

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Tese

**Peptídeos antimicrobianos sintéticos contra *Enterococcus* resistente à
vancomicina**

Patrícia Gomes Lima

Pelotas, 2024

Patrícia Gomes Lima

**Peptídeos antimicrobianos sintéticos contra *Enterococcus* resistente à
vancomicina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia).

Orientadora: Profa. Dra. Daiane Drawanz Hartwig

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

L732p Lima, Patrícia Gomes

Peptídeos antimicrobianos sintéticos contra *Enterococcus* resistente à vancomicina [recurso eletrônico] / Patrícia Gomes Lima ; Daiane Drawanz Hartwig, orientadora. — Pelotas, 2024.
116 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. PAMs. 2. Biofilme bacteriano. 3. Resistência antimicrobiana. 4. VRE. I. Hartwig, Daiane Drawanz, orient. II. Título.

CDD 615.329

Patrícia Gomes Lima

Peptídeos antimicrobianos sintéticos contra *Enterococcus* resistente à
vancomicina

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 13/12/2024

Banca examinadora:

Profa. Dra. Daiane Drawanz Hartwig (Orientadora) Doutora em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia) pela Universidade Federal de Pelotas.

Profa. Dra. Sibele Borsuk Doutora em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia) pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Clóvis Moreira Junior Doutor em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia) pela Universidade Federal de Pelotas.

Dra. Natasha Rodrigues de Oliveira Doutora em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia) pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr. Amilton Clair Pinto Seixas Neto Doutor em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia) pela Universidade Federal de Pelotas.

Agradecimentos

À minha orientadora Profa. Dra. Daiane Drawanz Hartwig por ter me acompanhado durante o meu doutorado e estar sempre disposto a compartilhar os seus conhecimentos, conselhos e ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite para contribuir com este trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios (LaBBio), Laboratório de Bioinformática e Proteômica (BIOPRO) e Laboratório de Imunologia Aplicada, pela ajuda e infraestrutura.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), especialmente ao Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza, pela continuidade da parceria na pesquisa científica.

À Universidade Federal de Pelotas (UFPEl), ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico.

A todos que de alguma forma contribuíram com a minha formação acadêmica e execução deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Resumo

LIMA, Patrícia Gomes. **Peptídeos antimicrobianos sintéticos contra *Enterococcus* resistente à vancomicina**. 2024. 116f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Bactérias do gênero *Enterococcus* são uma das principais causas de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e apresentam um amplo espectro de resistência a antibióticos, sendo *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) um dos mais relevantes. Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas que fazem parte do sistema imune inato, presentes em todos os seres vivos, capazes de participar na defesa contra infecções microbianas. Os PAMs sintéticos surgem como uma opção promissora para superar a resistência a antimicrobianos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antibacteriano e antibiofilme de oito PAMs contra as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes à vancomicina, além de investigar seus mecanismos de ação e sua atividade em combinação com antibióticos convencionais. Assim, foram testados oito PAMs sintéticos, denominados *Mo*-CBP₃-Pepl, *Mo*-CBP₃-PepII, *Mo*-CBP₃-PepIII, *RcAlb*-Pepl, *RcAlb*-PepII, *RcAlb*-PepIII, PepGAT e PepKAA, quanto à atividade antibacteriana *in vitro* contra *E. faecalis* ATCC® 51299, *E. faecium* NCTC® 12202 e quatro isolados clínicos de VRE (Etf1, Etf4, Etf5 e Etf7). Os resultados mostraram que, isoladamente, os PAMs demonstraram de 20-48% de inibição do crescimento de *E. faecalis* ATCC® 51299, sendo o valor máximo alcançado pelo *Mo*-CBP₃-Pepl. Contudo, quando combinados com o antibiótico cloranfenicol, que apresentou inibição de 36% sozinho, a atividade aumentou para 55–76%. A maior atividade inibitória foi observada com a combinação de cloranfenicol com *RcAlb*-PepIII (76%) e PepKAA (70%), representando um incremento de 2 a 3 vezes em relação aos compostos isolados. Análises microscópicas demonstraram que o tratamento de células de *E. faecalis* ATCC® 51299 com a combinação de PAMs e cloranfenicol resultou em danos significativos à membrana bacteriana. No caso do biofilme de *E. faecalis* ATCC® 51299, a inibição máxima com os PAMs isolados foi de 22% (*Mo*-CBP₃-PepII), variando de 10-33% quando foram combinados com cloranfenicol. Nos testes com isolados de *E. faecium* VRE, a inibição máxima foi de 58%, obtida com *Mo*-CBP₃-PepII contra o isolado Etf5. Este isolado, que apresentou a maior resistência à vancomicina (máximo de 35% de inibição do crescimento), foi também o mais suscetível ao tratamento combinado de PAMs e vancomicina. A combinação de vancomicina com *Mo*-CBP₃-Pepl atingiu 64% de inibição, um aumento de 2 a 5 vezes em comparação à vancomicina isolada. Para *E. faecium*, a inibição máxima do biofilme foi de 33%, enquanto a degradação do biofilme alcançou 46% com o uso isolado dos PAMs. Esses resultados sugerem que os peptídeos avaliados têm potencial para o desenvolvimento de novos fármacos contra infecções enterocócicas causadas por cepas resistentes, tanto em uso isolado quanto em associação com antibióticos já existentes.

Palavras-chave: PAMs; biofilme bacteriano; resistência antimicrobiana; VRE.

Abstract

LIMA, Patrícia Gomes. **Synthetic antimicrobial peptides against vancomycin-resistant *Enterococcus***. 2024. 116f. Thesis (Doctorate) - Postgraduate Program in Biotechnology. Federal University of Pelotas, Pelotas.

Bacteria of the genus *Enterococcus* are among the main causes of healthcare-associated infections (HAIs) and exhibit a broad spectrum of antibiotic resistance, with vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) being one of the most significant. Antimicrobial peptides (AMPs) are molecules that are part of the innate immune system, present in all living beings, capable of participating in the defense against microbial infections. Synthetic antimicrobial peptides (AMPs) emerge as a promising option to overcome antimicrobial resistance. This study aimed to evaluate the antibacterial and antibiofilm effects of eight AMPs against vancomycin-resistant *E. faecalis* and *E. faecium*, as well as to investigate their mechanisms of action and activity in combination with conventional antibiotics. Eight synthetic AMPs, named *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, *Mo*-CBP₃-PepIII, *RcAlb*-PepI, *RcAlb*-PepII, *RcAlb*-PepIII, PepGAT, and PepKAA, were tested for their *in vitro* antibacterial activity against *E. faecalis* ATCC[®] 51299, *E. faecium* NCTC[®] 12202, and four clinical VRE isolates (Etf1, Etf4, Etf5, and Etf7). The results showed that, individually, the AMPs demonstrated 20–48% inhibition of *E. faecalis* ATCC[®] 51299 growth, with the highest value achieved by *Mo*-CBP₃-PepI. However, when combined with the antibiotic chloramphenicol, which alone showed 36% inhibition, the activity increased to 55–76%. The highest inhibitory activity was observed with the combination of chloramphenicol with *RcAlb*-PepIII (76%) and PepKAA (70%), representing a 2- to 3-fold increase compared to the compounds used alone. Microscopic analyses demonstrated that the treatment of *E. faecalis* ATCC[®] 51299 cells with the combination of AMPs and chloramphenicol caused significant damage to the bacterial membrane. Regarding the biofilm of *E. faecalis* ATCC[®] 51299, the maximum inhibition achieved with AMPs alone was 22% (*Mo*-CBP₃-PepII), ranging from 10–33% when combined with chloramphenicol. In tests with VRE isolates of *E. faecium*, the maximum inhibition was 58%, achieved with *Mo*-CBP₃-PepII against the Etf5 isolate. This isolate, which showed the highest resistance to vancomycin (maximum of 35% growth inhibition), was also the most susceptible to combined treatment with AMPs and vancomycin. The combination of vancomycin with *Mo*-CBP₃-PepI reached 64% inhibition, a 2- to 5-fold increase compared to vancomycin alone. For *E. faecium*, the maximum biofilm inhibition was 33%, while biofilm degradation reached 46% with the AMPs used alone. These findings suggest that the evaluated peptides have potential as candidates for the development of new drugs against enterococcal infections caused by resistant strains, either as standalone treatments or in combination with existing antibiotics.

Keywords: AMPs; bacterial biofilm; antimicrobial resistance; VRE.

Lista de Figuras

Figura 1 – Mecanismos de ação dos PAMs.	28
---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1 – PAMs X <i>Enterococcus</i>	29
--	----

Sumário

1 Introdução geral	12
2 Revisão da literatura	14
2.1 Antibióticos e resistência bacteriana	14
2.1.1 Contexto histórico da descoberta e uso de antibióticos	14
2.1.2 Antibióticos Cloranfenicol e Vancomicina	15
2.1.3 Resistência a antibióticos e sua relevância para a saúde pública	16
2.1.4 Grupo ESKAPE.....	17
2.2 Gênero <i>Enterococcus</i>	19
2.2.1 Importância e características	19
2.2.2 Patogenicidade	20
2.2.3 Fatores de virulência.....	22
2.2.4 Mecanismos de resistência a antibióticos	23
2.2.5 VRE	25
2.3 Peptídeos antimicrobianos (PAMs).....	27
2.3.1 Definição e características dos PAMs.....	27
2.3.2 Mecanismos de ação dos PAMs.....	28
2.3.3 PAMs como alternativa contra resistência a antimicrobianos	30
2.3.4 PAMs sintéticos inspirados nas proteínas <i>Mo</i> -CBP ₃ , <i>Rc</i> -2S-Alb e quitinase	31
2.4 Terapia medicamentosa combinada	32
3 Hipótese e objetivos	34
3.1 Hipótese.....	34
3.2 Objetivo Geral	34
3.3 Objetivos Específicos.....	34
4 CAPÍTULOS	35

4.1 Capítulo 1 – Artigo: Synthetic antimicrobial peptides: activity against vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecalis</i> and modulation of chloramphenicol antibacterial activity	35
4.2 Capítulo 2 – Patente de Invenção: PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA TRATAR INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>Enterococcus faecalis</i>	60
4.3 Capítulo 3 – Manuscrito: Synthetic antimicrobial peptides modulate the antibacterial activity of vancomycin against clinical isolates of Vancomycin-Resistant <i>Enterococcus faecium</i>	78
5 Conclusão geral	106
REFERÊNCIAS	107

1 Introdução geral

A resistência aos antimicrobianos é um grave problema de saúde pública e socioeconômico que afeta o mundo inteiro. Estima-se que a resistência aos antibióticos foi diretamente responsável por 1,27 milhões de mortes globalmente em 2019 e contribuiu para 4,95 milhões de mortes (ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2022). Além disso, previsões indicam que a crescente resistência aos antimicrobianos poderia causar até 10 milhões de mortes por ano até 2050 (O'NEILL, 2016). No que se refere às questões econômicas, o Banco Mundial estima que a resistência aos antimicrobianos possa resultar em custos adicionais de cuidados de saúde no valor de 1 bilhão de dólares até 2050, e em perdas do Produto Interno Bruto (PIB) de 1 bilhão a 3,4 bilhões de dólares por ano até 2030 (WORLD BANK, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023).

Nesse contexto, alguns patógenos causam grande preocupação, como os do gênero *Enterococcus*. Especificamente, são relevantes os *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE), que durante os últimos anos emergiram como uma das principais causas de infecções nosocomiais (GILMORE *et al.*, 2014). Assim, *E. faecalis* foi responsável por 3.420 mortes globais relacionadas à resistência à vancomicina e 30.200 mortes globais atribuíveis à resistência a 1 ou mais medicamentos. Em relação ao *E. faecium*, a contagem é de 14.300 mortes globais atribuíveis à resistência à vancomicina e 51.500 mortes globais atribuíveis à resistência a 1 ou mais medicamentos. Ambas as estimativas são relativas ao ano de 2019 (ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2022).

Adicionalmente, estudos epidemiológicos indicam que em comparação com pacientes não infectados, a infecção por VRE foi associada ao aumento da mortalidade, maior tempo de internação (3-4,6 dias a mais ou 1,4 vezes mais) e readmissão (2,9 vezes) (CHIANG *et al.*, 2016). Ademais, as infecções nosocomiais por VRE aumentam significativamente os custos hospitalares em comparação com as infecções por *Enterococcus* suscetível à vancomicina (1,4 vezes mais) (PUCHTER *et al.*, 2018).

Dado o grande risco que a resistência antimicrobiana representa, a Organização Mundial da Saúde (OMS) nomeou a resistência aos antibióticos como uma das principais ameaças de saúde pública do século XXI (WHO, 2014). Para

superar esta questão, esforços precisam ser feitos para propor opções viáveis, que podem ser alcançadas melhorando os antibióticos já existentes ou desenvolvendo novas moléculas antimicrobianas.

Atualmente, uma das alternativas mais promissoras no tratamento contra microrganismos resistentes são os peptídeos antimicrobianos (PAMs). Recentemente, oito peptídeos antimicrobianos sintéticos, racionalmente desenhados baseados em proteínas vegetais, demonstraram resultados promissores e com potencial para serem utilizados como tratamento antimicrobiano alternativo para substituir ou complementar os já existentes. São eles: *Mo*-CBP₃-Pepl, *Mo*-CBP₃-Pepll e *Mo*-CBP₃-Peplll (OLIVEIRA *et al.*, 2019); *Rc*Alb-Pepl, *Rc*Alb-Pepll e *Rc*Alb-Peplll (DIAS *et al.*, 2020); e PepGAT e PepKAA (SOUZA *et al.*, 2020). No entanto, mais estudos são necessários para acessar o potencial desses PAMs sintéticos contra bactérias patogênicas relevantes.

Nesta tese, investigamos o potencial antibacteriano e antibiofilme desses oito peptídeos antimicrobianos sintéticos contra as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes à vancomicina, além de investigar seus modos de ação e sua atividade em combinação com antibióticos convencionais. Assim, os resultados obtidos estão organizados como capítulos. O capítulo 1 consiste em um artigo científico intitulado *Synthetic antimicrobial peptides: activity against vancomycin-resistant Enterococcus faecalis and modulation of chloramphenicol antibacterial activity*, publicado na revista Journal of Applied Microbiology. O capítulo 2 consiste em pedido de depósito de patente referente aos resultados apresentados no capítulo 1. O capítulo 3 consiste em um manuscrito intitulado *Synthetic antimicrobial peptides modulate the antibacterial activity of vancomycin against clinical isolates of Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium*.

2 Revisão da literatura

2.1 Antibióticos e resistência bacteriana

2.1.1 Contexto histórico da descoberta e uso de antibióticos

A descoberta e introdução do uso de antibióticos constituíram um momento crucial na história da medicina, alterando a maneira como as doenças infecciosas eram tratadas e geridas (KATZ; BALTZ, 2016). Apesar dos antibióticos tais como os conhecemos hoje não serem tão antigos, as tentativas de combater infecções microbianas remonta há milênios (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). Somente em 1910 o primeiro agente antimicrobiano foi aprovado, denominado Salvarsan e desenvolvido pelo pesquisador Paul Ehrlich (NICOLAOU; RIGOL, 2017).

Já em 1928, a descoberta mais impactante da história da medicina foi feita. Alexander Fleming descobriu por acaso que uma colônia de *Staphylococcus aureus* não se proliferava em uma região contaminada por mofo. Este fungo, *Penicillium notatum*, produzia uma substância capaz de exterminar as bactérias (AMINOV, 2017; FLEMING, 1929). Com o início do seu uso terapêutico em 1942, esta substância, a penicilina, foi a primeira a possuir atividade antibacteriana reconhecida, abrindo caminho para a criação de novos medicamentos (VENTOLA, 2015).

Depois da descoberta da penicilina, a investigação sobre antibióticos progrediu rapidamente. O período conhecido como era dourada dos antibióticos, que se estendeu de 1940 a 1970, foi caracterizado pela descoberta de diversas outras moléculas antimicrobianas, tais como a cloranfenicol (1947), tetraciclina (1950), eritromicina (1953), vancomicina (1953) e gentamicina (1967) (NICOLAOU; RIGOL, 2017; VENTOLA, 2015). Assim, as mortes causadas por infecções bacterianas diminuíram consideravelmente, aumentando a expectativa de vida em diversas regiões do mundo (ADEDEJI, 2016).

2.1.2 Antibióticos Cloranfenicol e Vancomicina

O cloranfenicol, da categoria dos anfenicóis, foi isolado do *Streptomyces venezuelensis* por Davidson Gottlieb, no ano de 1947 (EHRLICH *et al.*, 1947). Geralmente é bacteriostático, mas pode ser bactericida em altas concentrações. É um antibiótico de amplo espectro usado contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e anaeróbicas (OONG; TADI, 2023). Seu mecanismo de ação consiste em se ligar de maneira reversível à subunidade 50S do ribossomo 70S, impedindo a síntese de proteínas e prevenindo diretamente a formação de proteínas bacterianas (BALBI, 2004; SERRANO, 2014).

A capacidade do cloranfenicol de atravessar facilmente a barreira hematoencefálica faz com que ele seja a droga preferida para tratar meningite bacteriana causada por *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenza*. Além disso, ele é especialmente relevante para pacientes alérgicos a β -lactâmicos ou para pacientes com outras infecções severas em que medicamentos alternativos são contraindicados ou ineficazes (OONG; TADI, 2023). Isso ocorre devido às reações adversas relacionadas ao uso do cloranfenicol, que se tornam frequentes quando administrados sistematicamente e de forma prolongada (OONG; TADI, 2023). Esses efeitos colaterais podem englobar problemas hematológicos como anemia aplástica, supressão da medula óssea, leucemia, neurotoxicidade e síndrome do bebê cinzento (AMINOV, 2017).

Em 1953, Edmund Kornfeld, um químico orgânico na Eli Lilly, descobriu a vancomicina produzida pela bactéria *Amycolatopsis orientalis*, obtida da amostra de solo proveniente de Bornéu. Esse antibiótico foi o primeiro descoberto na categoria de glicopeptídeos, antibióticos compostos de peptídeos cíclicos ou policíclicos glicosilados, sintetizados de forma não ribossômica (AMINOV, 2017). Sendo a vancomicina um glicopeptídeo tricíclico com um peso molecular de aproximadamente 1.500 Da (WILHELM, 1991).

Assim, o mecanismo de ação da vancomicina consiste em inibir a biossíntese da parede celular, afetando a formação do peptideoglicano em bactérias Gram-positivas (AMINOV, 2017). A vancomicina liga-se firmemente ao terminal D-alanina-D-alanina (D-Ala-D-Ala) na extremidade das cadeias peptídicas precursoras, prevenindo assim a transpeptidação e a transglicosilação, o que interrompe a

ligação cruzada da parede celular e leva à lise e morte celular (JAMES *et al.*, 2012). A vancomicina é bactericida contra a maioria dos organismos Gram-positivos, exceto enterococos (WILHELM, 1991).

Este medicamento não é o agente de primeira escolha, sendo prescrito para tratar infecções sérias provocadas por bactérias Gram-positivas, para tratamento contra microrganismos resistentes ou ainda para pacientes com alergia a penicilinas e cefalosporinas (PATEL; PREUSS; BERNICE, 2023). Portanto, a vancomicina é frequentemente usada em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) para tratar não somente infecções hospitalares e sepse, mas também para tratar casos de pneumonia, empiema, endocardite, osteomielite, abscessos de tecidos moles, entre outras condições (BRUNIERA *et al.*, 2015).

2.1.3 Resistência a antibióticos e sua relevância para a saúde pública

Ao passo que o emprego dos antibióticos foi revolucionário para a medicina, a sua utilização massiva desde a década de 1940 trouxe consigo consequências. A utilização imprópria desses fármacos resultou no surgimento de resistência bacteriana. Pode-se destacar entre essas práticas o uso excessivo de antibióticos, a falta de cumprimento do tratamento conforme o recomendado e a prescrição inadequada feita por profissionais da saúde (VENTOLA, 2015).

A resistência antimicrobiana é um fenômeno que pode ocorrer naturalmente devido às características intrínsecas do microrganismo, definida como resistência primária, ou ser adquirida, o que acontece por meio de mutações ou transferências de genes de resistência, denominada resistência secundária (NICOLAOU; RIGOL, 2017).

Um dos mecanismos de resistência bacteriana mais frequente é a alteração do fármaco por meio da ação de enzimas, tais como as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) e as β -lactamases (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010). Essas enzimas têm a capacidade de modificar os medicamentos, reduzindo sua afinidade pelo seu alvo ou os destruindo. Além disso, também pode ocorrer a modificação do sítio de ação do medicamento, através da introdução de mutações nos genes responsáveis pelo sítio de ligação, alterações enzimáticas no local de ligação, também reduzindo a afinidade pela molécula do medicamento (LAMBERT, 2005).

Em adição, pode haver a superexpressão do alvo da droga, aumentando a concentração necessária para que a droga seja efetiva (LIMA *et al.*, 2021).

Ademais, outra estratégia de resistência a antimicrobianos é a diminuição da concentração do medicamento no interior da célula bacteriana. Isso é alcançado através de mecanismos como a redução da permeabilidade da membrana celular e o uso de bombas de efluxo, que lançam o medicamento para fora da célula (DARBY *et al.*, 2022).

Por fim, as bactérias podem se organizar em estruturas denominadas biofilme, que também confere resistência a antimicrobianos (LIMA *et al.*, 2021). Nessas estruturas, várias células bacterianas se fixam a uma superfície, onde se recobrem com uma matriz polimérica extracelular contendo polissacarídeos, proteínas e DNA. Deste modo, as bactérias no interior dessa estrutura se tornam menos acessíveis para o contato com antibióticos, facilitando sua degradação por enzimas caso consigam penetrar no interior do biofilme (SINGH *et al.*, 2017). Além disso, é comum a presença de bactérias com o metabolismo reduzido na camada mais interna dos biofilmes, se tornando células persistentes (SINGH *et al.*, 2017).

Assim, apesar do desenvolvimento de resistência bacteriana ser um fenômeno natural, o uso excessivo e impróprio de antibióticos intensificou a pressão seletiva (MUTEEB *et al.*, 2023). Através de processos como mutações genéticas e permuta de material genético, as bactérias começaram a adquirir resistência aos antibióticos, um problema que vem se agravando desde a década de 1960. Infecções anteriormente controladas por antibióticos tornaram-se mais complexas de tratar, surgindo novas variedades de bactérias multirresistentes, como o grupo ESKAPE (HALL; MAH, 2017).

2.1.4 Grupo ESKAPE

O acrônimo “ESKAPE” se refere de forma coletiva a seis patógenos relevantes devido a sua crescente resistência a antibióticos e virulência, são eles: *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (ZHEN *et al.*, 2019). Os patógenos ESKAPE são responsáveis pela maioria das infecções nosocomiais e são capazes de “escapar” dos efeitos dos antibióticos comumente utilizados,

representando uma ameaça significativa à saúde pública (MA *et al.*, 2020; MULANI *et al.*, 2019).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) também incluiu recentemente os patógenos ESKAPE na lista de bactérias contra as quais novos antibióticos são urgentemente necessários. De acordo com a Lista de Patógenos Bacterianos Prioritários (BPPL) da OMS classificados como grupos críticos, altos e médios para pesquisa e desenvolvimento de medidas de saúde pública, *A. baumannii* está no grupo crítico, enquanto *E. faecium*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* estão no grupo de alta prioridade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024).

Os patógenos ESKAPE estão ligados a um elevado risco de mortalidade e elevação dos gastos econômicos (ZHEN *et al.*, 2019). De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos (EUA), microrganismos resistentes a antibióticos são responsáveis por mais de dois milhões de infecções anualmente no país, causando pelo menos 23.000 óbitos (CDC, 2013). Globalmente, prevê-se um crescimento na resistência antimicrobiana até 2050, com a estimativa de mortes de aproximadamente 10 milhões de pessoas, variando entre os diversos continentes (MA *et al.*, 2020; O'NEILL J., 2016).

Apesar do uso, desenvolvimento e comercialização de novos antibióticos serem essenciais para o tratamento eficaz de infecções por patógenos resistentes, eles vêm desacelerando desde o final da década de 1990 (MULANI *et al.*, 2019). A *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA aprovou 11 novos tratamentos antimicrobianos entre 2017 e 2019, enquanto a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) aprovou somente quatro (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

A avaliação dos antibióticos recomendados nas diretrizes do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) mostrou que muitos dos antibióticos indicados para o tratamento contra patógenos do grupo ESKAPE foram descartados, com a inclusão de poucas combinações de antibióticos/antibióticos (MULANI *et al.*, 2019). Evidenciando a necessidade do desenvolvimento de novos tratamentos contra essas infecções.

2.2 Gênero *Enterococcus*

2.2.1 Importância e características

O gênero *Enterococcus* consiste em espécies que colonizam os tratos gastrointestinais (GI) humanos e animais de forma ubíqua (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019). Além disso, as bactérias desse gênero também são encontradas em ambientes (como esgoto, solo e água), plantas e diferentes tipos de alimentos (incluindo produtos lácteos, vegetais fermentados, carne, peixe e frutos do mar) (CATTOIR, 2022; RAMOS *et al.*, 2020).

As principais características dos *Enterococcus* incluem serem células Gram-positivas, não formadoras de esporos, esféricas ou ovóides dispostas em pares ou cadeias, geralmente negativas para reação de catalase (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019; LEBRETON; WILLEMS; GILMORE, 2014). Além disso, essas bactérias são anaeróbias facultativas e quimioheterotróficas fermentativas obrigatórias, sendo o ácido láctico o produto final predominante da fermentação de carboidratos (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019; LEBRETON; WILLEMS; GILMORE, 2014).

Somente a partir de 1980 que os *Enterococcus* passaram a formar uma entidade taxonômica única, já que antes eles faziam parte do gênero *Streptococcus* (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019). Atualmente, mais de 50 espécies de *Enterococcus* foram descritas, sendo *E. faecium* e *E. faecalis* as mais predominantes no trato gastrointestinal humano (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019). Outras espécies do gênero incluem *E. avium*, *E. caccae*, *E. casseliflavus*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae* e *E. raffinosus*, comumente achados em animais e vegetais (SAID; TIRTHANI; LESHIO, 2024).

Como dito anteriormente, os *Enterococcus* são capazes de habitar uma variedade de ambientes, sendo um dos principais motivos dessa ampla distribuição a sua resiliência (RAMOS *et al.*, 2020). Assim, essas bactérias são capazes de sobreviverem condições de estresse ambiental, ampla faixa de pH e temperaturas (entre 10 °C e 45 °C), bem como de estresse osmótico, como alta concentração de NaCl (LEBRETON; WILLEMS; GILMORE, 2014).

Em vista disso, essas características seriam positivas para a aplicação dessas bactérias como fermentadoras na indústria alimentícia. No entanto, também

contribuem com a dificuldade de controlar e eliminar a disseminação de *Enterococcus* em ambientes hospitalares (RAMOS *et al.*, 2020).

2.2.2 Patogenicidade

Desde o final da década 1970 é notado o aumento da incidência de infecções enterocócicas (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019). No entanto, os primeiros relatos datam de 1899, quando foram identificados casos de infecção e uma descrição detalhada das bactérias isoladas foi feita, mesmo antes da criação do gênero *Enterococcus* (MACCALLUM; HASTINGS, 1899; THIERCELIN, 1899).

As infecções por *Enterococcus* são geralmente oportunistas, afetando principalmente idosos, imunocomprometidos, pacientes em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), com comorbidades graves ou tratados com antibióticos de amplo espectro (RAMOS *et al.*, 2020). Nos Estados Unidos e União Europeia, esse gênero ocupa a 2ª posição dentre os patógenos mais frequentemente associados a Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), sendo um dos principais patógenos nosocomiais (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019; RAMOS *et al.*, 2020).

Deste modo, a infecção por esses patógenos oportunistas tem como origem a própria microbiota, onde ultrapassam a barreira mucosa, ou a colonização por cepas resistentes a antibióticos que surgem nos hospitais e apresentam muitas vezes patogenicidade aumentada (LEBRETON; WILLEMS; GILMORE, 2014).

No entanto, em hospitais também é necessário levar em consideração a presença desses patógenos no ambiente. Já que eles podem sobreviver por longos períodos em superfícies ambientais e são tolerantes ao calor e agentes desinfetantes, como cloro e álcool, assim seu controle em ambiente hospitalar é difícil (RAMOS *et al.*, 2020). Uma importante forma de transmissão entre pacientes é através das mãos contaminadas dos profissionais de saúde. Isso se dá devido às diversas condições ambientais em que os *Enterococcus* conseguem sobreviver, persistindo por até 60 minutos nas mãos e por até quatro meses em superfícies inertes (HIGUITA; HUYCKE, 2014).

Em humanos, *E. faecalis* e *E. faecium* são as espécies enterocócicas patogênicas mais importantes (CATTOIR, 2022). *E. faecalis* era a principal espécie

de *Enterococcus* responsável por infecções até por volta de 1990 (90–95% dos isolados clínicos) e *E. faecium* pela maioria dos casos restantes (JETT; HUYCKE; GILMORE, 1994; VU; CARVALHO, 2011). Desde então, os isolados de *E. faecium* aumentaram a incidência, principalmente devido à disseminação da resistência a antibióticos (RAMOS *et al.*, 2020).

Os *Enterococcus* são conhecidos por serem responsáveis por inúmeras doenças clínicas em comunidades e hospitais. O tipo mais comum de infecções são as do trato urinário (ITU), chegando até 30% dos causadores de ITUs nosocomiais, e como segundo principal causador de infecções do trato urinário associadas a cateteres (CODELIA-ANJUM *et al.*, 2023). Assim, *Enterococcus* podem causar ITUs como cistite, prostatite e epididimite, além de ITUs complicadas, principalmente em homens mais velhos, como pielonefrite, abscessos perinéfricos e prostatite crônica, podendo resultar em bacteremia (ÁLVAREZ-ARTERO *et al.*, 2021; HIGUITA; HUYCKE, 2014).

Além disso, *Enterococcus* estão entre os principais microrganismos causadores de infecções da corrente sanguínea em ambientes hospitalares, sendo a bacteremia uma das complicações mais comuns (ROSSELLI DEL TURCO *et al.*, 2020). Deste modo, desde a década de 1980 vem ocorrendo um aumento da incidência de bacteremia causada por essas bactérias, alcançando atualmente a segunda posição (HIGUITA; HUYCKE, 2014).

A bacteremia enterocócica frequentemente afeta pacientes idosos, debilitados e imunossuprimidos, sendo a principal fonte de disseminação dessas bactérias o trato geniturinário (HIGUITA; HUYCKE, 2014; ROSSELLI DEL TURCO *et al.*, 2020). Adicionalmente, outras fontes comuns são infecções abdominais e biliares, de tecidos moles, ou uso de cateter (SAID; TIRTHANI; LESHIO, 2024). As taxas de mortalidade podem alcançar até 20% dependendo dos fatores de risco associados, principalmente agravado pelo desenvolvimento de endocardite (CECI *et al.*, 2015; ROSSELLI DEL TURCO *et al.*, 2020).

No geral, os enterococos causam entre 10 a 18% dos casos de endocardite infecciosa, (DANNEELS *et al.*, 2022; HERRERA-HIDALGO *et al.*, 2023). *E. faecalis* sendo a espécie enterocócica que causa a maioria dos casos (cerca de 90%) (FERNÁNDEZ-HIDALGO; ESCOLÀ-VERGÉ; PERICÀS, 2020). Essas infecções

geralmente ocorrem em homens mais velhos (70 anos ou mais), com comorbidades, associada ao ambiente hospitalar e ao uso de válvula protética (DAHL *et al.*, 2022; FERNÁNDEZ-HIDALGO; ESCOLÀ-VERGÉ; PERICÀS, 2020). Outras infecções enterocócicas que ocorrem menos frequentemente são meningite, osteomielite hematogênica, artrite séptica, infecções intra-abdominais e infecções de feridas (HIGUITA; HUYCKE, 2014; SAID; TIRTHANI; LESHIO, 2024).

2.2.3 Fatores de virulência

O processo de infecção microbiana geralmente consiste em etapas de colonização, adesão às células do hospedeiro, invasão de tecidos e evasão do sistema imunológico (UPADHYAYA; RAVIKUMAR; UMAPATHY, 2009; YUKSEKDAG *et al.*, 2021). Os fatores de virulência ajudam nesse processo de patogênese de cepas enterocócicas, causando infecções mais graves do que aquelas que não os possuem (CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA; ZADERNOWSKA; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, 2017; YUKSEKDAG *et al.*, 2021).

Inicialmente, esses fatores de virulência podem ajudar na colonização dos hospedeiros pelos patógenos. Por exemplo, os componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva (MSCRAMMs) estão na superfície das células enterocócicas auxiliando no início da infecção, ao contribuir para a adesão aos tecidos do hospedeiro (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019). Fazem parte desse grupo a proteína de ligação ao colágeno (Ace), que promove a colonização ao se ligar a proteínas da matriz extracelular, bem como ao colágeno tipo I e IV (RICH *et al.*, 1999).

Também contribui para a colonização a substância de agregação (AS), que se liga diretamente às células hospedeiras. Além da proteína de superfície enterocócica (Esp), associada à produção de biofilme, e adesina de parede celular (EfaA), relacionada à endocardite (CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA; ZADERNOWSKA; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, 2017).

Os fatores de virulência continuam auxiliando nas etapas seguintes do processo de infecção, promovendo danos teciduais aos hospedeiros, o que facilita a invasão pelos patógenos. A citolisina (Cyl) auxilia nesse processo, destruindo eritrócitos, leucócitos e macrófagos (YUKSEKDAG *et al.*, 2021). Além dessa,

também participam a gelatinase (GelE), que hidrolisa gelatina, elastina, colágeno, hemoglobina e outros peptídeos bioativos, bem como a hialuronidase (Hyl), que destrói mucopolissacarídeos do tecido conjuntivo e cartilagem (CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA; ZADERNOWSKA; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, 2017).

Por fim, os feromônios sexuais também são fatores de virulência enterocócicos, consistindo em pequenos peptídeos hidrofóbicos que facilitam a transferência de DNA plasmidial por conjugação (CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA; ZADERNOWSKA; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, 2017). Assim, eles contribuem para a disseminação de marcadores de virulência e a aquisição de resistência a antibióticos (YUKSEKDAG *et al.*, 2021).

2.2.4 Mecanismos de resistência a antibióticos

A resistência a antibióticos por *Enterococcus* pode ser definida como intrínseca, aquela que faz parte da herança genética própria da espécie, ou adquirida, originada de mutações nos genes ou aquisição de genes de resistência de outras bactérias (KRISTICH; RICE; ARIAS, 2014). As principais espécies do gênero que possuem resistência são *E. faecalis* e *E. faecium*, consequentemente as de maior importância clínica devido ao risco de colonização e infecção (RŮŽIČKOVÁ; VÍTĚZOVÁ; KUSHKEVYCH, 2020).

Enterococcus são intrinsecamente resistentes a várias classes de antibióticos, incluindo β -lactâmicos, aminoglicosídeos, cefalosporinas, lincosamidas e estreptograminas, podendo ainda adquirir resistência a outras classes, incluindo quinolonas, tetraciclina, macrolídeos, linezolida, cloranfenicol e glicopeptídeos (como a vancomicina) (FARON; LEDEBOER; BUCHAN, 2016; RŮŽIČKOVÁ; VÍTĚZOVÁ; KUSHKEVYCH, 2020).

Os enterococos são conhecidos por apresentar uma resistência intrínseca aos aminoglicosídeos por possuírem a parede celular naturalmente impermeável a essa classe de antibióticos (RŮŽIČKOVÁ; VÍTĚZOVÁ; KUSHKEVYCH, 2020). Além disso, essas bactérias também podem adquirir genes que produzem enzimas modificadoras de aminoglicosídeos ou que causam mutações ribossômicas que afetam a ligação ao alvo (ARIAS; MURRAY, 2012).

A superprodução de proteínas de ligação à penicilina (PBPs) com baixa afinidade de ligação para β -lactâmicos, particularmente PBP4 e PBP5, é a forma como os *Enterococcus* mantêm sua resistência intrínseca aos β -lactâmicos (FARON; LEDEBOER; BUCHAN, 2016; HOLLENBECK; RICE, 2012). Deste modo, há o aumento da concentração inibitória mínima (CIM) em relação a outras bactérias Gram-positivas relacionadas (RŮŽIČKOVÁ; VÍTEŽOVÁ; KUSHKEVYCH, 2020). No entanto, diferentes níveis de resistência são observados entre as espécies de *Enterococcus*, sendo *E. faecium* 4 a 16 vezes menos suscetível a penicilina que *E. faecalis* (FARON; LEDEBOER; BUCHAN, 2016).

Para contornar casos de resistência aos β -lactâmicos, como a ampicilina, ou de alergia a eles, era geralmente utilizada a vancomicina. No entanto, depois de mais de 20 anos de uso, no final da década de 1980 foi identificado o surgimento de resistência a glicopeptídeos em *Enterococos*, como a vancomicina (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

Em *Enterococcus*, a resistência a glicopeptídeos é mediada pelo operon de resistência à vancomicina (Van), que pode ser transportado cromossomicamente ou em plasmídeo (FARON; LEDEBOER; BUCHAN, 2016). O mecanismo de resistência consiste em causar alterações no precursor do pentapeptídeo peptidoglicano (D-Ala-D-Ala), diminuindo sua afinidade pelos antibióticos (RŮŽIČKOVÁ; VÍTEŽOVÁ; KUSHKEVYCH, 2020).

Assim, dependendo do tipo de alteração, os operons podem ser divididos em: vanA, vanB, vanD e vanM, que substituem por um terminal D-alanina-D-lactato (D-Ala-D-Lac) conferindo resistência de nível moderado a alto à vancomicina e teicoplanina (CIMs > 256 μ g/ml); e os operons vanC, vanE, vanG, vanL e vanN que substituem pelo terminal D-alanina-D-serina (D-Ala-D-Ser), resultando em resistência de baixo nível à vancomicina (CIMs 8–16 μ g/ml) (CATTOIR, 2022; GERALDES *et al.*, 2022). Esses precursores alterados tornam mais difícil para o antibiótico se ligar ao peptidoglicano e têm uma afinidade muito menor (até 1000 vezes) para glicopeptídeos do que os originais (ARIAS; MURRAY, 2012).

Os operons vanA, vanB e vanC são os comumente identificados, sendo vanA e vanB mais prevalentes em infecções enterocócicas em humanos (FARON; LEDEBOER; BUCHAN, 2016; GERALDES *et al.*, 2022). No fenótipo VanA,

transmitido por plasmídeo e comumente associado a *E. faecium* e *E. faecalis*, é conferida resistência à vancomicina e à teicoplanina (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019). Já VanB confere resistência à vancomicina e susceptibilidade à teicoplanina (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019). Enquanto VanC, codificado cromossomicamente, confere resistência de baixo nível à vancomicina sendo identificado intrinsecamente em *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. flavescens* (GERALDES *et al.*, 2022).

Outro mecanismo de resistência dos enterococos são as bombas iônicas, que removem substâncias da célula, atuando principalmente contra os antibióticos dos grupos lincosamidas e estreptograminas (RŮŽIČKOVÁ; VÍTEŽOVÁ; KUSHKEVYCH, 2020). Adicionalmente, essas bactérias também podem adquirir genes que codificam a modificação e inativação de antibióticos desse grupo, como quinupristina-dalfopristina, primeiro medicamento aprovado pelo FDA para o tratamento de infecções por VRE (ARIAS; MURRAY, 2012).

Resistência enterocócica aos antibióticos linezolida (0,49-1,83%) e daptomicina (0,6%), usados para tratar infecções por VRE, é rara, mas já foram documentadas (CATTOIR, 2022; FARRELL *et al.*, 2011; KELESIDIS *et al.*, 2010). A via mais comum envolve mutação no sítio de ligação da linezolida, ou alteração das interações da daptomicina com a membrana celular (ARIAS; MURRAY, 2012).

2.2.5 Vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE)

Os primeiros isolados de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (Vancomycin-resistant *Enterococci*; VRE) em humanos foram identificados na Europa na década de 1980 (LEVITUS; REWANE; PERERA, 2023). A provável fonte de VRE pode estar relacionada ao uso do antibiótico glicopeptídeo avoparcina, análogo da vancomicina, em criação de animais para profilaxia ou promoção do crescimento (RAZA *et al.*, 2018). Especificamente na Europa, essa prática foi muito utilizada, sendo VRE encontrado em até 4% das amostras de alimentos de origem animal, mesmo após 10 anos da proibição do uso da avoparcina em animais (LÓPEZ *et al.*, 2009). Assim, a alta prevalência de VRE em animais pode ter sido uma fonte de transmissão de VRE para pessoas saudáveis sem exposição hospitalar.

No caso do surgimento de VRE nos Estados Unidos, está provavelmente relacionado ao uso crescente de vancomicina no ambiente clínico (LEVITUS;

REWANE; PERERA, 2023). Até 1989, praticamente todos os isolados sanguíneos de *Enterococcus* eram suscetíveis à vancomicina, porém a resistência aumentou para 12,8% (1995) e 25,9% (2000) nos anos seguintes (CDC, 2000). Falhas nas práticas de controle de infecção podem ter favorecido a disseminação rápida das cepas de VRE, já que ela era mais prevalente em hospitais onde o uso de antibióticos é maior, e a disseminação bacteriana por transmissão cruzada comum (BONTEN; WILLEMS; WEINSTEIN, 2001).

VRE são distribuídos globalmente, com taxas de infecção variando de 1% a 55%, e taxas de mortalidade de até 70% (EICHEL *et al.*, 2023). Dependendo do local, até 80% dos isolados de VRE são de *E. faecium* (FIORE; VAN TYNE; GILMORE, 2019; KHAN *et al.*, 2022). Especificamente no Brasil, a prevalência dessa bactéria chega a 67% (JABBARI SHIADEH *et al.*, 2019).

Outro fator preocupante é a transferência horizontal de genes de resistência à vancomicina entre *Enterococcus* spp. e outros organismos. Em 2002, o primeiro caso de *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) foi documentado, sendo a vancomicina um dos antibióticos que são usados contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (FARON; LEDEBOER; BUCHAN, 2016). Apesar da baixa taxa de transferência de resistência *in vivo*, esses casos ainda são preocupantes.

Além disso, VRE representam um desafio para o tratamento de pacientes com infecções devido a essas bactérias. Isso ocorre devido à ocorrência concomitante de resistência a outros antibióticos, como a maioria das cepas de *E. faecium* que são resistentes a β -lactâmicos e aminoglicosídeos (LEVITUS; REWANE; PERERA, 2023). Adicionalmente, também é comum a resistência a cefalosporinas, clindamicina, macrolídeos e fluoroquinolonas (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000). Assim, as opções de tratamento de infecções por VRE são frequentemente limitadas.

2.3 Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

2.3.1 Definição e características dos PAMs

Também conhecidos como peptídeos de defesa do hospedeiro, os PAMs são produzidos por praticamente todos os seres vivos (LIMA *et al.*, 2021). Eles são componentes importantes do sistema de defesa imunológica inata, atuando como a primeira linha contra infecções por patógenos (HANEY *et al.*, 2017; MISHRA *et al.*, 2017). Assim, os PAMs aumentam a resposta imune, bem como, destroem microrganismos invasores na maioria das espécies vivas (MA *et al.*, 2020). Esses peptídeos são eficazes contra bactérias, vírus, parasitas e fungos, entre outros microrganismos.

Embora os PAMs sejam produzidos por uma grande variedade de organismos, esses peptídeos compartilham características em comum. Em geral, os PAMs são sequências polipeptídicas sintetizadas por ribossomos, como pró-peptídeos inativos (HANEY; MANSOUR; HANCOCK, 2017). Então, eles passam por processamento para se tornarem formas antibacterianas ativas, que geralmente têm uma faixa de tamanho de 12 a 50 resíduos de aminoácidos (LIMA *et al.*, 2021).

Além disso, a maioria dos PAMs apresenta carga líquida positiva em pH neutro, devidos a presença de resíduos catiônicos, como aminoácidos arginina ou lisina (HANEY; MANSOUR; HANCOCK, 2017). Outra característica importante é a hidrofobicidade, com a presença de aminoácidos hidrofóbicos em até 50% ou mais da estrutura dos PAMs (HANEY; MANSOUR; HANCOCK, 2017). Esses dois parâmetros, tanto a carga quanto a hidrofobicidade, são essenciais para o mecanismo de ação dos PAMs, através da interação peptídeos-membrana microbiana. Outras, como helicidade, anfipaticidade e autoassociação, também contribuem para a inserção de peptídeos na membrana (LIMA *et al.*, 2021).

A maioria dos PAMs não apresenta uma forma estruturada em soluções aquosas, mas podem passar por mudanças conformacionais e estabelecer uma conformação bem definida dependendo das condições ambientais (ERDEM BÜYÜKKIRAZ; KESMEN, 2021). A sequência primária e interação com membranas microbiana são os principais fatores que influenciam a estrutura dos PAMs. Assim,

os PAMs podem assumir diferentes conformações estruturais, classificados em hélice α , folha β e estendido (MA *et al.*, 2020).

2.3.2 Mecanismos de ação dos PAMs

Um dos modos de ação mais importantes dos PAMs, bem como o mais elucidado, é a permeabilização da membrana bacteriana (Figura 1). Para isso, é necessário que haja inicialmente uma interação eletrostática entre os resíduos catiônicos nos PAMs e as moléculas aniônicas na superfície da célula bacteriana (Figura 1a) (LIMA *et al.*, 2021). Então, os PAMs são atraídos pelos ácidos lipoteicóicos da parede celular de bactérias Gram-positivas e os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa de Gram-negativas (ERDEM BÜYÜKKIRAZ; KESMEN, 2021).

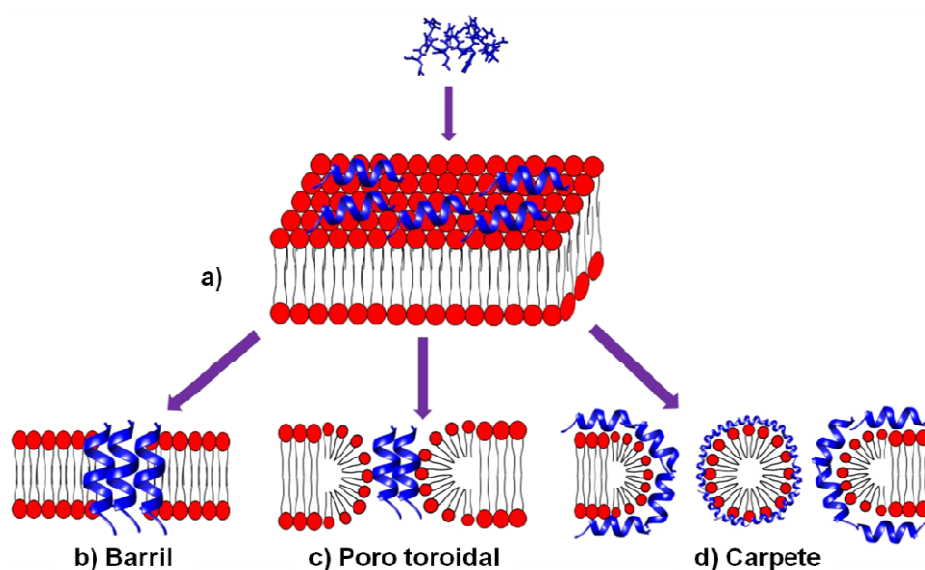
Em seguida, os PAMs precisam interagir com a membrana citoplasmática para poderem romper ou penetrar na célula bacteriana. Para isso, a maior parte dos PAMs possui características estruturais que simplificam essas interações com as membranas bacterianas, sendo a mais evidente a atração eletrostática (LIMA *et al.*, 2021). As membranas citoplasmáticas bacterianas são caracterizadas pelo alto teor de lipídios aniônicos, enquanto as membranas animais possuem fosfolipídios zwitteriônicos, como fosfatidilcolina (PC) e esfingomielina (ERDEM BÜYÜKKIRAZ; KESMEN, 2021). Assim, os PAMs interagem preferencialmente com a cardiolipina e o fosfatidilglicerol, lipídios carregados negativamente presentes nas membranas citoplasmáticas bacterianas (HANEY; MANSOUR; HANCOCK, 2017).

Vários modelos foram propostos para explicar como os PAMs induzem a permeabilização da membrana, como os modelos barril (*barrel-stave*), poro toroidal (*toroidal-pore*) e carpete (*carpet-like*), esquematizados na Figura 1. No modelo de barril, a formação do poro ocorre através da inserção da parte hidrofóbica do peptídeo no núcleo lipídico da membrana (HANEY; MANSOUR; HANCOCK, 2017). Quando alcançam uma concentração máxima, os monômeros peptídicos se unem, reduzindo a exposição dos resíduos hidrofílicos do peptídeo e criando poros transmembrana no núcleo da membrana hidrofóbica (Figura 1b) (ERDEM BÜYÜKKIRAZ; KESMEN, 2021). Isso resulta no transbordamento do conteúdo da célula bacteriana e na morte das bactérias (MA *et al.*, 2020).

Já no modelo de poro toroidal (Figura 1c), os grupos polares dos peptídeos se ligam aos grupos polares dos fosfolipídeos (ERDEM BÜYÜKKIRAZ; KESMEN, 2021). Com isso, induzem a mudança da monocamada de fosfolipídios bacterianos até que um orifício de 1 a 2 nm de diâmetro seja formado, podendo culminar na morte bacteriana (MA *et al.*, 2020).

No modo de ação do modelo carpete os peptídeos atuam de forma difusa, semelhante à ação de um detergente (Figura 1d). Os PAMs carregados positivamente são atraídos eletrostaticamente para os grupos de fosfolipídios com porção aniônica na superfície da membrana, assumindo uma conformação anfipática (HANEY; MANSOUR; HANCOCK, 2017). Assim, uma elevada concentração de peptídeos se deposita na superfície da membrana, criando um revestimento parecido com um tapete, resultando na desintegração da membrana e na formação de micelas (ERDEM BÜYÜKKIRAZ; KESMEN, 2021).

Figura 1 – Mecanismos de ação dos PAMs.



Representação esquemática da interação do PAM com a membrana bacteriana: a) iniciando com a adsorção do PAM na membrana da célula alvo. b) No modelo barril-bastão, os peptídeos permeiam através da bicamada; c) no poro toroidal, os peptídeos interagem com a superfície da membrana, induzem a curvatura da bicamada e se inserem perpendicularmente na bicamada da membrana; d) no modelo carpete, os peptídeos cobrem toda a membrana, formando micelas com a membrana fragmentada.

Fonte: (MANNIELLO *et al.*, 2021).

Além disso, os PAMs podem adicionalmente ou exclusivamente terem alvos intracelulares. Uma vez dentro da célula microbiana, os PAMs podem inibir a síntese

de parede celular, DNA, RNA e de proteínas, bem como inibir a atividade de enzimas (LIMA *et al.*, 2021). A soma desses efeitos pode levar ao colapso das vias metabólicas e resultar na morte celular.

2.3.3 PAMs como alternativa terapêutica contra resistência a antimicrobianos

Atualmente, um grande número de PAMs está sendo investigado como potenciais novos antibióticos. Eles têm demonstrado atividades antimicrobianas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, mostrando um amplo espectro de ação contra diversas infecções (MA *et al.*, 2020). Adicionalmente, eles podem ser utilizados isoladamente ou em combinação com antibióticos convencionais para obter efeitos sinérgicos ou aditivos (ERDEM BÜYÜKKIRAZ; KESMEN, 2021).

Particularmente, os PAMs são promissores no combate a patógenos multirresistentes, como os do grupo ESKAPE (MULANI *et al.*, 2019). Especificamente, vários estudos demonstraram a ação de PAMs contra cepas de *Enterococcus*, incluindo VRE (Tabela 1).

Tabela 1 – Ação de PAMs contra cepas de *Enterococcus*

PAM	Bactéria	MIC	Referência
P1, P2, P3	<i>E. faecalis</i> (ATCC [®] 29212)	32 - >256 µg/mL	(LACH <i>et al.</i> , 2023)
cCF10, C6, C6-cCF10, cCF10-C6, C4, cCF10-C4, C3, cCF10-C3, random-C4	<i>E. faecalis</i> (ATCC [®] 25922)	4 - >128 µM	(XU <i>et al.</i> , 2020)
Pleurocidin	<i>E. faecium</i> (19434)	1,9 µg/mL	(CHOI, Hyemin; LEE, 2012)
LL-37	<i>E. faecalis</i> (V583)	32 µM	(ZHANG <i>et al.</i> , 2023)
P18	<i>E. faecalis</i> (VREF, isolados clínicos) <i>E. faecium</i> (VREF, isolados clínicos)	4; 1 µM	(SHIN <i>et al.</i> , 2002)
Buwchitin	<i>E. faecalis</i> (JH2-2)	100-200 µg/mL	(OYAMA <i>et al.</i> , 2017)
sAvBD6	<i>E. faecalis</i> (ATCC [®] 29212)	2 µM	(PENG <i>et al.</i> , 2013)
Copsin	<i>E. faecium</i> ; <i>E. faecium</i> (VRE); <i>E. faecalis</i>	4; 2; 8 µg/mL	(ESSIG <i>et al.</i> , 2014)
BCP61	<i>E. faecalis</i> (ATCC [®] 29212); VRE	5; 20 µg/mL	(CHOI, Yun Hee <i>et al.</i> , 2012)
Pantinin-1, Pantinin-2, Pantinin-3	VRE S13	4 – 36 µM	(ZENG <i>et al.</i> , 2013)

Blapersin, W2F (Foldincrease), W2Y, W2A	<i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> (VRE)	0,5 – 16 µM	(WU <i>et al.</i> 2020)
DD K, DD L, DD M, DD Q1, DD Q2	<i>E. faecalis</i> (ATCC® 29212)	10 – 38 µM	(BATISTA <i>et al.</i> 1999)
<i>Ornithodoros</i> defensin A	<i>E. faecalis</i> (MAFF 117004)	1 µg/mL	(NAKAJIMA <i>et al.</i> 2003)
Pexiganan	<i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> (Van A)	4 e 512 µg/mL	(FLAMM <i>et al.</i> 2016)
Ci-MAM-A24	<i>E. faecalis</i> (ATCC® 51299) e <i>E. faecium</i> (DSM 17050 e isolados clínicos)	0,78 – 3,125 µg/mL	(FEDDERS, PODSCHUN, LEIPPE 2010)

Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

Além disso, a resistência aos PAMs ocorre com menor frequência em comparação com antibióticos tradicionais. Isso ocorre devido ao seu principal modo de ação consistir em causar dano à membrana celular, tornando difícil para as bactérias desenvolverem resistência a eles (LIMA *et al.*, 2021). Assim, a resistência aos PAMs surge por meio de mecanismos intrínsecos e inespecíficos, com menor frequência de transferência horizontal de genes de resistência do que com antibióticos (ERDEM BÜYÜKKIRAZ; KESMEN, 2021).

O Mercado global de PAMs está em crescimento, com uma expectativa de aumento significativo até 2031 (CRESTI; CAPPELLO; PINI, 2024). Mais de 60 peptídeos já foram aprovados pela FDA, e mais de 400 estão em fase de testes clínicos (ERDEM BÜYÜKKIRAZ; KESMEN, 2021). Embora ainda haja desafios em termos de estabilidade, segurança e formulação para aplicação comercial, a pesquisa crescente sugere um futuro promissor. Assim, os PAMs representam uma solução promissora, como alternativa ou complemento aos antibióticos convencionais, para combater infecções bacterianas, especialmente aquelas causadas por patógenos resistentes.

2.3.4 PAMs sintéticos inspirados nas proteínas *Mo*-CBP₃, *Rc*-2S-Alb e quitinase

Novos produtos antimicrobianos, como os peptídeos antimicrobianos (PAMs), podem ser descobertos e extraídos a partir de fontes naturais, mas esse método tradicional enfrenta limitações, como baixo rendimento, custo elevado e dificuldades no escalonamento da produção. Além disso, os PAMs naturais podem ter características indesejáveis, como instabilidade, baixa seletividade, toxicidade e

sensibilidade ao sal (ERDEM BÜYÜKKIRAZ; KESMEN, 2021). Para superar esses desafios, os peptídeos antimicrobianos sintéticos são uma alternativa, sendo projetados de forma racional para otimizar suas propriedades terapêuticas (LIMA *et al.*, 2021).

Assim, peptídeos sintéticos foram projetados racionalmente usando como modelo as sequências primárias de proteínas vegetais, resultando nos peptídeos *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII e *Mo*-CBP₃-PepIII (OLIVEIRA *et al.*, 2019), *Rc*Alb-PepI, *Rc*Alb-PepII e *Rc*Alb-PepIII (DIAS *et al.*, 2020), e PepGAT e PepKAA (SOUZA *et al.*, 2020). Os peptídeos foram projetados empregando a sequência de aminoácidos das proteínas vegetais *Mo*-CBP₃ (GIFONI *et al.*, 2012), *Rc*-2S-Alb (SOUZA *et al.*, 2016) e uma quitinase (Número de acesso NCBINP_181885.1).

Esses peptídeos apresentaram ampla atividade antimicrobiana, sendo eficazes contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (OLIVEIRA *et al.* 2019, DIAS *et al.* 2020, SOUZA *et al.* 2020). Além disso, a combinação desses SAMPs com antibióticos convencionais demonstrou atividade sinérgica contra *Staphylococcus aureus* (NETO *et al.* 2022 , NETO *et al.* 2023).

Nesse sentido, é necessário ressaltar que os peptídeos não apresentaram atividade hemolítica em eritrócitos humanos, nem citotoxicidade em linhagens de células Vero, fibroblastos e queratinócitos humanos, ou embriões de peixe-zebra. Além disso, nenhum dos peptídeos em estudo apresentaram potencial alergênico quando analisados *in silico* (OLIVEIRA *et al.* 2019, DIAS *et al.* 2020, SOUZA *et al.* 2020).

2.4 Terapia medicamentosa combinada

Combinar antimicrobianos já existentes com outros antimicrobianos ou compostos não antimicrobianos proporciona uma estratégia eficaz para lidar com a questão da resistência a antibióticos (MULANI *et al.*, 2019). A terapia combinatória usando PAMs e antibióticos mostra-se promissora no tratamento de infecções multirresistentes, especialmente aquelas envolvendo bactérias formadoras de biofilme (PIZZOLATO-CEZAR; OKUDA-SHINAGAWA; MACHINI, 2019).

O principal motivo da interação sinérgica entre PAMs e outros agentes antimicrobianos é que a maioria dos PAMs é capaz de causar a formação de poros nas membranas microbianas, o que facilita a entrada dos fármacos na célula

microbiana, superando mecanismos de resistência que envolva a baixa penetrabilidade da droga pela membrana celular microbiana (LI; FERNÁNDEZ-MILLÁN; BOIX, 2020). Essa abordagem oferece vários benefícios, como eliminação mais eficiente de bactérias resistentes, menor probabilidade de desenvolvimento de resistência, menores doses de antibióticos necessárias e menos efeitos colaterais (PIZZOLATO-CEZAR; OKUDA-SHINAGAWA; MACHINI, 2019).

O sucesso da terapia PAM-antibiótico se deve em grande parte aos diferentes mecanismos de ação, onde mesmo os PAMs com atividade antimicrobiana moderada podem aumentar significativamente o efeito dos antibióticos contra bactérias resistentes (PIZZOLATO-CEZAR; OKUDA-SHINAGAWA; MACHINI, 2019). Diante disso, os PAMs podem ser empregados como adjuvantes, facilitando e complementando a ação dos antibióticos convencionais (LI; FERNÁNDEZ-MILLÁN; BOIX, 2020).

3 Hipótese e objetivos

3.1 Hipótese

Os peptídeos antimicrobianos sintéticos *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, *Mo*-CBP₃-PepIII, *RcAlb*-PepI, *RcAlb*-PepII, *RcAlb*-PepIII, PepGAT e PepKAA possuem atividade antibacteriana e antibiofilme contra *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina.

3.2 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme dos peptídeos antimicrobianos (PAMs) sintéticos *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, *Mo*-CBP₃-PepIII, *RcAlb*-PepI, *RcAlb*-PepII, *RcAlb*-PepIII, PepGAT e PepKAA frente a bactérias do gênero *Enterococcus* resistentes à vancomicina.

3.3 Objetivos Específicos

- Determinar atividade antibacteriana *in vitro* dos PAMs frente às espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina;
- Determinar possíveis modos de ação antimicrobiana;
- Avaliar a atividade antibacteriana combinada dos PAMs com antibióticos comerciais;
- Avaliar atividade antibiofilme dos PAMs.

4 Capítulos

4.1 Capítulo 1 – Artigo: Synthetic antimicrobial peptides: activity against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and modulation of chloramphenicol antibacterial activity

Artigo publicado na revista *Journal of Applied Microbiology*

(<https://doi.org/10.1093/jambio/lxae126>)

Synthetic antimicrobial peptides: activity against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and modulation of chloramphenicol antibacterial activity

LIMA, Patrícia Gomes^a; SOUZA, Pedro Filho Noronha^b; MESQUITA, Felipe Pantoja^b; OLIVEIRA, Thaís Larré^c; HARTWIG, Daiane Drawanz^a

^aDepartment of Microbiology and Parasitology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, CEP: 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

^bDrug Research and Development Center, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, CEP: 60430-275, Fortaleza, CE, Brazil.

^cCenter for Technological Development, Federal University of Pelotas, CEP: 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

[§]Corresponding author:

Daiane Drawanz Hartwig

Federal University of Pelotas, University Campus, CEP 96010–900, Pelotas, RS, Brazil.

Email: daianehartwig@gmail.com

Fone: +555332757616

ABSTRACT

Aims

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*) is a leading cause of nosocomial infection and presents a wide spectrum of antibiotic resistance, being vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) one of the most relevant. Synthetic antimicrobial peptides (SAMPs) are currently a promising option to overcome antimicrobial resistance. Thus, the purpose of this study was to assess the effect of eight SAMPs against vancomycin-resistant *E. faecalis*, as well as to investigate their mechanism of action and synergy with conventional antibiotics.

Methods and Results

Here, eight SAMPs, *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, *Mo*-CBP₃-PepIII, *Rc*Alb-PepI, *Rc*Alb-PepII, *Rc*Alb-PepIII, PepGAT, and PepKAA, were tested for antibacterial activity *in vitro* against *E. faecalis* (ATCC® 51299) through broth microdilution. A maximum of 48% of *E. faecalis* growth inhibition was achieved by treatment with SAMPs alone. However, when these peptides were combined with the antibiotic chloramphenicol, assessed by checkerboard method, the inhibition increased to 55-76% of inhibition, 2-3 folds of increase if compared to the effects of the compounds alone. Microscopic analysis showed that *E. faecalis* cells treated with a combination of SAMPs and chloramphenicol resulted in bacterial membrane damage. The biofilm inhibition maximum was 22% for SAMPs alone, when combined with chloramphenicol the maximum increased to 33%.

Conclusions

SAMPs and their combination with chloramphenicol demonstrate antibacterial activity against *E. faecalis*, possibly by inducing bacterial membrane damage.

Impact Statement

It is feasible to suggest that the association between the SAMPs and chloramphenicol has the potential to develop an antimicrobial agent against vancomycin-resistant *E. faecalis*.

KEYWORDS: antibacterial action, synergism, pore formation, VRE, SAMP.

INTRODUCTION

Enterococcus genus is the third leading cause of nosocomial infections and primary bloodstream infections associated with healthcare are estimated to be responsible for 25-50% of the mortality rate among hospitalized patients (Jabbari et al. 2019). In humans, *E. faecalis* is one of the most abundant species of this genus. In Europe and the United States, *E. faecalis* was the 5th most frequently isolated organism from catheter-associated urinary tract infections and the 3rd most frequently isolated from bloodstream infections (Hidron et al. 2008; Weiner et al. 2016). *E. faecalis* can also cause urinary infections, endodontic infections, peritonitis, endocarditis, osteomyelitis, diabetic foot ulcers, and meningitis (Nešuta et al. 2017).

Moreover, these bacteria present a relevant therapeutic challenge, as they have a spectrum of intrinsic resistance and acquired resistance to a variety of antibiotics, such as vancomycin and linezolid (Hollenbeck and Rice 2012; Tong et al. 2014; García-Solache and Rice 2019). Consequently, it is difficult to treat those infections with antibiotic therapy alone (Hollenbeck and Rice 2012; Tong et al. 2014).

One of the most promising alternatives in the treatment of resistant microorganisms is synthetic antimicrobial peptides (SAMPs). SAMPs show a broad spectrum of antimicrobial activities, acting against bacteria, parasites, viruses, and fungi (Huan et al. 2020). Furthermore, because the main target of action of SAMPs is cell membranes and not a biosynthesis process of the microorganism, they are considered an option to reduce the chance of resistance development (Ghosh and Haldar 2015).

However, even though SAMPs provide a potentially new supply of antimicrobials for treating various bacterial illnesses, they still need further testing, and conventional antibiotics remain a fundamental resource for antibacterial therapy and cannot be completely substituted yet. As a result, combining conventional antibiotics and SAMPs may be an alternative to extend the lives of many antibiotics (Tong et al. 2014).

Recently, eight SAMPs, rationally designed based on plant proteins, showed promising results and the potential to be used as an alternative antimicrobial treatment to replace or complement the existing ones. They are *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, and *Mo*-CBP₃-PepIII; *Rc*Alb-PepI, *Rc*Alb-PepII, and *Rc*Alb-PepIII, and PepGAT and PepKAA (Oliveira et al. 2019; Dias et al. 2020; Souza et al. 2020). Those peptides present broad antimicrobial activity, being effective against both, gram-negative and gram-positive bacteria (Oliveira et al. 2019; Dias et al. 2020; Souza et al. 2020). Additionally, the combination of these SAMPs with conventional antibiotics demonstrated synergistic activity against *Staphylococcus aureus* (Neto et al. 2022; Neto et al. 2023). Therefore, this study aimed to evaluate the activity of eight SAMPs against *E. faecalis*, analyze their mechanism of action, and their synergism with conventional antibiotics.

MATERIALS AND METHODS

Peptides design

The peptides *Mo*-CBP₃-PepI (CPAIQRCC), *Mo*-CBP₃-PepII (NIQPPCRCC), and *Mo*-CBP₃-PepIII (AIQRCC) were designed as described previously (Oliveira et al. 2019), using the amino acid sequence of the protein *Mo*-CBP₃ from *Moringa oleifera* seeds (Gifoni et al. 2012). The peptides *Rc*Alb-PepI (AKLIPTIA), *Rc*Alb-PepII (AKLIPTIAL), and *Rc*Alb-PepIII (SLRGCC) were designed as described previously (Dias et al. 2020) using the amino acid sequence of the protein *Rc*-2S-Alb from *Ricinus communis* seed cake (Souza et al. 2016). The peptides PepGAT (GATIRAVNSR) and PepKAA (KAANRIKYFQ) were designed as described previously (Souza et al. 2020) using the amino acid sequence of the chitinase from *Arabidopsis thaliana* (NCBI accession number NP_181885.1) (Lin et al. 1999). For this, the software CPAmP (http://bioserver-3.bioacademy.gr/Bioserver/C-PAmP/Peptide_index.php) of free access was used. Thus, the peptides had to meet

the following criteria: net positive charge; low molecular weight (600-1200 Da); Boman index ≤ 2.5 ; at least 40% hydrophobic potential. These criteria were evaluated using the Antimicrobial Peptide Database tool (<http://aps.unmc.edu/AP/>). All peptides were chemically synthesized by the company Chempeptide (Shanghai, China), where the quality and purity (95%) were analyzed by reverse-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometry.

Bacterial strain

In this study, the strain of *E. faecalis* ATCC[®] 51299 was used. This strain belongs to the Laboratory of Bacteriology and Bioassays (LaBBio), from the Federal University of Pelotas (UFPel, Pelotas, RS, Brazil). *E. faecalis* ATCC[®] 51299 presents a vancomycin-resistant phenotype and possesses the vancomycin resistance gene *vanB* [genotype *vanBant(6)-I aac(6') aph(2''')*] (Patel et al. 1997; Sung et al. 2015). The bacterial strain was maintained at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Brain Heart Infusion broth (BHI - Kasvi[®]) with 10% glycerol.

Antibacterial activity

The antimicrobial activity of the eight SAMPs was evaluated against vancomycin-resistant *E. faecalis* (ATCC[®] 51299) using the Broth Microdilution Assay in polystyrene plates as established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2018), determining the percentage of bacterial growth inhibition compared to the control (Souza et al. 2020). Serial two-fold dilutions of the peptides were made, testing concentrations from 0.49 to 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dissolved in saline solution (0.15 mol.L^{-1} NaCl) containing 5% dimethyl sulfoxide (DMSO). Then, 50 μL of bacterial inoculum (1.5×10^8 CFU/mL) prepared in Brain Heart Infusion (BHI - Kasvi[®]) broth, standardized by optical density at 630 nm ($\text{OD}_{630} \approx 0.1$), was added. A 5% DMSO solution in saline (100% growth) was used as a control. The plates were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. After incubation, the optical density was measured using a microplate reader (Molecular Devices, SpectraMax 190) at a wavelength of 630 nm. Then, the percentage of bacterial growth inhibition of each treatment was calculated compared to the control (5% DMSO solution in saline). The same procedure was applied to determine the antibacterial activity of the antibiotic chloramphenicol. The tests were performed in triplicate.

Determination of antibiofilm activity

Antibiofilm assays were performed according to the method described by Dias et al. (2020). Briefly, to evaluate the inhibition of bacterial formation biofilm, 96-well flat-bottom polystyrene microplates were used,

incubating 50 μL of bacterial suspension (1.5×10^8 CFU/mL) with 50 μL of peptides at the same concentrations used in the antibacterial activity assay (37 °C, 48 h). After incubation, the biofilm formed was stained with an aqueous solution of 0.1% (m/v) of crystal violet and diluted with ethanol (95%), and then the absorbance was measured using a microplate reader (Molecular Devices, SpectraMax 190) at a wavelength of 580 nm. The inhibition of biofilm formation was calculated by comparing the absorbance obtained for cells treated with the peptides and those obtained for cells treated with 5% DMSO in saline (negative control). The effects of peptides on the degradation of preformed biofilm were evaluated using 100 μL aliquots of bacterial suspension previously incubated at 37 °C for 24 h. Then, the supernatant was removed, planktonic cells and culture medium were discarded, and the biofilm was treated with the peptides ($0.49 - 500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) for 24 h at 37 °C. The culture medium was discarded again, and the same procedure described above was used to quantify the biofilm biomass and calculate the biofilm degradation. The tests were performed in triplicate.

Checkerboard assay

The checkerboard assay evaluated the interaction among SAMPs (0.49 to $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) combined with chloramphenicol (0.49 to $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) against *E. faecalis*. The broth microdilution assay was performed in a 96-well plate with a final volume of 100 μL (Costa et al. 2019). The bacterial inoculum was prepared, and the assay was performed as described above. All antibiotic and peptide concentrations were tested alone and in combination. The data was analyzed to calculate the fractional inhibitory concentration index (FICI). The FICI values indicate whether the interaction between the substances is synergistic ($\text{FIC} \leq 0.5$), additive ($\text{FIC} > 0.50$ and < 1), or indifferent ($\text{FIC} > 1$ and ≤ 4) (Chin, Weitzman and Della-Latta 1997).

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) analysis

E. faecalis cells were grown until the logarithmic growth stage in BHI, treated with chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and its combination with peptides ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), and then incubated at 37 °C for 20 h. Cells treated with 5% DMSO in saline were used as the negative control. After centrifugation ($5,000 \times g$; 5 min) and washing with PBS, cells were stained with SYTO 9 and propidium iodide, according to the manufacturer's recommendations (LIVE/DEAD™ BacLight™ - Invitrogen, USA). Next, cells were washed twice with PBS and observed with a Leica TCS SP8 confocal laser scanning microscope at 100 $\times$ magnification (Maia et al. 2020).

Scanning electron microscopy (SEM) analysis

Sample preparation was performed according to Souza et al. (2020). Briefly, *E. faecalis* cells were treated with chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and peptides ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), then incubated at 37°C for 24 h. *E. faecalis* cells were centrifuged at 3000 g, 5 min, at 22°C . The supernatants obtained were discarded, and the cell pellets were fixed for 48 h at 4°C with 1 mL of the fixation solution [2.5% (v/v) glutaraldehyde prepared in 0.15 mol.L^{-1} Na-phosphate buffer pH 7.2]. Following, the cells were recovered by centrifugation, as mentioned above, washed three times with sterile distilled water (dH_2O), and centrifuged again. Sample dehydration was conducted by incubating with increasing ethanol concentrations (30%, 50%, 70%, 100%, and 100% v/v) for 10 min each, followed by centrifugation as previously described. After, samples were drained for microscope coverslips and dried in an oven at 37°C for 24 h. After drying, the samples were transferred to stubs and covered with gold with a sputter coater (Desk V, Denton Vacuum). Images were captured with a JSM - 6610LV Jeol scanning electron microscope (Tokyo, Japan), using an acceleration beam voltage of 15 kV a 5,000 to $40,000\times$ detector magnification.

Statistical analysis

All experiments were performed three times, and the results were expressed as mean $\pm$ standard error. Data were submitted to ANOVA, followed by Tukey's test, using GraphPad Prism 5.01, with a significance of $P<0.05$.

RESULTS

The antibacterial assay revealed that *Mo*-CBP₃-PepI presents the strongest activity against *E. faecalis*, inhibiting a maximum of 48% ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) of bacterial growth compared to the negative control (DMSO 5%), equivalent to 100% growth (Figure 1a). The other peptides and concentrations tested ranged from 20-40% of inhibition growth (Figure 1).

Different concentrations of these compounds were tested in a checkerboard assay to investigate possible synergism among the SAMPs and the commercial antibiotic chloramphenicol. Since chloramphenicol MIC against *E. faecalis* was $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, their subinhibitory concentrations ($125\text{-}0.49 \mu\text{g.mL}^{-1}$) were used for the checkerboard assay. Thus, the combination of chloramphenicol and the SAMPs resulted in higher antibacterial activity than the compounds alone, at $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. All of the eight peptides were able to modulate the antibacterial activity of chloramphenicol, showing higher inhibitory concentrations than the compounds alone, ranging from 55-76% inhibition (Figure 2). Higher inhibitory activity was observed with the

combination of chloramphenicol with *RcAlb-PepIII* (76%) and *PepKAA* (70%), being able to 2-fold the effect of the antibiotic and to 3-fold the inhibition by the peptides alone (Figure 2). Thus, according to FICI calculations, the interaction of the SAMPs with chloramphenicol was classified as an additive (Table 1).

CLSM analysis was performed using two dyes, SYTO 9 and propidium iodide. SYTO 9 stains all bacterial cells, while propidium iodide penetrates only where the bacterial membrane is damaged. Accordingly, CLSM analysis showed that the cells treated with a combination of peptides ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) emitted red fluorescence more intensely than the cells treated with DMSO or antibiotic alone ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figure 3).

The effect of the combination of peptides ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) on the bacterial cell membrane was further investigated by scanning electron microscopy (SEM). The images obtained revealed severe morphological damages in the treated cell if compared to the control (Figure 4). Cells treated with DMSO 5% displayed characteristic shapes without any cracks or damage. Similarly, cells treated with only chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) showed normal shape, although they were present in fewer numbers than in the DMSO 5% treatment. In contrast, cells treated with a combination of peptides ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) showed cell wall deformation, deep craters, and indentations (Figure 4b, c, e, i, h, and j). The treatments with *Mo*-CBP₃-PepII ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figure 4d) and *RcAlb*-PepI ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figure 4f) is seen the presence of pores formed in the cell leading to loss of internal content and cell death. In the treatment with *RcAlb*-PepII ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) cells were completely collapsed (Figure 4g).

Additionally, the ability of the SAMPs to inhibit *E. faecalis* biofilm formation was tested (Figure 5). As the biofilm confers greater resistance to microorganisms, the maximum inhibition obtained was 22% with *Mo*-CBP₃-PepII ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figure 5b). Most different peptide concentrations tested inhibited less than 20% of biofilm formation. Furthermore, the SAMPs could not degrade the pre-formed biofilm of *E. faecalis* (data not shown).

Chloramphenicol was able to inhibit biofilm formation with MIC of $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$. In this manner, the combination of chloramphenicol with peptides ranged from 13-33%, except for the *RcAlb*-PepII and *PepGAT*, which did not show better results combined (Figure 6). Further, none of the tested antibiotics were able to efficiently degrade the biofilm of *E. faecalis* (data not shown).

DISCUSSION

E. faecalis is a component of the human gut's healthy microbiota but can also act as an opportunistic pathogen. Particularly, vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) are among the most challenging to treat nosocomial bacteria (Khan et al. 2019). Thus, searching for the potential usefulness of compounds and treatment options for patients infected with resistant enterococci is essential.

In this study, eight SAMPs (*Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, *Mo*-CBP₃-PepIII, *Rc*Alb-PepI, *Rc*Alb-PepII, *Rc*Alb-PepIII, PepGAT, and PepKAA) were tested against vancomycin-resistant *E. faecalis* (genotype *vanB*) (Patel et al. 1997). Still, none of the tested peptides strongly inhibited *E. faecalis* growth *in vitro*, with a maximum inhibition of 48% (*Mo*-CBP₃-PepI), closely followed by the other SAMPs with 20-40% growth inhibition (Figure 1). As all of the tested SAMPs share similar physicochemical properties, this pronounced inhibitory activity of *Mo*-CBP₃-PepI may be related to its higher abilities to interact with SDS micelles (Lima et al. 2020; Souza et al. 2020). In this manner, the capacity to better interact with SDS micelles simulates the interaction of peptides with the negative membrane of microorganisms, which is correlated to the SAMP antimicrobial activity (Lima et al. 2021).

Overall, as demonstrated in previous studies, these same peptides showed high antibacterial activity against other species of bacteria, such as *Staphylococcus aureus* (gram-positive) and *Salmonella enterica* (gram-negative) (Oliveira et al. 2019; Souza et al. 2020). Therefore, the overall differences between gram-positive and gram-negative bacteria appear unrelated to these SAMPs antibacterial activity.

Still, even though the development of antimicrobial resistance against SAMPs is not as prevalent when compared to antibiotics, different studies investigated mechanisms for bacterial protection against SAMPs (Andersson, Hughes, and Kubicek-Sutherland 2016; Moravej et al. 2017; Nešuta et al. 2017; Assoni et al. 2020). For instance, some mechanisms of resistance to antimicrobial peptides present in *Enterococcus* are modifications in membrane/cell wall structure, transport systems and efflux pumps, and AMP-induced gene expression/repression (Assoni et al. 2020).

Among these studies, Nešuta et al. (2017) found that *E. faecalis* can secrete proteases in the environment, such as gelatinase and serine protease, which might be able to degrade SAMPs (Nešuta et al. 2017). Therefore, a possible reason why these SAMPs (*Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, *Mo*-CBP₃-PepIII, *Rc*Alb-PepI, *Rc*Alb-PepII, *Rc*Alb-PepIII, PepGAT, and PepKAA) that showed strong antimicrobial activity against other species (Oliveira et al. 2019; Dias et al. 2020; Souza et al. 2020) did not demonstrate such efficacy against *E. faecalis*, may be due to the degradation of the peptides by proteases secreted by this bacteria (Nešuta et al. 2017). However, some inhibition on the growth of *E. faecalis* was still observed when treated with SAMPs, with a

maximum inhibition ranging from 40-48% of inhibition. Thus, it is possible to hypothesize that either the peptides were not fully degraded or their fragments could still perform their antimicrobial activity, even after being cleaved. Likewise, Wendler et al. (2019) found that the fragments of proteolytic degradation of the AMP human beta-defensin 1 still retained their antimicrobial activity (Wendler et al. 2019).

Additionally, in the face of the alarming pace of antimicrobial resistance development, some old and indisuse antibiotics may need to be reevaluated. Therefore, this may be the case with chloramphenicol, which is a broad-spectrum antibiotic isolated from the bacteria *Streptomyces venezuelae* in 1948. Due to its severe adverse effects, this antimicrobial agent is rarely used in developed countries but is still common in the developing world (Čivljak et al. 2014). Remarkably, recent studies have highlighted the potential application of chloramphenicol as an effective alternative to treat resistant bacterial infections in specific cases, such as treatment alternatives for short antibiotic courses, in life-threatening situations when no alternatives (less toxic drugs) are available (Čivljak et al. 2014; Eliakim-Raz et al. 2015; Sood 2016).

In this manner, another approach tested in this study was the combination of the SAMPs with the conventional antibiotic chloramphenicol. Notably, when the peptides were combined with chloramphenicol, their inhibition percentage nearly doubled for all tested molecules (Figure 3). At the same time, the combination with the other antibiotics resulted in indifferent or antagonistic interaction (data not shown). Similarly, Park et al. (2004) found a synergistic effect among chloramphenicol and peptide A3 against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *E. coli* (Park, Kim, and Hahm 2004).

Thus, this effect may be related to the antibiotic and the SAMPs mode of action. Accordingly, chloramphenicol acts in the bacterial ribosome, a cytoplasmic target, inhibiting protein synthesis by binding to the 50S ribosomal subunit and suppressing the formation of bacterial protein (Oong and Tadi 2022). On the other hand, one of the main modes of action of AMPs is microbial membrane disruption, causing membrane thinning, alteration in membrane curvature, pore formation, and modification of the bilayer permeability barrier (Haney, Mansour, and Hancock 2017; Lima et al. 2021). Also, it is necessary to consider that some usual mechanisms of resistance to chloramphenicol involve efflux systems and permeability barriers (Čivljak et al. 2014).

Therefore, the SAMPs might assist in the internalization of chloramphenicol by disrupting the bacterial membrane, which may cause higher antibacterial activity observed when combined than when the compounds were used alone. Similar results were found by Zharkova et al. (2019), which stated that the majority of the synergistic interactions they observed involved AMPs that significantly affected the permeability of bacterial

membranes and antibiotics that interfered with the biosynthesis of nucleic acids and proteins, being necessary for antibiotics to exert their microbicidal action inside of cells (Zharkova et al. 2019).

This hypothesis was corroborated by SEM and CLSM analysis, which provided some insights into the mechanism of antibacterial activity of the SAMPs against *E. faecalis*. CLSM analysis showed higher PI uptake by the bacterial cells treated with a combination of peptides and antibiotics than the control cells treated only with DMSO or chloramphenicol ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Since PI red fluorescence is emitted only when the dye interacts with the DNA of cells with their membrane damaged, it indicates that the bacterial membrane of *E. faecalis* was damaged when treated with the AMPs and chloramphenicol in combination (Souza et al. 2020). Correspondingly, the morphology of the *E. faecalis* cells treated with the combination of peptides ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$), observed by SEM analysis, displayed cell membrane damage. It has been suggested that these peptides might induce pore formation and disrupt the bacterial cell membrane.

Furthermore, at subinhibitory concentrations, AMPs can also induce the modulation of bacterial pathogens' expression and secretion of virulence, resistance, or colonization effectors (Duperthuy 2020). Accordingly, in a recent study, proteomic analysis was applied in *Klebsiella pneumonia* treated with *Mo*-CBP₃-PepI, showing changes in its essential metabolic pathways (Branco et al. 2022). For instance, Branco et al. (2022) found a reduction in the abundance of protein related to DNA and protein metabolism, cytoskeleton and cell wall organization, redox metabolism, regulation factors, ribosomal proteins, and resistance to antibiotics (Branco et al. 2022). Along these lines, the peptides *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, *Mo*-CBP₃-PepIII, *RcAlb*-PepI, *RcAlb*-PepII, *RcAlb*-PepIII, PepGAT, and PepKAA may be responsible for causing changes in essential characteristics of the *E. faecalis* cells, resulting in a modulation of the antibacterial activity of the chloramphenicol against this microorganism.

Consequently, the antibacterial activity of chloramphenicol is two-fold higher when used in combination with the SAMPs than when compared to its activity alone. It is especially important to note the relevancy of reducing the therapeutic dose of chloramphenicol, since it may allow the minimization of its side effects (Linard De Carvalho et al. 2019). Also, using a combination of antimicrobials with different targets is essential to overcome the various resistance mechanisms developed by pathogens, enhancing the effectiveness of both compounds (Zharkova et al. 2019).

In addition, *E. faecalis* can form a biofilm, a mechanism that confers strong antibiotic resistance, increasing drug resistance up to 1000-fold if compared to free cells (McEwen and Collignon 2018; Willett et al. 2021). Here, the peptides *Mo*-CBP₃-PepII and PepGAT inhibited the formation of *E. faecalis* biofilm by a

maximum of 22 and 21%, respectively. Similar results were observed by COSTA et al. (2018), in which the antimicrobial peptide BLS P34 inhibited biofilm formation of *E. faecalis* isolates by 2-31% (Costa et al. 2018).

Besides, it is important to notice previous studies have shown that the peptides (*Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, *Mo*-CBP₃-PepIII, *Rc*Alb-PepI, *Rc*Alb-PepII, *Rc*Alb-PepIII, PepGAT, and PepKAA) are not toxic to types A, B and O of human erythrocytes or to Vero cell line at concentrations up to 500 µg.mL⁻¹ (Oliveira et al. 2019; Dias et al. 2020; Lima et al. 2020; Souza et al. 2020). Furthermore, these peptides do not present toxicity to other human cells, such as fibroblasts (L929 and MRC-5 cell lines) keratinocytes (HaCat), or zebrafish embryos (Souza et al. 2022). Regarding allergenicity, *in silico* tests showed that none of the peptides presented allergenic potential when analyzed in databases of known primary allergic epitopes (Oliveira et al. 2019; Dias et al. 2020; Souza et al. 2020).

Shortly, researchers should consider using the antibiotics already on the market and rediscover old and abandoned antimicrobials for prospective treatments that may be used alone or, possibly better, in combination with other medications (Čiviljak et al. 2014). Considering this, the association of SAMPs with conventional antibiotics represents a therapeutic option for infections caused by resistant bacteria.

Nonetheless, this study focused on only one bacterial strain (ATCC 51299), which can be considered a limitation of the study. Thus, future research should address the antibacterial potential of the SAMPs against different *E. faecalis* strains and also other relevant species, such as *E. faecium*.

Overall, our study demonstrated that, *in vitro*, the antimicrobial peptides *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, *Mo*-CBP₃-PepIII, *Rc*Alb-PepI, *Rc*Alb-PepII, *Rc*Alb-PepIII, PepGAT and PepKAA combined with the antibiotic chloramphenicol represents a promising alternative for developing a new antimicrobial agent against *E. faecalis*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Federal University of Ceará (UFC, Fortaleza, CE, Brazil) for their collaboration and for providing the synthetic antimicrobial peptides.

CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interest declared.

FUNDING

This work was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brasil (CAPES, <http://www.capes.gov.br/>) – Finance Code 001 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, <http://www.cnpq.br/>) which provided research and scholarship.

REFERENCES

- Andersson DI, Hughes D, Kubicek-Sutherland JZ. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist Updat* 2016;**26**:43–57.
- Assoni L, Milani B, Carvalho MR et al. Resistance Mechanisms to Antimicrobial Peptides in Gram-Positive Bacteria. *Front Microbiol* 2020;**11**:2362.
- Branco LAC, Souza PFN, Neto NAS et al. New Insights into the Mechanism of Antibacterial Action of Synthetic Peptide Mo-CBP3-PepI against *Klebsiella pneumoniae*. *Antibiotics* 2022;**11**, DOI: 10.3390/antibiotics11121753.
- Chin NX, Weitzman I, Della-Latta P. In vitro activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with fluconazole and itraconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;**41**:850–2.
- Čivljak R, Giannella M, Di Bella S et al. Could chloramphenicol be used against ESKAPE pathogens? A review of in vitro data in the literature from the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014;**12**:249–64.
- CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2018:91.
- Costa GA, Rossatto FCP, Medeiros AW et al. Evaluation antibacterial and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P34 against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *An Acad Bras Cienc* 2018;**90**:73–84.
- Costa RA, Ortega DB, Fulgêncio DLA et al. Checkerboard testing method indicates synergic effect of pelgipeptins against multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol Res Innov* 2019;**3**:187–91.
- Dias LP, Souza PFN, Oliveira JTA 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*. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2020;**1862**:183092.

Duperthuy M. Antimicrobial Peptides: Virulence and Resistance Modulation in Gram-Negative Bacteria.

Microorganisms 2020;**8**, DOI: 10.3390/MICROORGANISMS8020280.

Eliakim-Raz N, Lador A, Leibovici-Weissman Y et al. Efficacy and safety of chloramphenicol: joining the revival of old antibiotics? Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Antimicrob Chemother* 2015;**70**:979–96.

García-Solache M, Rice LB. The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. *Clin Microbiol Rev* 2019;**32**, DOI: 10.1128/CMR.00058-18.

Ghosh C, Haldar J. Membrane-Active Small Molecules: Designs Inspired by Antimicrobial Peptides.

ChemMedChem 2015;**10**:1606–24.

Gifoni JM, Oliveira JTA, Oliveira HD et al. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. *Biopolymers* 2012;**98**:406–15.

Haney EF, Mansour SC, Hancock REW. Antimicrobial peptides: An introduction. *Methods in Molecular Biology*. Vol 1548. Humana Press Inc., 2017, 3–22.

Hidron AI, Edwards JR, Patel J et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;**29**:996–1011.

Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence* 2012;**3**:421–569.

Huan Y, Kong Q, Mou H et al. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol* 2020;**11**:2559.

Jabbari SM, Shiadeh, Pormohammad A et al. Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*: A systematic review and meta-analysis. *Infect Drug Resist* 2019;**12**:2713–25.

Khan A, Davlieva M, Panesso D et al. Antimicrobial sensing coupled with cell membrane remodeling mediates antibiotic resistance and virulence in *Enterococcus faecalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;**116**:26925–

32.

Lima PG, Oliveira JTA, Amaral JL et al. Synthetic antimicrobial peptides: Characteristics, design, and potential as alternative molecules to overcome microbial resistance. *Life Sci* 2021;**278**, DOI:

10.1016/J.LFS.2021.119647.

Lima PG, Souza PFN, Freitas CDT et al. Anticandidal activity of synthetic peptides: Mechanism of action revealed by scanning electron and fluorescence microscopies and synergism effect with nystatin. *J Pept Sci* 2020;**26**:e3249.

Lin X, Kaul S, Rounsley S et al. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nat* 1999 4026763 1999;**402**:761–8.

Linard De Carvalho AB, Cruz CA, Almeida De Freitas CL et al. Chemical Profile, Antibacterial Activity and Antibiotic-Modulating Effect of the Hexanic *Zea mays* L. Silk Extract (Poaceae). *Antibiot* 2019, Vol 8, Page 22 2019;**8**:22.

Maia DSV, Haubert L, Kroning IS et al. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from food poisoning outbreaks and effect of *Butia odorata* Barb. Rodr. Extract on planktonic and biofilm cells. *LWT* 2020;**117**:108685.

McEwen SA, Collignon PJ. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr* 2018;**6**, DOI: 10.1128/MICROBIOLSPEC.ARBA-0009-2017/ASSET/F012945C-D054-4E7E-AEFF-DD2EB5D9869D/ASSETS/GRAPHIC/ARBA-0009-2017-FIG4.GIF.

Moravej H, Moravej Z, Yazdanparast M et al. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. 2017, DOI: 10.1089/mdr.2017.0392.

Nešuta O, Buděšínský M, Buděšínský B et al. How proteases from *Enterococcus faecalis* contribute to its resistance to short α -helical antimicrobial peptides. *Pathog Dis* 2017;**75**:91.

Neto NAS, Aguiar TKB, Costa RJP et al. United we stand, divided we fall: in-depth proteomic evaluation of the synergistic effect of Mo-CBP3-PepI and Ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biofouling* 2023;**39**:838–52.

Neto NAS, Oliveira JTA, Aguiar TKB et al. Synergistic Antibiofilm Activity between Synthetic Peptides and

- Ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. *Pathogens* 2022;**11**, DOI: 10.3390/pathogens11090995.
- Oliveira JTA, Souza PFN, Vasconcelos IM 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* 2019;**157**:10–21.
- Oong GC, Tadi P. Chloramphenicol - StatPearls - NCBI Bookshelf. *StatPearls Publ* 2022.
- Park Y, Kim HJ, Hahm KS. Antibacterial synergism of novel antibiotic peptides with chloramphenicol. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**321**:109–15.
- Patel R, Uhl JIMR, Kohner P et al. Multiplex PCR Detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* Genes in *Enterococci*. *J Clin Microbiol* 1997;**35**:703–7.
- Sood S. Chloramphenicol – A Potent Armament Against Multi-Drug Resistant (MDR) Gram Negative *Bacilli*? *J Clin Diagn Res* 2016;**10**:DC01.
- Souza PFN, Marques LSM, Oliveira JTA et al. Synthetic antimicrobial peptides: From choice of the best sequences to action mechanisms. *Biochimie* 2020;**175**, DOI: 10.1016/j.biochi.2020.05.016.
- Souza PFN, Vantilburg MF, Mesquita FP et al. Neutralizing Effect of Synthetic Peptides toward SARS-CoV-2. *ACS Omega* 2022, DOI: 10.1021/acsomega.2c02203.
- Souza PFN, Vasconcelos IM, Silva FDA et al. A 2S albumin from the seed cake of *Ricinus communis* inhibits trypsin and has strong antibacterial activity against human pathogenic bacteria. *J Nat Prod* 2016;**79**:2423–31.
- Sung K, Khan S, Marasa B et al. Genomic sequence of a clinical vancomycin-resistant reference strain, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299. *Genome Announc* 2015;**3**:1–2.
- Tong Z, Zhang Y, Ling J et al. An In Vitro Study on the Effects of Nisin on the Antibacterial Activities of 18 Antibiotics against *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* 2014;**9**:e89209.
- Weiner LM, Webb AK, Limbago B et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2016;**37**:1288–301.

Wendler J, Schroeder BO, Ehmann D et al. Proteolytic Degradation of reduced Human Beta Defensin 1 generates a Novel Antibiotic Octapeptide. *Sci Reports 2019 91* 2019;**9**:1–12.

Willett JLE, Dale JL, Kwiatkowski LM et al. Comparative Biofilm Assays Using *Enterococcus faecalis* OG1RF Identify New Determinants of Biofilm Formation. *MBio* 2021;**12**, DOI: 10.1128/MBIO.01011-21.

Zharkova MS, Orlov DS, Golubeva OY et al. Application of Antimicrobial Peptides of the Innate Immune System in Combination With Conventional Antibiotics-A Novel Way to Combat Antibiotic Resistance? *Front Cell Infect Microbiol* 2019;**9**, DOI: 10.3389/FCIMB.2019.00128.

AUTHORS CONTRIBUTION STATEMENT

Patrícia Gomes Lima: Conceptualization, Investigation, Formal Analysis, Validation, and Writing— Original Draft. **Pedro Filho Noronha Souza:** Resources and Writing – review & editing. **Felipe Pantoja Mesquita:** Resources. **Thaís Larré Oliveira:** Resources. **Daiane Drawanz Hartwig:** Supervision, Resources, Project administration, Funding acquisition, and Writing – review & editing.

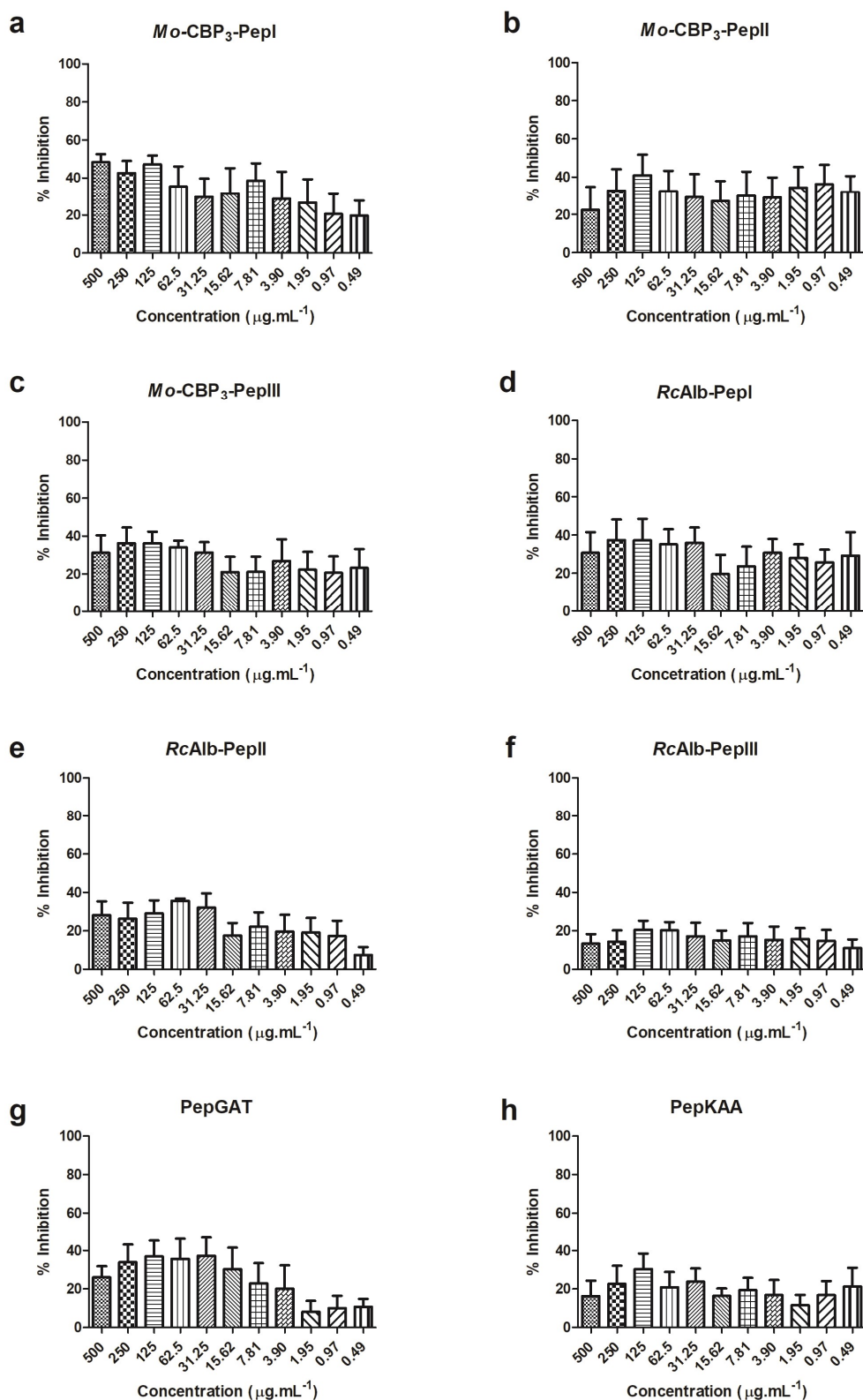


Figure 1 Antibacterial activity of SAMPs against *E. faecalis*. Data are shown as a percentage of inhibition. The percentage of inhibition is calculated based on bacterial cells treated with DMSO 5%, a negative inhibition control with 100% growth.

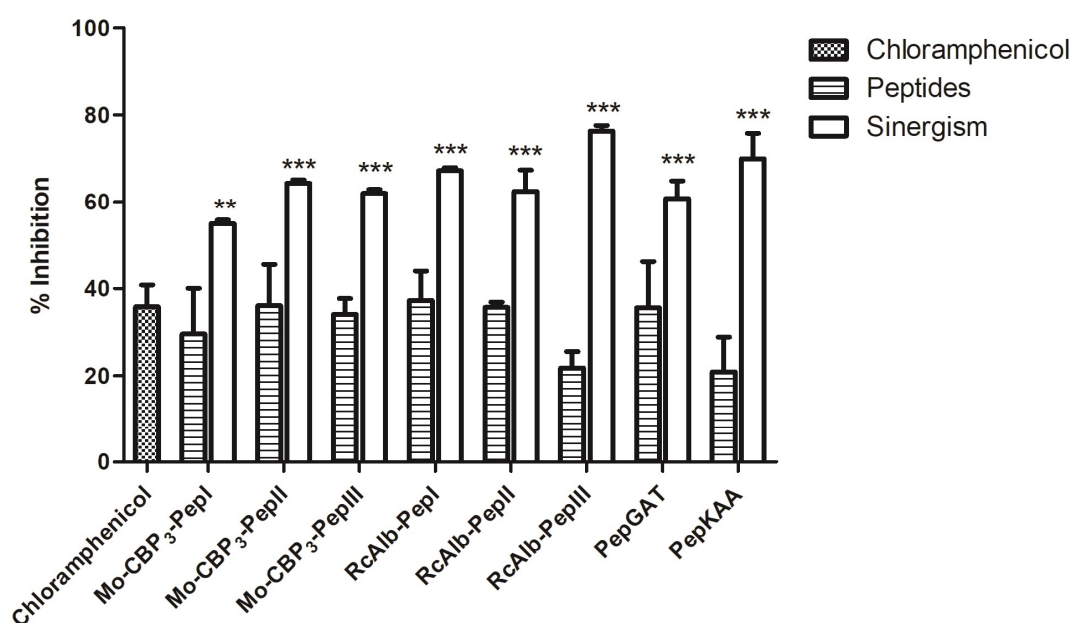


Figure 2 Combination of SAMPs ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) against *E. faecalis*. Results are expressed as each group's mean and standard error of the mean (SEM). The asterisks indicate a significant difference between groups when compared with chloramphenicol (** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

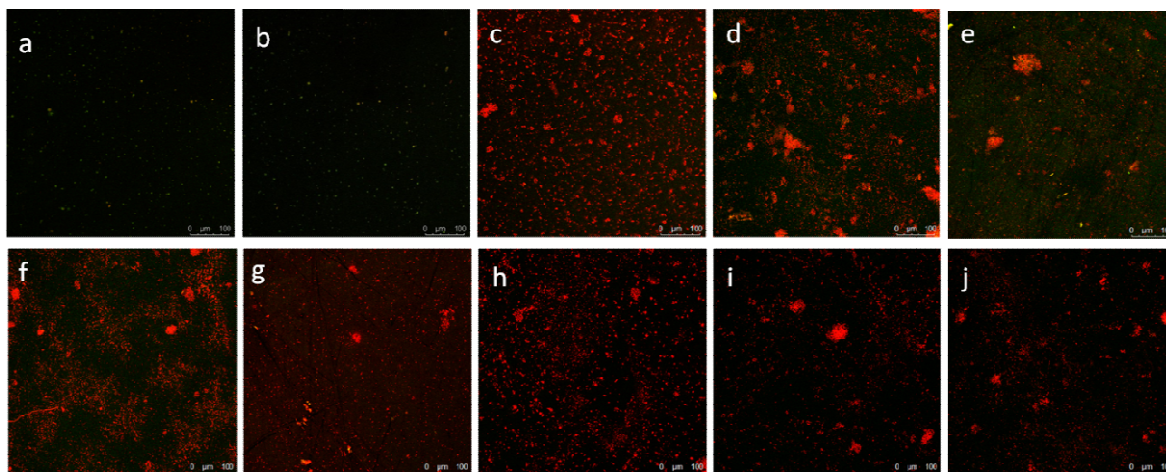


Figure 3 CLSM analysis. **a**: DMSO 5%; **b**: Chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **c**: *Mo*-CBP₃-PepI ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **d**: *Mo*-CBP₃-PepII ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **e**: *Mo*-CBP₃-PepIII ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **f**: *RcAlb*-PepI ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **g**: *RcAlb*-PepII ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **h**: *RcAlb*-PepIII ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **i**: PepGAT and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **j**: PepKAA ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

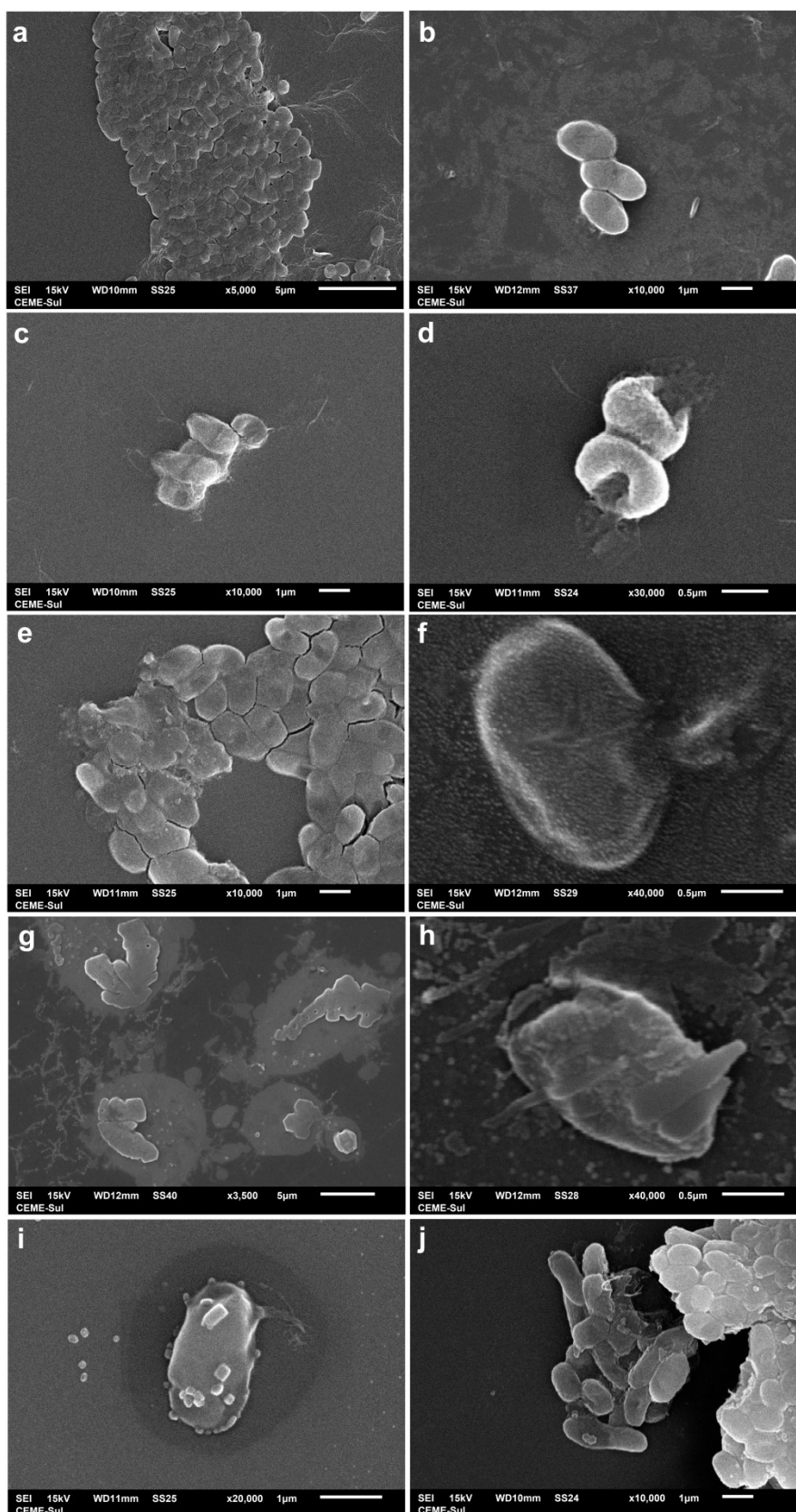


Figure 4 SEM analysis. **a:** DMSO 5%; **b:** Chloramphenicol (125 μg.mL⁻¹); **c:** *Mo*-CBP3-PepI (62.5 μg.mL⁻¹) and chloramphenicol (125 μg.mL⁻¹); **d:** *Mo*-CBP3-PepII (62.5 μg.mL⁻¹) and chloramphenicol (125 μg.mL⁻¹); **e:** *Mo*-

CBP3-PepIII ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **f**: *RcAlb*-PepI ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **g**: *RcAlb*-PepII ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **h** : *RcAlb*-PepIII ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **i**: PepGAT and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$); **j**: PepKAA ($62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

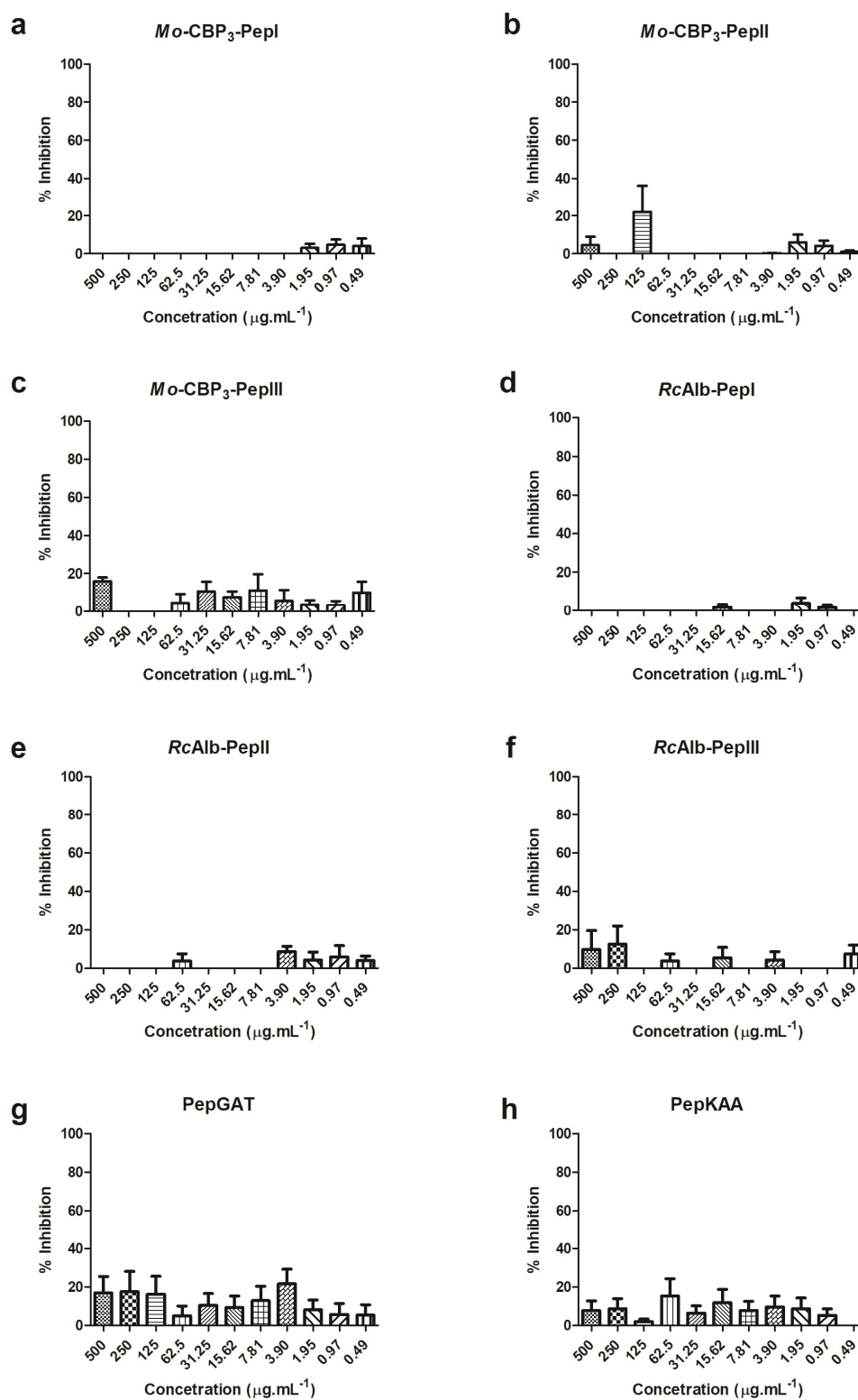


Figure 5 *E. faecalis* biofilm formation inhibition by SAMPs. Data are shown as the percentage of inhibition. The percentage of inhibition is calculated based on bacterial cells treated with DMSO 5%, a negative inhibition control with 100% growth.

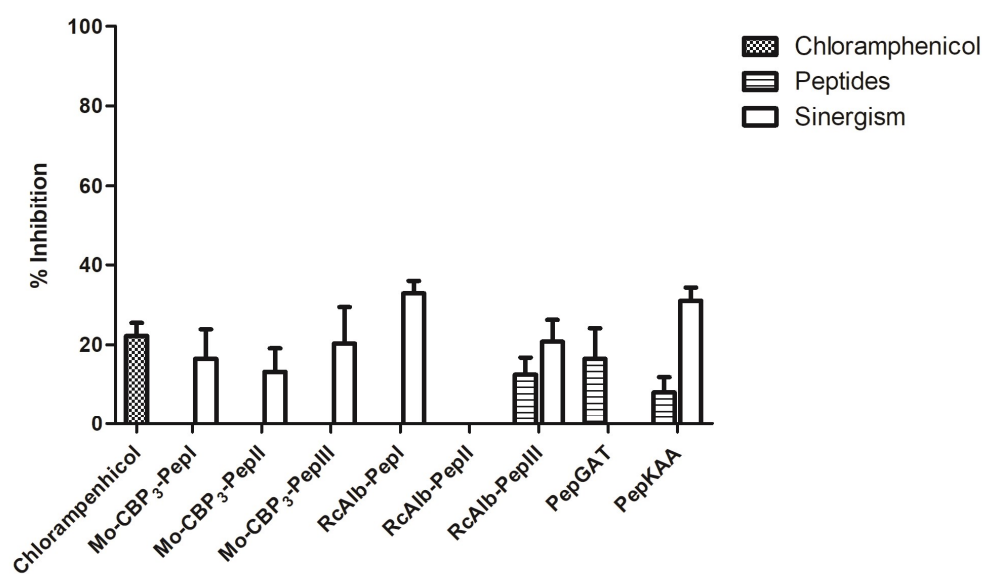


Figure 6 Combination of chloramphenicol and SAMPs against biofilm formation.

Table 1 Minimal inhibitory concentration (MIC) of SAMPs and chloramphenicol and Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI)

	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	FICI
<i>Mo</i>-CBP₃-PepI	>500 (1000)	0.5625 (A)
<i>Mo</i>-CBP₃-PepII	>500 (1000)	0.5625 (A)
<i>Mo</i>-CBP₃-PepIII	>500 (1000)	0.5625 (A)
<i>Rc</i>Alb-PepI	>500 (1000)	0.5625 (A)
<i>Rc</i>Alb-PepII	>500 (1000)	0.5625 (A)
<i>Rc</i>Alb-PepIII	>500 (1000)	0.5625 (A)
PepGAT	>500 (1000)	0.5625 (A)
PepKAA	>500 (1000)	0.5625 (A)
Chloramphenicol	250	

As displayed in parenthesis, the MIC higher than the tested concentrations was considered double the higher tested concentration for FICI calculations. MIC: Minimum Inhibitory Concentration; FICI: fractional inhibitory concentration index; (A): additive interaction effect.

4.2 Capítulo 2 – Patente de Invenção: PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA TRATAR INFECÇÕES CAUSADAS POR *Enterococcus faecalis*

Depósito de um pedido de patente ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI)

Número do Processo: BR 10 2024 015635 8

**PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA TRATAR INFECÇÕES CAUSADAS
POR *Enterococcus faecalis***

RESUMO

A presente invenção, classificada internacionalmente no setor técnico A61K (referente a preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas) e A61K 38/08 (preparações medicinais contendo peptídeos de 5 a 11 aminoácidos), refere-se ao uso de peptídeos sintéticos e sua associação com outros antibióticos, na produção de medicamento antibacteriano frente a bactérias da espécie *Enterococcus faecalis*. Esta invenção apresenta-se como uma alternativa às drogas utilizadas atualmente, podendo ser aplicada sozinha, como um novo medicamento, ou como adjuvante de outras drogas convencionais, como a Cloranfenicol. As principais vantagens da utilização dos peptídeos sintéticos são: 1- Sua alta atividade e especificidade; 2 - Atuam principalmente através de alterações na membrana celular, mecanismo com baixo risco de desenvolvimento de resistência; 3 - Podem ser utilizados como adjuvantes de drogas já existentes; 4 - Baixa toxicidade; 5 - Baixo custo de obtenção dos peptídeos.

**PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA TRATAR INFECÇÕES CAUSADAS
POR *Enterococcus faecalis***

Campo da invenção

[001] A presente invenção, classificada internacionalmente no setor técnico A61K (referente a preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas) e A61K 38/08 (preparações medicinais contendo peptídeos de 5 a 11 aminoácidos), refere-se ao uso de peptídeos sintéticos e sua associação com outros antibióticos, na produção de medicamento antibacteriano para tratamento de infecções causadas por bactérias da espécie *Enterococcus faecalis*.

Fundamentos da invenção

[002] A resistência antimicrobiana representa uma das principais ameaças à saúde pública mundial do século XXI. Predições indicam que 2,4 milhões de pessoas morrerão de infecções por microrganismos resistentes nos próximos 30 anos somente nos continentes da Europa, América do Norte e Austrália, podendo custar até US\$ 3,5 bilhões por ano (OECD, 2018). Além disso, é previsto que no ano de 2050 as mortes causadas por resistência antimicrobiana mundialmente chegariam a 10 milhões (GHOSH, C., SARKAR, P., ISSA, R., & HALDAR, J. **Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance. Trends in microbiology**, 2019).

[003] A ocorrência de resistência antimicrobiana pode se dar naturalmente, devido às características intrínsecas do micro-organismo ou ser adquirida, devido à mutações ou transferências de genes de resistência (**SABTU, N.; ENOCH, D. A.; BROWN, N. M. Antibiotic resistance: what, why, where, when and how. Br Med Bull, [s.l.], v. 116, n. 1, p. 1093, 2015**). Apesar de ser inevitável, já que é um processo natural evolutivo, o desenvolvimento de resistência antimicrobiana foi agravado devido à pressão seletiva impulsionada principalmente por conta do mau uso das drogas antimicrobianas. Dentre essas práticas pode-se citar o uso excessivo de antibióticos, o não cumprimento do tratamento da forma recomendada e a prescrição inadequada por parte de profissionais da saúde (**VENTOLA, C. LEE. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. Pharmacy and therapeutics, v. 40, n. 4, p. 277, 2015**).

[004] Neste contexto, o gênero *Enterococcus* apresenta grande relevância em relação à saúde pública mundial. Deste modo, esse grupo é a terceira principal causa de infecções nosocomiais e infecções primárias da corrente sanguínea associadas aos cuidados de saúde, estimando-se que sejam responsáveis por 25-50% dos casos de mortalidade entre pacientes hospitalizados (**SHIADEH, S. M. J., PORMOHAMMAD, A., HASHEMI, A., & LAK, P. Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*: a systematic review and meta-analysis. Infection and drug resistance, v. 12, p. 2713, 2019**). Em humanos, *E. faecalis* é uma das espécies mais abundantes desse gênero. Considerando somente Europa e Estados Unidos, *E. faecalis* foi o 5º micro-organismo

mais frequentemente isolado de infecções do trato urinário associadas a cateter e o 3º para infecções da corrente sanguínea (WEINER, L. M., WEBB, A. K., LIMBAGO, B., DUDECK, M. A., PATEL, J., KALLEN, A. J., EDWARDS, J. R., et al..Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infection control & hospital epidemiology*, v. 37, n. 11, p. 1288-1301, 2016). Além disso, esse quadro é agravado devido à resistência intrínseca e a tolerância a diversos antibióticos apresentada por essas bactérias.

[005] Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas expressas por essencialmente todos os organismos vivos, sendo responsáveis pela primeira linha de defesa contra a infecção por patógenos, eliminando-os e aumentando a resposta imune do organismo (HANEY, Evan F.; MANSOUR, Sarah C.; HANCOCK, Robert EW. *Antimicrobial peptides: an introduction*. In: *Antimicrobial Peptides*. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 3-22). Além disso, os PAMs mostram um amplo espectro de atividades antimicrobianas, atuando contra bactérias, parasitas, vírus e fungos. Assim, eles representam uma alternativa para o tratamento de micro-organismos resistentes.

[006] Um dos principais modos de ação dos PAMs, e mais amplamente estudado, é a permeabilização da membrana citoplasmática. Assim, devido ao alvo principal de ação dos PAMs serem as membranas celulares e não um processo de biossíntese do micro-organismo, eles são considerados uma opção para reduzir a chance de desenvolvimento de

resistência (GHOSH, Chandradhish; HALDAR, Jayanta. **Membrane-Active Small Molecules: Designs Inspired by Antimicrobial Peptides**. *ChemMedChem*, v. 10, n. 10, p. 1606- 1624, 2015).

[007] Novos antimicrobianos, incluindo PAMs, podem ser descobertos isolando-os de uma fonte natural. No entanto, este caminho clássico para descobrir novas moléculas não é adequado para o processo de escalonamento, uma vez que pode ser demorado, ter baixo rendimento e alto custo de produção. Além disso, os PAMs de ocorrência natural podem possuir algumas características indesejáveis a sua aplicação terapêutica, como instabilidade devido à degradação por proteases do hospedeiro, baixa seletividade, baixa hidrossolubilidade, atividade hemolítica, toxicidade ao hospedeiro e sensibilidade ao sal (BOTO, A.; PÉREZ DE LA LASTRA, J.; GONZÁLEZ, C. **The Road from Host-DefensePeptidesto a New Generation of Antimicrobial Drugs**. *Molecules*, v. 23, n. 2, p. 311,2018. DE OLIVEIRA, David M. P. et al. **Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens**. *Clinical microbiology reviews*, v. 33, n. 3, p. e00181-19, 2020).

[008] A fim de superar essas desvantagens, tem-se como alternativa os peptídeos antimicrobianos sintéticos (PAMSs). Essas moléculas são produzidas com base no desenho racional que relaciona estrutura com a atividade dessas moléculas, uma vez que cada aminoácido é adicionado sequencialmente ao PAMS, sendo possível fazer modificações pontuais, analisando e otimizando essas moléculas (HANEY, Evan F.; MANSOUR, Sarah C.; HANCOCK, Robert EW.

Antimicrobial peptides: an introduction. In: Antimicrobial Peptides. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 3-22).

[009] Adicionalmente, o uso de PAMs em conjunto com antibióticos já aprovados pode resultar em sinergismo, aumentando a eficácia desses antibióticos. O principal motivo da interação sinérgica entre PAMs e outros agentes antimicrobianos é que a maioria dos peptídeos é capaz de causar a formação de poros nas membranas microbianas, o que facilita a entrada dos fármacos na célula, permitindo a inibição da síntese de DNA, síntese de proteína ou síntese da parede celular. Consequentemente, esta combinação pode ser eficaz para superar os mecanismos de resistência que envolve a membrana celular microbiana, como a baixa penetrabilidade da droga. Outra vantagem do uso combinado é a redução da dose efetiva, minimizando o potencial de toxicidade e reduzindo os custos do tratamento (LI, Jiarui; FERNÁNDEZ-MILLÁN, Pablo; BOIX, Ester. **Synergism between host defence peptides and antibiotics against bacterial infections. Current Topics in Medicinal Chemistry, v. 20, n. 14, p. 1238-1263, 2020).** Assim, pode prevenir o desenvolvimento de resistência aos medicamentos e prolongar a vida útil dos agentes antimicrobianos tradicionais.

[0010]Recentemente, oito peptídeos antimicrobianos sintéticos, racionalmente desenhados baseados em proteínas vegetais, demonstraram resultados promissores e com potencial para serem utilizados como tratamento antimicrobiano alternativo para substituir ou complementar os já existentes. São eles: Mo-CBP3-PepI, Mo-CBP3-PepII e Mo-CBP3-PepIII, RcAlb-PepI, RcAlb-PepII e RcAlb-PepIII,

PepGAT e PepKAA. Esses peptídeos já demonstraram potente atividade antifúngica contra *Tricophytonrubrum* e *T. mentagrophytes* (BR1020210047143) e *Penicillium* sp. (BR1020210073942). Além disso, eles também demonstraram atividade contra bactérias, como *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (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, 2019; 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, 2020), comprovando o potencial de utilização desses PAMSS contra bactérias patogênicas.

Descrição da invenção

[0011]A presente invenção consiste no uso de peptídeos sintéticos com atividade antibacteriana frente a bactérias da espécie *Enterococcus faecalis*, bem como, sua combinação ao antibiótico cloranfenicol.

[0012]Todos os peptídeos citados nesta patente (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8) foram desenhados tomando como base a sequência de diferentes proteínas vegetais. Os peptídeos SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:3 foram desenhados a partir da sequência de uma

proteína antimicrobiana purificada de sementes de *Moringa oleifera* (Mo-CBP3). SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 e SEQ ID NO:6 foram desenhados a partir da proteína albumina 2S, que possui atividade antimicrobiana e foi purificada da torta da semente de *Ricinus communis*. SEQ ID NO:7 e SEQ ID NO:8 foram desenhados a partir da proteína quitinase de *Arabidopsis thaliana* (número de acesso NCBI NP_181885.1).

[0013] Para o desenho dos peptídeos foram utilizadas ferramentas de bioinformática disponíveis gratuitamente online, conforme descrito por **(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, 2019)**. O software foi CePAmP de acesso gratuito (http://bioserver-3.bioacademy.gr/Bioserver/C-PAmP/Peptide_index.php) e os peptídeos tiveram que cumprir os seguintes critérios: carga líquida positiva; baixa massa molecular (600-1200 Da); índice de Boman $\leq 2,5$; pelo menos 40% de potencial hidrofóbico. Esses critérios foram avaliados usando a ferramenta Banco de dados de peptídeos antimicrobianos (<http://aps.unmc.edu/AP/>).

[0014] Os peptídeos sintéticos foram sintetizados quimicamente pela empresa Chempeptide (Shanghai, China). A qualidade e a pureza ($\geq 95\%$) foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC, JASCO, EASTON, MD, EUA) e espectrometria de massa (Waltham, MA, EUA).

[0015] Todos os peptídeos propostos nesse inventário foram avaliados em diversos meios quanto a sua toxicidade e

alergenicidade. Durante o desenho, todas as sequencias foram confrontadas contra bancos de dados de toxicidade, alergenicidade e hemólise. E os resultados mostraram que os peptídeos não apresentam nenhum indício de toxicidade, alergenicidade ou efeito hemolítico. Dados experimentais mostraram que todos os peptídeos são seguros, não apresentando toxicidade contra eritrócitos de coelhos e células Vero de macacos. Partindo para os humanos, todos os peptídeos testados contra os três tipos de eritrócitos humanos (A, B e O) não apresentaram nenhum efeito tóxico mesmo em concentrações 10 vezes maiores que sua concentração antimicrobiana (concentração usada para inibir 100% o crescimento de micro-organismos). Partindo para outros tipos celulares, os peptídeos, mesmo em altas concentrações, não apresentaram nenhuma toxicidade contra fibroblastos e queratinócitos humanos.

[0016] Preferencialmente, o método pode ser realizado obedecendo ao protocolo descrito a seguir. Pode ser adotada técnica de microdiluição em caldo utilizando placas de poliestireno como estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100 (ISBN 1-56238-804-5 [Print]; ISBN 1-56238-805-3 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2017)* para determinar a concentração mínima inibitória (CMI) dos peptídeos frente a bactéria. Além disso, recomenda-se a diluição dos peptídeos em solução salina (NaCl 0,15 M) contendo 5% dimetilsulfóxido (DMSO), nas concentrações que podem

variar de 0,5 a 500 µg/mL. Em relação ao inóculo, é preferível que ele seja padronizado na densidade ótica (DO) de 0,1 (600 nm). Recomenda-se também que para testar o sinergismo dos peptídeos com outros agentes antibacterianos, sejam combinados na proporção de 1:1 (v/v), nas concentrações a serem testadas, que podem variar de 0,5 a 500 µg/mL. Em seguida, as placas devem ser incubadas por 24 h, e sua DO aferida após esse período. A determinação da CMI do antibiótico cloranfenicol pode ser realizada de forma semelhante à descrita para os peptídeos.

Exemplos de concretizações da invenção

[0017] Para permitir uma melhor compreensão da presente invenção, é apresentado a seguir um exemplo de possível combinação para esta invenção. De acordo com os potenciais de aplicação da presente invenção e de forma somente ilustrativa, sem a intenção de limitar em qualquer circunstância a abrangência da presente invenção, é descrito a seguir uma das possíveis utilizações dos peptídeos sintéticos antimicrobianos inibindo *E. faecalis*.

Exemplo 1

[0018] A bactéria utilizada foi a *Enterococcus faecalis*, cepa padrão ATCC® 51299™ (*American Type Culture Collection*). Eles foram mantidos congelados (-20°C) e reativados em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Kasvi®), a 37°C por 16-18 horas. A atividade antimicrobiana foi avaliada através da Técnica de Microdiluição em Caldo em placas de poliestireno como estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (**CLINICAL AND LABORATORY**

STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100 (ISBN 1-56238-804-5 [Print]; ISBN 1-56238-805-3 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2017), determinando a porcentagem de inibição do crescimento bacteriano em relação ao controle (SOUZA, P. F. N. et al. **Synthetic antimicrobial peptides: From choice of the best sequences to action mechanisms. Biochimie, v. 175, p. 132-145, 2020).** Foram feitas diluições seriadas de razão dois dos peptídeos, testando concentrações de 0,49 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em solução salina (NaCl 0,15 M) contendo 5% dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, foram adicionados 50 μL do inóculo bacteriano preparado em caldo BHI, padronizado por densidade ótica (600nm). Como controle foi utilizado solução de DMSO 5% em salina (100% de crescimento). As placas foram incubadas a 37°C por 24h, após esse período a porcentagem de inibição do crescimento bacteriano foi calculada. Semelhantemente, foi testada a atividade antimicrobiana do antibiótico cloranfenicol (0,49 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) contra *E. faecalis*. Ademais, foram testadas combinações de PAMSS (0,49 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com cloranfenicol (0,49 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), para determinar possíveis combinações com efeito de sinergismo.

Resultados

[0019] Os peptídeos (0,49 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) inibiram o crescimento de *E. faecalis* de 20 a 48%, com concentração mínima inibitória >500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Já o antibiótico cloranfenicol (0,49 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) inibiu de 24 a 96% do crescimento da bactéria, com concentração mínima

inibitória de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Combinações das concentrações subinibitórias dos peptídeos (62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), inibindo de 20,8 a 37,3% sozinho, e de cloranfenicol (125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), inibindo 35,8% sozinho, resultaram em maior porcentagem de inibição de *E. faecalis* do que das moléculas separadas (Tabela 1). Nesse contexto, os máximos de inibição das combinações variaram entre 54-76% (Tabela 1). Assim, a combinação dos peptídeos ao antibiótico cloranfenicol aproximadamente dobrou a atividade antibacteriana que os compostos apresentavam sozinhos. Indicando que os peptídeos testados apresentam efeito aditivo e modulador com cloranfenicol.

Tabela 1. Atividade antibacteriana dos peptídeos e combinação com cloranfenicol

Agente antimicrobiano	Inibição (%)	Combinação	Inibição (%)	FICI	FM
SEQ ID NO:1	29,5	SEQ ID NO:1/CHL	54,9	0,56 (A)	2
SEQ ID NO:2	36	SEQ ID NO:2/CHL	64,3	0,56 (A)	2
SEQ ID NO:3	34,1	SEQ ID NO:3/CHL	61,9	0,56 (A)	2
SEQ ID NO:4	37,3	SEQ ID NO:4/CHL	67,2	0,56 (A)	2
SEQ ID NO:5	35,7	SEQ ID NO:5/CHL	62,4	0,56 (A)	2
SEQ ID NO:6	21,7	SEQ ID NO:6/CHL	76,3	0,56 (A)	2
SEQ ID NO:7	35,6	SEQ ID NO:7/CHL	60,7	0,56 (A)	2
SEQ ID NO:8	20,8	SEQ ID NO:8/CHL	69,9	0,56 (A)	2
CHL	35,8				

CHL: cloranfenicol. FICI: índice da concentração fracionada inibitória; (A): efeito de interação aditiva;

FM: fator modulatório (Peptídeos são capazes de reduzir a CIM do cloranfenicol). Os resultados do FICI foram interpretados da seguinte forma: $FICI \leq 0,50$ = sinergismo; $0,50 < FICI \leq 1,0$ = aditividade; $1,0 < FICI \leq 4,0$ = indiferença e $FICI > 4,0$ = antagonismo.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO:1

Moringa oleífera

Sequência de aminoácidos do peptídeo Mo-CBP3-PepI

CPAIQRCC

SEQ ID NO:2

Moringa oleífera

Sequência de aminoácidos do peptídeo Mo-CBP3-PepII

NIQPPCRCC

SEQ ID NO:3

Moringa oleífera

Sequência de aminoácidos do peptídeo Mo-CBP3-PepIII

AIQRCC

SEQ ID NO:04

Ricinus communis

Sequência de aminoácidos do peptídeo RcAlb-PepI

AKLIPTIA

SEQ ID NO:05

Ricinus communis

Sequência de aminoácidos do peptídeo RcAlb-PepII

AKLIPTIAL

SEQ ID NO:06

Ricinus communis

Sequência de aminoácidos do peptídeo RcAlb-PepIII

SLRGCC

SEQ ID NO:07

Arabidopsis thaliana

Sequência de aminoácidos do peptídeo PepGAT
GATIRAVNSR

SEQ ID NO:08

Arabidopsis thaliana

Sequência de aminoácidos do peptídeo PepKAA
KAANRIKYFQ

REIVINDICAÇÕES

1) PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA TRATAR INFECÇÕES CAUSADAS POR *Enterococcus faecalis*, conforme reivindicação 1, **caracterizado por** peptídeos que possuem as seguintes sequências de aminoácidos: SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7 e SEQ ID N° 8;

2) PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA TRATAR INFECÇÕES CAUSADAS POR *Enterococcus faecalis*, conforme reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** ter peptídeos desenhados a partir da sequência completa de três proteínas vegetais [proteína de ligação à quitina de *Moringa oleífera* (Mo-CBP3), proteína albumina 2S da semente de *Ricinus communis* (RcAlb) e quitinase de *Arabidopsis thaliana* (número de acesso NCBI NP_181885.1)];

3) PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA TRATAR INFECÇÕES CAUSADAS POR *Enterococcus faecalis*, conforme a reivindicação 1 a 3, **caracterizado por** inibir o crescimento das células de *E. faecalis in vitro*, com peptídeos de forma individual nas concentrações de 0,5 a 500 µg/mL;

4) PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA TRATAR INFECÇÕES CAUSADAS POR *Enterococcus faecalis*, conforme reivindicações 1 a 4, **caracterizado por** inibir o crescimento das células de *E. faecalis in vitro*, com peptídeo (62,5 µg.mL⁻¹) e cloranfenicol (125 µg.mL⁻¹) de forma combinada;

5) PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA TRATAR INFECÇÕES CAUSADAS POR

Enterococcus faecalis, conforme reivindicações 3 a 5, **caracterizado por** apresentar efeito aditivo e modulador com o antibiótico cloranfenicol;

6) PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA TRATAR INFECÇÕES CAUSADAS POR *Enterococcus faecalis*, conforme reivindicações de 1 a 6, **caracterizado por** os peptídeos serem usados isoladamente, em diferentes combinações ou em diferentes concentrações entre eles ou com outros antibióticos;

7) PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA TRATAR INFECÇÕES CAUSADAS POR *Enterococcus faecalis*, conforme reivindicações de 1 a 7, **caracterizado por** uso como antibacteriano através das seguintes vias de administração: via oral, sublingual, parenteral, cutânea, nasal, oftálmica, auricular, pulmonar, vaginal e retal;

8) PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA TRATAR INFECÇÕES CAUSADAS POR *Enterococcus faecalis*, conforme reivindicações de 1 a 8, **caracterizado por** uso como antibacteriano através das seguintes formas farmacêuticas: comprimido, cápsula, pastilhas, drágeas, pós para reconstituição, gotas, xarope, soluções e suspensões injetáveis, soluções tópicas, pomadas, cremes, loção, gel, adesivos, spray e gotas nasais, colírios e pomadas oftálmicas, gotas auriculares ou otológicas e pomadas auriculares, aerossol, comprimidos vaginais, cremes, pomadas, óvulos, supositórios e enemas.

4.3 Capítulo 3 – Manuscrito formatado de acordo com a revista *Journal of Applied Microbiology*

**Synthetic antimicrobial peptides modulate the antibacterial activity of vancomycin against
clinical isolates of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium***

LIMA, Patrícia Gomes^a; SOUZA, Pedro Filho Noronha^b; HARTWIG, Daiane Drawanz^a

^a Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, CEP: 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

^b Drug Research and Development Center, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, CEP: 60430-275, Fortaleza, CE, Brazil.

§Corresponding author:

Daiane Drawanz Hartwig

Federal University of Pelotas, University Campus, CEP 96010–900, Pelotas, RS, Brazil.

Email: daianehartwig@gmail.com

Fone: +555332757616

Running headline: SAMPs against VRE

ABSTRACT

Aims

Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) is classified as a high-priority bacterial pathogen and is one of the leading causes of healthcare-associated infections (HAIs). Synthetic antimicrobial peptides (SAMPs) are emerging as a promising strategy to combat antimicrobial resistance. This study aimed to evaluate the antibacterial activity of eight SAMPs against VRE clinical isolates and to investigate their combined effect with vancomycin.

Methods and Results

Eight SAMPs named *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, *Mo*-CBP₃-PepIII, *Rc*Alb-PepI, *Rc*Alb-PepII, *Rc*Alb-PepIII, PepGAT, and PepKAA were tested *in vitro* for antibacterial activity against four VRE clinical isolates and *E. faecium* NCTC[®] 12202 using the broth microdilution method. The VRE isolate with the highest

resistance to vancomycin, showing only 35% growth inhibition, was the most responsive to combination therapy with SAMPs and vancomycin. Using the checkerboard method, vancomycin combined with *Mo*-CBP₃-PepI achieved a 64% inhibition rate, representing a 2- to 5-fold increase in activity compared to vancomycin alone. The maximum biofilm inhibition was 33% with SAMPs, while biofilm degradation reached 46%.

Conclusions

SAMPs, either alone or in combination with vancomycin, exhibit significant antibacterial activity against VRE clinical isolates.

Impact Statement

SAMPs, when used in combination with vancomycin, hold the potential for the development of novel antibacterial agents targeting VRE.

KEYWORDS: antibacterial activity, synergy, VRE, synthetic antimicrobial peptides, SAMP

1. INTRODUCTION

Enterococci are part of the normal microbiota of the gastrointestinal tract in both humans and animals (García-Solache and Rice 2019). However, in recent decades, enterococci have emerged as a leading cause of hospital-acquired infections, evolving rapidly into a globally significant nosocomial pathogen (Zhou et al. 2020). As these infections are primarily associated with healthcare-associated infections (HAIs), enterococci rank among the major causes of urinary tract infections (UTIs), bacteremia, endocarditis, wound infections, and infections related to catheters and other implanted medical devices (García-Solache and Rice 2019).

In addition, enterococci possess a broad array of resistance genes, with the development of resistance to glycopeptides, such as vancomycin, being particularly notable (Zhou et al. 2020). In 2024, the World Health Organization classified vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) as a high-priority bacterial pathogen (WHO 2024). The *vanA* and *vanB* genes are the primary mechanisms conferring high-level vancomycin resistance in enterococci (O'Toole et al. 2023).

An estimated 14,300 deaths worldwide in 2019 were attributed to vancomycin resistance in *E. faecium* infections, while 51,500 deaths were linked to resistance to one or more drugs (Murray et al. 2022). Moreover, studies have demonstrated that VRE infections are associated with higher hospitalization and mortality rates compared to infections caused by vancomycin-susceptible *Enterococcus* strains (Puchter et al. 2018).

Given these challenges, it is crucial to develop effective treatments against this resistant pathogen. Synthetic antimicrobial peptides (SAMPs) have emerged as one of the most promising alternatives for combating resistant microbes. Their primary mechanism of action involves disrupting microbial cell membranes, providing a broad spectrum of antimicrobial activity that is effective against bacteria, viruses, parasites, and fungi (Huan et al. 2020).

In this study, we evaluated the antimicrobial activity of the SAMPs *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, and *Mo*-CBP₃-PepIII (Oliveira et al. 2019); *Rc*Alb-PepI, *Rc*Alb-PepII, and *Rc*Alb-PepIII (Dias et al. 2020); and PepGAT and PepKAA (Souza et al. 2020) against vancomycin-resistant *E. faecium* isolates.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Peptides design

The peptides *Mo*-CBP₃-PepI (CPAIQRCC), *Mo*-CBP₃-PepII (NIQPPCRCC), and *Mo*-CBP₃-PepIII (AIQRCC) (Oliveira et al. 2019); *Rc*Alb-PepI (AKLIPTIA), *Rc*Alb-PepII (AKLIPTIAL), and *Rc*Alb-PepIII (SLRGCC) (Dias et al. 2020); PepGAT (GATIRAVNSR); and Pep-KAA (KAANRIKYFQ) were designed as previously described (Souza et al. 2020). These peptides were developed to meet specific criteria, including a net positive charge, low molecular weight (600–1200 Da), a Boman index ≤ 2.5 , and at least 40% hydrophobic potential. These characteristics were assessed using the Antimicrobial Peptide Database tool (<http://aps.unmc.edu/AP/>). All peptides were chemically synthesized by Chempeptide (Shanghai, China). The quality and purity of the peptides ($\geq 95\%$) were confirmed by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and mass spectrometry.

2.2 Bacterial Strains

In this study, four clinical isolates of *E. faecium* (biorepository numbers Etf1, Etf4, Etf5, and Etf7), the standard strains *E. faecium* NCTC[®] 12202 and *E. faecalis* ATCC[®] 51299 were used. The strains are part of the Laboratory of Bacteriology and Bioassays (LaBBio) collection at the Federal University of Pelotas (UFPel, Pelotas, RS, Brazil) and were provided by the Microbiology Laboratory of the School Hospital, Federal University of Pelotas (UFPel, Pelotas, RS, Brazil). The bacterial strains were stored at -20°C in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Kasvi[®]) supplemented with 10% glycerol.

2.3 Molecular analysis

Firstly, DNA extraction was performed by boiling method according to the previously described protocol with some modifications (Alduhaidhawiet et al. 2022). The bacterial suspension was centrifuged at $10,000 \times g$ for 2 min, the supernatant was discarded, and the pellet was washed twice with 1 mL of PBS and further centrifuged at $10,000 \times g$ for 2 min. Then the supernatant was discarded. A volume of 100 μ L of ultrapure water was added and cells were lysed in a heating block at 100 °C for 10 min and then were centrifuged at $10,000 \times g$ for 2 minutes. Finally, the supernatant was used as a DNA template.

Specific primers, *sodA* gene from *E. faecalis* (FL) and *sodA* gene from *E. faecium* (FM), and reaction conditions of PCR were used to species identification (Table 1). The presence and absence of virulence genes was also evaluated, including *van A*, *van B*, and *gelE* (Table 1). *E. faecium* NCTC® 12202 exhibits a vancomycin-resistant phenotype and harbors the vancomycin resistance gene *vanA* (Uttley et al., 1989). Similarly, *E. faecalis* ATCC® 51299 also displays a vancomycin-resistant phenotype but carries the *vanB* gene (Patel et al., 1997; Sung et al., 2015). Thus, DNA samples prepared from *E. faecium* NCTC® 12202 and *E. faecalis* ATCC® 51299 were used as positive controls for the *vanA* and *vanB* gene, respectively (Kuzucu et al., 2005). The 25 μ L PCR reaction mixture was composed of 13 μ L of Master Mix [Dream Taq PCR Master Mix (2X), Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, USA], 5 μ L of the DNA template, 5 μ L of nuclease-free water, and 1 μ L of each primer (10 pMol). The PCR cycling conditions consisted of the initial denaturation at 94 °C/2 min followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at temperature established in Table 1 for each gene for 30 seconds, and extension at 72 °C for 1 min, followed by a final extension at 72 °C for 10 min.

2.4 Antibacterial activity

The eight SAMPs were evaluated against the four clinical isolates and standard strain (NCTC® 12202) of *E. faecium* using the Broth Microdilution Assay in polystyrene plates as established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2018), determining the percentage of bacterial growth inhibition compared to the control (Souza et al. 2020). Serial two-fold dilutions of the peptides were made, testing concentrations from 0.49 to 500 μ g/mL dissolved in saline solution (0.15 mol/L^{-1} NaCl) containing 5% dimethyl sulfoxide (DMSO). Then, 50 μ L of bacterial inoculum (1.5×10^8 CFU/mL) prepared in Brain Heart Infusion (BHI—Kasvi®) broth, standardized by optical density at 630 nm ($\text{OD}_{630} \approx 0.1$), was added. A 5% DMSO solution in saline (100% growth) was used as a control. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. After incubation, the optical density was measured using a microplate reader (Molecular Devices, SpectraMax 190) at a wavelength of 630 nm. Then, the percentage of bacterial growth inhibition of each treatment was calculated compared to the

control (5% DMSO solution in saline). The same procedure was applied to determine the antibacterial activity of the antibiotic vancomycin. The tests were performed in triplicate.

Additionally, the clinical isolates were tested for multidrug resistance in an automated antimicrobial susceptibility test. Vitek® 2 – card AST-P585 (bioMérieux, Inc., Durham, NC, USA) testing was performed using software version 07.01, cards were inoculated and filled according to the manufacturer's instructions.

2.5 Checkerboard assay

The checkerboard assay evaluated the interaction among SAMPs ($0.49\text{--}500\text{ }\mu\text{g/mL}^{-1}$) combined with vancomycin ($0.49\text{--}125\text{ }\mu\text{g/mL}$) against *E. faecium* isolates. The broth microdilution assay was performed in a 96-well plate with a final volume of 100 μL (Costa et al. 2019). The bacterial inoculum was prepared, and the assay was performed as described above. All antibiotic and peptide concentrations were tested alone and in combination. The data was analyzed to calculate the Modulatory Factor (MF): maximum growth inhibition (%) of vancomycin in combination with SAMPs' maximum growth inhibition (%) of vancomycin alone (Lima et al. 2024). The result was expressed as the number of times the SAMPs could increase the maximum growth inhibition (%) of vancomycin. The tests were performed in triplicate.

2.6 Antibiofilm activity

To determine the effect of the SAMPs on bacterial biofilm formation and destruction, antibiofilm assays were performed according to the method described by Dias et al. (2020). To evaluate the inhibition of bacterial biofilm formation, 96-well flat-bottom polystyrene microplates were used, incubating 50 μL of bacterial suspension ($1.5 \times 10^8\text{ CFU/mL}$) with 50 μL of peptides ($0.49\text{ to }500\text{ }\mu\text{g/mL}$), at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h. After incubation, the biofilm formed was stained with an aqueous solution of 0.1% (m/v) of crystal violet and diluted with ethanol (95%). Then the quantification of the biofilm was measured using a microplate reader (Molecular Devices, SpectraMax 190) at a wavelength of 580 nm. The inhibition of biofilm formation was calculated by comparing the absorbance obtained for cells treated with the peptides and those obtained for cells treated with 5% DMSO in saline (negative control). The effects of peptides on the degradation of preformed biofilm were evaluated using 100 μL aliquots of bacterial suspension previously incubated in 96-well flat-bottom polystyrene microplates, at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. Then, the supernatant was removed, planktonic cells and culture medium were discarded, and the biofilm was treated with the peptides ($0.49\text{--}500\text{ }\mu\text{g/mL}$), for 24 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. The culture medium was discarded

again, and the same procedure described above was used to quantify the biofilm biomass and calculate the biofilm degradation. The tests were performed in triplicate.

2.7 Statistical analysis

All experiments were performed three times, and the results were expressed as mean $\pm$ standard error. Data were submitted to ANOVA, followed by Tukey's test, using GraphPad Prism 5.01, with a significance of $P < 0.05$.

3. RESULTS

3.1 Molecular analysis

Specie-specific gene *sodA* from *E. faecium* was detected in all isolates (Etf1, Etf4, Etf5, and Etf7) and was further confirmed in the reference strain *E. faecium* NCTC® 12202. Additionally, all these strains carried the *vanA* gene, which confers vancomycin resistance. In contrast, neither the *vanB* gene nor the *gelE* gene was detected in the tested strains (Table 2).

3.2 Antibacterial activity

The reference strain *E. faecium* NCTC® 12202 exhibited resistance to all tested concentrations of vancomycin (0.5–500 $\mu\text{g/mL}$), with a maximum growth inhibition of 30% observed at 500 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 1). Similarly, all *E. faecium* isolates were evaluated *in vitro* for their susceptibility to vancomycin, with the percentage of bacterial growth inhibition shown in Figure 1. None of the tested vancomycin concentrations effectively inhibited the growth of the *E. faecium* isolates. The highest growth inhibition, 52%, was achieved with the Etf4 treated with 125 $\mu\text{g/mL}$ of vancomycin. For the other isolates, vancomycin achieved maximum growth inhibitions of 41% for Etf7 (125 $\mu\text{g/mL}$), 38% for Etf1 (500 $\mu\text{g/mL}$) and 35% for Etf5 (125 $\mu\text{g/mL}$) (Figure 1).

The susceptibility of *E. faecium* to SAMPs was also evaluated. The reference strain *E. faecium* NCTC® 12202 showed minimal inhibition (less than 20%) with all tested SAMPs (data not shown). For Etf1, the maximum inhibition was 38%, also achieved with *Mo*-CBP₃-PepII at 15.6 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 2). The highest inhibition of Etf4 (57%) was observed with PepKAA at the same concentration (Figure 3). Among the SAMPs tested, the highest inhibition observed was 58%, achieved with 15.6 $\mu\text{g/mL}$ of *Mo*-CBP₃-PepII against the isolate

Etf5 (Figure 4). Similarly, *Mo*-CBP₃-PepII was the most effective treatment for Etf7, reaching 49% inhibition at 15.6 µg/mL (Figure 5).

Moreover, the clinical isolates Etf1, Etf4, Etf5, and Etf7 showed a resistance profile to several antibiotics, including penicillin, ampicillin, vancomycin, teicoplanin, erythromycin, and linezolid (Table 3).

3.3 Checkerboard assay

The checkerboard assay revealed that the SAMP *Mo*-CBP₃-PepI (15.6 µg/mL) enhanced the antibacterial activity of vancomycin (0.1–500 µg/mL) against the isolate Etf5. As shown in Figure 6, the growth inhibition of Etf5 treated with vancomycin alone ranged from 13% to 35%. However, when combined with *Mo*-CBP₃-PepI, growth inhibition increased to 64% (Figure 6). This indicates that the antibacterial activity of vancomycin, when used in combination with SAMPs, is 2- to 5-fold higher compared to its activity alone. Neither of the other SAMPs combinations tested showed higher antibacterial activity (data not shown).

3.4 Antibiofilm activity

The antibiofilm activity of vancomycin and SAMPs was evaluated against four *E. faecium* isolates and the results are shown in Figure 7. Vancomycin demonstrated a maximum inhibition of 30% in biofilm formation when tested against Etf1, while for Etf7, 28% inhibition was observed at 125 µg/mL. In contrast, vancomycin exhibited minimal activity (less than 20% inhibition) against the biofilm formation of Etf4 and Etf5. Similarly, it showed negligible inhibition of biofilm formation in the reference strain *E. faecium* NCTC® 12202 (less than 20%) (data not shown). Regarding biofilm degradation, vancomycin showed limited effectiveness, with less than 20% inhibition for Etf1 and Etf4. However, higher levels of degradation were observed for Etf5 (32%) and Etf7 (45%) at a concentration of 500 µg/mL (Figure 7).

Among the tested SAMPs, *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, *Rc*Alb-PepII, and PepKAA were selected to assess their antibiofilm activity against *E. faecium* isolates. For Etf1, the highest biofilm formation inhibition ranged from 32% to 33% at 500 µg/mL when treated with *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, or *Rc*Alb-PepII (Figure 8). The highest biofilm degradation for Etf1 (43%) was achieved with *Mo*-CBP₃-PepI at the same concentration (Figure 8). The Etf4 biofilm was not significantly inhibited (less than 20%) by any of the tested SAMPs (Figure 9). Its maximum biofilm degradation ranged from 24% to 27%. For Etf5, the highest biofilm inhibition (23%) was observed when treated with either *Mo*-CBP₃-PepI or *Mo*-CBP₃-PepII (Figure 10). Meanwhile, biofilm degradation of up to 45%–46% was achieved with *Mo*-CBP₃-PepII, *Rc*Alb-PepII, and

PepKAA. The Etf7 biofilm was also not significantly inhibited (less than 20%) by any of the SAMPs tested. However, a maximum degradation of approximately 28% was observed when treated with *Mo*-CBP3-PepI, *Mo*-CBP3-PepII, *RcAlb*-PepII, or PepKAA (Figure 11).

4. DISCUSSION

Vancomycin-resistant *E. faecium* (VRE) is a significant nosocomial pathogen, and developing new strategies to effectively treat these infections is crucial for public health. Antimicrobial peptides (AMPs) represent promising candidates to combat antimicrobial resistance. In this study, we evaluated the activity of eight synthetic antimicrobial peptides (SAMPs) - *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, *Mo*-CBP₃-PepIII, *RcAlb*-PepI, *RcAlb*-PepII, *RcAlb*-PepIII, PepGAT, and PepKAA - against four VRE isolates (Etf1, Etf4, Etf5, and Etf7) and the reference strain *E. faecium* NCTC[®] 12202.

The VRE isolates were first characterized for the presence of resistance-related genes, including those for vancomycin resistance (*vanA* and *vanB*) and gelatinase (*gelE*). The most common vancomycin resistance genes are *vanA* and *vanB* (O'Toole et al. 2023). Consistent with this, all four isolates carried the *vanA* gene. However, the *vanB* and *gelE* genes were absent in all isolates. The prevalence of the *vanA* gene aligns with findings from other studies evaluating the presence of *vanA* and *vanB* in VRE isolates (Moosavian et al. 2018; Alves et al. 2017). The *vanA* gene is capable of both vertical and horizontal transfer, whereas *vanB* is clustered and occupies a significant portion of the chromosome, reducing its likelihood of spreading between strains (Arredondo-Alonso et al. 2021; Moosavian et al. 2018). Furthermore, Moosavian et al. (2018) suggest that the *vanA* gene is more commonly associated with clinical strains, whereas the *vanB* gene is primarily linked to outbreaks and food contamination.

Gelatinase (*gelE*) is an extracellular protease capable of hydrolyzing gelatin, elastin, collagen, hemoglobin, and bioactive peptides (Chajęcka-Wierzchowska et al. 2017). The absence of the *gelE* gene in all VRE isolates may be related to the higher growth inhibition observed with SAMPs, compared to our previous study against *E. faecalis* ATCC[®] 51299 (Lima et al. 2024). Thus, the VRE isolates analyzed here may lack the virulence factor associated with protease production, which could contribute to the structural integrity of the SAMPs and enhance their antibacterial activity.

All the isolates were resistant to vancomycin, with the highest growth inhibition ranging from 35% to 52% when treated with higher concentrations of the antibiotic (125–500 µg/mL). However, when treated with the SAMPs, the growth inhibition was slightly higher (38% to 58%) at a much lower concentration (15.6

µg/mL). Since the antibacterial activity of both vancomycin and SAMPs alone did not reach a lethal concentration, we evaluated the combination of these compounds against the VRE isolates. As a result, we observed higher growth inhibition in Etf5 when treated with a combination of *Mo*-CBP₃-PepI (15.6 µg/mL) and vancomycin (0.1 – 500 µg/mL). Moreover, the antibacterial activity of vancomycin in combination with the SAMPs was 2- to 5-fold higher than when used alone. Notably, Etf5 was the most resistant to vancomycin among the clinical isolates, yet it was the most susceptible to the combination of SAMPs and vancomycin. This highlights the potential of these SAMPs as a promising alternative treatment for resistant infections.

Vancomycin is a glycopeptide antibiotic used as a drug of last resort for the treatment of severe infections caused by Gram-positive bacteria, such as *Enterococcus* species (Patel et al. 2024). Vancomycin induces bacterial cell death by inhibiting the polymerization of peptidoglycans in the bacterial cell wall. In response, enterococci develop resistance to vancomycin by altering the peptidoglycan synthesis pathway in their cell walls. This resistance mechanism involves the substitution of D-Ala-D-Ala with D-Ala-D-lactate, which leads to the loss of one hydrogen-bonding interaction between vancomycin and the peptide (Patel et al. 2024). The loss of this bond results in a 1,000-fold decrease in the binding affinity between vancomycin and peptidoglycan (Stogios and Savchenko 2020). Consequently, the synthesis and polymerization of N-acetylmuramic acid (NAM) and N-acetylglucosamine (NAG) within the peptidoglycan layer are inhibited. This disruption compromises the bacterial cell wall, leading to leakage of intracellular components, osmotic stress, and cell lysis, resulting in bacterial cell death (Patel et al. 2024; Stogios and Savchenko 2020).

Like vancomycin, the primary mode of action of antimicrobial peptides is bacterial cell disruption (Lima et al. 2021). This was also demonstrated in previous works, in which these peptides showed their capacity to disrupt microbial cell membranes, possibly by pore formation (Lima et al. 2024). According to Wu et al., the combination of antimicrobial peptides with vancomycin can enhance the antibiotic's efficacy against Gram-positive bacterial cells. Specifically, they reported that the antimicrobial peptide Bip-P-113 interacted synergistically with vancomycin against *E. faecium* (BCRC 15B0132, VRE) (Wu et al. 2020).

The positive effects of antimicrobial peptides at sub-lethal concentrations for treating VRE infections include altering the morpho functional properties of bacteria, thereby reducing their pathogenicity, weakening their virulence, and diminishing their resistance (Duperthuy 2020; Vasilchenko and Rogozhin 2019). For instance, recent proteomic studies investigating the treatment of *Klebsiella pneumoniae* with the SAMP *Mo*-CBP₃-PepI revealed changes in key metabolic pathways (Branco et al. 2022). Based on these findings, it is

plausible to hypothesize that combining *Mo*-CBP₃-PepI with vancomycin may enhance the antibiotic's antibacterial activity through modulation induced by the SAMP.

Furthermore, all of the VRE isolates demonstrated the ability to form biofilms, a virulence factor that facilitates the exchange of genetic material between cells and significantly increases their resistance to antibiotics (by approximately 10–1,000 times) (Chajęcka-Wierzchowska et al. 2017). Enterococcal biofilms are frequently found on medical devices, including ureteral stents and intravascular catheters, as well as in infections such as urinary tract infections, wound infections, and periodontal infections (Şchiopu et al. 2023). In this study, we determined that the maximum inhibition of biofilm formation was comparable for both vancomycin (30%) and the SAMPs (33%). Conversely, biofilm degradation was slightly higher, with vancomycin achieving 45% degradation and *Mo*-CBP₃-PepII, *Rc*Alb-PepII, and PepKAA reaching 46%. The relevance of biofilm degradation in treating enterococcal biofilms commonly encountered in hospital environments cannot be overstated. Consequently, future studies should investigate the combination of SAMPs with vancomycin to achieve more effective biofilm degradation.

It is also important to note that the SAMPs evaluated in this study have previously been tested for cytotoxicity, hemolytic activity, and allergenicity, with all results being negative (Oliveira et al. 2019; Dias et al. 2020; Lima et al. 2020; Souza et al., 2020). These findings underscore the potential of antimicrobial peptides to combat antimicrobial resistance. Specifically, for use against VRE, these SAMPs could be applied in combination with conventional antibiotics, such as vancomycin, to enhance antibacterial efficacy and mitigate bacterial resistance.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Federal University of Ceará (UFC, Fortaleza, CE, Brazil) for their collaboration and for providing the synthetic antimicrobial peptides.

CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interest was declared.

FUNDING

This work was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brasil (CAPES, <http://www.capes.gov.br/>) – Finance Code 001 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, <http://www.cnpq.br/>) which provided research and scholarship.

REFERENCES

- Alduhaidhawi, Athraa Harjan Mohsen, AlHuchaimi, Sundus Nsaif, Al- Mayah, Thikra Abdullah, Al-Ouqaili, Mushtak TS, Alkafaas, Samar Sami, Muthupandian, Saravanan, et al., ‘Prevalence of CRISPR-Cas Systems and Their Possible Association with Antibiotic Resistance in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Collected from Hospital Wastewater’, *Infection and Drug Resistance*, Volume 15 (2022), 1143–54.
- Alves, Geraldo da Silva, Pereira, Monalessa Fábila, Bride, Lais de Lima, Nunes, Ana Paula Ferreira, and Schuenck, Ricardo Pinto, ‘Clonal Dissemination of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* ST412 in a Brazilian Region’, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21/6 (2017), 656–59.
- Antimicrobial Resistance Collaborators, ‘Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis’, *The Lancet*, 399/10325 (2022), 629–55.
- Arredondo-Alonso, Sergio, Top, Janetta, Corander, Jukka, Willems, Rob J. L., and Schürch, Anita C., ‘Mode and Dynamics of VanA-Type Vancomycin Resistance Dissemination in Dutch Hospitals’, *Genome Medicine*, 13/1 (2021).
- Branco, Levi A. C., Souza, Pedro F. N., Neto, Nilton A. S., Aguiar, Tawanny K. B., Silva, Ayrles F. B., Carneiro, Rômulo F., et al., ‘New Insights into the Mechanism of Antibacterial Action of Synthetic Peptide *Mo*-CBP₃-PepI against *Klebsiella pneumoniae*’, *Antibiotics*, 11/12 (2022), 1753.
- Chajęcka-Wierzchowska, Wioleta, Zadernowska, Anna, and Łaniewska-Trokenheim, Łucja, ‘Virulence Factors of *Enterococcus* spp. Presented in Food’, *LWT*, 75 (2017), 670–76.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing a CLSI Supplement for Global Application. 30th Edition*, 2020
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2018:91.
- Costa, Rosiane A., Ortega, Daniel B., Fulgêncio, Débora L.A., Costa, Flávio S., Araújo, Thiago F., and Barreto, Cristine C., ‘Checkerboard Testing Method Indicates Synergic Effect of Pelgipeptins against Multidrug Resistant *Klebsiella pneumoniae*’, *Biotechnology Research and Innovation*, 3/1 (2019), 187–91.
- Dias, Lucas P, Souza, Pedro F N, Oliveira, Jose T A, Vasconcelos, Ilka M, Araújo, Nadine M S, Tilburg, Mauricio F V, 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*, 1862/2 (2019), 183092–92.

- Eaton, T. J., and Gasson, M. J., 'Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates', *Applied and Environmental Microbiology*, 67/4 (2001), 1628–35.
- García-Solache, Mónica, and Rice, Louis B., 'The *Enterococcus*: A Model of Adaptability to Its Environment', *Clinical Microbiology Reviews*, 32/2 (2019).
- Iweriebor, Benson C, Obi, Larry C, and Okoh, Anthony I, 'Virulence and Antimicrobial Resistance Factors of *Enterococcus* spp. Isolated from Fecal Samples from Piggery Farms in Eastern Cape, South Africa', *BMC Microbiology*, 15/1 (2015).
- Kuzucu, Cigdem, Cizmeci, Zeynep, Durmaz, Riza, Durmaz, Bengul, and Ozerol, Ibrahim Halil, 'The Prevalence of Fecal Colonization of Enterococci, the Resistance of the Isolates to Ampicillin, Vancomycin, and High-Level Aminoglycosides, and the Clonal Relationship among Isolates', *Microbial Drug Resistance*, 11/2 (2005), 159–64.
- Lima, Patrícia G., Oliveira, Jose T.A., Amaral, Jackson L., Freitas, Cleverson D.T., and Souza, Pedro F.N., 'Synthetic Antimicrobial Peptides: Characteristics, Design, and Potential as Alternative Molecules to Overcome Microbial Resistance', *Life Sciences*, 278 (2021), 119647.
- Lima, Patrícia Gomes, Souza, Pedro Filho Noronha, Mesquita, Felipe Pantoja, Oliveira, Thaís Larré, and Hartwig, Daiane Drawanz, 'Synthetic Antimicrobial Peptides: Activity against Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and Modulation of Chloramphenicol Antibacterial Activity', *Journal of Applied Microbiology*, 135/6 (2024).
- Moosavian, Mojtaba, Ghadri, Hosein, and Samli, Zahra, 'Molecular Detection of *vanA* and *vanB* Genes among Vancomycin-Resistant Enterococci in ICU-Hospitalized Patients in Ahvaz in Southwest of Iran', *Infection and Drug Resistance*, Volume 11 (2018), 2269–75.
- Nam, Sehee, Kim, Min-jeong, Park, Chulmin, Park, Jong-Geun, Maeng, Pil Jae, and Lee, Gyu-Cheol, 'Detection and Genotyping of Vancomycin-Resistant *Enterococcus* spp. By Multiplex Polymerase Chain Reaction in Korean Aquatic Environmental Samples', *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216/4 (2013), 421–27.
- O'Toole, Ronan F., Leong, Kelvin W.C., Cumming, Vanessa, and van Hal, Sebastian J., 'Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and the Emergence of New Sequence Types Associated with Hospital Infection', *Research in Microbiology*, 174/4 (2023), 104046.
- Oliveira, Jose T.A., Souza, Pedro F.N., Vasconcelos, Ilka M., Dias, Lucas P., Martins, Thiago F., Van Tilburg, Mauricio F., 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*, 157 (2019), 10–21.
- Patel, R, Uhl, J R, Kohner, P, Hopkins, M K, and Cockerill, F R, 'Multiplex PCR Detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* Genes in Enterococci.', *Journal of Clinical Microbiology*, 35/3 (1997), 703–7.

Patel, Shivali, Preuss, Charles V, and Bernice, Fidelia, 'Vancomycin', *Nih.gov* (2023).

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459263/>>

Puchter, Laura, Chaberny, Iris Freya, Schwab, Frank, Vonberg, Ralf-Peter, Bange, Franz-Christoph, and Ebadi, Ella, 'Economic Burden of Nosocomial Infections Caused by Vancomycin-Resistant Enterococci', *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 7/1 (2018).

Șchiopu, Pavel, Țoc, Dan Alexandru, Colosi, Ioana Alina, Costache, Carmen, Ruospo, Giuseppe, Berar, George, et al., 'An Overview of the Factors Involved in Biofilm Production by the *Enterococcus* Genus', *International Journal of Molecular Sciences*, 24/14 (2023), 11577–77.

Souza, Pedro F. N., Marques, Lidyane S. M., Oliveira, Jose T. A., Lima, Patrícia G., Dias, Lucas P., Neto, Nilton A. S., et al., 'Synthetic Antimicrobial Peptides: From Choice of the Best Sequences to Action Mechanisms', *Biochimie*, 175 (2020), 132–45.

Stogios, Peter J., and Savchenko, Alexei, 'Molecular Mechanisms of Vancomycin Resistance', *Protein Science*, 29/3 (2020), 654–69.

Sung, Kidon, Khan, Saeed, Marasa, Bernard, Min, Seonggi, Kweon, Ohgew, Nawaz, Mohamed, et al., 'Genomic Sequence of a Clinical Vancomycin-Resistant Reference Strain, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299', *Genome Announcements*, 3/6 (2015).

Uttley, A. H. C., George, R. C., Naidoo, J., Woodford, N., Johnson, A. P., Collins, C. H., et al., 'High-Level Vancomycin-Resistant Enterococci Causing Hospital Infections', *Epidemiology and Infection*, 103/1 (1989), 173–81.

Vasilchenko, Alexey S., and Rogozhin, Eugene A., 'Sub-Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides', *Frontiers in Microbiology*, 10 (2019).

World Health Organization. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024. Geneva: World Health Organization, 2024.

Wu, Chih-Lung, Hsueh, Ju-Yun, Yip, Bak-Sau, Chih, Ya-Han, Peng, Kuang-Li, and Cheng, Jya-Wei, 'Antimicrobial Peptides Display Strong Synergy with Vancomycin against Vancomycin-Resistant *E. faecium*, *S. aureus*, and Wild-Type *E. coli*', *International Journal of Molecular Sciences*, 21/13 (2020), 4578.

Yuksekdag, Zehranur, Ahlatcı, Nur Seda, Hajikhani, Rasta, Darilmaz, Derya Onal, and Beyatli, Yavuz, 'Safety and Metabolic Characteristics of 17 *Enterococcus faecium* Isolates', *Archives of Microbiology*, 203/9 (2021), 5683–94.

Zhou, Xuewei, Willems, Rob J. L., Friedrich, Alexander W., Rossen, John W. A., and Bathoorn, Erik, 'Enterococcus faecium: From Microbiological Insights to Practical Recommendations for Infection Control and Diagnostics', *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9/1 (2020).

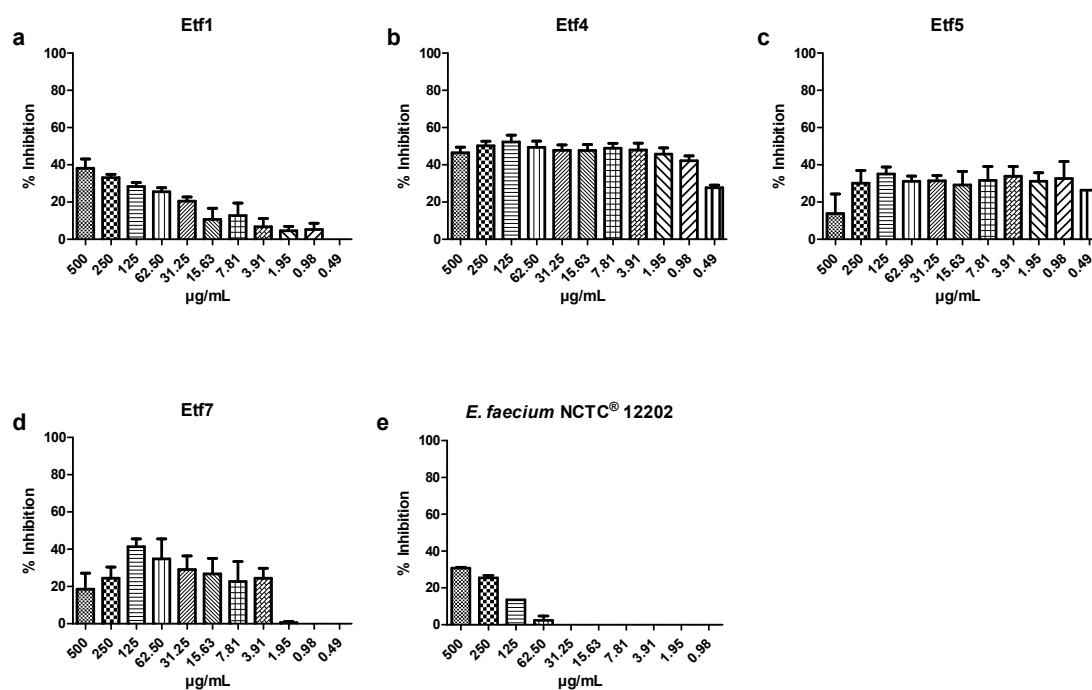


Figure 1. Antibacterial activity of vancomycin against *E. faecium*. The data are presented as the percentage of growth inhibition. The percentage of inhibition was calculated relative to bacterial cells treated with 5% DMSO, used as a control representing 100% growth.

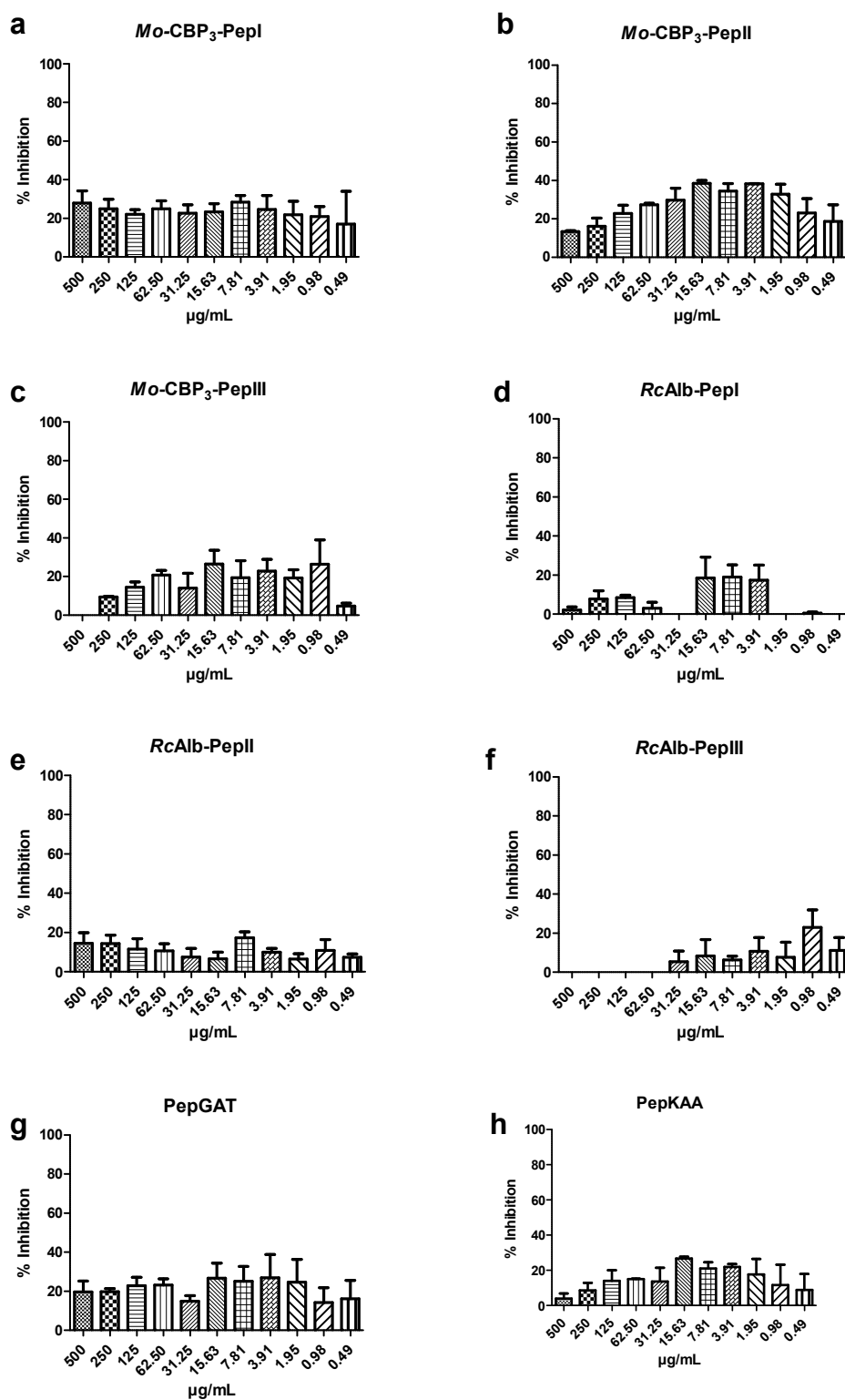


Figure 2. Antibacterial activity of SAMPs against EtfI: a) *Mo*-CBP₃-PepI; b) *Mo*-CBP₃-PepII; c) *Mo*-CBP₃-PepIII; d) *Rc*Alb-PepI; e) *Rc*Alb-PepII; f) *Rc*Alb-PepIII; g) PepGAT; and h) PepKAA. The data are presented as the percentage of growth inhibition. The percentage of inhibition was calculated relative to bacterial cells treated with 5% DMSO, used as a control representing 100% growth.

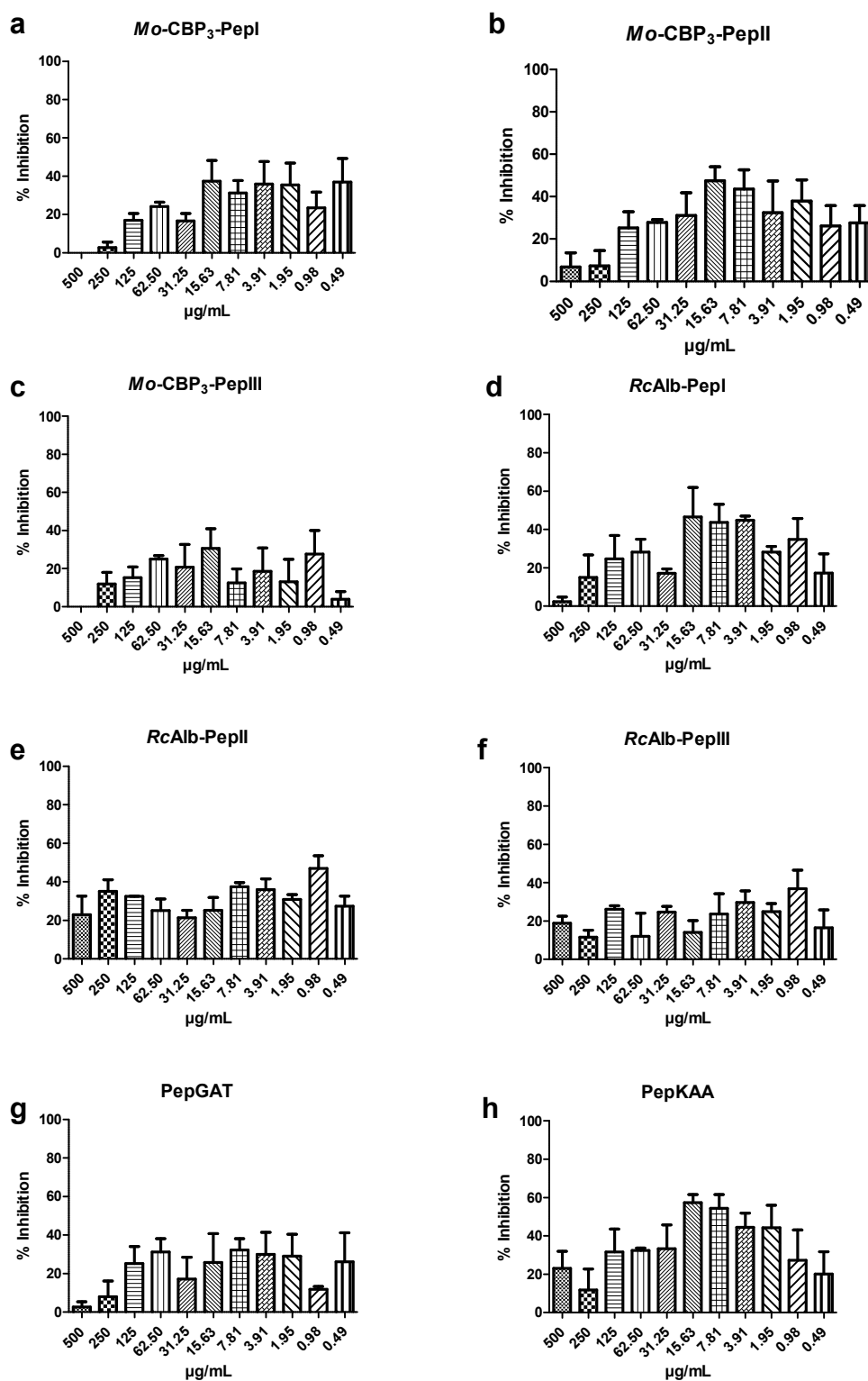


Figure 3. Antibacterial activity of SAMPs against Etf4: a) *Mo*-CBP₃-PepI; b) *Mo*-CBP₃-PepII; c) *Mo*-CBP₃-PepIII; d) *Rc*Alb-PepI; e) *Rc*Alb-PepII; f) *Rc*Alb-PepIII; g) PepGAT; and h) PepKAA. The data are presented as the percentage of growth inhibition. The percentage of inhibition was calculated relative to bacterial cells treated with 5% DMSO, used as a control representing 100% growth.

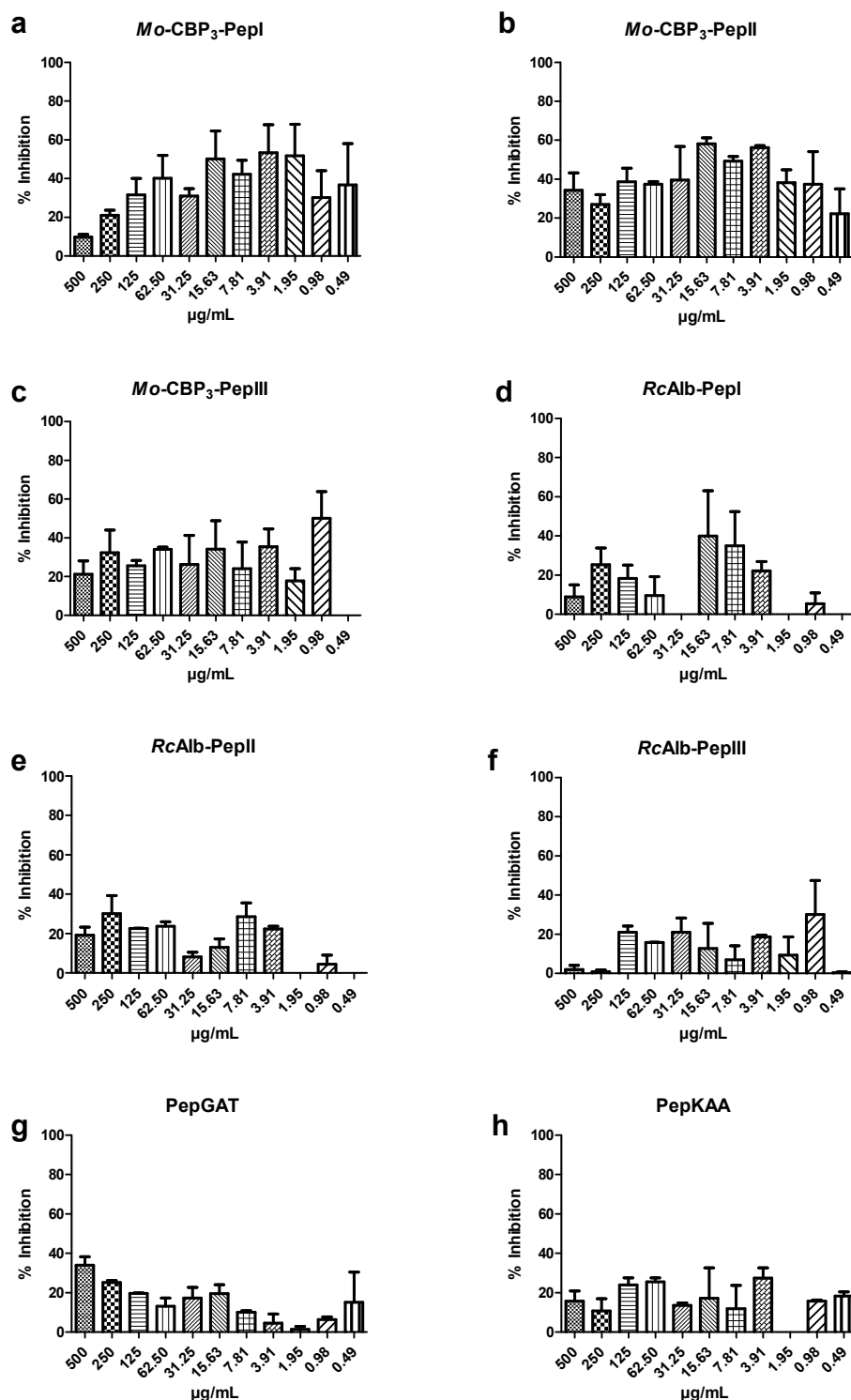


Figure 4. Antibacterial activity of SAMPs against Etf5: a) *Mo*-CBP₃-PepI; b) *Mo*-CBP₃-PepII; c) *Mo*-CBP₃-PepIII; d) *Rc*Alb-PepI; e) *Rc*Alb-PepII; f) *Rc*Alb-PepIII; g) PepGAT; and h) PepKAA. The data are presented as the percentage of growth inhibition. The percentage of inhibition was calculated relative to bacterial cells treated with 5% DMSO, used as a control representing 100% growth.

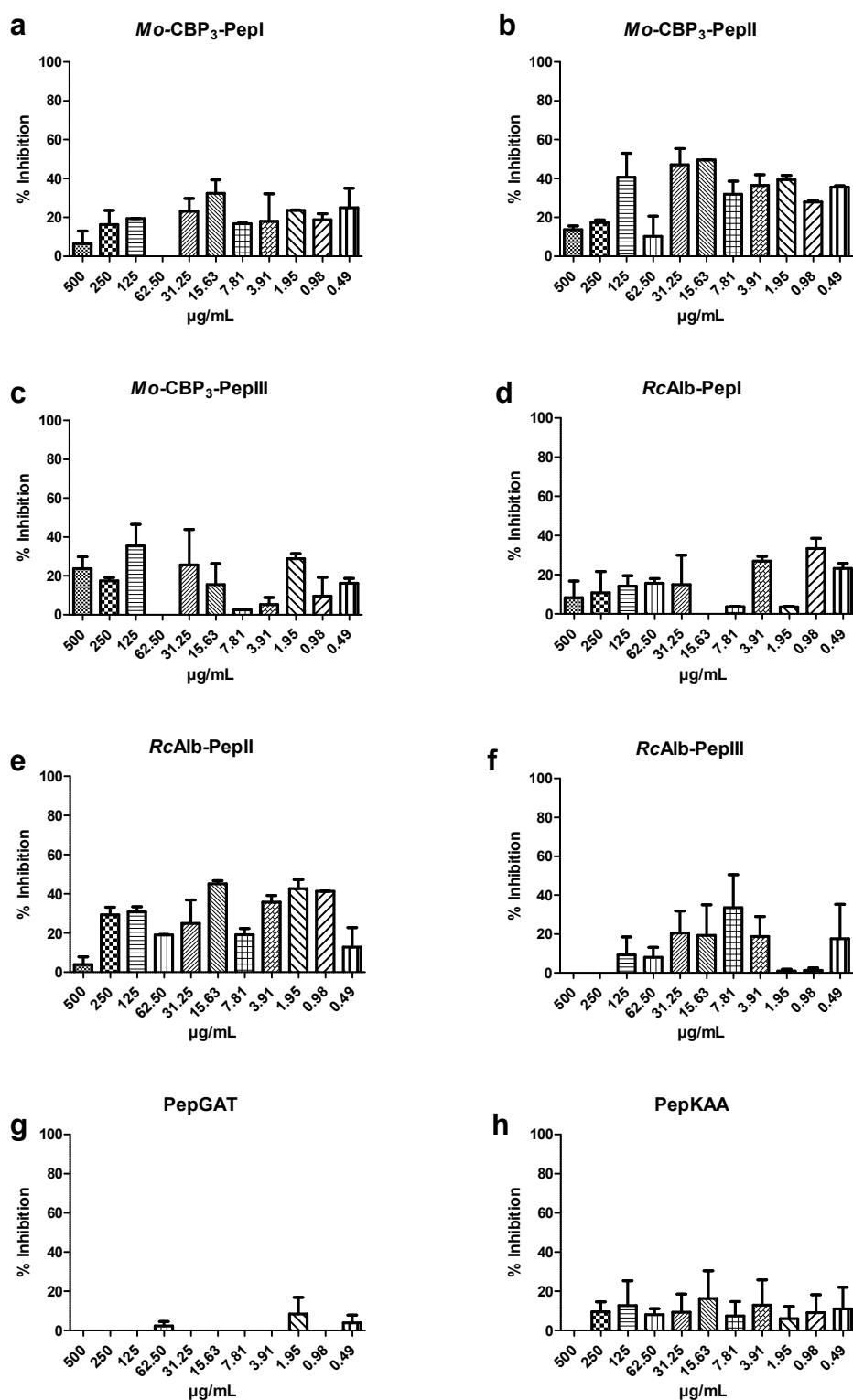


Figure 5. Antibacterial activity of SAMPs against Etf7: a) *Mo*-CBP₃-PepI; b) *Mo*-CBP₃-PepII; c) *Mo*-CBP₃-PepIII; d) *Rc*Alb-PepI; e) *Rc*Alb-PepII; f) *Rc*Alb-PepIII; g) PepGAT; and h) PepKAA. The data are presented as the percentage of growth inhibition. The percentage of inhibition was calculated relative to bacterial cells treated with 5% DMSO, used as a control representing 100% growth.

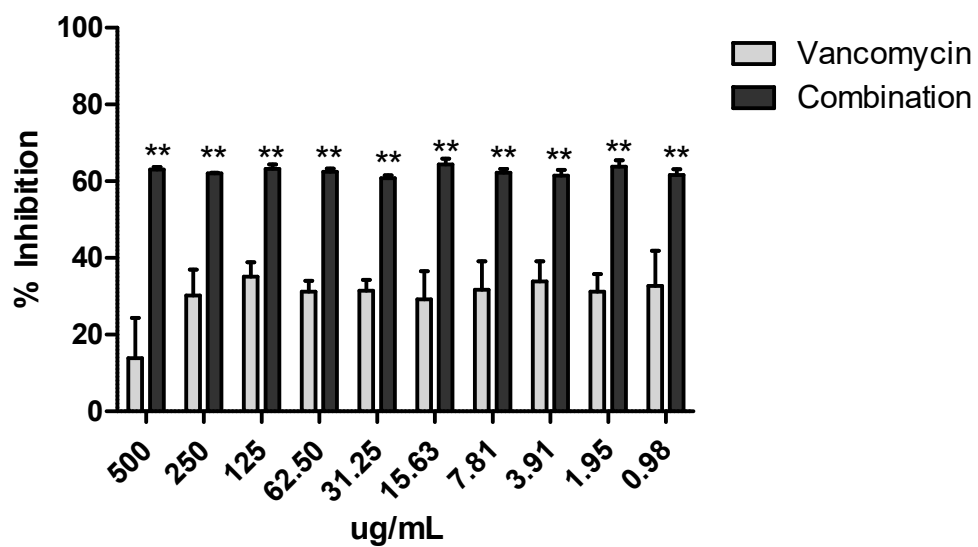


Figure 6. Combination of *Mo*-CBP3-PepI (15.6 µg/mL) and vancomycin (500-0.1 µg/mL) against Et5. Results are expressed as each group's mean and standard error of the mean (SEM). The asterisks indicate a significant difference between groups when compared with vancomycin alone (** $P < 0.05$).

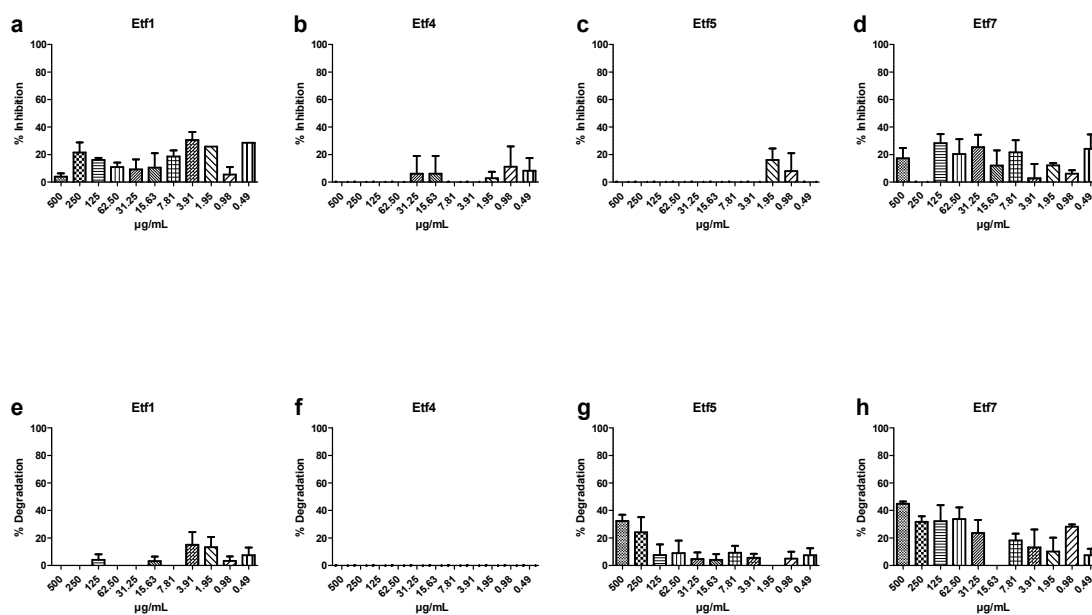


Figure 7. *E. faecium* isolates biofilm formation inhibition by vancomycin (a-d) and biofilm degradation by vancomycin (e-h). The data are presented as the percentage of inhibition. The percentage of inhibition was calculated relative to bacterial cells treated with 5% DMSO, used as a control representing 100% growth.

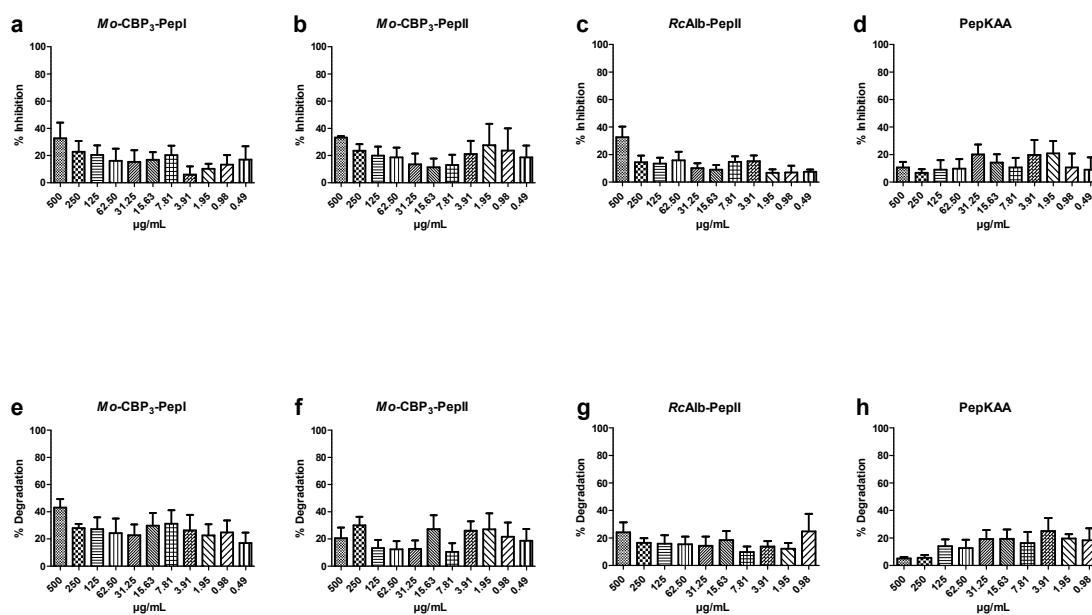


Figure 8. *E. coli* biofilm formation inhibition by SAMPs (a-d) and biofilm degradation by SAMPs (e-h). The data are presented as the percentage of inhibition. The percentage of inhibition was calculated relative to bacterial cells treated with 5% DMSO, used as a control representing 100% growth.

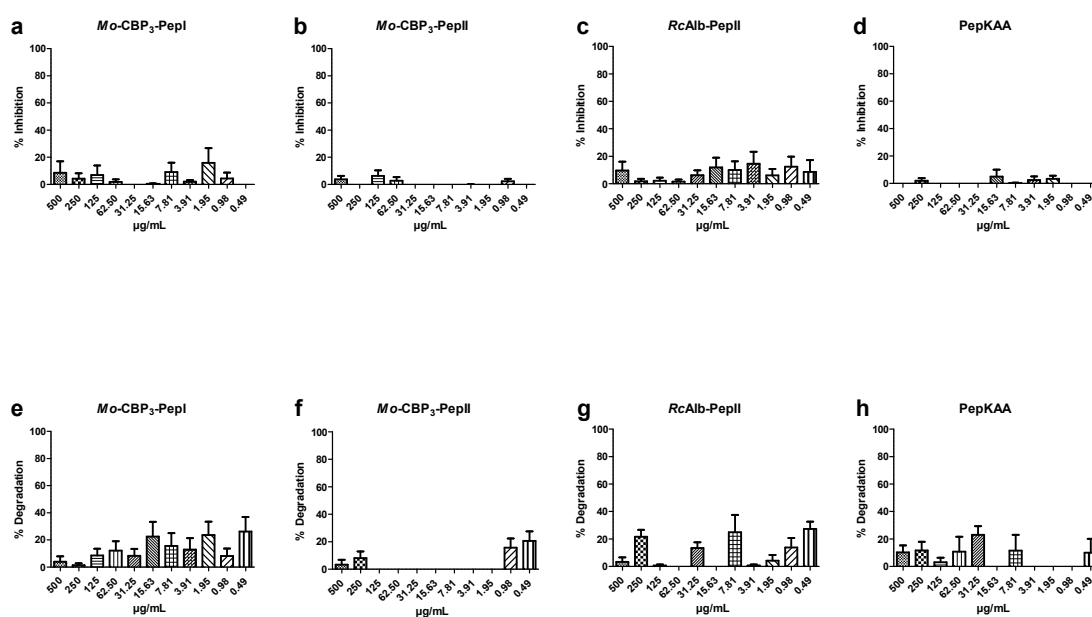


Figure 9. Etf4 biofilm formation inhibition by SAMPs (a-d) and biofilm degradation by SAMPs (e-h). The data are presented as the percentage of inhibition. The percentage of inhibition was calculated relative to bacterial cells treated with 5% DMSO, used as a control representing 100% growth.

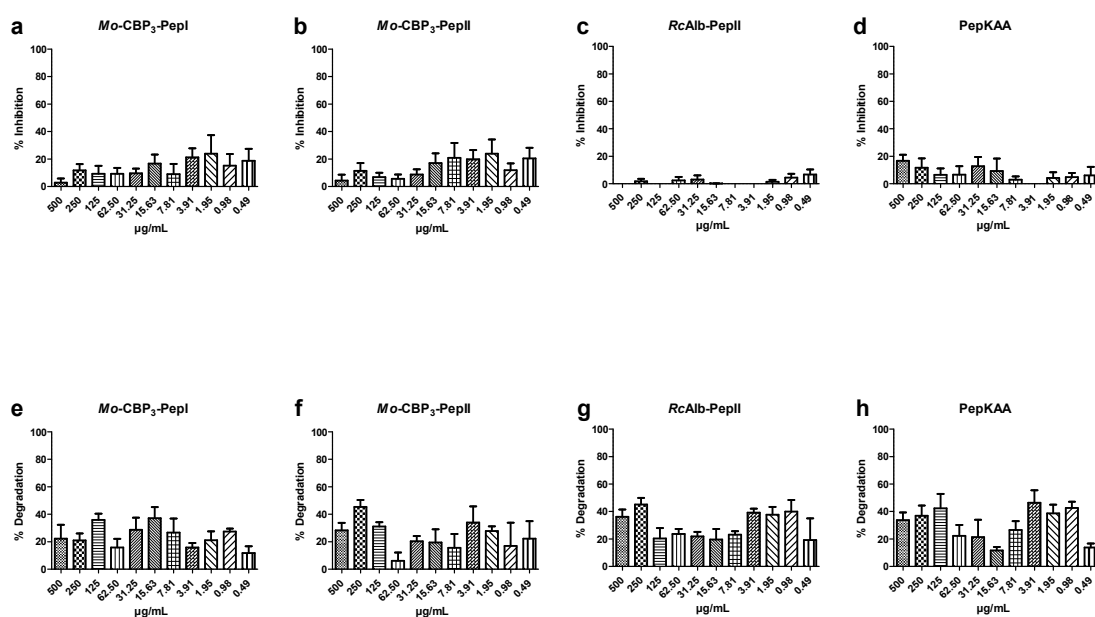


Figure 10. Etf5 biofilm formation inhibition by SAMPs (a-d) and biofilm degradation by SAMPs (e-h). The data are presented as the percentage of inhibition. The percentage of inhibition was calculated relative to bacterial cells treated with 5% DMSO, used as a control representing 100% growth.

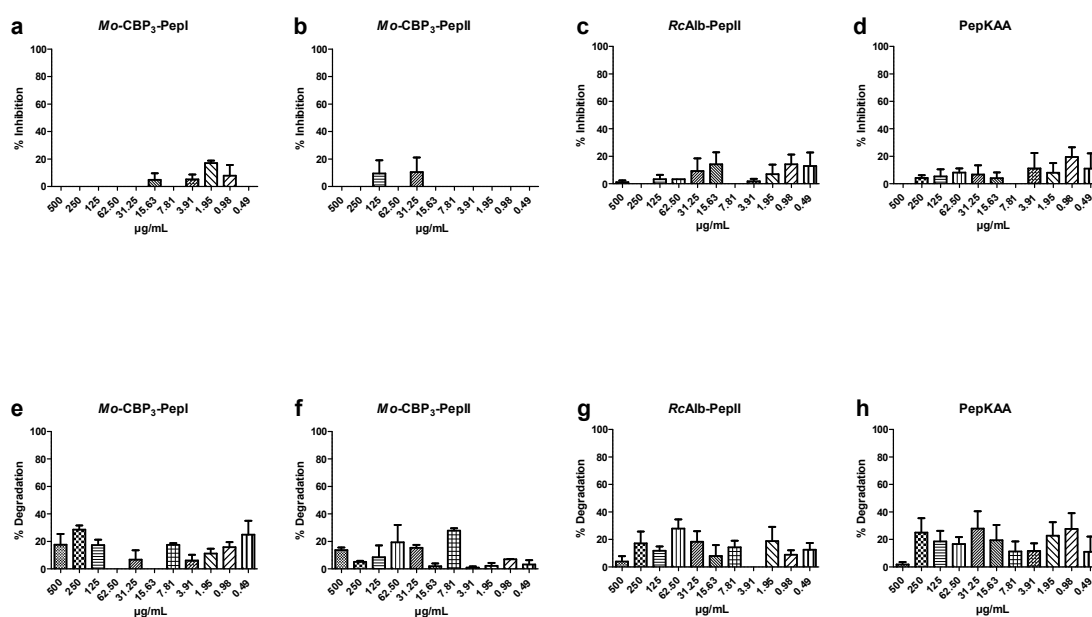


Figure 11. Etf7 biofilm formation inhibition by SAMPs (a-d) and biofilm degradation by SAMPs (e-h). The data are presented as the percentage of inhibition. The percentage of inhibition was calculated relative to bacterial cells treated with 5% DMSO, used as a control representing 100% growth.

Table 1 Oligonucleotides used to amplify the enterococci genes

Gene description	Target Gene	Primer Name	Primer Sequence 5' – 3'	Amplicon Size (bp)	°C	References
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	<i>sodA</i>	FL1	ACTTATGTGACT AACTTAACC	360	52	(Alduhaidhawi et al. 2022; Iweriebor, Obi and Okoh 2015)
		FL2	TAATGGTGAAT CTTGGTTTGG			
<i>E. faecium</i> ATCC 19434	<i>sodA</i>	FM1	GAAAAAACAAT AGAAGAATTAT	215	48	(Alduhaidhawi et al. 2022; Iweriebor, Obi and Okoh 2015)
		FM2	TGCTTTTTTGAA TTCTTCTTTA			
Vancomycin resistance A	<i>vanA</i>	vanA-F	GCGCGGTCCAC TTGTAGATA	314	50	(Iweriebor, Obi and Okoh 2015; Nam et al. 2013)
		vanA-R	TGAGCAACCCC CAAACAGTA			
Vancomycin resistance B	<i>vanB</i>	vanB-F	AGACATTCCGG TCGAGGAAC	220	50	(Iweriebor, Obi and Okoh 2015; Nam et al. 2013)
		vanB-R	GCTGTCAATTAG TGCGGGAA			
Gelatinase	<i>gelE</i>	gelE-F	ACCCCGTATCAT TGGTTT	419	51	(Eaton and Gasson 2001; Yuksekdog et al. 2021)
		gelE-R	ACGCATTGCTTT TCCATC			

Table 2 Gene detection in enterococci

Strains	Genes			
	<i>sodA</i> (FM)	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>gelE</i>
<i>E. faecium</i> NCTC® 12202	+	+	-	-
Etf1	+	+	-	-
Etf4	+	+	-	-
Etf5	+	+	-	-
Etf7	+	+	-	-

Table 3 Antimicrobial susceptibility of clinical isolates

Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Isolates			
		Etf1	Etf4	Etf5	Etf7
Penicillin	≥ 16	R	R	R	R
Ampicillin	≥ 16	R	R	R	R
Streptomycin	≥ 1000	S	S	S	S
Gentamycin	>500	S	S	S	S
Vancomycin	≥ 32	R	R	R	R
Teicoplanin	≥ 32	R	R	R	R
Erythromycin	≥ 8	R	R	R	R
Linezolid	≥ 8	S	R	S	R

R: resistant; S: susceptible.

5 Conclusão geral

- Os PAMs *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, *Mo*-CBP₃-PepIII, *RcAlb*-PepI, *RcAlb*-PepII, *RcAlb*-PepIII, PepGAT e PepKAA possuem atividade antibacteriana contra *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes à vancomicina. Um máximo de 48% de inibição do crescimento de *E. faecalis* foi alcançado pelo tratamento com o PAM *Mo*-CBP₃-PepI (500 µg/mL). Em relação aos isolados clínicos de *E. faecium*, as maiores inibições foram dos tratamentos com os PAMs PepKAA (15,6 µg/mL) e *Mo*-CBP₃-PepII (15,6 µg/mL), alcançando 57% de inibição do crescimento de Etf4 e 58% de inibição do crescimento de Etf5, respectivamente.
- Dentre os modos de ação investigados, há a indicação de permeabilização da membrana celular bacteriana. Tal mecanismo de ação é uma vantagem do uso de PAMs, já que é mais difícil de desenvolver resistência contra ele.
- Além disso, a combinação dos PAMs com os antibióticos cloranfenicol e vancomicina apresentou um aumento da ação antibacteriana em diferentes combinações. Assim, quando os PAMs foram combinados com o antibiótico cloranfenicol, a inibição do crescimento de *E. faecalis* aumentou para 55%–76% de inibição, um aumento de duas a três vezes se comparado aos efeitos dos compostos isoladamente. Já a vancomicina combinada com *Mo*-CBP₃-PepI atingiu uma taxa de inibição de 64%, representando um aumento de 2 a 5 vezes na atividade em comparação com a vancomicina sozinha. Indicando que em combinação é possível diminuir a dose efetiva dos fármacos, reduzindo custos e efeitos colaterais.
- A atividade antibiofilme dos PAMs não foi tão efetiva quanto sua atividade antibacteriana contra células livres de *E. faecalis* e *E. faecium*. O máximo de inibição do biofilme de *E. faecalis* foi de 22% para os PAMs sozinhos, já quando combinado com cloranfenicol, o máximo aumentou para 33%. Para os isolados clínicos de *E. faecium* a inibição máxima do biofilme foi de 33% com os PAMs, enquanto a degradação do biofilme atingiu 46%.
- Assim, pode-se concluir que os PAMs *Mo*-CBP₃-PepI, *Mo*-CBP₃-PepII, *Mo*-CBP₃-PepIII, *RcAlb*-PepI, *RcAlb*-PepII, *RcAlb*-PepIII, PepGAT e PepKAA são moléculas promissoras para serem utilizadas como alternativa para superar a resistência antimicrobiana, sendo empregados sozinhos ou como adjuvantes para melhorar a atividade de outras drogas.

Referências

ÁLVAREZ-ARTERO, E. et al. Urinary tract infection caused by *Enterococcus* spp.: Risk factors and mortality. An observational study. **Revista Clínica Española (English Edition)**, v. 221, n. 7, p. 375–383, ago. 2021.

AMINOV, R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 4–19, jun. 2017.

ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 19 jan. 2022.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266–78, 2012.

BALBI, H. J. Chloramphenicol: A Review. **Pediatrics in Review**, v. 25, n. 8, p. 284–288, 1 ago. 2004.

BATISTA, C. V. F. et al. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*1. **Peptides**, v. 20, n. 6, p. 679–686, ago. 1999.

BONTEN, M. J.; WILLEMS, R.; WEINSTEIN, R. A. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 5, p. 314–325, 1 dez. 2001.

BRUNIERA, F. R. et al. The use of vancomycin with its therapeutic and adverse effects: a review. **PubMed**, v. 19, n. 4, p. 694–700, 1 fev. 2015.

CATTOIR, V. The multifaceted lifestyle of enterococci: genetic diversity, ecology and risks for public health. **Current Opinion in Microbiology**, v. 65, p. 73–80, fev. 2022.

CDC. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1992-April 2000, Issued June 2000. **American Journal of Infection Control**, v. 28, n. 6, p. 429–448, dez. 2000.

CECI, M. et al. Clinical and microbiological features of bacteremia caused by *Enterococcus faecalis*. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 11, p. 1195–1203, 30 nov. 2015.

CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Antibiotic resistance threats in the United States**. United States, Atlanta, GA: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>>.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C. G. Vancomycin-Resistant Enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 686–707, 1 out. 2000.

CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W.; ZADERNOWSKA, A.; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, Ł. Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. **LWT**, v. 75, p. 670–676, jan. 2017.

CHIANG, H.-Y. et al. Incidence and Outcomes Associated With Infections Caused by Vancomycin-Resistant Enterococci in the United States: Systematic Literature Review and Meta-Analysis. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 38, n. 2, p. 203–215, 9 nov. 2016.

CHOI, H.; LEE, D. G. Antimicrobial peptide pleurocidin synergizes with antibiotics through hydroxyl radical formation and membrane damage, and exerts antibiofilm activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1820, n. 12, p. 1831–1838, dez. 2012.

CHOI, Y. H. et al. A novel thermotolerant and acidotolerant peptide produced by a *Bacillus* strain newly isolated from a fermented food (kimchi) shows activity against multidrug-resistant bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 1, p. 80–83, jul. 2012.

CODELIA-ANJUM, A. et al. Enterococcal Urinary Tract Infections: A Review of the Pathogenicity, Epidemiology, and Treatment. **Antibiotics**, v. 12, n. 4, p. 778, 19 abr. 2023.

CRESTI, L.; CAPPELLO, G.; PINI, A. Antimicrobial Peptides towards Clinical Application—A Long History to Be Concluded. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 9, p. 4870–4870, 29 abr. 2024.

DAHL, A. et al. Sign of the Times: Updating Infective Endocarditis Diagnostic Criteria to Recognize *Enterococcus faecalis* as a Typical Endocarditis Bacterium. **Clinical Infectious Diseases**, v. 75, n. 6, 9 mar. 2022.

DANNEELS, P. et al. Impact of *Enterococcus faecalis* Endocarditis Treatment on Risk of Relapse. **Clinical Infectious Diseases**, v. 76, n. 2, p. 281–290, 19 set. 2022.

DARBY, E. M. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 280–295, 21 nov. 2022.

DE OLIVEIRA, D. M. P. et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, 13 maio 2020.

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. 183092–183092, 1 nov. 2019.

EHRLICH, J. et al. Chloromycetin, a New Antibiotic From a Soil Actinomycete. **Science (New York, N.Y.)**, v. 106, n. 2757, p. 417, 31 out. 1947.

EICHEL, V. M. et al. Epidemiology and outcomes of vancomycin-resistant *Enterococcus* infections: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Hospital Infection**, v. 141, p. 119–128, 1 nov. 2023.

ERDEM BÜYÜKKIRAZ, M.; KESMEN, Z. Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 3, 13 out. 2021.

ESSIG, A. et al. Copsin, a Novel Peptide-based Fungal Antibiotic Interfering with the Peptidoglycan Synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 50, p. 34953–34964, 12 dez. 2014.

FARON, M. L.; LEDEBOER, N. A.; BUCHAN, B. W. Resistance Mechanisms, Epidemiology, and Approaches to Screening for Vancomycin-Resistant *Enterococcus* in the Health Care Setting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 2436–2447, 1 out. 2016.

FARRELL, D. J. et al. LEADER Program Results for 2009: an Activity and Spectrum Analysis of Linezolid Using 6,414 Clinical Isolates from 56 Medical Centers in the United States. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 8, p. 3684–3690, 1 ago. 2011.

FEDDERS, H.; PODSCHUN, R.; LEIPPE, M. The antimicrobial peptide Ci-MAM-A24 is highly active against multidrug-resistant and anaerobic bacteria pathogenic for humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 3, p. 264–266, set. 2010.

FERNÁNDEZ-HIDALGO, N.; ESCOLÀ-VERGÉ, L.; PERICÀS, J. M. *Enterococcus faecalis* endocarditis: what's next? **Future Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 349–364, mar. 2020.

FIORE, E.; VAN TYNE, D.; GILMORE, M. S. Pathogenicity of Enterococci. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 4, 5 jul. 2019.

FLAMM, R. K. et al. In vitro spectrum of pexiganan activity; bactericidal action and resistance selection tested against pathogens with elevated MIC values to topical agents. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 1, p. 66–69, set. 2016.

FLEMING, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to Their Use in the Isolation of *B. influenzae*. **British journal of experimental pathology**, v. 10, n. 3, p. 226–236, jun. 1929.

GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L. B. The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, 20 mar. 2019.

GERALDES, C. et al. *Enterococcus* Virulence and Resistant Traits Associated with Its Permanence in the Hospital Environment. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, p. 857, 1 jul. 2022.

GILMORE, M. S. et al. **Enterococci : From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**. [s.l.] Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

HALL, C. W.; MAH, T.-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 276–301, 25 mar. 2017.

HANEY, E. F.; MANSOUR, S. C.; HANCOCK, R. E. W. Antimicrobial Peptides: An Introduction. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1548, p. 3–22, 2017.

HERRERA-HIDALGO, L. et al. Treatment of *Enterococcus faecalis* Infective Endocarditis: A Continuing Challenge. **Antibiotics**, v. 12, n. 4, p. 704, 4 abr. 2023.

HIGUITA, N. I. A.; HUYCKE, M. M. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. In: GILMORE, M. S. et al. (Eds.). **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. **Virulence**, v. 3, n. 5, p. 421–569, 15 ago. 2012.

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, Present and Future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 72–80, out. 2019.

JABBARI SHIADEH, S. M. et al. Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*: a systematic review and meta-analysis. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 12, p. 2713–2725, set. 2019.

JAMES, R. C. et al. Redesign of Glycopeptide Antibiotics: Back to the Future. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 5, p. 797–804, 21 fev. 2012.

JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 462–478, 1 out. 1994.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 155–76, 2016.

KELESIDIS, T. et al. Daptomycin Nonsusceptible Enterococci: An Emerging Challenge for Clinicians. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 2, p. 228–234, 17 dez. 2010.

KHAN, A. et al. Antimicrobial Susceptibility Testing for Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 60, n. 9, 13 jun. 2022.

KRISTICH, C. J.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. In: GILMORE, M. S. et al. (Eds.). **Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

LACH, J. et al. Novel Antimicrobial Peptides from Saline Environments Active against *E. faecalis* and *S. aureus*: Identification, Characterisation and Potential Usage. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 14, p. 11787–11787, 22 jul. 2023.

LEBRETON, F.; WILLEMS, R. J. L.; GILMORE, M. S. **Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

LEVITUS, M.; REWANE, A.; PERERA, T. B. Vancomycin-Resistant Enterococci. **NCBI Bookshelf**, 2023.

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, 2020.

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. 2021.

LÓPEZ, M. et al. Detection of vanA and vanB2-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1-2, p. 172–178, jul. 2009.

MA, Y.-X. et al. Considerations and Caveats in Combating ESKAPE Pathogens against Nosocomial Infections. **Advanced Science (Weinheim, Baden-Württemberg, Germany)**, v. 7, n. 1, p. 1901872, 1 jan. 2020.

MACCALLUM, W. G.; HASTINGS, T. W. A case of Acute Endocarditis caused by *Micrococcus Zymogenes* (Nov. Spec.), with a description of the microorganism.

Journal of Experimental Medicine, v. 4, n. 5-6, p. 521–534, 1 set. 1899.

MANNIELLO, M. D. et al. Insect antimicrobial peptides: potential weapons to counteract the antibiotic resistance. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, p. 4259–4282, 17 fev. 2021.

MULANI, M. S. et al. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: a Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 539, 1 abr. 2019.

MUTEEB, G. et al. Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 11, p. 1615–1615, 15 nov. 2023.

NAKAJIMA, Y. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1624, n. 1-3, p. 125–130, dez. 2003.

NICOLAOU, K. C.; RIGOL, S. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. **The Journal of Antibiotics**, v. 71, n. 2, p. 153–184, 5 jul. 2017.

O'NEILL J. **Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations** Review on Antimicrobial Resistance. London: [s.n.].

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.

OONG, G. C.; TADI, P. Chloramphenicol. **PubMed**, jul. 2023.

OYAMA, L. et al. Buwchitin: A Ruminant Peptide with Antimicrobial Potential against *Enterococcus faecalis*. **Frontiers in chemistry**, v. 5, n. 51, 12 jul. 2017.

PATEL, S.; PREUSS, C. V.; BERNICE, F. **Vancomycin**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459263/>>.

PENG, K. S. et al. Tissue distribution, expression, and antimicrobial activity of *Anas platyrhynchos* avian β -defensin 6. **Poultry Science**, v. 92, n. 1, p. 97–104, jan. 2013.

PIZZOLATO-CEZAR, L. R.; OKUDA-SHINAGAWA, N. M.; MACHINI, M. T. Combinatory Therapy Antimicrobial Peptide-Antibiotic to Minimize the Ongoing Rise of Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 9 ago. 2019.

PUCHTER, L. et al. Economic burden of nosocomial infections caused by vancomycin-resistant enterococci. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, 5 jan. 2018.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **DrugResistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 151–171, dez. 2010.

RAMOS, S. et al. Enterococci, from Harmless Bacteria to a Pathogen. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1118, 1 ago. 2020.

RAZA, T. et al. Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. **J Pak Med Assoc**, v. 68, n. 5, p. 768–772, maio 2018.

RICH, R. L. et al. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 38, p. 26939–26945, 17 set. 1999.

ROSSELLI DEL TURCO, E. et al. How do I manage a patient with enterococcal bacteraemia? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 3, nov. 2020.

RŮŽIČKOVÁ, M.; VÍTĚZOVÁ, M.; KUSHKEVYCH, I. The characterization of *Enterococcus* genus: resistance mechanisms and inflammatory bowel disease. **Open Medicine**, v. 15, n. 1, p. 211–224, 3 abr. 2020.

SAID, M. S.; TIRTHANI, E.; LESHIO, E. **Enterococcus Infections**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.

SERRANO, J. LiverTox: An online information resource and a site for case report submission on drug-induced liver injury. **Clinical Liver Disease**, v. 4, n. 1, p. 22–25, jul. 2014.

SHIN, S. Y. et al. Salt Resistance and Synergistic Effect with Vancomycin of α -Helical Antimicrobial Peptide P18. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n. 1, p. 558–562, jan. 2002.

SINGH, S. et al. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 53–62, 28 abr. 2017.

SOUZA, P. F. N. et al. Synthetic antimicrobial peptides: From choice of the best sequences to action mechanisms. **Biochimie**, v. 175, p. 132–145, 1 ago. 2020.

THIERCELIN, M. E. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. **C R Seances Soc Biol Fil**, v. 5, p. 269–271, 1899.

UPADHYAYA, P. M. G.; RAVIKUMAR, K. L.; UMAPATHY, B. L. Review of virulence factors of *Enterococcus*: An emerging nosocomial pathogen. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 301, 2009.

VU, J.; CARVALHO, J. *Enterococcus*: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. **Frontiers in Biology**, v. 6, n. 5, p. 357–366, out. 2011.

WILHELM, M. P. Vancomycin. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 66, n. 11, p. 1165–1170, 1 nov. 1991.

WORLD BANK. **Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future**. Disponível em: <<https://www.worldbank.org/en/topic/health/publication/drug-resistant-infections-a-threat-to-our-economic-future>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024**. Geneva: World Health Organization, 2024.

WU, J. et al. The second N-terminal aromatic residue of the fungal defensin, blapersin, of *Blastomyces percursoris* is essential for its antibacterial activity. **Peptides**, v. 133, p. 170400–170400, 29 ago. 2020.

XU, L. et al. Conversion of Broad-Spectrum Antimicrobial Peptides into Species-Specific Antimicrobials Capable of Precisely Targeting Pathogenic Bacteria.

Scientific Reports, v. 10, n. 1, p. 944, 22 jan. 2020.

YUKSEKDAG, Z. et al. Safety and metabolic characteristics of 17 *Enterococcus faecium* isolates. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 9, p. 5683–5694, 28 ago. 2021.

ZENG, X.-C. et al. Three new antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus imperator*. **Peptides**, v. 45, p. 28–34, jul. 2013.

ZHANG, H. et al. Bactericidal synergism between phage endolysin Ply2660 and cathelicidin LL-37 against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* biofilms. **npj biofilms and microbiomes**, v. 9, n. 1, 6 abr. 2023.

ZHEN, X. et al. Economic burden of antibiotic resistance in ESKAPE organisms: a systematic review. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, 13 ago. 2019.