



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SAMILLA BEATRIZ DE REZENDE

**INFLUÊNCIA DE D-ARGININAS E D-LISINAS EM
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DESENHADOS
COMPUTACIONALMENTE**

CAMPO GRANDE – MS
MAIO – 2021

SAMILLA BEATRIZ DE REZENDE

**INFLUÊNCIA DE D-ARGININAS E D-LISINAS EM
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DESENHADOS
COMPUTACIONALMENTE**

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia"

Orientador: Prof. Dr. Marlon Henrique e Silva Cardoso

Coorientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

CAMPO GRANDE – MS

MAIO – 2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade Católica Dom Bosco
Bibliotecária Mourimise de Moura Viana - CRB-1 3360

R4671. Rezende, Samilla Beatriz de
Influência de D-argininas e D-lisinas em peptídeos
antimicrobianos desenhados computacionalmente / Samilla
Beatriz de Rezende; Orientada pelo Prof. Dr. Marlon
Henrique e Silva Cardoso e Coorientada pelo Prof.
Dr. Octávio Luiz Franco.-- Campo Grande, MS : 2021.
73 f.: il.

Dissertação (mestrado em biotecnologia) - Universidade
Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2021
Bibliografia: p. 58 a 65

I. Peptídeos antimicrobianos. 2. Antimicrobianos. 3.
Aminocíclidos.I. Cardoso, Marlon Henrique e Silva. II. Franco,
Octávio Luiz. III. Título.

CDD: Ed. 21 -- 660.6



**"INFLUÊNCIA DE D-argininas e D-lisinas EM PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS DESENHADOS COMPUTACIONALMENTE"**

Autora: Samilla Beatriz de Rezende

Orientador: Prof. Dr. Marlon Henrique e Silva Cardoso

Coorientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADO em 10 de maio de 2021.

A presente defesa foi realizada por web conferência. Eu, Marlon Henrique e Silva Cardoso, como presidente da banca assinei a folha de aprovação com o consentimento de todos os membros, ainda na presença virtual destes. A Web conferência foi gravada e o link (<https://meet.google.com/ixy-suhh-grs>) ficará disponível por três anos, a partir da data de realização da mesma.


Prof. Dr. Marlon Henrique e Silva Cardoso – UCDB

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco-UCDB

Prof. Dr. Nuno Fernando D. C. C. dos Santos – UCDB

Prof. Dr. Sébastien Charneau - UnB

MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO - UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Av. Tamandaré, 6000 - Jardim Seminário - CEP: 79117-900 - CAMPO GRANDE - MS - BRASIL
CNPJ/MF: 03.226.149/0015-87 - Fone: 55 67 3312-2300 - Fax: 55 67 3312-3301 - www.ucdb.br

“O maior bem do Homem é uma mente inquieta”

Isaac Asimov

Dedicado a todos os curiosos que estão sempre em busca de mais, que este trabalho possa agregar ainda mais nos seus conhecimentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sempre me dá forças para continuar.

A minha família, em especial minha mãe, senhora Lismar que sempre acredita e sonha comigo.

Ao meu orientador Dr. Marlon Henrique e Silva Cardoso e sua esposa Dra. Elizabete de Souza Cândido por serem uma fonte de inspiração e resiliência.

Ao meu coorientador Dr. Octávio Luiz Franco por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa.

Aos meus colaboradores do laboratório *S-INOVA Biotech*

As minhas amigas de jaleco e carreira M.Sc. Joelma Patrícia Rossetto e M.Sc. Karen Garcia Nogueira Oshiro, pela disposição em ajudar na hora do aperto.

A todos que de alguma maneira ajudaram com alguma sugestão.

Aos membros da banca, pois se dispuseram a avaliar este trabalho.

A instituição Universidade Católica Dom Bosco.

A CAPES, por financiar minha bolsa de estudos e as instituições de fomento CNPq e FUNDECT.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1.	Infecções bacterianas.....	16
1.2.	Peptídeos antimicrobianos (PAMs).....	18
1.3.	Peptídomiméticos	21
1.4.	PAMs contendo D-AAs.....	26
1.5.	PAMS desenhados computacionalmente	28
2.	JUSTIFICATIVA	34
3.	OBJETIVOS	35
3.1.	Objetivo geral.....	35
3.2.	Objetivos específicos.....	35
4.	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1.	Síntese química dos peptídeos derivados <i>P. aerophilum</i>	36
4.2.	Teste de estabilidade em soro proveniente de plasma humano	36
4.3.	Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)	36
4.4.	Avaliação da atividade hemolítica	37
4.5.	Ensaio de viabilidade celular	37
4.6.	Caracterização das estruturas secundárias por dicroísmo circular (DC)	38
4.7.	Avaliação dos deslocamentos químicos secundários por ressonância magnética nuclear (RMN)	38
5.	RESULTADOS	39
5.1.	Grupos de estudo, propriedades físico-químicas e síntese	39
5.2.	Estabilidade em soro proveniente de plasma humano	41
5.3.	Ensaios antibacterianos	42
5.4.	Ensaios hemolítico e citotóxico	43
5.5.	Análises estruturais	44
6.	DISCUSSÃO	50
7.	CONCLUSÃO.....	56
8.	PERSPECTIVAS	57
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
10.	ANEXOS	66

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Representação de estratégias peptidomiméticas, que estão sendo utilizadas no combate as doenças causadas por cepas bacterianas.....	23
Tabela 2. Dados preliminares em relação as atividades antibacteriana e hemolítica do peptídeo parental PaDBS1 e seus análogos gerados através do algoritmo <i>Joker</i> . Propriedades físico-químicas como carga, hidrofobicidade e momento hidrofóbico foram calculadas através do servidor <i>HeliQuest</i> (https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py).....	32
Tabela 3. Representação das sequências utilizadas, onde o Grupo I consiste de sequências em L-aminoácido, seguido do Grupo II com alterações em todos os resíduos de arginina e lisina para D-aminoácido.....	39
Tabela 4. Teste de estabilidade em soro proveniente de plasma humano para os peptídeos do Grupo I (L-aminoácido) e os peptídeos do Grupo II (diastereoisômeros). Resíduos em negrito (Grupo II) representam D-aminoácidos.....	41
Tabela 5. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para os peptídeos PaDBS1R2, PaDBS1R6, PaDBS1R7 e seus análogos diastereoisômeros.....	43
Tabela 6. Atividade hemolítica (%) e citotóxica (IC ₅₀) dos peptídeos de estudo, frente a eritrócitos de camundongos, células RAW 267,4 e macrófagos recrutados de camundongos.....	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mecanismos de resistência mais comumente relatados em cepas do grupo ESKAPE.** Representação esquemática de alguns dos mecanismos mais comumente relatados em cepas Gram-negativas, incluindo (i) a atuação das enzimas β -lactamases para a hidrólise do anel β -lactâmico de antibióticos, (ii) a alteração do alvo por meio de mutações em genes específicos, (iii) formação de biofilme, (iv) a inibição da ação antibiótica através de enzimas inibidoras, (v) superexpressão de bombas de efluxo, bem como (vi) modificações nas propriedades físico-químicas da superfície celular, impedindo a entrada dos antibióticos. Figura do autor.....18
- Figura 2. Mecanismos de ação mais comumente relatados para PAMs.** Representação esquemática dos mecanismos associados a membranas reportados para PAMs líticos, incluindo barril toroidal, barril estável e modelo carpete. Ademais, estudos têm destacado o potencial de alguns PAMs em atravessar as membranas bacterianas para exercer atividades intracelulares, incluindo a síntese de DNA/RNA, proteínas, bem como inibição da ação de proteínas chaperonas. Figura do autor.....20
- Figura 3. Estratégias peptidomiméticas utilizadas atualmente no desenvolvimento de PAMs candidatos a fármacos.** Representação esquemática da otimização dos PAMs através das estratégias peptidomiméticas. Dentre elas podemos citar a inversão de quiralidade (inserção de D-aminoácidos em sequências L-aminoácidos); a glicosilação de PAMs (inserção de açúcares nas sequências de PAMs), podendo ser ligação aos átomos de oxigênio (tipo-O), nitrogênio (tipo-N), carbono (tipo-C) ou enxofre (tipo-S); a PEGilação (adição de cadeias de polietilenoglicol (PEG) às cadeias laterais de PAMs); PAMs grampeados (inserção de um grampo composto por hidrocarbonetos, o qual estabiliza uma determinada estrutura bioativa); a ciclização, onde as extremidades (NH₂) e (COOH) se encontram conectadas formando uma estrutura circular, podendo também ocorrer entre as cadeias laterais de PAMs; a formação de dendrímeros (agregados de polímero radialmente ramificados a partir de um núcleo central, onde há a multimerização do PAMs alvo); e, por fim, as estratégias de *grafting*, onde epítópos (por exemplo, PAMs) com uma determinada atividade biológica podem ser inseridos dentro de um arcabouço estável (por exemplo, estruturas estabilizadas por cisteínas) visando uma maior biodisponibilidade no hospedeiro infectado. Figura do autor.....25

Figura 4. Inserção de D-aminoácidos em sequências L-aminoácidos. Representação das estratégias de inserção de D-aminoácidos em sequências de L-aminoácidos. Inicialmente, a partir de uma sequência composta inteiramente por L-aminoácido podemos gerar sua imagem espelhada composta inteiramente por D-aminoácidos. Ademais, a topologia e orientação espacial de peptídeos L-aminoácidos podem ser preservadas em peptídeo D-aminoácido a partir da síntese deste em sua ordem inversa, gerando peptídeos retro-inverso. Por fim, peptídeos diastereoisômeros são obtidos a partir de uma mistura de L- e D-aminoácidos em uma mesma sequência peptídica.....**28**

Figura 5. Diagramas de hélice para o peptídeo parental PaDBS1 e seus análogos PaDBS1R2, R6 e R7 gerados pelo algoritmo Joker. Os diagramas mostram a distribuição dos resíduos de aminoácidos ao longo de uma estrutura α -helicoidal para os peptídeos. Os resíduos carregados positivamente estão apresentados em cor azul, os não carregados em cinza e os resíduos não polares em amarelo. O vetor do momento hidrofóbico é representado por setas que partem do centro dos diagramas, uma vez que o valor estimado do momento hidrofóbico é proporcional ao tamanho das setas.**40**

Figura 6. Espectros de DC para os peptídeos PaDBS1R2, R6 e R7 parentais (L-aminoácido – Grupo I) e diastereoisômeros (D-Arg/D-Lis – Grupo II). Os espectros de DC foram adquiridos em diferentes ambientes, incluindo água (preto), tampão (cinza), TFE 30% (v/v) (vermelho) e 50 mmol L⁻¹ SDS (azul). Os peptídeos L-aminoácido (Grupo I) estão representados de A-C, enquanto os análogos diastereoisômeros (Grupo II) estão representados de D-F.....**45**

Figura 7. Deslocamentos químicos secundários para H α a partir da subtração dos deslocamentos experimentais dos deslocamentos descritos na literatura para estruturas randômicas descritas por Wishart *et al.* (1995), bem como análises de coeficiente de temperatura em TFE 30% (v/v). Em (A) o segmento α -helicoidal para PaDBS1R2 foi calculado entre os resíduos Lis³ a Lis⁶ seguido da Lis¹⁰ a Arg¹³. Para o peptídeo PaDBS1R6 o seguimento α -helicoidal foi observado entre a Lis⁶ e Ile¹⁶. Por fim, o peptídeo PaDBS1R7 apresentou um segmento α -helicoidal entre Lis⁸ e Ile¹⁷. (B) Para os peptídeos do Grupo II apenas três resíduos obtiveram valores maiores que -0,1 ppm e menores que 0,1 ppm caracterizando, assim, ausência de formação de estrutura secundária. (C) Coeficiente de temperatura calculado para o Grupo I, onde valores mais positivos que -4,6 ppb K⁻¹ caracterizam resíduos mais protegidos ao solvente e,

consequentemente, envolvidos em ligações de hidrogênio intrapeptídicas (CIERPICKI; OTLEWSKI, 2001).....47

Figura 8. Deslocamentos químicos secundários para H α a partir da subtração dos deslocamentos experimentais dos deslocamentos descritos na literatura para estruturas randômicas descritas por Wishart *et al* (1995), e mapeados em todas as variações de temperatura, para todas as sequências de PAMs L-aminoácidos. Em (A) os valores para o deslocamento em média se mantiveram em região com valor mais negativo que -0,1 ppm, indicando formação de estrutura secundária. (B) o PaDBS1R6 mostrou tendência para formação de estrutura secundária apenas em temperatura ambiente (298 K), em média sua estrutura se manteve em *random coil* uma vez que as temperaturas variaram para mais ou para menos. (C) O mesmo comportamento observado para PaDBS1R2 foi também observado para PaDBS1R7 mantendo, assim, uma maior estabilidade de estrutura secundária, ainda que ocorra variação na temperatura.....49

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

OMS Organização Mundial da Saúde

ESKAPE *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp*

RIF rifamicina

RNA ácido ribonucleico

DNA ácido desoxirribonucleico

PAM peptídeo antimicrobiano

PEG polietilenoglicol

QSAR relação quantitativa estrutura-atividade (do inglês *Quantitative Structure-Activity Relationship*)

APD Antimicrobial Peptide Database

NR-NCBI National Center for Biotechnology Information

CIM concentração inibitória mínima

CBM concentração bactericida mínima

MTT brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]

DC dicroísmo circular

RMN ressonância magnética nuclear

TFE 2,2,2 trifluoroetanol

SDS dodecil sulfato de sódio

TOCSY Espectroscopia de Correlação Total

NOESY Efeito Nuclear *Overhouser*

HRAN local de coleta da cepa de *A.baumannii*, no Hospital Regional da Asa Norte (Brasília)

KpC *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase

RESUMO

REZENDE, Samilla Beatriz. **Influência de D-Argininas e D-Lisinas em peptídeos antimicrobianos desenhados computacionalmente.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2021.

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm sido destacados como uma alternativa a antibioticoterapia convencional. Contudo, alguns obstáculos ainda devem ser ultrapassados para que os PAMs sejam administrados a nível clínico, incluindo sua rápida eliminação e degradação proteolítica. A otimização de PAMs através da incorporação de D-aminoácidos (D-aa) em sequências L-aminoácidos (L-aa) pode gerar peptídeos diastereoisômeros com maior resistência a proteases, sendo uma estratégia para superar as limitações dos PAMs em um contexto clínico. Assim, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar a influência de D-Argininas (D-Arg) e D-Lisinas (D-Lis) em três peptídeos antimicrobianos desenhados computacionalmente, denominados PaDBS1R2, R6 e R7. Dois grupos de peptídeos foram utilizados, incluindo um grupo parental L-aa (Grupo I) e um grupo contendo todos os resíduos de arginina e lisina em sua orientação D-aa (grupo II, diastereoisômeros). Todos os peptídeos foram sintetizados e submetidos à testes de estabilidade em soro proveniente de plasma humano. Ademais, foram realizados ensaios contra cepas susceptíveis e resistentes. Ensaios hemolíticos e citotóxicos utilizando células de mamíferos saudáveis também foram realizados. A avaliação estrutural de ambos os grupos foi realizada através de experimentos de dicroísmo circular (DC) e ressonância magnética nuclear (RMN). Nos ensaios de estabilidade, após 60 min de incubação com soro humano, os peptídeos do Grupo II apresentaram maior resistência a proteólise ($>55\%$) quando comparados ao Grupo I (0%). Contudo, do ponto de vista de atividades biológicas, apenas os peptídeos do Grupo I apresentaram amplo espectro de atividade antibacteriana de 32 a 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto os peptídeos diastereoisômeros tiveram suas atividades drasticamente comprometidas. Para ambos os grupos, não foram observadas atividades hemolíticas ou citotóxicas até 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As análises estruturais revelaram que o Grupo I adotou estrutura de α -hélice em 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) 30% (v/v) e em micelas de dodecil sulfato de sódio (SDS). No entanto, o Grupo II perdeu completamente sua estrutura secundária. Em suma, a inversão de quiralidade proporcionou uma maior estabilidade em plasma nos peptídeos do Grupo II a custo da perda estrutural que, por consequência, ocasionou na depleção da atividade dos peptídeos. Dessa forma, estudos futuros são encorajados para não só avaliar a influência, mas modular a inserção de D-Arg e D-Lis nas sequências alvo para otimização da estrutura-função em peptídeo diastereoisômeros.

Palavras-chave: peptídeos antimicrobianos, D-aminoácidos, peptídeos diastereoisômeros, resistência bacteriana

ABSTRACT

REZENDE, Samilla Beatriz. **Influence of D-Arginines and D-Lysines in computationally designed antimicrobial peptides.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2021.

Antimicrobial peptides (AMPs) have been highlighted as an alternative to conventional antibiotic therapies. However, some obstacles still have to be overcome for AMPs to be administered at the clinical level, including their rapid elimination and proteolytic degradation. The optimization of AMPs through the incorporation of D-amino acid residues (D-aa) into L-amino acid sequences (L-aa) can generate diastereomeric peptides, with greater resistance to proteases, being a strategy to overcome AMP's limitations in the clinical context. Thus, the aim of this work was to evaluate the influence of D-Arginines (D-Arg) and D-Lysines (D-Lys) in three computationally designed antimicrobial peptides, named PaDBS1R2, R6, and R7. Two groups of peptides were used, including a parental group L-aa (Group I) and a group containing all arginine and lysine residues in their D-aa orientation (group II, diastereoisomers). All peptides were synthesized and submitted to stability assays in serum from human plasma. In addition, biological assays were performed against susceptible and resistant bacterial strains. Hemolytic and cytotoxic assays using healthy mammalian cells were also carried out. The structural evaluation of both groups was carried out through circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR) experiments. In the stability tests, after 60 min of incubation with human serum, peptides from Group II showed higher resistance to proteolysis (> 55%) when compared to Group I (0%). However, from the point of view of biological activities, only peptides from Group I presented a broad spectrum of antibacterial activity from 32 to 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, whereas the diastereomeric peptides had their activities drastically compromised. For both groups, no hemolytic or cytotoxic activities were observed up to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Structural analyses revealed that Group I adopted an α -helix structure in 2,2,2-trifluoroethanol 30% (TFE) (v/v) and sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles. However, Group II has completely lost its secondary structure. In summary, the inversion of chirality provided greater stability in serum for peptides from Group II at the cost of structural loss that, consequently, led to the depletion of antimicrobial activity. Thus, future studies are encouraged not to only evaluate the influence but also to modulate the insertion of D-Arg and D-Lys in target sequences to optimize structure-function in diastereoisomer peptides.

Keywords: antimicrobial peptides, D-amino acids, diastereomeric peptides, bacterial resistance

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infecções bacterianas

As infecções nosocomiais causadas por cepas bacterianas resistentes a antibióticos representam uma grave ameaça à humanidade (HAY *et al.*, 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), níveis alarmantes de resistência antimicrobiana foram relatados em países de todos os níveis de renda (UNITED, 2019). Sendo assim, projeta-se que essa resistência aos antibióticos de segunda e terceira geração aumente em 70% até 2030 (TAYLER *et al.*, 2019). Nesse contexto, o desenvolvimento de mecanismos de resistência por essas cepas desempenha um grande papel na saúde pública, em âmbito social e na economia mundial (CORNEJO *et al.*, 2017).

Cepas bacterianas resistentes pertencentes ao grupo *ESKAPE* (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter* spp.) se destacam por estar na lista de prioridade para o desenvolvimento de terapias antimicrobianas (SHRIVASTAVA *et al.*, 2018). As cepas deste grupo são conhecidas por possuir diversos mecanismos de resistência a variadas classes de antibióticos, o que as caracterizam como cepas multirresistentes ou “superbactérias” (ALANIS, 2005).

Dentre os mecanismos de resistência mais comumente relatados podemos citar a ação direta de β-lactamases (Figura 1), bem como a modificação de enzimas bacterianas para a inativação de diversas classes de antibióticos como as cefalosporinas, penicilina, aminoglicosídeos, gentamicina e estreptomicina (ZAMAN *et al.*, 2017) (Figura 1). Isto é possível dada a regulação negativa das porinas ou pela substituição de porinas por canais mais seletivos (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). Ademais, cepas resistentes podem modular a expressão de bombas de efluxo bacterianas para o transporte ativo de diversos antibióticos para fora da célula, sendo este um dos principais contribuintes para a resistência intrínseca de bactérias (Figura 1) (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). A mutação genética e aquisição de elementos genéticos móveis (EGMs) nos patógenos também representam elementos associados a resistência (BEATSON; WALKER, 2014). Um exemplo de resistência mutacional é o desenvolvimento de resistência a rifamicina (RIF), uma vez que a mesma bloqueia a transcrição bacteriana por inibição da enzima de polimerase de ácido ribonucleico (RNA) dependente do ácido desoxirribonucleico

(DNA) (MUNITA *et al.*, 2016). Dessa forma, tais mutações resultam na diminuição da afinidade do fármaco por seu alvo, o qual geralmente poupa a atividade catalítica da polimerase, permitindo a transcrição (FLOSS; YU, 2005).

Outra estratégia de sobrevivência dessas bactérias é o desenvolvimento de consórcios organizados conhecidos como biofilmes. Os biofilmes podem ser definidos como uma associação estruturada uni ou polimicrobiana, possuindo uma matriz extracelular de polissacarídeo(s), proteínas e DNA (DE LA FUENTE-NÚÑEZ *et al.*, 2013). A formação dessas comunidades se inicia a partir de células bacterianas planctônicas (livre-nadantes) que se aderem às superfícies formando colônias que, após um tempo, começam a secretar uma matriz extracelular criando, assim, uma barreira física tolerante aos agentes antimicrobianos (KOSTAKIOTI *et al.*, 2013; MAGANA *et al.*, 2018; RÖMLING; BALSALOBRE, 2012). Além disso, os biofilmes desempenham um papel proeminente em infecções crônicas, sendo responsáveis por mais de 80% das infecções nosocomiais crônicas elevando, assim, as taxas de hospitalização (MAGANA *et al.*, 2018; RÖMLING; BALSALOBRE, 2012).

Em vista de todos esses mecanismos de resistência apresentados, uma das alternativas para o combate a essas cepas é a utilização de peptídeos antimicrobianos (PAM), os quais serão discutidos em maiores detalhes nos tópicos a seguir.

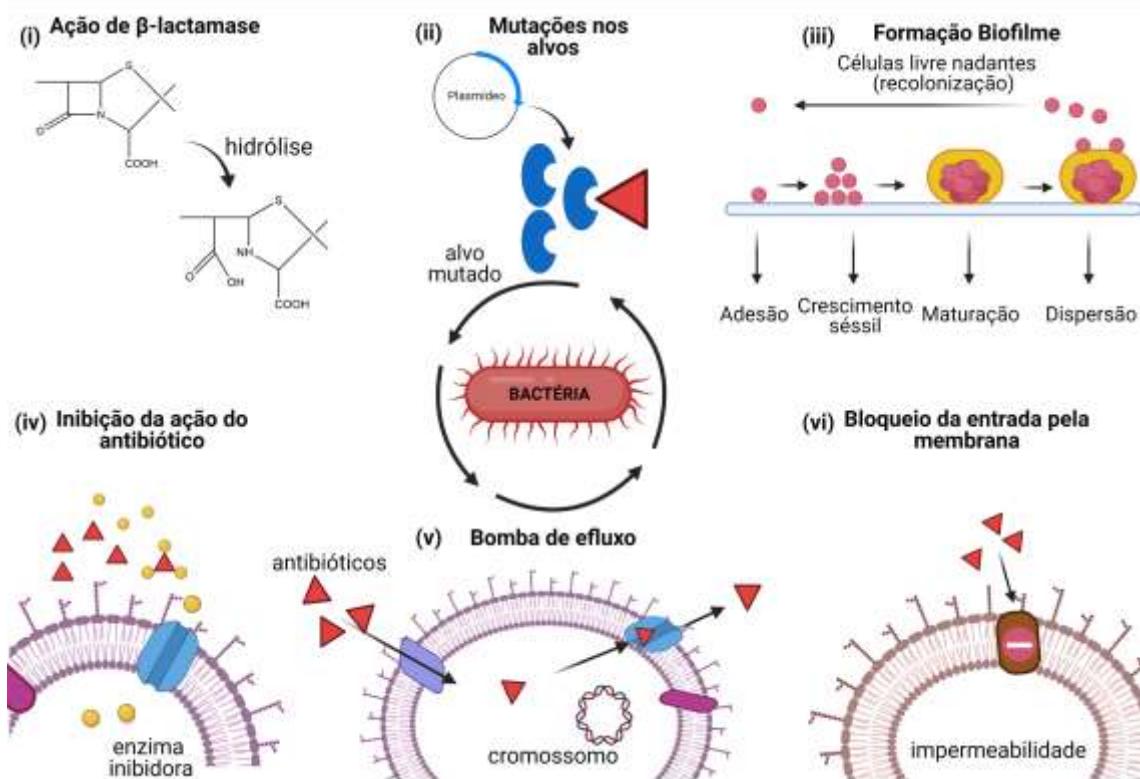


Figura 1. Mecanismos de resistência mais comumente relatados em cepas do grupo ESKAPE. Representação esquemática de alguns dos mecanismos mais comumente relatados em cepas Gram-negativas, incluindo (i) a atuação das enzimas β -lactamas para a hidrólise do anel β -lactâmico de antibióticos, (ii) a alteração do alvo por meio de mutações em genes específicos, (iii) formação de biofilme, (iv) a inibição da ação antibiótica através de enzimas inibidoras, (v) superexpressão de bombas de efluxo, bem como (vi) modificações nas propriedades físico-químicas da superfície celular, impedindo a entrada dos antibióticos. Figura do autor.

1.2. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Os PAMs possuem propriedades multifuncionais que estão intrinsecamente relacionadas à sua diversidade e perfil estrutural, tornando-os moléculas promissoras dispostas de diversos mecanismos de ação (TORRES *et al.*, 2018). Portanto, esta classe de peptídeos surgiu como uma nova proposta para o desenvolvimento de fármacos, uma vez que podem atuar no combate a patógenos humanos como bactérias, vírus, fungos e protozoários (MAHLAPUU *et al.*, 2020). Em sua maioria os PAMs são constituídos por

L-aminoácidos, apresentando estruturas secundárias com a presença de α -hélice e folha β , ou por uma mistura de ambas. Essa classe de peptídeos é conhecida por representar estruturas anfipáticas com conjuntos de regiões hidrofóbicas e carregadas positivamente, contendo cerca de 10 a 50 resíduos de aminoácidos arranjados de forma linear ou cíclica (SIRTORI *et al.*, 2008). Contudo, crescentes relatos vêm descrevendo a descoberta, bem como a construção de PAMs curtos e de estrutura altamente instável apresentando, assim, inúmeros estados de transição ambiente dependente (FJELL *et al.*, 2012).

Os PAMs são comumente relatados por sua capacidade de interagir com membranas microbianas, através de interações eletrostáticas e não específicas (HURDLE *et al.*, 2011). A presença de resíduos como arginina, lisina e histidina (pH dependente) influenciam diretamente no caráter catiônico dos PAMs, bem como no ancoramento inicial peptídeo-membrana (HANCOCK; SCOTT, 2000; TRAVKOVA *et al.*, 2017). No entanto, é importante destacar que, por serem de natureza complexa, esses mecanismos de interação peptídeo-membrana dependem também da composição de lipídios e fluidez da membrana, além da atividade metabólica do organismo alvo (SANI; SEPAROVIC, 2016).

Dentre os mecanismos de ação mais bem descritos para os PAMs, podemos citar a formação de poros em membranas biológicas, resultando na saída de íons e metabólitos do meio intracelular para o extracelular, despolarização de membrana, interrupção de processos respiratórios e, consequentemente, a morte celular (KUMAR *et al.*, 2018). Nesse contexto, os modelos de mecanismos de ação mais conhecidos e elucidados são: barril toroidal, barril estável e modelo carpete (Figura 2).

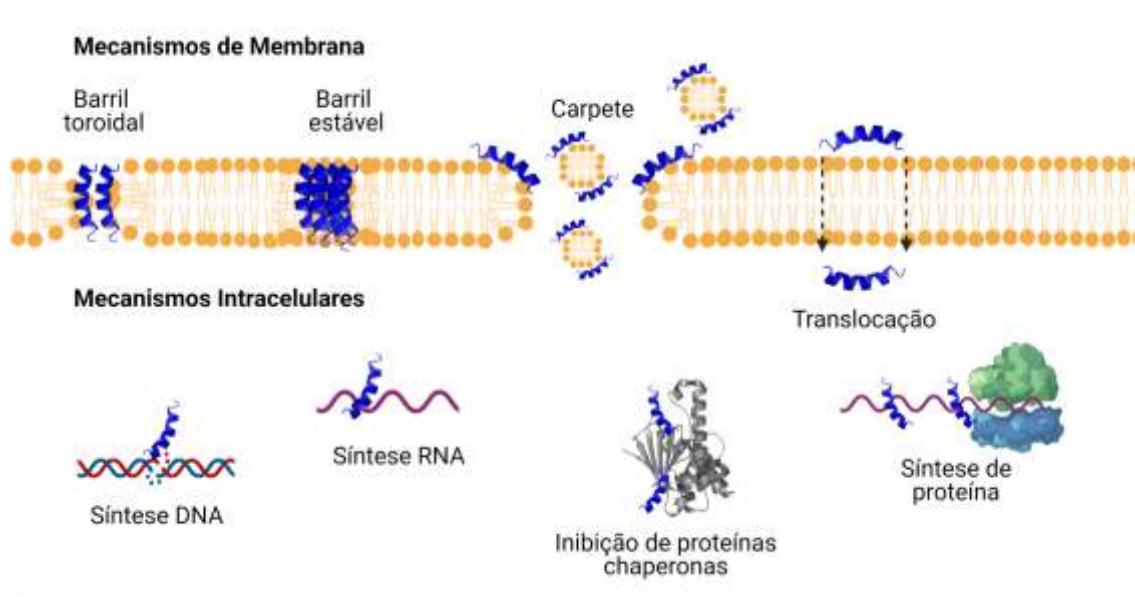


Figura 2. Mecanismos de ação mais comumente relatados para PAMs.
 Representação esquemática dos mecanismos associados a membranas reportados para PAMs líticos, incluindo barril toroidal, barril estável e modelo carpete. Ademais, estudos têm destacado o potencial de alguns PAMs em atravessar as membranas bacterianas para exercer atividades intracelulares, incluindo a síntese de DNA/RNA, proteínas, bem como inibição da ação de proteínas chaperonas. Figura do autor.

Em adição aos mecanismos relacionados a permeabilização/rompimento de membranas biológicas, trabalhos têm relatado a influência dos PAMs em processos macromoleculares, incluindo sua interferência na biossíntese de membrana externa, na divisão celular, além de outras atividades cujos alvos são a síntese de RNA e proteínas (FJELL *et al.*, 2012). Nesse sentido, os PAMs não líticos são identificados pela sua capacidade de inativar bactérias interrompendo processos celulares vitais, sendo que podem atravessar a membrana bacteriana para interferir na síntese de DNA, RNA, parede celular e proteínas (CARDOSO *et al.*, 2019).

Apesar de todas as características citadas acima, alguns PAMs podem apresentar algumas limitações em relação ao seu potencial terapêutico. Dentre elas, podemos citar as propriedades hemolíticas, degradação por proteases, biodisponibilidade, instabilidade estrutural, bem como citotoxicidade frente células de mamíferos, o que impacta diretamente na viabilidade do desenvolvimento de um possível fármaco (MAHLAPUU *et al.*, 2020). Nesse contexto, a otimização de PAMs representa uma área da biologia

sintética que visa o desenvolvimento de moléculas antimicrobianas mais efetivas e que possam ser usadas como potenciais fármacos (TORRES; DE LA FUENTE-NUNEZ, 2019). Sendo assim, para superar essas limitações, pesquisas têm sido realizadas afim de otimizar e modular a estrutura dos PAMs, contudo mantendo sua bioatividade original. Dentre as estratégias de melhoramento de PAMs, podemos citar as modificações químicas como, por exemplo, glicosilação, ciclização, PEGuilação, utilização de dendrímeros, grampeamento e inversão de quiralidade de resíduos chave. Essas estratégias são conhecidas como “peptidomiméticos”.

1.3. Peptidomiméticos

O termo “peptidomimético” foi introduzido na década de 80. Atualmente, já é um conceito bem estabelecido na descoberta de medicamentos para abordar os peptídeos bioativos, que estão sendo levados em consideração para o desenvolvimento de novos fármacos também chamados de “medicamentos peptidomiméticos” (TRABOCCHI, 2020). Com os avanços tecnológicos atuais é possível produzir peptídeos sintéticos juntamente com estratégias para otimizar compostos líderes a partir de peptídeos naturais e sintéticos.

Devido aos avanços na otimização das sequências e estruturas de PAMs por estratégias computacionais, há um aumento crescente de novas sequências depositadas em bancos de dados. No entanto, embora esses novos PAMs demonstrem um potencial promissor frente a cepas e biofilmes bacterianos, essas moléculas precisam superar inúmeros obstáculos devido à sua instabilidade metabólica, resultando em baixa biodisponibilidade oral e intravenosa (TRABOCCHI, 2020). Em vista disso, os peptidomiméticos foram concebidos para atender a essas limitações, pois são desenvolvidos para apresentar estabilidade metabólica, biodisponibilidade eficiente, alta afinidade e seletividade em peptídeos bioativos (LENCI; TRABOCCHI, 2020).

Através da otimização de peptídeos por modificações físico-químicas é possível modular a relação estrutura-função visando o melhoramento da atividade biológica (Tabela 1). Algumas abordagens peptidomiméticas vêm sendo aplicadas para aumentar a diversidade dos PAMs, bem como estender sua gama de funcionalidades, incluindo glicosilação (Figura 3), que interfere na rigidez dos PAMs (BEDNARSKA *et al.*, 2017). Estratégias de PEGuilação também estão sendo utilizadas para evitar a rápida eliminação de PAMs, através da adição de uma ou mais cadeias de polietilenoglicol

(PEG) (SOUSA *et al.*, 2018). Podemos citar também a ciclização e o grampeamento (*stapling*) de PAMs, favorecendo a estabilização da estrutura secundária e, consequentemente, preservando determinada conformação bioativa (Figura 3) (CHE, 2019; MIGOŃ *et al.*, 2018). Além disso, PAMs organizados em dendrímeros têm sido utilizados no ajuste e aperfeiçoamento de peptídeos antimicrobianos através da sua multimerização e favorecendo, assim, a biodisponibilidade e liberação controlada dessa classe de antimicrobianos no organismo hospedeiro infectado (SCORCIAPINO *et al.*, 2017). Ademais, a utilização e incorporação de D-aminoácidos, em sua maioria, provê resistência à proteólise e propriedades biológicas preservadas, independentemente do reconhecimento quiral (CARDOSO; CÂNDIDO; *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019).

Em vista de todas estas estratégias de otimização de PAMs como alternativa na luta contra as cepas resistentes. O foco desse trabalho foi a incorporação de D-aminoácidos em sequências de L-aminoácidos com o objetivo de promover a resistência a proteólise e preservar as propriedades antimicrobianas dos mesmos. O conceito, aplicação e custo-benefício de PAMs contendo D-aminoácidos serão abordados em detalhes nos tópicos a seguir.

Tabela 1. Representação de estratégias peptidomiméticas, que estão sendo utilizadas no combate as doenças causadas por cepas bacterianas.

Peptidomiméticos	Peptídeos	Atividade Antibacteriana	Referências
Glicosilação	[T9,K7]indolicidina [βGlc-T9,K7]indolicidina PDGu(7)-block- PBLK(13) Peptídeo β-bloqueador (PAS8-b-PDM12)	<i>E.coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>enterica</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> e <i>M. smegmatis</i> MRSA (clinical isolates) <i>K. pneumoniae</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>Enterobacter spp</i> <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , e <i>B. anthracis</i> <i>S. aureus</i>	(DWIVEDI <i>et al.</i> , 2019) (ZHANG <i>et al.</i> , 2019) (SI <i>et al.</i> , 2020)
PEGuilação	PEG-CaLL	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , e <i>B. anthracis</i>	(MORRIS <i>et al.</i> , 2012)
Ciclização	CyO2 – cycloviolacina 2 Kalata B1, circulina A/B conotoxina ω-MVIIA [G1K,K8R]cGm	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> <i>E. coli</i> , <i>P. aeurginosa</i> , <i>S. aureus</i> e duas cepas fúngicas, incluindo <i>C. kefyr</i> e <i>C. tropicalis</i> <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	(STRÖMSTEDT <i>et al.</i> , 2017) (HEMU; P TAM, 2017) (TROEIRA HENRIQUES <i>et al.</i> , 2017)
Grafting	C1/C2 RV3	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> , <i>S. pullorum</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. aureus</i> , MRSA, <i>S. epidermidis</i> e <i>E. faecalis</i>	(ANDREEV <i>et al.</i> , 2016) (WANG <i>et al.</i> , 2021)
Grampeamento	esculetina_2EM : Ac-DS-14W, Ac-DS-12W, Ac-DS-3W, Ac-DS-5W , Su-DS-5W, H-DS-5W 6K-F17 : S-6K-F17 ,S-6K-F17-2G, S-6K-F17-3G, S-6K-F17-3GN Mag(i+4)1,15	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E.coli</i> , <i>S. dysentariae</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>K. pneumonia</i> e <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	(DINH <i>et al.</i> , 2015) (STONE <i>et al.</i> , 2018)
D-enântiomeros e PAMs RI	D-LAK120, D-LAK120-H, D-LAK120-A, D-LAK120-P13, D-LAK120-HP13,	resistente à colistina <i>A. baumannii</i> <i>M. smegmatis</i> e <i>M. marinum</i> (isolados clínicos)	(MOURTADA <i>et al.</i> , 2019) (LAN <i>et al.</i> , 2014)

	LAK120-AP13		
	DJK-5	<i>P. aeruginosa</i>	(KŁODZIŃSKA <i>et al.</i> , 2019)
	DJK-5, DJK-6	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>S. enterica</i>	(DE LA FUENTE-NÚÑEZ <i>et al.</i> , 2015)
Dendrímeros	(RW)4D	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	(LIU <i>et al.</i> , 2007)
	G3KL	<i>A. baumannii</i> e <i>P. aeruginosa</i>	(PIRES <i>et al.</i> , 2015)

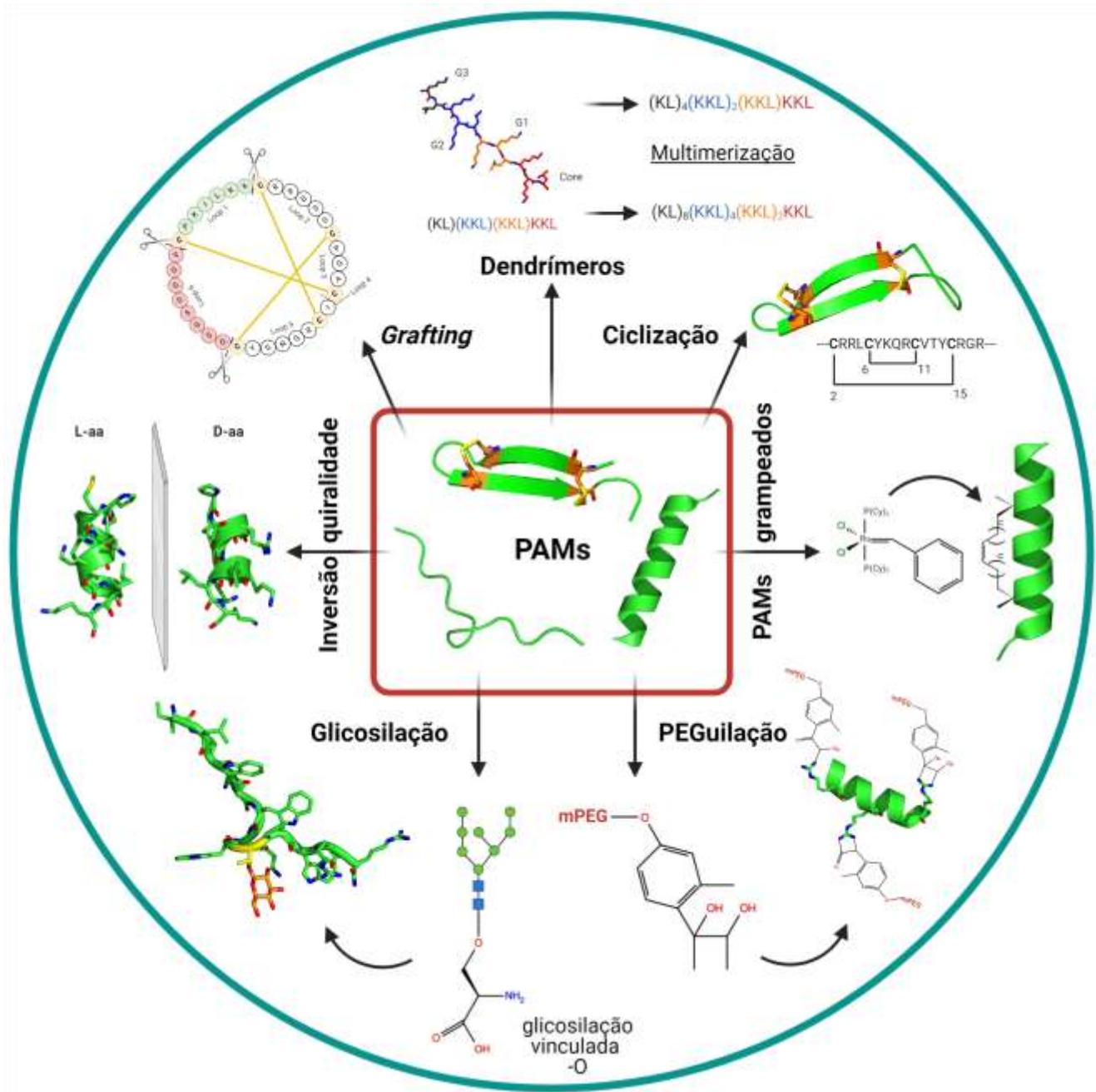


Figura 3. Estratégias peptidomiméticas utilizadas atualmente no desenvolvimento de PAMs candidatos a fármacos. Representação esquemática da otimização dos PAMs através das estratégias peptidomiméticas. Dentre elas podemos citar a inversão de quiralidade (inserção de D-aminoácidos em sequências L-aminoácidos); a glicosilação de PAMs (inserção de açúcares nas sequências de PAMs), podendo ser ligação aos átomos de oxigênio (tipo-O), nitrogênio (tipo-N), carbono (tipo-C) ou

enxofre (tipo-S); a PEGuilação (adição de cadeias de polietilenoglicol (PEG) às cadeias laterais de PAMs); PAMs grampeados (inserção de um grampo composto por hidrocarbonetos, o qual estabiliza uma determinada estrutura bioativa); a ciclização, onde as extremidades (NH_2) e (COOH) se encontram conectadas formando uma estrutura circular, podendo também ocorrer entre as cadeias laterais de PAMs; a formação de dendrímeros (agregados de polímero radialmente ramificados a partir de um núcleo central, onde há a multimerização do PAMs alvo); e, por fim, as estratégias de *grafting*, onde epítópos (por exemplo, PAMs) com uma determinada atividade biológica podem ser inseridos dentro de um arcabouço estável (por exemplo, estruturas estabilizadas por cisteínas) visando uma maior biodisponibilidade no hospedeiro infectado. Figura do autor.

1.4. PAMs contendo D-AAs

Do ponto de vista funcional, modificações pós-traducionais e modificações químicas em peptídeos/proteínas contendo D-aminoácidos confere a essas moléculas uma estereoquímica pouco usual, muitas vezes relacionada a maior resistência a processos catalíticos realizados por enzimas (proteases), sendo essa resistência uma propriedade desejada em termos de investimento na indústria farmacológica (CARDOSO; CÂNDIDO; *et al.*, 2018). Em relação a estrutura, as propriedades físico-químicas são conservadas entre L- e D-enantiômeros, uma vez que cada configuração pode girar a luz polarizada em um plano oposto (CHEN *et al.*, 2006). Sendo assim, podem ser observadas modificações na orientação espacial e topologia das cadeias laterais entre esses tipos de aminoácidos dentro de uma cadeia peptídica (LIU *et al.*, 2016).

A substituição de L-aminoácidos por variações estereoquímicas tem sido usada há muito tempo como uma alternativa promissora para prevenir a degradação proteolítica (GRIECO *et al.*, 2013). Análises estruturais experimentais mostraram que resíduos de D-aminoácido podem atuar como quebradores de α -hélice e folha- β em peptídeos, contribuindo para uma orientação espacial oposta quando comparados aos seus L-peptídeos, favorecendo assim a estabilidade proteolítica e, consequentemente, biodisponibilidade *in vivo* (DE LA FUENTE-NÚÑEZ *et al.*, 2015; GRIECO *et al.*, 2013). Por outro lado, tais mudanças espaciais podem comprometer as atividades dos PAMs. Dessa forma, Goodman e Chorev (1979) propuseram a síntese de peptídeos

retro-inverso (RI), também conhecidos como peptídeos totalmente D-retro ou peptídeos retro-enantiômeros, por serem compostos de D-aminoácidos em uma ordem reversa a sequências em L-aminoácidos (GOODMAN; CHOREV, 1979).

Outra limitação dos PAMs constituídos totalmente por D-aminoácidos inclui o custo elevado de produção, o que pode desencorajar a sua aplicação em ensaios clínicos que necessitam de maiores quantidade de peptídeo (CARDOSO; CÂNDIDO; *et al.*, 2018). Nesse sentido, PAMs parcialmente constituídos por D-aminoácidos são denominados diastereoisômeros, e já foram relatados como ocorrendo naturalmente (CARDOSO; CÂNDIDO; *et al.*, 2018). Dessa forma, estas alterações e fusões podem garantir a estabilidade estrutural, orientação espacial, topologia da cadeia lateral e consequentemente, a bioatividade desses peptídeos (CARDOSO; CÂNDIDO; *et al.*, 2018).

Nesse contexto, além de utilizar a técnica de substituição de L- por D-aminoácido em sequências peptídicas, é necessário se obter a orientação do melhor local para efetuar a inserção, pois essas alterações podem influenciar na conformação estrutural e funcional dos peptídeos. Estratégias de modificações pontuais em PAMs diastereoisômeros têm mostrado resultados promissores, como é o caso da temporina L (GRIECO *et al.*, 2013) e gramacidina 14 (KONDEJEWSKI *et al.*, 1999), as quais demonstram a influência positiva da substituição de L- por D-aminoácidos para a obtenção de um melhor índice terapêutico. Essas modificações pontuais de resíduos de D-aminoácidos em PAMs diastereoisômeros podem, em alguns casos, não interferir drasticamente em seu arranjo estrutural comparado ao PAM parental (SCUDIERO *et al.*, 2013). Somado a isso, do ponto de vista industrial, os PAMs diastereoisômeros se mostram estratégias mais viáveis em termos de custo de produção, bem como o tempo aplicado neste processo, quando comparados a PAMs inteiramente constituídos de D-aminoácidos, seja em sua sequência original ou retro-inversa.

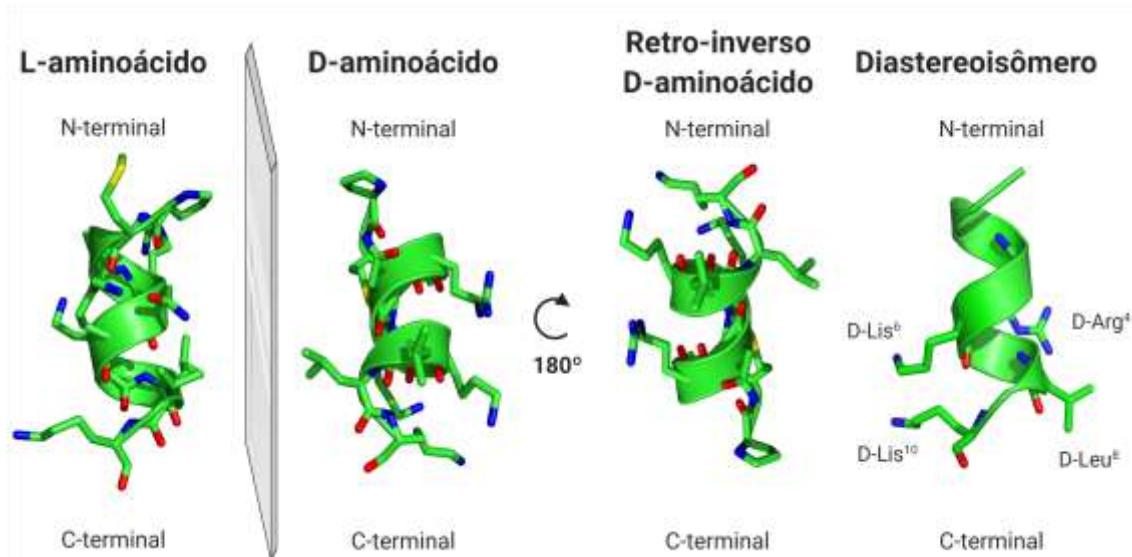


Figura 4. Inserção de D-aminoácidos em sequências L-aminoácidos. Representação das estratégias de inserção de D-aminoácidos em sequências de L-aminoácidos. Inicialmente, a partir de uma sequência composta inteiramente por L-aminoácido podemos gerar sua imagem espelhada composta inteiramente por D-aminoácidos. Ademais, a topologia e orientação espacial de peptídeos L-aminoácidos podem ser preservadas em peptídeo D-aminoácido a partir da síntese deste em sua ordem inversa, gerando peptídeos retro-inverso. Por fim, peptídeos diastereoisômeros são obtidos a partir de uma mistura de L- e D-aminoácidos em uma mesma sequência peptídica.

1.5. PAMS desenhados computacionalmente

Com o aumento das infecções provenientes por bactérias resistentes, as estratégias uma vez utilizadas para o desenvolvimento de fármacos têm se tornado obsoletas em curto espaço de tempo. Dessa forma, novas alternativas precisam ser propostas. Os PAMs naturais são, em muitos casos, longos e multifuncionais, dificultando sua aplicação como um antimicrobiano específico e, assim, destacando a necessidade de serem otimizados para aplicações clínicas (CIUMAC *et al.*, 2019). Nesse contexto, a produção de peptídeos sintéticos através de estratégias computacionais pode ser uma opção para o desenvolvimento de novos fármacos em larga escala. Em especial, considerando que essas estratégias podem ser alinhadas aos avanços proporcionados pelas estratégias peptidomiméticas para otimização de PAMs.

Neste contexto, estratégias avançadas de desenho racional alinhadas a metodologias computacionais têm sido usadas no desenvolvimento de PAMs mais

potentes a um custo menor (FJELL *et al.*, 2012). O desenho racional de novos fármacos tornou-se uma área promissora na medicina química, visando o desenvolvimento de produtos altamente especializados contra cepas e com o menor nível de efeito colateral (PORTO *et al.*, 2012). Ademais, várias ferramentas computacionais têm sido desenvolvidas buscando gerar novas variantes de PAMs (CARDOSO *et al.*, 2020). Dentre várias dessas ferramentas podemos mencionar métodos empíricos e aprendizado de máquina, juntamente com abordagens estocásticas, as quais buscam a otimização de peptídeos através de processos randômicos (PORTO *et al.*, 2012). Modelos de aprendizado de máquina podem automatizar processos de otimização de pequenas sequências de PAMs, podendo validar as mesmas experimentalmente. Dentre esses modelos, o modelo de relação quantitativa entre estrutura e atividade (QSAR) (MITCHELL, 2014) busca a utilização de propriedades físico-químicas para prever a atividade biológica de sequências peptídicas (HILPERT *et al.*, 2007). Podemos citar ainda os métodos evolutivos, os quais se destacam pela utilização de algoritmos genéticos para desenvolver gerações contendo sucessivas mutações e deleções em uma sequência alvo, afim de melhorar a identificação dos padrões de atividade antibacteriana (FJELL *et al.*, 2011).

Ademais, as metodologias *de novo* geram sequências de PAMs sem a utilização de um modelo, apenas utilizando as preferências de posição dos aminoácidos através dos cálculos estequiométricos, podendo assim garantir as características de carga e anfipaticidade da estrutura predita (PORTO *et al.*, 2012). Métodos como esse, permitiram a propagação de diversas sequências com variedade de aminoácidos, estruturas tridimensionais e mecanismos de ação (A HISS *et al.*, 2010). Nesse contexto, modelos linguísticos propostos por Loose *et.al* (2006), se baseiam não apenas nas propriedades físico-químicas de PAMs, mas também buscam otimizar a disposição dos aminoácidos dentro de uma sequência primária (LOOSE *et al.*, 2006). Neste modelo é proposto que cada aminoácido represente uma “palavra” que compõe uma “frase” (sequência) e para que a mesma faça sentido a palavra deve ser colocada na posição correta.

Estudos apontam que a funcionalidade de peptídeos/proteínas está associada com a disposição particular dos resíduos de aminoácidos ao longo da sequência (CHEN; BAHAR, 2004). Em vista disso, quando uma estrutura ou padrão funcional é identificado a partir de uma sequência modelo, esse padrão pode ser utilizado inserindo-

o em uma sequência alvo com o objetivo de gerar novas funções (CARDOSO *et al.*, 2020). Nesse contexto, Porto *et al* (2018) desenvolveu um algoritmo, denominado *Joker*, baseado no modelo linguístico, e que utiliza a inserção de padrões (PORTO; FENSTERSEIFER; *et al.*, 2018). O algoritmo *Joker* realiza modificações nas sequências dos peptídeos a partir da inserção de um padrão de interesse (por exemplo, padrão de α -hélice ou padrão antimicrobiano), utilizando um sistema de janela deslizante (PORTO; FENSTERSEIFER; *et al.*, 2018). Os passos seguidos pelos autores do algoritmo *Joker* incluíram, inicialmente, a busca por padrões de aminoácidos no *Antimicrobial Peptide Database* (APD) (WANG *et al.*, 2016). Foram obtidas 248 sequências de PAMs α -helicoidais, contendo 18 resíduos de aminoácidos (formação de um mínimo de três voltas de α -hélice), as quais foram utilizadas para a identificação de possíveis padrões de aminoácidos (PORTO; FENSTERSEIFER; *et al.*, 2018). Como resultado, o padrão de α -hélice (KK[ILV]x(3)[AILV]) foi identificado e, posteriormente, inserido em um conjunto de sequências “cegas” (*blind set*) não antimicrobianas e depositadas no banco de dados de proteínas não-redundantes do *National Center for Biotechnology Information* (NR-NCBI).

Dentre as sequências selecionadas no NR-NCBI, um fragmento de proteína ribossomal (L39e – MARNKPLGKKRLAAGAFK) proveniente da bactéria *Pyrobaculum aerophilum* foi selecionado e submetido a métodos de desenho automatizado de PAMs pelo algoritmo *Joker* (PORTO; FENSTERSEIFER; *et al.*, 2018). Como resultado, nove sequências análogas foram geradas (PaDBS1R1 – R9), sintetizadas e inicialmente avaliadas acerca de suas propriedades antimicrobianas e hemolíticas contra cepas bioluminescentes de *P. aeruginosa* e eritrócitos humanos, respectivamente (PORTO; FENSTERSEIFER; *et al.*, 2018).

Dessa forma, com base nos resultados preliminares (Tabela 2), os peptídeos PaDBS1R2, R6 e R7 se mostraram os análogos mais promissores. Dentre os peptídeos apresentados, PaDBS1R6 foi extensivamente estudado por Fensterseifer *et al.* (2019), onde foi demonstrado em modelos animais de infecção cutânea e sistêmica uma atividade tempo-dependente para este peptídeo, possivelmente dada a sua degradação nesses modelos (FENSTERSEIFER *et al.*, 2019). Dados similares foram também observados para os outros dois melhores peptídeos candidatos, PaDBS1R2 e R7, quando avaliados em modelos animais (dados ainda não publicados).

Portanto, como alternativa para superar as desvantagens dos PAMs em relação a rápida degradação proteolítica, alta citotoxicidade e aliado ao grande potencial dessas moléculas frente as cepas multirresistentes, estudos mais aprofundados a respeito da influência de D-aminoácidos em sequências diastereoisômeras são propostos afim de estender e melhorar sua eficácia, visando sua aplicação em nível clínico.

Tabela 2. Dados preliminares em relação as atividades antibacteriana e hemolítica do peptídeo parental PaDBS1 e seus análogos gerados através do algoritmo *Joker*. Propriedades físico-químicas como carga, hidrofobicidade e momento hidrofóbico foram calculadas através do servidor *HeliQuest* (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>).

Peptídeos	Sequências	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) *	Ensaio hemolítico			Propriedades físico-químicas		
			(KK[ILV]x(3)[AILV])			Carga	Hidrofobicidade	Momento Hidrofóbico (%)
PaDBS1	-MARNKPLGKKLRLAAAFK				+6	19,4		0,135
PaDBS1R1	<u>PKI</u> LNK <u>I</u> L <u>GK</u> I <u>L</u> RLAAFK	6,25	50	+4	61,4		0,631	
PaDBS1R2	<u>PM</u> K <u>LL</u> K <u>R</u> L <u>G</u> K <u>K</u> I <u>R</u> LAAFK	3	>200	+6	<u>40,5</u>		<u>0,446</u>	
PaDBS1R3	PMA <u>K</u> <u>LL</u> P <u>R</u> I <u>KK</u> K <u>I</u> LAAFK	12,5	>200	+5	52,4		0,356	
PaDBS1R4	PMAR <u>K</u> <u>LL</u> R <u>I</u> K <u>L</u> K <u>I</u> AAFK	50	100	+5	58,3		0,234	
PaDBS1R5	PMARN <u>K</u> <u>IL</u> G <u>K</u> I <u>LR</u> K <u>I</u> AAFK	6,25	>200	+5	43,8		0,431	
PaDBS1R6	PMARN <u>KK</u> <u>LL</u> <u>KK</u> <u>LR</u> K <u>I</u> AFK	1,5	>200	+7	<u>29,9</u>		<u>0,260</u>	
PaDBS1R7	PMARNKP <u>K</u> <u>IL</u> K <u>R</u> I <u>L</u> A <u>K</u> I <u>F</u> K	6,25	>200	+6	<u>40,6</u>		<u>0,464</u>	
PaDBS1R8	PMARNKPL <u>K</u> <u>IL</u> R <u>L</u> A <u>A</u> K <u>I</u> K	12,5	>200	+5	46,7		0,360	
PaDBS1R9	PMARNKPLG <u>K</u> <u>IL</u> R <u>R</u> I <u>A</u> K <u>I</u> K	12,5	>200	+6	22,2		0,389	

CIM* - Concentração inibitória mínima contra cepas bioluminescentes de *P. aeruginosa*. Ensaio preliminar para a busca por atividades antimicrobianas de acordo com o *SPOT-array* (FRANK, 2002).

Dessa forma, afim de aprimorar essas sequências, foi proposto neste trabalho a realização da inversão da quiralidade dos resíduos de arginina e lisina para D-Arginina e D-Lisina em todas essas sequências afim de otimizar e aprimorar esses PAMs, estendendo sua eficácia nos contextos *in vitro* e *in vivo*.

Para isso, todas as argininas e lisinas dessas sequências tiveram sua quiralidade invertida, uma vez que são os principais sítios ativos de degradação por serino proteases. Este estudo englobou análises de estabilidade em soro proveniente de plasma humano, bem como ensaios antimicrobianos de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), juntamente com testes de atividade hemolítica e citotóxica. Ademais, análises estruturais foram realizadas através de experimentos de dicroísmo circular (DC) e ressonância magnética nuclear (RMN), afim de entender a influência dos resíduos de arginina e lisina em conformação D-aminoácidos, bem como as interações e comportamento apresentado pelos peptídeos diastereoisômeros em comparação com suas sequências parentais em conformação L-aminoácido.

2. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de novos antibióticos como alternativa para combate as cepas resistentes tem se tornado mais intenso nas últimas décadas, como resposta aos relatos cada vez mais frequentes de patógenos multirresistentes. Somado a isso, os efeitos colaterais causados por alguns antibióticos que se encontram disponíveis atualmente no mercado também representam um obstáculo a ser ultrapassado. Dessa forma, há a necessidade de investimento em estudos mais elaborados acerca das propriedades físico-químicas de tais medicamentos, bem como seus patógenos alvo e também sobre o comportamento destes no corpo humano. Neste contexto, os PAMs configuram moléculas presentes em todos os seres vivos e desempenham um papel crucial na proteção contra microrganismos, sendo reconhecidos como a primeira linha de defesa contra patógenos. Uma das estratégias de otimização dos PAMs é o uso de D-aminoácidos, visando o aumento de sua estabilidade e biodisponibilidade tanto em ambiente *in vitro* quanto *in vivo*. Sendo assim, é possível utilizar D-aminoácidos ao longo de toda a cadeia de um PAM, seja em sua forma original ou retro-inversa, bem como o uso de D-aminoácidos juntamente com L-aminoácidos caracterizando, assim, os peptídeos diastereoisômeros. Nesse contexto, a última opção se destaca pelo seu menor custo e tempo de produção, aliado a resistência à proteólise, redução da toxicidade perante células de mamíferos e, na maior parte dos casos, a preservação do potencial antimicrobiano dos peptídeos modificados. Portanto, neste estudo, foi realizada a síntese química dos peptídeos PaDBS1R2, R6 e R7 como diastereoisômeros, onde todos os resíduos positivamente carregados de arginina e lisina em conformação L-aminoácidos foram substituídos por D-aminoácidos. Os peptídeos parentais L-aminoácidos foram utilizados como controle em todos os ensaios propostos. Dessa forma, todos os peptídeos foram submetidos a avaliações de estabilidade em soro proveniente de plasma humano, atividades antibacterianas, hemolítica e citotóxica. Em paralelo, as análises estruturais de DC e RMN foram realizadas afim de compreender a influência da D-Arg e D-Lis no arranjo estrutural e, consequentemente, na atividade biológica dos peptídeos testados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a influência de D-Arg e D-Lis nas atividades biológicas e estrutura de três PAMs desenhados computacionalmente.

3.2. Objetivos específicos

- i. Sintetizar os peptídeos PaDBS1R2, R6 e R7 em sua forma L-aminoácido e diastereoisômeros (D-Arg e D-Lis);
- ii. Testar a estabilidade dos peptídeos parentais e diastereoisômeros em soro proveniente de plasma humano;
- iii. Realizar ensaios antimicrobianos, hemolítico e citotóxico;
- iv. Caracterizar a estrutura secundária dos peptídeos por DC;
- v. Avaliar os deslocamentos químicos secundários ($H\alpha$) e coeficiente de temperaturas (NH) dos peptídeos por RMN.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Síntese química dos peptídeos derivados *P. aerophilum*

Os peptídeos PaDBS1R2, R6 e R7 em conformação L-aminoácidos e diastereoisômeros (D-Arg e D-Lis) foram adquiridos da empresa *Peptide 2.0 Incorporated* (USA), a qual realizou a síntese através da metodologia de fase sólida *F-moc* (9-fluorenilmetiloxicarbonilo) com >95% de pureza. A massa dos peptídeos foi determinada através de espectrômetro de massa MALDIToF/ToF UltraFlex III (Bruker Daltonics), inicialmente os peptídeos liofilizados foram submetidos a solubilização em água ultrapura e misturados em solução saturada de matriz constituída por ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (1:3), em seguida foram depositados em uma placa do tipo MTP 384 *massive* para peptídeos sintéticos, deixados para cristalizar à temperatura ambiente. A calibração foi realizada utilizando *Peptide calibration standard II* (Bruker Daltonics) como padrões de massa molecular.

4.2. Teste de estabilidade em soro proveniente de plasma humano

Os peptídeos foram avaliados quanto a sua estabilidade em soro proveniente de plasma humano de acordo com o protocolo descrito por Chan e colaboradores (2013). Cada peptídeo foi diluído em 1:10 com 50% de soro em tampão fosfato-salino (PBS). Os pontos de incubação foram de 0, 30 e 60 min a 37 °C. As proteínas do soro foram precipitadas com a adição de TFA (4 µL; 10 min, 4 °C) para cada tubo. A estabilidade de cada ponto de tempo analisada foi calculada como a área da fração do peptídeo em soro (tratamento com peptídeos) em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE; do inglês: *High performance liquid chromatography* HPLC) a 215 nm comparada a porcentagem de área do tempo zero coletado.

4.3. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A CIM foi determinada frente a cepas bacterianas susceptíveis e resistentes, incluindo isolados clínicos disponíveis no laboratório de Microbiologia do S-Inova Biotech da Universidade Católica Dom Bosco (UCBD). Os ensaios foram realizados utilizando as cepas de *E. coli* (ATCC 25922 e *K. pneumoniae* carbapenemase positiva (KpC+) 001812446), *K. pneumoniae* (KpC+ 001825971) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853), assim como o isolado clínico *A. baumannii* (HRAN 003321216). O método

utilizado foi o de microdiluição em caldo de acordo M7-A6 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (WAYNE, 2011) em microplaca de 96 poços. A suspensão bacteriana ajustada (5×10^5 unidades formadoras de colônias (UFC) mL $^{-1}$) foram aplicadas em cada poço da microplaca contendo os peptídeos (concentração final de 32 a 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por poço). As microplacas foram incubadas a 37 °C e a leitura da densidade óptica (D.O. 600 nm) foi realizada após 24 h. Uma alíquota de 10 μL de células bacterianas provenientes dos poços do ensaio para determinação da CIM foi diluída (1:10, v/v), plaqueada em meio Mueller-Hinton ágar (MHA) e incubadas a 37 °C por 24 h. Após este período, a CBM foi determinada como a concentração na qual não foi possível realizar a contagem de colônias bacterianas em MHA.

4.4. Avaliação da atividade hemolítica

Os ensaios hemolíticos foram realizados com eritrócitos de murinos saudáveis, como descrito anteriormente (CARDOSO; CÂNDIDO; *et al.*, 2018). O sangue venoso fresco dos murinos foi coletado e armazenado em tubos contendo solução salina (0,9% NaCl). O estoque de peptídeos foi preparado a partir de diluições seriadas, onde a concentração inicial utilizada foi de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A solução salina contendo eritrócitos foi utilizada como controle negativo, enquanto que 1% de Triton X-100 (100% de lise dos eritrócitos) foi utilizado como controle positivo. As taxas de hemólise foram aferidas a 415 nm, sendo calculadas de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ Hemólise} = (\text{amostra} - \text{salina}) / (\text{Triton } 1\% - \text{salina}) \times 100$$

4.5. Ensaio de viabilidade celular

O potencial citotóxico dos peptídeos de estudo foi avaliado frente a diferentes linhagens celulares, incluindo macrófagos de murino (RAW 264,7 e macrófagos recrutados de camundongos). Os ensaios de citotoxicidade celular foram realizados de acordo com Chan e colaboradores (2015). As células foram incubadas durante 24 h (aderência) e tratadas com meios frescos no dia seguinte, antes da adição de peptídeos (de 1,5 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). As células com peptídeos foram incubadas por 24 h. Após este período 3-(4,5-dimetiltiazolil-2) -2,5-difeniltetrazolio brometo (MTT) foi adicionado (10 μL ; 5 mg mL $^{-1}$ em PBS), e as células foram incubadas por mais 4 h. O sobrenadante foi removido e, em seguida, 100 μL de DMSO foram adicionados. A viabilidade celular foi aferida a 600 nm. Triton X-100 0,1% (v/v) foi utilizado como controle positivo.

4.6. Caracterização das estruturas secundárias por dicroísmo circular (DC)

A preferência conformacional para os peptídeos a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi investigada em diferentes ambientes, incluindo água ultrapura, solução tampão fosfato de potássio (10 mmol L^{-1}), 2,2,2 trifluoroetanol (TFE) 30% (v/v) em água e dodecil sulfato de sódio (SDS) 50 mmol L^{-1} . Os experimentos foram realizados em um spectropolarímetro JASCO (J-810) equipado com um controlador de temperatura do tipo *Peltier*. Os espectros foram obtidos em temperatura de 25 °C. As medidas foram realizadas de 185 a 260 nm a uma velocidade de varredura de 50 nm min^{-1} . A resolução foi de 0,1 nm com tempo de resposta de 1 s em cinco acumulações de varredura para cada amostra. Todos os espectros foram analisados usando o algoritmo *Fast Fourier de Jasco* e a linha de base corrigida.

4.7. Avaliação dos deslocamentos químicos secundários por ressonância magnética nuclear (RMN)

Espectros de RMN foram obtidos para todas as sequências utilizadas no presente trabalho. Cada peptídeo, individualmente, foi avaliado em 60% (v/v) H_2O , 30% (v/v) TFE- d_3 , e 10% (v/v) D_2O (Cambridge Laboratórios de isótopos) a uma concentração de 1 mmol L^{-1} (pH 4,3). 4,4- ácido dimetil-4-silapentano-1-sulfônico (DSS) foi usado como uma referência de deslocamento químico para calibração espectral. Espectros unidimensionais ^1H e bidimensionais, incluindo (Espectroscopia de Correlação Total) TOCSY, (Efeito Nuclear *Overhauser*) NOESY, foram adquiridos a 298 K em um espetrômetro *Bruker Avance* de 600 MHz. Os espectros foram processados usando o programa *TopSpin 2.1* (Bruker) e atribuídos com o software CCPNMR v.2.4. Os valores de deslocamento químico secundários para $\text{H}\alpha$ foram obtidos através da subtração dos valores mapeados dos espectros de RMN, com valores de ^1H descritos por (WISHART *et al.*, 1995). Dessa forma foram obtidos os resultados dos deslocamentos químicos para cada peptídeo testado. Experimentos de coeficiente de temperaturas foram realizados em 70% (v/v) D_2O e 30% (v/v) TFE- d_3 (pH 4,3). Os espectros foram registrados de 283 a 308 K, em intervalos de 5 K.

5. RESULTADOS

5.1. Grupos de estudo, propriedades físico-químicas e síntese

Com base nas sequências dos peptídeos PaDBS1R2, R6 e R7 em L-aminoácido (denominado de Grupo I), foram realizadas as inversões de quiralidade em todos os resíduos de arginina e lisina, os quais são carregados positivamente e, dessa forma, alvo de degradação por serino proteases (por exemplo, tripsina e quimotripsina). Sendo assim, foi gerado um novo grupo com três sequências de diastereoisômeros, denominado Grupo II (Tabela 3).

Tabela 3. Representação das sequências utilizadas, onde o Grupo I consiste de sequências em L-aminoácido, seguido do Grupo II com alterações em todos os resíduos de arginina e lisina para D-aminoácido.

Peptídeo	L- aa	D-Arg / D-Lis
	Grupo I	Grupo II
PaDBS1R2	PMKLLKRLGKKIRLAAFK	PM K LL K RL G KK I R L AAFK K
PaDBS1R6	PMARNKKLLKKLRLKIAFK	PM A R N K KK L K KLRL K IAFK K
PaDBS1R7	PMARNKP K ILKRILAKIFK	PM A R N K P K IL K RILAKIF K

Resíduos em negrito (Grupo II) representam D-aminoácidos.

As características físico-químicas de cada peptídeo como carga, hidrofobicidade e momento hidrofóbico foram calculadas pelo servidor *HelliQuest* (GAUTIER *et al.*, 2008), como apresentado anteriormente na Tabela 2. Como resultado, o valor de hidrofobicidade calculado para o peptídeo PaDBS1R6 foi menor em comparação com PaDBS1R2 e R7, assim como o valor do momento hidrofóbico. Essas características indicam que dentro de um diagrama α -helicoidal, o peptídeo PaDBS1R6 é o menos anfipático em comparação aos outros peptídeos de estudo (Figura 5). Por outro lado, PaDBS1R6 é o peptídeo mais catiônico, uma vez que sua carga é +7, sendo +6 para os outros dois peptídeos. Ademais, todos os peptídeos apresentaram um percentual de hidrofobicidade abaixo de 50%, o que é desejável para PAMs não tóxicos frente a células humanas saudáveis.

Todos os peptídeos foram sintetizados pela técnica de fase sólida (*Fmoc*), com massa molecular confirmada por espectrometria de massas (MALDI-ToF, providenciados pela empresa *Peptide 2.0*). Para os peptídeos do Grupo I, incluindo

PaDBS1R2, R6 e R7, foram observadas massas moleculares iguais a 2184,01 Da, 2298,27 Da e 2266,44 Da, respectivamente (Anexos 1 a 3). Para o Grupo II (diastereoisômeros contendo D-Arg/D-Lis), nessa mesma ordem, foram observadas massas moleculares iguais a 2183,27 Da, 2298,02 Da e 2266,99 Da (Anexos 4 a 6), sendo o grau de pureza para todas as análises acima de 95%.

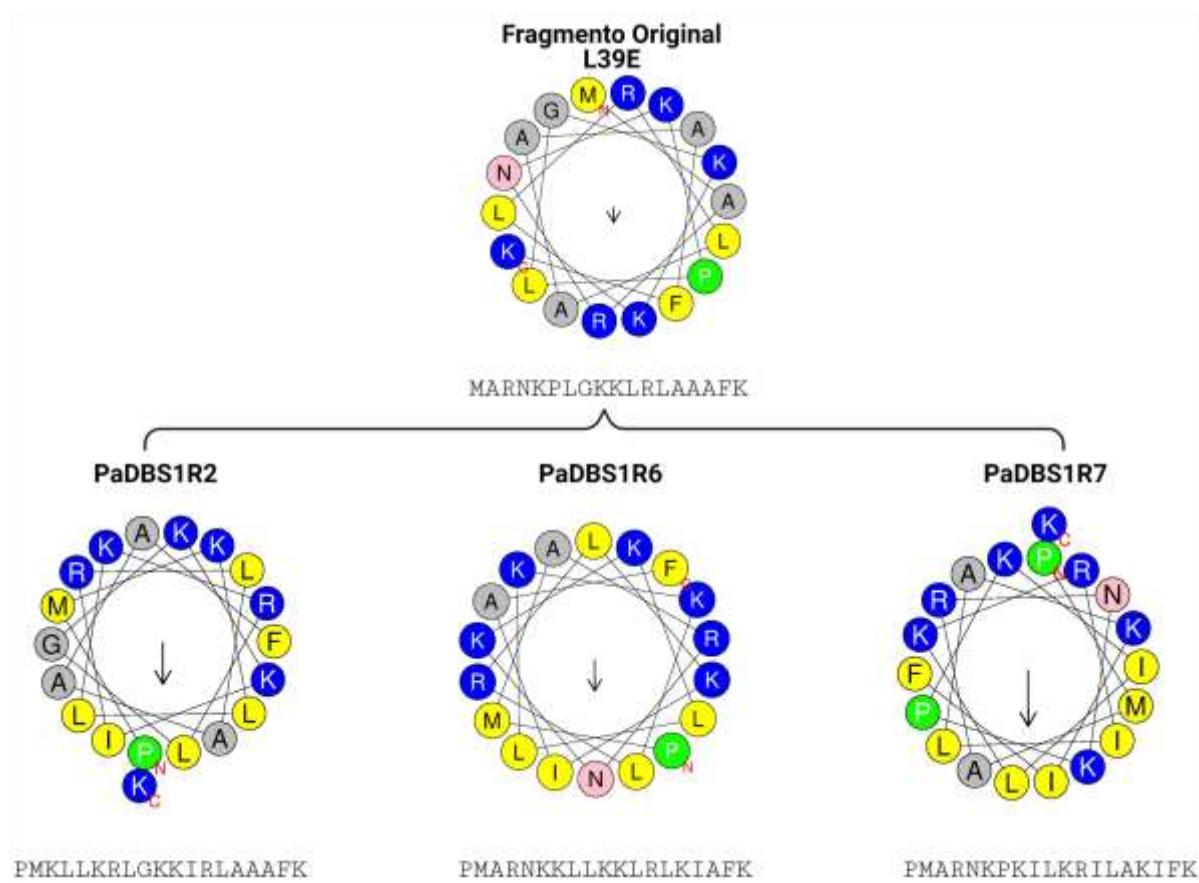


Figura 5. Diagramas de hélice para o peptídeo parental PaDBS1 e seus análogos PaDBS1R2, R6 e R7 gerados pelo algoritmo *Joker*. Os diagramas mostram a distribuição dos resíduos de aminoácidos ao longo de uma estrutura α -helicoidal para os peptídeos. Os resíduos carregados positivamente estão apresentados em cor azul, os não carregados em cinza e os resíduos não polares em amarelo. O vetor do momento hidrofóbico é representado por setas que partem do centro dos diagramas, uma vez que o valor estimado do momento hidrofóbico é proporcional ao tamanho das setas.

5.2. Estabilidade em soro proveniente de plasma humano

Inicialmente, os grupos de peptídeos foram avaliados quanto a sua estabilidade em soro proveniente de plasma humano. Como observado na (Tabela 4) os peptídeos L-aminoácido sofreram degradação acima de 70% já no tempo inicial, sendo totalmente degradados após 30 e 60 min de incubação. Já para os peptídeos diastereoisômeros pertencentes ao Grupo II (PaDBS1R2, R6 e R7) foi observada uma estabilidade média de 48%, 65% e 56%, respectivamente, nos tempos de incubação de 0 a 60 min. Dessa forma, podemos afirmar que, após a inserção dos resíduos de D-Arg e D-Lis, as sequências do Grupo II se tornaram mais resistentes ao ambiente proteolítico avaliado, demonstrando que nosso primeiro objetivo foi alcançado. Contudo, é válido destacar a necessidade de realizar este mesmo experimento em maiores tempos de incubação, afim de avaliar a linearidade e cinética dessa resistência a proteólise.

Tabela 4. Teste de estabilidade em soro proveniente de plasma humano para os peptídeos do Grupo I (L-aminoácido) e os peptídeos do Grupo II (diastereoisômeros). Resíduos em negrito (Grupo II) representam D-aminoácidos.

Peptídeo		Estabilidade no Plasma (%)		
Grupo I – L-aa		0 min	30 min	60 min
PaDBS1R2	PMKLLKRLGKKIRLAAFK	28,3	0	0
PaDBS1R6	PMARNKKLLKKLRLKIAFK	23,2	0	0
PaDBS1R7	PMARNKPKILKRILAKIFK	0	0	0
Grupo II – D-Arg/D-Lis				
PaDBS1R2	PM K LL K RLG K K I R L AAFK	46,7	43,6	53,7
PaDBS1R6	PM A RNK K LL K KL R L K IAFK	60,8	67,1	69,0
PaDBS1R7	PM A RNP K IL K RILAKIFK	62,4	46,3	56,6

5.3. Ensaios antibacterianos

Os ensaios de CIM foram realizados com os Grupo I e II (Tabela 5), frente a cepas bacterianas suspcetíveis e resistentes previamente descritas na metodologia. Os peptídeos PaDBS1R2, R6 e R7 do Grupo I foram capazes de inibir as cepas de *E. coli* (ATCC 25922) a 4, 8 e 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Quando esses mesmos peptídeos foram avaliados contra cepas de *E. coli* (KpC+ 001812446) foram observados CIMs de 2, 4 e 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Já contra as cepas de *A. baumannii* (isolado clínico 003321216), PaDBS1R2 e R6 inibiram o crescimento bacteriano a 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto o peptídeo PaDBS1R7 realizou essa mesma função a 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os maiores valores de CIM foram obtidos frente a *P. aeruginosa* (ATCC 27853), sendo eles 8, 16, 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para PaDBS1R2, R6 e R7, respectivamente. Por outro lado, não foram observadas atividades contra *K. pneumoniae* (KpC+ 001825971) na concentração mais alta testada (32 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os ensaios de CBM também realizados com o Grupo I mostraram que esses peptídeos não só inibem o crescimento, mas como também erradicam as cepas testadas de 4 a 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$, como observado na Tabela 4.

Nesse estudo, os peptídeos do Grupo II não apresentaram atividades bacteriostáticas na maior concentração de 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com exceção do peptídeo PaDBS1R2, o qual inibiu o crescimento de um isolado clínico de *A.baumannii* (HRAN 003321216) a 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Nos ensaios de CBM, no entanto, não foi observada atividade em concentrações até 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Dessa forma, observamos que apesar da maior estabilidade em soro, os peptídeos diastereoisômeros do Grupo II perderam as atividades contra cepas bacterianas Gram-negativas quando comparado aos seus PAMs parentais L-aminoácido.

Tabela 5. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para os peptídeos PaDBS1R2, PaDBS1R6, PaDBS1R7 e seus análogos diastereoisômeros.

	CIM (CBM) - $\mu\text{mol L}^{-1}$					
	Grupo I - L- aa			Grupo II - D-Arg/D-Lis		
	R2	R6	R7	R2_D	R6_D	R7_D
<i>E. coli</i> (KpC+ 001812446)	2 (4)	4 (8)	4 (8)	>32	>32	>32
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	4 (4)	8 (8)	16 (32)	>32	>32	>32
<i>A. baumannii</i> (isolado clínico)	8 (16)	8 (16)	4 (16)	32	>32	>32
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	8 (16)	16 (32)	32 (32)	>32	>32	>32
<i>K. pneumoniae</i> (KpC+ 001825971)	>32	>32	>32	>32	>32	>32

5.4. Ensaios hemolítico e citotóxico

As propriedades hemolíticas e citotóxicas dos PAMs geralmente representam um gargalo relevante no decorrer do tratamento de infecções bacterianas. Sendo assim, ensaios hemolíticos e citotóxicos (Tabela 6) foram realizados para o ambos os grupos com a utilização de eritrócitos e macrófagos (RAW 264,7 e macrófagos recrutados de camundongos) de murinos. Constatou-se que na maior concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ tanto os L-aminoácidos quanto os diastereoisômeros não foram hemolíticos. Ademais, não foi observado o comprometimento das linhagens celulares testadas sugerindo, assim, a seletividade para células bacterianas no caso dos peptídeo L-aminoácidos do Grupo I.

Tabela 6. Atividade hemolítica (%) e citotóxica (IC_{50}) dos peptídeos de estudo, frente a eritrócitos de camundongos, células RAW 267,4 e macrófagos recrutados de camundongos.

Peptídeos	Hemólise (%)					
	Grupo I - L- aa			Grupo II - D- aa		
Eritrócito de camundongo	R2	R6	R7	R2_D	R6_D	R7_D
RAW 267,4	13	12,6	12,3	11,4	11,8	14,7
Viabilidade celular (IC_{50} - $\mu\text{mol L}^{-1}$)						
Macrófagos recrutados	>100	>100	>100	>100	>100	>100

IC_{50} : Comprometimento da viabilidade celular em 50%.

5.5. Análises estruturais

Como parte deste projeto, a caracterização da estrutura secundária dos grupos de peptídeos foi realizada, inicialmente, através das análises de DC (Figura 6). Essas análises foram realizadas em diferentes ambientes, incluindo água ultrapura, solução tampão de fosfato de potássio 10 mmol L⁻¹ (pH 7,4), TFE 30% em água (v/v) e SDS 50 mmol L⁻¹ (micelas). Inicialmente, foi observado que os peptídeos L-aminoácido pertencentes ao Grupo I apresentaram maior propensão para formação de α -hélice nos ambientes TFE 30% e SDS, em comparação aos espectros obtidos em água e tampão. Os valores de absorção de banda ficaram entre 190 (nm) positivo e 208/222 (nm) negativos em TFE e SDS, característicos de formação de α -hélice. Quando avaliados em água e tampão, os valores ficaram entre 212 (nm) positivo e 195 (nm) negativo característicos de formação de *random coil*.

Por outro lado, foi observado que os peptídeos do Grupo II contendo D-Arg/D-Lis não formaram estrutura secundária em nenhum dos ambientes miméticos avaliados, uma vez que os valores de absorção de banda ficaram entre os valores de 212 (nm) positivo e 195 (nm) negativo. Dessa forma, concluímos que os peptídeos do Grupo II, quando comparados com seu grupo parental (Grupo I), apresentaram a perda de estrutura α -helicoidal nos ambientes testados. Essa característica pode estar intimamente relacionada com a perda de atividade antimicrobiana no Grupo II.

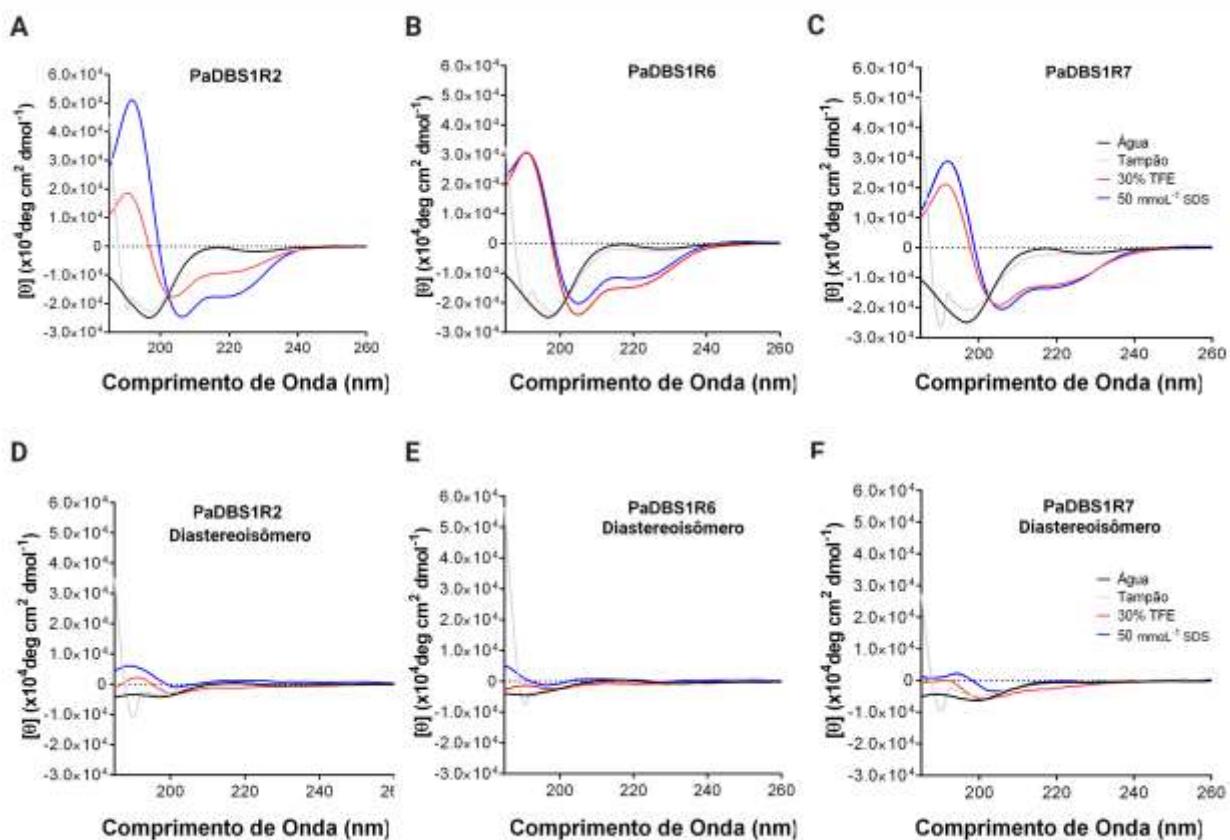


Figura 6. Espectros de DC para os peptídeos PaDBS1R2, R6 e R7 parentais (L-aminoácido – Grupo I) e diastereoisômeros (D-Arg/D-Lis – Grupo II). Os espectros de DC foram adquiridos em diferentes ambientes, incluindo água (preto), tampão (cinza), TFE 30% (v/v) (vermelho) e 50 mmol L⁻¹ SDS (azul). Os peptídeos L-aminoácido (Grupo I) estão representados de A-C, enquanto os análogos diastereoisômeros (Grupo II) estão representados de D-F.

Em associação as análises de DC, foram realizados experimentos de RMN para determinar os pontos de segmentos helicoidais e de *random coil* nas sequências estudadas. Os grupos também foram submetidos a análises em TFE 30% em água (v/v). Nesse contexto, o deslocamento químico secundário é mensurado de acordo com o resultado dos valores adquiridos através do assinalamento de H_α, os quais são subtraídos da tabela de padronização reportada por Wishart *et al.* (1995). Logo, esse resultado é baseado nos valores < -0,1 ou > 0,1 ppm, onde o resultado mais negativo que -0,1 ppm ocorrerá formação de α-hélice; enquanto valores mais positivos que 0,1 ppm indicam a formação de estrutura em folha-β. Foi observado que o Grupo I parental

demonstrou a formação de estrutura secundária em α -hélice. As regiões de segmento α -helicoidal podem ser observadas para PaDBS1R2 entre os resíduos Lis³ e Lis⁶ e, em uma segunda parte, entre os resíduos Lis¹⁰ e Arg¹³ (Figura 7A). Já o peptídeo PaDBS1R6 possui uma região α -helicoidal bem definida entre os resíduos Lis⁶ e Ile¹⁶ (Figura 6A). Por fim, o peptídeo PaDBS1R7 possui um segmento helicoidal que se estende da Lis⁸ a Ile¹⁷ (Figura 6A).

Em contrapartida, o Grupo II representado pelos peptídeos diastereoisômeros (Figura 7B) não apresentou formação de nenhuma estrutura secundária (valores entre 0,1 e -0,1 ppm), confirmando assim que esses peptídeos permaneceram em *random coil* no ambiente mimético testado.

Análises de coeficiente de temperatura também foram realizadas com o Grupo I, afim de investigar sua estrutura secundária em maiores detalhes. Essas análises foram realizadas para mensurar as ligações de hidrogênio estabelecidas pelos prótons amídicos (NH) de 283 a 308 K, com intervalos de 5K. Com base na literatura, os valores de coeficiente de temperaturas mais positivos que -4,6 ppb K⁻¹ são interpretados como uma maior proteção daquele dado próton amídico (NH) ao solvente favorecendo, assim, a formação de ligações de hidrogênio intrapeptídicas. Esses dados fornecem ainda informação acerca da diferença de flexibilidade entre as estruturas analisadas.

Dessa forma, observou-se (Figura 7C) com esses dados que os resíduos Leu⁴, Leu⁵, Lis⁶, Arg⁷, Lis¹¹, Arg¹³, Ala¹⁷, Phe¹⁸ e Lis¹⁹ do peptídeo PaDBS1R2 se mantiveram protegidos do solvente uma vez que o deslocamento de seus NH apresentou assim valores maiores que -4.6 ppb K⁻¹ (Figura 7C). Já para o peptídeo PaDBS1R7 os resíduos que ficaram protegidos foram Pro⁷, Lis⁸, Lis¹¹, Arg¹², Ala¹⁵, Lis¹⁶ e Lis¹⁹ (Figura 7C). Interessantemente, o peptídeo PaDBS1R6 (menos anfipático) não apresentou resíduos com gradiente mais positivos que -4.6 ppb K⁻¹. Considerando que quanto maior o número de resíduos protegidos do solvente maior o número de ligações de hidrogênio intrapeptídicas, podemos inferir que o peptídeo PaDBS1R6 sofreu os maiores deslocamentos de NH nas temperaturas avaliadas. Sendo assim, temos a seguinte ordem de estabilidade temperatura-dependente: PaDBS1R2 > R7 > R6.

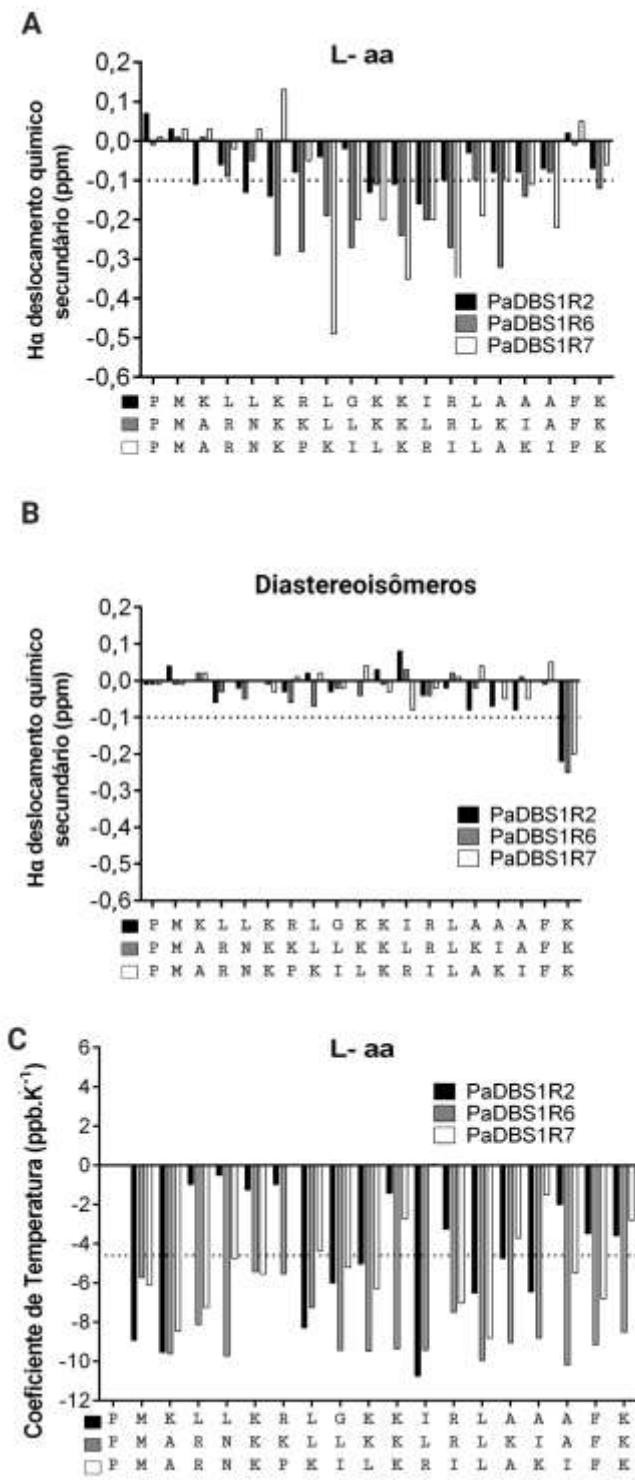


Figura 7. Deslocamentos químicos secundários para H_α a partir da subtração dos deslocamentos experimentais dos deslocamentos descritos na literatura para estruturas randômicas descritas por Wishart *et al.* (1995), bem como análises de coeficiente de temperatura em TFE 30% (v/v). Em (A) o segmento α -helicoidal para PaDBS1R2 foi calculado entre os resíduos Lis³ a Lis⁶ seguido da Lis¹⁰ a Arg¹³. Para o

peptídeo PaDBS1R6 o seguimento α -helicoidal foi observado entre a Lis⁶ e Ile¹⁶. Por fim, o peptídeo PaDBS1R7 apresentou um segmento α -helicoidal entre Lis⁸ e Ile¹⁷. (B) Para os peptídeos do Grupo II apenas três resíduos obtiveram valores maiores que -0,1 ppm e menores que 0,1 ppm caracterizando, assim, ausência de formação de estrutura secundária. (C) Coeficiente de temperatura calculado para o Grupo I, onde valores mais positivos que -4,6 ppb K⁻¹ caracterizam resíduos mais protegidos ao solvente e, consequentemente, envolvidos em ligações de hidrogênio intrapeptídicas (CIERPICKI; OTLEWSKI, 2001).

Em adição aos dados de deslocamento químico para NH mais comumente avaliados em experimentos de coeficiente de temperaturas, neste trabalho também buscamos determinar os deslocamentos químicos para H α em todas as temperaturas testadas. Como resultado, observamos que mesmo variando a temperatura os peptídeos parentais L-aminoácidos PaDBS1R2 e R7, apresentaram deslocamento para H α estáveis ao longo das variações de temperatura (Figura 8A e C), corroborando com o fato desses peptídeos terem apresentado um maior número de ligação intrapeptídicas como mostrado acima (Figura 7C). Em contrapartida, o peptídeo PaDBS1R6 mostrou que variações de temperatura para mais ou menos (a partir de 298K) resultaram em valores de deslocamento de H α mais positivos (Figura 8B), caracterizando assim uma diminuição no perfil de α -hélice do peptídeo. Nesse sentido, podemos afirmar que o perfil de α -hélice do PaDBS1R6 está intimamente relacionado com os coeficientes de temperatura.

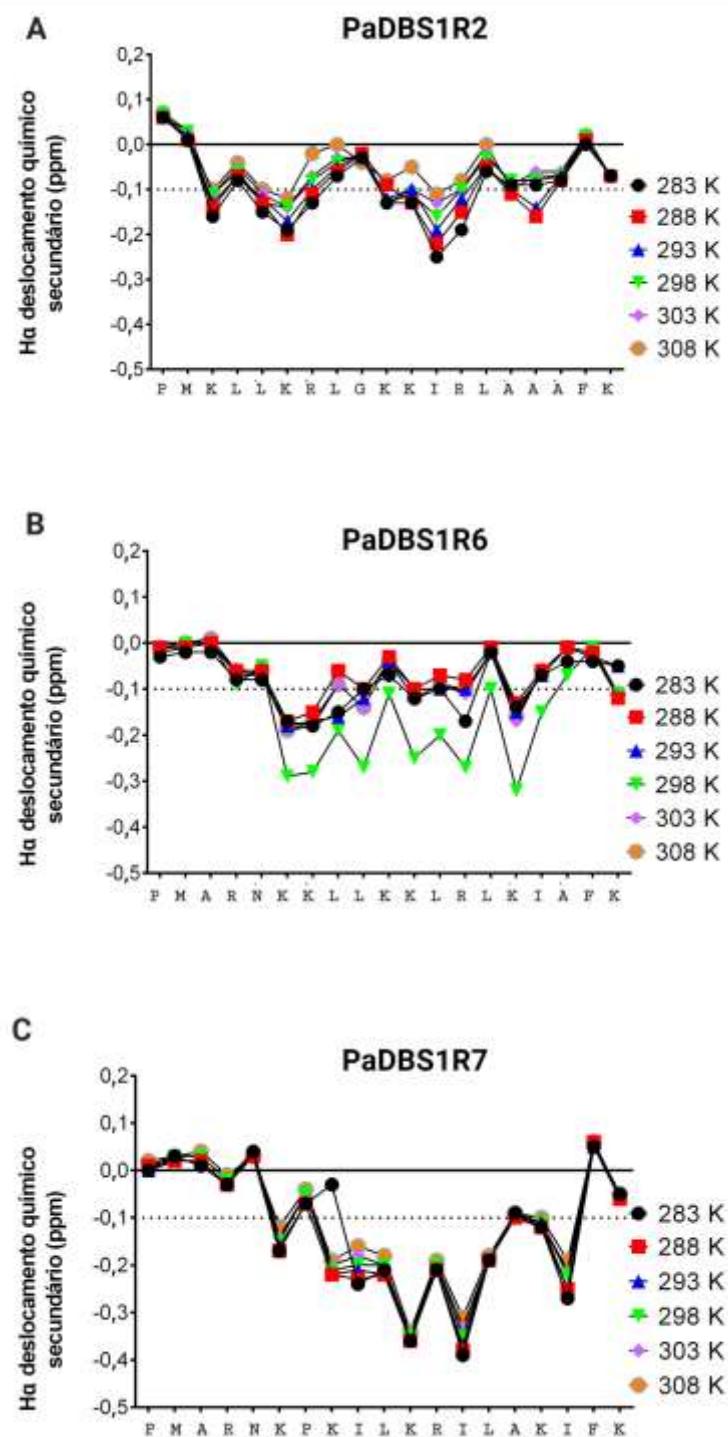


Figura 8. Deslocamentos químicos secundários para $\text{H}\alpha$ a partir da subtração dos deslocamentos experimentais dos deslocamentos descritos na literatura para estruturas randômicas descritas por Wishart *et al* (1995), e mapeados em todas as variações de temperatura, para todas as sequências de PAMs L-aminoácidos. Em (A) os valores para o deslocamento em média se mantiveram em região com valor mais negativo que -0,1 ppm, indicando formação de estrutura secundária. (B) o PaDBS1R6

mostrou tendência para formação de estrutura secundária apenas em temperatura ambiente (298 K), em média sua estrutura se manteve em *random coil* uma vez que as temperaturas variaram para mais ou para menos. (C) O mesmo comportamento observado para PaDBS1R2 foi também observado para PaDBS1R7 mantendo, assim, uma maior estabilidade de estrutura secundária, ainda que ocorra variação na temperatura.

6. DISCUSSÃO

Infecções nosocomiais causadas por cepas bacterianas resistentes a antibióticos representam uma grave ameaça à humanidade (HAY *et al.*, 2018). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) destacam que a resistência antimicrobiana está entre uma das três principais ameaças a saúde humana (SHRIVASTAVA *et al.*, 2018). Cepas bacterianas são eficientes na síntese e compartilhamento de genes envolvidos na resistência aos antibióticos (EL-HALFWY; VALVANO, 2015). Nesse contexto, essas cepas podem causar, além dos efeitos negativos na saúde pública, graves problemas no âmbito social e também na economia mundial (CORNEJO *et al.*, 2017).

Dessa forma, a busca por novas alternativas pela comunidade científica tem sido cada vez mais incentivada. Os PAMs representam uma das alternativas à antibioticoterapia convencional, uma vez que possuem múltiplas atividades biológicas no contexto da resistência bacteriana. Apesar das vantagens apresentadas pelos PAMs como fortes candidatos no desenvolvimento de novos fármacos contra as cepas resistentes, estes podem apresentar algumas desvantagens quando avaliados em contexto clínico. Dentre eles podemos citar sua instabilidade (ZHAO *et al.*, 2016), degradação proteolítica (PACHÓN-IBÁÑEZ *et al.*, 2017), curto tempo de meia-vida devido a rápida eliminação (LOMBARDI *et al.*, 2015), bem como baixa seletividade celular em alguns casos, levando a toxicidade frente a células saudáveis do hospedeiro (OSHIRO *et al.*, 2019). Esses fatores podem comprometer a biodisponibilidade dos PAMs resultando, assim, em limitações nos tratamentos antibacterianos.

Na tentativa de superar essas limitações, estratégias de peptidomiméticos, incluindo a glicosilação, PEGuilação, ciclização, *grafting*, multimerização (dendrímeros), grampeamento, bem como a inserção de D-aminoácidos em sequências peptídicas representam alternativas promissoras para a otimização desses PAMs. Dentre estas opções, a última alternativa visa o aumento da estabilidade e biodisponibilidade

dos PAMs, tanto em ambiente *in vitro* quanto *in vivo*. Sendo assim, é possível utilizar D-aminoácidos ao longo de toda a cadeia de um PAM, seja em sua forma original ou retro-inversa, bem como o uso de D-aminoácidos juntamente com L-aminoácidos caracterizando, assim, os peptídeos diastereoisômeros.

Nesse contexto, os diastereoisômeros se destacam pelo seu menor custo e tempo de produção, aliado a resistência à proteólise, redução da toxicidade perante células de mamíferos e, na maior parte dos casos, a preservação do potencial antimicrobiano dos peptídeos modificados. Estudos demonstram que aminoácidos catiônicos são de grande importância para a atividade antimicrobiana, característica da maioria dos PAMs anfipáticos, uma vez que eles são os responsáveis por interações eletrostáticas iniciais com membranas bacterianas (LOHNER *et al.*, 2008; LUONG *et al.*, 2018). Sendo assim, arginina e lisina são os resíduos catiônicos mais comumente encontrados nos PAMs, e responsáveis por estabilizar o primeiro contato peptídeo/membranas aniônicas (TRAVKOVA *et al.*, 2017). No entanto, as argininas e lisinas também são conhecidas por serem alvos de serino proteases (como a tripsina), sendo clivadas na região C-terminal (BÖTTGER *et al.*, 2017). Dessa forma, os PAMs catiônicos se tornam altamente susceptíveis a degradação proteolítica.

Diante das características citadas acima, neste trabalho foi realizada a síntese de dois grupos de peptídeos, incluindo sequências L-aminoácidos (parental) e sequências diastereoisômeras, onde todas as argininas e lisinas foram inseridas em sua configuração D-aminoácido. Para isso, foram utilizados como sequências alvo os peptídeos PaDBS1R2, R6 e R7, os quais foram desenhados a partir de uma estratégia computacional automatizada, denominada algoritmo *Joker* (PORTO; FENSTERSEIFER; *et al.*, 2018). Dessa forma, utilizamos o Grupo I como nosso controle, uma vez que todas as sequências estavam em conformação L-aminoácido, juntamente com o Grupo II, constituído dos diastereoisômeros.

No presente estudo, observamos que nos ensaios em soro proveniente de plasma humano o Grupo II constituído de peptídeos diastereoisômeros manteve sua estabilidade em ambiente proteolítico em mais de 50% comparado com o Grupo I, o qual foi rapidamente degradado. Estudos conduzidos por, Hong *et al* (1999) investigaram o PAM (KLSK) seu D-enantiômero, bem como seis diastereoisômeros análogos. Os autores constataram que, apesar de todos os peptídeos terem aumentado sua estabilidade, os diastereoisômeros apresentaram perda de estrutura em α -hélice em comparação com

os D-enantiômeros, os quais apresentaram propriedades antimicrobianas conservadas uma vez que mantiveram sua estrutura secundária em α -hélice conservada, mesmo que esta apresentasse uma topologia e orientação espacial oposta ao dos parentais L-aminoácidos (HONG *et al.*, 1999). Lu *et al.* (2020) realizou a substituição de resíduos L-aminoácido por D-aminoácidos e aminoácidos não naturais na tentativa de avaliar a estabilidade das sequências alteradas frente a serino proteases (por exemplo, tripsina), proteases do plasma e enzimas secretadas por bactérias. Os autores demonstraram que os peptídeos testados obtiveram um aumento na resistência a proteólise, no entanto essa modificação pode estar associada também a potencial risco de perda de atividade, bem como aumento na citotoxicidade da molécula (LU *et al.*, 2020).

Em nossos ensaios biológicos de CIM e CBM, observamos que os peptídeos do Grupo I inibiram e erradicaram todas as cepas testadas, com exceção de uma cepa de *K. pneumoniae* KpC+, de 2 a 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Mais especificamente, os dados obtidos para o peptídeo L-aminoácido PaDBS1R6 corroboram os dados apresentados por Fensterseifer *et al.* (2019), onde os autores reportaram a seletividade deste peptídeo por membranas características de bactérias Gram-negativas (FENSTERSEIFER *et al.*, 2019).

Por outro lado, o Grupo II constituído pelos análogos diastereoisômeros não apresentou atividade de CIM na maior concentração de 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ frente as cepas testadas, com exceção da cepa de isolado clínico *A. baumannii* (HRAN 003321216) no qual o valor de CIM foi de 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Nos ensaios de CBM, no entanto, não foi observada atividade em concentrações até 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Achados similares foram reportados por Grieco *et al* (2013) ao substituir L-aminoácidos do PAM temporina L por D-aminoácidos. Naquele trabalho, os autores observaram uma diminuição de mais de 75% nas taxas de hemólise nos peptídeos diastereoisômeros. No entanto, estes mesmos peptídeos tiveram sua atividade antimicrobiana reduzida em até quatro vezes comparado ao parental temporina L (GRIECO *et al.*, 2013). Ademais, os autores fizeram uso de análises estruturais, constatando que os D-aminoácidos inseridos ao longo da cadeia da temporina L atuaram como disjuntores de estrutura em α -hélice, interferindo assim nas respostas dos PAMs frente a cepas bacterianas.

Afim de estudar essas variações estruturais após alterações físico-químicas em peptídeo L-parentais, Kondejewski e colaboradores geraram 14 análogos D-aminoácidos altamente anfipáticos a partir do PAM cíclico sintético gramicidina 14 (KONDEJEWSKI *et al.*, 1999). Ao investigarem a estrutura através de análises de DC e

RMN em ambientes hidrofílicos foi relatada uma alta desordem estrutural dos análogos indicando, assim, uma ruptura da estrutura de folha β característica do PAM L-parental (KONDEJEWSKI *et al.*, 1999). Esses dados reforçam a importância do local onde será realizada a alteração de quiralidade, uma vez que a influência de D-aminoácidos em posições não estratégicas pode comprometer a atividade do PAM alvo.

No presente estudo, análises estruturais também foram realizadas uma vez que o entendimento da estrutura dos PAMs é de grande importância para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação da classe de peptídeos (relação estrutura-função), auxiliando em estratégias de melhoramento dessas moléculas (CARDOSO; CÂNDIDO; *et al.*, 2018). As metodologias mais utilizadas para realizar estudos estruturais experimentais a nível molecular em PAMs incluem as técnicas de DC e RMN. Ambas as técnicas possibilitam a utilização de diversos solventes e co-solventes, incluindo água, soluções tampão, misturas de água/TFE ou tampão/TFE, bem como em ambientes miméticos como micelas, vesícula e bicamadas lipídicas. Mais especificamente, o co-solvente TFE que é capaz de deslocar moléculas de água ao redor de peptídeos, favorecendo assim a formação de ligações de hidrogênio intrapeptídicas (FIORONI *et al.*, 2002) responsáveis por estabilizar estruturas em α -hélice, folhas- β e *hairpins*. Ademais, é o co-solvente orgânico mais comumente utilizado, uma vez que pode ser misturado com água em diferentes proporções (HANEY *et al.*, 2009). Por outro lado, estudos com objetivo de simular ambientes aniônicos comumente fazem uso de detergentes organizados em micelas, como é o caso do SDS.

Neste trabalho, as estruturas do Grupo I e II foram investigadas através dos experimentos de DC em água ultrapura, tampão, TFE 30% (v/v) e SDS. Ambos os grupos, quando avaliados em soluções em água e tampão, apresentaram o mesmo arranjo estrutural em *random coil*. Em contrapartida, quando avaliados em TFE e SDS os peptídeos parentais L-aminoácidos do Grupo I apresentaram estruturas α -helicoidais. Em contraste, os peptídeos diastereoisômeros do Grupo II não apresentaram nenhuma estrutura secundária definida. Assim, analisando esses dados juntamente aos resultados de CIM, pode-se inferir que o Grupo II apresentou perda de estrutura e, consequentemente, perda de atividade. Esses dados foram ainda corroborados pelos estudos de RMN em relação aos deslocamentos químicos de $H\alpha$, determinados para ambos os grupos de peptídeos em TFE 30% (v/v). As condições utilizadas nas análises estruturais possuem caráter altamente hidrofóbico e aniônico, ideais para mimetizar

membranas de bactérias Gram-negativas e mostrando, assim, que as promissoras atividades observadas para o Grupo I são α -hélice dependente. Interessantemente, contudo, essa perda estrutural até o momento não pareceu interferir na ausência de atividades hemolítica e citotóxica para os peptídeos testados, independente das modificações de quiralidade realizadas.

De fato, inúmeros trabalhos relatam que a transição de *random coil* para α -hélice são comumente associadas com a eficácia dos PAMs e, em alguns casos, até mesmo sinônimo de melhoria (HUANG *et al.*, 2014). Por exemplo, Porto *et al* (2018) apresentaram um PAM derivado de *Psidium guajava* (goiaba), o qual durante análises em condições de membrana adotou estrutura em α -hélice, estando isso altamente correlacionado a sua capacidade de causar ruptura em membranas bacterianas a partir de hiperpolarização (PORTO; IRAZAZABAL; *et al.*, 2018). Ademais, Cardoso *et al* (2016) projetaram o peptídeo Pa-MAP 1.9 realizando a distribuição das faces hidrofílicas e hidrofóbicas, visando garantir maior anfipaticidade no peptídeo (CARDOSO *et al.*, 2016). Ao distribuir resíduos de alanina de forma uniforme ao longo de toda sua sequência os autores alcançaram maiores níveis de segmentos α -helicoidal (CARDOSO *et al.*, 2016). Tal estrutura permitiu uma maior interação com bicamadas aniônicas, causando a perturbação de membranas características de bactérias Gram-negativas.

Dessa forma, mesmo com todas as limitações apontadas até aqui podemos destacar PAMs diastereoisômeros que apresentaram atividade antimicrobiana eficaz contra cepas bacterianas. Estudos realizados com peptídeos derivados da região C-terminal da β -defensina humana (BDH), nomeados de BDH-1 e BDH-3, também tem mostrado a influência de D-aminoácidos nesses peptídeos (OLLI *et al.*, 2013). Naquele trabalho, os peptídeos BDH-1 e BDH-3 tiveram a quiralidade de seus resíduos de lisina e isoleucina invertida (OLLI *et al.*, 2013). Tais alterações, geraram análogos diastereoisômeros, que desempenharam atividades até oito vezes mais efetivas contra as cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *Candida albicans* em comparação aos seus parentais em conformação L-aminoácido (OLLI *et al.*, 2013). Além disso, afim de melhorar o potencial terapêutico de um PAM derivado de pele de sapo (ascaphin-8), Conlon e colaboradores realizaram substituições dos resíduos de aminoácido Asp⁴, Gly⁸, Ala¹⁰ e Leu¹⁸ por resíduos de Lis em conformação D-aminoácido. Dessa forma, os autores realizaram ensaios de CIM contra cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, constatando

que as atividades foram mantidas após as alterações (MICHAEL CONLON *et al.*, 2008). Ademais, Hamamoto e pesquisadores realizaram diversas alterações de L-aminoácido para D-aminoácido em um peptídeo rico em arginina (granulisina) composto por 11 resíduos de aminoácidos. Dentre as sequências geradas, o análogo diastereoisômero contendo seis alterações de quiralidade ($R_D V_D C R_D T G_D R_D S R_D W R$) se mostrou efetivo nos ensaios contra as bactérias *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, e *Enterococcus faecalis*, uma vez comparado com sua sequência parental L-granulisina (HAMAMOTO *et al.*, 2002).

Em vista disso, a utilização de peptídeos contendo D-aminoácidos pode ser de grande valia por apresentarem vantagens como bioestabilidade, diversidade estrutural, e baixo custo de produção para sequências diastereoisômeras quando comparadas a peptídeos constituídos inteiramente de D-aminoácidos (incluindo peptídeos retro-inversos). Somado a isso, a inserção de D-aminoácidos em peptídeos diastereoisômeros pode possibilitar o desenvolvimento de diferentes padrões de L- e D-aminoácidos com possíveis atividades biológicas (CARDOSO; CÂNDIDO; *et al.*, 2018). Nesse contexto, mais estudos são encorajados afim de desvendar os efeitos da modulação da inversão de quiralidade na estrutura e mecanismos de ação de PAMs diastereoisômeros, visando novas estratégias que possam gerar potenciais fármacos no combate às cepas multirresistentes.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi objetivado a otimização de PAMs potencialmente ativos através da inserção de resíduos de D-Arginina e D-Lisina em sequências L-aminoácidos. Em suma, observamos que os peptídeos diastereoisômeros apresentaram maior estabilidade em ambiente proteolítico em comparação aos peptídeos parentais L-aminoácidos. Esses resultados mostraram que nosso primeiro objetivo de obter uma maior quantidade de peptídeos ativos em soro proveniente de plasma humano foi alcançado com sucesso. Contudo, experimentos futuros são propostos para avaliar tal estabilidade em maiores intervalos de tempo. Somado a isso, aqui observamos que mesmo que os diastereoisômeros tenham apresentado maior estabilidade em soro proveniente de plasma humano, estes perderam completamente sua atividade antimicrobiana em comparação aos peptídeos parentais. Isso pode ser explicado pela perda de estrutura α -helicoidal nos peptídeos diastereoisômeros, como observado nos estudos de DC e RMN. Dessa forma, mais estudos devem ser realizados, visando a modulação da inserção de D-aminoácidos nas sequências alvo garantindo, assim, suas propriedades de resistência a proteólise, bem como manter ou melhorar suas atividades frente a cepas bacterianas de interesse clínico.

8. PERSPECTIVAS

Estudos mais detalhados sobre a cinética da estabilidade em soro proveniente de plasma humano são encorajados assim como a modulação da inserção de D-Argininas e D-Lisinas nas sequências dos três peptídeos desenhados computacionalmente e investigados neste estudo. Nesse sentido, para estudos futuros tendo como ponto de partida está Dissertação de Mestrado, novos grupos de peptídeos serão utilizados para otimizar o desenvolvimento de PAMs diastereoisômeros biologicamente ativos. Dentre as estratégias propostas, podemos citar: (i) um grupo gerado através de estratégias *in silico* para predizer possíveis sítios de clivagem por diferentes enzimas, reduzindo assim o número de D-Arg e D-Lis nas sequências alvo; (ii) um grupo onde as alterações de quiralidade pontuais serão baseadas em análises de cromatografia líquida/espectrometria de massas (LC-MS) após a incubação de peptídeos L-aminoácidos com soro proveniente de plasma humano; e, por fim, (iii) um grupo onde D-Arg e D-Lis serão inseridas fora do padrão antimicrobiano α -helicoidal utilizado (KK[ILV]x(3)[AILV]) pelo algoritmo *Joker* para o desenho dos peptídeos apresentados neste trabalho. Dessa forma, será possível uma comparação mais detalhada da modulação de inversão de quiralidade gerando peptídeos mais estáveis na presença de proteases e, possivelmente, com suas atividades antimicrobianas conservadas. Ademais, os peptídeos estudados até o momento e descritos no presente trabalho (L-aminoácidos e os diastereoisômeros com todas as argininas e lisinas em forma D-aminoácido) seriam utilizados como os grupos controle.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A HISS, J.; HARTENFELLER, M.; SCHNEIDER, G. Concepts and applications of “natural computing” techniques in *de novo* drug and peptide design. **Current Pharmaceutical Design**, 16, n. 15, p. 1656-1665, 2010.
- ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, 36, n. 6, p. 697-705, 2005.
- ANDREEV, K.; MARTYNOWYCZ, M. W.; IVANKIN, A.; HUANG, M. L. et al. Cyclization improves membrane permeation by antimicrobial peptoids. **Langmuir**, 32, n. 48, p. 12905-12913, 2016.
- BEATSON, S. A.; WALKER, M. J. Tracking antibiotic resistance. **Science**, 345, n. 6203, p. 1454-1455, 2014.
- BEDNARSKA, N. G.; WREN, B. W.; WILLCOCKS, S. J. The importance of the glycosylation of antimicrobial peptides: natural and synthetic approaches. **Drug Discovery Today**, 22, n. 6, p. 919-926, 2017.
- BÖTTGER, R.; HOFFMANN, R.; KNAPPE, D. Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. **PloS One**, 12, n. 6, p. e0178943, 2017.
- CARDOSO, M. H.; CÂNDIDO, E. S.; CHAN, L. Y.; DER TOROSSIAN TORRES, M. et al. A computationally designed peptide derived from *Escherichia coli* as a potential drug template for antibacterial and antibiofilm therapies. **ACS Infectious Diseases**, 4, n. 12, p. 1727-1736, 2018.
- CARDOSO, M. H.; CÂNDIDO, E. S.; OSHIRO, K. G.; REZENDE, S. B. et al. Peptides containing D-amino acids and retro-inverso peptides: general applications and special focus on antimicrobial peptides. In: **Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering**: Elsevier, 2018. p. 131-155.
- CARDOSO, M. H.; MENEGUETTI, B. T.; COSTA, B. O.; BUCCINI, D. F. et al. Non-lytic antibacterial peptides that translocate through bacterial membranes to act on intracellular targets. **International Journal of Molecular Sciences**, 20, n. 19, p. 4877, 2019.
- CARDOSO, M. H.; OROZCO, R. Q.; REZENDE, S. B.; RODRIGUES, G. et al. Computer-aided design of antimicrobial peptides: are we generating effective drug candidates? **Frontiers in Microbiology**, 10, p. 3097, 2020.
- CARDOSO, M. H.; RIBEIRO, S. M.; NOLASCO, D. O.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. et al. A polyalanine peptide derived from polar fish with anti-infectious activities. **Scientific Reports**, 6, n. 1, p. 1-15, 2016.

CHAN, L. Y.; ZHANG, V. M.; HUANG, Y. h.; WATERS, N. C. *et al.* Cyclization of the antimicrobial peptide gomesin with native chemical ligation: influences on stability and bioactivity. **ChemBioChem**, 14, n. 5, p. 617-624, 2013.

CHE, Y. Design of cyclic peptides as protein recognition motifs. In: **Cyclic Peptide Design**: Springer, 2019. p. 97-106.

CHEN, S.-C.; BAHAR, I. Mining frequent patterns in protein structures: a study of protease families. **Bioinformatics**, 20, n. suppl_1, p. i77-i85, 2004.

CHEN, Y.; VASIL, A. I.; REHAUME, L.; MANT, C. T. *et al.* Comparison of biophysical and biologic properties of α -helical enantiomeric antimicrobial peptides. **Chemical Biology & Drug Design**, 67, n. 2, p. 162-173, 2006.

CIERPICKI, T.; OTLEWSKI, J. Amide proton temperature coefficients as hydrogen bond indicators in proteins. **Journal of Biomolecular NMR**, 21, n. 3, p. 249-261, 2001.

CIUMAC, D.; GONG, H.; HU, X.; LU, J. R. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. **Journal of Colloid and Interface Science**, 537, p. 163-185, 2019.

CORNEJO, E.; SCHLAERMANN, P.; MUKHERJEE, S. How to rewire the host cell: A home improvement guide for intracellular bacteria. **Journal of Cell Biology**, 216, n. 12, p. 3931-3948, 2017.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; REFFUVEILLE, F.; FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, 16, n. 5, p. 580-589, 2013.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; REFFUVEILLE, F.; MANSOUR, S. C.; RECKSEIDLER-ZENTENO, S. L. *et al.* D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Chemistry & Biology**, 22, n. 2, p. 196-205, 2015.

DINH, T. T.; KIM, D.-H.; LUONG, H. X.; LEE, B.-J. *et al.* Antimicrobial activity of doubly-stapled alanine/lysine-based peptides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 25, n. 18, p. 4016-4019, 2015.

DWIVEDI, R.; AGGARWAL, P.; BHAVESH, N. S.; KAUR, K. J. Design of therapeutically improved analogue of the antimicrobial peptide, indolicidin, using a glycosylation strategy. **Amino Acids**, 51, n. 10-12, p. 1443-1460, 2019.

EL-HALFAWY, O. M.; VALVANO, M. A. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. **Clinical Microbiology Reviews**, 28, n. 1, p. 191-207, 2015.

FENSTERSEIFER, I. C.; FELICIO, M. R.; ALVES, E. S.; CARDOSO, M. H. *et al.* Selective antibacterial activity of the cationic peptide PaDBS1R6 against Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes**, 1861, n. 7, p. 1375-1387, 2019.

FENSTERSEIFER, I. C.; SILVA, O. N.; MALIK, U.; RAVIPATI, A. S. et al. Effects of cyclotides against cutaneous infections caused by *Staphylococcus aureus*. **Peptides**, 63, p. 38-42, 2015.

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 25, n. 4, p. 661-681, 2012.

FIORONI, M.; DIAZ, M. D.; BURGER, K.; BERGER, S. Solvation phenomena of a tetrapeptide in water/trifluoroethanol and water/ethanol mixtures: a diffusion NMR, intermolecular NOE, and molecular dynamics study. **Journal of the American Chemical Society**, 124, n. 26, p. 7737-7744, 2002.

FJELL, C. D.; HISS, J. A.; HANCOCK, R. E.; SCHNEIDER, G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews Drug Discovery**, 11, n. 1, p. 37-51, 2012.

FJELL, C. D.; JENSSSEN, H.; CHEUNG, W. A.; HANCOCK, R. E. et al. Optimization of antibacterial peptides by genetic algorithms and cheminformatics. **Chemical Biology & Drug Design**, 77, n. 1, p. 48-56, 2011.

FLOSS, H. G.; YU, T.-W. Rifamycin mode of action, resistance, and biosynthesis. **Chemical Reviews**, 105, n. 2, p. 621-632, 2005.

FRANK, R. The SPOT-synthesis technique: synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. **Journal of Immunological Methods**, 267, n. 1, p. 13-26, 2002.

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

GOODMAN, M.; CHOREV, M. On the concept of linear modified retro-peptide structures. **Accounts of Chemical Research**, 12, n. 1, p. 1-7, 1979.

GRIECO, P.; CAROTENUTO, A.; AURIEMMA, L.; SAVIELLO, M. R. et al. The effect of d-amino acid substitution on the selectivity of temporin L towards target cells: identification of a potent anti-*Candida* peptide. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, 1828, n. 2, p. 652-660, 2013.

HAMAMOTO, K.; KIDA, Y.; ZHANG, Y.; SHIMIZU, T. et al. Antimicrobial activity and stability to proteolysis of small linear cationic peptides with D-amino acid substitutions. **Microbiology and Immunology**, 46, n. 11, p. 741-749, 2002.

HANCOCK, R. E.; SCOTT, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, 97, n. 16, p. 8856-8861, 2000.

HANEY, E. F.; HUNTER, H. N.; MATSUZAKI, K.; VOGEL, H. J. Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: linking structure to function? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, 1788, n. 8, p. 1639-1655, 2009.

HAY, S. I.; RAO, P. C.; DOLECEK, C.; DAY, N. P. *et al.* Measuring and mapping the global burden of antimicrobial resistance. **BMC Medicine**, 16, n. 1, p. 1-3, 2018.

HEMU, X.; P TAM, J. Macrocyclic antimicrobial peptides engineered from ω -conotoxin. **Current Pharmaceutical Design**, 23, n. 14, p. 2131-2138, 2017.

HILPERT, K.; WINKLER, D. F.; HANCOCK, R. E. Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. **Nature Protocols**, 2, n. 6, p. 1333, 2007.

HONG, S. Y.; OH, J. E.; LEE, K.-H. Effect of D-amino acid substitution on the stability, the secondary structure, and the activity of membrane-active peptide. **Biochemical Pharmacology**, 58, n. 11, p. 1775-1780, 1999.

HUANG, Y.; HE, L.; LI, G.; ZHAI, N. *et al.* Role of helicity of α -helical antimicrobial peptides to improve specificity. **Protein & Cell**, 5, n. 8, p. 631-642, 2014.

HURDLE, J. G.; O'NEILL, A. J.; CHOPRA, I.; LEE, R. E. Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections. **Nature Reviews Microbiology**, 9, n. 1, p. 62-75, 2011.

KONDEJEWSKI, L. H.; JELOKHANI-NIARAKI, M.; FARMER, S. W.; LIX, B. *et al.* Dissociation of antimicrobial and hemolytic activities in cyclic peptide diastereomers by systematic alterations in amphipathicity. **Journal of Biological Chemistry**, 274, n. 19, p. 13181-13192, 1999.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 3, n. 4, p. a010306, 2013.

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**, 8, n. 1, p. 4, 2018.

KŁODZIŃSKA, S. N.; PLETZER, D.; RAHANJAM, N.; RADES, T. *et al.* Hyaluronic acid-based nanogels improve *in vivo* compatibility of the anti-biofilm peptide DJK-5. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 20, p. 102022, 2019.

LAN, Y.; LAM, J. T.; SIU, G. K.; YAM, W. C. *et al.* Cationic amphipathic D-enantiomeric antimicrobial peptides with *in vitro* and *ex vivo* activity against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, 94, n. 6, p. 678-689, 2014.

LENCI, E.; TRABOCCHI, A. Peptidomimetic toolbox for drug discovery. **Chemical Society Reviews**, 49, n. 11, p. 3262-3277, 2020.

LI, Y.; LIU, T.; LIU, Y.; TAN, Z. *et al.* Antimicrobial activity, membrane interaction and stability of the D-amino acid substituted analogs of antimicrobial peptide W3R6. **Journal of Photochemistry and Photobiology Biology**, 200, p. 111645, 2019.

LIU, M.; LI, X.; XIE, Z.; XIE, C. *et al.* D-peptides as recognition molecules and therapeutic agents. **The Chemical Record**, 16, n. 4, p. 1772-1786, 2016.

LIU, Z.; YOUNG, A. W.; HU, P.; RICE, A. J. *et al.* Tuning the membrane selectivity of antimicrobial peptides by using multivalent design. **Chembiochem**, 8, n. 17, p. 2063-2065, Nov 23 2007.

LOHNER, K.; SEVCSIK, E.; PABST, G. Chapter Five Liposome-Based Biomembrane Mimetic Systems: Implications for Lipid–Peptide Interactions. **Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes**, 6, p. 103-137, 2008.

LOMBARDI, L.; MAISETTA, G.; BATONI, G.; TAVANTI, A. Insights into the antimicrobial properties of hepcidins: advantages and drawbacks as potential therapeutic agents. **Molecules**, 20, n. 4, p. 6319-6341, 2015.

LOOSE, C.; JENSEN, K.; RIGOUTSOS, I.; STEPHANOPOULOS, G. A linguistic model for the rational design of antimicrobial peptides. **Nature**, 443, n. 7113, p. 867-869, 2006.

LU, J.; XU, H.; XIA, J.; MA, J. *et al.* D-and Unnatural Amino Acid Substituted Antimicrobial Peptides With Improved Proteolytic Resistance and Their Proteolytic Degradation Characteristics. **Frontiers in Microbiology**, 11, 2020.

LUONG, H. X.; KIM, D.-H.; LEE, B.-J.; KIM, Y.-W. Effects of lysine-to-arginine substitution on antimicrobial activity of cationic stapled heptapeptides. **Archives of Pharmacal Research**, 41, n. 11, p. 1092-1097, 2018.

MAGANA, M.; SERETI, C.; IOANNIDIS, A.; MITCHELL, C. A. *et al.* Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. **Clinical Microbiology Reviews**, 31, n. 3, 2018.

MAHLAPUU, M.; BJÖRN, C.; EKBLOM, J. Antimicrobial peptides as therapeutic agents: Opportunities and challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, 40, n. 7, p. 978-992, 2020.

MICHAEL CONLON, J.; GALADARI, S.; RAZA, H.; CONDAMINE, E. Design of potent, non-toxic antimicrobial agents based upon the naturally occurring frog skin peptides, ascaphin-8 and peptide XT-7. **Chemical Biology & Drug Design**, 72, n. 1, p. 58-64, 2008.

MIGOŃ, D.; NEUBAUER, D.; KAMYSZ, W. Hydrocarbon stapled antimicrobial peptides. **The Protein Journal**, 37, n. 1, p. 2-12, 2018.

MITCHELL, J. B. Machine learning methods in chemoinformatics. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, 4, n. 5, p. 468-481, 2014.

MORRIS, C. J.; BECK, K.; FOX, M. A.; ULAETO, D. et al. Pegylation of antimicrobial peptides maintains the active peptide conformation, model membrane interactions, and antimicrobial activity while improving lung tissue biocompatibility following airway delivery. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 56, n. 6, p. 3298-3308, 2012.

MOURTADA, R.; HERCE, H. D.; YIN, D. J.; MOROCO, J. A. et al. Design of stapled antimicrobial peptides that are stable, nontoxic and kill antibiotic-resistant bacteria in mice. **Nature Biotechnology**, 37, n. 10, p. 1186-1197, 2019/10/01 2019.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A.; UNIT, A.; SANTIAGO, A. D. HHS public access. **Mech Antibiot Resist**, 4, p. 1e37, 2016.

OLLI, S.; RANGARAJ, N.; NAGARAJ, R. Effect of selectively introducing arginine and D-amino acids on the antimicrobial activity and salt sensitivity in analogs of human beta-defensins. **PLoS One**, 8, n. 9, p. e77031, 2013.

OSHIRO, K. G.; CANDIDO, E. S.; CHAN, L. Y.; TORRES, M. D. et al. Computer-aided design of mastoparan-like peptides enables the generation of nontoxic variants with extended antibacterial properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, 62, n. 17, p. 8140-8151, 2019.

PACHÓN-IBÁÑEZ, M. E.; SMANI, Y.; PACHÓN, J.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J. Perspectives for clinical use of engineered human host defense antimicrobial peptides. **FEMS Microbiology Reviews**, 41, n. 3, p. 323-342, 2017.

PIRES, J.; SIRIWARDENA, T. N.; STACH, M.; TINGUELY, R. et al. In Vitro Activity of the Novel Antimicrobial Peptide Dendrimer G3KL against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 59, n. 12, p. 7915-7918, Dec 2015.

PORTO, W. F.; FENSTERSEIFER, I. C.; RIBEIRO, S. M.; FRANCO, O. L. Joker: An algorithm to insert patterns into sequences for designing antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, 1862, n. 9, p. 2043-2052, 2018.

PORTO, W. F.; IRAZAZABAL, L.; ALVES, E. S.; RIBEIRO, S. M. et al. *In silico* optimization of a guava antimicrobial peptide enables combinatorial exploration for peptide design. **Nature Communications**, 9, n. 1, p. 1-12, 2018.

PORTO, W. F.; SILVA, O. N.; FRANCO, O. L. Prediction and rational design of antimicrobial peptides. **Protein Structure**, 1, 2012.

RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of Internal Medicine**, 272, n. 6, p. 541-561, 2012.

SANI, M.-A.; SEPAROVIC, F. How membrane-active peptides get into lipid membranes. **Accounts of Chemical Research**, 49, n. 6, p. 1130-1138, 2016.

SCORCIAPINO, M. A.; SERRA, I.; MANZO, G.; RINALDI, A. C. Antimicrobial dendrimeric peptides: Structure, activity and new therapeutic applications. **International Journal of Molecular Sciences**, 18, n. 3, p. 542, 2017.

SCUDIERO, O.; GALDIERO, S.; NIGRO, E.; DEL VECCHIO, L. *et al.* Chimeric beta-defensin analogs, including the novel 3NI analog, display salt-resistant antimicrobial activity and lack toxicity in human epithelial cell lines. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 57, n. 4, p. 1701-1708, 2013.

SHRIVASTAVA, S. R.; SHRIVASTAVA, P. S.; RAMASAMY, J. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **Journal of Medical Society**, 32, n. 1, p. 76, 2018.

SI, Z.; LIM, H. W.; TAY, M. Y.; DU, Y. *et al.* A glycosylated cationic block poly (beta - peptide) reverses intrinsic antibiotic resistance in all *ESKAPE* Gram-negative bacteria. **Angewandte Chemie International Edition**, 2020.

SIRTORI, L. R.; MOTTA, A. d. S. d.; BRANDELLI, A. Mode of action of antimicrobial peptide P45 on *Listeria monocytogenes*. **Journal of basic microbiology**, 48, n. 5, p. 393-400, 2008.

SOUSA, S. F.; PERES, J.; COELHO, M.; VIEIRA, T. F. Analyzing PEGylation through molecular dynamics simulations. **ChemistrySelect**, 3, n. 29, p. 8415-8427, 2018.

STONE, T. A.; COLE, G. B.; NGUYEN, H. Q.; SHARPE, S. *et al.* Influence of hydrocarbon-stapling on membrane interactions of synthetic antimicrobial peptides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 26, n. 6, p. 1189-1196, 2018.

STRÖMSTEDT, A. A.; PARK, S.; BURMAN, R.; GÖRANSSON, U. Bactericidal activity of cyclotides where phosphatidylethanolamine-lipid selectivity determines antimicrobial spectra. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, 1859, n. 10, p. 1986-2000, 2017.

TAYLER, E.; GREGORY, R.; BLOOM, G.; SALAMA, P. *et al.* Universal health coverage: an opportunity to address antimicrobial resistance? **The Lancet Global Health**, 7, n. 11, p. e1480-e1481, 2019.

TORRES, M. D.; PEDRON, C. N.; HIGASHIKUNI, Y.; KRAMER, R. M. *et al.* Structure-function-guided exploration of the antimicrobial peptide polybia-CP identifies activity determinants and generates synthetic therapeutic candidates. **Communications biology**, 1, n. 1, p. 1-16, 2018.

TORRES, M. D. T.; DE LA FUENTE-NUNEZ, C. Toward computer-made artificial antibiotics. **Current Opinion in Microbiology**, 51, p. 30-38, 2019.

TRABOCCHI, A. Principles and applications of small molecule peptidomimetics. In: **Small Molecule Drug Discovery**: Elsevier, 2020. p. 163-195.

TRAVKOVA, O. G.; MOEHWALD, H.; BREZESINSKI, G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Advances in Colloid and Interface Science**, 247, p. 521-532, 2017.

TROEIRA HENRIQUES, S. n.; LAWRENCE, N.; CHAOUSIS, S.; RAVIPATI, A. S. et al. Redesigned spider peptide with improved antimicrobial and anticancer properties. **ACS Chemical Biology**, 12, n. 9, p. 2324-2334, 2017.

UNITED, I. No time to wait—securing the future from drug-resistant infections. **Report to the Secretary General of the Nations**, 2019.

WANG, C.; SHAO, C.; FANG, Y.; WANG, J. et al. Binding loop of sunflower trypsin inhibitor 1 serves as a design motif for proteolysis-resistant antimicrobial peptides. **Acta Biomaterialia**, 124, p. 254-269, 2021/04/01/2021.

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

WAYNE, P. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2011.

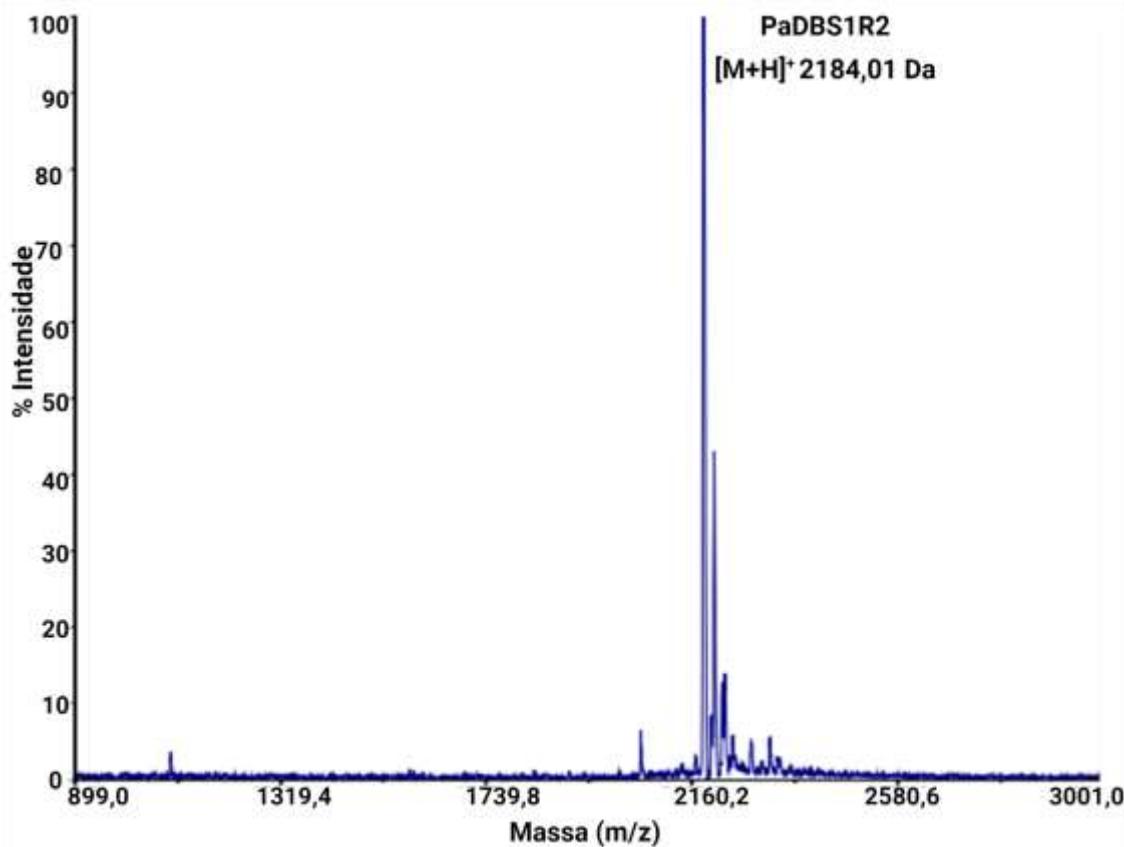
WISHART, D. S.; BIGAM, C. G.; HOLM, A.; HODGES, R. S. et al. ¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. **Journal of Biomolecular NMR**, 5, n. 1, p. 67-81, 1995.

ZAMAN, S. B.; HUSSAIN, M. A.; NYE, R.; MEHTA, V. et al. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. **Cureus**, 9, n. 6, 2017.

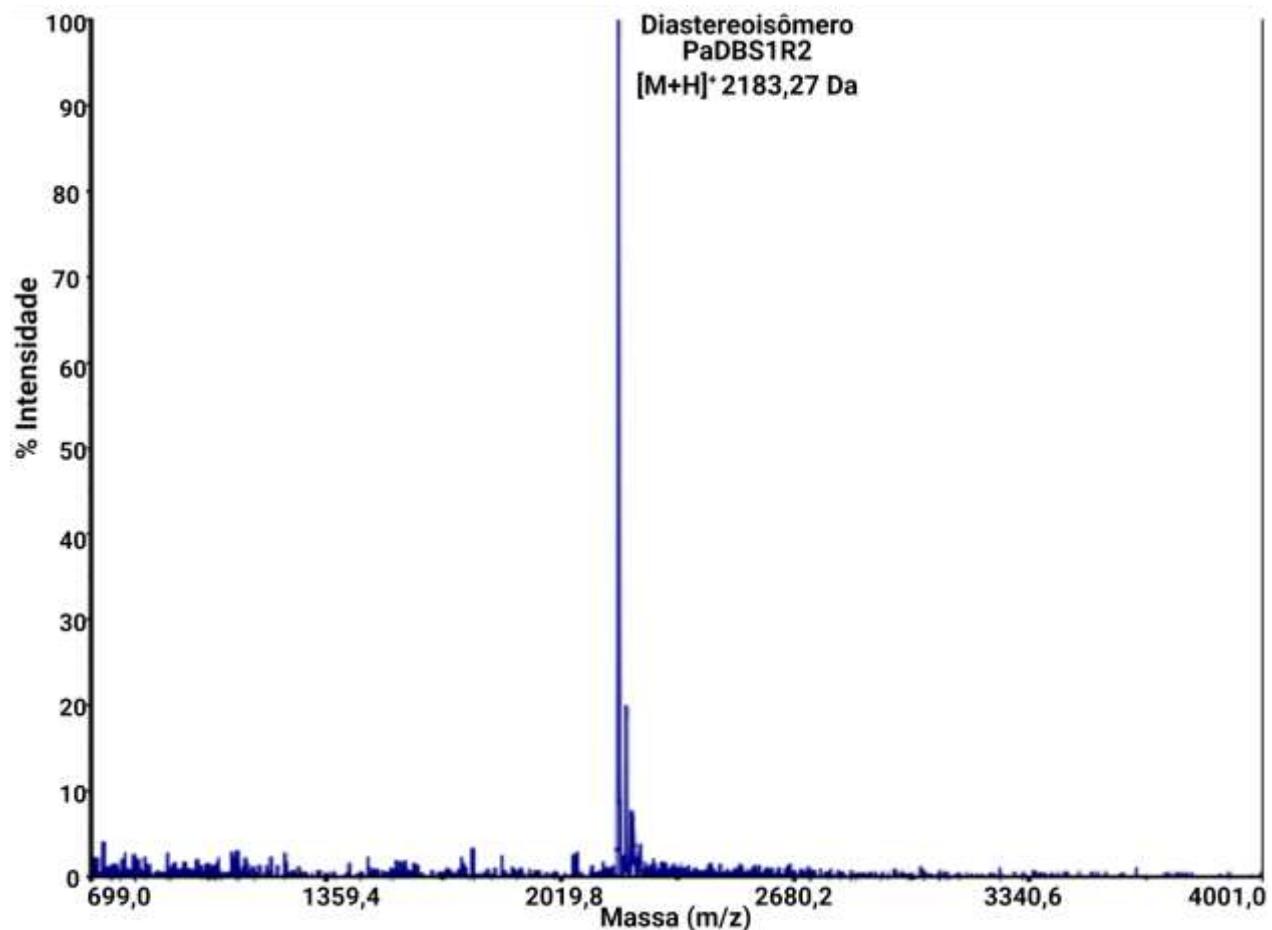
ZHANG, K.; DU, Y.; SI, Z.; LIU, Y. et al. Enantiomeric glycosylated cationic block co-beta-peptides eradicate *Staphylococcus aureus* biofilms and antibiotic-tolerant persisters. **Nature Communications**, 10, n. 1, p. 1-14, 2019.

ZHAO, Y.; ZHANG, M.; QIU, S.; WANG, J. et al. Antimicrobial activity and stability of the D-amino acid substituted derivatives of antimicrobial peptide *polybia-MPI*. **AMB Express**, 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

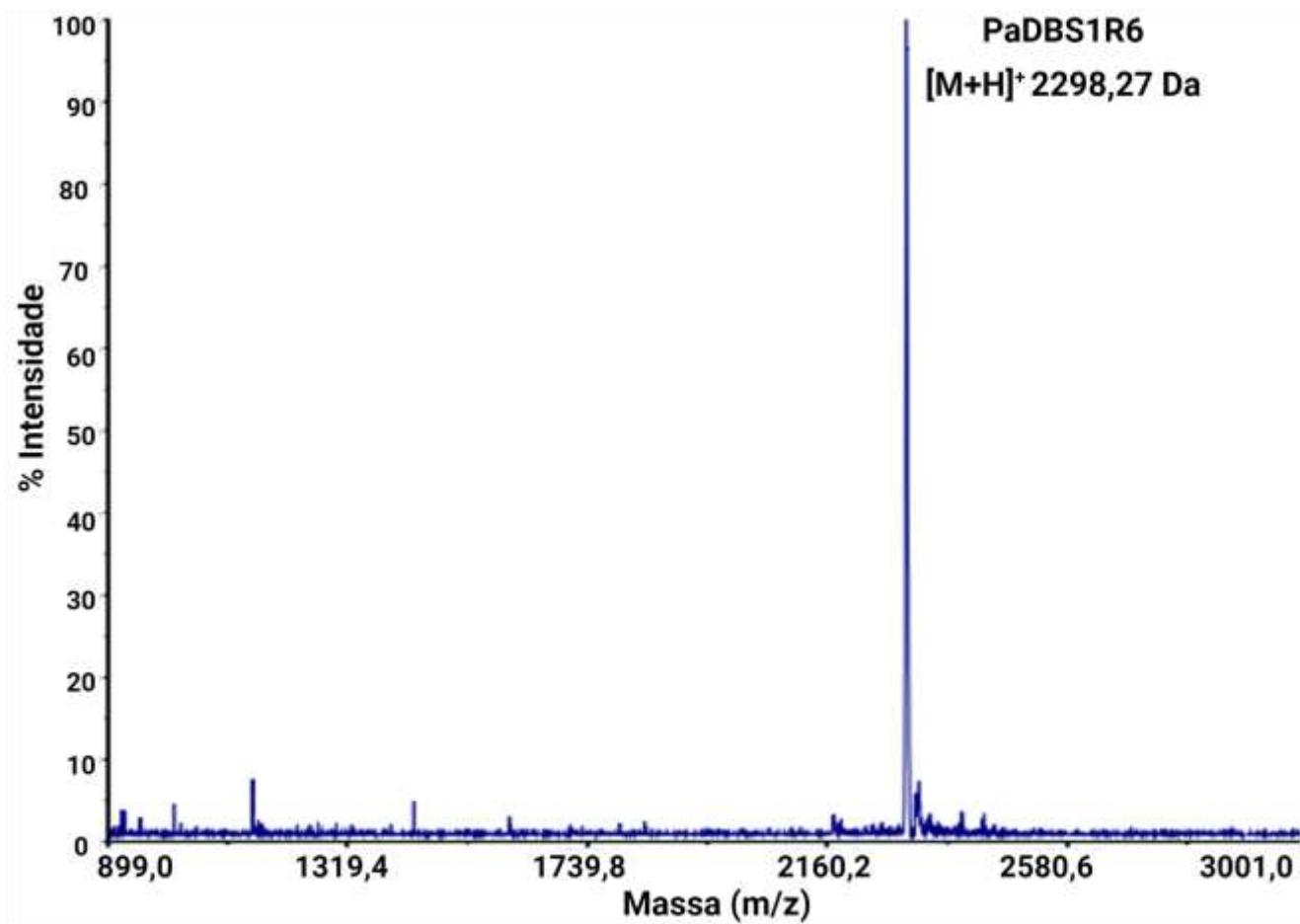
10. ANEXOS



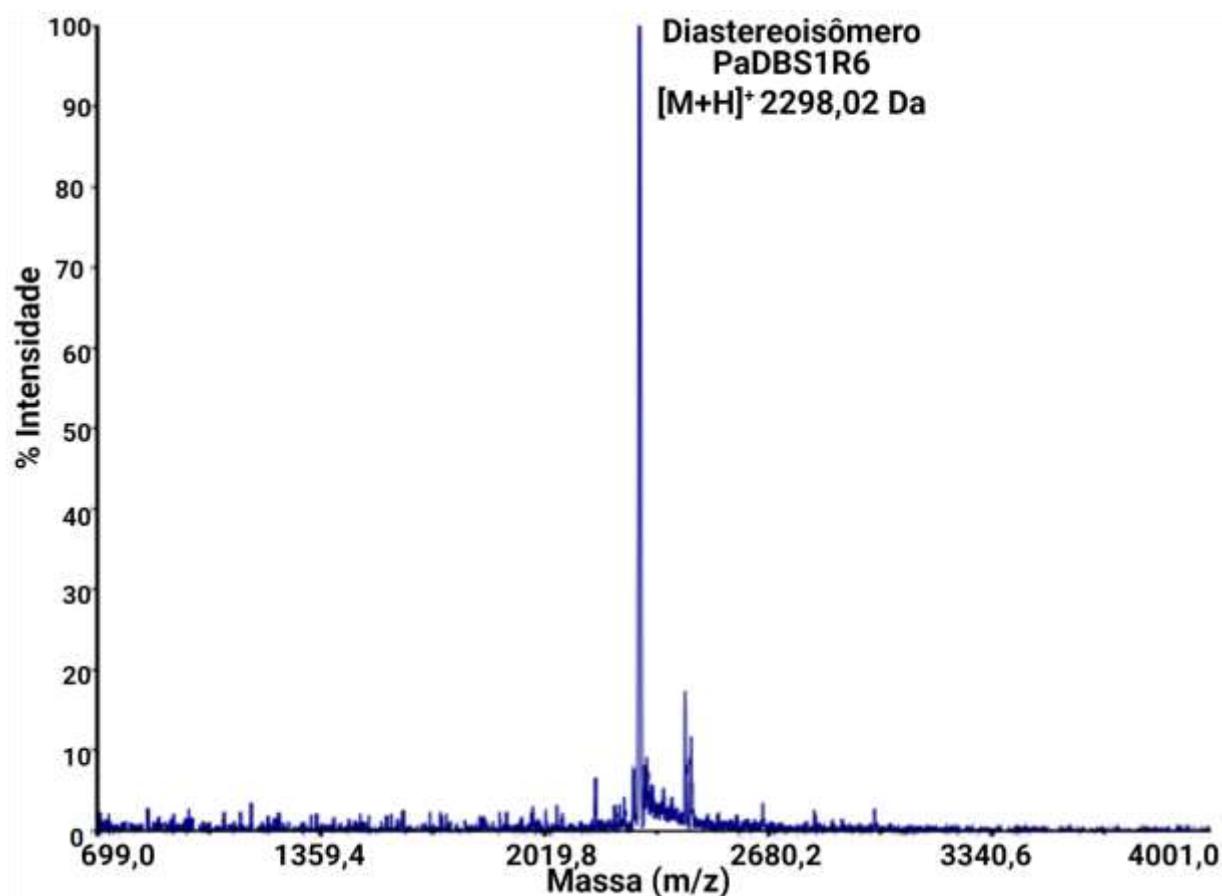
Anexo 1. Análises de MALDI-TOF para o peptídeo PaDBS1R2. A massa molecular para o PaDBS1R2 foi confirmada por MALDI-TOF, revelando uma massa monoisotópica de 2184,01 Da. Grau de pureza igual a 98,87%.



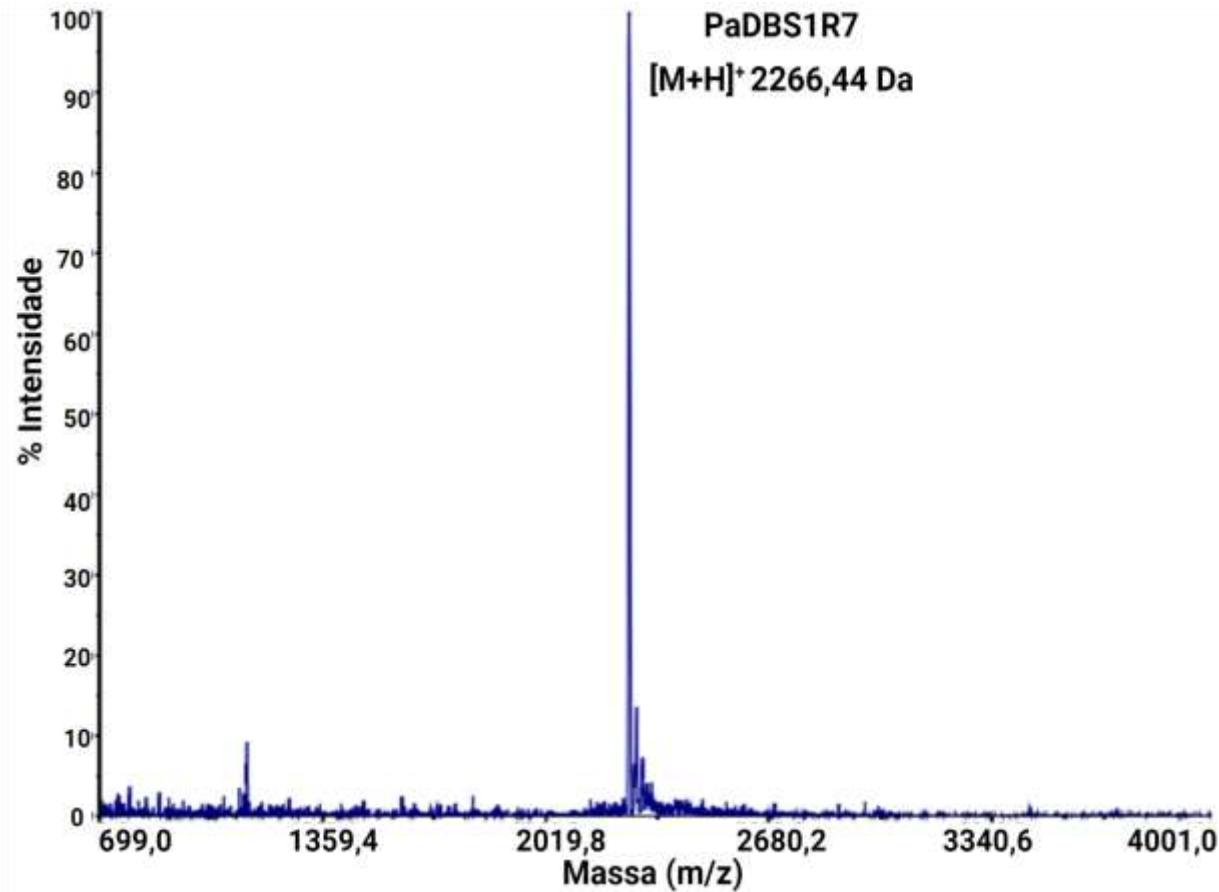
Anexo 2. Análises MALDI-TOF para o peptídeo diastereoisômero PaDBS1R2. A massa molecular de PaDBS1R2 foi confirmada por MALDI-TOF, revelando uma massa monoisotópica de 2183,27 Da. Grau de pureza igual a 95,06%.



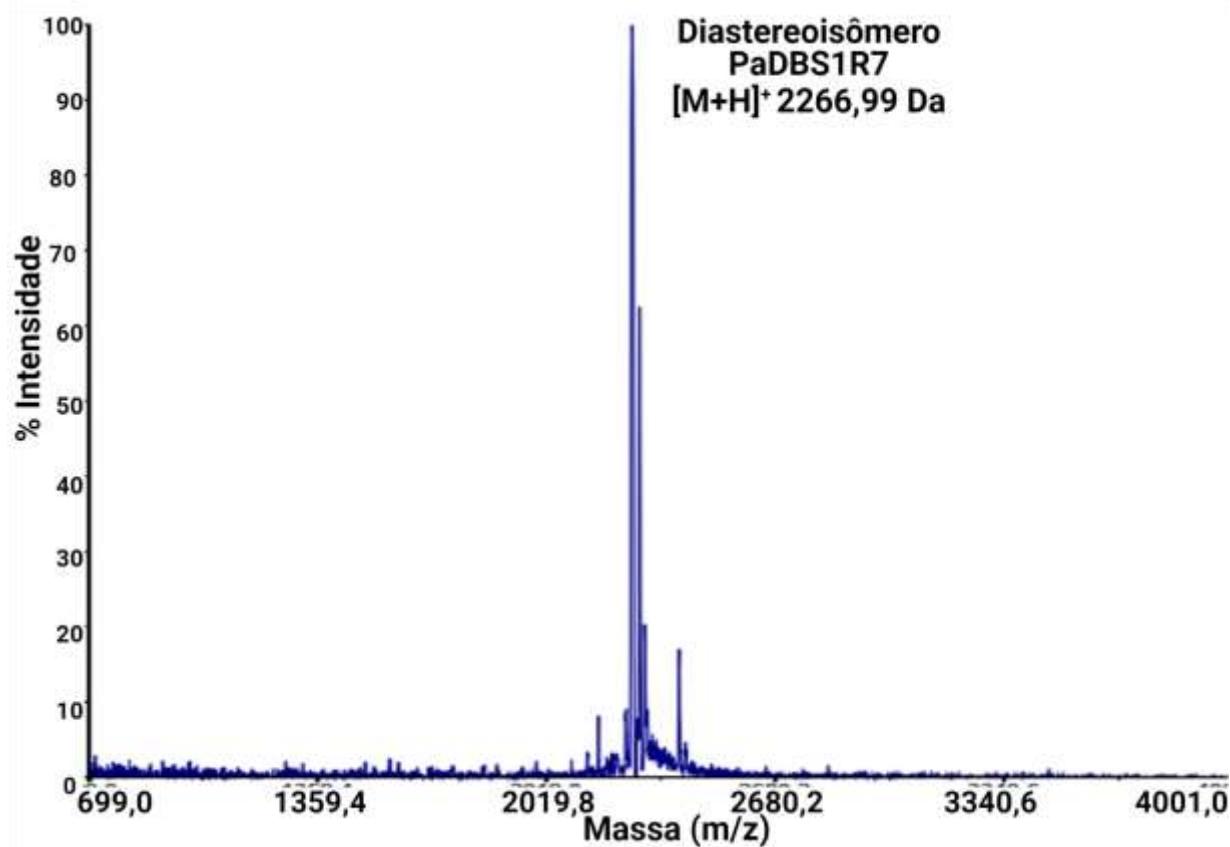
Anexo 3. Análises MALDI-TOF para o peptídeo PaDBS1R6. A massa molecular de PaDBS1R6 foi confirmada por MALDI-TOF, revelando uma massa monoisotópica de 2298,27 Da. Grau de pureza igual a 95,65%.



Anexo 4. Análises MALDI-TOF para o peptídeo diastereoisômero PaDBS1R6. A massa molecular de PaDBS1R6 foi confirmada por MALDI-TOF, revelando uma massa monoisotópica de 2298,02 Da. Grau de pureza igual a 97,72%.



Anexo 5. Análises MALDI-TOF para o peptídeo PaDBS1R7. A massa molecular de PaDBS1R7 foi confirmada por MALDI-TOF, revelando uma massa monoisotópica de 2266,44 Da. Grau de pureza igual a 98,29%.



Anexo 6. Análises MALDI-TOF para o peptídeo diastereoisômero PaDBS1R7. A massa molecular de PaDBS1R7 foi confirmada por MALDI-TOF, revelando uma massa monoisotópica de 2266,99 Da. Grau de pureza de (95,75%).

Artigo 1



Computer-Aided Design of Antimicrobial Peptides: Are We Generating Effective Drug Candidates?

Marlon H. Cardoso^{1,2}, Raquel Q. Orozco^{1,2}, Samilla B. Rezende¹, Gisele Rodrigues², Karen G. N. Oshiro^{1,4}, Elizabete S. Cândido^{1,2} and Octávio L. Franco^{1,2,3,4*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Kai Hilpert

St George's, University of London,
United Kingdom

Reviewed by:

Rolf Münch

Karlsruhe Institute of Technology,
Germany

Steven W. Polyak

University of South Australia, Australia
Manique L. Van Hook
George Mason University,
United States

*Correspondence:

Octávio L. Franco
ocfranco@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 20 September 2019

Accepted: 20 December 2019

Published: 22 January 2020

Citation:

Cardoso MH, Orozco RQ,
Rezende SB, Rodrigues G,
Oshiro KGN, Cândido ES and
Franco OL (2020) Computer-Aided
Design of Antimicrobial Peptides: Are
We Generating Effective Drug
Candidates?
Front. Microbiol. 10:3097.
doi: 10.3389/fmicb.2019.03097

Antimicrobial peptides (AMPs), especially antibacterial peptides, have been widely investigated as potential alternatives to antibiotic-based therapies. Indeed, naturally occurring and synthetic AMPs have shown promising results against a series of clinically relevant bacteria. Even so, this class of antimicrobials has continuously failed clinical trials at some point, highlighting the importance of AMP optimization. In this context, the computer-aided design of AMPs has put together crucial information on chemical parameters and bioactivities in AMP sequences, thus providing modes of prediction to evaluate the antibacterial potential of a candidate sequence before synthesis. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) computational models, for instance, have greatly contributed to AMP sequence optimization aimed at improved biological activities. In addition to machine-learning methods, the de novo design, linguistic model, pattern insertion methods, and genetic algorithms have shown the potential to boost the automated design of AMPs. However, how successful have these approaches been in generating effective antibacterial drug candidates? Bearing this in mind, this review will focus on the main computational strategies that have generated AMPs with promising activities against pathogenic bacteria, as well as anti-infective potential in different animal models, including sepsis and cutaneous infections. Moreover, we will point out recent studies on the computer-aided design of antibiofilm peptides. As expected from automated design strategies, diverse candidate sequences with different structural arrangements have been generated and deposited in databases. We will, therefore, also discuss the structural diversity that has been engendered.

Keywords: computer-aided design, bacteria, biofilms, antimicrobial peptides, drug design

Patente 1



04/08/2020 870200097484
13:03

29409161920913636

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 015866 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 03226149001587

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Associação com intuito não econômico

Endereço: Avenida Tamandaré, nº 6000. Jardim Seminário

Cidade: Campo Grande

Estado: MS

CEP: 79002-970

País: Brasil

Telefone: (67) 3312-3580

Fax: -

Email: s-inova@ucdb.br

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 04/08/2020 às 13:03, Petição 870200097484