comprovante de depósito da patente do peptídeo IKR18.....	III
Anexo IV. Artigo publicado na revista Artigo publicado na revista Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects.....	IV

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APD	Antimicrobial Peptide Database
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CDC	Center Control Disease
Chol	Cholesterol
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DC	Discoísmo circular
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
h	Horas
HC50	Concentração de 50% de morte das células
IS	Índice de Seletividade
I-TASSER	Iterative Threading Assembly Refinement
LPS	Lipopolissacarídeo de Membrana Externa
LUVs	Large Unilamellar Vesicles
M	Unidade de Concentração Molar
mg	Miligrama
m/z	Unidade massa/carga
mL	Mililitro
MHA	Muller Hinton Ágar
MH	Muller Hinton
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nm	Nanômetro
PAM	Peptídeo Antimicrobiano
PDB	Protein Data Bank
POPG	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
POPE	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
ProSA-web	Protein Structure Analysis
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WHO	World Health Organization
UTI	Unidade de terapia intensiva
OMS	Organização Mundial de Saúde
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
TFE	Trifluoroetanol
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Código	Aminoácidos
A	Alanina
C	Cisteína
D	Aspartato ou Ácido aspártico
E	Glutamato ou Ácido glutâmico
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
K	Lisina
L	Leucina
M	Metionina
N	Asparagina
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
W	Triptofano
Y	Tirosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 Descoberta de antibióticos – uma breve história de um problema desafiador	24
2.2 Infecções.....	27
2.3 Resistência	28
2.4 Biofilmes	31
2.5 Peptídeos Antimicrobianos (PAMS).....	34
2.6 Mecanismo de ação dos PAMS	36
2.7 Bactérias patogênicas humanas de importância médica formadoras de biofilme.	39
2.8 Métodos de desenhos computacionais de peptídeos antimicrobianos	41
2.9 Espécie vegetal bioinspiradora.....	42
3. OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivo Geral	44
3.2 Objetivos Específicos.....	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Acesso ao patrimônio genético	44
4.2 Microrganismos.....	45
4.3 Inseto	45
4.4 Acesso ao patrimônio genético	44
4.5 Desenho computacional do peptídeo.....	46
4.6 Aquisição do peptídeo.....	47
4.7 Determinação da concentração de peptídeo em solução	48
4.8 Dicroísmo circular	48
4.8.1 Preparação das vesículas.....	48
4.8.2 Estudos de dicroísmo circular (CD).....	49
4.8.3 Estudos de permeabilização	49
4.9 Avaliação da atividade antimicrobiana	50
4.9.1 Microrganismos.....	50
4.9.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	50
4.10 Determinação da atividade bactericida tempo-dependente	51
4.11 Avaliação do mecanismo de ação	52
4.11.1 Determinação da captação do cristal violeta.....	52
4.11.2 Determinação da captação do corante sytox green.....	52
4.12 Efeito sinérgico do IKR18 com antibióticos.....	52

4.13	Efeito do tratamento sobre biofilmes.....	54
4.13.1	Preparação do IKR18.....	54
4.13.2	Ensaio de inibição da formação de biofilme.....	54
4.13.3	Ensaio sobre efeitos no biofilme maduro (pré-formados).....	54
4.13.4	Viabilidade pós-tratamento: quantificação de UFC.....	55
4.14	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	55
4.15	Determinação da toxicidade.....	56
4.15.1	Atividade hemolítica do IKR18.....	56
4.16	<i>Galleria mellonella</i> modelo de estudo <i>in vivo</i>	57
4.16.1	Toxicidade sistêmica em <i>Galleria mellonella</i>	57
4.16.2	Atividade anti-infecciosa de IKR18 contra infecção bacteriana.....	57
4.17	Análise dos Resultados.....	58
5.	RESULTADOS.....	59
5.1	Sequência do peptídeo.....	59
5.2	Aquisição do peptídeo.....	63
5.3	Dicroísmo circular de IKR18.....	61
5.3.1	Determinação da estrutura secundária.....	63
5.4	Determinação da atividade antibacteriana.....	65
5.4.1	Determinação da concentração inibitória mínima e bactericida mínima.....	65
5.5	Determinação da atividade bactericida tempo-dependente.....	67
5.6	Permeabilidade de membrana bacteriana.....	69
5.6.1	Ensaio da captação do cristal violeta.....	69
5.6.2	Ensaio com sytox green.....	70
5.7	Efeito sinérgico do peptídeo com antibióticos.....	71
5.8	Efeitos do IKR18 na inibição da formação de biofilme.....	71
5.9	Efeitos do IKR18 na formação do biofilme maduro.....	73
5.10	Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes.....	75
5.11	Determinação da toxicidade.....	76
5.11.1	Atividade hemolítica.....	76
5.11.2	Efeito do IKR18 na toxicidade de <i>G. mellonella</i>	77
5.12	Atividade anti-infecciosa de IKR18 em larvas de <i>G. mellonella</i>	78
6.	DISCUSSÃO.....	80
7.	CONCLUSÃO.....	84
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
9.	ANEXOS.....	96

1. INTRODUÇÃO

A Unidade de Terapia Intensiva (UTI) em uma instituição hospitalar é o ambiente destinado à pacientes criticamente enfermos. Geralmente, estes indivíduos estão mais susceptíveis a adquirir infecções nosocomiais, em decorrência do estado de saúde fragilizado, do emprego de procedimentos invasivos, do uso de doses altas de medicamentos e do maior tempo de internação em um local contaminado e colonizado por diversos microrganismos, muitos destes multirresistentes.

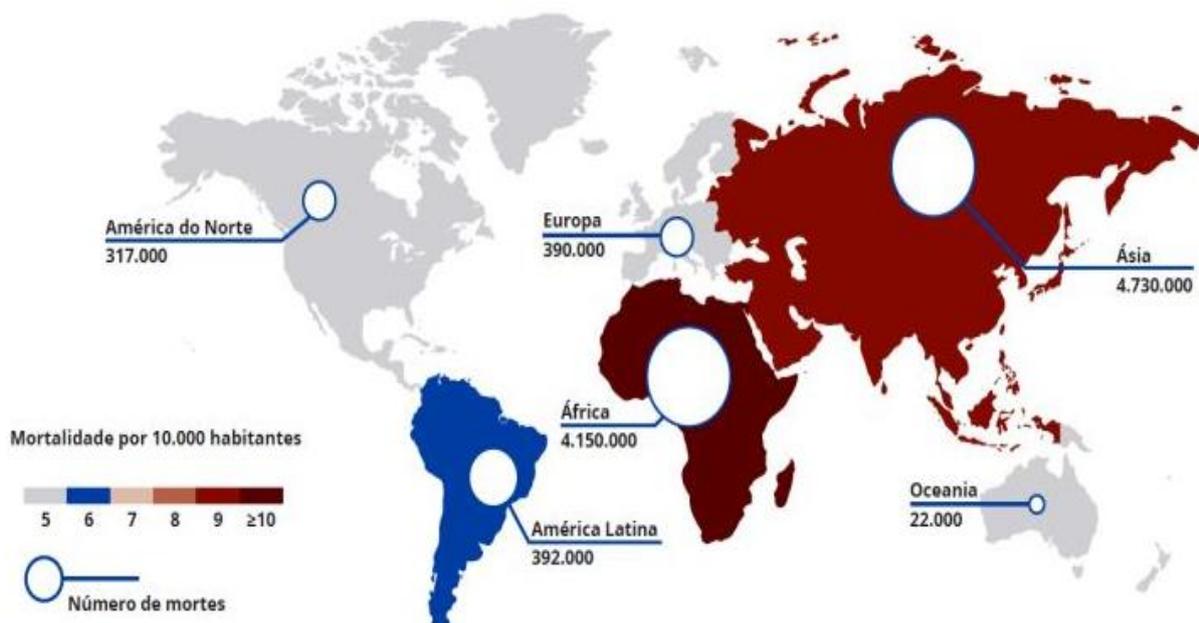
Os microrganismos multirresistentes são considerados um grave problema de saúde pública, uma vez que, frequentemente, criam mecanismos para minimizar ou interromper a ação antimicrobiana dos antibióticos, ocasionando assim um desafio para os profissionais da saúde no momento da escolha do tratamento adequado. Dentre os microrganismos multirresistentes destaca-se o grupo denominado ESKAPE, acrônimo para as bactérias *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* Tais bactérias são os principais agentes causadores de doenças infecciosas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Os antibióticos são a classe mais significativa de produtos farmacêuticos e uma das invenções médicas mais influentes do século XX. Os antibióticos têm sido inegavelmente uma importante proteção para a saúde humana na luta da sociedade contra as bactérias, salvando milhões de vidas (RIBEIRO DA CUNHA; FONSECA; CALADO, 2019). No entanto, o número de infecções causadas por microrganismos multirresistentes (MDR), do inglês *multidrug-resistant* (MDR), está aumentando em todo o mundo, e a ameaça de infecções intratáveis preocupa desde o início do século XXI (GAJDÁCS; ALBERICIO, 2019). Os microrganismos multirresistentes recebem essa denominação por serem resistentes a um ou mais antimicrobianos de três ou mais categorias testadas. Embora os antibióticos tenham permitido o desenvolvimento de vários campos da prática médica, incluindo os resultados efetivos de várias operações cirúrgicas e terapias imunossupressoras que dependem de profilaxia antibiótica e o potencial para gerenciar complicações infecciosas, a resistência antimicrobiana (RAM) apresenta um desafio significativo para os sistemas de saúde em todo o mundo (DODDS, 2017). A exposição contínua a medicamentos como quinolonas, cefalosporinas (terceira geração) ou carbapenêmico exerce uma pressão seletiva, na qual resulta no aumento em número de células e na disseminação dos patógenos resistentes. Há uma correlação entre o uso indevido de agentes antibacterianos,

seja em pacientes ou animais, e o desenvolvimento de microrganismos multirresistentes (ROCA *et al.*, 2015; FISHMAN, 2006).

De acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2019, a resistência microbiana foi elencada como uma das dez ameaças à saúde global. Projeções internacionais estimam que, se não houver um efetivo progresso em relação ao controle da RAM de forma mais efetiva que atualmente, por volta do ano 2050 morrerão anualmente cerca de 392.000 pessoas na América Latina, enquanto o número terá subido para 10 milhões, custando mais de \$ 2,9 trilhões (WATKINS; BONOMO, 2016; FERNANDES *et al.*, 2016) (Figura 1). Diante disso, a resistência antimicrobiana representa não somente um problema para a saúde humana como também para a economia em todo o mundo.

Figura 1 – Previsão no mapa mundi da mortalidade anual atribuível à resistência a antibióticos em 2050.



Fonte: Fernandes *et al.*, 2016

Embora o cenário seja sombrio, uma série de avanços científicos têm demonstrado potencial para auxiliar na exploração e desenvolvimento de novos antibióticos. Métodos de biologia sintética, juntamente com métodos genéticos, estudos genômicos e metagenômicos de bactérias, animais e até invertebrados aquáticos têm sido realizados (FORTMAN; MUKHOPADHYAY, 2016). Diversas abordagens terapêuticas e inovadoras são utilizadas para combater o avanço da resistência (ZHABIZ; OMAR; DONALD GENE, 2014), como também as vacinas (THANAWASTIEN *et al.*, 2015) são usadas para combater infecções bacterianas.

Além destes métodos modernos, a química orgânica e farmacêutica sintética tradicional permanece como instrumento importante na luta contra a resistência antimicrobiana (CZAPLEWSKI *et al.*, 2016). Esses métodos modernos são iniciativas de avanços regulatórios com potencial de impedir ou minimizar que a era pós-antibiótica acabe sendo uma realidade (FORTMAN; MUKHOPADHYAY, 2016).

Neste cenário, a busca por novas moléculas com propriedades antimicrobianas e antitumorais, que sejam mais eficazes ou suplementem as terapias já existentes, faz-se cada vez mais necessária e urgente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Descoberta de antibióticos – uma breve história de um problema desafiador

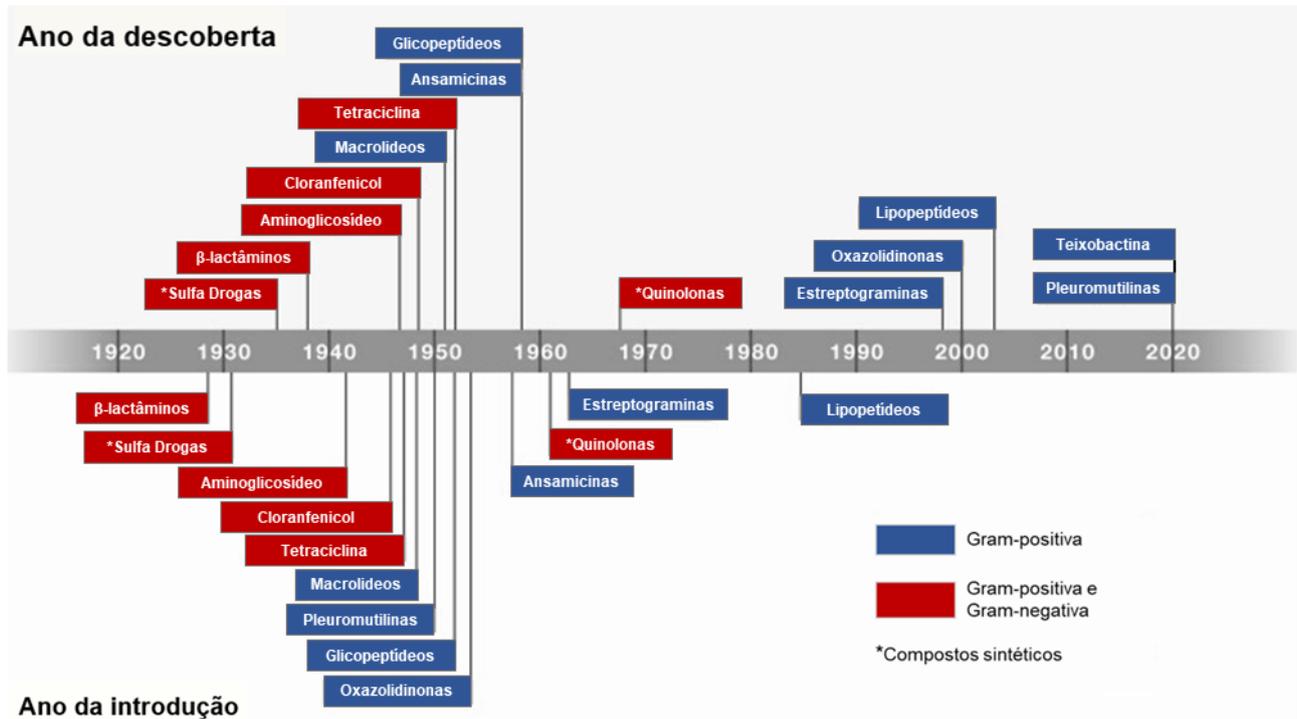
Durante o período pré-antibiótico, a compreensão dos microrganismos e doenças infecciosas eram inadequadas. Os processos de tratamento e prevenção da transmissão dessas doenças contagiosas eram precárias, e frequentemente se aproximavam de níveis epidêmicos, resultando na morte de milhões de pessoas (JAYACHANDRAN, 2018). Para entender a condição catastrófica das pessoas no período pré-antibiótico, o surto da 'praga' pode ser citado como exemplo, chamada também como a peste negra ou peste bubônica é causada por *Yersinia pestis*, bactéria transmitida através da picada de pulgas ou de animais infectados. Essa bactéria foi responsável por uma série de pandemias ao longo da história (YANG, 2018), incluindo a 'peste justiniana' que matou quase cem milhões de pessoas (UDDIN *et al.*, 2021), a 'peste negra' no século XIV que causou mais de cinquenta milhões de mortes na Europa (TWIGG, 2003), e o surto entre 1895 e 1930 resultou em cerca de 12 milhões de infecções. No entanto, hoje a peste pode ser facilmente tratada com antibióticos (GALY *et al.*, 2018).

Em 1676, por meio da descoberta de organismos vivos microscópicos ou 'animalcules', Antonie van Leeuwenhoek iniciou o desenvolvimento dos estudos com antibióticos (GOULD, 2016). Em 1871, Joseph Lister descobriu que o *Penicillium glaucum* tinha efeitos inibitórios sobre o crescimento de bactérias, o que lhe permitiu tratar a lesão de uma enfermeira com o extrato *P. Glaucum*, fato que despertou a ideia de que a bactéria seria responsável pela infecção (DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019). Na segunda metade do século XIX, o bacteriologista francês Louis Pasteur e o médico alemão Robert Koch conduziram estudos sobre bactérias de forma independente. Luís Pasteur trabalhou com *Bacillus anthracis*, enquanto Robert Koch estudou *Mycobacterium tuberculosis*, identificando uma correlação entre espécies de bactérias e doenças. As observações destes dois principais microbiologistas impulsionaram, portanto, o desenvolvimento da microbiologia e dos antibióticos para a era moderna (NICOLAOU; RIGOL, 2018).

Ao longo das décadas seguintes, o uso de medicamentos antibacterianos tornou-se generalizado, embora o acesso equitativo a esses medicamentos esteja longe de estar disponível em todo o mundo. Entretanto, essas drogas têm sido amplamente mal utilizadas em humanos e animais, o que tem favorecido a seleção e disseminação de bactérias. Consequentemente, os medicamentos antibacterianos tornam-se menos eficazes ou mesmo ineficazes, resultando em uma emergência de segurança de saúde global

acelerada que está ultrapassando rapidamente as opções de tratamento disponíveis. Até a década de 1970, novos medicamentos antibacterianos foram desenvolvidos e alguns patógenos comuns mostraram-se totalmente susceptíveis. Já durante a década de 80, novas classes de drogas antibacterianas foram descobertas (Figura 2).

Figura 2 – Linha do tempo da descoberta dos antibióticos. Apresentando o ano da descoberta e o desenvolvimento da resistência relatada em cada antibiótico.



Fonte: Adaptado de (Lewis, 2020).

Primeira era dos antibióticos

O primeiro antibiótico, o ácido micofenólico, descoberto em 1893, pelo microbiologista italiano Bartolomeo Gosio, foi isolado de *P. glaucum*, que inibe o crescimento de *Bacillus anthracis* (UDDIN *et al.*, 2021). Em 1909, Paulo Ehrlich e seus colaboradores desenvolveram Salvarsan (arsfenamina), o primeiro antibiótico sintético derivado do arsênico, que é eficaz contra o *Treponema pallidum* (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019), o patógeno causador da sífilis.

Neosalvarsan, que era menos perigoso e mais eficaz na tratamento da sífilis do que seu precursor (Salvarsan), foi introduzido em 1913 (DIGIANDOMENICO; SELLMAN, 2015). Ambas drogas apresentavam fatores de risco elevados para a saúde humana devido à presença de arsênico, sendo posteriormente superados pelo Prontosil, uma sulfonamida antibacteriana de amplo espectro (sulfamidocrisoidina). Essa droga foi descoberta pelo

bacteriologista alemão Gerhard Domagk em 1930, e foi principalmente usada no tratamento de soldados feridos durante a Primeira Guerra Mundial. Tal descoberta estabeleceu um novo marco na história da pesquisa com antibióticos (ZHABIZ; OMAR; DONALD GENE, 2014). A droga Prontosil exerce papel bacteriostático contra diferentes grupos de bactérias, inibindo a dihidropteroato enzima sintetase (DHPS) na via do ácido fólico, que eventualmente bloqueia a síntese do ácido nucleico bacteriano (SYKES; PAPICH, 2014). No entanto, as sulfonamidas acabaram sendo substituídas mais tarde pela penicilina, pois as bactérias tornaram-se resistentes ao Prontosil (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019) em decorrência de mutações na enzima DHPS (SKÖLD, 2000).

Em 1928, o bacteriologista escocês Alexander Fleming acidentalmente descobriu que um fungo (*Penicillium notatum*) inibiu o desenvolvimento de colônias de *Staphylococcus aureus*. Fleming observou que o fungo excretou um composto que inibia a bactéria e, em 1929 conseguiu isolar o agente ativo da molécula, batizando-a de 'penicilina', o primeiro e verdadeiro antibiótico. No entanto, somente em 1939 com o trabalho de Howard Walter Florey e Ernst Boris Chain que a estrutura da penicilina G foi elucidada (a primeira penicilina a ser usada em infecções bacterianas). Os autores foram capazes de isolar a penicilina, tornando possível o aumento de sua produção em larga escala. O advento do uso da penicilina para tratar infecções em 1945 foi, portanto, o próximo grande avanço na descoberta de antibióticos (GAYNES, 2017). A estrutura da penicilina foi elucidada através da análise cristalográfica de raios X por Dorothy Crowfoot Hodgkin no mesmo ano, permitindo classificá-lo como o primeiro membro da família β -lactama de antibióticos naturais (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

Penicilina, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos pertencem à mesma classe de antibióticos β -lactâmicos, por apresentarem um anel β -lactâmico e ter um mecanismo de ação bactericida comum. Os antibióticos β -lactâmicos inibem a biossíntese de paredes celulares de bactérias Gram-positivas (KHANNA; GERRIETS, 2022). No entanto, certas bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* produzem enzimas β -lactamases que destroem os β -lactamas presentes no anel dos antibióticos β -lactâmicos, tornando as bactérias resistentes a ele (BUSH; BRADFORD, 2016). Os semissintéticos derivados da penicilina, incluindo meticilina, oxacilina, ampicilina, e a carbenicilina mostraram atividades de amplo espectro contra várias bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Haemophilus influenzae*, *E. coli* e *Proteus mirabilis*). Independentemente do fato de que a ampicilina ainda seja usada na medicina, os estafilococos tornaram-se resistentes à meticilina em 1961 e não são mais

utilizados na prática clínica (GAYNES, 2017). *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), foi descrito mais tarde como a primeira “superbactéria” da história.

2.2 Infecções

As doenças infecciosas são um problema significativo para a saúde pública e a estabilidade econômica da sociedade em todo o mundo, apresentando desafios crescentes para a segurança da saúde e o progresso humano. Há séculos elas estão entre as principais causas de morte e incapacidade de recuperação. A ameaça representada por doenças infecciosas torna-se ainda mais preocupante pelo surgimento contínuo de novas epidemias de doenças infecciosas não conhecidas e antigas de impacto global (NII-TREBI, 2017).

Nas últimas três décadas e meia, surgiram pelo menos 30 novos agentes infecciosos que afetam humanos. Dentre eles, a maioria são zoonóticos e suas origens mostram uma correlação significativa com fatores socioeconômicos, ambientais e ecológicos. Como esses agentes infecciosos continuam a aumentar, colocando as pessoas em maior contato com os patógenos causadores de doenças, existe a preocupação de que as doenças infecciosas continuem a representar um desafio gigantesco.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o controle e a prevenção de infecções devem ser abordagens importantes, baseadas em evidências científicas com o objetivo de evitar que pacientes e profissionais de saúde sofram com as consequências. Quando hospitalizados os pacientes que recebem cuidados de saúde não devem contrair infecções, principalmente por práticas de cuidados inadequados (WHO, 2017).

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) ou infecções nosocomiais são infecções de ambientes hospitalares ou ambulatoriais, que geralmente acometem o indivíduo hospitalizado 48 horas após a hospitalização ou em 30 dias após receber cuidados de saúde ou até 90 dias após a realização de cirurgias (HAQUE *et al.*, 2018). A prevenção de tais infecções impede o aumento do número de óbitos, além de proporcionar economia e redução da disseminação da resistência antimicrobiana, incentivando a qualidade em práticas de saúde. No entanto, as infecções nosocomiais ainda é a sexta principal causa de morte, sendo superior às mortes causadas pela Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS), câncer e acidentes de trânsito (LIU; DICKTER, 2020). Na Europa mais de 2,5 milhões de casos de IRAS ocorrem todos os anos com mais de 90.000 mortes, de acordo com a OMS, e as unidades de terapia intensiva (UTIs) são os ambientes com maior taxa dessas infecções e mortalidade (DESPOTOVIC *et al.*, 2020).

De modo a contribuir com a diminuição de infecções hospitalares e outras, a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (*IDSA – do inglês Infections Diseases Society of America*), uma comunidade de especialistas em doenças infecciosas, visa promover a excelência no atendimento ao paciente através do desenvolvimento de diretrizes contendo orientações clínicas através de pesquisas, saúde pública e prevenção. Como exemplo, a IDSA publicou em 2022 a respeito do manejo da pneumonia adquirida no ambiente hospitalar ressaltando que os patógenos comumente identificados são *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa* orientando a terapia empírica, além de recomendar aos médicos que observem o perfil de prevalência e os fatores de risco de transmissão em suas instituições (LOSIER; DELA CRUZ, 2022).

2.3 Resistência

A resistência antimicrobiana (RAM) representa uma grande ameaça à saúde humana em todo o mundo. Diversas publicações estimaram o efeito da RAM na incidência, mortes, tempo de permanência hospitalar e custos de saúde para combinações específicas de patógeno-medicamento em locais selecionados (WHO, 2018). A sua rápida disseminação nacional e internacional representa uma emergência sanitária global. Diante disso, a conscientização e a busca constante de estratégias eficazes para controlar doenças infecciosas bem como o surgimento de novas doenças, permanecem cruciais.

A RAM é um fenômeno inevitável porque os microrganismos desenvolvem mutações genéticas para mitigar o efeito letal dos antimicrobianos (SUBRAMANIAM; GIRISH, 2020). A resistência foi inicialmente observada em estafilococos, estreptococos e gonococos. Apenas um ano após o uso do primeiro antibiótico comercial, no caso a penicilina que foi introduzida no mercado em 1941, houve o surgimento de uma cepa de *S. aureus* já resistente à penicilina (DODDS, 2017). Da mesma forma, *S. aureus* tornou-se resistente à metilina, antibiótico semissintético relacionado à penicilina, no mesmo ano que foi introduzido no mercado (1960) (DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019).

Embora a RAM seja um fenômeno inevitável, ela tem sido uma fonte de grande preocupação ao longo dos anos, uma vez que não é preciso muito tempo para um antibiótico estabelecer resistência. Tendo em vista que atualmente mais de 70% das bactérias patogênicas são resistentes a pelo menos um antibiótico (ECONOMOU; GOUSIA,

2019), o problema da RAM tornou-se um dos mais sérios desafios para a saúde, proteção alimentar e saúde sustentável.

A OMS (2019) declarou que a resistência aos antimicrobianos é uma das 10 principais ameaças de saúde pública da humanidade. O uso indevido e excessivo dos antimicrobianos é o principal fator que determina a aparição de patógenos farmacorresistentes. A falta de água limpa e saneamento, a prevenção e controle inadequados das infecções contribuem para a propagação de microrganismos, muitos deles resistentes ao tratamento com os antimicrobianos atualmente existentes.

O custo da RAM para a economia é considerável. Além de morte e incapacidade, o prolongamento das doenças se traduz em estâncias hospitalares mais longas, a necessidade de remédios mais caros e dificuldades financeiras para as pessoas afetadas. Sem eficácia antimicrobiana, os resultados da medicina moderna no tratamento de infecções, especialmente durante grandes cirurgias e quimioterapia contra o câncer, são comprometidos em maior grau.

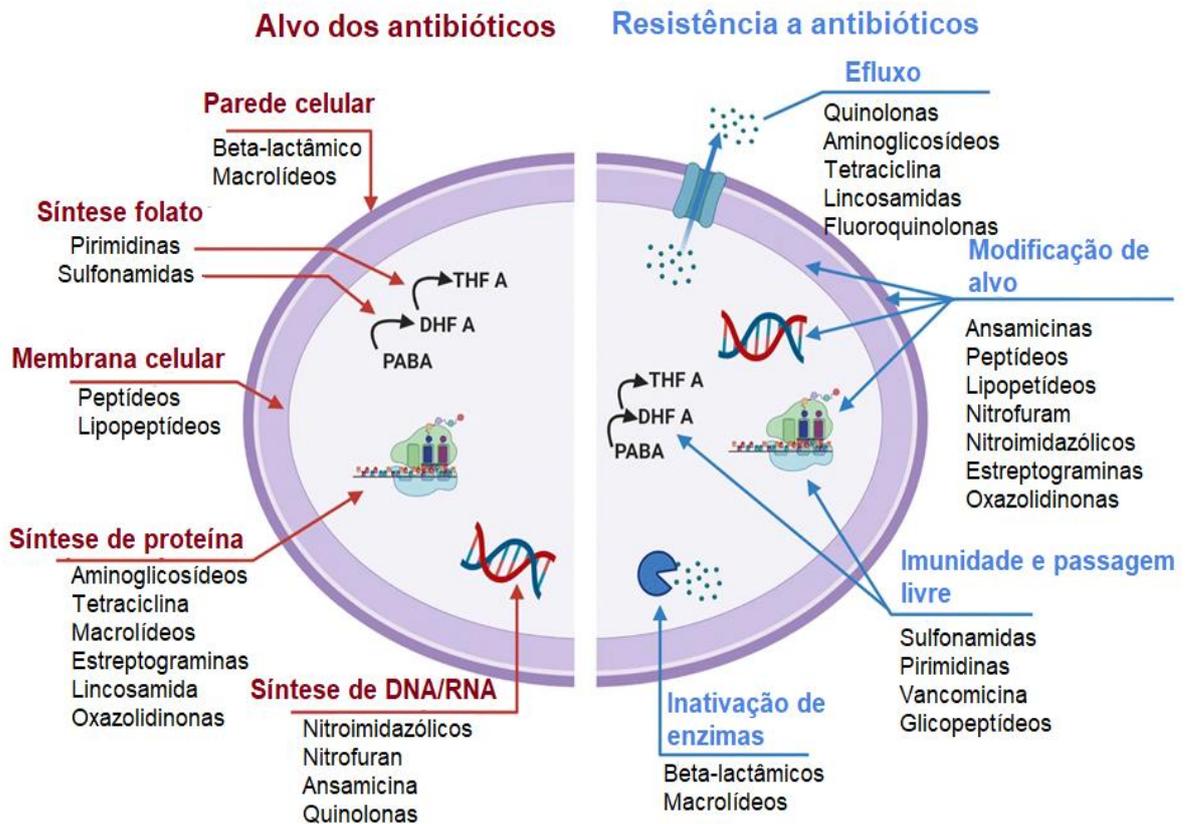
A escolha correta da farmacoterapia para o tratamento das infecções é imprescindível, pois a administração múltipla e imprudente de antimicrobianos sistêmicos para pacientes hospitalizados é capaz de modificar a microbiota humana sem levar ao sucesso terapêutico (KLUYTMANS; VAN BELKUM; VERBRUGH, 1997; LOWY, 1998). Essa condição possibilita o surgimento de cepas resistentes a determinadas classes terapêuticas, reduzindo os recursos farmacológicos (WENZEL; PERL, 1995).

A resistência desenvolvida pelos microrganismos não é algo novo mas sim um processo natural que ocorre há milhões de anos, uma vez que os microrganismos sofrem adaptações que os auxiliam na luta pela sobrevivência em ambientes mais hostis que venham enfrentar, como a transferência horizontal de genes de gerações a gerações, sendo um dos poucos organismos capazes de manter o material genético de outras espécies, havendo também a indução de mutação frente a estresses genéticos (READ; WOODS, 2014).

Essas mutações provocam a resistência aos antibióticos por meio de vários mecanismos, como a modificação do alvo antimicrobiano, a secreção de enzimas que causam a inativação do antibiótico, a diminuição da captação do antibiótico de forma a impedir a penetração deste no interior e alteração na permeabilidade da parede celular da membrana citoplasmática, como também a ativação de mecanismos de efluxo, eliminando os antibióticos e alterando as principais vias bioquímicas (UDDIN; CHAKRABORTY *et al.*, 2021). Segundo ABOUEHASSAN (2019), existem cinco alvos antibacterianos dos agentes

terapêuticos convencionais: a parede celular bacteriana, a membrana celular, a síntese de proteínas, a síntese de DNA e RNA e o metabolismo do ácido fólico (Figura 3).

Figura 3 – Alvos antibacterianos de agentes terapêuticos convencionais e mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias a esses antibióticos.



Fonte: Adaptado de (CARDOSO; GLOSSOP; MEIKLE; ABURTO-MEDINA *et al.*, 2021).

De acordo com a OMS, a mortalidade relacionada às bactérias multirresistentes do grupo ESKAPE aumentaram nos últimos anos tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. Através da análise de genomas bacterianos, foram relatados a existência de aproximadamente 20.000 genes potencialmente resistentes, mostrando uma lacuna na eficácia dos tratamentos atuais (TAO, 2021).

A resistência antimicrobiana é originada a partir de terapias inadequadas e uso irracional de antimicrobianos, provocando assim o surgimento de mecanismos de defesa de patógenos, sendo necessária a utilização de altas doses de medicamento e uma combinação de agentes na tentativa de alcançar o sucesso terapêutico (OLESEN; BARNETT; MACFADDEN, 2018). As bactérias do grupo ESKAPE com maior prevalência nos hospitais são *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), *Escherichia coli*

produtora de β - lactamase de espectro estendido (ESBL) e *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE). É importante citar também a existência de uma relação da resistência antimicrobiana entre as respostas imunes do hospedeiro com a frequente formação de biofilme. Quando a resposta imunológica do paciente/indivíduo está enfraquecida, cepas multirresistentes produzem de moderado a alto o número de biofilmes, interferindo assim na resposta ao tratamento (TENOVER, 2006; MURALI *et al.*, 2014).

2.4 Biofilmes

Biofilmes bacterianos constituem um modelo de agregação caracterizado pelo crescimento de microrganismos diante de um ambiente hostil, que ameaça a sobrevivência da espécie. No biofilme é possível observar a presença de uma mesma espécie de bactéria ou a coexistência de diferentes espécies bacterianas em simbiose (TRINIDAD *et al.*, 2011; WOLCOTT *et al.*, 2013).

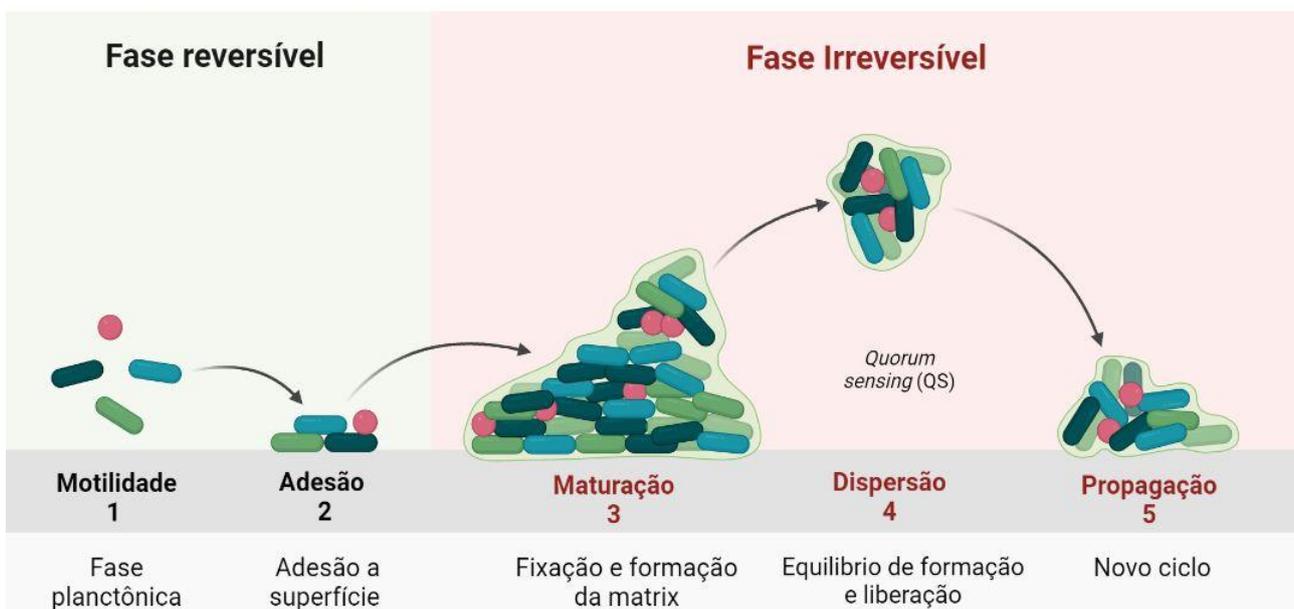
Os biofilmes são envoltos por uma matriz polimérica extracelular sintetizada pelas bactérias que o compõem. Algumas bactérias estão comumente relacionadas à formação de biofilme como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e *Haemophilus influenzae*, entre outros (DONLAN, 2002).

Na forma de biofilme as bactérias mostram-se cerca de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos antimicrobianos do que quando na sua forma livre (WILKINS *et al.*, 2014). Em muitos casos, os tratamentos mais efetivos podem envolver métodos físicos e químicos (aplicação de ultrassom, antibioticoterapia e antisepsia) ou a direta remoção do biofilme seja por lavagem, desbridamento ou reparo cirúrgico (BIXLER; BHUSHAN, 2012).

Os biofilmes são comunidades tridimensionais complexas de microrganismos aderidos a uma superfície e envoltos em uma substância exopolimérica protetora. A formação do biofilme progride em cinco etapas principais (Figura 4). Na primeira fase, as células individuais, chamadas planctônicas migram e aderem a uma superfície. Ao fornecer as condições ideais presentes, essas células aderentes então iniciam a produção do biofilme na superfície e ficam envoltos em pequenas quantidades de material exopolimérico. No estágio dois, as células aderentes exsudam uma substância polimérica extracelular (EPS) e tornam-se irreversivelmente aderidos à superfície, o que resulta em células de agregação e formação de matrizes. No estágio três, o biofilme começa a amadurecer desenvolvendo microcolônias e canais de água em sua arquitetura, ao mesmo tempo em que se formam significativamente em mais camadas. Dentro do estágio quatro, o biofilme totalmente

maduro atinge seu máximo em densidade, sendo então considerada uma comunidade tridimensional. No estágio cinco, o biofilme maduro libera microcolônias de células da comunidade principal, que são livres para migrar para novas superfícies espalhando a infecção para outros locais (VERDEROSA; TOTSIKA; FAIRFULL-SMITH, 2019).

Figura 4 – Formação de biofilme e *quorum sensing*. Esta figura mostra cinco etapas em um ciclo de vida do biofilme e os fatores associados que participam do desenvolvimento do biofilme. O biofilme começa a partir da adesão inicial da bactéria e depois se desenvolve em uma adesão irreversível. Durante esses dois períodos, DNA extracelular, proteases, proteínas da superfície celular ou proteínas associadas ao biofilme estão envolvidas na iniciação do biofilme. Nas etapas seguintes, o EPS é gerado e o biofilme se torna maduro. Um mecanismo de comunicação célula-célula, chamado *quorum sensing* (QS), pode ser definido como um mecanismo de comunicação entre bactérias, através da produção e difusão de pequenas moléculas químicas ou sinalizadoras, através de membranas bacterianas. desempenha um papel importante nas duas últimas etapas da formação do biofilme. Por último, mas não menos importante, as bactérias podem se dispersar do biofilme para encontrar novos nichos e iniciar a formação de novos biofilmes, resultando assim na conclusão do ciclo de vida do biofilme.



Fonte: Ramalho, S.R; elaborada no programa Biorender (adaptada).

A presença dos biofilmes em infecções nosocomiais constitui um grave problema de saúde pública (Jamal *et al.*, 2018). De acordo com (BIXLER; BHUSHAN, 2012), mais de 45% das infecções hospitalares podem ser relacionadas ao uso de dispositivos médico-hospitalares infectados com bactérias formadoras de biofilme (Figura 5). Além disso, diversas doenças tem seu tratamento prejudicado devido à colonização por

bactérias oportunistas, sendo que as formadoras de biofilme podem representar um fator importante no desenvolvimento de doenças crônicas (ALVAREZ *et al.*, 2004).

A formação de biofilme é um mecanismo de virulência significativo na patogênese de muitos patógenos bacterianos de importância médica, como *Pseudomonas aeruginosa* (GELLATLY; HANCOCK; DISEASE, 2013), *Staphylococcus aureus* (GORDON; LOWY, 2008) e *Escherichia coli* (BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008). É grande o número de doenças atribuídas ou associadas a infecções de biofilme, sendo alguns exemplos comuns como colite (VON ROSENVINGE *et al.*, 2013), conjuntivite (BEHLAU; GILMORE, 2008), gengivite (COLOMBO *et al.*, 2016), uretrite (DELCARU *et al.*, 2016) e otite (POST, 2001).

Estima-se que aproximadamente 80% de todas as infecções microbianas em humanos são resultado direto de biofilmes (DAVIES, 2003; DECHO, 2013). Uma infecção relacionada ao biofilme de interesse médico são os biofilmes de *P. aeruginosa*, presente nos pulmões de pacientes com fibrose cística. Este patógeno oportunista é conhecido por causar infecções pulmonares agudas e crônicas que podem resultar em morbidade e mortalidade significativas (WAGNER; IGLEWSKI; IMMUNOLOGY, 2008).

Uma segunda área de considerável preocupação são as infecções crônicas de feridas. Sugere-se que as infecções de feridas altamente persistentes e relacionadas ao biofilme, geralmente envolvendo os patógenos *P. aeruginosa* e *S. aureus* (OMAR *et al.*, 2017), sejam responsáveis por mais de 80% das 100.000 amputações de membros realizadas em pacientes diabéticos em cada ano (JAMES *et al.*, 2018).

Além disso, a formação de biofilmes bacterianos é um comportamento de virulência adicional. Dentro do biofilme, a bactéria pode entrar em um estado metabólico inferior, dificultando a antibioticoterapia e as defesas imunológicas do hospedeiro (HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2013).

Compreender como as doenças dominantes reaparecem é fundamental para controlar os danos que causam. O mundo enfrenta constantemente desafios com doenças infecciosas, algumas das quais embora com potencial pandêmico recebem menos atenção ou são negligenciadas.

Em diversos pacientes, a resistência bacteriana aos antimicrobianos pode estimular o crescimento dos biofilmes à medida que as doses de antimicrobianos utilizadas podem produzir concentrações subinibitórias (KARATAN & WATNICK, 2009). Diante disso, faz-se necessário e urgente o desenvolvimento de novos agentes microbianos. Dentre algumas opções, destacam-se os peptídeos antimicrobianos (PAMS).

2.5 Peptídeos Antimicrobianos (PAMS)

Os peptídeos com atividade antimicrobiana (PAMS) podem ser encontrados em diversos organismos, tecidos e células, estando presentes em praticamente todas as formas de vida (BROWN; HANCOCK, 2006). Os PAMS são importantes componentes do sistema imune inato (HANEY *et al.*, 2017), participam do sistema de defesas das plantas, similarmente ao sistema imune inato dos seres humanos, protegendo-as de patógenos e pragas.

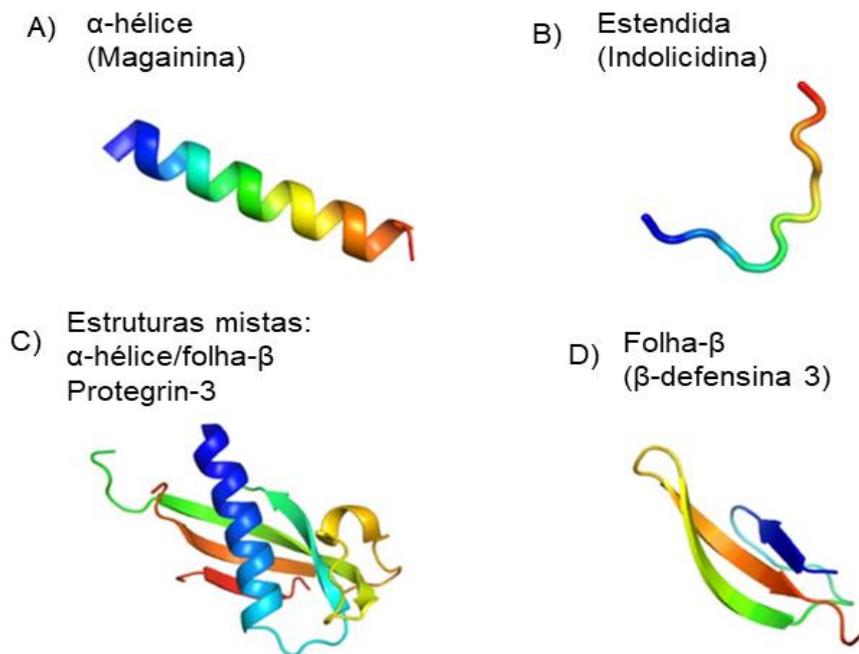
Em bancos de dados como *Antimicrobial Peptide Database* (APD, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) já existem catalogados mais de 3.569 peptídeos antimicrobianos naturais (WANG; LI; WANG, 2016).

Esses peptídeos catiônicos apresentam menos de 50 resíduos de aminoácidos (HANEY *et al.*, 2015; YUAN *et al.*, 2019), com baixa massa molecular (>10 kDa) e anfipaticidade (solubilidade tanto em ambiente aquoso como em membranas lipídicas). As estruturas tridimensionais influenciam nas atividades biológicas dos PAMS e são classificadas em quatro famílias (Figura 5) com base em seu dobramento sendo classificadas em α -hélice, folha- β , estruturas mistas e estendida ou *random coil* (WANG, 2013). O grupo dos peptídeos em α -hélices é composto por aqueles que formam hélices anfipáticas (em alguns casos) em membranas ou em locais semelhantes. Já os do grupo com folhas- β geralmente são estabilizados por pontes dissulfeto, apresentando estrutura rígida, como as estruturas mistas que apresenta as estruturas α -hélices e folhas- β (KANG *et al.*, 2017). Essas características propiciam a permeabilização das membranas celulares dos microrganismos, que podem se romper. Em virtude dessas características, os PAMS têm apresentado grande potencial em se tornarem uma nova classe de antimicrobianos (FOX *et al.*, 2012).

Os PAMS podem se apresentar em diferentes conformações, a estrutura α -hélice é uma das mais estudadas. Essa conformação está relacionada à estrutura anfipática dos PAMS, que apresentam uma porção hidrofóbica para inserção na membrana (MACCARI *et al.*, 2013). Os PAMS de folha- β são frequentemente estabilizados por pontes dissulfeto entre resíduos Cys conservados, como a família das defensinas, mas não interferem na atividade antimicrobiana com e sem ligação de dissulfeto (JIANG *et al.*, 2022). PAMS podem também não assumir uma estrutura secundária regular, assumindo uma forma estendida, que geralmente é correlacionada a um alto teor de resíduos específicos de aminoácidos em sua sequência, como resíduos Arg, Trp ou Pro (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011).

Essas moléculas apresentam um amplo espectro de atividades antimicrobianas, atuando contra bactérias, fungos, vírus e parasitas. Além disso, devido ao alvo principal de ação dos PAMS serem as membranas celulares e não um processo de biossíntese do microrganismo, eles são considerados uma opção para reduzir a chance de desenvolvimento da resistência (GHOSH; HALDAR, 2015).

Figura 5 – Classes estruturais tridimensionais, representadas por diferentes peptídeos antimicrobianos: **A)** α -hélice: Magainina (LONG-MEI; TIAN-TIAN; XIU-QING, 2015) **B)** Estendida: Indolicidina (BATISTA ARAUJO; SASTRE DE SOUZA; LORENZON, 2022) **C)** Estrutura mista: Protegrin-3 (USACHEV; EFIMOV; KOLOSOVA; KLOCHKOVA *et al.*, 2015) e **D)** Folha- β : β -defensina 3 (DHOPLE; KRUKEMEYER; RAMAMOORTHY, 2006) .



Como mencionado anteriormente, os PAMS podem ser considerados moléculas ubíquas na natureza, uma vez que são produzidos por todos os organismos vivos (SIERRA *et al.*, 2017). Esses peptídeos compartilham características em comum, como possuir de 12 a 50 resíduos de aminoácidos (HANCOCK; SAHL, 2006). Outra característica importante é a presença de resíduos catiônicos, como aminoácidos arginina ou lisina, que conferem uma carga líquida positiva em pH neutro (SHARMA *et al.*, 2018). Além disso, os PAMS geralmente apresentam um alto teor de aminoácidos hidrofóbicos (até 50% ou mais) (HANCOCK; SAHL, 2006).

Essas duas propriedades dos PAMS são altamente importantes para gerar uma estrutura anfipática, que é responsável por permitir que eles interajam com os componentes aniônicos das membranas microbianas, podendo penetrar nas células e causar danos à

membrana (AOKI; UEDA, 2013; MISHRA *et al.*, 2017). No entanto, uma presença excessiva da quantidade de aminoácidos hidrofóbicos presentes na sequência de PAMS pode resultar em menor seletividade e maior toxicidade para células de mamíferos (KANG *et al.*, 2017).

A conformação tridimensional dos PAMS está intimamente relacionada à sua atividade biológica, é definida pela sequência primária do peptídeo e pela interação com a membrana microbiana, uma vez que esses peptídeos geralmente assumem uma conformação anfipática na presença de uma membrana biológica (HANEY; MANSOUR; HANCOCK, 2017; NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011).

2.6 Mecanismo de ação do PAMS

Diversos são os mecanismos de ação de um PAM. Um dos principais modos de ação e mais amplamente estudado, é a permeabilização da membrana microbiana (SIERRA *et al.*, 2017). Inicialmente, para chegar à membrana celular ou dentro da célula bacteriana, os peptídeos precisam cruzar a barreira da parede celular. Assim, interações com componentes da parede celular, β -glucanos e quitina são essenciais (CABIB; ARROYO, 2013). Em alguns casos, os componentes da parede celular podem ser o próprio alvo, levando ao enfraquecimento dessa barreira e à perda da viabilidade da bactéria (RAUTENBACH *et al.*, 2016).

No combate a biofilmes maduros (estabelecidos), os mecanismos envolvidos que podem promover a erradicação consistem na penetração da matriz extracelular, causando a morte das células associadas ao biofilme, ou então, na ligação com endotoxinas e consequentemente neutralização das mesmas (DI LUCA; MACCARI; NIFOSÌ, 2014; JORGE; LOURENCO; PEREIRA, 2012).

Os PAMS podem evitar a formação do estilo de vida microbiano tanto na forma planctônica quanto na sua forma de vida em comunidade, onde torna-se mais difícil a sua destruição, algumas formas de ação dos peptídeos pode ser realizada através da: inibição da adesão inicial, pelo revestimento da superfície abiótica ou pela interação com a superfície bacteriana; pela prevenção da maturação do biofilme, alvejando os primeiros colonizadores da superfície; ou ainda, pela ligação às moléculas de QS, e assim, inibindo a comunicação bacteriana (DI LUCA; MACCARI; NIFOSÌ, 2014; JORGE; LOURENÇO; PEREIRA, 2012).

Para romper a membrana ou penetrar na célula microbiana, os PAMS devem primeiro interagir com a membrana. Como dito anteriormente, a maioria dos PAMS compartilha características estruturais que facilitam essas interações com as membranas

microbianas, sendo a primeira delas a atração eletrostática. Isso ocorre pela atração dos peptídeos carregados positivamente para os componentes carregados negativamente das membranas microbianas, como os lipídios carregados negativamente presentes na superfície externa da membrana citoplasmática (FJELL *et al.*, 2011).

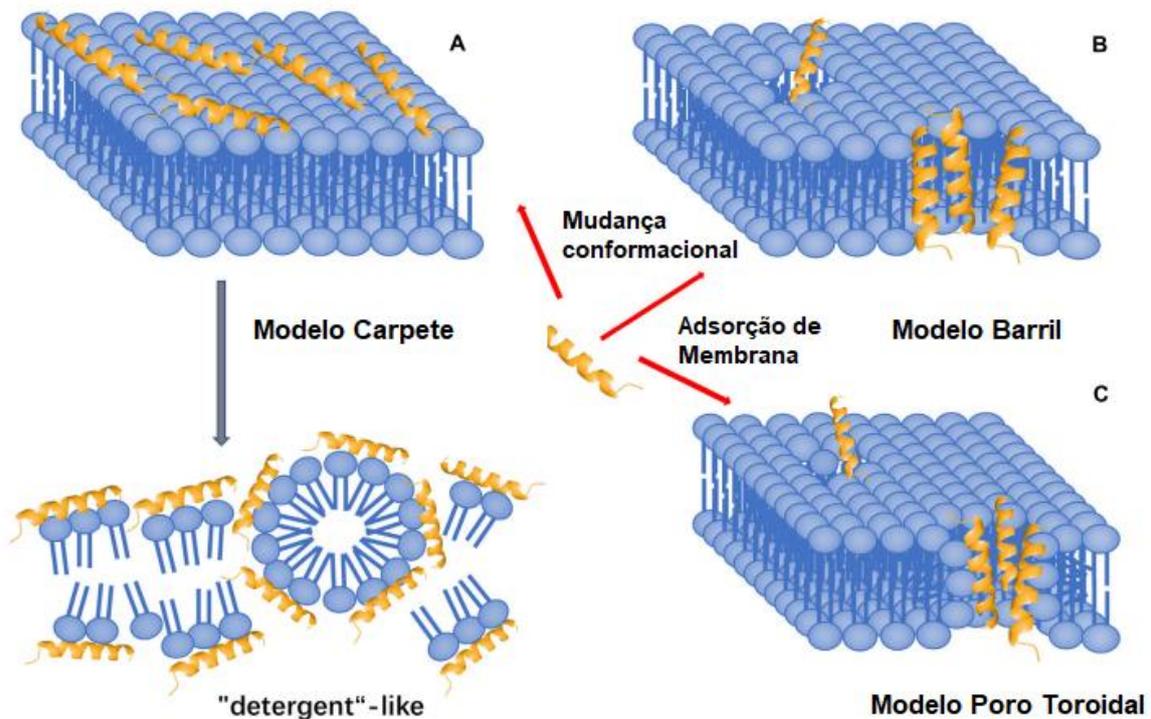
A próxima etapa é a inserção do PAM na bicamada lipídica, que é auxiliada pela interação com resíduos hidrofóbicos e a estrutura anfipática dos peptídeos (BROGDEN, 2005; SHARMA *et al.*, 2018). Alguns modelos foram propostos para explicar a ação de permeabilização da membrana dos PAMS, por exemplo, os modelos barril (*barrel-stave*), poro toroidal (*toroidalpore*) e tapete (*carpet-like*) (Figura 6). No modelo barril, o poro é formado pela inserção da porção hidrofóbica do peptídeo no núcleo lipídico da membrana. Ao atingir uma concentração limite, os monômeros peptídicos agregam-se, minimizando a exposição dos resíduos hidrofílicos do peptídeo e formando poros transmembrana dentro do núcleo da membrana hidrofóbica (SIERRA *et al.*, 2017; YEAMAN; YOUNT, 2003).

No entanto, no modelo de poro toroidal não há interações específicas de peptídeo-peptídeo, em vez disso, os grupos polares dos peptídeos se associam com os grupos de cabeça polar dos fosfolipídeos (HANEY; MANSOUR; HANCOCK, 2017; WIMLEY, 2010). Assim, no poro do modelo barril, a conformação hidrofóbica e hidrofílica dos lipídios não é alterada, enquanto nos poros toroidais essa conformação é interrompida (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018).

O modo de ação do modelo tapete, ao contrário dos demais modelos, não consiste na formação específica de poros (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018). Nesse caso, os peptídeos atuam de forma difusa, o que pode ser comparado à ação de um detergente (YEAMAN; YOUNT, 2003).

Os PAMS carregados positivamente são atraídos eletrostaticamente para os grupos de fosfolipídios de cabeça aniônica na superfície da membrana, assumindo uma conformação anfipática (SHARMA *et al.*, 2018; SIERRA *et al.*, 2017). Uma alta densidade de peptídeos se acumula na superfície da membrana formando uma cobertura semelhante a um tapete, levando à desintegração da membrana e a formação de micelas (HANEY; MANSOUR; HANCOCK, 2017; KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018).

Figura 6 – Ilustração esquemática dos eventos que ocorrem na membrana citoplasmática bacteriana após adsorção do PAM.



Fonte: Adaptado de (HUAN; KONG; MOU; YI, 2020).

A ruptura da membrana é o mais importante e o principal modo de ação para a atividade antimicrobiana desses peptídeos, porém não é o único modo de ação (SHARMA *et al.*, 2018). Estudos mostraram que alguns PAMS foram capazes de cumprir sua função antimicrobiana sem causar danos à membrana celular, através da inibição das funções celulares (BROGDEN, 2005; HANEY; MANSOUR; HANCOCK, 2017).

Assim, os alvos intracelulares representam o principal mecanismo de morte celular de alguns PAMS (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018). Uma vez dentro da célula microbiana, os PAMS podem inibir a síntese de parede celular, DNA, RNA e de proteínas, bem como inibir a atividade de enzimas (BECHINGER; GORR, 2017; GUILHELMELLI *et al.*, 2013). A soma desses efeitos pode levar ao colapso das vias metabólicas e resultar na morte celular (SHARMA; SAHOO; BHUNIA, 2016).

2.7 Bactérias patogênicas humanas de importância médica formadoras de biofilme

Staphylococcus aureus e sua importância no âmbito hospitalar

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva que naturalmente coloniza a pele e mucosas de humanos e animais. É mais frequentemente encontrado nas cavidades nasais devido a superfície destas células favorecer a adesão do microrganismo (BES *et al.*, 2018; LIU, 2009).

As mãos e a falta de hábitos de higiene contribuem para o transporte e a contaminação de objetos e outros indivíduos, o que facilita a propagação de *S. aureus* (WERTHEIM *et al.*, 2006). Estima-se que aproximadamente 20% da população são portadores persistentes da bactéria, enquanto 60% apresentam colonização transitória e os 20% restantes são considerados não portadores (BES *et al.*, 2018).

Além disso, profissionais da saúde saudáveis em ambiente hospitalar podem contaminar-se a partir de pacientes colonizados por *S. aureus*, de modo a tornarem-se reservatórios e promoverem a disseminação do microrganismo (LISTER; HORSWILL, 2015; LOWY, 1998). Desde a década de 90, *S. aureus* representa uma grande preocupação no âmbito hospitalar, pois já foi considerado como a principal causa de pneumonias e infecções pós-cirúrgicas adquiridas em hospital, e a segunda maior causa de infecções de corrente sanguínea (LOWY, 1998). A regularidade de *S. aureus* na mucosa humana configura um dos principais fatores desencadeantes de infecções nosocomiais e, associado ao surgimento de cepas resistentes, *S. aureus* persiste como um problema mundial até as duas últimas décadas (TONG *et al.*, 2015; WERTHEIM *et al.*, 2005).

Vale ressaltar ainda que o microrganismo possui também a capacidade de evadir o sistema imunológico do hospedeiro e colonizar outros sítios do organismo. Ademais, indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 1, usuários de drogas injetáveis, com insuficiência renal – que necessitam de hemodiálise – ou com síndrome da imunodeficiência adquirida, por exemplo, apresentam risco aumentado de desenvolvimento de doenças por *S. aureus* (GORDON; LOWY, 2008; LOWY, 1998). Uma vez instalado, o microrganismo pode causar diversas manifestações clínicas, que vão desde infecções de feridas, pele e tecidos moles (como foliculite, furúnculo e carbúnculo), até endocardite infecciosa, pneumonia, osteomielite, meningite e infecções relacionadas à próteses e implantes (LOWY, 1998; PEACOCK; PATERSON, 2015; TONG *et al.*, 2015).

S. aureus é uma das principais causas de infecção humana que pode evoluir para resistência a muitos antibióticos tradicionais. Infecções causadas por *S. aureus* resistente

à metilina (MRSA) resultam em morbidade e mortalidade significativas para pacientes tanto dentro como fora de ambientes de saúde. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou cepas de MRSA como um dos doze patógenos importantes que ameaçam a saúde humana. Isso se deve principalmente à dificuldade no tratamento de MRSA, que muitas vezes é resistente à múltiplas classes de antibióticos (LAKHUNDI; ZHANG, 2018). A maioria das infecções crônicas causadas por MRSA alavancam o estado do biofilme em sua patogênese, acrescentando assim a dificuldade ao tratamento com antibiótico (HOSSEINI *et al.*, 2020). Embora a vancomicina seja o antibiótico de primeira linha para o tratamento de bacteremia por MRSA, já foi relatado na literatura que MRSA diminuiu a sensibilidade à vancomicina (HOLUBAR *et al.*, 2020; NAVES; TRINDADE; GONTIJO FILHO, 2012). Portanto, há uma necessidade urgente de pesquisas para encontrar novos agentes antimicrobianos e novos métodos de combate a *S. aureus* e MRSA.

Acinetobacter baumannii

Acinetobacter baumannii é uma bactéria Gram-negativa que causa até 20% das infecções em unidades de terapia intensiva (UTIs) em todo o mundo, sendo também hábil na aquisição de resistência aos antimicrobianos. Nas UTIs, as infecções por esse microrganismo normalmente estão associadas ao processo de ventilação mecânica, podendo atingir os pulmões e a corrente sanguínea (IBRAHIM *et al.*, 2021).

As infecções por *A. baumannii* geralmente ocorrem em pacientes hospitalizados ou pacientes com contato contínuo com o sistema de saúde (ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018). Sem uma ação adequada por meio de uma melhor vigilância epidemiológica e desenvolvimento terapêutico, *A. baumannii* tem a capacidade de potencializar uma epidemia global (IBRAHIM *et al.*, 2021).

A ampla dispersão dessas bactérias se deve à sua versatilidade metabólica e nutricional. Características como a, utilização de várias fontes de carbono para crescimento, capacidade de crescer em diferentes condições de pH e temperatura, resistência à antibióticos e desinfetantes, tolerância a baixas umidades, além da capacidade de aderência e formação de biofilme contribuem para que esses organismos se adaptem a ambientes diversos (MORRIS *et al.*, 2019; MUNOZ-PRICE; WEINSTEIN, 2008).

A. baumannii é capaz de causar infecções graves em pacientes hospitalizados, incluindo infecções do trato respiratório inferior, principalmente em indivíduos sob ventilação mecânica, infecções de corrente sanguínea, do trato urinário e de feridas. Essas infecções são influenciadas por vários fatores como aqueles relacionados a complexidade

do ambiente hospitalar e dos setores de terapia intensiva, bem como idade do paciente, comorbidades apresentadas, duração da internação, dias de ventilação mecânica, doenças intercorrentes e o uso de agentes antimicrobianos prévios os quais favorecem a infecção (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; IBRAHIM *et al.*, 2021).

A elevada ocorrência de infecções nosocomiais causadas por *A. baumannii* pode estar relacionada a sua capacidade de causar surtos hospitalares, os quais são favorecidos pelos seus fatores de virulência e patogenicidade. No que diz respeito à adesão em superfícies abióticas, numerosos estudos revelaram uma alta propensão de isolados clínicos de *A. baumannii* para formar biofilme em diferentes substratos, como vidro ou plástico (TOMARAS *et al.*, 2003; EIJKELKAMP *et al.*, 2011). Esta capacidade de *A. baumannii* crescer como biofilme em superfícies abióticas desempenha um papel importante na causa de infecções nosocomiais, devido à colonização da superfície de equipamentos hospitalares e dispositivos médicos residentes, cateteres, cateteres venosos centrais (CVCs), tubos endotraqueais etc. (CHUANG *et al.*, 2012).

Além disso, investigações adicionais são necessárias como a correlação entre a capacidade de *A. baumannii* de aderir e formar biofilme, a propensão a causar surtos de infecções, risco de vida e aumento da resistência aos antibióticos. De fato, as diferenças quantitativas na formação de biofilme entre isolados clínicos em associação com a epidemia de cepas e a gravidade das infecções, foram pouco investigados até agora e essas questões importantes aguardam mais pesquisas neste campo (GURUNG *et al.*, 2013).

2.8 Métodos de desenhos computacionais de peptídeos antimicrobianos

O termo bioinformática foi lançado como uma nova área do conhecimento científico, representando a interação da biologia com a informática. Esta nova área passou a fazer parte de muitos projetos biológicos como forma de analisar grandes quantidades de dados, possibilidade de armazenamento em bancos de dados e apresentação de tais resultados em interfaces acessíveis via web, tornando a pesquisa mais interativa e dinâmica. Uma definição mais ampla da bioinformática seria a aplicação de ferramentas de computação para análise, captura e interpretação de dados biológicos.

A bioinformática é uma área interdisciplinar que absorve a ciência da computação, matemática, biologia, física e medicina (BAYAT, 2002). Na busca de novos peptídeos antimicrobianos faz-se o uso de recursos tecnológicos, como ferramentas computacionais, que auxiliam no desenho da sequência e estrutura de um peptídeo, fazendo cálculos de

probabilidade e cruzamento de dados em bancos para indicação se ele pode ou não ser antimicrobiano (TORRES *et al.*, 2019).

Nos bancos de dados de proteínas, várias sequências são anotadas como hipotéticas, incluindo sequências que se assemelham a peptídeos antimicrobianos. Uma maneira fácil de explorar os bancos de dados de proteínas consiste em procurar por sequências através de padrões ou usar a busca por similaridade, tais como alinhamentos locais. Este tipo de abordagem é comumente aplicado a peptídeos antimicrobianos estabilizados por cisteína, uma vez que as classes têm um padrão de cisteína típico. Quando comparado com o processo de purificação peptídica, a pesquisa no banco de dados tem as vantagens da identificação rápida de sequências e baixos custos, podendo ser utilizado no cruzamento de dados e obtenção de inúmeras informações relevantes ao avanço em pesquisas biológicas e tecnológicas.

Atualmente estão listados no *The Antimicrobial Peptide Database* (APD) (WANG; LI; WANG, 2016), cerca de 3569 PAMS, tanto naturais como otimizados, sendo o número para peptídeos antibacterianos de 3029 (último acesso em: 25 de janeiro de 2023. <http://aps.unmc.edu/ap/main.php>). Os peptídeos naturais, como o próprio nome sugere são definidos como aqueles encontrados na natureza. Enquanto os peptídeos otimizados são aqueles modificados físico-quimicamente com o objetivo de aperfeiçoar sua sequência e assim sanar algumas limitações, o que caracteriza o desenho racional (FJELL *et al.*, 2011). Como exemplo, os peptídeos desenvolvidos a partir de um modelo de peptídeo antimicrobiano com atividade definida para que problemas como: sequências alongadas de aminoácidos que aumentam os custos de produção, elevada toxicidade e instabilidade sejam resolvidos (FJELL *et al.*, 2011). O desenho racional é feito, portanto, através da otimização *in silico* para que as sequências peptídicas tenham funções biológicas melhoradas.

2.9 Espécie vegetal bioinspiradora

Das sementes de *Inga laurina* (Figura 7), uma espécie de árvore nativa do Brasil da família Fabaceae e não endêmica, foi isolado um inibidor de tripsina (ILTI) pertencente à família *Kunitz* de inibidores de serino peptidase. O ILTI é uma proteína composta por 178 resíduos de aminoácidos (MACEDO *et al.*, 2007), e apresenta-se como uma proteína multifuncional, onde já foram descritas atividades biológicas de grande interesse biotecnológico, como inibição de tripsina bovina (MACEDO *et al.*, 2007), atividade na endoprotease digestiva de insetos (MACEDO *et al.*, 2011), atividade inseticida (RAMOS *et*

al., 2012), atividade antimicrobiana (MACEDO *et al.*, 2016) e potente atividade antibiofilme e antitumoral da proteína recombinante de ILTI (CARNEIRO *et al.*, 2018), além de já terem sido realizados estudos de peptídeos sintéticos, projetados utilizando ferramentas computacionais, que apresentam características moleculares similares ao inibidor e que apresenta toxicidade frente uma espécie de praga que ataca lavouras de soja (MERIÑOCABRERA *et al.*, 2020).

Diante do potencial promissor de ILTI quanto às suas atividades biológicas, ele foi utilizado como inspiração para o desenho do peptídeo antimicrobiano deste trabalho. A sequência de ILTI utilizada está depositada no NCBI.

Figura 7 – *Inga laurina*: A) árvore), B e C) fruto verde, D) sementes. Fonte: (A, B) www.biologiadapaisagem.com.br, (C, D) www.clickmudas.com.br.



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenhar com o auxílio de ferramentas computacionais e avaliar o potencial antimicrobiano de um peptídeo inspirado em uma proteína de origem vegetal (ILTI) frente a bactérias patogênicas formadoras de biofilmes buscando compreender sua estrutura e modo de ação.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter a sequência de peptídeo antimicrobiano a partir da fragmentação *in silico* da proteína ILTI (*Inga laurina trypsin inhibitor*);
- Analisar, *in silico*, os fragmentos obtidos da sequência de aminoácidos visando reconhecer os que se enquadram dentro dos padrões compatíveis com peptídeos antimicrobianos;
- Conhecer as propriedades físico-químicas dos peptídeos;
- Realizar análises estruturais através de dicroísmo circular e modelagem molecular;
- Avaliar a atividade antibacteriana do peptídeo;
- Analisar a atividade do peptídeo frente a biofilmes pré-formados e maduros;
- Verificar a toxicidade do peptídeo *in vitro* e *in vivo*;
- Avaliar a toxicidade do peptídeo na sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella*;
- Investigar os mecanismos de ação da molécula.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Purificação de Proteínas e suas funções Biológicas (LPPFB), localizado na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Estudos complementares foram realizados com nossa rede de colaboradores interinstitucionais, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP).

4.1 Acesso ao patrimônio genético

O acesso ao patrimônio genético dos microrganismos utilizados durante a pesquisa e execução do projeto foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o número A315278.

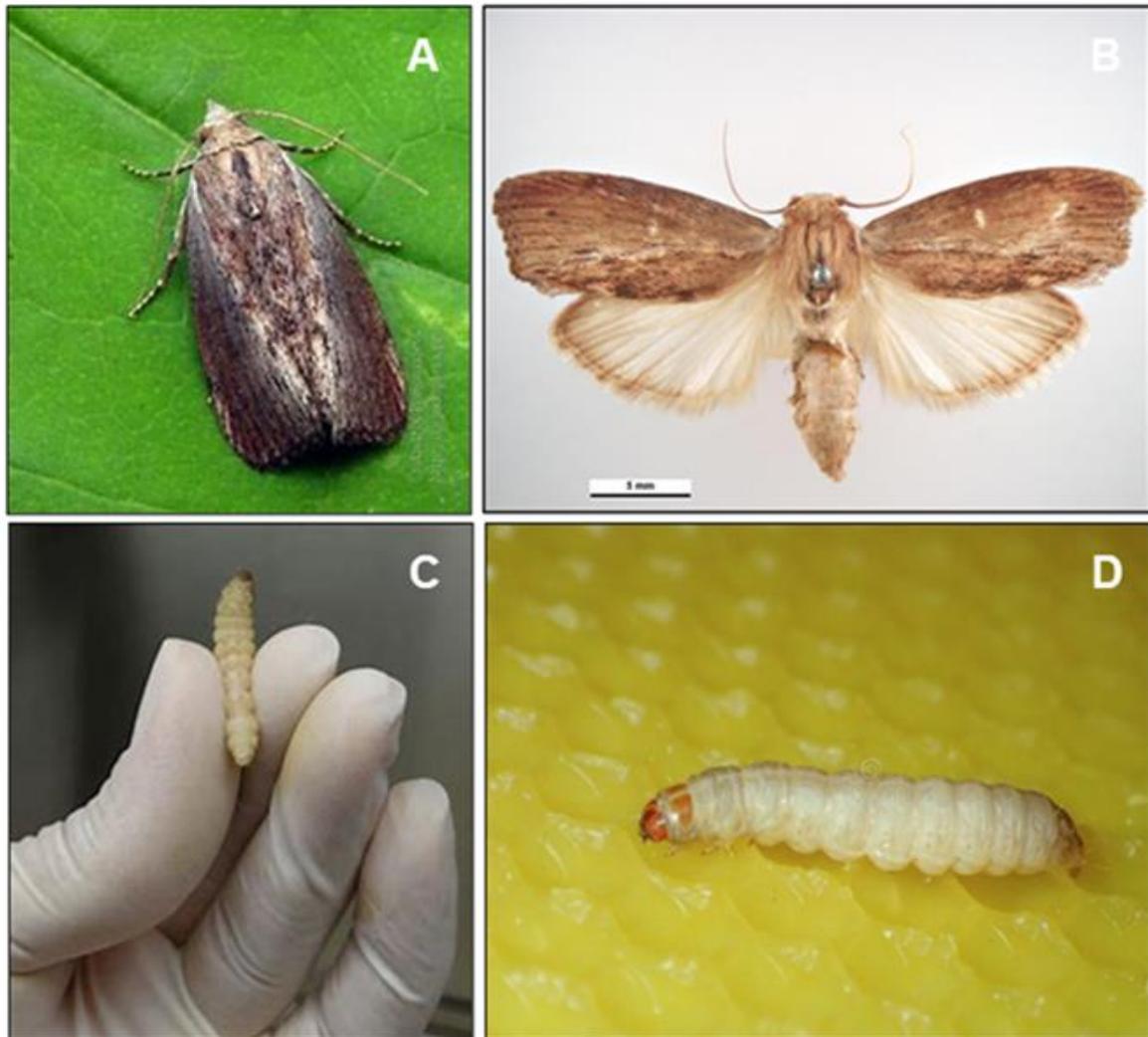
4.2 Microrganismos

Foram utilizadas as cepas obtidas comercialmente e catalogadas no *American Type Culture Collection* (ATCC): methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) ATCC 29213, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC 49453, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 29970, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Serratia marcescens* ATCC 13880, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.

4.3 Inseto

Foi utilizada uma espécie de inseto, *Galleria mellonella* pertence à ordem Lepidoptera, situada no grupo das traças, da família Pyralidae. O inseto foi mantido em condições ideais e rigorosamente controladas, com temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa e com dieta padrão.

Figura 9 – Inseto-praga utilizado no estudo. (A, B) adulto de *Galeria mellonella*; (C, D). larva *G. mellonella*. Fotos (A, B) obtidas de (Simon Hinkley & Ken Walker, Museum Victoria); Fotos (C, D).



4.4 Desenho computacional do peptídeo

A sequência de aminoácidos do peptídeo foi desenhada através da fragmentação *in silico* do inibidor de peptidase de sementes de *Inga laurina* (ILTI), cuja sequência encontra-se depositada no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), código GenBank: AFG28551.1 (link de acesso: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AFG28551.1>).

Para a obtenção *in silico* do peptídeo e predição da atividade antimicrobiana, a sequência de ILTI com 178 resíduos de aminoácidos foi submetida a clivagem através do *software Collection of Antimicrobial Peptides* (CAMPR3) o qual é dividido em quatro

algoritmos: *Support Vector Machine* (SVM), *Randon Forest* (RF), *Artificial Neural Network* (ANN) e *Discriminat Analysis* (DA) que buscam através de base de dados como UniProt e PubMed, PAMS já identificados que podem apresentar atividade antimicrobiana com base em cálculos de probabilidade.

Dentre as sequências fragmentadas, a localizada entre os resíduos 59-76 ISSPYKAAFIKTSWPLNL foi selecionada e serviu como modelo para o desenho computacional. A partir desta sequência peptídica, as modificações de resíduos e de suas localizações foram realizadas com o objetivo de formar um peptídeo com carga líquida positiva e uma porção hidrofóbica. Essas características determinam sua atividade antimicrobiana e seletividade gerando a seguinte sequência de estudo: IKRQYKRFFKLFKWFLKK, denominado IKR18, pelas iniciais dos três primeiros resíduos de aminoácidos e o número total presente na sequência de dezoito resíduos.

A fim de projetar um peptídeo de cadeia curta com atividade antimicrobiana potencializada, foi realizado o estudo de fragmentos com 18 resíduos de aminoácidos para obtenção de peptídeos com estrutura secundária em α -hélice. A clivagem e a predição antimicrobiana foi realizada no *software Collection of Antimicrobial Peptides* (CAMPR3) que consiste em um banco de dados para estudos sobre sequências e estruturas de PAMS com base em cálculos de probabilidade utilizando padrões (WAGHU; BARAI; GURUNG; IDICULA-THOMAS, 2016). Após isso o *software Helical Wheel Projections* (RICHARDSON *et al.*, 1986), foi utilizado para verificar o caráter anfipático da molécula e a análise de parâmetros físico-químicos foi realizada no *The Antimicrobial Peptide Database* (base de dados APD3) (WANG *et al.*, 2004, 2009 e 2016). O valor da hidrofobicidade média foi calculado através da ferramenta computacional *ExpASy – ProtScale* desenvolvida por Gasteiger *et al.* (2005). Após o desenho dos peptídeos, foram realizadas pesquisas em bancos de dados de PAM (APD3 e CAMP_{r3}), para checar possível sequência homóloga (WANG *et al.*, 2016. THOMAS *et al.*, 2010).

4.5 Aquisição do peptídeo

Após realizado toda etapa de desenho computacional, modelagem e validação, foi realizado o pedido da síntese do peptídeo na empresa AMINOTECH. As análises realizadas por espectrometria de massas MALDI-TOF confirmaram a massa de IKR18 gerando íon de m/z 2505.14Da demonstrado no espectro de massas.

4.6 Determinação da concentração de peptídeo em solução

A concentração de peptídeo em solução foi determinada pela absorbância aferida em espectrofotômetro a 280 nm. Utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração (mg/mL)} = (A_{280} \times \text{FD} \times \text{PM}) / \epsilon$$

Onde A_{280} é o valor da absorbância obtida em 280 nm, FD é o fator de diluição, PM é o peso molecular e ϵ é o coeficiente de extinção molar de cada resíduo. O coeficiente de extinção molar é calculado a partir da quantidade de resíduos de triptofano (W) e tirosina (Y). Multiplicar o número de resíduos de triptofano por 5560 e o número de resíduos de tirosina por 1200. Somando-se os dois valores, obtém-se o coeficiente de extinção molar. Triptofano e tirosina são cromóforos, por isso há necessidade de calcular esse coeficiente (SIGMA-ALDRICH, 2017).

4.7 Dicroísmo Circular (CD)

4.7.1 Preparação das vesículas

Para a realização dos estudos de interação peptídeo-membrana foram utilizadas vesículas (LUVs – *large unilamellar vesicles*) de diferentes composições lipídicas. No presente trabalho foram utilizados os lipídios: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo(1-rac-glicerol) (POPG), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE) e colesterol, os quais foram devidamente pesados e dissolvidos em 1 mL de clorofórmio/metanol (1:4) e evaporados sob fluxo de N_2 até a secagem completa da solução, possibilitando a formação de um fino filme lipídico na parede do tubo. Posteriormente, o solvente residual foi eliminado sob vácuo durante 12 horas, e ressuspenso (com tampão fosfato ou solução de carboxifluoresceína - CF) até a formação de uma suspensão homogênea de vesículas multilamelares. A solução foi submetida a 6 ciclos de congelamento-descongelamento, sendo em seguida, submetida a técnica de extrusão através de membranas de policarbonato com poro de 100 nm por 15 ciclos. No caso das vesículas carregadas com CF, a fração não incorporada no interior das vesículas, foi removida por filtração em gel utilizando uma coluna Sephadex G50 de 1 x 12 cm estabilizada com tampão Tris.HCl 0,01 mM; NaCl 0,15 mM; pH 7,0. A homogeneidade e

tamanho das LUVs foram verificados por DLS - *Dynamic light scattering* (Malvern instruments).

4.7.2 Estudos de dicroísmo circular (CD)

As análises de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Inc., Japão), utilizando uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico. Os espectros foram coletados em uma faixa de comprimento de onda de 190-280 nm, com 0,2 nm *step resolution* a 100 nm/s, a 30°C, e uma média foi obtida a partir de 6 varreduras, para cada espectro. Os peptídeos foram preparados em solução aquosa a 30 µM e submetidos a análise na presença de SDS e na presença de 50% (v/v) de trifluoroetanol (TFE). Os dados obtidos em foram convertidos em *elipticidade molar residual* $[\theta]$ de acordo com a equação:

$$[\theta] = \frac{\theta}{10 * C * l * n_r}$$

4.7.3 Estudos de permeabilização

A capacidade de permeabilização do peptídeo foi avaliada mediante a liberação de CF das vesículas. Esta por sua vez, foi determinada por meio do aumento da intensidade de fluorescência em 520 nm (comprimento de onda de excitação = 490 nm). Os experimentos foram realizados a 30°C com controle termostatizado Peltier. A determinação do valor correspondente a 100% de liberação de CF (100% de permeabilização) foi realizada após a adição de 1% do detergente Triton X-100. Os dados obtidos foram apresentados em função da porcentagem de liberação de CF após a adição de peptídeo no sistema, por meio da equação:

$$R\% = [(F - F_0)/(F_t - F_{in})] \times 100$$

onde F_0 e F representam a fluorescência inicial e final antes e após à adição do peptídeo. F_t é a fluorescência após a adição de Triton-X.

4.8 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

4.8.1 Microrganismos

Para determinar a atividade antimicrobiana do peptídeo IKR18 foram utilizadas as cepas obtidas comercialmente e catalogadas no *American Type Culture Collection* (ATCC): methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) ATCC 29213, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC 49453, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 29970, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Serratia marcescens* ATCC 13880, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.

As cepas foram mantidas a -20°C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) acrescido de glicerol a 20%. Para uso em ensaio, as cepas foram ativadas transferindo-as novamente para caldo BHI e mantidas em estufa a 37°C por 24 h para crescimento bacteriano e posteriormente repicadas utilizando a técnica de esgotamento por estrias, com alça de inoculação, para ágar *Mueller Hinton* (MHA). O repique foi incubado a 37°C por 24 h para obter colônias isoladas.

4.8.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) do peptídeo projetado foram determinadas utilizando a técnica de microdiluição em caldo, de acordo com os protocolos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). O peptídeo foi dissolvido em solução de água estéril e testado em concentrações que variaram de 4 µM a 0,5 µM. Ciprofloxacina e vancomicina foram utilizados como controle positivo. O meio de cultura *Muller Hinton* caldo sem adição de qualquer outro agente foi utilizado para verificar a esterilidade do mesmo.

O preparo do inóculo bacteriano foi realizado pelo método de crescimento direto. Colônias isoladas em MHA foram colocadas em solução de NaCl 0,9% estéril até atingir turvação igual a 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL⁻¹) determinada em turbidímetro (MS Tecnopon). A suspensão bacteriana foi diluída na proporção 1:20 (v/v), atingindo assim a concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL⁻¹. Essa suspensão diluída foi adicionada aos poços da microplaca contendo o meio de cultura MH, amostras do

IKR18 e o antibiótico, onde apresentaram uma concentração final de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL⁻¹.

Em cada poço foram adicionadas 80 µL de caldo MH, 10 µL das soluções de trabalho do peptídeo e posteriormente 10 µL do inóculo bacteriano. Como controle negativo de crescimento foram adicionados no poço 80 µL de caldo MH, 10 µL de ciprofloxacina em concentrações seriadas de 1,5 a 96,5 µM e 10 µL do inóculo bacteriano. Como controle positivo de crescimento foram adicionados no poço 80 µL de caldo MH, 10 µL de solução NaCl 0,9% estéril e 10 µL do inóculo bacteriano. O controle de esterilidade continha 80 µL de caldo MH e 20 µL de solução NaCl 0,9% estéril. Todas as amostras e controles foram testadas em triplicata. A microplaca foi incubada a 37°C sob agitação constante e monitorada por 18 h em intervalos de 30 min em leitor de microplaca Multiskan GO (*Thermo Fisher Scientific*) a 595 nm. A porcentagem de inibição do crescimento bacteriano foi calculada utilizando a última leitura da fase exponencial de crescimento bacteriano.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi aquela que inibiu 100% do crescimento bacteriano. Para avaliar a concentração bactericida mínima (CBM) do peptídeo, após a incubação da placa, transferiu-se 10 µL de cada poço das triplicatas para MHA, onde foram observadas o crescimento da bactéria por 24h. Havendo crescimento bacteriano foi determinado como sendo bacteriostático e quando não havia crescimento bacteriano como sendo bactericida.

4.9 Determinação da atividade bactericida tempo-dependente

O ensaio da atividade bactericida foi avaliado pelo tempo de morte dependente como descrito por Mitic-Culafic *et. al* (2005) para a bactéria *S. aureus* (MSSA) (ATCC 29213), metilina-resistente MRSA (ATCC 43300) e *A. baumannii* (ATCC 19906). O preparo do inóculo bacteriano foi realizado pelo método de crescimento direto. Colônias isoladas em MHA foram adicionadas em solução de NaCl 0,9% estéril até atingir suspensão igual a 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL⁻¹) determinada em turbidímetro (MS TecnoPON). A suspensão bacteriana foi tratada com o peptídeo IKR18 na CBM da bactéria correspondente, tratadas com a concentração de MBC de IKR18 para MSSA (1 µM), MRSA (2 µM) e *A. baumannii* (1 µM), respectivamente. O controle de crescimento usado foi a suspensão bacteriana sem tratamento e outra com o a CBM do antibiótico vancomicina e ciprofloxacina. Alíquotas de 10 µL das misturas (controles e tratamento) foram transferidas em placas de MHA nos

intervalos de tempo de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 270 e 300 minutos utilizando *swabs* para a técnica de esgotamento. As culturas tratadas e não tratada foram incubadas durante 24 h a 37°C. Foi realizado a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.10 Avaliação do mecanismo de ação - permeabilidade das membranas bacterianas

4.10.1 Determinação da captação do cristal violeta

As cepas bacterianas de MSSA (ATCC 29213) e MRSA (ATCC 43300) e *A. baumannii* (ATCC 19906) foram incubadas por 24 horas em BHI. À suspensão bacteriana foi ajustada a 0,5 da escala McFarland, determinada em turbidímetro. A suspensão bacteriana (180 µL) foi adicionada a solução do peptídeo IKR18 (20 µL) na CIM e CBM. O controle continha 180 µL da suspensão bacteriana e 20 µL de solução salina NaCl 0,9%. Após incubação a 37 °C por 4 h, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 9300 x g por 5 minutos e ressuspensas em solução salina contendo 10 µg/mL⁻¹ de cristal violeta. Amostra e controle foram incubados a 37°C por 10 minutos. Após esse período, a suspensão foi centrifugada a 13400 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e procedeu-se a leitura da absorbância a 570 nm (VAARA; VAARA, 1981). Realizou-se também a leitura da absorbância da solução de cristal violeta. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Para o cálculo da porcentagem de captação, considerou-se a solução de cristal violeta como 100%. O valor da captação de cristal violeta pela amostra e pelo controle foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$\text{Captação do cristal violeta} = \frac{ABS_{amostra}}{ABS_{solução de cristal violeta}} \times 100$$

Onde $ABS_{amostra}$ é a absorbância da amostra e $ABS_{solução de cristal violeta}$ é a absorbância da solução de cristal violeta.

4.10.2 Determinação do ensaio de captura do corante Sytox Green

A permeabilidade de membrana foi investigada utilizando o ensaio de captura do corante *Sytox Green*, como descrito por Mohanram & Bhattacharjya (2016) e modificações

propostas por Almeida *et al.*, (2021). No ensaio, uma suspensão de *S. aureus* (MSSA) (ATCC 29213), meticilina-resistente MRSA (ATCC 43300) e *A. baumannii* (ATCC 19906) cultivadas em caldo *Mueller Hinton* durante 18 h a 37°C, foram preparadas com OD 600 nm a 0,5 em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0. Em seguida, 280 µL da suspensão bacteriana foram transferidos para microplacas pretas de 96 poços, onde foi adicionado 10 µL de *Sytox green* a 30 µM e incubado durante 10 min a 37°C. Posteriormente, 10 µL do peptídeo projetado, a uma concentração 30 vezes maior que o CIM, para que ao final da concentração no poço fosse atingido a concentração de CIM/CBM, adicionado a cada poço, e o ensaio cinético foi realizado durante 120 min, com leituras a cada 5 min. O ensaio foi realizado com leitura de fluorescência, excitação a 485 nm e emissão a 520 nm em leitor de microplacas Varioskan Lux microplate reader (*Thermo Scientific*). O controle negativo de dano de membrana foi realizado com MSSA, MRSA e *A. baumannii* incubadas com 10 µL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0.

4.11 Efeito sinérgico do peptídeo IKR18 com antibióticos

O efeito sinérgico de IKR18 com vancomicina e ciprofloxacina foi investigado através do método de microdiluição em caldo checkerboard. Soluções do peptídeo IKR18, e dos antibióticos vancomicina para MSSA (1 µM) e MRSA (1,56 µM) e ciprofloxacina para *A. baumannii* (8 µM), de acordo com o antibiograma de cada cepa avaliada, foram preparadas a 4X CIM. A densidade de bactérias atingiu uma concentração final de $1,5 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹. O resultado do efeito combinatório, de maior eficácia foi a aplicação da menor concentração de cada combinação que inibiu completamente o crescimento microbiano. O índice de concentração inibitória fracionada (FICI) foi calculado por meio da equação: $\Sigma FIC = FICA + FICB$, onde o FIC é a razão da CIM do fármaco em combinação com a CIM sozinha (WHITE *et al.*, 1996; ODDS *et al.*, 2003). Foi considerado efeito sinérgico quando o FICI $\leq 0,5$, efeito indiferente quando FICI >1 e ≤ 4 e efeito antagonista quando FICI $>4,0$.

4.12 Efeito do tratamento sobre biofilmes

4.12.1 Preparação do IKR18

A partir da solução mãe, o peptídeo IKR18 foi diluído em caldo BHI com 1% de glicose, de forma a obter concentrações finais de 1xCIM e 10xCIM.

4.12.2 Ensaio de inibição da formação de biofilme

O ensaio foi realizado em placas de microdiluição de 96 poços e o meio de cultura utilizado foi o caldo BHI com 1% de glicose, conforme metodologia descrita por Emeri *et al.* (2019) 200µL do inóculo bacteriano ($1,5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹), foram adicionados aos poços e levados à estufa a 37°C por 2h, para promover a adesão celular inicial, para a etapa inicial de pré-adesão. Posteriormente, 200µL de solução estéril de NaCl 0,9% foi utilizada cuidadosamente para remover e lavar os poços com as células não aderentes, utilizando micropipeta automática. Assim, foram adicionados 200µL do meio de cultura contendo IKR18 1xCIM (1µM) e 10xCIM (10 µM) adicionado aos poços, a placa foi novamente incubada a 37°C por 24h. Feita a incubação, o meio foi removido e os biofilmes foram lavados uma vez com 200µL de solução salina 0,9% estéril, de forma a remover as células planctônicas e mortas. Por fim, os biofilmes foram processados para quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), conforme a seção 4.12.4. A vancomicina foi utilizada como controle positivo para as cepas MSSA e MRSA nas respectivas concentrações de (1µM e 1,56 µM). Enquanto o controle negativo *A. baumannii* (1µM) foram os poços com biofilme formado sem interferência do IKR18. Todos os ensaios foram realizados de forma independente e em triplicata (SARDI *et al.*, 2017).

4.12.3 Ensaio sobre efeitos no biofilme maduro (pré-formados)

O ensaio foi realizado em placas de microdiluição de 96 poços e o meio de cultura utilizado foi o caldo BHI com 1% de glicose, conforme metodologia descrita por Emeri *et al.* (2019) 200µL do inóculo bacteriano, foram adicionados aos poços e levados à estufa a 37°C por 24h, em aerobiose, para promover a formação do biofilme. Após cada poço foi lavado uma vez com solução salina 0,9% estéril para remover as células não aderentes. Assim, foram adicionados 200µL do meio de cultura contendo IKR18 (1xCIM e 10xCIM) e

a placa foi novamente incubada a 37°C por 24h, em aerobiose. Após o tratamento, o meio de cultura foi cuidadosamente removido e os poços foram lavados uma vez com 200µL de solução salina 0,9% estéril para a remoção das células planctônicas e mortas. Por fim, os biofilmes foram processados para quantificação das UFC, conforme a seção abaixo. A vancomicina e ciprofloxacina foi utilizada como controle positivo, enquanto o controle negativo foram os poços com biofilme formado sem interferência do IKR18. Todos os ensaios foram realizados de forma independente e em triplicata (SARDI *et al.*, 2017).

4.12.4 Viabilidade pós-tratamento: quantificação de UFC

Após os tratamentos com o peptídeo IKR18 e a lavagem com solução salina 0,9% estéril, os biofilmes foram desprendidos dos poços por meio da utilização de uma micropipeta automática de 50µL. Para isso, foram adicionados 50µL de salina 0,9% estéril nos poços e, com a ponta da ponteira, o fundo foi raspado e a suspensão homogeneizada, de forma a promover a dissociação das células. Assim, foram aspirados 50µL dessa suspensão, e foram individualmente transferidos a tubos contendo 450µL de solução salina 0,9% estéril (diluição 1:10). Os tubos foram submetidos ao vortex por 3 minutos para homogeneização. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas de cada tubo, e uma fração de 10 µL de cada diluição foi plaqueada utilizando a alça de Drigalski em ágar BHI. As placas foram incubadas a 37°C por 24h, e as UFC foram quantificadas. A sobrevivência do microrganismo foi definida como a porcentagem de UFC determinada comparativamente à sobrevivência de MSSA, MRSA e *A. baumannii* de biofilmes que não foram tratados com (SARDI *et al.*, 2017; EMERI *et al.*, 2019).

4.13 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Usamos a microscopia eletrônica de varredura para analisar os efeitos do IKR18 na estrutura e integridade dos biofilmes maduros de MRSA e *A. baumannii*. Primeiro, os biofilmes foram cultivados por 24 h a 37°C em placas de 6 poços tratadas (Corning BD Falcon). Os biofilmes foram tratados com IKR18 e antibióticos durante 24 h, a 10X MIC. Biofilmes não tratados foram incluídos como controle negativo. Os poços foram lavados duas vezes com solução de NaCl a 0,9% e fixados em glutaraldeído a 2,5% (em NaCl a 0,9%) por 2 h à temperatura ambiente. As amostras foram desidratadas em série com

etanol (80 a 100%) por 5 min, revestidas com ouro a 40 mA (BAL-TEC SCD 050) e observadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 5600 LV). Imagens representativas da erradicação de biofilmes maduros foram coletadas para investigar os efeitos do peptídeo na estrutura do biofilme.

4.14 Determinação da toxicidade

4.14.1 Atividade hemolítica do IKR18

No ensaio utilizado para determinar a atividade hemolítica do peptídeo IKR18, foi modificado a partir do protocolo de (UGGERHØJ; POULSEN; MUNK; FREDBORG *et al.*, 2015). Os eritrócitos de (sangue de carneiro desfibrinado – Newprov) foram lavados três vezes com solução salina, seguido de duas centrifugações por 8 min a 1380 \times g e uma centrifugação por 8 min a 2455 \times g, para a obtenção de uma solução concentrada de eritrócitos que posteriormente foi utilizada no ensaio. Após a lavagem, os eritrócitos foram ressuspensos para 0,5% (v/v) em solução salina. A suspensão eritrocitária (50 μ L) foi colocada em microtubos de polipropileno juntamente com a solução contendo o peptídeo IKR18 (50 μ L). O peptídeo foi submetido a diluições seriadas variando de 407,3 μ M a 0,79 μ M. Os microtubos foram incubados a 37°C durante 1 hora. Após a incubação, os microtubos foram centrifugados por 10 min a 2455 \times g. Os sobrenadantes foram transferidos para uma microplaca de poliestireno de 96 poços e foi realizada a leitura da absorbância a 414 nm. A hemólise foi observada pela coloração vermelha nos poços, em resposta à liberação da hemoglobina do interior dos eritrócitos. Para o cálculo da porcentagem de hemólise Triton X-100 (0,2%) foi usado como controle positivo para 100% de hemólise e a solução salina NaCl 0,9% foi usada como controle negativo de hemólise. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

$$\% \text{ hemólise} = \frac{(OD_{amostra} - OD_{NaCl\ 0,9\%})}{(OD_{Triton} - OD_{NaCl\ 0,9\%})} \times 100$$

4.15 *Galleria mellonella* modelo de estudo *in vivo*

4.15.1 Toxicidade sistêmica em *Galleria mellonella*

Este ensaio foi realizado para avaliar os efeitos tóxicos agudos do peptídeo. Este modelo invertebrado permite a avaliação preliminar da toxicidade sistêmica mediante tratamento com um determinado medicamento. Modelo de estudo no invertebrado *in vivo*, utilizando larvas de *Galleria mellonella*. Todo o ciclo de *G. mellonella* foi mantido a 37°C. Os insetos foram alimentados com uma dieta artificial de livre demanda composta de mel e farinha. Para o experimento, foram utilizadas 10 larvas selecionadas aleatoriamente para cada grupo, tratamento e controle pesando entre (0,2 e 0,3 g) e sem ou com poucos sinais de melanização (escurecimento do corpo das larvas). Dez microlitros (10 µl) do peptídeo em diluições seriadas variando de 407,3 µM a 0,79 µM, desenhado computacionalmente foram injetados na hemocele de cada larva através da última proleg esquerda utilizando uma seringa de *Hamilton* (Hamilton, Reno, NV). As larvas foram incubadas no escuro a 37°C e a sua sobrevivência foi registrada em intervalos selecionados durante 96 h. As larvas que não exibiram movimento ao toque e com altos níveis de melanização foram contadas como mortas (MEGAW *et al.*, 2015; SARDI *et al.*, 2017).

4.15.2 Atividade anti-infecciosa de IKR18 contra infecção bacteriana

Suspensões de bacteriana (1×10^7 UFC.mL⁻¹) preparadas em solução de NaCl 0,9%. Um volume de 10 µL de suspensão de bactérias foi injetado na última perna esquerda de cada larva com uma seringa Hamilton. Em seguida, as larvas foram tratadas com IKR18 no CIM e 10XCIM na última perna direita. O tratamento antibiótico foi incluído com vancomicina e ciprofloxacina no CIM. Após as injeções, as larvas foram mantidas em placa de Petri a 37°C no escuro. Cada tratamento foi composto por dez larvas. A análise da curva de sobrevivência foi realizada durante 5 dias, em intervalos de 24 horas (GOMES *et al.*, 2016).

4.16 Análise dos Resultados

Os resultados obtidos foram submetidos inicialmente a uma análise exploratória para a determinação do melhor teste estatístico, sendo em seguida aplicado o teste mais conveniente para cada análise do presente trabalho. O *software* utilizado foi o GraphPad Prism 7.0 e, em todos os ensaios, foi adotado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Sequência do peptídeo

O peptídeo analisado foi derivado da fragmentação *in silico* do ILTI (*Inga laurina* Tripsin Inhibitor), uma proteína intacta composta por 178 aminoácidos. Da clivagem desta proteína obteve-se um total de 159 aminoácidos. Desse total, apenas uma sequência de peptídeo foi escolhida para estudo e posterior síntese em laboratório e, por fim, ser testada através dos ensaios *in vitro*.

O peptídeo predito possui 18 resíduos de aminoácidos. Através da clivagem do ILTI, que serviu como base para obtenção do peptídeo sintético, foi levado em consideração a predição da atividade antimicrobiana informada pelos algoritmos do programa CAMPR₃ e características físico-químicas e estruturais obtidas *in silico*, como por exemplo, ponto isoelétrico, índice de Boman, carga líquida total, hidrofobicidade e anfipaticidade, peso molecular e estrutura secundária.

Através desses parâmetros físico-químicos foi possível fazer alterações no peptídeo descrito, visando o melhoramento da estrutura e das características físico-químicas de modo que houvesse, teoricamente, um aumento na atividade antimicrobiana.

Por meio do planejamento físico-químico guiado e auxiliado por ferramentas computacionais, obteve-se uma única sequência de PAM para formar uma estrutura anfipática. Para isso foi realizada a substituição de aminoácidos ao longo da sequência (Figura 10), originando o peptídeo denominado IKR18 (IKRQYKRFFKLFKWFLKK). O nome IKR18 foi escolhido com base nos três primeiros resíduos de aminoácidos: Ile (I), Lys (K) e Arg (R), e no número total de aminoácidos (18 resíduos).

As propriedades físico-químicas calculadas para o IKR18 foram uma carga líquida positiva de +8, índice de Boman de 2,21 kcal.mol⁻¹, com 44% de aminoácidos hidrofóbicos (Tabela 1), formando um peptídeo com peso molecular igual a 2.505,14 Da.

Os resultados da síntese de IKR18, como pureza e peso molecular (2.505,1 Da) foram confirmados por HPLC/MS-MS.

Tabela 1 – Características físico-químicas e estruturais da sequência do peptídeo IKR18 determinada pelo programa Antimicrobial Peptide Database (APD).

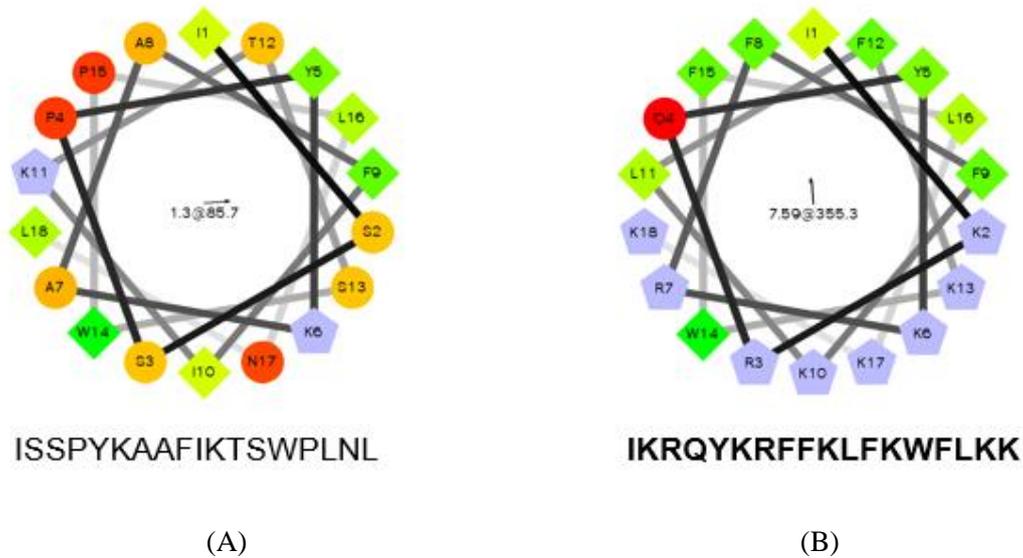
IKR18						
I-K-R-Q-Y-K-R-F-F-K-L-F-K-W-F-L-K-K						
Nome	Sequência	Carga Líquida Total	Índice de Boman (Kcal/mol)	pI	Massa Molar Teórica (Da)	Relação Hidrofóbica
IKR18	IKRQYKRFFKLFKWFLKK	+8	2,21	11,30	2505,14	44%

*Os resíduos em vermelho na sequência representam os seis aminoácidos conservados.

O peptídeo contém 18 resíduos de aminoácidos para formar uma estrutura em alfa-hélice. IKR18 apresenta a seguinte sequência de aminoácidos: Isoleucina – Lisina – Arginina – Glutamina – Tirosina – Lisina – Arginina – Fenilalanina – Fenilalanina – Leucina – Fenilalanina – Lisina – Triptofano – Fenilalanina – Leucina – Lisina – Lisina (IKRQYKRFFKLFKWFLKK). A sequência foi protegida pelo depósito de patente registrada sob o Número de Processo BR 10 2020 025823-0 A2.

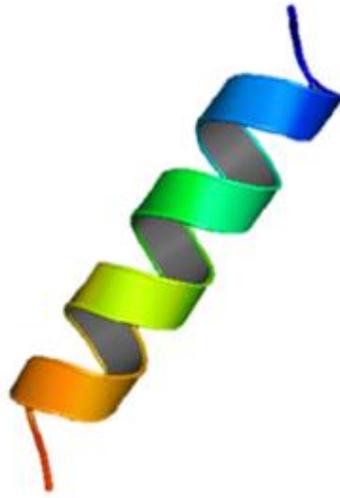
Para confirmar se a sequência do peptídeo de origem apresentava uma conformação anfipática, foi analisada a imagem gerada pelo *software Helical Wheel Projections*, através da qual foi constatado que seriam necessárias alterações na estrutura do peptídeo para que este atingisse a conformação desejada. Em vista disso, foi feita uma reordenação dos resíduos de aminoácidos e substituições de resíduos, a fim de corroborar com o aumento da atividade antimicrobiana teórica. Na Figura 9 pode-se observar que o peptídeo obtido a partir do desenho computacional possui uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica, garantindo assim o caráter anfipático.

Figura 9 – Diagrama da roda helicoidal do peptídeo IKR18 onde os resíduos hidrofílicos são representados como círculos, resíduos hidrofóbicos como losangos e os potencialmente carregados positivamente como pentágonos. Cores: o resíduo mais hidrofóbico é verde e a quantidade de verde diminui proporcionalmente à hidrofobicidade, com hidrofobicidade zero codificada como amarelo. Os resíduos potencialmente carregados são azul claros. (A) Sequência parental – sem modificação e (B) sequência modificada através das ferramentas computacionais (IKR18).



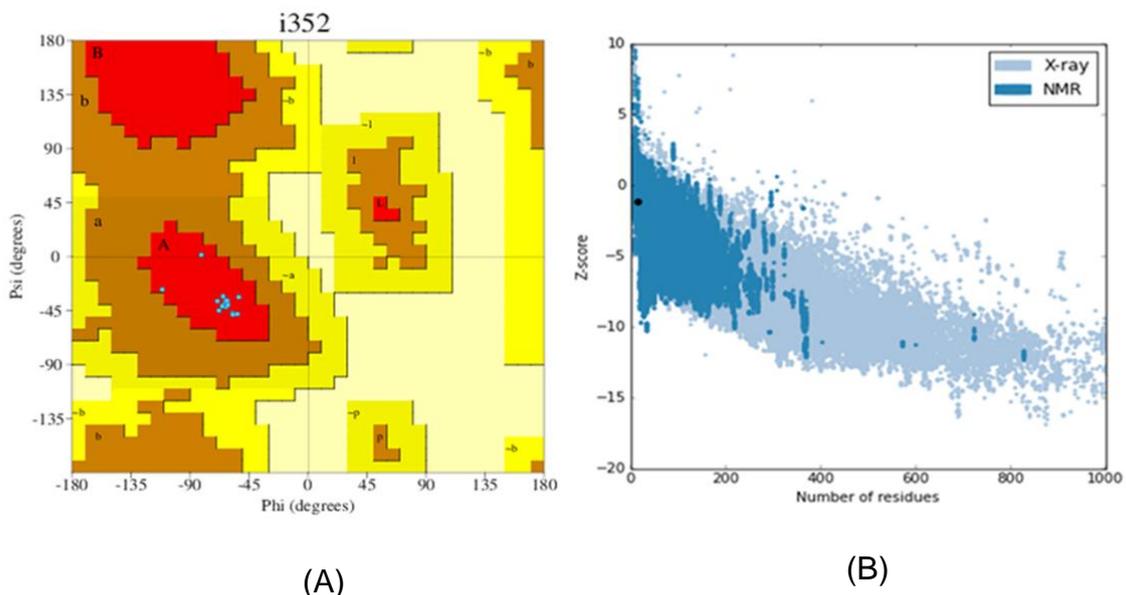
Após as melhorias na estrutura do peptídeo, foi realizada a modelagem de cada um dos peptídeos pelo *software* I-TASSER. Ao realizar a modelagem, verificou-se que o peptídeo obtido após o processo do desenho computacional, adquiriu conformação α -hélice, como mostrado na Figura 10.

Figura 10 – Estrura tridimensional do peptídeo IKR18 predita pelo *software* I-TASSER.



A validação é uma etapa essencial que pode ser executada em diferentes níveis de organização estrutural. Deve-se avaliar a qualidade do empacotamento global do peptídeo, os possíveis erros estruturais em regiões localizadas e os parâmetros estereoquímicos. A validação do peptídeo projetado IKR18 foi feita utilizando o *software* PROCHECK, o qual gerou os gráficos de Ramachandran mostrados na Figura 11. Buscando maior confiabilidade em relação a estrutura organizacional do peptídeo gerado, a validação foi feita também utilizando o *software* ProSa-web (Tabela 2).

Figura 11 – Diagrama de Ramachandran (A). Os pontos azuis e a área em vermelho representam os ângulos em regiões permitidas. A região em marrom representa adicionalmente favorável e a região em amarelo generosamente favorável. Gráfico Z-score (B), revela o índice de qualidade da estrutura presente na região em RMN, destacado em ponto preto.



A sequência de aminoácidos foi validada pelo ProSa-web (WIEDERSTEIN & SIPPL, 2007), apresentando valor de Z-score de -1,19 (Figura 12), que indica que a estrutura estava dentro da faixa de escores encontrados para peptídeos de tamanho similar depositados no banco de dados de proteínas – PDB (BERMAN *et al.*, 2000). Também foi feita a validação pelo *software* PROCHECK, que gerou um gráfico de Ramachandran, o qual mostrou 100% dos resíduos de aminoácidos nas regiões mais favoráveis (área vermelha), demonstrando que não havia nenhum impedimento em relação à estereoquímica (Tabela 2). Essa validação estrutural serve para observar a qualidade do peptídeo, os possíveis erros estruturais e os parâmetros estereoquímicos.

Tabela 2 – Interpretação *in silico* do resultado da análise de validação da estrutura do peptídeo IKR18 pelo programa Prochek e Prosa-Web.

VALIDAÇÃO	IKR18
Prochek	
Ramachandran plot	100%
Most allowed regions	0%
Generously allowed regions	0%
Disalloed regions	0%
G-factors*	0,2%
ProSA-Web	
Z-score*	-1,19

5.2 Aquisição do peptídeo

A empresa Aminotech realizou a síntese do peptídeo IKR18 e verificou a sua pureza em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em uma porcentagem de pureza com 99.8%. A massa molecular foi determinada por MALDI/TOF-MS indicando peso molecular de 2505,1. Da.

5.3 Dicroísmo circular

5.3.1 Determinação da estrutura secundária

Os resultados obtidos indicam que o peptídeo IKR18, utilizando a técnica de dicroísmo circular (DC) para investigar a estrutura secundária do IKR18. Na Figura 12, apresentamos que o IKR18 possui uma estrutura randômica (sem definição) em solução aquosa, com pico negativo máximo em torno de 200 nm. Após a incubação de IKR18 com

o indutor de estrutura, TFE, ou na presença de micelas SDS, o padrão de DC foi trocado, sugerindo alteração na estrutura secundária. A ocorrência de dois picos negativos, em 208 e 222 nm, e um pico positivo em torno de 190 nm corrobora a adoção de uma estrutura α -hélice bem definida (Figura 13). Um espectro de CD semelhante foi observado quando IKR18 foi incubado com POPG/POPC, fosfolipídios encontrados em membranas de bactérias, demonstrando que a superfície aniônica micelar bem como a presença de fosfolipídios favorecem a dinâmica conformacional de IKR18 no processo de interação peptídeo-membrana.

Figura 12 – Espectros de dicroísmo circular do peptídeo IKR18 a 30 μ M em PBS (■) e na presença de 50% TFE (●) (v/v) e de 50 mM SDS (▲) a 30°C.

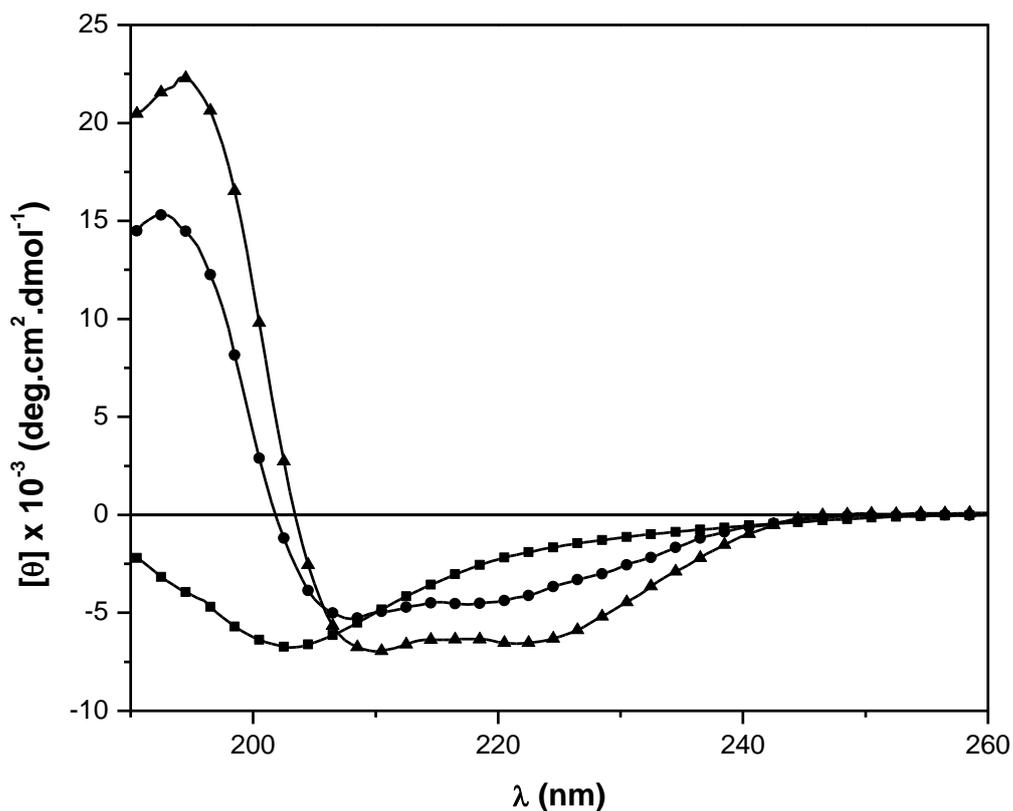
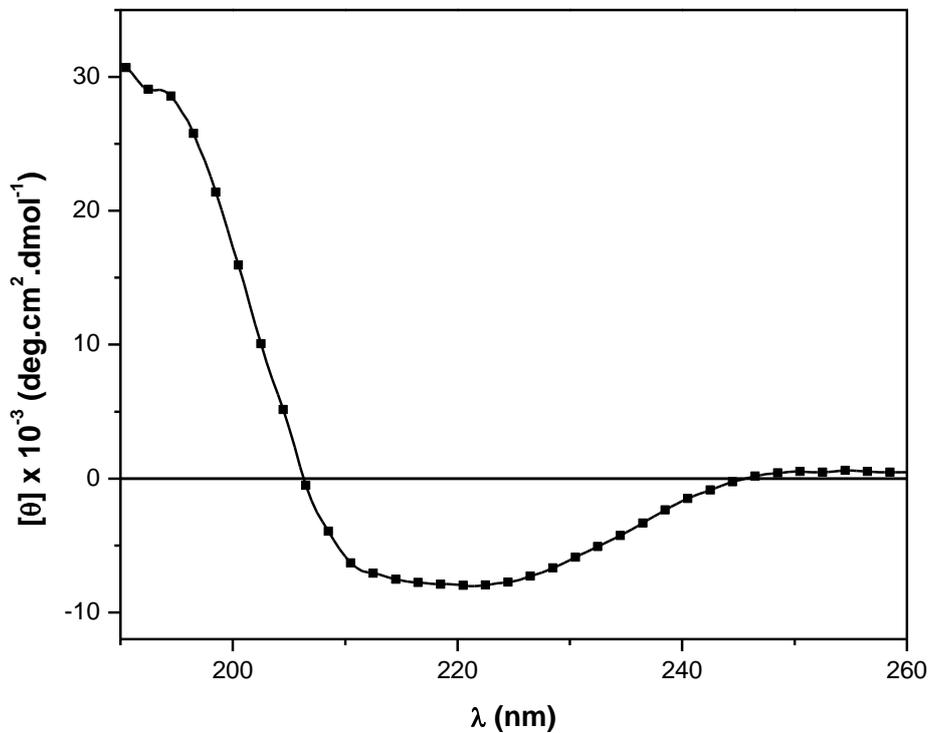


Figura 13 – Espectro de dicroísmo circular do peptídeo IKR18 a 30 μM na presença de POPG/POPC na relação peptídeo:lipídio de 1:20 a 30°C.



5.4 Determinação da atividade antibacteriana

5.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima e bactericida mínima

Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), através do método de microdiluição em caldo (CLSI, 2012), foram utilizadas diferentes concentrações do IKR18 frente a bactérias suscetíveis e resistentes descritas na metodologia. Foi estabelecido a CIM de cada bactéria testada por inibir 100% do crescimento durante 24h e da CBM após as 24h da atividade antibacteriana. De acordo com a Tabela 3, as cepas foram divididas entre Gram-positivas e Gram-negativas.

Os resultados referentes à atividade antimicrobiana do IKR18 são apresentados na Tabela 3. No geral, os valores de CIM e CBM variam de 1 μM a 4 μM , de acordo com as cepas testadas. Portanto, IKR18 foi eficaz no controle tanto de cepas Gram-negativas quanto Gram-positivas. Além disso, IKR18 foi incubado com eritrócitos de sangue desfibrinado para investigar suas propriedades hemolíticas. A concentração de peptídeo necessária para desencadear 50% de hemólise (HC_{50}) foi obtida e utilizada para determinar

o índice de seletividade (IS), razão entre a HC_{50} e a CIM. O IS variou entre 6,25 a 25, sugerindo que em concentrações efetivas para controle do crescimento bacteriano, o peptídeo não afeta a integridade dos eritrócitos.

Tabela 3 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) pelo tratamento com o peptídeo IKR18.

Cepas Bacterianas	*CIM (μM)	**CBM (μM)	***IS
Gram-negativa			
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	1	1	25.00
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	1	1	25.00
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	1	2	25.00
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	1	2	25.00
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	3	3	8.33
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 13182	4	4	6.25
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	4	4	6.25
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	4	4	6.25
Gram-positiva			
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) ATCC 29213	1	1	25.00
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 29970	1	1	25.00
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 43300	2	2	12.50
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 49453	3	3	8.33
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	4	4	6.25
Tipo Celular	Atividade Hemolítica (HC_{50} - μM)		
Eritrócitos	25		

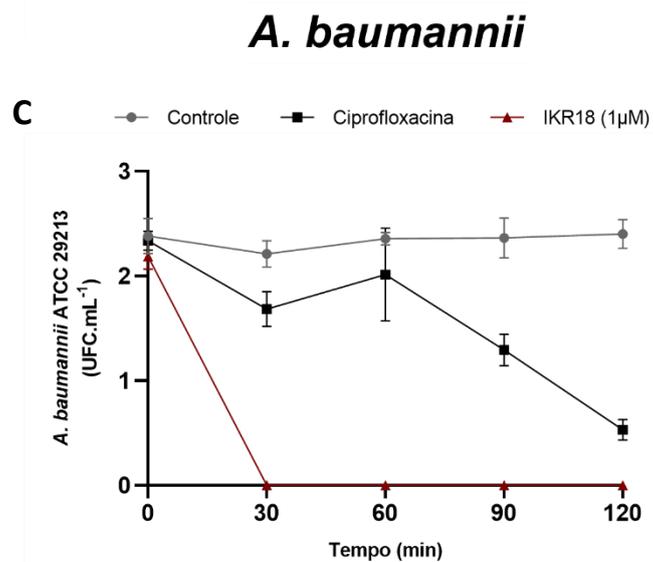
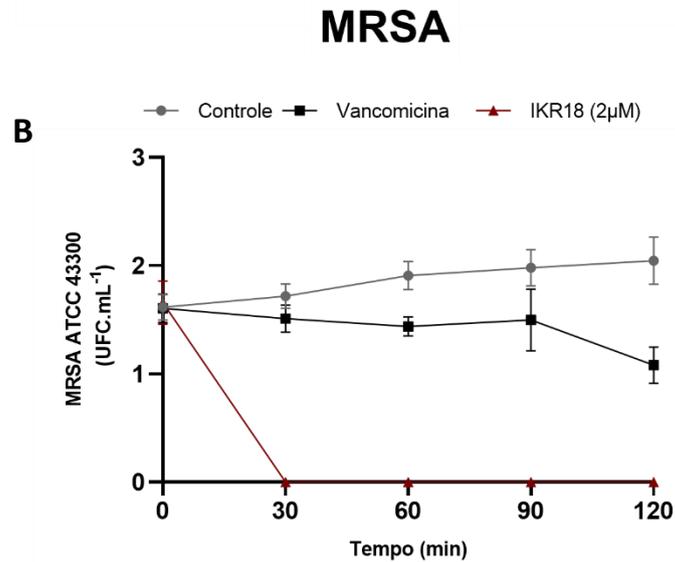
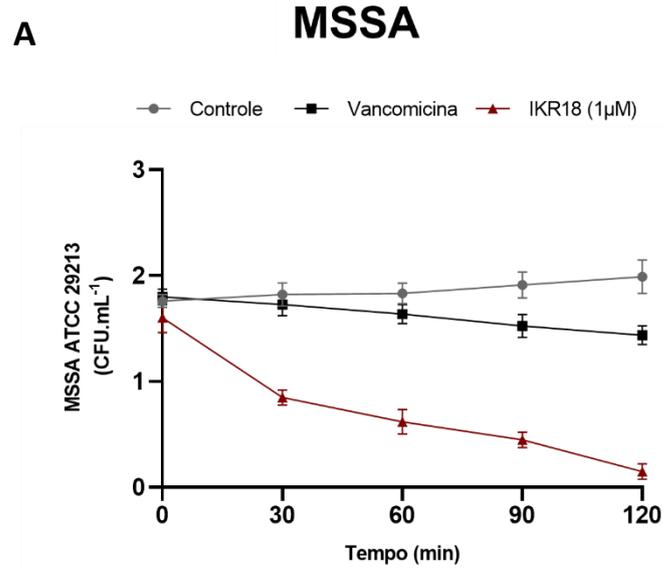
*CIM: Concentração Inibitória Mínima; **CBM: Concentração Bactericida Mínima; Bacteriostático (CBM/CIM \geq 4) Bactericida (MBC/MIC $<$ 4) activity. ***IS: Índice de seletividade, concentração de peptídeo necessária para desencadear 50% de hemólise (HC_{50}), razão entre a HC_{50} e a CIM.

Dentre todo o conjunto de bactérias, as cepas de *S. aureus* sensível à metilina (MSSA), *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) e *A. baumannii* foram escolhidas para ensaios posteriores, uma vez que essas cepas apresentam maior relevância clínica, segundo a OMS.

5.5 Determinação da atividade bactericida tempo-dependente

A Figura 14 mostra a cinética de morte de MSSA, MRSA e *A. baumannii* tratados com IKR18. O peptídeo provocou uma morte completa de MRSA e *A. baumannii* em 30 min. A cepa MSSA apresentou um padrão distinto de morte bacteriana, com redução linear de UFC completada em 120 min. Entre os antibióticos, a vancomicina provocou uma redução moderada na UFC de 90 min. A maior redução de UFC foi obtida para *A. baumannii* tratada com ciprofloxacina, apresentando redução de 80% em 120 min. O controle negativo apresentou alta UFC ao longo do ensaio. Com base em estudos de cinética de *time-kill*, demonstrou que o IKR18 possui um mecanismo de ação diferente na morte bacteriana, quando comparado aos antibióticos comerciais.

Figura 14 – Efeito bactericida de IKR18. O peptídeo, vancomicina e ciprofloxacina foram usados para obter curvas de tempo de morte. As cepas MSSA (A), MRSA (B) e *A. baumannii* (C) foram incubadas no CBM durante 120 min. Os resultados são apresentados como UFC.mL⁻¹.

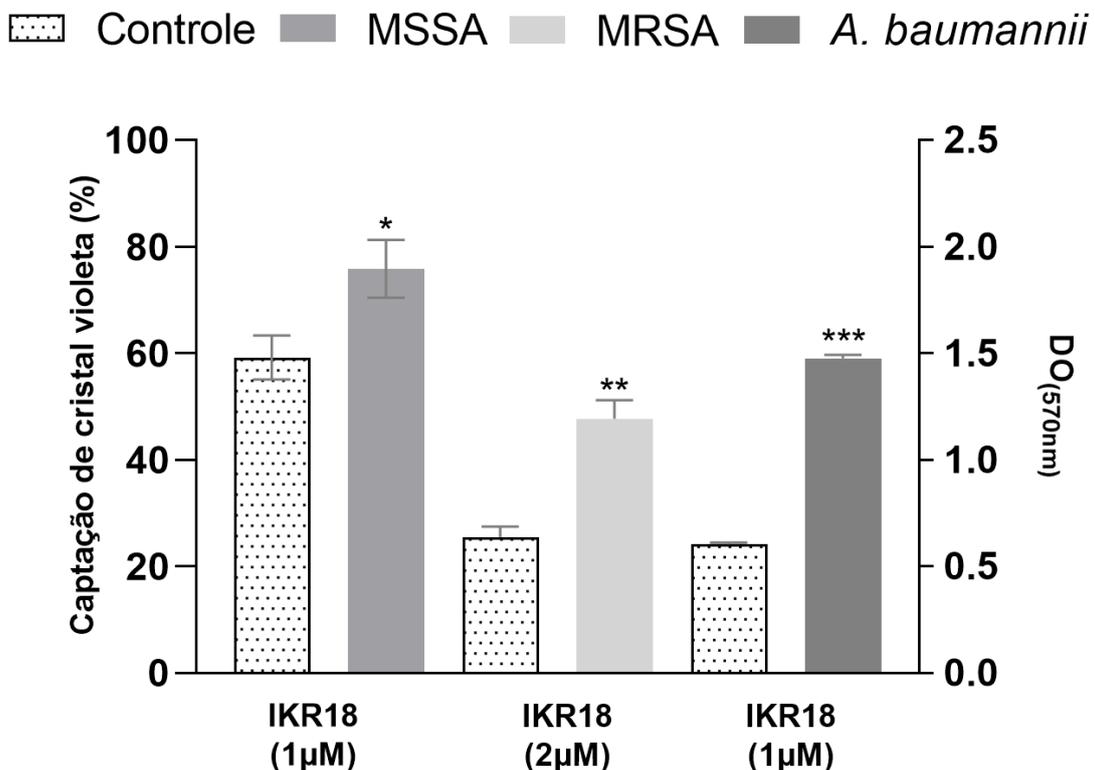


5.6 Permeabilidade de membrana bacteriana

5.6.1 Ensaio da captação do cristal violeta

A investigação da possível captação do cristal violeta foi realizada através da incubação do peptídeo IKR18 com as cepas bacterianas MSSA, MRSA e *A. baumannii* na CIM e CBM de cada. O aumento de captação do cristal violeta para a cepa MSSA na CBM foi de aproximadamente 78% comparada ao controle, para a cepa MRSA houve um aumento em torno de 43% comparada ao seu controle e *A. baumannii* de 60% de captação de cristal violeta (Figura 15). De acordo com os resultados, o aumento da captação de cristal violeta foi expresso em porcentagem, sugerindo que o peptídeo IKR18 possa provocar e alterar a integridade da membrana celular das cepas bacterianas.

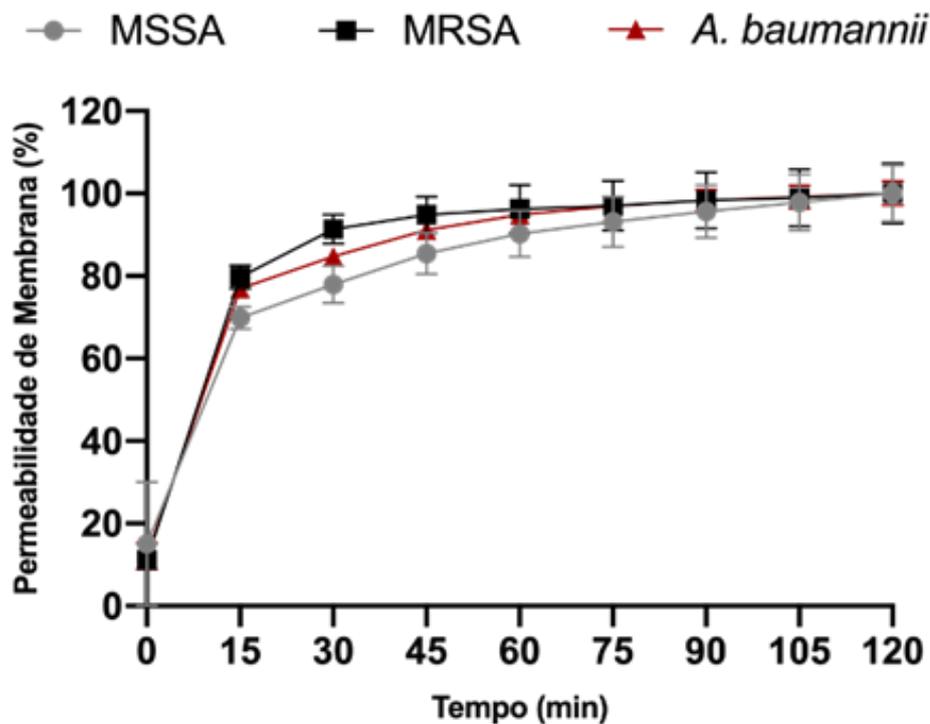
Figura 15 – Porcentagem de captação do cristal violeta das cepas MSSA, MRSA e *A. baumannii* com o tratamento do peptídeo IKR18. Controle corresponde a bactéria incubada sem tratamento. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Tukey, com $p < 0,05$.



5.6.2 Ensaio com *Sytox green*

Outros ensaios foram realizados para entender se o mecanismo de ação do IKR18 envolve danos nas membranas bacterianas, mecanismo compatível com o time-kill observado no ensaio anterior. A Figura 16 mostra a absorção de *Sytox green* por bactérias tratadas com IKR18. O peptídeo desencadeou um aumento acentuado na captação de *Sytox* em 15 min, com uma captação média em torno de 80% para MRSA e *A. baumannii*, em 60 min. A cepa MSSA apresentou um padrão distinto de captação de *Sytox*, com permeabilização completa da membrana entre 105 e 120 min. Os resultados indicam, portanto, que o mecanismo de ação do IKR18 envolve danos na membrana bacteriana. O maior tempo necessário para aumentar a captação de *Sytox* pela cepa MSSA também corroborou o ensaio cinético *time-kill*, sugerindo uma relação entre a ocorrência de danos na membrana e o tempo de morte bacteriana tardia.

Figura 16 – Captação de *Sytox green* por bactérias tratadas com IKR18. A fluorescência foi determinada para MSSA (A), MRSA (B) e *A. baumannii* (C) expostos a IKR18 em CBM. Os ensaios foram realizados em triplicado.



5.7 Efeito sinérgico do peptídeo com antibióticos

Uma matriz de concentração utilizando IKR18 e os antibióticos vancomicina e ciprofloxacina foi construída para investigar a ocorrência de efeito sinérgico entre os compostos. De acordo com o índice de concentração inibitória fracionada (CIF), verificamos que a combinação de IKR18 e vancomicina contra MSSA e MRSA apresentou efeito aditivo (Tabela 4). Curiosamente, a combinação de IKR18 e ciprofloxacina mostrou um efeito sinérgico contra *A. baumannii*. Portanto, a combinação de antibióticos com IKR18 pode representar uma nova abordagem promissora para o controle bacteriano.

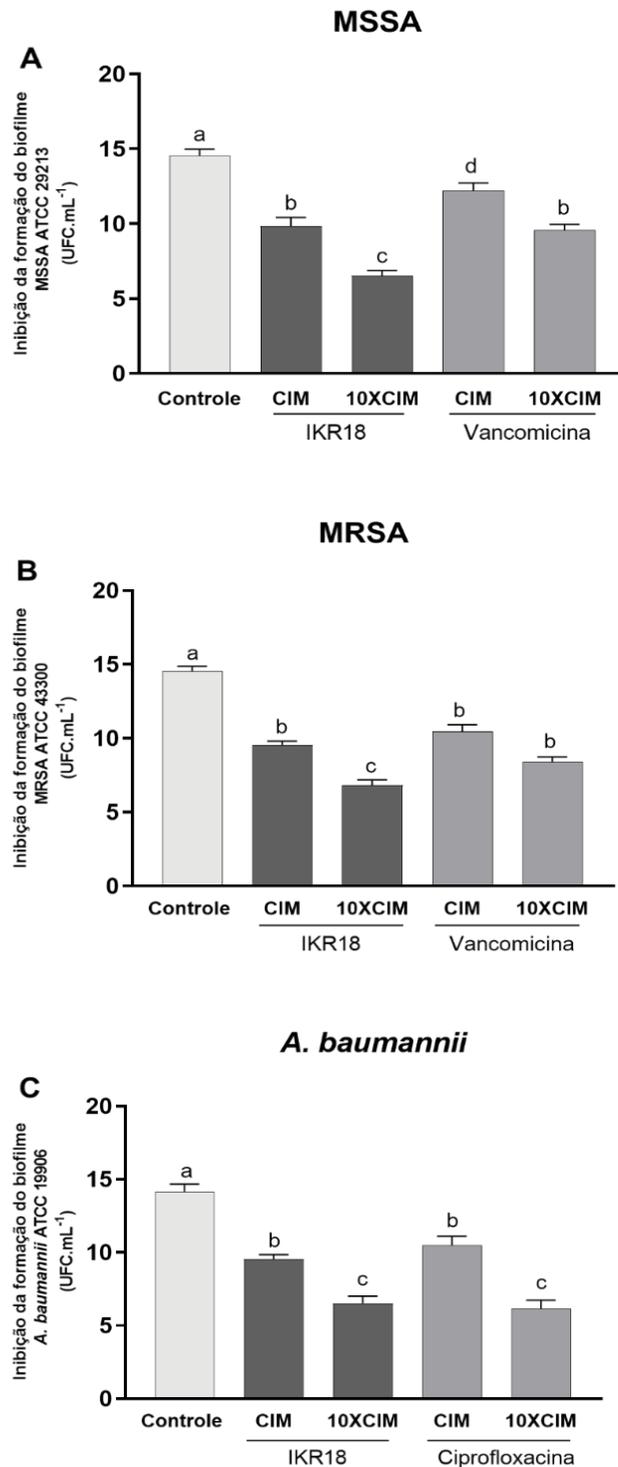
Tabela 4 – Avaliação da combinação entre IKR18, vancomicina e ciprofloxacina para inibir a formação de cepas de MSSA, MRSA e *A. baumannii*. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF).

Microrganismos	Agentes	CIM (μM)				ΣICIF	Resultado
		Individual		Combinação			
MSSA ATCC 29213	IKR18 (a) + vancomicina (b)	a	b	a	b	$\text{ICIF}_A + \text{ICIF}_B$	Aditivo
		1.0	1.0	0.0019	0.5	0.61	
MRSA ATCC 43300	IKR18 (a) + vancomicina (b)	2.0	1.56	1.0	0.39	0.75	Aditivo
<i>A. baumannii</i> ATCC 19906	IKR18 (a) + ciprofloxacina (b)	1.0	8.0	0.0078	0.25	0.03	Sinérgico

5.8 Efeitos do IKR18 na inibição da formação de biofilme

Como o IKR18 mostrou atividade antimicrobiana contra bactérias planctônicas, buscou-se investigar mais profundamente os efeitos do peptídeo em biofilmes de bactérias. A Figura 17 mostra os efeitos de IKR18 na inibição da formação de biofilme de MSSA, MRSA e *A. baumannii*. Comparado ao controle, o IKR18 inibiu a formação de biofilme em ~30% na CIM, uma redução semelhante provocada pelo tratamento com antibióticos. Concentrações crescentes de IK18 ou antibiótico para 10XCIM causaram uma inibição significativa da formação de biofilme. No entanto, um aumento de 10 vezes em IKR18 ou antibióticos CIM aumentou a inibição da formação de biofilme em 45-55%. Esses dados sugerem que o efeito do IKR18 e dos antibióticos na inibição da formação de biofilme não foi dependente da dose.

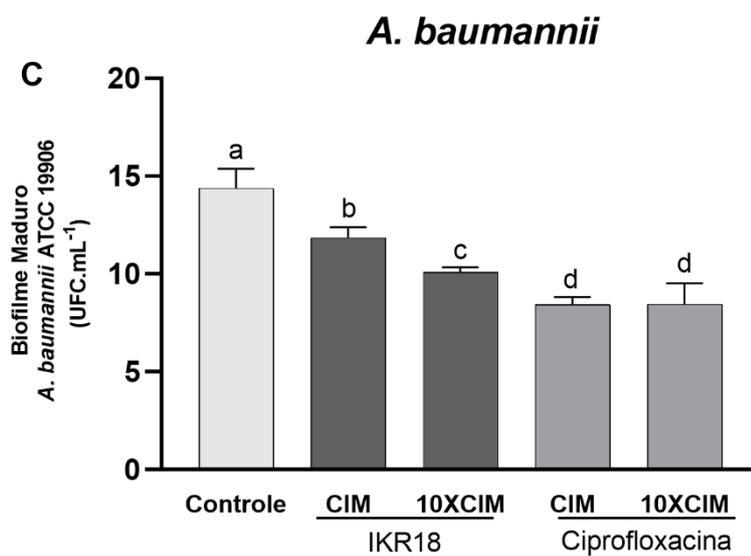
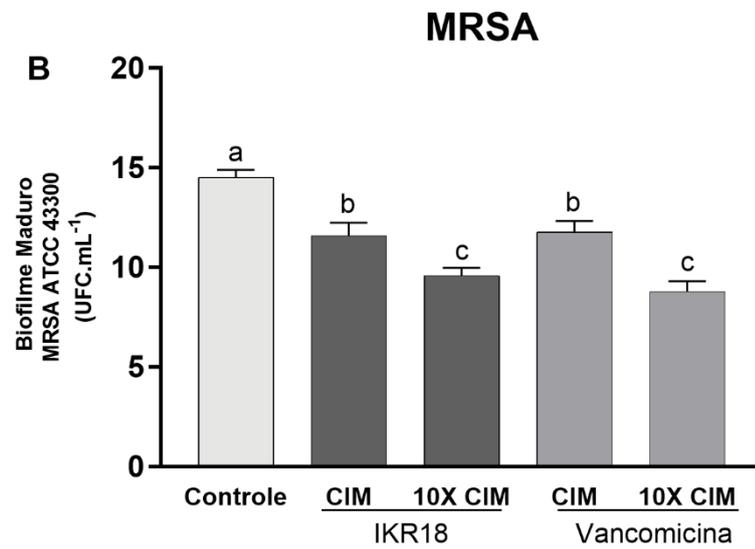
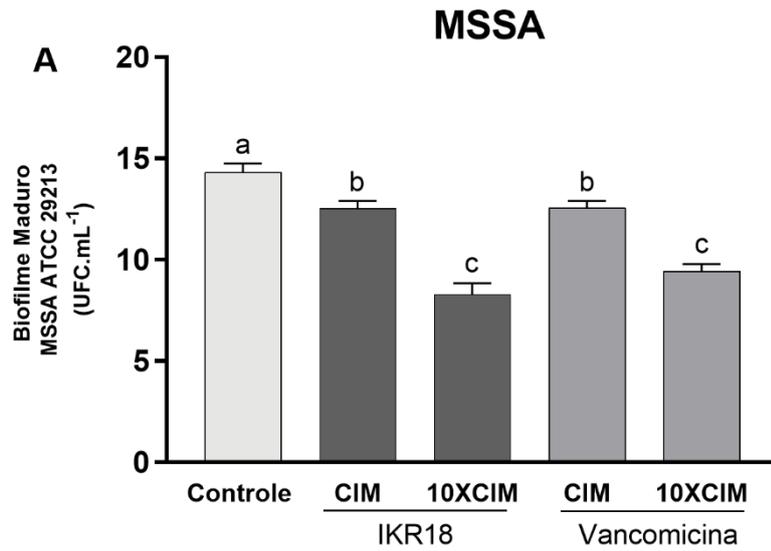
Figura 17 – Efeito de IKR18 na inibição da formação de biofilme. Análises quantitativas (UFC.ml⁻¹) de biofilmes controle e biofilmes tratados com IKR18 e antibióticos contra MSSA (a), MRSA (b) e *A. baumannii* (c). Os efeitos foram analisados em MIC e 10xCIM. A análise anova foi seguida pelo pós-teste de tukey ($p < 0,05$) e letras diferentes indicam diferença estatística.



5.9 Efeitos do IKR18 na formação do biofilme maduro

Os efeitos do IKR18 na erradicação de biofilmes maduros também foram investigados. IKR18 provocou uma redução significativa na massa de biofilme no CIM, cerca de 13-20% (Figura 18). Uma redução semelhante foi observada para vancomicina no CIM contra MSSA e MRSA (Figura 18A e 18B). A ciprofloxacina apresentou os melhores resultados na erradicação do biofilme maduro, reduzindo ~42% da massa de biofilme na CIM (Figura 18C). IKR18, vancomicina e ciprofloxacina não mostraram efeito dose-dependente na erradicação do biofilme, pois em concentrações mais elevadas destes não houve redução proporcional da massa do biofilme. Mesmo em 10XCIM, a ciprofloxacina não aumentou a taxa de erradicação contra *A. baumannii*.

Figura 18 – Efeitos do IKR18 na erradicação de biofilmes maduros. Análises quantitativas (UFC.mL^{-1}) de biofilmes controle e biofilmes tratados com IKR18 e antibióticos contra MSSA (A), MRSA (B) e *A. baumannii* (C). Os efeitos foram analisados em CIM e 10XCIM. A análise ANOVA foi seguida pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) e letras diferentes indicam diferença estatística.



5.10 Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes

Por fim, a microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar os efeitos do IKR18 na estrutura e integridade dos biofilmes de MRSA (Figura 19) e *A. baumannii* (Figura 20). Através das imagens coletadas, notou-se que biofilmes maduros tratados com IKR18 ou antibióticos sofrem danos na arquitetura geral. Foi observada a formação de trincas na estrutura do biofilme (Figura 19C e 20C). Utilizando aumentos de 15.000x (Figura 19D e 20D), é possível visualizar que as falhas observadas (indicada pelas setas) na estrutura do biofilme ocorreram devido à morte de bactérias que estavam envolvidas na matriz extracelular. Na Figura 19D, é possível visualizar o arcabouço da matriz que envolveu as bactérias mortas. Com a morte das bactérias que encheram o local, podemos observar o espaço vazio (setas). Na Figura 20D, é possível visualizar bactérias mortas que tiveram a integridade de suas membranas comprometida pela ação do IKR18 (setas).

Figura 19 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura (5.000 x) mostrando biofilme de *S. aureus* resistente à meticilina. Células não tratadas (A), tratadas com vancomicina (B) e tratadas com IKR18 (C). Imagem detalhada (15.000 x) (D) do biofilme IKR18 tratado com MRSA.

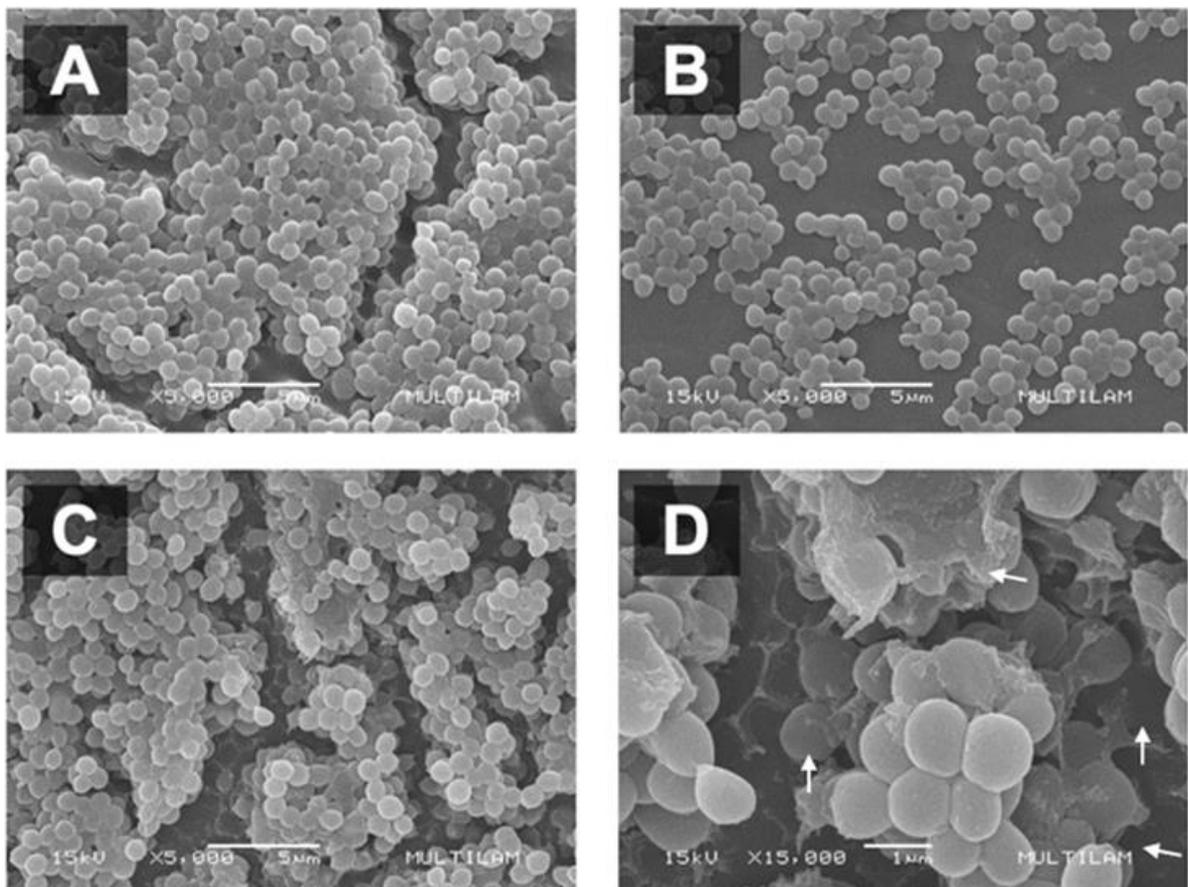
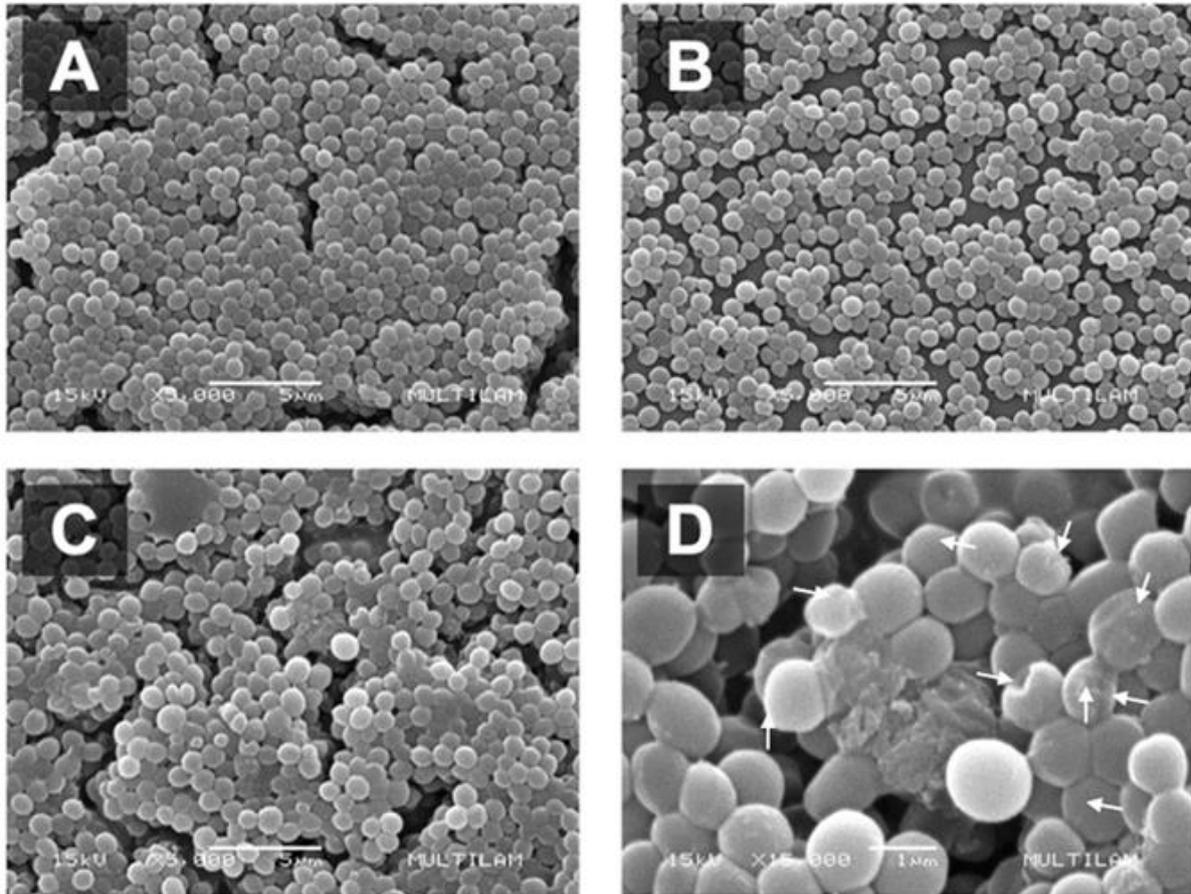


Figura 20 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura (5.000 x) mostrando o biofilme de *A. baumannii*. Células não tratadas (A), tratadas com ciprofloxacina (B) e tratadas com IKR18 (C). Imagem detalhada (15.000 x) (D) de biofilme tratado com IKR18 *A. baumannii*.

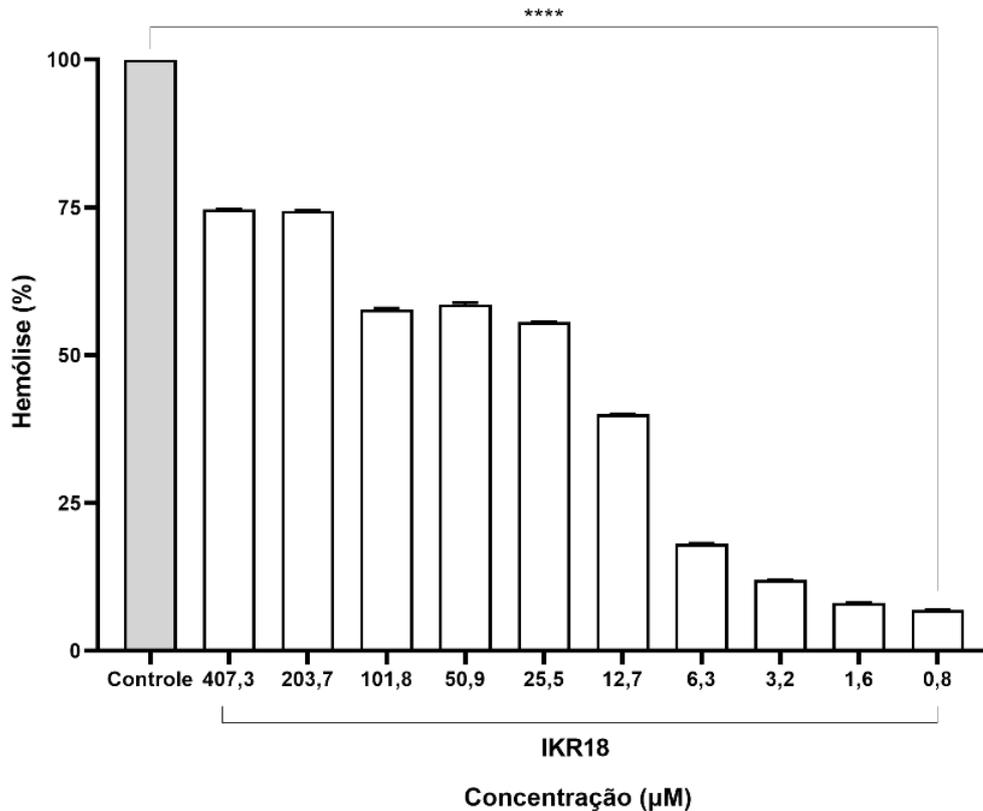


5.11 Determinação da toxicidade

5.11.1 Atividade hemolítica

O ensaio hemolítico foi realizado com eritrócitos e submetido à diluição seriada do peptídeo IKR18, iniciando em 407,3 μM até 0,79 μM , como descrito na Figura 21. Na presença de 1,59 μM apresentou 8% de hemólise e em 101,8 μM afetou 57% das células. Esse valor é 100 vezes superior à CIM encontrada para as cepas de MSSA (1 μM), MRSA (2 μM) e *A. baumannii* (1 μM), colaborando com o ensaio de toxicidade *in vivo* de *G. mellonella* descrito abaixo. O peptídeo apresenta potencial para administração nessas concentrações e 100 vezes o seu valor apresentando menos de 10% de hemólise.

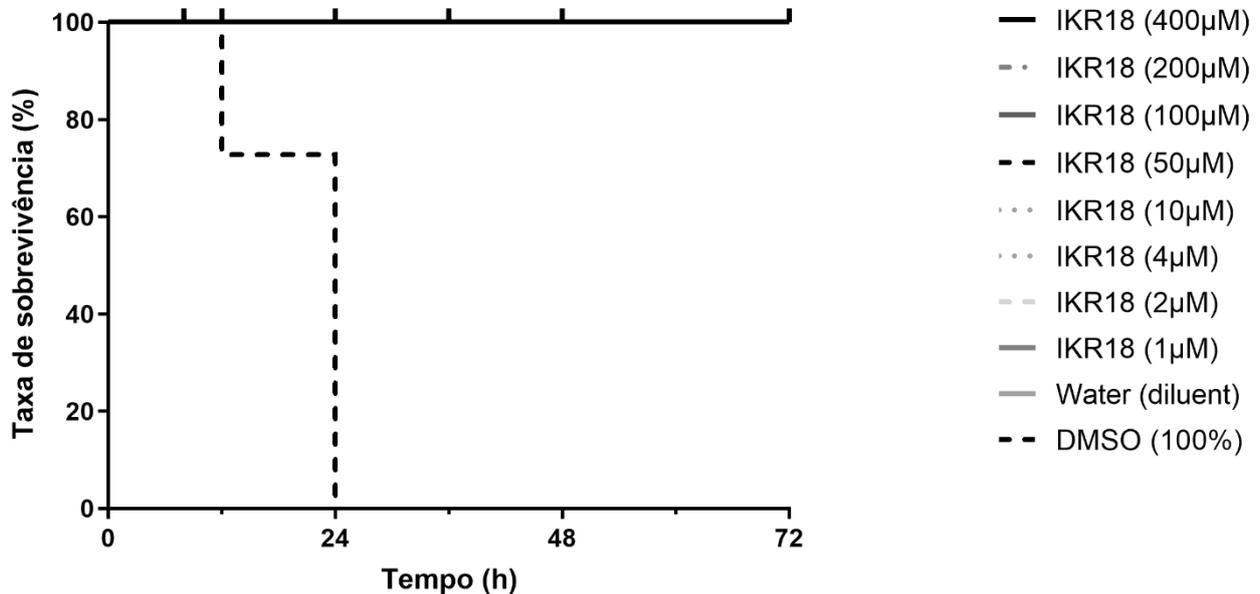
Figura 21 – Atividade hemolítica expressa em porcentagem do peptídeo IKR18 em concentrações 407,3 – 0,79 (μM) em células de eritrócitos. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações do IKR18 (ANOVA com teste de Tukey, $p < 0,05$).



5.11. 2 Efeito do IKR18 na toxicidade de *G. mellonella*

Antes de investigar as propriedades anti-infecciosas do IKR18 no modelo de *G. mellonella*, foram feitas injeções com diferentes concentrações do peptídeo para investigar primeiramente seus efeitos tóxicos. Diferentes concentrações de IKR18 (400-1 μM) não mostraram sinais de toxicidade após observações até 72 h (Figura 22). O controle positivo de toxicidade, DMSO, provocou 100% de morte das larvas em 24 h. Portanto, sugerimos que IKR18 não apresenta toxicidade no modelo utilizado.

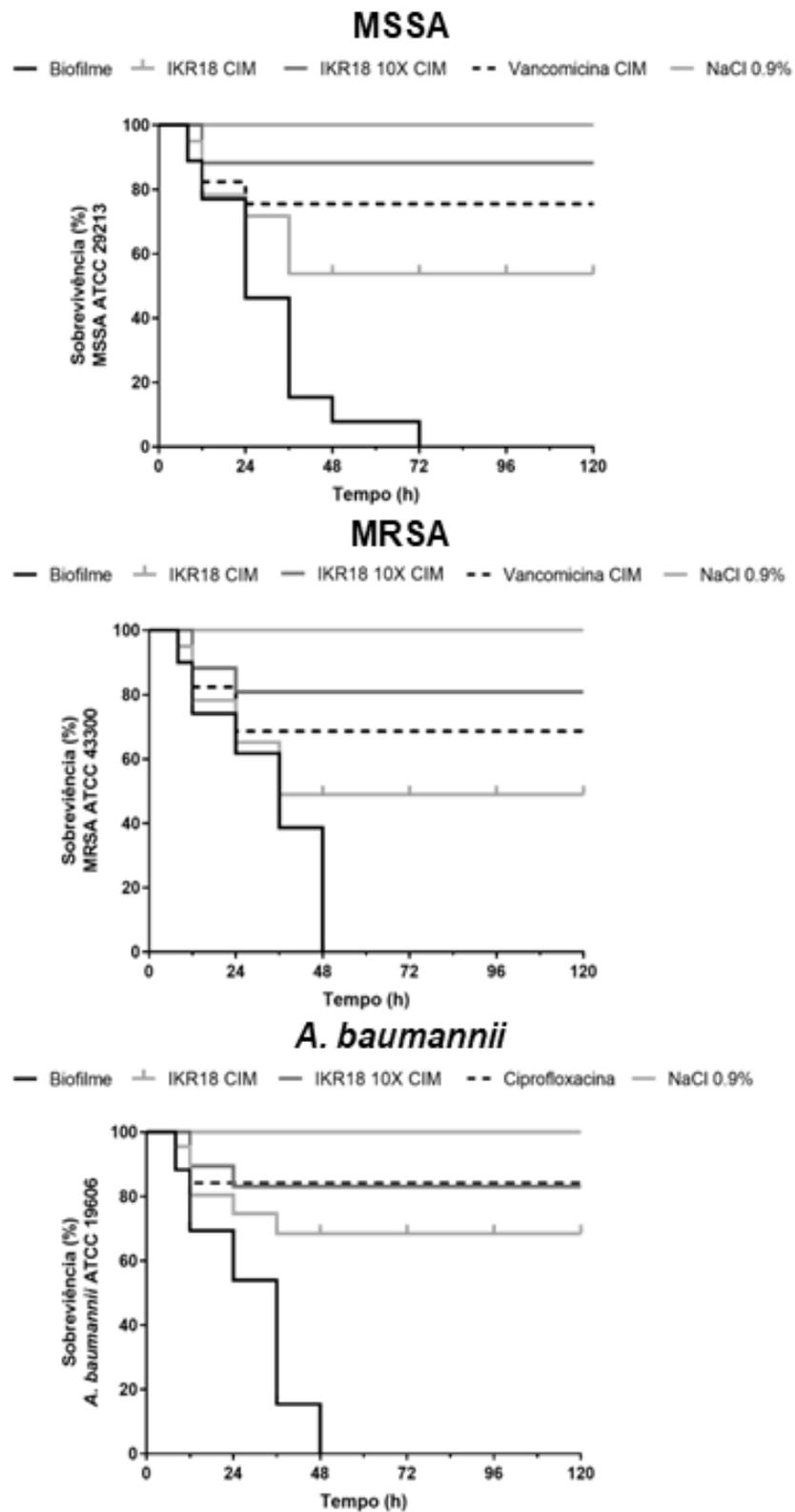
Figura 22 – Ensaio de toxicidade. Porcentagem de sobrevivência ao longo do tempo de larvas de *G. mellonella* injetadas com IKR18 em doses de 400 a 1 μM .



5.12 Atividade anti-infecciosa de IKR18 em larvas de *G. Mellonella*

Como não foram observados sinais de toxicidade em *G. mellonella*, este modelo foi utilizado para avaliar os efeitos de IKR18 contra infecção bacteriana (Figura 23). O controle positivo da infecção, utilizando cepas de MRSA e *A. baumannii*, induziu 100% de morte das larvas em 48 h. A cepa MSSA atingiu 100% de morte das larvas em 72 h. O tratamento de *G. mellonella* mostrou que IKR18 possui propriedades anti-infecciosas. Uma única injeção de IKR18 na CIM e 10XCIM aumentou a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com MSSA em 55 e 90%, respectivamente. Para MRSA, a proteção promovida pelo IKR18 foi de 50 e 80%, respectivamente. Por fim, o peptídeo também protegeu as larvas de *G. mellonella* contra a infecção por *A. baumannii*, atingindo uma taxa de sobrevivência de 68 e 83%, respectivamente. Assim, demonstrou-se que IKR18 foi seguro para administração e mostrou propriedades anti-infecciosas *in vivo*.

Figura 23 – Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectada com MSSA (A), MRSA (B) e *A. baumannii* (C).



6. DISCUSSÃO

O CDC e a OMS classificam os patógenos da RAM como uma ameaça iminente à saúde humana (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). Um dos problemas provocados por esses patógenos são as infecções, que podem ser causadas tanto por bactérias planctônicas quanto por biofilmes, e que são comumente difíceis de serem tratadas com os antibióticos disponíveis no mercado devido às altas taxas de resistência (WATKINS; BONOMO, 2016). Diversas pesquisas dedicadas aos estudos de peptídeos antimicrobianos (PAMS) e antibiofilmes têm demonstrado que essas moléculas são altamente promissoras, e em consequência mais de 1386 PAMS foram identificados nos últimos anos (WAGHU; IDICULA-THOMAS, 2020). Diversas dessas descobertas foram impulsionadas por estudos que avaliaram o número crescente de resistência bacteriana a antibióticos (GUO *et al.*, 2020). E desde então, PAMS eficazes contra bactérias resistentes tem sido estudados como candidatos promissores no combate à resistência bacteriana.

Dentro desse contexto, o uso de abordagens *in silico* para a compreensão e síntese de novos peptídeos têm sido cada vez mais recorrentes. Com auxílio de ferramentas computacionais, busca-se construir moléculas antimicrobianas mais promissoras quanto a sua função biológica e a faixa de sua atividade, visando assim superar o grande problema da resistência associada aos antimicrobianos convencionais (FARHADI; HASHEMIAN, 2018). Nesse contexto, decorre diversos esforços da comunidade científica para desenvolver alternativas para o controle de infecções causadas por cepas resistentes.

Neste trabalho, descrevemos as características estruturais e funcionais de IKR18, um peptídeo antimicrobiano projetado com auxílio de ferramentas computacionais e inspirado no ILTI.

A maioria dos PAMS exibem cargas líquidas positivas (+2 e +9) devido ao alto teor de resíduos de Arg e Lys. Normalmente, as cargas líquidas positivas são combinadas com uma proporção substancial (30-50%) de resíduos hidrofóbicos, formando moléculas com características anfipáticas (FJELL *et al.*, 2011). Os resultados referentes à composição de dois aminoácidos básicos são muito interessantes. A maioria dos PAMS compartilha cargas líquidas positivas devido à ocorrência de resíduos Lys e Arg, em um arranjo específico que forma faces anfipáticas ao longo da hélice, opondo-se a resíduos hidrofóbicos (RODRIGUES *et al.*, 2018), permitindo dessa maneira a conformação em alfa-hélice. Estudos realizados por (KHARA *et al.*, 2017) mostraram que peptídeos sintéticos que exibiam conformação alfa-helicoidal mais altas tinham melhores atividades antimicrobianas pelo enovelamento do peptídeo em estruturas anfipáticas. A composição mista de resíduos

catiônicos e hidrofóbicos nos PAMS torna-os mais adequados para interagir e perturbar a membrana citoplasmática bacteriana, que apresenta conteúdo lipídico aniônico (VINEETH KUMAR; SANIL, 2017).

A carga líquida de PAMS catiônicos foi sugerida como necessária para interagir com componentes carregados negativamente de membranas de microrganismos (DODOU LIMA *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2018). No entanto, algumas características físico-químicas, como momento hidrofóbico e hidrofobicidade, também foram correlacionadas com a interação da membrana (DRIN; ANTONNY, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2012). Peptídeos ativos em membranas biológicas frequentemente mostram hidrofobicidade entre 0,1 e 0,6 e momento hidrofóbico maior que 0,2 (DODOU LIMA *et al.*, 2020).

As propriedades físico-químicas e estruturais que governam a disposição dos PAMS estão intimamente associadas à fatores que determinam a potência antimicrobiana e o espectro de atividade (MCCLOSKEY *et al.*, 2019). Com base nos espectros de CD de IKR18, demonstramos que esse peptídeo apresenta diferentes estruturas secundárias, orientadas por diferenças nas características físico-químicas de determinados ambientes. Em solução aquosa, IKR18 exibiu uma estrutura aleatória, enquanto uma estrutura α -hélice bem definida foi observada na presença de TFE, SDS ou LUVs compostos por POPC e POPG. As micelas SDS e POPC:POPG LUVs apresentam uma superfície micelar aniônica, favorecendo a dinâmica conformacional do peptídeo no processo de interação peptídeo-membrana (PIRTSKHALAVA *et al.*, 2021). Além disso, o método induzido por TFE para determinar as estruturas de PAMS tem sido usado em vários estudos, como RQ18 (ALMEIDA *et al.*, 2021), e peptídeos derivados de catelicidina, denominados BotrAMP14, CrotAMP14 e LL-37 (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

IKR18 mostrou atividade antimicrobiana contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com CIM variando de 1 a 4 μ M. Esses valores estão de acordo com a literatura, onde CIM variando de 0,9 a 3,6 μ M foram relatadas (ALMEIDA *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2018), bem como CIMs maiores (YUAN *et al.*, 2019), como Pa-MAP (CARDOSO *et al.*, 2016) e EcDBS1R5 (CARDOSO *et al.*, 2018), com CIM variando de 32 e 96 μ M, respectivamente. Assim, demonstramos que o desenho do peptídeo IKR18 a partir da sequência de ILTI mostrou-se uma estratégia eficiente para obtenção de peptídeos com alta atividade antimicrobiana. Em relação à CBM, o IKR18 mostrou um efeito bactericida rápido, assim como a maioria dos PAMS já descritos, eliminando uma alta carga microbiana. A cinética de morte bacteriana em menor tempo e com dosagens mais baixas

são ideais para novos agentes antimicrobianos, minimizando o risco de sua propagação e a probabilidade de indução de resistência (CHANDRASEKARAN; JIANG, 2019).

As infecções por *S. aureus* são geralmente tratadas com oxacilina em cepas sensíveis, mas nas resistentes à meticilina são tratadas com vancomicina (THABIT *et al.*, 2015). A vancomicina tem sido a base da terapia de MRSA, e a ciprofloxacina para *A. baumannii* apesar de deficiências importantes, como pobre penetração em tecidos e intracelular, efeitos bactericidas lentos (> 12h) e o recente surgimento de susceptibilidade diminuída à vancomicina em alguns isolados de *S. aureus* (HAGIHARA *et al.*, 2012). Neste trabalho, o IKR18 apresentou efeito bactericida rápido (30 min), apresentando grande vantagem para o tratamento efetivo das cepas avaliadas. Além disso, os valores de CIM do peptídeo encontrado neste trabalho são semelhantes aos valores de CIM de vancomicina em ambas as cepas (MSSA e MRSA).

Constatamos que IKR18 foi atraído pela membrana de bactérias carregadas negativamente através de interações eletrostáticas, localizadas em grupos de cabeças lipídicas na superfície externa da membrana citoplasmática. A interação do IKR18 com as membranas leva a um movimento iônico desregulado e a dissipação do potencial de membrana, o que resulta na lise da membrana. Este mecanismo corrobora com nossos resultados, uma vez que o IKR18 adquiriu uma estrutura secundária na presença de micelas POPG:POPC, induziu uma morte rápida das bactérias, induziu a captação de *Sytox green* e apresentou bactérias com morfologia comprometida, corroborando a lise direta das membranas bacterianas (ZHANG *et al.*, 2016).

O uso de diferentes antibióticos em combinação pode ser uma estratégia utilizado para ampliar o espectro antimicrobiano, prevenir o surgimento de organismos resistentes, minimizar a toxicidade e obter efeitos sinérgicos. Nossos resultados envolvendo o tratamento de MSSA (*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina) e MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) ambas com IKR18 e o antibiótico vancomicina revelaram um efeito aditivo, indicando que doses menores de peptídeo e vancomicina poderiam melhorar a eficácia dos tratamentos. A associação de IKR18 e ciprofloxacina para tratamento de *A. baumannii* mostrou um efeito sinérgico, apontando associação positiva para tratamento de infecções Gram-negativas com ciprofloxacina. Em parte, o efeito sinérgico do IKR18 com a ciprofloxacina pode ser atribuído aos diferentes mecanismos de ação das moléculas, uma vez que o antibiótico inibe a replicação do DNA por meio da DNA topoisomerase bacteriana e inibição da DNA-girase (THAI; SALISBURY; ZITO, 2020).

A resistência aos medicamentos de primeira linha utilizados no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* é a causa mais comum de infecções em estabelecimentos de saúde. Segundo a OMS, estima-se que as pessoas com infecção por MRSA tenham 64% mais chances de morrer do que as pessoas que adquirem uma forma não resistente da infecção. Por sua vez, *A. baumannii* possui alto potencial de formação de biofilme em superfícies, podendo se instalar em órgãos como o pulmão e levar a um processo inflamatório de difícil tratamento (WONG *et al.*, 2017). Para avaliar o potencial de IKR18 para combater biofilmes bacterianos, realizamos ensaios para avaliar o efeito do peptídeo tanto na inibição da formação quanto na erradicação de formas maduras de biofilme. Observamos que IKR18 reduziu parcialmente a massa do biofilme, com resultados semelhantes aos antibióticos comerciais. A microscopia eletrônica de varredura demonstrou que a redução da massa do biofilme ocorreu devido à morte das bactérias. A maioria dos PAMS considerados como peptídeos antibiofilme compartilham uma série de características, incluindo a capacidade de inibirem a adesão e a formação de bactérias, regular negativamente os fatores de detecção de quorum e ruptura dos biofilmes maduros, mesmo em concentrações sub-inibitórias (DE LA FUENTE-NÚÑEZ *et al.*, 2016).

Quando um biofilme bacteriano é estabelecido, as bactérias tornam-se de 100 a 1.000 vezes mais resistentes aos antimicrobianos do que quando em sua forma planctônica (WILKINS *et al.*, 2014). Em muitos casos, os tratamentos mais eficazes podem envolver métodos físicos e químicos (aplicação de ultrassom, antibioticoterapia e antisepsia) ou a remoção direta do biofilme seja por lavagem, desbridamento ou reparo cirúrgico (BIXLER; BHUSHAN, 2012). Os resultados obtidos mostram que IKR18 apresentou melhor atividade contra bactérias planctônicas, e teve sua atividade diminuída contra biofilmes.

Estes resultados permitem concluir que IKR18 provou ser uma molécula antimicrobiana, tendo como alvo membranas bacterianas. No entanto, as defesas adicionais presentes no biofilme bacteriano dificultam o acesso do peptídeo às membranas. Por esta razão, IKR18 não foi um bom erradicador de biofilme, sendo preferencialmente ativo contra formas planctônicas de bactérias.

Os PAMS têm grande potencial como agentes antibiofilme, como a Polimixina E (Colistina), um PAM clinicamente disponível, sendo frequentemente utilizado como medicamento de último recurso em infecções associadas ao biofilme, quando surge resistência a todos os outros medicamentos. O uso de PAMS para o desenvolvimento de revestimentos superficiais antiadesivos tem sido pesquisado como estratégias para combater ou prevenir infecções associadas ao biofilme de implantes médicos (SÁNCHEZ-GÓMEZ; MARTÍNEZ-DE-TEJADA, 2017).

O surgimento de patógenos com uma variedade de mecanismos de resistência intensificou os desafios associados ao controle de infecções e estratégias de tratamento, sendo necessários novos mecanismos de ação (THABIT; CRANDON; NICOLAU, 2015). O mecanismo dos PAMS é geralmente drástico se a concentração limite for atingida (HOLLMANN *et al.*, 2018), como ruptura do invólucro. Neste trabalho, IKR18 apresentou alteração na permeabilidade da membrana (ensaio cristal violeta, captura do corante sytox green), através desses ensaios o mecanismo parece atuar diretamente na parede celular.

A ruptura da membrana foi descrita como o mecanismo de ação de um peptídeo obtido do veneno de *Dinoponera quadriceps* (DqV) sobre *S. aureus* (LIMA *et al.*, 2014) e MEV foi usado para confirmar o efeito de membrana de IKR18 sugerido pelo ensaio cristal violeta e sytox. Imagens de MEV mostraram danos drásticos à membrana na concentração de 1XCIM e 10XCIM, com a presença de várias rupturas e murchamento, projetando-se da superfície da célula na concentração do CIM, confirmando o efeito de membrana.

A presença dessas rupturas projetando-se da superfície celular é resultado da interação peptídeo-membrana, que pode levar à desestabilização da membrana externa e, posteriormente, à ruptura do invólucro celular. Esse fenômeno poderia ser explicado por este tipo de PAM, primeiro causar uma desestabilização da parede celular e depois da membrana (HOLLMANN *et al.*, 2018). Nossas imagens de MEV mostraram esse perfil na concentração do CIM, mesma concentração capaz de inibir a formação de biofilme.

Ensaio preliminares sobre a toxicidade de IKR18 foram realizados usando eritrócitos e para as larvas de *G. mellonella*. Os resultados confirmaram não haver toxicidade nas concentrações testadas. Larvas de *G. mellonella* têm sido amplamente utilizadas como modelo animal para estudar a toxicidade e propriedades anti-infecciosas de PAMS, como NapFFKK-OH (MCCLOSKEY *et al.*, 2019) e Japonicin-2LF (YUAN *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, o modelo de *G. mellonella* tem sido usado principalmente para triagem de potenciais drogas antiestafilocócicas daptomicina e vancomicina (DESBOIS; COOTE, 2011). O modelo de infecção por *G. mellonella* tem sido usado para estudar uma variedade de bactérias Gram-positivas, incluindo *Streptococcus pyogenes* (LOH *et al.*, 2013) *Streptococcus pneumoniae*. Bactérias Gram-negativas investigadas usando o modelo de infecção por *G. mellonella* incluem, *E. coli* e *A. baumannii* (JACOBS *et al.*, 2014). Os resultados com larvas de *G. mellonella* compartilham uma forte correlação com a toxicidade medida em mamíferos. Neste estudo, demonstramos que IKR18 possui

propriedades anti-infecciosas usando *G. mellonella* infectada com MSSA, MRSA e *A. baumannii*. O tratamento efetivamente aumentou a taxa de sobrevivência larval. Portanto, nossos resultados demonstraram o potencial do IKR18 como alternativa para o controle de infecções, gerando a oportunidade de ensaios adicionais em estudos pré-clínicos.

7. CONCLUSÃO

De acordo com as avaliações das atividades do peptídeo otimizado e desenhado através do uso de ferramentas computacionais e definida como: IKRQYKRFFKLFKWFLKK sendo a mais compatível com os padrões antimicrobianos e denominada como IKR18.

Através dos ensaios apresentados, o peptídeo IKR18 foi eficiente na inibição de bactérias planctônicas e resistentes e de amplo espectro, constatou-se também sua atuação mais moderada na redução da biomassa de biofilmes das cepas avaliadas. Assim, em relação às atividades avaliadas o peptídeo prova ser um candidato em potencial para futuras terapias de prevenção das infecções bacterianas.

Quanto às combinações do peptídeo com a vancomicina e a ciprofloxacina, antibióticos considerados padrão ouro para o tratamento de infecções ocasionadas por esses microrganismos, todas as cepas avaliadas foram capazes de demonstrar um efeito aditivo e sinérgico para inibição de células planctônicas ou para a formação de biofilmes. Em vista disso, estudos adicionais sobre os efeitos de combinação com outros agentes antimicrobianos, bem como, o mecanismo de ação envolvido nas atividades demonstradas ajudará a reforçar o potencial do peptídeo otimizado como futuro agente terapêutico.

Os PAMS representam candidatos promissores para o futuro tratamento de bactérias resistentes a antibióticos. Descrevemos as propriedades antimicrobianas e anti-infecciosas do IKR18 contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A atividade membranolítica do IKR18 pode ser utilizada para aumentar a absorção de antibióticos, gerando efeitos sinérgicos e aditivos. A eficácia do IKR18 foi demonstrada *in vivo*, apoiando novos estudos com IKR18 para uso terapêutico contra bactérias ESKAPE.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. V.; DE OLIVEIRA, C. F. R.; DOS SANTOS, E. L.; DOS SANTOS, H. F.; JÚNIOR E.C; MARCHETTO, R.; DA CRUZ, L.A.; FERREIRA, A.M.T.; GOMES, V.M.; TAVEIRA, G.B.; COSTA, B.O.; FRANCO, O.L.; CARDOSO, M.H.; MACEDO, M.L.R. Differential interactions of the antimicrobial peptide, RQ18, with phospholipids and cholesterol modulate its selectivity for microorganism membranes. **Biochimica Biophysica Acta General Subjectes**, n. 9, p. 129, 2021.

ALMEIDA, L. H. O.; OLIVEIRA, C. F. R.; RODRIGUES, M. S.; NETO, S. M. BOLETI, A.P.A.; TAVEIRA, G.B.; MELLO É.O.; GOMES, V.M.; SANTOS, E.L.D.; CRUSCA, E. JR.; FRANCO, O.L.; CARDOSO, M.H.E.S.; MACEDO M.L.R. Adepamycin: design, synthesis and biological properties of a new peptide with antimicrobial properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 691, p. 108487, 2020.

ALVAREZ, A. E.; RIBEIRO, A. F.; HESSEL, G.; BERTUZZO, C. S.; RIBEIRO, J.D. Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 5, p. 371-379, 2004.

ANTUNES, L. C.; VISCA, P.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathogens and Disease**, v. 71, n. 3, p. 292-301, 2014.

AOKI, W.; UEDA, M. J. P. Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 8, p. 1055-1081, 2013.

BARBER, N. C.; STARK, L. A. Online resources for understanding outbreaks and infectious diseases. **CBE Life Sciences Education**, v.14, n. 1, p.1-5, 2015.

BATISTA ARAUJO, J.; SASTRE DE SOUZA, G.; LORENZON, E. N. Indolicidin revisited: biological activity, potential applications and perspectives of an antimicrobial peptide not yet fully explored. **World Journal Microbiology Biotechnology**, n. 3, p. 38-39, 2022.

BECHINGER, B.; GORR, S. U. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 3, p. 254-260, 2017.

BEHLAU, I.; GILMORE, M. S. J. A. o. O. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. **Archives of ophthalmology**, v. 126, n. 11, p. 1572-1581, 2008.

BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J.-M. J. B. b. *Escherichia coli* biofilms. **Current topics in microbiology and immunology**, v.40, p. 249-289, 2008.

BES, T. M.; MARTINS, R. R.; PERDIGÃO, L.; MONGELOS, D.; MORENO, L.; MORENO, A.; OLIVEIRA, G.S.; COSTA, S.F.; LEVIN, A.S. Prevalence of methicillin-resistant

Staphylococcus aureus colonization in individuals from the community in the city of Sao Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, p. 58-60, 2018.

BIXLER, G. D.; BHUSHAN, B. Biofouling: lessons from nature. **Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences**, v. 370, n. 1967, p. 2381-2417, 2012.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.

BROWN, K. L.; HANCOCK, R. E. W. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Current opinion in microbiology**, v. 18, n. 1, p. 24-30, 2006.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harb Perspect in Medicine**, v. 6, n. 8, 2016.

CABIB, E.; ARROYO, J. How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 648-655, 2013.

CARDOSO, M. H.; CANDIDO, E. S.; CHAN, L. Y.; DER TOROSSIAN TORRES, M.; OSHIRO, K.G.N.; REZENDE, S.B.; PORTO, W.F.; LU, T.K.; DE LA FUENTE-NUNEZ, C.; CRAIK, D.J.; FRANCO, O.L. A computationally designed peptide derived from *Escherichia coli* as a potential drug template for antibacterial and antibiofilm therapies. **American Chemical Society Infectious Diseases**, v. 4, n. 12, p. 1727-1736, 2018.

CARDOSO, M. H.; RIBEIRO, S. M.; NOLASCO, D. O.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. FELÍCIO, M.R.; GONÇALVES, S.; MATOS, C.O.; LIAO, L.M.; SANTOS, N.C.; HANCOCK, R.E.; FRANCO, O.L.; MIGLIOLO, L. A polyalanine peptide derived from polar fish with anti-infectious activities. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2016.

CARDOSO, P.; GLOSSOP, H.; MEIKLE, T. G.; ABURTO-MEDINA, A, CONN, C.E.; SAROJINI, V.; VALERY, C. Molecular engineering of antimicrobial peptides: microbial targets, peptide motifs and translation opportunities. **Biophysical Reviews**, v. 13, n. 1, p. 35-69, 2021.

CHANDRASEKARAN, S.; JIANG, S. C. A dose response model for quantifying the infection risk of antibiotic-resistant bacteria. **Scientific Reports**. v. 9, n. 1, p. 17093, 2019.

COLOMBO, A. P. V.; MAGALHÃES, C. B.; HARTENBACH, F. A. R. R.; DO SOUTO, R. M.; DA SILVA-BOGHOSSIAN, C. M. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. **Microbial Pathogenesis**, v. 94, p. 27-34, 2016.

CZAPLEWSKI, L.; BAX, R.; CLOKIE, M.; DAWSON, M.; FAIRHEAD, H.; FISCHETTI, V.A.; FOSTER, S.; GILMORE, B.F.; HANCOCK, R.E.; HARPER, D.; HENDERSON, I.R.; HILPERT, K.; JONES, B.V.; KADIOGLU, A.; KNOWLES, D.; ÓLAFSDÓTTIR, S.; PAYNE, D.; PROJAN, S.; SHAUNAK, S.; SILVERMAN, J.; THOMAS, C.M.; TRUST, T.J.; WARN, P.;

REX, J.H. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. **The Lancet Infectious Diseases**, v.16, n. 2, p. 239-251, 2016.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 2, p. 114-122, 2003.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; CARDOSO, M. H.; DE SOUZA CÂNDIDO, E.; FRANCO, O.; HANCOCK, R.E. Synthetic antibiofilm peptides. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1858, n. 5, p. 1061-1069, 2016.

DE OLIVEIRA, D. M. P.; FORDE, B. M.; KIDD, T. J.; HARRIS, P. N. A.; SCHEMBRI, M.A.; BEATSON, S.A.; PATERSON, D.L.; WALKER, M.J. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, 2020.

DELCARU, C.; ALEXANDRU, I.; PODGOREANU, P.; GROSU, M.; STAVROPOULOS, E.; CHIFIRIUC, M.C.; LAZAR, V. Microbial biofilms in urinary tract infections and prostatitis: etiology, pathogenicity, and combating strategies. **Pathogens**, v. 5, n. 4, p. 65, 2016.

DESBOIS, A. P.; COOTE, P. J. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an *in vivo* model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 8, p. 1785-1790, 2011.

DHOPLE, V.; KRUKEMEYER, A.; RAMAMOORTHY, A. J. B. e. B. A.-B. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1758, n. 9, p. 1499-1512, 2006.

DI LUCA, M.; MACCARI, G.; NIFOSÌ, R. Treatment of microbial biofilms in the post-antibiotic era: prophylactic and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools. **Pathogens and Disease**, v. 70, n. 3, p. 257-270, 2014.

DIGIANDOMENICO, A.; SELLMAN, B. R. Antibacterial monoclonal antibodies: the next generation? **Current Opinion in Microbiology**, v. 27, p. 78-85, 2015.

DIXIT, A.; KUMAR, N.; KUMAR, S.; TRIGUN, V. Antimicrobial Resistance: Progress in the Decade since Emergence of New Delhi Metallo- β -Lactamase in India. **Indian Journal Community Medicine**, v. 44, n. 1, p. 4-8, 2019.

DODDS, D. R. Antibiotic resistance: A current epilogue. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 139-146, 2017.

DONLAN, R. M. J. E. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 881, 2002.

DURAND, G. A.; RAOULT, D.; DUBOURG, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 4, p. 371-382, 2019.

ECONOMOU, V.; GOUSIA, P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. **Infection Drug Resistance**, v. 8, p. 49-61, 2015.

FARHADI, T.; HASHEMIAN, S. M. Computer-aided design of amino acid-based therapeutics: a review. **Drug Design Development Therapy**, v.12, p. 1239-1254, 2018.

FJELL, C. D.; HISS, J. A.; HANCOCK, R. E.; SCHNEIDER, G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 37-51, 2011.

FORTMAN, J. L.; MUKHOPADHYAY, A. The Future of Antibiotics: Emerging Technologies and Stewardship. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 7, p. 515-517, 2016.

FOX, M. A.; THWAITE, J. E.; ULAETO, D. O.; ATKINS, T. P.; ATKINS, H.S. Design and characterization of novel hybrid antimicrobial peptides based on cecropin A, LL-37 and magainin II. **Peptides**, v. 33, n. 2, p. 197-205, 2012.

GAJDÁCS, M.; ALBERICIO, F. Antibiotic Resistance: From the Bench to Patients. **Antibiotics**, v. 8, n. 3, p. 129, 2019.

GALY, A.; LOUBET, P.; PEIFFER-SMADJA, N.; YAZDANPANA, Y. La peste : mise au point et actualités. **La Revue de Médecine Interne**, v. 39, n. 11, p. 863-868, 2018.

GAYNES, R. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. **Emerging Infectious Disease Journal**, v. 23, n. 5, p. 849, 2017.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. J. P.; DISEASE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens Disease**, v. 67, n. 3, p. 159-173, 2013.

GHOSH, C.; HALDAR, J. J. C. Membrane-active small molecules: designs inspired by antimicrobial peptides. **Chemical Medical Chemical**, v. 10, n. 10, p. 1606-1624, 2015.

GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical Infectious Disease**, v. 46, n. 5, p. 350-359, 2008.

GOULD, K. Antibiotics: from prehistory to the present day. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 3, p. 572-575, 2016.

GOMES, A.P.; ALVES FIGUEIREDO, L.M.; LUIZA DO ROSÁRIO PALMA, A.; CORRÊA GERALDO, B.M.; ISLER CASTRO, K.C.; RUANO DE OLIVEIRA F.L.; JORGE, A.O.C.; DE OLIVEIRA, L.D.; JUNQUEIRA, J.C. *Punica granatum* L. (Pomegranate) extract: *in vivo* study of antimicrobial activity against *Porphyromonas gingivalis* in *Galleria mellonella* model. **Scientific World Journal**. 2016

GUILHELMELLI, F.; VILELA, N.; ALBUQUERQUE, P.; DERENGOWSKI, L. S.; SILVA-PEREIRA, I.; KYAW C.M. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers Microbiology**, v. 4, p. 353, 2013.

GUO, Y.; SONG, G.; SUN, M.; WANG, J. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Fontiers in Cell Infection Microbiology**, v. 10, n. 107, 2020.

GURUNG, J.; KHYRIEM, A. B.; BANIK, A.; LYNGDOH, W. V.; CHOUDHURY, B.; BHATTACHARYYA, P. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. **Indian Society of Critical Care Medicine**, v.17, n. 4, p. 214, 2013.

HANCOCK, R. E.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551-1557, 2006.

HANEY, E. F.; MANSOUR, S. C.; HANCOCK, R. E. J. A. P. Antimicrobial peptides: an introduction. **Methods in Molecular Biology**, p. 3-22, 2017.

HANEY, E. F.; MANSOUR, S. C.; HILCHIE, A. L.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R.E. High throughput screening methods for assessing antibiofilm and immunomodulatory activities of synthetic peptides. **Peptides**, v. 71, p. 276-285, 2015.

HAQUE, M.; SARTELLI, M.; MCKIMM, J.; ABU BAKAR, M. Health care-associated infections - an overview. **Infection Drug Resistance**, v. 11, p. 2321-2333, 2018.

HARDING, C. M.; HENNON, S. W.; FELDMAN, M. F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v.16, n. 2, p. 91-102, 2018.

HENRIQUES, A. F. F. M.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais: O estado da arte. **Arquivos de medicina**, v. 1, p. 27-36, 2013.

HOLUBAR, M.; MENG, L.; ALEGRIA, W.; DERESINSKI, S. Bacteremia due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Update on New Therapeutic Approaches. **Infectious Disease Clinics North America**, v. 34, n. 4, p. 849-861, 2020.

HOSSEINI, M.; SHAPOURI MOGHADDAM, A.; DERAKHSHAN, S.; HASHEMIPOUR, S. M. A. *et al.* Correlation Between Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in MRSA and MSSA Isolated from Clinical Samples in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Microbial Drug Resistance**, v. 26, n. 9, p. 1071-1080, 2020.

HUAN, Y.; KONG, Q.; MOU, H.; YI, H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. **Frontiers in Microbiology**, n. 26 p.1071-1080, 2020.

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion Microbiology**, v. 51, p. 72-80, 2019.

IBRAHIM, S.; AL-SARYI, N.; AL-KADMY, I. M. S.; AZIZ, S. N. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 10, p. 6987-6998, 2021.

JACOBS, A. C.; THOMPSON, M. G.; BLACK, C. C.; KESSLER, J. L. AB5075, a highly virulent isolate of *Acinetobacter baumannii*, as a model strain for the evaluation of pathogenesis and antimicrobial treatments. **mBio**, v. 5, n. 3, p. 1076-01014, 2014.

JAMES, G. A.; SWOGGER, E.; WOLCOTT, R.; PULCINI, E.D.; SECOR, P.; SESTRICH, J.; COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S. Biofilms in chronic wounds. **Wound Repair Regen**, v. 16, n. 1, p. 37-44, 2008.

JAYACHANDRAN, S. Pre-antibiotics era to post-antibiotic era. **Guest Editorial**, v. 30, n. 2, p. 100-101, 2018.

JIANG, W.; WU, Y.; ZHOU, M.; SONG, G.; LIU, R. Advance and Designing Strategies in Polymeric Antifungal Agents Inspired by Membrane-Active Peptides. **Chemistry**, v. 28, n. 65, p. 65, 2022.

JORGE, P.; LOURENÇO, A.; PEREIRA, M. O. New trends in peptide-based anti-biofilm strategies: a review of recent achievements and bioinformatic approaches. **Biofouling**, v. 28, n. 10, p. 1033-1061, 2012.

JORGE, P.; LOURENCO, A.; PEREIRA, M. O. J. B. New trends in peptide-based anti-biofilm strategies: a review of recent achievements and bioinformatic approaches. **Biofouling**, v. 28, n. 10, p. 1033-1061, 2012.

KANG, H.-K.; KIM, C.; SEO, C. H.; PARK, Y. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1-12, 2017.

KHANNA, N. R.; GERRIETS, V. Beta Lactamase Inhibitors. *In*: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC., 2022.

KHARA, J. S.; OBUOBI, S.; WANG, Y.; HAMILTON, M. S. Disruption of drug-resistant biofilms using de novo designed short α -helical antimicrobial peptides with idealized facial amphiphilicity. **Acta Biomaterialia**, v. 57, p. 103-114, 2017.

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility *in vivo*. **Biomolecules**, v. 8, n. 1, 2018.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, 2018.

LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers Cell Infection Microbiology**, n.4, v.178, 2015.

LIU, G. Y. Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection. **Pediatric Research**, v. 65, n. 7, p. 71-77, 2009.

LIU, J.-Y.; DICKTER, J. K. Nosocomial Infections: A History of Hospital-Acquired Infections. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 637-652, 2020.

LOH, J. M.; ADENWALLA, N.; WILES, S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 419-428, 2013.

LONG-MEI, Y.; TIAN-TIAN, Y.; XIU-QING, W. J. J. o. S. U. CecropinA-Magainin, a New Hybrid Antibacterial Peptide Against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Medical Science**, v. 46, n. 2, 2015.

LOSIER A.; DELA CRUZ C. S. New testing guidelines for community-acquired pneumonia. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 35, n. 2, p. 128-132, 2022.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

MACCARI, G.; DI LUCA, M.; NIFOSÍ, R.; CARDARELLI, F.; SIGNORE, G.; BOCCARDI, C.; BIFONE A. Antimicrobial peptides design by evolutionary multiobjective optimization. **PLoS Computational Biology**, v. 9, n. 9, p. 1003, 2013.

MCCLOSKEY, A. P.; LEE, M.; MEGAW, J.; MCEVOY, J.; COULTER, S.M.; PENTLAVALLI, S.; LAVERTY, G. Investigating the *In Vivo* Antimicrobial Activity of a Self-Assembling Peptide Hydrogel Using a *Galleria mellonella* Infection Model. **ACS Omega**, v. 4, n. 2, p. 2584-2589, 2019.

MISHRA, B.; REILING, S.; ZARENA, D.; WANG, G. Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 38, p. 87-96, 2017.

MORRIS, F. C.; DEXTER, C.; KOSTOULIAS, X.; UDDIN, M. I.; PELEG, A.Y. The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers Microbiology**, v. 10, p. 1601, 2019.

MUNOZ-PRICE, L. S.; WEINSTEIN, R. A. *Acinetobacter* infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 12, p. 1271-1281, 2008.

NAVES, K. S. C.; TRINDADE, N. V. d.; GONTIJO FILHO, P. P. J. R. d. S. B. d. M. T. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome in non-intensive-care units. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 45, p. 189-193, 2012.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464-472, 2011.

NICOLAOU, K. C.; RIGOL, S. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. **The Journal of Antibiotics**, v. 71, n. 2, p. 153-184, 2018.

NII-TREBI, N. I. Emerging and Neglected Infectious Diseases: Insights, Advances, and Challenges. **BioMed Research International**, p. 524, 2017.

OLIVEIRA, N. G. J.; CARDOSO, M. H.; VELIKOVA, N.; GIESBERS, M.; WELLS, J.M.; REZENDE, T.M.B.; DE VRIES R.; FRANCO, O.L. Physicochemical-guided design of cathelicidin-derived peptides generates membrane active variants with therapeutic potential. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 9127, 2020.

OMAR, A.; WRIGHT, J. B.; SCHULTZ, G.; BURRELL, R.; NADWORNY, P. Microbial biofilms and chronic wounds. **Microorganisms**, v. 5, n. 1, p. 9, 2017.

PEACOCK, S. J.; PATERSON, G. K. J. A. R. B. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, n. 1, p. 577-601, 2015.

PIRTSKHALAVA, M.; AMSTRONG, A. A.; GRIGOLAVA, M.; CHUBINIDZE, M.; ALIMBARASHVILI, E.; VISHNEPOLSKY, B.; GABRIELIAN, A.; ROSENTHAL, A.; HURT D.E.; TARTAKOVSKY M. DBAASP v3: database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. **Nucleic Acids Research**, v.49, n.1, p. 288-297, 2021.

POST, J. C. Candidate's Thesis: direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. **Laryngoscope**, v. 111, n. 12, p. 2083-2094, 2001.

RAUTENBACH, M.; TROSKIE, A. M.; VOSLOO, J. A. Antifungal peptides: To be or not to be membrane active. **Biochimie**, v. 130, p. 132-145, 2016.

READ, A. F.; WOODS, R. J. Antibiotic resistance management. **Evolution, Medicine and Public Health**, n. 1, p. 147, 2014.

RIBEIRO DA CUNHA, B.; FONSECA, L. P.; CALADO, C. R. C. Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go?. **Antibiotics**, v. 8, n. 2, p. 45, 2019.

RODRIGUES, M. S.; DE OLIVEIRA, C. F. R.; ALMEIDA, L. H. O.; NETO, S. M.; BOLETI A.P.A.; DOS SANTOS, E.L.; CARDOSO, M.H.; RIBEIRO, S.M.; FRANCO, O.L.; RODRIGUES, F.S.; MACEDO, A.J.; BRUST, F.R.; MACEDO, M.L.R. Adevonin, a novel synthetic antimicrobial peptide designed from the *Adenantha pavonina* trypsin inhibitor (ApTI) sequence. **Pathogens and Global Health**, v. 112, n. 8, p. 438-447, 2018.

SHARMA, K.; AAGHAZ, S.; SHENMAR, K.; JAIN, R. Short antimicrobial peptides. **Recent Patents on anti-infective drug discovery**, v. 13, n. 1, p. 12-52, 2018.

SHARMA, S.; SAHOO, N.; BHUNIA, A. Antimicrobial Peptides and their Pore/Ion Channel Properties in Neutralization of Pathogenic Microbes. **Current Topics in Medical Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 46-53, 2016.

SIERRA, J. M.; FUSTÉ, E.; RABANAL, F.; VINUESA, T.; Viñas M. An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. **Expert Opinion Biological Therapy** v. 17, n. 6, p. 663-676, 2017.

SKÖLD, O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. **Drug Resistance Updates**, v. 3, n. 3, p. 155-160, 2000.

SUBRAMANIAM, G.; GIRISH, M. Antibiotic Resistance — A Cause for Reemergence of Infections. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 87, n. 11, p. 937-944, 2020.

SYKES, J. E.; PAPICH, M. G. Chapter 8 - Antibacterial Drugs. *In*: SYKES, J. E. (Ed.). **Canine and Feline Infectious Diseases**. Saint Louis: W.B. Saunders, 2014. p. 66-86.

THAI, T.; SALISBURY, B. H.; ZITO, P. M. J. S. Ciprofloxacin. 2020.

THANAWASTIEN, A.; CARTEE, R. T.; GRIFFIN, T. J.; KILLEEN, K. P. MEKALANOS, J.J. Conjugate-like immunogens produced as protein capsular matrix vaccines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 112, n. 10, p. 1143-1151, 2015.

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

TRINIDAD, A.; IBÁÑEZ, A.; GÓMEZ, D.; GARCÍA-BERROCAL, J. Ramírez-Camacho, R. Application of environmental scanning electron microscopy for study of biofilms in medical devices. **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**, v.34, n.7, 2011.

TWIGG, G. The Black Death and DNA. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 11, 2003.

UDDIN, T. M.; CHAKRABORTY, A. J.; KHUSRO, A.; ZIDAN, B. M. R. M.; MITRA, S, EMRAN, T.B.; DHAMA, K.; RIPON, M.K.H.; GAJDÁCS, M.; SAHIBZADA, M.U.K.; HOSSAIN, M.J.; KOIRALA, N. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 12, p. 1750-1766, 2021.

UGGERHØJ, L. E.; POULSEN, T. J.; MUNK, J. K.; FREDBORG, M.; SONDERGAARD, T.E.; FRIMODT-MOLLER, N.; HANSEN, P.R.; WIMMER, R. Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides: do's and don'ts. **Chembiochem**, v, 16, n. 2, p. 242-253, 2015.

USACHEV, K. S.; EFIMOV, S. V.; KOLOSOVA, O. A.; KLOCHKOVA, E. A. Antimicrobial peptide protegrin-3 adopt an antiparallel dimer in the presence of DPC micelles: a high-resolution NMR study. **Journal Biomol NMR**, v. 62, n. 1, p. 71-79, 2015.

VAARA, M.; VAARA, T. Outer membrane permeability barrier disruption by polymyxin in polymyxin-susceptible and -resistant *Salmonella typhimurium*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 19, n. 4, p. 578-583, 1981.

VERDEROSA, A. D.; TOTSIKA, M.; FAIRFULL-SMITH, K. E. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. **Frontiers in Chemistry**, v. 28, n. 7, p.824, 2019.

VINEETH KUMAR, T. V.; SANIL, G. A Review of the Mechanism of Action of Amphibian Antimicrobial Peptides Focusing on Peptide-Membrane Interaction and Membrane Curvature. **Current Protein & Peptide Science**, v. 18, n. 12, p. 1263-1272, 2017.

VON ROSENVINGE, E. C.; O'MAY, G. A.; MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G. T. *et al.* Microbial biofilms and gastrointestinal diseases. **Pathogens Disease**, v. 67, n. 1, p. 25-38, 2013.

WAGHU, F. H.; BARAI, R. S.; GURUNG, P.; IDICULA-THOMAS, S. CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. 1, p.1094-1097, 2016.

WAGHU, F. H.; IDICULA-THOMAS, S. Collection of antimicrobial peptides database and its derivatives: Applications and beyond. **Protein Science**, v. 29, n. 1, p. 36-42, 2020.

WAGNER, V. E.; IGLEWSKI, B. H. *P. aeruginosa* biofilms in CF infection. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 35, n. 3, p. 124-134, 2008.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. 1, p. 1087-1093, 2016.

WANG, G. J. P. Database-guided discovery of potent peptides to combat HIV-1 or superbugs. v. 6, n. 6, p. 728-758, 2013.

WATKINS, R. R.; BONOMO, R. A. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 313-322, 2016.

WERTHEIM, H. F.; MELLES, D. C.; VOS, M. C.; VAN LEEUWEN, W. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 751-762, 2005.

WERTHEIM, H. F.; VAN KLEEF, M.; VOS, M. C.; OTT, A.; VERBRUGH, H.A.; FOKKENS W. Nose picking and nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v. 27, n. 8, p. 863-867, 2006.

WHO, W. H. O. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017.

WILKINS, M.; HALL-STOODLEY, L.; ALLAN, R. N.; FAUST, S. N. New approaches to the treatment of biofilm-related infections. **Journal Infection**, v. 69, n. 1, p. 47-52, 2014.

WIMLEY, W. C. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. **ACS Chemical Biology**, v. 5, n. 10, p. 905-917, 2010.

WOLCOTT, R.; COSTERTON, J. W.; RAOULT, D.; CUTLER, S. J. The polymicrobial nature of biofilm infection. **Clinical Microbiology Infection**, v.19, n. 2, p. 107-112, 2013.

WONG, D.; NIELSEN, T. B.; BONOMO, R. A.; PANTAPALANGKOOR, P. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 409-447, 2017.

YANG, R. Plague: Recognition, Treatment, and Prevention. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 01519-01517, 2018.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27-55, 2003.

YUAN, Y.; ZAI, Y.; XI, X.; MA, C. WANG L, ZHOU M, SHAW C, CHEN T. A novel membrane-disruptive antimicrobial peptide from frog skin secretion against cystic fibrosis isolates and evaluation of anti-MRSA effect using *Galleria mellonella* model. **Biochim Biophys Acta Gen Subj**, v. 1863, n. 5, p. 849-856, 2019.

ZHABIZ, G.; OMAR, B.; DONALD GENE, P. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 02, 2014.

ZHANG, S.-K.; SONG, J.-W.; GONG, F.; LI, S.B.; CHANG HY, XIE HM, GAO HW, TAN YX, JI SP. Design of an α -helical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti-biofilm activity. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 27394, 2016.

9. ANEXOS

Anexo I - Comprovante de cadastro no Sisgen das espécies utilizadas nesta pesquisa.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A315278

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A315278
Usuário:	MARIA LIGIA RODRIGUES MACEDO
CPF/CNPJ:	221.061.703-00
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Inga cylindrica
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Escherichia coli
Salmonella enterica
Enterobacter aerogenes
Pseudomonas aeruginosa
Candida albicans
Candida tropicalis
Candida buinensis
Fagopyrum tataricum
Spodoptera frugiperda
Galleria mellonella

Anexo II - Declaração de trâmite processual do pedido de patente emitido pelo Núcleo de Inovação Tecnológica (AGINOVA), Agência UFMS.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



DECLARAÇÃO DE TRAMITE PROCESSUAL

Declaro, para os devidos fins, que o presente processo, referente ao Depósito de Patente realizado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob o título **PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO INSPIRADO NA SEQUÊNCIA DE UM INIBIDOR DE PEPTIDASE E SEU USO EM ENSAIOS BIOLÓGICOS**, dos inventores: **Suellen Rodrigues Ramalho, Maria Lígia Rodrigues Macedo, Janaina de Cássia Orlandi Sardi e Renata Trentin Perdomo**, encontra-se em trâmite processual no INPI.

Campo Grande, 23 de janeiro de 2023.

Christian Mendes de Oliveira,
Assistente em administração.



Documento assinado eletronicamente por **Christian Mendes de Oliveira, Assistente em Administração**, em 23/01/2023, às 10:40, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3801401** e o código CRC **E06BBBC7**.

UNIDADE DE APOIO NÚCLEO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone: (67) 3345-7188

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Anexo III - Protocolo do comprovante de depósito da patente do peptídeo IKR18.

BRASIL	Acesso à informação	Participe	Serviços	Legislação	Canais	
Instituto Nacional da Propriedade Industrial Ministério da Economia						
Consulta à Base de Dados do INPI						
> Consultar por: Base Patentes Finalizar Sessão					[Início Ajuda?] 1/1	
Depósito de pedido nacional de Patente						
(21) Nº do Pedido: BR 10 2020 025823 0 A2						
(22) Data do Depósito: 17/12/2020						
(43) Data de Publicação: 28/06/2022						
(47) Data de Concessão: -						
(51) Classificação IPC: C07K 7/08 ; A61K 38/10 ; A61P 31/00 ; A61P 35/00						
(54) Título: PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO INSPIRADO NA SEQUÊNCIA DE UM INIBIDOR DE PEPTIDASE E SEU USO EM ENSAIOS BIOLÓGICOS						
PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO INSPIRADO NA SEQUÊNCIA DE UM INIBIDOR DE PEPTIDASE E SEU USO EM ENSAIOS BIOLÓGICOS. A presente invenção refere-se ao peptídeo desenvolvido com o auxílio de ferramentas computacionais. Bioinspirado em uma proteína de origem vegetal, o inibidor de peptidase obtido a partir das sementes de Inga bairina (ILT1) proteína na qual foi dividida por métodos <i>in silico</i> e selecionada a melhor sequência peptídica para modificações em seus resíduos de aminoácidos com o intuito de aumentar seu poder de ação biológico e reduzir a atividade citotóxica. Em baixas						
(57) Resumo: concentrações, o peptídeo é capaz de combater bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e por ação bactericida é capaz de inibir o crescimento da bactéria multiresistente <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA). Apresenta atividade antifúngica sobre o crescimento dos fungos <i>Candida albicans</i> e <i>Candida tropicalis</i> e ação contra duas linhagens de células cancerígenas de Adenocarcinoma Renal Humano (786-P) e Hepatocarcinoma Humano (HepG2) evidenciando o caráter multifuncional da molécula de estudo. Desta forma, a composição proposta pode ser utilizada como agente antimicrobiano e anticâncer, objetivando o tratamento de doenças causadas por micro-organismos patogênicos e células cancerígenas.						
(71) Nome do Depositante: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL (BR/MS)						
(72) Nome do Inventor: SUELLEN RODRIGUES RAMALHO / MARIA LÍGIA RODRIGUES MACEDO / JANAINA DE CÁSSIA ORLANDI SARDE / RENATA TRENTIN PERDOMO						
Anuidades Ver todas as anuidades						
Tabela de Retribuição						
	3ª Anuidade <input checked="" type="checkbox"/>		4ª Anuidade <input checked="" type="checkbox"/>			
	Início	Fim	Início	Fim		
Ordinário	17/12/2022	17/03/2023	17/12/2023	17/03/2024		
Extraordinário	18/03/2023	17/09/2023	18/03/2024	17/09/2024		
Petições						
Serviço	Pgo	Protocolo	Data	Imagens	Cliente	Delivery Data
Serviços						
203	<input checked="" type="checkbox"/>	8902201403376	25/04/2022	- - -	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL	-
206	<input checked="" type="checkbox"/>	870218027721	24/03/2021	- - -	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL	-
200	<input checked="" type="checkbox"/>	87020158028	17/12/2020	- - -	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL	-
Anuidade						
220	<input checked="" type="checkbox"/>	890220447656	22/12/2022	- - -	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL	-
Outros						
Publicações						
RPI	Data RPI	Despacho	Ing	Complemento do Despacho		
2686	28/06/2022	3.1	- -			
2622	06/04/2021	2.1				
2619	16/03/2021	2.5		Text da exigência disponível no parecer (pdf) - acesso: Buscavet no Portal do INPI. Prazo para cumprimento - 30 (Trinta) dias corridos contados do 1º dia útil após essa publicação (não confunda o prazo de 30 dias, com 1 mês ou com 31 dias). Protocolo a petição de cumprimento - Guia de Recolhimento do União (GRU) de código 206 (Cumprimento de exigência formal preliminar) + documentos corrigidos, de acordo com o parecer. O pedido com exigência não cumprida ou cumprida fora do prazo não será aceito e terá sua numeração anulada.		
2608	29/12/2020	2.10	- -	Número de Protocolo '87020158028' em 17/12/2020 10:44 (WS)		
Dados atualizados até 17/01/2023 - Nº da Revista: 2715						
Documentos Publicados						
RPI 2686						

Anexo III - Protocolo do comprovante de depósito da patente do peptídeo IKR18.



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020025823-0 A2



(22) Data do Depósito: 17/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 28/06/2022

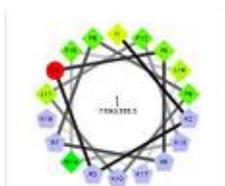
(54) **Título:** PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO INSPIRADO NA SEQUÊNCIA DE UM INIBIDOR DE PEPTIDASE E SEU USO EM ENSAIOS BIOLÓGICOS

(51) **Int. Cl.:** C07K 7/08; A61K 38/10; A61P 31/00; A61P 35/00.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL.

(72) **Inventor(es):** SUELLEN RODRIGUES RAMALHO; MARIA LÍGIA RODRIGUES MACEDO; JANAINA DE CÁSSIA ORLANDI SARDI; RENATA TRENTIN FERDOMO.

(57) **Resumo:** PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO INSPIRADO NA SEQUÊNCIA DE UM INIBIDOR DE PEPTIDASE E SEU USO EM ENSAIOS BIOLÓGICOS. A presente invenção refere-se ao peptídeo desenvolvido com o auxílio de ferramentas computacionais. Bioinspirado em uma proteína de origem vegetal, o inibidor de peptidase obtido a partir das sementes de *Inga burina* (ILT1) proteína na qual foi clivada por métodos *in silico* e selecionada a melhor sequência peptídica para modificações em seus resíduos de aminoácidos com o intuito de aumentar seu poder de ação biológico e reduzir a atividade citotóxica. Em baixas concentrações, o peptídeo é capaz de combater bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e por ação bactericida é capaz de inibir o crescimento da bactéria multiresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Apresenta atividade antifúngica sobre o crescimento dos fungos *Candida albicans* e *Candida tropicalis* e ação contra duas linhagens de células cancerígenas de Adenocarcinoma Renal Humano (786-0) e Hepatocarcinoma Humano (HepG2) evidenciando o caráter multifuncional da molécula de estudo. Desta forma, a composição proposta pode ser utilizada como agente antimicrobiano e anticâncer, objetivando o tratamento de doenças causadas por micro-organismos patogênicos e células cancerígenas.



IKRQYKRFFKLFKWFLKK

Fator de impacto: 4.117 – Conceito Capes (A1)
(<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130244>)

BBA - General Subjects 1866 (2022) 130244



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - General Subjects

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbagen



The synthetic antimicrobial peptide IKR18 displays anti-infectious properties in *Galleria mellonella* in vivo model

Suellen Rodrigues Ramalho^a, Janaina de Cássia Orlandi Sardi^a, Edson Crusca Júnior^b, Reinaldo Marchetto^b, Heberton Wender^c, Luiz Felipe Praça Vargas^c, Antonio de Miranda^d, Claudiane Vilharroel Almeida^a, Luís Henrique de Oliveira Almeida^a, Caio Fernando Ramalho de Oliveira^a, Maria Lígia Rodrigues Macedo^{a,*}

^a Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas, FAPAN, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil

^b Instituto de Química, Departamento de Bioquímica e Química Tecnológica, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, Brazil

^c Laboratório de Nanomateriais e Nanotecnologia Aplicada (LNNA), Instituto de Física, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil

^d Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Anti-infective activity
Antibiofilm
Bacteria
Infection model
MRSA

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are promising tools for developing new antibiotics. We described the design of IKR18, an AMP designed with the aid of computational tools. IKR18 showed antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). CD studies revealed that IKR18 assumes an alpha-helical structure in the membrane-mimetic environment. The action mechanism IKR18 involves damage to the bacteria membrane, as demonstrated by Sytox green uptake. Furthermore, IKR18 displayed synergic and additive effects in combination with antibiotics ciprofloxacin and vancomycin. The peptide showed anti-biofilm activity in concentration and efficiency compared with commercial antibiotics, involving the direct death of bacteria, as confirmed by scanning electron microscopy. The anti-infective activity of IKR18 was demonstrated in the *Galleria mellonella* model infected with *S. aureus*, MRSA, and *Acinetobacter baumannii*. The novel biotranspired peptide, IKR18, proved to be effective in the control of bacterial infection, opening opportunities for the development of further assays, including preclinical models.

1. Introduction

Infectious diseases are the major threats to public health and economic stability. Antimicrobial resistance (AMR) is an imminent threat [1], accounting for 10 million deaths annually and an impact on the global economy of one hundred trillion dollars [2]. Withal, the development and commercialization of novel antibiotics have slowed. Between 2017 and 2019, 11 new antimicrobial therapies were approved by FDA [3]. Furthermore, the formation of bacterial biofilms is an additional virulence behavior. The bacteria biofilm is formed by a three-dimensional microbial community protected with an extracellular polymeric matrix composed of water and macromolecules, including nucleic acids, lipids, and proteins. The bacteria might enter a lower metabolic state inside the biofilm, hindering antibiotic therapy and host immune defenses [4].

The development of new health technologies must deal with the

adaptation mechanisms of microorganisms. The WHO published a list of pathogens named ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* species), pathogens designated 'priority status' since new antimicrobial development is urgent [5]. Although methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is a significant burden in US health care settings, the incidence of hospital-acquired MRSA is declining, while the incidence of community-acquired MRSA infections has increased [6]. *A. baumannii* infection rates are comparatively low compared to those of other ESKAPE pathogens; however, 45% of global *A. baumannii* isolates are multidrug-resistant. Multidrug-resistant strains of *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* are overwhelming [7].

This scenario fosters initiatives to develop new antibacterial therapies, such as antimicrobial peptides (AMPs). AMPs are small molecules (3–50 kDa) with a positive net charge (+2 to +9), and an amphipathic rearrange that facilitates the interaction with the bacterial membranes

* Corresponding author.

E-mail address: lgiamacedo18@gmail.com (M.L.R. Macedo).

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130244>

Received 31 May 2022; Received in revised form 14 August 2022; Accepted 2 September 2022

Available online 23 September 2022

0304-4165/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.