



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

NILTON ARARIPE DOS SANTOS NETO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO E DEGRADAÇÃO
DE BIOFILME DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS BIOINSPIRADOS EM PROTEÍNAS
VEGETAIS CONTRA *Staphylococcus aureus***

FORTALEZA
2022

NILTON ARARIPE DOS SANTOS NETO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE
BIOFILME DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS BIOINSPIRADOS EM PROTEÍNAS
VEGETAIS CONTRA *Staphylococcus aureus*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza

FORTALEZA
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N385a Santos Neto, Nilton Araripe dos.
Avaliação da atividade de inibição da formação e degradação de biofilme de peptídeos sintéticos bioinspirados em proteínas vegetais contra *Staphylococcus aureus* / Nilton Araripe dos Santos Neto. – 2022.
51 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas.
Coorientação: Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza.
1. Peptídeos sintéticos. 2. Biofilme. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Sinergismo. I. Título.

CDD 661

NILTON ARARIPE DOS SANTOS NETO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE
BIOFILME DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS BIOINSPIRADOS EM PROTEÍNAS
VEGETAIS CONTRA *Staphylococcus aureus*

Monografia apresentada ao Curso Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Msc. Patrícia Gomes Lima
Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha família, amigos e orientadores pelo
suporte incondicional que me deram.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Magenia e Nilton pelo carinho, amor e apoio ao longo dessa jornada de graduação e por todos os ensinamentos que vou levar para minha vida. Vocês foram essenciais para a realização desse sonho.

À Ana Rita, meu amor, por sempre estar comigo em todos os momentos, por sempre me apoiar no meu sonho em ser pesquisador, por todos os ensinamentos, por todos os sorrisos que conseguiu tirar de mim, mesmo eu não estando no melhor momentos, por todo o amor, carinho, compreensão e disposição a me ajudar sempre.

Ao meu irmão Daniel, e meu melhor amigo, Thales por todas as risadas e jogatinas que aliviaram as angústias e incertezas ao longo dessa graduação.

Ao meu orientador Prof Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas pela orientação e disponibilidade em ajudar.

Ao meu co-orientador, e grande amigo, Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza, pelas orientações sempre que precisei, pelos conselhos, por sempre me instigar a pesquisar mais, pela confiança e pela oportunidade de trabalhar com uma pesquisa tão incrível. Eu, definitivamente, sou um melhor profissional hoje e pretendo seguir a carreira de pesquisador por sua causa, serei eternamente grato.

Aos meus amigos de laboratório com os quais sempre pude contar, Patrícia, Leandro, Lucia e Tawanny por sempre me ajudarem quando precisei, pelos conselhos e pelo apoio em momentos difíceis. Vocês foram essenciais na concepção desse trabalho e na minha construção como futuro pesquisador.

Ao Hermenão, Ana Rita, Ana Victória, Gustavo, Leo, Lilian, Rodrigo e Sofia por estarem comigo desde a época da escola e por sempre poder contar com o apoio de cada um.

Aos meus amigos da T9, Leonardo, João Pedro, Victor, Samuel, Ricardo, Sâmia e Larissa, que sempre me ajudaram ao longo desta graduação. Obrigado pelas discussões enriquecedoras, pelos papos descontraídos, e por estarem comigo nessa jornada.

Ao CNPq, pelo fomento à pesquisa, incentivo e suporte financeiro para realização desta pesquisa. Aos demais órgãos de fomento pelo apoio concedido a este trabalho.

“Ciência e vida cotidiana não podem e não
devem ser separadas” (Rosalind Franklin)

RESUMO

A bactéria patogênica *Staphylococcus aureus* é conhecida desde meados do século XX por ser uma bactéria resistente aos antibióticos. Com o passar dos anos, essa resistência expandiu para antibióticos além daqueles encontrados na classe das penicilinas. Por conta disso, *S. aureus* é uma bactéria de grande importância hospitalar, sendo um dos principais organismos causadores de infecções adquiridas em hospitais. Além das diversas resistências, *S. aureus* também é capaz de formar biofilme, uma estrutura extracelular capaz de conferir ainda mais proteção às células bacterianas. Para contornar tal problemática, estudos de prospecção vêm sendo realizados para encontrar moléculas alternativas capazes de impedir a formação e, até mesmo degradar esse biofilme após formado, que seria a situação mais problemática. A prospecção de peptídeos antimicrobianos (PAMs) parece ser uma alternativa promissora, visto que seus mecanismos de ação conseguem burlar os mecanismos de resistência bacterianos. Porém, peptídeos naturais são economicamente inviáveis, pois são encontrados em quantidades diminutas, além de sua instabilidade e toxicidade aos hospedeiros. Como alternativa, o uso de peptídeos antimicrobianos sintéticos, bioinspirados em proteínas vegetais, tem se mostrado vantajoso. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibiofilme, e possível efeito sinérgico, de oito peptídeos sintéticos, em combinação com o antibiótico ciprofloxacina. São eles: *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, *Mo*-CBP₃-PepIII, *Rc*Alb-PepI, *Rc*Alb-PepII, *Rc*Alb-PepIII, Pep GAT e Pep KAA. Nossos resultados mostraram que, quatro dos oito peptídeos, combinados com o antibiótico ciprofloxacina, foram capazes de inibir a formação do biofilme em até 76%, que foi obtido da combinação do peptídeo *Mo*-CBP₃-PepIII com o antibiótico. Além do ensaio antibiofilme, análises de microscopia de fluorescência corroboraram os resultados e mostraram que os peptídeos agem de forma a formar poros na membrana da célula e aumentando a atividade antibacteriana da ciprofloxacina, sugerindo efeito sinérgico e seu possível uso como adjuvante para melhorar a atividade de antibióticos.

Palavras-chave: peptídeos sintéticos; biofilme; *Staphylococcus aureus*; sinergismo.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a pathogenic bacterium known as resistant to antibiotics since the mid-20th century and, since then; your resistance did not stop growing, even towards the introduction of new pharmaceuticals. *S. aureus* has a huge medical importance, given to be the major organisms related to hospital-acquired infections (HAI). *S. aureus* is capable of forming biofilm, an extracellular structure that confers even more resistance to antibiotics. Over the years, studies have been conducted prospecting alternative molecules able to prevent biofilm formation, and even degrade preformed biofilms. In this context, antimicrobial peptides (AMPs) gained attention as promising alternative molecules, since their mechanisms of action can trespass bacterial resistance mechanisms. Even so, natural AMPs are economically unviable, given their low yield, low stability and toxicity to hosts. As an alternative, synthetic antimicrobial peptides (SAMPs), bioinspired in plant proteins, have been proving advantageous. The present work aimed to evaluate antibiofilm activity, and a possible synergistic effect, of eight SAMPs, in combination with the antibiotic ciprofloxacin. Out of eight, four peptides, in combination with ciprofloxacin, were capable of inhibiting *S. aureus* biofilm formation up to 76%. The best combination was *Mo*-CBP₃-PepIII and ciprofloxacin. Besides the antibiofilm assay, fluorescence microscopy analysis confirmed the results and showed that the peptides act in a way that forms pores on cellular membrane and enhancing ciprofloxacin's antibacterial activity, suggesting a synergistic effect between these molecules and their possible use as adjuvants for enhance antibiotics activity.

Keywords: synthetic peptides; biofilm; *Staphylococcus aureus*; synergism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de resistência antimicrobiana.....	14
Figura 2 - Etapas de formação de biofilme microbiano.....	17
Figura 3 - Mecanismos de ação dos PAMs.....	22
Figura 4 - Atividade antibiofilme e efeito sinérgico dos peptídeos combinados com o antibiótico ciprofloxacina. A: <i>Mo</i> -CBP ₃ -PepI; B: <i>Mo</i> -CBP ₃ -PepIII.....	31
Figura 5 - Atividade antibiofilme e efeito sinérgico dos peptídeos combinados com o antibiótico ciprofloxacina. A: <i>Rc</i> Alb-PepI; B: <i>Rc</i> Alb-PepII.....	33
Figura 6 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação <i>Mo</i> -CBP ₃ -PepI + ciprofloxacina na degradação do biofilme de <i>S. aureus</i>	35
Figura 7 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação <i>Rc</i> Alb-PepI + ciprofloxacina na degradação do biofilme de <i>S. aureus</i>	36
Figura 8 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação <i>Rc</i> Alb-PepI + ciprofloxacina na degradação do biofilme de <i>S. aureus</i>	37
Figura 9 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação <i>Rc</i> Alb-PepII + ciprofloxacina na degradação do biofilme de <i>S. aureus</i>	38
Figura 10 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação <i>Rc</i> Alb-PepII + ciprofloxacina na degradação do biofilme de <i>S. aureus</i>	39
Figura 11 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação <i>Rc</i> Alb-PepII + ciprofloxacina na degradação do biofilme de <i>S. aureus</i>	40
Figura 12 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação <i>Rc</i> Alb-PepII + ciprofloxacina na degradação do biofilme de <i>S. aureus</i>	41
Figura 13 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação <i>Mo</i> -CBP ₃ -PepIII + ciprofloxacina na inibição da formação do biofilme de <i>S. aureus</i>	42
Figura 14 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação <i>Mo</i> -CBP ₃ -PepIII + ciprofloxacina na inibição da formação do biofilme de <i>S. aureus</i>	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Antibióticos e a resistência bacteriana	12
1.2 Mecanismos de resistência bacteriana	13
<i>1.2.1 Biofilme e Staphylococcus aureus</i>	<i>16</i>
1.3 Peptídeos antimicrobianos (PAMs)	20
<i>1.3.1 Características dos PAMs</i>	<i>21</i>
<i>1.3.2 Mecanismos de ação dos PAMs</i>	<i>21</i>
1.4 PAMs sintéticos	23
<i>1.4.1 PAMs sintéticos desenhados a partir das proteínas Mo-CBP₃ e Rc-2S-Alb</i>	<i>24</i>
<i>1.4.2 PAMs sintéticos desenhados a partir de quitinase de A. thaliana</i>	<i>25</i>
1.5 Sinergismo	26
2 OBJETIVO GERAL	27
2.1 Objetivos específicos	27
3 METODOLOGIA	28
3.1 Obtenção do material biológico	28
3.2 Síntese dos peptídeos	28
3.3 Ensaio antibiofilme do sinergismo peptídeo/antibiótico	28
3.4 Estudo dos mecanismos de ação dos peptídeos contra o biofilme	29
<i>3.4.1 Integridade do biofilme determinada por microscopia de fluorescência</i>	<i>29</i>
3.5 Análise estatística	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
4.1 Atividade antibiofilme dos peptídeos e efeito sinérgico com ciprofloxacina	31
4.2 Mecanismo de ação por microscopia de fluorescência	34
5. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXO A – ARTIGO CIENTÍFICO 1	50
ANEXO B – ARTIGO CIENTÍFICO 2	51
ANEXO C – ARTIGO CIENTÍFICO 3	52
ANEXO D – ARTIGO CIENTÍFICO 4	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Antibióticos e a resistência bacteriana

Em 1928, quando Alexander Fleming descobriu a penicilina, deu-se início a era dos antibióticos e a era de ouro da pesquisa e desenvolvimento de medicamentos para o controle e tratamento de doenças infecciosas (MA et al., 2021). Nos anos de 1940-1960, houve uma explosão de prospecção e descoberta de novos agentes antimicrobianos naturais, a maioria deles contra bactérias Gram-positivas, como a própria *S. aureus*, entre eles estão: β -lactâmicos, tetraciclina, macrolídeos, aminoglicosídeos e até mesmo peptídeos. Além deles, houve a introdução de três antimicrobianos sintéticos: isoniazida, trimetopim e metronidazol (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Já nos anos de 1960-1980, começaram a aparecer os antibióticos semi-sintéticos, e o diferencial deles para os já existentes era o amplo espectro, ou seja, possuem atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Grande parte desses novos antibióticos foram derivados a partir de antibióticos já existentes, como os derivados β -lactâmicos, análogos de tetraciclina e os derivados aminoglicosídicos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Entre 1980-2000, houve uma redução drástica da descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos, mesmo com ferramentas mais avançadas e recentes da época, como a genômica. Atrelado à essa redução no desenvolvimento de novos antibióticos, ainda houve o aumento na incidência de resistência microbiana. Além disso, a introdução de antibióticos sintéticos, como as Fluoroquinolonas, foi um marco que modificou o mercado de antibióticos da época (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Em relação aos seus mecanismos de ação, os antibióticos podem atuar de 4 modos. (1) atuar na inibição da síntese de parede celular (β -lactâmicos); (2) inibição da replicação do DNA, mais precisamente inibindo a ação da DNA girase (quinolonas); (3) inibição da transcrição gênica, atuando na inibição da ação da RNA polimerase (fidaxomicina) ou no alongamento do RNA (actinomicina), inibição da tradução, podendo atuar tanto na inibição da subunidade 30S (tetraciclina), quanto da subunidade 50S (anfenicóis, lincosamidas); e (4) podem atuar na inibição do metabolismo do ácido fólico (sulfonamidas) (PENCHOVSKY; TRAYKOVSKA, 2015).

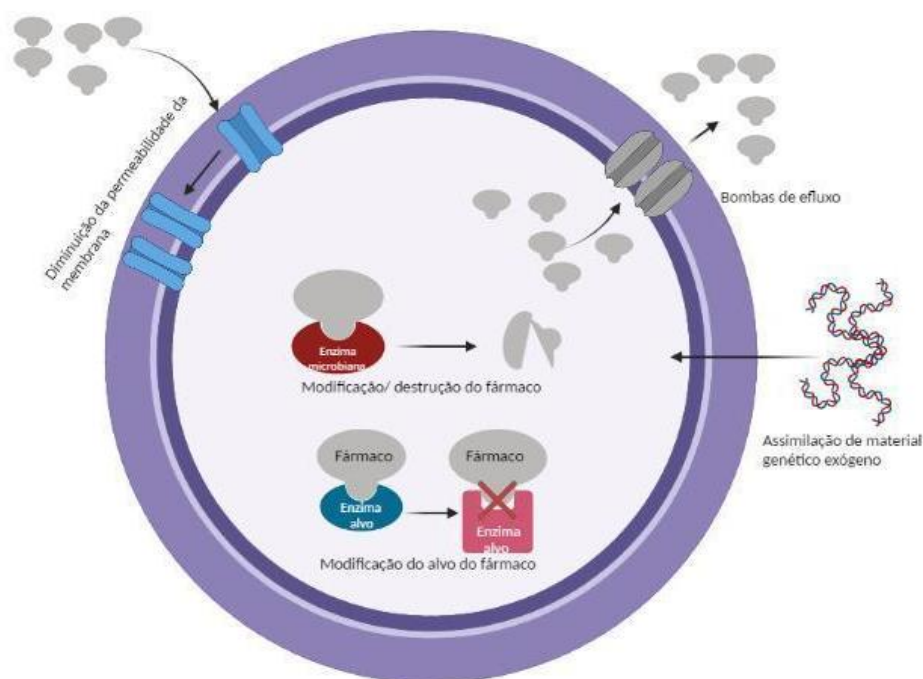
A partir dos anos 2000, ainda menos antibióticos foram introduzidos no mercado (linezolida em 2001, daptomicina em 2003), e a resistência microbiana só vem a aumentar desde então (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Neste período, houve a documentação de isolados de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* não susceptível à penicilina (PNSSP), Enterococos resistentes à vancomicina (VRE) e *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de amplo espectro (ESBL) (SANTOS, 2004).

O crescimento exacerbado de microrganismos resistentes têm se mostrado como um dos maiores problemas de saúde mundial dos últimos anos, por conta da baixa disponibilidade de novos antibióticos (NAINU et al., 2021). No ano de 2020, existiam um total de 150 agentes antimicrobianos na fase pré-clínica e 43 na fase clínica (WHO, 2020). Esse crescimento acelerado da resistência antimicrobiana se dá, principalmente, por três fatores principais: uso indiscriminado e indevido na prescrição de receitas médicas, mau uso por parte dos pacientes em relação a não-completude do tratamento com antibióticos, e o uso exacerbado da indústria agropecuária tanto como prevenção e aditivo alimentar, levando a exposição desses agentes aos microrganismos do ambiente (NAINU et al., 2021).

1.2 Mecanismos de resistência bacteriana

A resistência bacteriana pode vir a ocorrer naturalmente e também pode ocorrer de maneira acelerada por ação do homem. Essa resistência, como mostrado na figura 1, pode ser adquirida através de novas mutações randômicas e seleção natural, quando em contato com o agente antimicrobiano, ou adquirindo, de outros microorganismos, a informação genética que confere tal resistência (transferência horizontal de genes) (TENOVER, 2006).

Figura 1 - Mecanismos de resistência bacteriana



Fonte: elaborado pelo autor.

Em se tratando dos mecanismos de resistência, os microrganismos podem: alterar o alvo proteico do antibiótico em questão, podendo ocorrer a modificação ou deleção do sítio de ligação, alta expressão de enzimas que alteram e inativam o agente antimicrobiano, diminuição da permeabilidade da membrana a tais agentes, ou a alta expressão de bombas de efluxo responsáveis por lançar para o meio extracelular o agente antibacteriano (TENOVER, 2006).

Em relação ao mecanismo de resistência envolvendo a alteração do alvo proteico, podemos citar alguns exemplos já documentados na literatura. Nos casos da penicilina e outros β -lactâmicos, houve a mudança estrutural do alvo desses agentes, a proteína de ligação à penicilina (PBP), que está diretamente ligada à síntese de peptidoglicano de bactérias Gram-positivas. Qualquer tipo de mudança nessa proteína, seja de forma estrutural ou nos seus níveis de expressão, pode tornar os antibióticos β -lactâmicos pouco efetivos ou até ineficazes, como já visto em cepas de *Pneumococci* e *Salmonella enterica* (CAPUTO, 1993; NAINU et al., 2021; SUN; SELMER; ANDERSSON, 2014).

Outro exemplo que pode ser mencionado é o caso dos antibióticos que agem sobre a síntese de DNA, nas subunidades ribossomais, onde qualquer mutação ou mudança conformacional nas subunidades do ribossomo, pode afetar a efetividade desses agentes (macrolídeos e aminoglicosídeos), como foi documentado a presença de genes de resistência

da família de genes *erm* em algumas espécies bacterianas, onde esses genes correspondem a enzimas metilases responsáveis pela metilação das subunidades ribossomais e conferindo resistência a esses indivíduos (CHOI et al., 2018; NAINU et al., 2021).

A resistência contra Fluoroquinolonas também ocorre através desse mecanismo, onde mudanças nas enzimas DNA-girase (topoisomerase IV) podem inutilizar esses agentes antimicrobianos, como já foi documentado em cepas resistente onde ocorreram mutações em ambas as subunidades das duas enzimas, mais comumente nas serinas e aminoácidos ácidos do sítio ativo, onde fica ancorada a ponte água-íon metálico e a metilação do sítio A do rRNA 16S por uma metiltransferase, resultando na perda de habilidade dos antibióticos em se ligarem ao ribossomo (ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014; EGOROV; ULYASHOVA; RUBTSOVA, 2018; NAINU et al., 2021). Além dessas, a resistência contra sulfonamidas vem a ocorrer por conta desse mecanismo de resistência, com modificações nas enzimas presente na via biossintética do ácido fólico, como foi documentado em cepas bacterianas com genes *sul1* e *sul2*, que expressam diidropteroato sintases altamente resistentes a sulfonamidas (NAINU et al., 2021; SKÖLD, 2001).

Em relação ao mecanismo de inativação dos compostos antimicrobianos, essa inativação pode ser alcançada de duas formas: degradação do fármaco, ou transferência de grupos químicos (Metil) para que o fármaco seja inativado. As enzimas responsáveis por essa modificação ou destruição são classificadas em três categorias: hidrolases, transferases e oxidorredutases. Na classe das hidrolases, estão as β -lactamases. As β -lactamases hidrolisam a ligação amida do anel β -lactâmico e, desse modo, fazendo com que o antibiótico perca a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana (EGOROV; ULYASHOVA; RUBTSOVA, 2018).

Na classe das transferases, estão as aminoglicosídeo N-acetiltransferases, cujo mecanismo é adicionar um grupo acetil ou metil no agente antimicrobiano, impedindo-o de se ligar ao ribossomo e inibir a síntese proteica (EGOROV; ULYASHOVA; RUBTSOVA, 2018; SEFTON, 2002). Por fim, na classe das oxidorredutases, está a monooxigenase dependente de flavina, já observada em *Streptomyces venezuelae*, que é uma enzima que confere resistência a todas as tetraciclina. Seu mecanismo de ação se baseia catalisando a hidroxilação das tetraciclina, na presença de Mg^{+2} , NADPH e O_2 , levando a decomposição da molécula (EGOROV; ULYASHOVA; RUBTSOVA, 2018; KOTEVA et al., 2018).

Para reduzir a permeabilidade da membrana, os microrganismos podem reduzir a expressão de proteínas membranares por onde os agentes são transportados. Um exemplo dessas proteínas são as aquaporinas, as quais transportam antibióticos hidrofílicos. Além disso,

a própria formação de biofilme é conhecida por ser um mecanismo que reduz a permeabilidade da membrana, atrasando a penetração dos antibióticos na célula. Esse biofilme é conhecido por ser composto de diversas células amontoadas umas nas outras que, por sua vez, formam uma matriz extracelular. No caso das bactérias, essa matriz é composta por uma variedade de secreções celulares, como proteínas, carboidratos e DNA. Um exemplo de organismos que usam biofilme como mecanismo de resistência é a própria *S. aureus* (NAINU et al., 2021; PAGÈS; JAMES; WINTERHALTER, 2008).

Para a remoção dessas moléculas antimicrobianas, os microrganismos também vieram a desenvolver bombas de efluxo, que visam remover essas moléculas do meio intracelular para o meio extracelular, diminuindo a concentração interna das células. Em bactérias, existem cinco classes de bombas de efluxo que têm relação com a resistência a antibióticos, com dois principais mecanismos de efluxo: protomotriz (H^+ , Na^+) e por hidrólise de ATP. Essas bombas de efluxo estão relacionadas com a resistência contra diversas classes de antibióticos, como as fluoroquinolona, tetraciclina e aminoglicosídeos. No caso dos fungos, as bombas de efluxo funcionam de forma similar às bombas de bactérias, e conferem resistências a diversos antifúngicos, principalmente os azóis. Alguns exemplos de organismos com esse mecanismo de resistência são: *Pseudomonas aeruginosa*, *S. typhimurium* e *S. aureus* (ARCHER et al., 2011; EGOROV; ULYASHOVA; RUBTSOVA, 2018; WEBBER, 2003).

1.2.1 Biofilme e *Staphylococcus aureus*

Um biofilme é composto, principalmente, por um consórcio estruturado de células bacterianas envolvidas em uma matriz extracelular de polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular. Além dos mecanismos de resistência já apresentados, a maioria das bactérias, se não todas, são capazes de formar biofilme. O biofilme bacteriano é responsável por promover a sobrevivência das bactérias na natureza. Arelada à questão da sobrevivência em ambientes, o biofilme também confere resistência a antibióticos, desinfetantes químicos e à fagocitose e outros componentes do sistema imunológico. Para que se chegue ao estágio de biofilme maduro, sua produção pelas bactérias passa por algumas etapas, como mostrado na figura 2: (1) o acoplamento reversível das células bacterianas à superfície; (2) ligação irreversível à superfície, multiplicação das células, formação das microcolônias, produção da matriz extracelular que envolve a microcolônia; (3) e dispersão de células bacterianas para colonização

de novos locais onde seja possível a formação de biofilme (HØIBY et al., 2011; MOORMEIER; BAYLES, 2017).

Figura 2 - Etapas de formação de biofilme microbiano



Fonte: elaborado pelo autor.

O biofilme bacteriano é causador de diversas doenças de interesse médico, e o biofilme pode ser formado em diversas superfícies diferentes, como dentes, válvulas do coração, ouvido médio e em cateteres intravenosos. As infecções causadas por biofilme podem ser divididas em duas categorias, (1) infecções associadas a dispositivos e (2) infecções não associadas a dispositivos. A primeira categoria envolve a colonização e formação de biofilme em objetos como cateteres, próteses dentárias, dispositivos intrauterinos, entre outros, onde as células bacterianas podem se desacoplar dessas superfícies e se disseminarem aos tecidos próximos e até mesmo para a corrente sanguínea, podendo causar infecções severas. Já a segunda se trata da infecção diretamente nos tecidos do hospedeiro, onde pode levar a diferentes doenças dependendo de onde está instalado, como otite crônica, infecção recorrente do trato urinário e endocardite (SEGEV-ZARKO et al., 2015; YASIR; WILLCOX; DUTTA, 2018). Como o biofilme se apresenta como uma barreira física, dificultando a ação de antibióticos, é de extrema importância a descoberta de novas moléculas e tratamentos alternativos que possibilitem eliminar esses biofilmes bacterianos.

Em se tratando especificamente das bactérias do gênero *Staphylococcus*, elas são bactérias Gram positivas, esféricas, com diâmetro entre 0,5 e 1,5 μm , não esporulam, e são imóveis. Os estafilococos podem se arranjar no ambiente de diversas formas, sozinhas, em pares, cadeias curtas e agrupamentos irregulares. A primeira descrição de *Staphylococcus aureus* é datada de 1883, por Alexander Ogston, quando foi encontrada em pus de alguns abscessos cirúrgicos.

Seu mecanismo de patogenicidade já é bem descrito, e consiste na adesão à pele ou mucosa para romper as barreiras do epitélio, com o uso de seus fatores de virulência. Após invadir o epitélio, a *S. aureus* se utiliza de diversos mecanismos para promover sua sobrevivência e proliferação, como a neutralização da fagocitose, inibição das respostas imunes e opsonização do complemento (SANTOS et al., 2007). Muito de sua patogenicidade vem de seus fatores de virulência, que possuem papéis muito importantes tanto na captação de nutrientes, quanto na adesão celular, e na sua capacidade de se “esconder” da resposta imunológica do hospedeiro. Seus fatores de virulência podem ser classificados em três categorias: fatores relacionados à aderência às células do hospedeiro ou à matriz extracelular, como produção de moléculas de fibrinogênio, fibronectina, colágeno, ou de enzimas coagulases; fatores relacionados à capacidade de evasão da defesa do hospedeiro, como as diversas enterotoxinas, a toxina da síndrome do choque tóxico, lipases, polissacarídeos capsulares e a proteína A; e fatores relacionados à invasão nas células do hospedeiro e sua penetração nos tecidos ou adesão de superfícies de próteses, onde estão incluídas as toxinas a, b, d, g, e d-hemolisinas (SANTOS et al., 2007; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

A evolução da resistência da *S. aureus* aos antibióticos vêm crescendo constantemente. Poucos anos após o início do uso clínico da penicilina, a *S. aureus* começou a desenvolver mecanismos de resistência contra tal antibiótico, esse mecanismo seria a expressão de enzimas que inativam o fármaco, a betalactamase, mais precisamente a penicilinase. Em 1944, apenas 5% das *S. aureus* eram resistentes à penicilina. Porém, em 1959, apenas 15 anos depois, 80% das *S. aureus* possuíam resistência à penicilina, além de terem adquirido resistência à ampicilina e amoxicilina. A produção de lactamases se dava pelo gene *blaZ*, gene que é regulado por outros dois genes: *blaI* e *blaRI*, onde *blaRI* expressava um sensor-transdutor que, na presença de penicilina, inicia uma cascata de eventos que leva ao aumento de expressão de penicilinasas (SANTOS et al., 2007; LOWY, 2003; PANTOSTI et al., 2007).

Em 1960, foi descoberta a meticilina, um antibiótico semi-sintético da classe das penicilinas, que foi criado justamente para tentar conter a onda de *S. aureus* resistentes à penicilinas, pois ela foi desenhada para ser invulnerável aos ataques das betalactamases. O fármaco fez o seu trabalho, mas por pouco tempo. Já em 1961, houve o primeiro relato documentado de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). O surgimento da MRSA foi tão marcante na história da medicina que, mesmo a meticilina ter sido substituída por diferentes antibióticos, cepas de *S. aureus* multirresistentes ainda são chamadas de MRSA. Atualmente, a sigla MRSA indica a resistência a todos os antibióticos da classe dos β -lactâmicos. A resistência à meticilina se dá pelo gene *mecA* e seus reguladores: *mecI* e *mecRI*. O gene *mecA* é responsável

pela expressão de uma PBP com afinidade reduzida a β -lactâmicos, a PBP2a (PANTOSTI et al., 2007; LOWY, 2003).

Após o surgimento e disseminação da MRSA, na década de 1960, o principal antibiótico que era utilizado para tratar infecções era a vancomicina. A prevalência deste antibiótico durou um certo, mas na década de 1990, começaram a aparecer cepas de MRSA que não eram susceptíveis à vancomicina, mostrando uma resistência intermediária (VISA) ou resistência total ao antibiótico (VRSA), agravando ainda mais o acúmulo de resistências nesse microrganismo. A primeira ocorrência da VISA foi em 1996, no Japão. Essa resistência está associada a uma parede celular mais espessa, fazendo com que uma maior concentração de vancomicina fosse necessária para inibir o crescimento. Não apenas por isso, a parede celular das cepas VISA é rica em cadeias de peptidoglicano que não possuem ligações cruzadas, e deixam a mostra o dipeptídeo D-Ala-D-Ala, o alvo da vancomicina, servindo como distrações para que o antibiótico não atinja seu verdadeiro alvo (PANTOSTI et al., 2007; LOWY, 2003). Diferente da VISA, as VRSA são cepas resistentes a altos níveis de vancomicina, e seu mecanismo de resistência é totalmente diferente do mecanismo da VISA. Cepas de VRSA obtiveram todo o aparato genético que confere resistência a glicopeptídeos, através de transferência horizontal de genes, tendo os enterococos resistentes à vancomicina (VRE) como doadores. O aparato genético em questão é o operon *vanA*, que consistem em um conjunto de genes que codificam a síntese de precursores modificados de peptidoglicano, ao invés de possuírem D-Ala-D-Ala terminal, os genes presentes no operon modificam essa terminação para D-Ala-D-Lac. A vancomicina possui uma afinidade extremamente baixa com esses precursores contendo a terminação D-Ala-D-Lac, tornando-a ineficaz (PANTOSTI et al., 2007; LOWY, 2003).

Com a vancomicina não sendo mais uma alternativa tão viável, por conta da alta resistência e da alta taxa de toxicidade em altas concentrações, a nova arma contra MRSA se tornou as fluoroquinolonas, que se iniciou com o uso de ciprofloxacino, em 1997 na versão oral, e em 2001 a versão intravenosa. Porém, pouco tempo depois, já havia cepas de MRSA com resistência a essa classe de antibióticos. Essa resistência se deu a uma mutação que mudou certos aminoácidos na região determinante de resistência a fluoroquinolonas, fazendo com que esses antibióticos se tornassem ineficazes. Essa mutação ocorreu em duas enzimas responsáveis pela replicação do DNA e que são alvos das fluoroquinolonas: DNA girase e topoisomerase IV. Além dessa mudança de aminoácidos, ainda foi encontrado a presença de bombas de efluxo para diminuir a concentração intracelular desses antibióticos. (PANTOSTI et al., 2007; LOWY, 2003).

Recentemente, os antibióticos mais utilizados para tratar infecções por MRSA são antibióticos bem recentes, como a linezolida e a daptomicina. A linezolida é um antibiótico da classe das oxazolidinonas e a daptomicina é um lipopeptídeo. Apesar de seu uso ser recente, esses fármacos existem desde a década de 1980, ou seja, a lista de antibióticos eficazes contra MRSA diminui, enquanto a lista de novos antibióticos não aumenta. Para piorar, estudos mais recentes já mostraram que já existem cepas de MRSA resistentes a esses antibióticos. Felizmente, estatisticamente falando, essa resistência ainda é ínfima. Essa situação só corrobora a necessidade da busca de alternativas em relação ao tratamento das infecções causadas por MRSA, principalmente as infecções adquiridas em hospitais (PANTOSTI et al., 2007; SHARIATI et al., 2020).

Desde sua descoberta, e até antes disso, *S. aureus* vem sendo um grande problema de saúde pública podendo provocar diversas doenças, como espinhas, furúnculos, e até pneumonias e meningites, e desde a descoberta dos primeiros antibióticos, nas décadas de 1920 e 1930, *S. aureus* vem evoluindo concomitantemente à disponibilização de novos antibióticos no mercado, e com o tempo vai adquirindo resistência aos mesmos e, por conta disso, se tornou uma bactéria de alta importância hospitalar (SANTOS et al., 2007). Isso acaba por ser um problema muito sério, dado que estamos vivendo no período chamado de *Discovery Void*, um período que se dá desde 1987 (descoberta das Oxazolidinonas) até os dias de hoje, onde nenhuma nova classe de antibióticos foi descoberta, enquanto cepas multirresistentes continuam acumulando resistências através dos mecanismos já supracitados (BROUGHTON et al., 2016; MATSINGOS et al., 2021).

1.3 Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Para conter a onda de microorganismos multirresistentes, apelidados de *superbugs*, é necessário buscar e prospectar novas moléculas capazes de tratar infecções, ou até trazer de volta a efetividade de moléculas já ineficazes. Esse é o caso dos peptídeos antimicrobianos (PAMs) (ADEGOKE et al., 2016; ZHANG; GALLO, 2016).

A escolha dos PAMs é muito interessante, e viável, por conta das diversas vantagens que eles trazem, como o fato do alvo dos PAMs serem as membranas celulares, parte da célula onde é muito difícil os microorganismos desenvolverem resistência, além do fato de

que são produzidos por todos os seres vivos já estudados para esse propósito, tornando-os uma fonte para prospecção quase que infinita (GHOSH; HALDAR, 2015; ZHANG; GALLO, 2016).

1.3.1 Características dos PAMs

Mesmo possuindo uma ampla diversidade de PAMs, todos apresentam algumas características intrínsecas comuns entre eles, como serem oligopeptídeos, com a quantidade de aminoácidos variando entre 5 e 50. Além disso, os PAMs possuem características que conferem a eles essa capacidade de interagir com as membranas de microrganismos e, conseqüentemente, conferir essa atividade antimicrobiana. Entre essas características estão a presença de resíduos de aminoácidos com carga positiva (lisinas e argininas) e a presença de aminoácidos hidrofóbicos. A presença dessas duas classes de aminoácidos confere aos PAMs uma propriedade de muita importância para seu papel antimicrobiano: a anfipaticidade. Por serem moléculas anfipáticas, os PAMs são capazes de interagir com membranas celulares. Entretanto, uma grande quantidade de aminoácidos com carga positiva pode causar um efeito indesejado, que é a baixa seletividade dos peptídeos e uma maior toxicidade às células do hospedeiro (BAHAR; REN, 2013; KANG et al., 2017; LIMA et al., 2021c; ZHANG; GALLO, 2016).

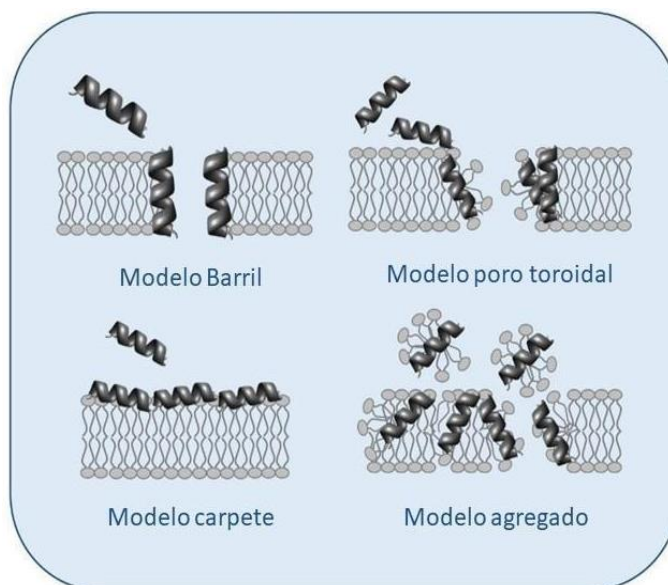
Os PAMs podem assumir diversas estruturas secundárias: folhas β , hélices α , e uma estrutura estendida. Essas estruturas estão diretamente ligadas à atividade biológica dos PAMs. A estrutura de folha β é caracterizada por pontes dissulfeto estabilizadas por resíduos Cys, como é o caso das defensinas e bacteriocinas. As hélices α são caracterizadas pela sua anfipaticidade, com a presença de aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos para interação completa com a membrana, como é o caso do peptídeo humano LL37 e a Magainina de sapos. Além disso, esses peptídeos possuem uma peculiaridade, eles exibem pouca estrutura secundária em soluções aquosas, mas quando em um ambiente apolar (membrana bacteriana), eles assumem a estrutura de hélice α anfipática (ZHANG; GALLO, 2016).

1.3.2 Mecanismos de ação dos PAMs

Grande parte dos PAMs possuem um mecanismo de ação característico, que é a interação com a membrana bacteriana, formação de poros e morte celular subsequente. Já foram propostos quatro modelos de como os PAMs formam poros nas membranas, como pode ser

visto na figura 3. São eles: poro toroidal, barril, carpete e modelo agregado (RAHEEM; STRAUS, 2019; YAN et al., 2021).

Figura 3 - Mecanismos de ação dos PAMs



Fonte: (RAHEEM; STRAUS, 2019) (com modificações).

No modelo de poro toroidal, a parte hidrofílica dos PAMs interage com a cabeça polar da membrana lipídica, enquanto que a parte hidrofóbica interage com a cauda apolar. Então, quando a proporção entre moléculas de peptídeo e fosfolípidios chega a um certo valor, os PAMs são verticalmente embutidos na bicamada lipídica. Esse deslocamento faz com que a membrana lipídica dobre para dentro e que os PAMs interajam com o grupo polar dos fosfolípidios para formar poros na membrana, seguidos de extravasamento do conteúdo celular e da incapacidade de manter a pressão osmótica em níveis regulares. Um exemplo de PAM que segue esse modelo é o peptídeo LL-37 (SEYFI et al., 2020; YAN et al., 2021).

No modelo barril, quanto mais moléculas de PAMs interagem com a membrana, mais moléculas são atraídas a interagirem com a superfície da membrana celular. Desse modo, os PAMs são inseridos, verticalmente, na bicamada lipídica e se agregam (interação peptídeo-peptídeo) para formar um canal iônico que desestabiliza a membrana e provoca o extravasamento de conteúdo celular. O que difere o modelo barril do modelo de poro toroidal, é que no modelo de poro toroidal não há uma interação entre peptídeos, apenas uma interação polar entre peptídeo e fosfolípido (SEYFI et al., 2020; YAN et al., 2021).

O modelo carpete difere um pouco dos outros supracitados, pois nele, os PAMs se dobram para formar uma estrutura anfifílica paralela à superfície da membrana e cobrindo-a,

como um carpete. Com isso, haverá a formação de micelas e ruptura parcial da membrana celular, causando destruição da bicamada lipídica e extravasamento do conteúdo celular (SEYFI et al., 2020; YAN et al., 2021).

Também há o modelo de formação de agregados, onde PAMs se acumulam na superfície da membrana celular, sem nenhuma conformação específica. Após chegarem em uma determinada concentração, os PAMs embutidos na membrana, formam um complexo com as moléculas de fosfolipídios e cruzam a membrana na forma de agregados (SEYFI et al., 2020; YAN et al., 2021).

Apesar dos mecanismos de danos causados na membrana celular serem os mais comuns entre os PAMs, alguns deles possuem mecanismos que atuam no interior da célula, afetando a fisiologia basal para promover morte celular. A literatura mostra casos de PAMs com mecanismos de interferência nos processos de transcrição e replicação do DNA e RNA bacteriano, ocorrendo pela interação eletrostática do PAM com as moléculas de ácidos nucleicos. Os PAMs também podem inibir o processo de tradução e modificações pós-traducionais. Alguns PAMs também podem afetar a atividade de algumas enzimas, como enzimas essenciais no metabolismo de substâncias lipídicas, e assim afetando o metabolismo basal da bactéria. Por fim, os PAMs podem também afetar a divisão celular, bloqueando-a. Há relatos na literatura de que, sob condições de extremo estresse, causada pelos PAMs, as bactérias assumem uma forma filamentosa, inibida de realizar divisão celular. Este último é o caso da diptericina, que faz com que células de *E. coli* se tornem mais alongadas, afetando o processo de divisão celular (YAN et al., 2021).

1.4 PAMs sintéticos

Apesar dos PAMs serem ótimos candidatos para novas drogas alternativas no combate às bactérias resistentes, ainda existem alguns entraves em relação a sua utilização. PAMs naturais podem apresentar baixa seletividade, atividade hemolítica, toxicidade ao hospedeiro, baixa estabilidade relacionada à digestão por proteases *in vivo*, baixa solubilidade e problemas de biodistribuição. Além desses problemas, ainda há a questão do escalonamento, pois os PAMs naturais possuem um rendimento de obtenção baixíssimo, necessitando altas quantidades de material biológico para extração e purificação de alguns miligramas. Para contornar tais desvantagens, os peptídeos antimicrobianos sintéticos são ótimas alternativas (BOTO; PÉREZ DE LA LASTRA; GONZÁLEZ, 2018; SOUZA et al., 2020a).

A produção dos peptídeos antimicrobianos sintéticos se dá pelo desenho racional dos mesmos, onde o tamanho do peptídeo, e quais aminoácidos serão utilizados, são minuciosamente selecionados, isso é chamado de desenho racional. O desenho racional é feito através de programas de bioinformática, onde é possível, com certo *softwares*, desenhar novos PAMs ou otimizar sequências já existentes, e obter diversos parâmetros do peptídeo desenhado, como carga líquida, hidrofobicidade, estrutura secundária, e índice de Boman, além de prever uma possível atividade antimicrobiana, a qual pode ser melhorada com adições e remoções pontuais (KUNDU, 2020; SOUZA et al., 2020a).

1.4.1 PAMs sintéticos desenhados a partir das proteínas *Mo-CBP₃* e *Rc-2S-Alb*

Das sementes de *Moringa oleifera*, foi purificada, e caracterizada, a proteína *Mo-CBP₃* (18 kDa), uma proteína de ligação à quitina da família das albuminas 2S, com alta atividade antifúngica. *In vitro*, *Mo-CBP₃* apresentou atividade contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloeosporioides*. Porém, ela não apresentou atividade antimicrobiana relevante contra patógenos humanos, como fungos do gênero *Candida*, mesmo em altas concentrações (BATISTA et al., 2014; GIFONI et al., 2012; NETO et al., 2017).

A *Rc-2S-Alb* é uma proteína que foi purificada, e caracterizada, da torta das sementes de *Ricinus communis*, e também pertence à família das albuminas 2S, família cujas principais características são a baixa massa molecular e alto conteúdo de glutamina, arginina, asparagina e cisteína (SOUZA et al., 2016, 2020a). Ela mostrou possuir alta atividade antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. Porém, ambas as proteínas apresentaram um problema em comum, um baixo rendimento de purificação, o mesmo problema recorrente de PAMs naturais.

Com o intuito de resolver o problema, foi feito o desenho racional de peptídeos sintéticos, baseados na sequência primária dessas proteínas, dando origem aos peptídeos *Mo-CBP₃-PepI* (CPAIQRCC), *Mo-CBP₃-PepII* (NIQPPCRCC) e *Mo-CBP₃-PepIII* (AIQRCC), a partir da proteína *Mo-CBP₃*; e *RcAlb-PepI* (AKLIPTIAL), *RcAlb-PepII* (SLRGCC) e *RcAlb-PepIII* (AKLIPTIA), a partir da proteína *Rc-2S-Alb* (DIAS et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2019). Os peptídeos foram desenhados com a ajuda do software C-PAmP de acesso gratuito (http://bioserver3.bioacademy.gr/Bioserver/C-PAmP/Peptide_index.php). Como requisitos para uma provável atividade antimicrobiana, os peptídeos tinham que possuir: carga líquida positiva; baixa massa molecular; índice de Boman $\leq 2,5$; e mínimo de 40% de hidrofobicidade.

Todas essas características foram avaliadas através de outra ferramenta, chamada de Banco de dados de peptídeos antimicrobianos (<http://aps.unmc.edu/AP/>).

Além do uso dessas ferramentas, os peptídeos também foram analisados em outras ferramentas *in silico*: iAMPpred tool (<http://cabgrid.res.in:8080/amppred/>), onde é dado um valor entre 0 e 1 correspondente à probabilidade do peptídeo ser antimicrobiano; Cell Penetrating Peptides (http://crdd.osdd.net/raghava/cellppd/multi_pep.php), que mostra o potencial do peptídeo para penetrar membranas celulares; Predicting antigenic peptides (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>), usado para prever o potencial alergênico; Peptide Cutter (http://web.expasy.org/peptide_cutter/), usado para prever a estabilidade e possíveis sítios de clivagem por proteases; e o HLP (<http://crdd.osdd.net/raghava/hlp/help.html>), usado para prever o tempo de meia-vida em ambiente intestinal.

1.4.2 PAMs sintéticos desenhados a partir de quitinase de *A. thaliana*

Além dos seis peptídeos supracitados, foi feito o desenho racional de mais dois peptídeos. Porém, dessa vez, o desenho dos peptídeos foi feito a partir de uma sequência aleatória do banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). No caso, a sequência escolhida foi de uma quitinase de *A. thaliana*. O desenho foi feito seguindo um fluxograma descrito por SOUZA et al., 2020, que consiste em quatro etapas: escolha da sequência proteica; uso de softwares para encontrar as melhores sequências de peptídeos aplicando alguns critérios, como a carga, índice de Boman e razão de hidrofobicidade; estabelecimento de outras propriedades físico-químicas e biológicas, como potencial antimicrobiano e potencial antibiofilme; obtenção da estruturas 3D dos peptídeos através do servidor PEP-Fold (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>). Com a avaliação desses critérios, foram obtidos dois peptídeos: PepGAT (GATIRAVNSR) e PepKAA (KAANRIKYFQ). Para obtenção dos peptídeos, foram utilizados dois servidores de uso gratuito: dPABBs (<http://ab-openlab.csir.res.in/abp/antibiofilm/protein.php>), utilizado para desenhar peptídeos com atividade antibiofilme; CellPPD (<http://crdd.osdd.net/raghava/cellppd/submission.php>), usado para desenhar peptídeos com propriedade de penetrar nas células.

1.5 Sinergismo

O sinergismo entre agentes antimicrobianos acontece quando a combinação, de pelo menos dois deles, resulta em uma atividade antimicrobiana maior que atividade dos agentes somados. Alguns dos mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos são os mecanismos relacionados a dificultar a entrada dos fármacos na célula. Os PAMs são ótimos candidatos a sinergismo com outros fármacos por conta do seu mecanismo de ação peculiar, de desestabilizar as membranas celulares, esse tipo de mecanismo pode vir a facilitar a entrada e ação de fármacos aos quais os microrganismos possuam resistência relacionada à permeabilidade de membrana (HOLLMANN et al., 2018; LI; FERNÁNDEZ-MILLÁN; BOIX, 2020). O sinergismo também pode levar a uma redução da dose efetiva do fármaco, reduzindo o custo de tratamento e podendo até reduzir a toxicidade. Com isso, o uso de PAMs em combinação com fármacos já presentes no mercado se torna bastante relevante (LI; FERNÁNDEZ-MILLÁN; BOIX, 2020).

Porém, é necessário tomar cuidado com certas desvantagens relacionadas a terapia combinada, como a questão do antagonismo, alto custo, superinfecção e maior incidência de efeitos adversos. Já existem exemplos na literatura que mostram o sinergismos de alguns PAMs combinados com antibióticos, como a combinação entre colistina e azitromicina, e entre o PAM LL-37 e moxifloxacina (HOLLMAN et al., 2018)

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação antibacteriana de peptídeos sintéticos, contra o biofilme da bactéria patogênica *S. aureus*, isoladamente e em combinação com o antibiótico comercial ciprofloxacina.

2.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar e quantificar a atividade antibiofilme, e possível efeito sinérgico, de oito peptídeos sintéticos bioinspirados em proteínas vegetais, em combinação com o antibiótico ciprofloxacina contra *S. aureus*;
- b) Estabelecer o mecanismo de ação, através de técnicas de microscopia, dos peptídeos que obtiveram atividade antibiofilme significativa.

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção do material biológico

A cepa (ATCC 25923) da bactéria *S. aureus* utilizada neste trabalho foi obtida do laboratório de proteínas tóxicas do departamento de bioquímica e biologia molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.2 Síntese dos peptídeos

Os peptídeos sintéticos *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, *Mo*-CBP₃-PepIII, *Rc*Alb-PepI, *Rc*Alb-PepII, *Rc*Alb-PepIII, PepGAT e PepKAA foram quimicamente sintetizados pela empresa GenOne (São Paulo, Brasil), onde foi feita uma análise de pureza e qualidade ($\geq 95\%$) por cromatografia líquida de fase reversa de alta performance, e espectrometria de massas.

3.3 Ensaio antibiofilme do sinergismo peptídeo/antibiótico

O ensaio foi feito em microplacas de poliestireno de 96 poços. A suspensão de células foi preparada a partir do cultivo celular da bactéria em caldo *Mueller Hinton* incubado a 37 °C por 24 h. Após esse período, a suspensão de células foi padronizada para conter 10⁶ células/mL. Para investigar se o peptídeo sintético era capaz de inibir a formação do biofilme, 50 µL da suspensão de células padronizada foi incubada em contato com 25 µL de peptídeo, diluído em uma solução de 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) em NaCl 0,15 M, em concentrações decrescente (1000 µg/mL – 0,4 µg/mL), juntamente com 25 µL de ciprofloxacina, diluído em uma solução de etanol 5% em NaCl 0,15 M, em concentrações crescentes (0,4 µg/mL - 1000 µg/mL), de modo que fosse possível observar qual molécula potencializa a ação da outra. As placas foram então incubadas por 48h, no escuro, a 37 °C. Após esse período, o sobrenadante foi retirado de cada poço e os poços lavados uma vez com NaCl 0,15 M estéril. Após isso, o biofilme no fundo dos poços foi fixado com 100 µL de uma solução de metanol 99%, deixando agir por 15 minutos. Após a total secagem dos poços, o biofilme foi corado com 200 µL de uma solução aquosa de cristal violeta 0,1%, deixando o cristal agir por 20 minutos. Os poços foram lavados três vezes com água destilada, para retirar o excesso de cristal violeta, e então o cristal ligado ao biofilme foi solubilizado em 200 µL de uma solução

aquosa de ácido acético 33%. A absorbância dos poços foi obtida via leitor de microplacas (BioTek™ Epoch, BioTek Instruments, Inc., USA) em um comprimento de onda de 590 nm.

Para observar a degradação do biofilme, o ensaio foi conduzido da mesma forma que descrito acima, mas com algumas adaptações. Inicialmente, 50 µL da suspensão de células foram incubados por 24h, no escuro, a 37 °C, para que o biofilme pudesse ser formado. Após isso, o sobrenadante foi removido (remoção das células planctônicas) e, em cada poço, foi colocado 25 µL da solução de peptídeo em diluição seriada decrescente, em combinação com 25 µL da solução de ciprofloxacina em diluição seriada crescente e incubado no escuro, a 37 °C, por mais 24h. Em seguida, o sobrenadante foi novamente removido e os passos de coração do biofilme foram os mesmos descritos acima. A inibição da formação e degradação do biofilme foram comparadas com três controles, (1) células em contato apenas com as diluições dos peptídeos, (2) células em contato apenas com as diluições de ciprofloxacina, (3) células em contato com solução de DMSO 5% em NaCl 0,15 M.

3.4 Estudo dos mecanismos de ação dos peptídeos contra o biofilme

Para elucidar seus mecanismos de ação, as combinações de peptídeos + ciprofloxacina que obtiveram resultado sinérgico no ensaio antibiofilme foram submetidas a análises de microscopia de fluorescência.

3.4.1 Integridade do biofilme determinada por microscopia de fluorescência

Para esse ensaio, o biofilme foi produzido e o ensaio foi conduzido da mesma forma que descrito no ensaio antibiofilme, mas, ao invés de ser conduzido em microplacas de poliestireno de 96 poços, o ensaio foi feito em lamínulas dentro de microplacas de seis poços. Após o período de incubação, as lamínulas foram incubadas com uma solução aquosa de 10^{-3} M do fluoróforo iodeto de propídio, no escuro, a 37 °C, por 30 minutos. Após isso, as lamínulas foram lavadas com uma solução aquosa de NaCl 0,15 M três vezes, para remover o excesso de fluoróforo, e então as lamínulas são analisadas em um microscópio de fluorescência (Olympus System Bx 60) em um comprimento de onda de excitação de 490 nm, e um comprimento de onda de emissão de 520 nm.

3.5 Análise estatística

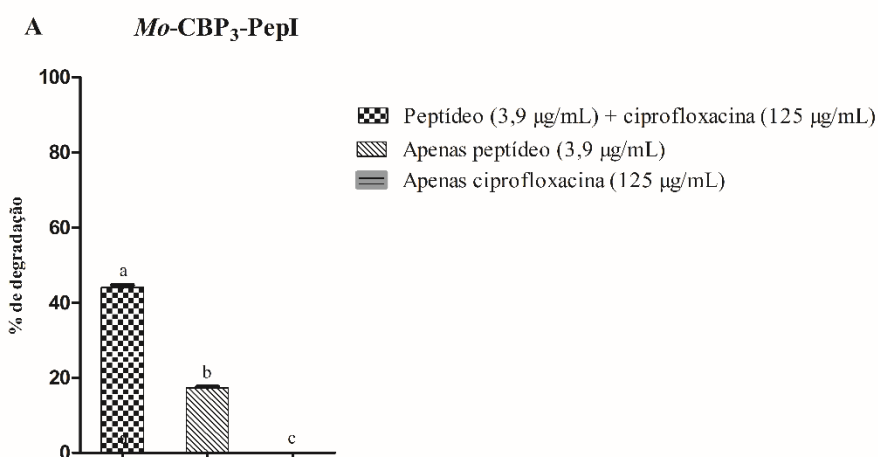
O ensaio antibiofilme foi realizado em triplicata. As análises estatísticas foram expressadas pela média \pm o desvio padrão. Foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5.01, onde os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey's, considerando uma significância de $P < 0,05$.

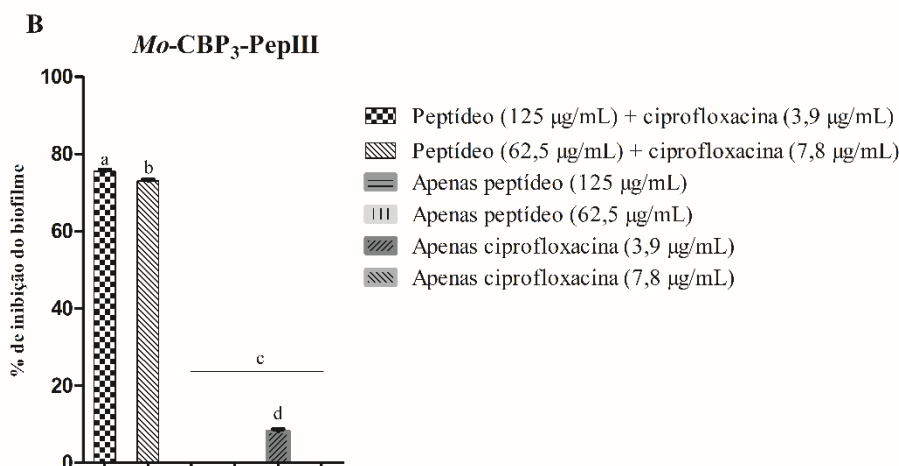
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Atividade antibiofilme dos peptídeos e efeito sinérgico com ciprofloxacina

Os peptídeos apresentaram comportamentos diferentes em relação ao biofilme de *S. aureus*, onde alguns apresentaram atividade na inibição da formação do biofilme, outros apresentaram efeito na degradação do mesmo. Enquanto o antibiótico ciprofloxacina e os peptídeos apresentaram pouca inibição, certas combinações entre antibiótico e os peptídeos foram capazes de potencializar a ação antibiofilme de ambas as moléculas, o que é chamado de efeito sinérgico. Isso foi observado com quatro dos oito peptídeos testados: *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepIII (Fig. 4), *Rc*Alb-PepI e *Rc*Alb-PepII (Fig. 5). Os outros peptídeos (dados não apresentados), não apresentaram ação antibiofilme (inibição da formação e degradação), e/ou não apresentaram efeito sinérgico.

Figura 4 - Atividade antibiofilme e efeito sinérgico dos peptídeos combinados com o antibiótico ciprofloxacina. **A:** Degradação do biofilme (*Mo*-CBP₃-PepI) **B:** Inibição da formação do biofilme (*Mo*-CBP₃-PepIII)



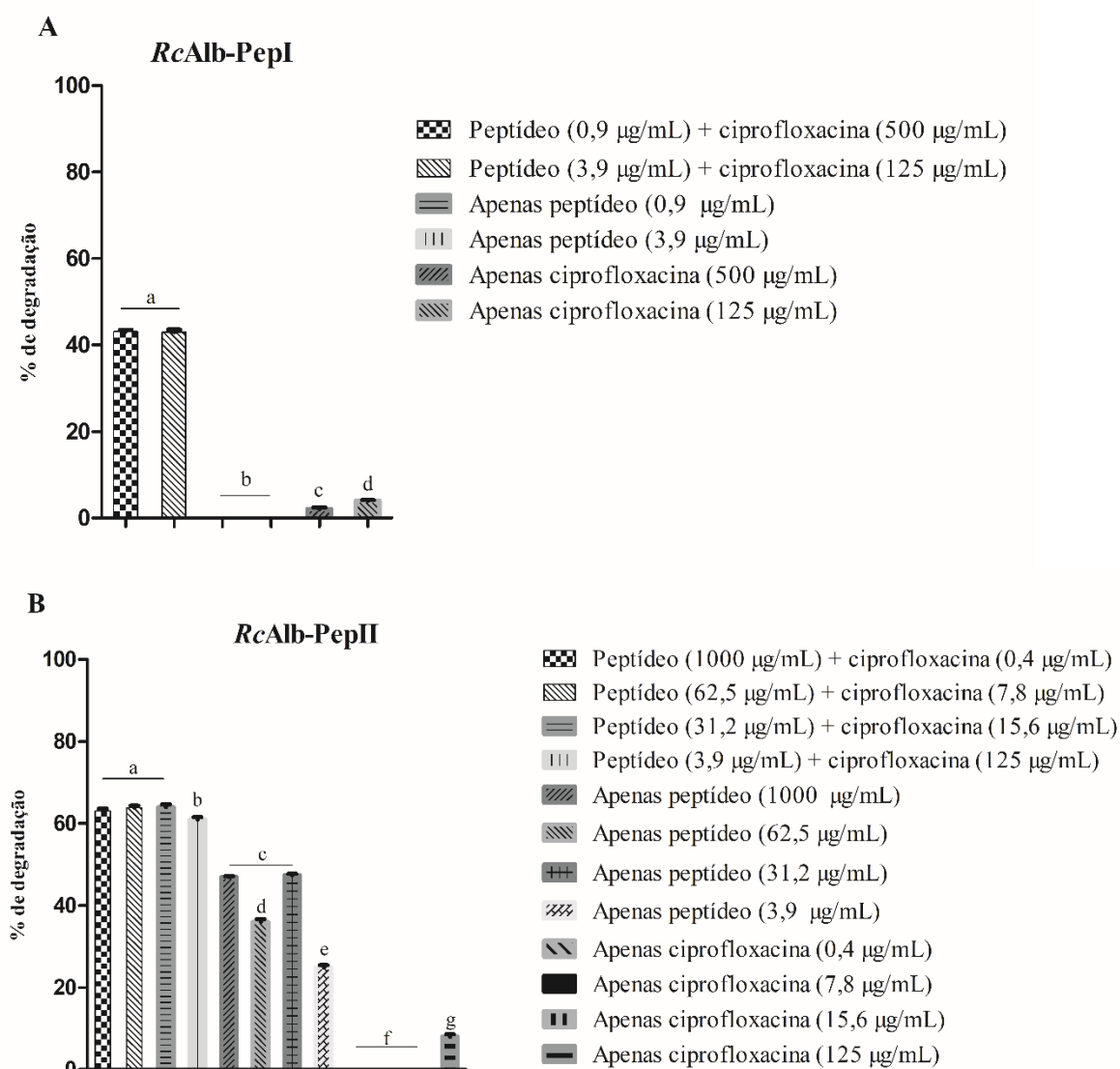


Fonte: elaborado pelo autor.

Em relação a inibição da formação do biofilme, apenas *Mo*-CBP₃-PepIII (Fig. 4A) obteve efeito sinérgico satisfatório com a ciprofloxacina, onde duas combinações foram capazes de alcançar 73 e 76% de atividade antibiofilme, enquanto o antibiótico e o peptídeo separados foram capazes de alcançar, no máximo, 8% de inibição (aumento de até 9,5 vezes).

Já em relação à degradação do biofilme formado, três peptídeos se destacaram: *Mo*-CBP₃-PepI, *Rc*Alb-PepI e *Rc*Alb-PepII (Fig. 4A e 5). Além de apresentarem atividade antibiofilme isoladamente, *Mo*-CBP₃-PepI e *Rc*Alb-PepII apresentaram uma melhora na atividade antibiofilme quando combinados com algumas concentrações de ciprofloxacina (2,5 vezes, e 1,45 vezes, respectivamente), as quais não apresentaram atividade antibiofilme. *Rc*Alb-PepI não apresentou nenhuma atividade. Porém, quando em combinação com algumas combinações de ciprofloxacina (500 e 62,5 µg/mL), onde o antibiótico também não apresentou atividade significativa, foi possível observar atividade na degradação do biofilme de 43% (Fig. 5A), mostrando possível efeito sinérgico entre as duas moléculas.

Figura 5 - Atividade antibiofilme e efeito sinérgico dos peptídeos combinados com o antibiótico ciprofloxacina. **A:** Degradação do biofilme (*RcAlb-PepI*). **B:** Degradação do biofilme (*RcAlb-PepII*)



Fonte: elaborado pelo autor.

Os peptídeos utilizados neste trabalho já apresentaram atividade antimicrobiana contra diversos tipos de patógenos, fungos dermatófitos, leveduras, fungos fitopatogênicos, e bactérias como a própria *S. aureus* (DIAS et al., 2020; LIMA et al., 2020, 2021a, 2021b; OLIVEIRA et al., 2019; SOUZA et al., 2020a, 2020b). A hipótese por trás desse trabalho seria se esses peptídeos são capazes de inibir a formação, ou até mesmo degradar o biofilme de *S. aureus*, visto que alguns dos peptídeos já possuem atividade antibacteriana comprovada contra

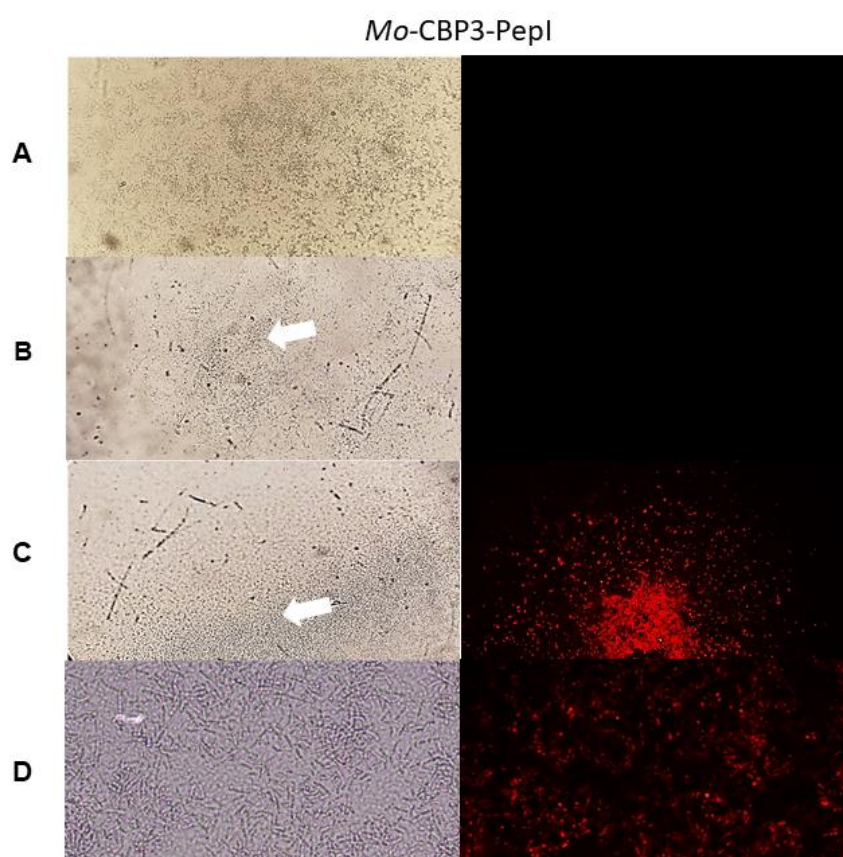
as células planctônicas de *S. aureus*. Na literatura é possível encontrar estudos acerca do mecanismo que tentam explicar a atividade antibiofilme, que pode ocorrer por conta da morte de células sésseis, ou prevenindo a adesão das células através da modulação de genes relacionados (SEGEV-ZARKO et al., 2015).

Diversos estudos vêm sendo feitos acerca do efeito sinérgico dos peptídeos antimicrobianos em combinações com fármacos comerciais. Os dados obtidos neste trabalho corroboram com tais estudos encontrados na literatura. BESSA et al. (2018) e MARTINEZ et al. (2019), apresentaram peptídeos antimicrobianos com atividade antibiofilme contra cepas resistentes de *P. aeruginosa*, e efeito sinérgico em combinação com antibióticos como meropenem e ciprofloxacina. KOPPEN et al. (2019) e DUAN et al. (2021) também apresentaram peptídeos antimicrobianos com atividade antibiofilme e efeito sinérgico com antibióticos e, nesse caso, contra a própria *Staphylococcus aureus*. Porém, o mecanismo ao qual esse sinergismo acontece, ainda não está totalmente elucidado. Uma dos modelos propostos mais aceito pela comunidade científica é o fato da maior parte dos peptídeos antimicrobianos alterarem a permeabilidade da membrana, tornando possível a entrada de tais fármacos para o interior da célula e permitindo assim a interação com seus alvos (DUAN et al., 2021). No caso dos nossos resultados, foi possível observar ganhos em relação à porcentagem de inibição e degradação quando combinamos peptídeo + antibiótico.

4.2 Mecanismo de ação por microscopia de fluorescência

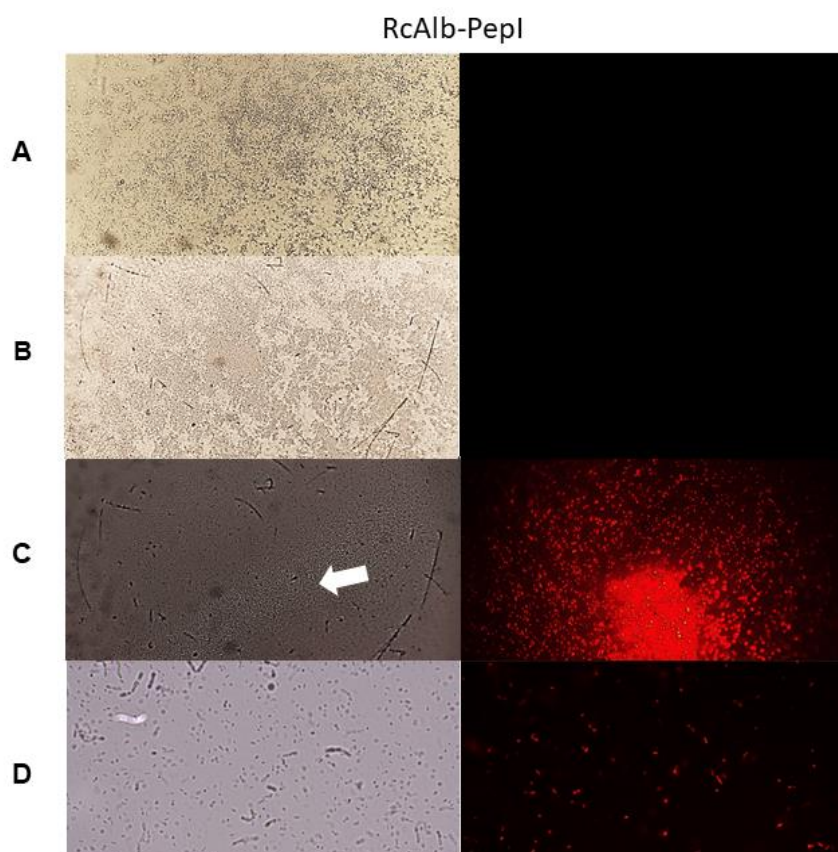
Para elucidar o mecanismo de ação dos peptídeos utilizados, em relação à atividade antibiofilme, foram feitas análises por microscopia de fluorescência utilizando-se do fluoróforo iodeto de propídio. Foram feitas análises de microscopia de fluorescência (Figs. 6 a 14) de todas as concentrações que demonstraram um possível efeito sinérgico entre peptídeo e antibiótico (Figs. 4 e 5).

Figura 6 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação *Mo*-CBP₃-PepI + ciprofloxacina na degradação do biofilme de *S. aureus*. Campo claro à esquerda e campo escuro à direita. **A:** Lâmina controle tratada apenas com solução de DMSO 5% em NaCl 0,15 M; **B:** Lâmina tratada apenas com o antibiótico (125 µg/mL); **C:** Lâmina tratada apenas com o peptídeo (3,9 µg/mL); **D:** Lâmina tratada com a combinação antibiótico + peptídeo (125 µg/mL + 3,9 µg/mL, respectivamente)



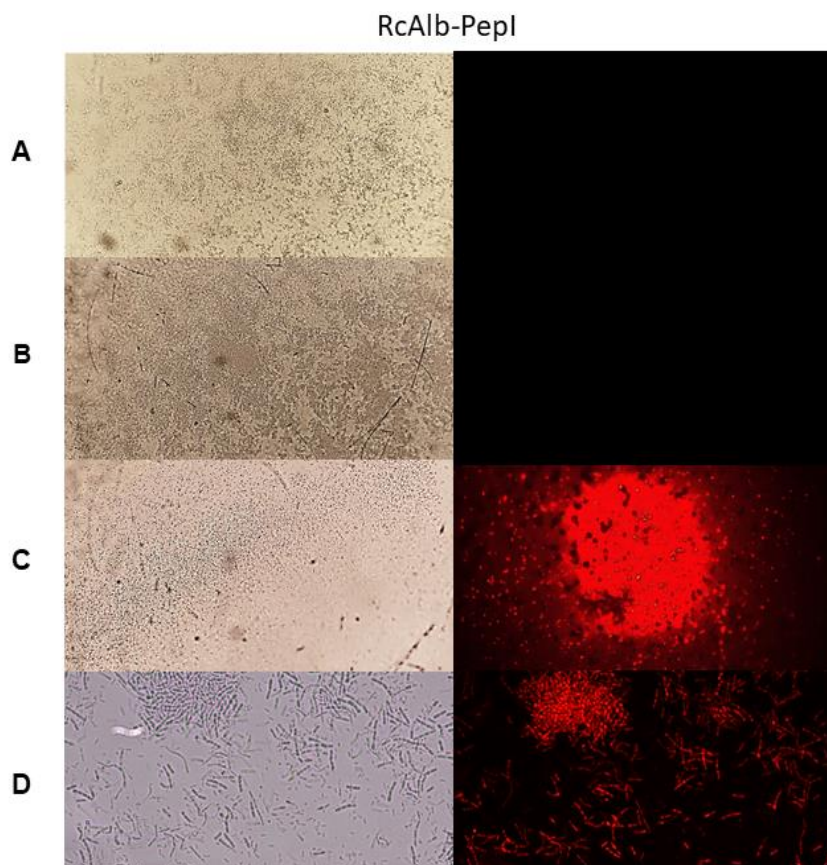
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 7 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação RcAlb-PepI + ciprofloxacina na degradação do biofilme de *S. aureus*. Campo claro à esquerda e campo escuro à direita. **A:** Lâmina controle tratada apenas com solução de DMSO 5% em NaCl 0,15 M; **B:** Lâmina tratada apenas com o antibiótico (500 µg/mL); **C:** Lâmina tratada apenas com o peptídeo (0,9 µg/mL); **D:** Lâmina tratada com a combinação antibiótico + peptídeo (500 µg/mL + 0,9 µg/mL, respectivamente)



Fonte: elaborado pelo autor.

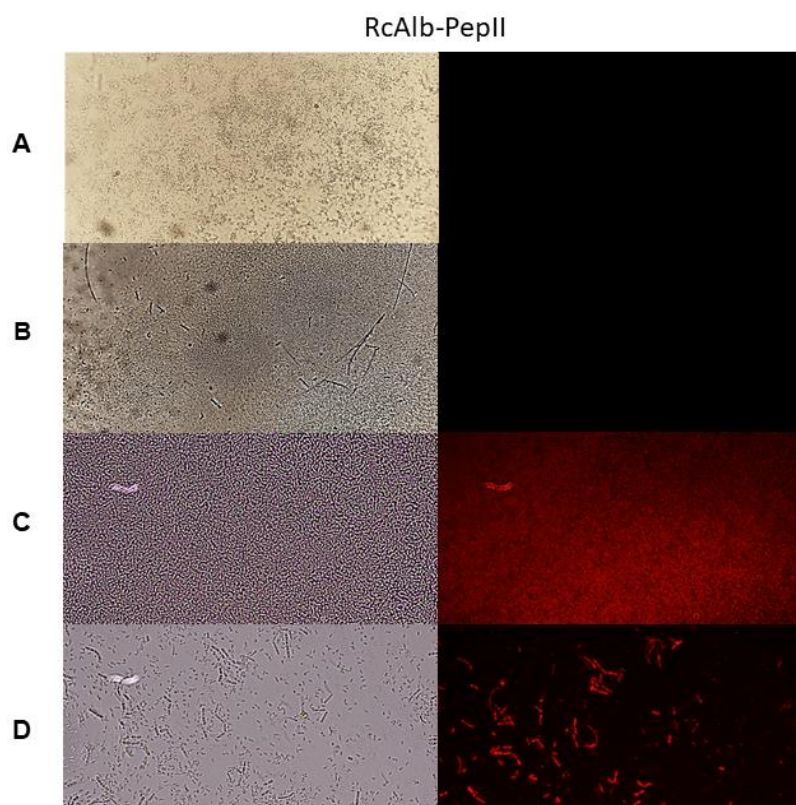
Figura 8 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação RcAlb-PepI + ciprofloxacina na degradação do biofilme de *S. aureus*. Campo claro à esquerda e campo escuro à direita. **A:** Lâmina controle tratada apenas com solução de DMSO 5% em NaCl 0,15 M; **B:** Lâmina tratada apenas com o antibiótico (125 µg/mL); **C:** Lâmina tratada apenas com o peptídeo (3,9 µg/mL); **D:** Lâmina tratada com a combinação antibiótico + peptídeo (125 µg/mL + 3,9 µg/mL, respectivamente)



Fonte: elaborado pelo autor.

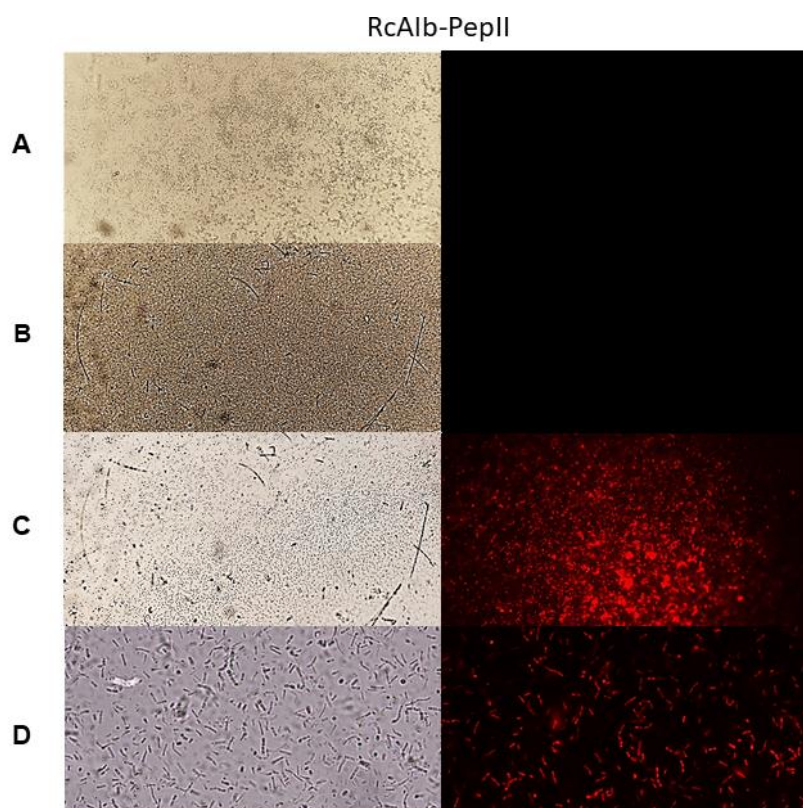
É possível observar nas imagens que houve pouca ou nenhuma fluorescência, em relação às células bacterianas tratadas apenas com a ciprofloxacina. Em relação ao campo claro, é possível observar o biofilme preenchendo quase toda a superfície da lâmina e, em alguns casos, preenchendo a imagem por completo. Já as imagens correspondendo aos tratamentos combinados (peptídeo+antibiótico), é possível observar que as células bacterianas emitem fluorescência, e ainda é possível observar a degradação do biofilme formado, onde o mesmo se encontra em pequenos fragmentos ao longo da imagem.

Figura 9 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação RcAlb-PepII + ciprofloxacina na degradação do biofilme de *S. aureus*. Campo claro à esquerda e campo escuro à direita. **A:** Lâmina controle tratada apenas com solução de DMSO 5% em NaCl 0,15 M; **B:** Lâmina tratada apenas com o antibiótico (0,4 µg/mL); **C:** Lâmina tratada apenas com o peptídeo (1000 µg/mL); **D:** Lâmina tratada com a combinação antibiótico + peptídeo (0,4 µg/mL + 1000 µg/mL, respectivamente)



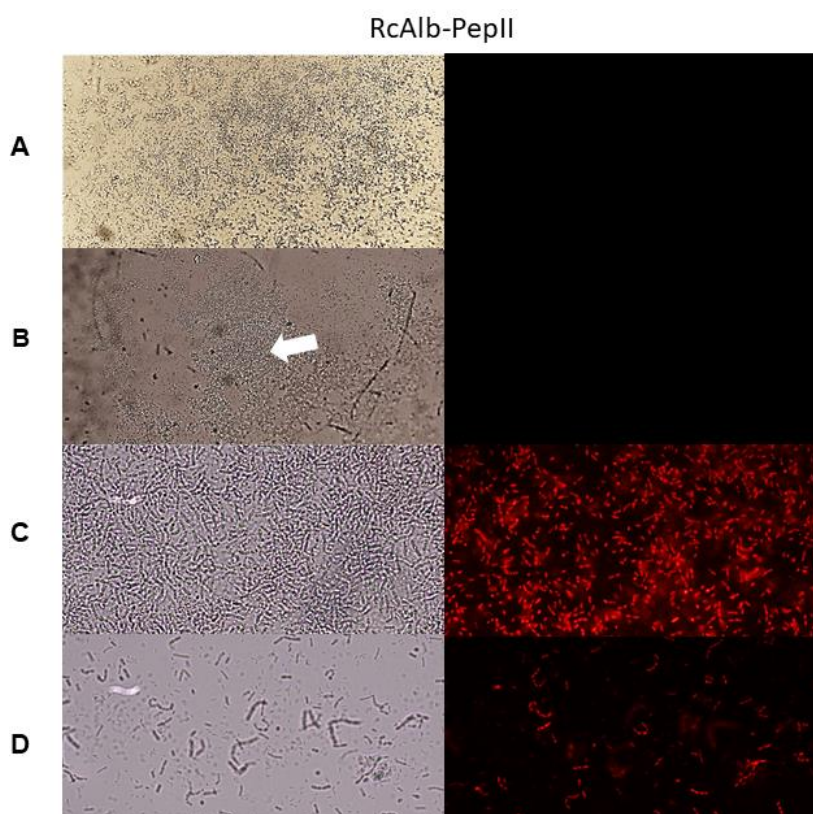
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 10 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação RcAlb-PepII + ciprofloxacina na degradação do biofilme de *S. aureus*. Campo claro à esquerda e campo escuro à direita. **A:** Lâmina controle tratada apenas com solução de DMSO 5% em NaCl 0,15 M; **B:** Lâmina tratada apenas com o antibiótico (7,8 µg/mL); **C:** Lâmina tratada apenas com o peptídeo (62,5 µg/mL); **D:** Lâmina tratada com a combinação antibiótico + peptídeo (7,8 µg/mL + 62,5 µg/mL, respectivamente)



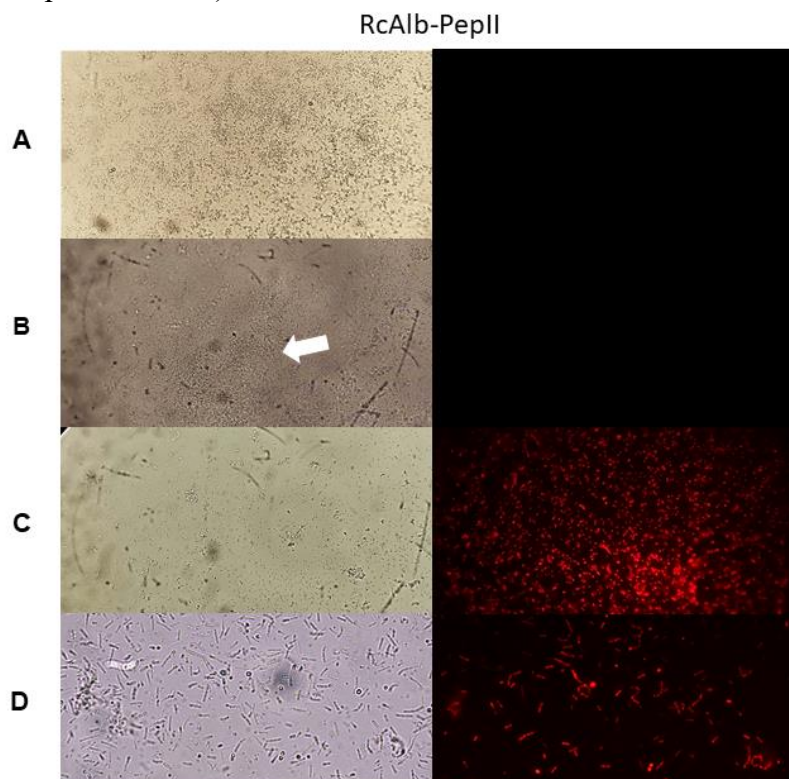
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 11 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação RcAlb-PepII + ciprofloxacina na degradação do biofilme de *S. aureus*. Campo claro à esquerda e campo escuro à direita. **A:** Lâmina controle tratada apenas com solução de DMSO 5% em NaCl 0,15 M; **B:** Lâmina tratada apenas com o antibiótico (15,6 µg/mL); **C:** Lâmina tratada apenas com o peptídeo (31,2 µg/mL); **D:** Lâmina tratada com a combinação antibiótico + peptídeo (15,6 µg/mL + 31,2 µg/mL, respectivamente)



Fonte: elaborado pelo autor.

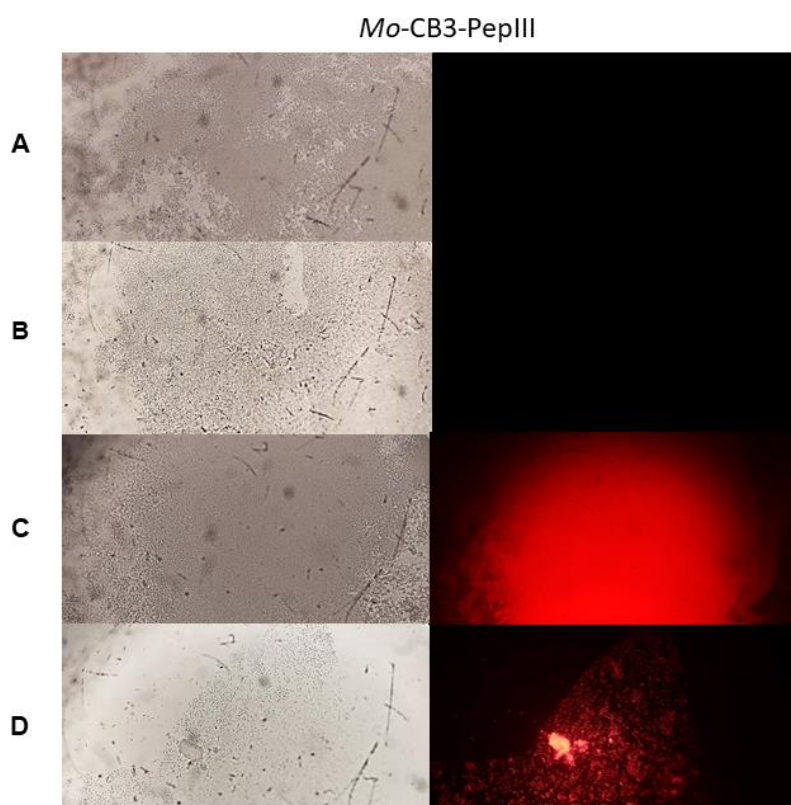
Figura 12 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação *RcAlb-PepII* + ciprofloxacina na degradação do biofilme de *S. aureus*. Campo claro à esquerda e campo escuro à direita. **A:** Lâmina controle tratada apenas com solução de DMSO 5% em NaCl 0,15 M; **B:** Lâmina tratada apenas com o antibiótico (125 µg/mL); **C:** Lâmina tratada apenas com o peptídeo (3,9 µg/mL); **D:** Lâmina tratada com a combinação antibiótico + peptídeo (125 µg/mL + 3,9 µg/mL, respectivamente)



Fonte: elaborado pelo autor.

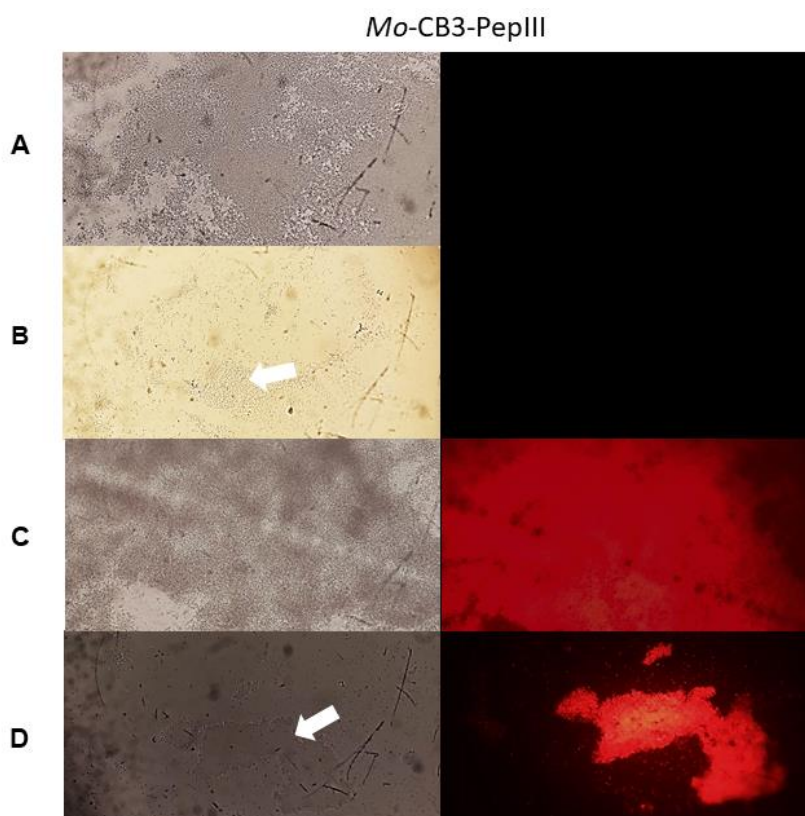
No caso da *Mo-CBP₃-PepIII*, ele foi o único peptídeo que apresentou inibição da formação do biofilme, o que pode ser visto nas figuras 13 e 14, onde também é possível ver que o biofilme na combinação peptídeo+antibiótico é reduzido em comparação com o biofilme na presença dos agentes separados.

Figura 13 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação *Mo*-CBP₃-PepIII + ciprofloxacina na inibição da formação do biofilme de *S. aureus*. Campo claro à esquerda e campo escuro à direita. **A:** Lâmina controle tratada apenas com solução de DMSO 5% em NaCl 0,15 M; **B:** Lâmina tratada apenas com o antibiótico (3,9 µg/mL); **C:** Lâmina tratada apenas com o peptídeo (125 µg/mL); **D:** Lâmina tratada com a combinação antibiótico + peptídeo (3,9 µg/mL + 125 µg/mL, respectivamente)



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 14 - Microscopia de fluorescência mostrando os efeitos da combinação *Mo*-CBP₃-PepIII + ciprofloxacina na inibição da formação do biofilme de *S. aureus*. Campo claro à esquerda e campo escuro à direita. **A:** Lâmina controle tratada apenas com solução de DMSO 5% em NaCl 0,15 M; **B:** Lâmina tratada apenas com o antibiótico (7,8 µg/mL); **C:** Lâmina tratada apenas com o peptídeo (62,5 µg/mL); **D:** Lâmina tratada com a combinação antibiótico + peptídeo (7,8 µg/mL + 62,5 µg/mL, respectivamente)



Fonte: elaborado pelo autor.

O uso do iodeto de propídio na análise de microscopia nos ajuda a entender qual o mecanismo de ação do peptídeo testado. Esse fluoróforo funciona de modo a emitir fluorescência vermelha quando ligado às moléculas de DNA. Porém, esse fluoróforo não é capaz de atravessar a membrana de células saudáveis, apenas quando há alguma mudança na sua permeabilidade (ex. formação de poros), o que o torna muito interessante para uso em análises de mecanismo de ação de moléculas antimicrobianas, (RAJA et al., 2011).

Os mecanismos de ação dos PAMs em relação à atividade antibiofilme, como já foi citado anteriormente, podem ser divididos em cinco mecanismos principais: (1) ruptura ou degradação do potencial de membrana de células presente no biofilme; (2) interrupção do

sistema de sinalização das células bacterianas; (3) degradação da matriz do biofilme e de polissacarídeos; (4) inibição do sistema de alarmas para evitar a resposta bacteriana ao estresse; (5) e regulação para baixa expressão de genes responsáveis pela formação de biofilme (YASIR; WILLCOX; DUTTA, 2018). As análises de mecanismo de ação nos fazem acreditar que a atividade antibiofilme, inibição da formação e degradação do biofilme, dos peptídeos vem da capacidade dos mesmos de alterar a permeabilidade da membrana bacteriana, fazendo com que o fármaco adentre ao interior da célula bacteriana de maneira mais fácil, e assim tendo acesso ao seu alvo intracelular, o que também poderia explicar o aumento de atividade quando combinando as duas moléculas.

Os resultados obtidos nas análises de microscopia corroboram os resultados obtidos no ensaio antibiofilme, e também reforçam a hipótese do seu mecanismo de sinergismo com a ciprofloxacina, o qual recebe acesso ao seu alvo intracelular, a enzima DNA-girase, graças à alteração da permeabilidade da membrana dessas células. Além disso, esses resultados reforçam a possibilidade do uso desses quatro peptídeos (*Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepIII, *Rc*Alb-PepI e *Rc*Alb-PepII) como adjuvantes em formulações de antibióticos, assim como também reduzir a sua dosagem, visto que não são tóxicos ao ser humano (DIAS et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2019).

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho revelou o efeito de oito peptídeos antimicrobianos sintéticos contra o biofilme de *S. aureus*, em combinação com o antibiótico ciprofloxacina, para observar um possível efeito sinérgico entre as duas moléculas, e compreender seu mecanismo de ação. Os resultados obtidos revelaram o sinergismo entre as duas moléculas em certas combinações, o que veio a reduzir a quantidade necessária de antibiótico e de peptídeo necessárias para a obtenção da atividade antibiofilme. O ensaio antibiofilme revelou que quatro dos oito peptídeos testados apresentam efeito sinérgico, quando combinados com o antibiótico ciprofloxacina, na inibição da formação, e na degradação do biofilme de *S. aureus* já formado. As análises dos mecanismos de ação mostraram efeito sobre a alteração da permeabilidade da membrana celular, e corroboram com os resultados do ensaio antibiofilme, mostrando que o mecanismo de ação dos peptídeos auxilia no combate à resistência bacteriana promovida pelo biofilme. Os dados obtidos dão suporte ao uso desses peptídeos como possíveis adjuvantes. Para tal, faz-se necessário o avanço dos estudos para as próximas etapas, como ensaios *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, A. et al. Antibiotic Resistant Superbugs: Assessment of the Interrelationship of Occurrence in Clinical Settings and Environmental Niches. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 29, 27 dez. 2016.
- ALDRED, K. J.; KERNS, R. J.; OSHEROFF, N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. **Biochemistry**, v. 53, n. 10, p. 1565–1574, 18 mar. 2014.
- ARCHER, N. K. et al. Staphylococcus aureus biofilms. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445–459, 27 set. 2011.
- BAHAR, A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, 28 nov. 2013.
- BATISTA, A. B. et al. New Insights into the Structure and Mode of Action of Mo-CBP3, an Antifungal Chitin-Binding Protein of Moringa oleifera Seeds. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e111427, 27 out. 2014.
- BOTO, A.; PÉREZ DE LA LASTRA, J.; GONZÁLEZ, C. The Road from Host-Defense Peptides to a New Generation of Antimicrobial Drugs. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 311, 1 fev. 2018.
- BROUGHTON, C. E. et al. Beyond the Discovery Void: New Targets for Antibacterial Compounds. **Science Progress**, v. 99, n. 2, p. 153–182, 2 jun. 2016.
- CAPUTO, G. M. Infections due to Penicillin-Resistant Pneumococci. **Archives of Internal Medicine**, v. 153, n. 11, p. 1301, 14 jun. 1993.
- CHOI, J. et al. Practical implications of erythromycin resistance gene diversity on surveillance and monitoring of resistance. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, n. 4, 1 abr. 2018.
- DIAS, L. P. et al. RcAlb-PepII, a synthetic small peptide bioinspired in the 2S albumin from the seed cake of Ricinus communis, is a potent antimicrobial agent against Klebsiella pneumoniae and Candida parapsilosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1862, n. 2, p. 183092, fev. 2020.
- DUAN, H. et al. Synergistic effect and antibiofilm activity of an antimicrobial peptide with traditional antibiotics against multi-drug resistant bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 158, p. 105056, set. 2021.
- EGOROV, A. M.; ULYASHOVA, M. M.; RUBTSOVA, M. Y. Bacterial Enzymes and Antibiotic Resistance. **Acta Naturae**, v. 10, n. 4, p. 33–48, 15 dez. 2018.
- GHOSH, C.; HALDAR, J. Membrane-Active Small Molecules: Designs Inspired by Antimicrobial Peptides. **ChemMedChem**, v. 10, n. 10, p. 1606–1624, out. 2015.
- GIFONI, J. M. et al. A novel chitin-binding protein from Moringa oleifera seed with potential for plant disease control. **Biopolymers**, v. 98, n. 4, p. 406–415, 2012.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HØIBY, N. et al. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Science**, v. 3, n. 2, p. 55–65, abr. 2011.

HOLLMANN, A. et al. Antimicrobial Peptides: Interaction with Model and Biological Membranes and Synergism with Chemical Antibiotics. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, 5 jun. 2018.

KANG, H.-K. et al. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1–12, 30 jan. 2017.

KOPPEN, B. C. et al. Synergistic microbicidal effect of cationic antimicrobial peptides and teicoplanin against planktonic and biofilm-encased *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 2, p. 143–151, fev. 2019.

KOTEVA, K. et al. Rox, a Rifamycin Resistance Enzyme with an Unprecedented Mechanism of Action. **Cell Chemical Biology**, v. 25, n. 4, p. 403–412.e5, abr. 2018.

KUNDU, R. Cationic Amphiphilic Peptides: Synthetic Antimicrobial Agents Inspired by Nature. **ChemMedChem**, v. 15, n. 20, p. 1887–1896, 19 out. 2020.

LI, J.; FERNÁNDEZ-MILLÁN, P.; BOIX, E. Synergism between Host Defence Peptides and Antibiotics Against Bacterial Infections. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 14, p. 1238–1263, 11 jun. 2020.

LIMA, P. G. et al. Anticandidal activity of synthetic peptides: Mechanism of action revealed by scanning electron and fluorescence microscopies and synergism effect with nystatin. **Journal of Peptide Science**, v. 26, n. 6, 18 jun. 2020.

LIMA, P. G. et al. Synthetic antimicrobial peptides control *Penicillium digitatum* infection in orange fruits. **Food Research International**, v. 147, n. February, 2021a.

LIMA, P. G. et al. Synthetic peptides against *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum*: Mechanisms of action and efficiency compared to griseofulvin and itraconazole. **Life Sciences**, v. 265, n. September 2020, p. 118803, 2021b.

LIMA, P. G. et al. Synthetic antimicrobial peptides: Characteristics, design, and potential as alternative molecules to overcome microbial resistance. **Life Sciences**, v. 278, p. 119647, ago. 2021c.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1265–1273, 1 maio 2003.

MA, F. et al. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. **Biosafety and Health**, v. 3, n. 1, p. 32–38, fev. 2021.

MATSINGOS, C. et al. Synthesis, microbiological evaluation and structure activity relationship analysis of linezolid analogues with different C5-acylamino substituents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 116397, nov. 2021.

MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental organism. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 3, p. 365–376, maio 2017.

NAINU, F. et al. Pharmaceutical Approaches on Antimicrobial Resistance: Prospects and Challenges. **Antibiotics**, v. 10, n. 8, p. 981, 14 ago. 2021.

NETO, J. X. S. et al. A Chitin-binding Protein Purified from Moringa oleifera Seeds Presents Anticandidal Activity by Increasing Cell Membrane Permeability and Reactive Oxygen Species Production. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 6 jun. 2017.

OLIVEIRA, J. T. A. et al. Mo-CBP3-PepI, Mo-CBP3-PepII, and Mo-CBP3-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability. **Biochimie**, v. 157, p. 10–21, fev. 2019.

PAGÈS, J.-M.; JAMES, C. E.; WINTERHALTER, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 893–903, 10 dez. 2008.

PANTOSTI, A.; SANCHINI, A.; MONACO, M. Mechanisms of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. **Future Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 323–334, jun. 2007.

PENCHOVSKY, R.; TRAYKOVSKA, M. Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do? **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 6, p. 631–650, 3 jun. 2015.

RAHEEM, N.; STRAUS, S. K. Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 12 dez. 2019.

RAJA, A. F. et al. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of acetyl-11-keto- β -boswellic acid from Boswellia serrata. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 54, 16 dez. 2011.

SANTOS, A. L. DOS et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413–423, dez. 2007.

SANTOS, N. DE Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 13, n. spe, p. 64–70, 2004.

SEFTON, A. M. Mechanisms of Antimicrobial Resistance. **Drugs**, v. 62, n. 4, p. 557–566, 2002.

SEGEV-ZARKO, L. et al. Mechanisms of biofilm inhibition and degradation by antimicrobial peptides. **Biochemical Journal**, v. 468, n. 2, p. 259–270, 1 jun. 2015.

SEYFI, R. et al. Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 1451–1463, 23

set. 2020.

SHARIATI, A. et al. The global prevalence of Daptomycin, Tigecycline, Quinupristin/Dalfopristin, and Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci strains: a systematic review and meta-analysis. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 9, n. 1, p. 56, 22 dez. 2020.

SKÖLD, O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. **Veterinary Research**, v. 32, n. 3/4, p. 261–273, maio 2001.

SOUZA, P. F. N. et al. A 2S Albumin from the Seed Cake of *Ricinus communis* Inhibits Trypsin and Has Strong Antibacterial Activity against Human Pathogenic Bacteria. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 10, p. 2423–2431, 28 out. 2016.

SOUZA, P. F. N. et al. Synthetic antimicrobial peptides: From choice of the best sequences to action mechanisms. **Biochimie**, v. 175, p. 132–145, ago. 2020a.

SOUZA, P. F. N. et al. Antidermatophytic activity of synthetic peptides: Action mechanisms and clinical application as adjuvants to enhance the activity and decrease the toxicity of Griseofulvin. **Mycoses**, v. 63, n. 9, p. 979–992, 7 set. 2020b.

SUN, S.; SELMER, M.; ANDERSSON, D. I. Resistance to β -Lactam Antibiotics Conferred by Point Mutations in Penicillin-Binding Proteins PBP3, PBP4 and PBP6 in *Salmonella enterica*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e97202, 8 maio 2014.

TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, p. S3–S10, jun. 2006.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. **Salud Pública de México**, v. 47, n. 5, out. 2005.

WEBBER, M. A. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 9–11, 1 jan. 2003.

YAN, Y. et al. Advances of peptides for antibacterial applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 202, p. 111682, jun. 2021.

ZHANG, L.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Current Biology**, v. 26, n. 1, p. R14–R19, jan. 2016.

ANEXO A – ARTIGO CIENTÍFICO 1

Artigo publicado na revista *Life Sciences* – Fator de impacto: 5.037

(<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118803>)

Life Sciences 265 (2021) 118803



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

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



Synthetic peptides against *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum*: Mechanisms of action and efficiency compared to griseofulvin and itraconazole

Patrícia G. Lima, Pedro F.N. Souza^{*}, Cleverson D.T. Freitas, Leandro P. Bezerra, Nilton A. S. Neto, Ayrles F.B. Silva, Jose T.A. Oliveira, Daniele O.B. Sousa^{*}

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará CEP 60.440-554, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Synthetic antifungal peptides
Dermatophytes
Synthetic peptides
Griseofulvin
Itraconazole

ABSTRACT

Aims: According to the WHO, 20–25% of people worldwide are affected by skin infections caused by dermatophytes, such as those of the *Trichophyton* genus. Additionally, several dermatophytes have developed resistance to drugs such as griseofulvin and itraconazole. This study tested 2S albumins-derived antimicrobial peptides (AMPs) as alternative antidermatophytic molecules.

Main methods: Membrane pore formation assays, tests to detect overproduction of ROS, scanning electron microscopy (SEM) and fluorescence microscopy (FM) were carried out to provide insight into the mechanisms of antidermatophytic action.

Key findings: All AMPs (at 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) tested reduced the mycelial growth of *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* by up to 95%. In contrast, using a concentration 20-fold higher, griseofulvin only inhibited *T. mentagrophytes* by 35%, while itraconazole was not active against both dermatophytes. Scanning electron and fluorescence microscopies revealed that the six AMPs caused severe damage to hyphal morphology by inducing cell wall rupture, hyphal content leakage, and death. Peptides also induced membrane pore formation and oxidative stress by overproduction of ROS. Based on the stronger activity of peptides than the commercial drugs and the mechanism of action, all six peptides have the potential to be either employed as models to develop new antidermatophytic drugs or as adjuvants to existing ones.

Significance: The synthetic peptides are more efficient than conventional drug to treat infection caused by dermatophytes being potential molecules to develop new drugs.

1. Introduction

According to the World Health Organization, around 20–25% of people worldwide are affected by skin infections caused by dermatophytes. During infection, the fungus colonizes keratinized tissues and feeds on the proteins present in the skin, hair and nails [1]. In immunocompromised patients, these microorganisms deeply penetrate the skin, leading to severe clinical conditions [2]. The main etiological agents of dermatophytosis belong to the genera *Microsporum*, *Epidermophyton* and *Trichophyton*, whose drug resistance is a threat to public health, attracting the attention of the scientific community.

Currently, the emergence of drug-resistant microorganisms is still rising, due to overuse or misuse of medicines, causing selection of strains

less affected by commercial antifungals and making it harder to treat those infections [1]. That is the case of drugs terbinafine, ketoconazole, itraconazole, and griseofulvin, which are still widely used in the treatment of dermatophytosis even though they have weak activity due to resistance [1,3]. Thus, it is necessary to seek alternative molecules to combat these microorganisms, to support the development of more active and selective drugs. In this respect, synthetic antimicrobial peptides (SAMPs) are strong candidates to fight these pathogens [4]. SAMPs share characteristics present in natural antimicrobial peptides, such as low molecular weight (600–1200 Da), high hydrophobic ratio (40–60%), positive net charge, α -helix structure, hydrophobic moment, and amphipathicity [5].

Recently, our research has designed six synthetic peptides derived

Fonte: Lima et al. (2021).

ANEXO B – ARTIGO CIENTÍFICO 2

Artigo publicado na revista *Food Research International* – Fator de impacto: 6.475

(<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110582>)

Food Research International 147 (2021) 110582



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

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



Synthetic antimicrobial peptides control *Penicillium digitatum* infection in orange fruits

Patrícia G. Lima^a, Cleverson D.T. Freitas^a, Jose T.A. Oliveira^a, Nilton A.S. Neto^a, Jackson L. Amaral^{a,b}, Ayrlles F.B. Silva^{a,b}, Jeanlex S. Sousa^b, Octávio L. Franco^{c,d}, Pedro F. N. Souza^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará CEP 60.440-554, Brazil

^b Department of Physics, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^c S-Inova Biotech, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande 79117900, Brazil

^d Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília, Brasília 70790160, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Antimicrobial Peptides (AMP)
Atomic Force Microscopy (AFM)
Food spoilage
Food preservatives
Synthetic peptides

ABSTRACT

Fungal contamination is among the main reasons for food spoilage, affecting food safety and the economy. Among fungi, *Penicillium digitatum* is a major agent of this problem. Here, the *in vitro* activity of eight synthetic antimicrobial peptides was assessed against *P. digitatum*, and their action mechanisms were evaluated. All peptides were able to inhibit fungal growth. Furthermore, atomic force and fluorescence microscopies revealed that all peptides targeted the fungal membrane leading to pore formation, loss of internal content, and death. The induction of high levels of reactive oxygen species (ROS) was also a mechanism employed by some peptides. Interestingly, only three peptides (PepGAT, PepKAA, and Mo-CBP₃-PepI) effectively control *P. digitatum* colonization in orange fruits, at a concentration (50 µg mL⁻¹) 20-fold lower than the commercial food preservative (sodium propionate). Altogether, PepGAT, PepKAA, and Mo-CBP₃-PepI showed high biotechnological potential as new food preservatives to control food infection by *P. digitatum*.

1. Introduction

Food spoilage is a problem caused by microorganisms that can result in serious risks to human health, besides leading to economic losses (Thery, O'Callaghan, O'Brien, & Arendt, 2018). Foodborne diseases are a significant public health concern worldwide, affecting 33 million people each year and causing 420,000 deaths (WHO, 2015). Fungi are among the main agents responsible for these issues, because they can produce mycotoxins that cause damage to the liver, nervous system, immune system, and fertility (Thery, Lynch, & Arendt, 2019). Some of the most common mycotoxins are those produced by *Penicillium* species (Nguyen, Haney, & Vogel, 2011). These microorganisms can also severely affect crop production (Thery et al., 2018).

Fruits are essential foods since they are sources of nutrients for humans and animals. Around 45% of fruits harvested worldwide are wasted every year because of spoilage caused by fungal contaminations (Snyder & Worobo, 2018). *Penicillium* spp. are among the most common

fungi isolated from cereals, but they can also contaminate fruits, grains, and nuts, as well as many processed products (Nguyen et al., 2011). *P. digitatum* is a necrotrophic fungus and causative agent of green mold, responsible for the citrus decay. On citrus, through wounds on the surface of the fruit, spores of *P. digitatum* germinate and grow right straight the contact with the damaged tissue completing its growth cycle up to two days leading to citrus soft rot and thus green mold (Wang et al., 2015; Yang et al., 2019). Moreover, *P. digitatum* can be harmful to humans and animals due to the production of a mycotoxin, citrinin, which is potentially nephrotoxic, teratogenic, and carcinogenic (Arai & Hibino, 1983).

Orange is one of the most important fruit crops worldwide, especially in subtropical and tropical regions, because it is an excellent source of nutrients for human health (Liu, Heying, & Tanumihardjo, 2012). Throughout the entire cultivation process, which covers planting, collecting, storing, and marketing, the fruit can be affected by many biotic stresses, resulting in spoilage and then risks to food safety. Altogether,

Fonte: Lima et al. (2021).

ANEXO C – ARTIGO CIENTÍFICO 3

Artigo publicado na revista *Biochimie* – Fator de impacto: 4.079

(<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.016>)

Biochimie 175 (2020) 132–145



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

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



Synthetic antimicrobial peptides: From choice of the best sequences to action mechanisms



Pedro F.N. Souza^{a,*}, Lidyane S.M. Marques^a, Jose T.A. Oliveira^a, Patrícia G. Lima^a, Lucas P. Dias^a, Nilton A.S. Neto^a, Francisco E.S. Lopes^a, Jeanlex S. Sousa^b, Ayrles F.B. Silva^a, Rômulo F. Caneiro^c, Jose L.S. Lopes^d, Márcio V. Ramos^a, Cleverson D.T. Freitas^{a,**}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, CEP 60.440-554, Brazil

^b Department of Physics, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^c Department of Fishery Engineering, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^d Institute of Physics, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 January 2020

Received in revised form

16 May 2020

Accepted 30 May 2020

Available online 11 June 2020

Keywords:

Antibiofilm activity

Candida

Dermatophyte

Peptide design

SAMP

ABSTRACT

The emergence of antibiotic-resistant microbes has stimulated research worldwide seeking new biologically active molecules. In this respect, synthetic antimicrobial peptides (SAMPs) have been suggested to overcome this problem. Although there are some online servers that provide putative SAMPs from protein sequences, the choice of the best peptide sequences for further analysis is still difficult. Therefore, the goal of this paper is not to launch a new tool but to provide a friendly workflow to characterize and predict potential SAMPs by employing existing tools. Using this proposed workflow, two peptides (PepGAT and PepKAA) were obtained and extensively characterized. These peptides damaged microbial membranes and cell walls, and induced overproduction of reactive oxygen species (ROS). Both peptides were found to assume random coil secondary structure in aqueous solution, organic solvent, and upon binding to negatively charged lipid systems. Peptides were also able to degrade formed biofilms but not to prevent biofilm formation. PepGAT was not resistant to proteolysis, whereas PepKAA was resistant to pepsin but not to pancreatin. Furthermore, both presented no hemolytic activity against red blood cells, even at a 10-fold higher concentration than the antimicrobial concentration. The pipeline proposed here is an easy way to design new SAMPs for application as alternatives to develop new drugs against human pathogenic microorganisms.

© 2020 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

The 1940s was an important period for microbiology and drug development due to the release of the first antibiotic (penicillin) for clinical use. During the ensuing 50 years, microbe-mediated infectious diseases were under control in most countries, mainly

developed ones. However, as a consequence of overuse and misuse of drugs, the number of resistant microbes has increased, making some conventional drugs ineffective [1]. Nowadays, there are many bacteria and fungi highly resistant to traditional drugs, such as erythromycin, tetracycline, chloramphenicol, fluconazole, itraconazole, and echinocandins. Thus, the continued misuse of antibiotics as the first choice to manage microbial infections is inappropriate and increases the risk of producing multiple microbial resistance to these drugs [2,3].

To face that global health threat, synthetic antimicrobial peptides (SAMPs) have emerged due to various advantages, such as potent activity, low production cost and no or very low toxicity [4,5]. Thus, many research groups have been seeking new SAMPs [6–8]. As a consequence, some free online servers have also been

* Corresponding author. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Laboratory of Plant Defense Proteins, Av. Mister Hull, P.O. Box: 60451 Fortaleza, CE, Brazil.

** Corresponding author. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Laboratory of Plant Proteases, Fortaleza, CE, Brazil.

E-mail addresses: pedrofilhobio@gmail.com (P.F.N. Souza), cleversondiniz@ufc.br (C.D.T. Freitas).

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.016>

0300-9084/© 2020 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

ANEXO D – ARTIGO CIENTÍFICO 4

Artigo publicado na revista *Mycoses* – Fator de impacto: 4.377

(<https://doi.org/10.1111/myc.13138>)

Received: 25 February 2020 | Revised: 25 May 2020 | Accepted: 29 June 2020

DOI: 10.1111/myc.13138

ORIGINAL ARTICLE



WILEY

Antidermatophytic activity of synthetic peptides: Action mechanisms and clinical application as adjuvants to enhance the activity and decrease the toxicity of Griseofulvin

Pedro F. N. Souza¹ | Patrícia G. Lima¹ | Cleverson D. T. Freitas¹ |
Daniele O. B. Sousa¹ | Nilton A. S. Neto¹ | Lucas P. Dias¹ | Ilka M. Vasconcelos¹ |
Larissa B. N. Freitas¹ | Rafael G. G. Silva² | Jeanlex S. Sousa³ | Ayrles F. B. Silva¹ |
Jose T. A. Oliveira¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

²Department of Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

³Department of Physics, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

Correspondence

Pedro F. N. Souza, Biochemistry and Molecular Biology Department, Federal University of Ceará, CE, Brazil. Laboratory of Plant Defense Proteins, Av. Mister Hull, Caixa Postal 60451 Fortaleza, CE, Brazil. Email: pedrofilhobio@gmail.com

Funding information

This work was supported by grants from the following Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (process numbers 308107/2013-6 and 306202/2017-4); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia de Bioinspiração (Process Number: 465507/2014-0) and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

Abstract

Background: Dermatophytes belonging to the *Trichophyton* genus are important human pathogens, but they have developed resistance to griseofulvin, the most common antifungal drug used to treat dermatophytosis.

Objective: This study was aimed to evaluate the antidermatophytic activity of synthetic peptides, as well as mechanisms of action and synergistic effect with griseofulvin.

Methods: Scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM) and fluorescence microscopy (FM) were employed to understand the activity and the mechanism of action of peptides.

Results: Here we report that synthetic peptides at 50 µg/mL, a concentration 20-fold lower than griseofulvin, reduced the microconidia viability of *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* by 100%, whereas griseofulvin decreased their viability by only 50% and 0%, respectively. The action mechanism of peptides involved cell wall damage, membrane pore formation and loss of cytoplasmic content. Peptides also induced overproduction of reactive oxygen species (ROS) and enhanced the activity of griseofulvin 10-fold against both fungi, suggesting synergistic effects, and eliminated the toxicity of this drug to human erythrocytes. Docking analysis revealed ionic and hydrophobic interactions between peptides and griseofulvin, which may explain the decline of griseofulvin toxicity when mixed with peptides.

Conclusion: Therefore, our results strongly suggest six peptides with high potential to be employed alone as new drugs or as adjuvants to enhance the activity and decrease the toxicity of griseofulvin.

KEYWORDS

action mechanisms, antifungal activity, clinical application, dermatophytosis, Griseofulvin®, synergism, synthetic peptides, *Trichophyton*