

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Centro de Desenvolvimento Tecnológico**

**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**



Dissertação

**Design computacional e caracterização de peptídeos antimicrobianos (AMPs)  
contra *Pseudomonas aeruginosa***

**Déborah Trota Farias de Albernaz**

Pelotas, 2024

**Déborah Trota Farias de Albernaz**

**Design computacional e caracterização de peptídeos antimicrobianos (AMPs)  
contra *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Biotecnologia).

Orientadora: Daiane Drawanz Hartwig

Coorientador: Frederico Schmitt Kremer

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação da Publicação

A327d Albernaz, Déborah Trota Farias de

Design computacional e caracterização de peptídeos antimicrobianos (AMPs) contra *Pseudomonas aeruginosa* [recurso eletrônico] / Déborah Trota Farias de Albernaz ; Daiane Drawanz Hartwig, orientadora ; Frederico Schmitt Kremer, coorientador. — Pelotas, 2024.  
109 f.

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

1. Bioinformática. 2. Sinergismo. 3. Antibiofilme. 4. *Quorum* sensing. 5. Toxicidade. I. Hartwig, Daiane Drawanz, orient. II. Kremer, Frederico Schmitt, coorient. III. Título.

CDD 615.329

Déborah Trota Farias de Albernaz

Design computacional e caracterização de peptídeos antimicrobianos (AMPs) contra  
*Pseudomonas aeruginosa*

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 02 de dezembro de 2024

Banca examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Daiane Drawanz Hartwig (Orientadora)

Doutora em Ciências (Biotecnologia) pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Frederico Schmitt Kremer (Coorientador)

Doutor em Ciências (Biotecnologia) pela Universidade Federal de Pelotas

Dr<sup>a</sup> Kamila Furtado da Cunha

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Amilton Clair Pinto Seixas Neto

Doutor em Ciências (Biotecnologia) pela Universidade Federal de Pelotas

Dr<sup>a</sup> Marcelle Oliveira Garcia

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pelotas

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo ao longo dos anos.

Ao meu namorado, que esteve presente em todas as etapas deste trabalho, você é meu maior incentivador.

Aos amigos, Amilton e Suzane, por todos os nossos cafés recheados de risadas, fofoca e parceria. Com certeza vocês foram parte fundamental dessa etapa.

Aos mestres, Daiane e Frederico, pela ajuda e orientação.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Obrigada.

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

## Resumo

ALBERNAZ, Déborah Trota Farias de. **Design computacional e caracterização de peptídeos antimicrobianos (AMPs) contra *Pseudomonas aeruginosa***. Orientadora: Daiane Drawanz Hartwig. 2024. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

As infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS) causadas por *Pseudomonas aeruginosa* representam uma ameaça significativa à saúde pública global, especialmente com o surgimento de cepas multirresistentes que não respondem a nenhuma das terapias disponíveis, incluindo os carbapenêmicos. Nesse contexto, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas é essencial. Peptídeos antimicrobianos (AMPs) têm se destacado como uma alternativa promissora devido aos seus mecanismos de ação seletivos, incluindo a interação com a membrana celular bacteriana, o que dificulta o desenvolvimento de resistência. Os AMPs são caracterizados por sua diversidade estrutural e por sua versatilidade de ação, apresentando potencial antibacteriano, antifúngico, antiviral e antitumoral. A utilização de estratégias computacionais para o design e a otimização de AMPs tem se mostrado eficaz na identificação de novos candidatos, permitindo a criação de moléculas com maior especificidade e menor toxicidade. Neste estudo, a ferramenta TACaPe, construída com o modelo de aprendizado profundo *Transformer*, foi treinada para prever 100 novos AMPs com potencial antibacteriano. Para direcionar a ação contra *Pseudomonas aeruginosa*, foram realizadas análises de *docking* molecular em receptores (LasR, RhIR e PqsR) relacionados às rotas de *quorum* sensing da bactéria. Os cinco peptídeos com melhor desempenho nas análises computacionais foram sintetizados quimicamente e tiveram sua atividade antibacteriana contra a cepa padrão de *P. aeruginosa* ATCC® 27853 avaliada *in vitro*. A concentração inibitória mínima (CIM) dos AMPs foi determinada em concentrações de até 250 µg/mL. Os AMPs demonstraram atividade antibiofilme em diferentes concentrações, com valores de inibição variando entre 23% e 93,4%. Além disso, dois AMPs apresentaram potencial sinérgico com o meropenem, reduzindo a CIM do antibiótico em até 9,5 vezes. Ensaio de citotoxicidade e atividade hemolítica indicaram que os AMPs são potencialmente seguros nas concentrações necessárias para a atividade antibacteriana. Esses resultados reforçam a utilidade das ferramentas computacionais na descoberta e otimização de novos medicamentos, evidenciando seu potencial como alternativas viáveis para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* multirresistente.

Palavras-chave: bioinformática; sinergismo; antibiofilme; *quorum* sensing; toxicidade.

## Abstract

ALBERNAZ, Déborah Trota Farias de. **Computational design and characterization of antimicrobial peptides (AMPs) against *Pseudomonas aeruginosa***. Advisor: Daiane Drawanz Hartwig. 2024. 109 p. Dissertation (Masters in Biotechnology) – Center for Technological Development, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2024.

Hospital-acquired infections (HAIs) caused by *Pseudomonas aeruginosa* represent a significant global public health threat, especially with the emergence of multidrug-resistant strains that do not respond to any of the available therapies, including carbapenems. In this context, the development of new therapeutic approaches is essential. Antimicrobial peptides (AMPs) have emerged as a promising alternative due to their selective mechanisms of action, including interaction with the bacterial cell membrane, which complicates the development of resistance. AMPs are characterized by their structural diversity and versatile actions, exhibiting antibacterial, antifungal, antiviral, and antitumor potential. The use of computational strategies for the design and optimization of AMPs has proven effective in identifying new candidates, enabling the creation of molecules with higher specificity and lower toxicity. In this study, the TACaPe tool, built on the deep learning Transformer model, was trained to predict 100 new AMPs with antibacterial potential. To target activity against *Pseudomonas aeruginosa*, molecular docking analyses were performed on receptors (LasR, RhIR, and PqsR) related to the bacterium's *quorum* sensing pathways. The five peptides with the best computational performance were chemically synthesized and tested for antibacterial activity against the *P. aeruginosa* ATCC® 27853 standard strain *in vitro*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the AMPs was determined at concentrations up to 250 µg/mL. The AMPs demonstrated anti-biofilm activity at different concentrations, with inhibition values ranging from 23% to 93.4%. Additionally, two AMPs exhibited synergistic potential with meropenem, reducing the antibiotic's MIC by up to 9.5-fold. Cytotoxicity and hemolytic activity assays indicated that the AMPs are potentially safe at concentrations necessary for antibacterial activity. These findings reinforce the utility of computational tools in the discovery and optimization of new drugs, highlighting their potential as viable alternatives for treating infections caused by multidrug-resistant *P. aeruginosa*.

Keywords: bioinformatics; synergism; antibiofilm; *quorum* sensing; toxicity.

## Lista de Figuras

Figura 1	Principais mecanismos de resistência apresentados por <i>P. aeruginosa</i> .....	20
Figura 2	Interações entre os principais sistemas de QS em <i>P. aeruginosa</i> , suas moléculas de sinalização e envolvimento na produção de fatores de virulência.....	23
Figura 3	Principais alvos celulares e mecanismos de ação dos AMPs.....	27

## Lista de Figuras do Manuscrito

Figura 1	Three-dimensional structures and Ramachandran validation plots of TAC-p1 (A), TAC-p2 (B), TAC-p3 (C), TAC-p4 (D), and TAC-p5 (E) AMPs.....	62
Figura 2	Biofilm inhibition of the <i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853 when exposed to different concentrations of AMPs. Control: untreated strain. * $P < 0.05$ compared to the control.....	63
Figura 3	Hemolytic activity of the AMPs against mice RBCs.....	64
Figura 4	Cell viability of L929 cells treated with different concentrations of AMPs. Untreated: viability control (untreated cell). * $P < 0.05$ compared to the control.....	65



## Lista de Tabelas

Tabela 1	AMP sequences and <i>in silico</i> assessment of toxicity, allergenicity, hemolytic activity, and antimicrobial properties.....	58
Tabela 2	Calculated physicochemical properties of the AMPs.....	59
Tabela 3	Molecular docking analysis results for the top five AMPs against QS receptors of <i>P. aeruginosa</i> .....	60
Tabela 4	MIC and synergistic activity (checkerboard assay) of the AMPs with meropenem against <i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853.....	61

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>11</b>
1.1 Hipótese.....	14
1.2 Objetivo Geral .....	14
1.3 Objetivos Específicos.....	14
<b>2 Revisão da Literatura .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>16</b>
2.1.1 Fatores de virulência.....	16
2.1.2 Mecanismos de resistência.....	19
2.1.3 <i>Quorum</i> sensing (QS) e formação de biofilme.....	22
<b>2.2 Peptídeos Antimicrobianos (AMPs).....</b>	<b>24</b>
2.2.1 Estrutura dos AMPs.....	24
2.2.2 Mecanismos de ação.....	26
2.2.3 Uso clínico e perspectivas futuras.....	27
<b>2.3 Bioinformática.....</b>	<b>29</b>
2.3.1 Estratégias computacionais para o desenvolvimento de fármacos.....	29
2.3.2 Algoritmos de IA.....	30
2.3.3 <i>Design</i> computacional de AMPs .....	32
<b>3. Manuscrito.....</b>	<b>34</b>
3.1 Novel Antimicrobial Peptides (AMPs) Targeting <i>Quorum</i> Sensing in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	35
<b>4. Considerações Finais.....</b>	<b>66</b>
<b>Referências.....</b>	<b>67</b>
<b>Apêndices.....</b>	<b>81</b>
<b>Apêndice A: Patente.....</b>	<b>82</b>

## 1 Introdução

A resistência aos antimicrobianos (RAM) ocorre quando microrganismos, como fungos, bactérias e vírus, se adaptam e sobrevivem na presença de medicamentos que antes os inibiam (Tang; Millar; Moore, 2023). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a RAM representa uma ameaça significativa à saúde pública global (WHO, 2024). Infecções causadas por patógenos resistentes aos antimicrobianos estão entre os maiores desafios terapêuticos atuais, resultando em mais de 1,27 milhões de mortes diretamente relacionadas e aproximadamente 5 milhões de óbitos associados no ano de 2019 (Murray *et al.*, 2022). Em 2024, a OMS atualizou sua lista de bactérias patogênicas prioritárias para a pesquisa e o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção, controle e tratamento da RAM. Uma das espécies integrantes desta lista, é *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, considerada como alta prioridade (WHO, 2024).

O gênero *Pseudomonas* spp. é composto por mais de 200 espécies de bacilos Gram-negativos, sendo *P. aeruginosa* a sua integrante de maior importância clínica (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2017). Essa espécie geralmente acomete indivíduos imunocomprometidos em unidades de terapia intensiva (UTIs), causando quadros graves de infecções no pulmão, trato urinário e pele (Behzadi; Baráth; Gajdács, 2021). Diversos fatores de virulência estão presentes em *P. aeruginosa*, como as exotoxinas e as adesinas (Veetilvalappil *et al.*, 2022). Além disso, essa espécie é formadora de biofilme, uma característica que facilita a adesão e colonização, além de servir como proteção frente a ação de antibióticos e desinfetantes (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2017).

*P. aeruginosa* apresenta fatores de resistência intrínsecos e adquiridos, que agravam o problema e limitam as suas possibilidades terapêuticas. Essa espécie é intrinsecamente resistente a algumas classes de antibióticos, especialmente devido à regulação da expressão de genes que codificam para a produção de bombas de efluxo (Lorusso *et al.*, 2022; Murray; Rosenthal; Pfaller, 2017). Entre os mecanismos de resistência adquirida, pode-se citar as mutações espontâneas e a transferência horizontal de genes através de plasmídeos (Pang *et al.*, 2019). É através desses mecanismos, que bactérias normalmente tornam-se um problema de saúde pública,

visto que a pressão seletiva exercida pelo uso indiscriminado de antibacterianos atua como um facilitador, selecionando cepas multirresistentes (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2017).

Além das adaptações estruturais e metabólicas, esse patógeno possui um sistema de comunicação intercelular conhecido como *quorum* sensing (QS), o qual regula a expressão de diversos fatores de virulência e a formação de biofilmes. Esse mecanismo permite que a bactéria detecte a densidade populacional e, ao atingir um determinado limiar, coordene ações em resposta ao ambiente. Em *P. aeruginosa*, o QS ocorre por meio das vias hierárquicas *las*, *rhl* e *pqs*, que utilizam moléculas sinalizadoras para ativar a expressão de genes associados à resistência e à virulência, fortalecendo seu potencial patogênico (Li *et al.*, 2022).

Nesse contexto, iniciativas que visam a pesquisa e o desenvolvimento de novos compostos e/ou melhorias para aqueles que já estão disponíveis na clínica tornaram-se um alvo de estudo promissor, como os peptídeos antimicrobianos (AMPs). Usualmente, os AMPs se apresentam como sequências curtas, geralmente entre 5-50 aminoácidos, de caráter catiônico e com alta porcentagem de resíduos hidrofóbicos (>50%). São compostos produzidos como mecanismo de defesa pela resposta imune inata de diferentes organismos, como peixes, plantas, mamíferos e insetos (Bin Hafeez *et al.*, 2021). Sua atividade pode ser classificada em antiviral, antibacteriana, antifúngica e antiparasitária, principalmente (Zhang *et al.*, 2021). Além disso, existem diversos estudos que atribuem aos AMPs também a ação antitumoral (Deslouches; Di, 2017; Hoskin; Ramamoorthy, 2008; Tornesello *et al.*, 2020).

Os AMPs possuem diferentes mecanismos de ação, sendo o principal associado à interação com a membrana celular dos microrganismos. Existem três modelos principais pelos quais essa interação pode ocorrer: o modelo tapete, o modelo poro-toroidal e o modelo barril-estave. No modelo tapete, os peptídeos se acumulam na superfície da membrana, desestabilizando sua integridade e causando a lise celular através da formação de micelas. Já nos modelos poro-toroidal e barril-estave, ambos formam um poro transmembrana, com diferença residindo na orientação das faces hidrofílicas e hidrofóbicas expostas ao longo da camada lipídica (Talapko *et al.*, 2022). Outros mecanismos de ação estão relacionados com a inibição da síntese de compostos intracelulares (Corrêa *et al.*, 2019).

A atividade antimicrobiana e os mecanismos de ação dos AMPs estão diretamente relacionados às suas características estruturais e parâmetros físico-químicos (Li *et al.*, 2021). Propriedades como tamanho e composição da sequência de aminoácidos, constituição da cadeia lateral, carga e proporção dos resíduos são apenas alguns dos diversos parâmetros que contribuem para o potencial ativo desses peptídeos. A sua estrutura secundária também é um fator relevante. Peptídeos nas formas  $\alpha$ -hélice e folha- $\beta$  são mais seletivos e demonstram maior capacidade de interagir com a membrana de microrganismos (Liang *et al.*, 2020).

A gramicidina é o primeiro AMP utilizado na indústria farmacêutica do qual se tem registro (Pavithrra; Rajasekaran, 2020). Desde sua descoberta em 1939, apenas dez formulações baseadas em AMPs se tornaram disponíveis comercialmente, todas de uso tópico ou intravenoso (Browne *et al.*, 2020). Entre essas formulações, destacam-se as polimixinas, consideradas como opção de última escolha para o tratamento de infecções hospitalares por bactérias Gram-negativas no Brasil (Quintanilha *et al.*, 2019; Rossi, 2011). Apesar desse número limitado, existe uma lista ampla de peptídeos em diferentes fases de testes clínicos, com potencial terapêutico no tratamento de infecções bacterianas, fúngicas e câncer (Koo; Seo, 2019; Sierra *et al.*, 2017; Zhang; Yang, 2022).

Existem algumas limitações que colaboram para os baixos números de AMPs que conseguem chegar ao uso clínico. Devido ao dano na membrana celular de células eucarióticas, a atividade hemolítica é considerada um de seus principais efeitos adversos (Wang *et al.*, 2021). Além disso, eles são considerados instáveis e facilmente hidrolisados por proteases, fazendo com que sua meia-vida seja baixa e dificultando sua utilização em formulações orais (Lai *et al.*, 2022). Entretanto, o estudo de modificações estruturais nesses peptídeos para permitir a correção desses e de outros problemas, e potencializar a sua atividade já é uma possibilidade. Hoje, o *design* racional de AMPs é uma linha de pesquisa bastante trabalhada ao redor do mundo e tem demonstrado resultados promissores (Marcos *et al.*, 2008; Pearson *et al.*, 2016; Uggerhøj *et al.*, 2015; You *et al.*, 2023).

Com o aumento do número de bancos de dados biológicos, a utilização de estratégias computacionais para o desenvolvimento de novas drogas foi facilitada. Hoje, existem mais de 30.000 sequências de AMPs com atividade, propriedades

físico-químicas e características estruturais catalogadas disponíveis *online*. A combinação desses dados com inteligência artificial (IA) e modelagem computacional tem permitido avanços significativos no campo do *design* de AMPs. Essa abordagem permite a previsão, triagem e *design* desses AMPs de forma rápida e automatizada, através da descoberta de padrões em milhares de sequências fornecidas por pesquisadores de todas as partes do mundo em diversos bancos de dados de AMPs disponíveis *online* (Bin Hafeez *et al.*, 2021; Liscano; Oñate-Garzón; Delgado, 2020).

Diante do exposto, à medida que a RAM continua a desafiar abordagens convencionais de tratamento, a combinação entre pesquisa computacional e biologia molecular oferece uma nova perspectiva na luta contra *P. aeruginosa* multirresistente a drogas (MDR). O desenvolvimento racional de novos AMPs ativos contra esse patógeno, apoiado por métodos de IA, pode oferecer um caminho promissor para contornar os desafios da RAM, proporcionando alternativas terapêuticas inovadoras e potencialmente eficazes contra infecções resistentes causadas por *P. aeruginosa*.

## 1.1 Hipótese

É possível combinar técnicas de modelagem computacional e IA para desenvolver peptídeos que possuam atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa*.

## 1.2 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar novos peptídeos sintéticos antibacterianos usando análises *in silico*, inteligência artificial e modelagem computacional na busca de alternativas terapêuticas contra infecções causadas por *P. aeruginosa*.

## 1.3 Objetivos Específicos

- Buscar e catalogar sequências peptídicas com atividade antibacteriana em bancos de dados de AMPs;
- Realizar uma curadoria dos dados obtidos e treinar o modelo de aprendizado de máquina (AM) da ferramenta TACaPe;

- Gerar novas sequências de AMPs a partir do modelo treinado;
- Avaliar *in silico* a atividade e os possíveis mecanismos de ação dos AMPs gerados nas rotas de QS de *P. aeruginosa*;
- Caracterizar *in silico* as propriedades físico-químicas, tóxicas e alergênicas dos AMPs gerados;
- Avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana e antibiofilme dos AMPs frente a cepa padrão de *P. aeruginosa* ATCC® 27853;
- Avaliar *in vitro* a combinação dos AMPs com antibióticos de escolha para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa*;
- Caracterizar *in vitro* a toxicidade e a atividade hemolítica dos AMPs produzidos.

## 2 Revisão de Literatura

### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* spp. é integrado por mais de 200 espécies de bactérias patogênicas e não-patogênicas. Esses microrganismos são bacilos Gram-negativos, aeróbios e não-fermentadores, que possuem característica ubíqua, ou seja, podem ser encontrados em praticamente todo o ambiente (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2017). Essa habilidade é, em grande parte, influenciada pela sua versatilidade metabólica e adaptabilidade às condições ambientais, que permitem a utilização de diferentes tipos de compostos orgânicos como fontes de carbono e nitrogênio (Ambreetha *et al.*, 2024).

Esse gênero é amplamente utilizado em estudos com organismos vegetais, devido ao seu papel como promotor de crescimento, e em ecossistemas naturais, pelas suas propriedades de biorremediação do solo, destacando-se espécies como *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae* e *Pseudomonas fluorescens* (Lupo; Haenni; Madec, 2018). Poucas espécies de *Pseudomonas* spp. são de interesse clínico na saúde humana, destacando-se a *P. aeruginosa* como seu integrante mais importante.

Em 2024, a OMS atualizou a sua lista de patógenos prioritários para a pesquisa e o desenvolvimento de novas drogas e, *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos continua listada como uma ameaça de alta prioridade (WHO, 2024). Esse microrganismo, que já integrava a lista em sua versão anterior, é um dos principais patógenos envolvidos com as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), tornando-se um problema de saúde pública global devido ao impacto nos índices de morbidade e mortalidade (Folic *et al.*, 2021). As IRAS são qualquer infecção adquirida após a admissão de um paciente no hospital, podendo se manifestar durante a internação ou após a alta, desde que relacionadas com o período de internação, e são responsáveis por diversas complicações que incluem o prolongamento do tempo de internação e aumento dos custos de saúde (Padoveze; Fortaleza, 2014).



*P. aeruginosa* é considerada uma bactéria oportunista, ou seja, acomete principalmente pacientes imunocomprometidos dentro de ambientes clínicos e hospitalares, sendo particularmente um problema para indivíduos internados em UTIs, onde eles estão mais suscetíveis devido ao uso de dispositivos invasivos, como cateteres e ventilação mecânica. Essa bactéria é especialmente perigosa para pacientes com fibrose cística, sendo a espécie mais comumente isolada nesses casos. *P. aeruginosa* se estabelece nas vias aéreas desses indivíduos, causando infecções praticamente impossíveis de erradicar após tornar-se crônicas (Silva Filho *et al.*, 2013).

As infecções causadas por *P. aeruginosa* estão associadas a altas taxas de mortalidade, em parte devido ao aumento da resistência aos carbapenêmicos, uma classe de antibióticos frequentemente utilizada como último recurso (Spernovasilis; Psichogiou; Poulakou, 2021). Um estudo de revisão de 2019 avaliou a prevalência de diferentes patógenos em IRAS entre os anos de 1985-2018 e identificou que mais da metade delas é causada por bactérias Gram-negativas. Além disso, este mesmo trabalho apontou que *P. aeruginosa* estava entre as maiores causas de IRAS na América do Sul, sendo responsável por cerca de 20% dos casos (Saleem *et al.*, 2019).

Diferentes manifestações clínicas são observadas em pacientes acometidos por *P. aeruginosa*. Entre elas estão infecções respiratórias, como pneumonia, especialmente grave em pacientes com comorbidades pulmonares; infecções cutâneas, frequentemente encontradas em queimaduras; infecções do trato urinário, com maior incidência em pacientes com cateteres vesicais; otite externa e média; infecções oculares, como ceratite; endocardite em pacientes com dispositivos intracardíacos; e bacteremia, uma infecção sistêmica potencialmente fatal (Streeter *et al.*, 2016).

### **2.1.1 Fatores de Virulência**

*P. aeruginosa* possui diversos fatores de virulência celulares e extracelulares que permitem o estabelecimento da infecção e a sua persistência no hospedeiro. Essa característica contribui para a patogênese da espécie e é controlada por um complexo

regulatório através de sistemas de sinalização. Os principais fatores de virulência de *P. aeruginosa* são as adesinas, toxinas e enzimas (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2017).

As adesinas são proteínas responsáveis pela adesão à célula hospedeira através do reconhecimento de receptores específicos nos tecidos do indivíduo, e constituem a primeira etapa para o estabelecimento da infecção bacteriana. Essas proteínas geralmente se encontram presentes na superfície celular bacteriana e permitem que a bactéria resista às tentativas naturais do organismo de eliminá-la, facilitando a colonização e o desenvolvimento da infecção. Em *P. aeruginosa* as adesinas de maior relevância para a sua patogênese são os flagelos e o pili, que também são responsáveis pela motilidade da bactéria, o LPS e o alginato (Liao *et al.*, 2022; Qin *et al.*, 2022).

O LPS é um componente da membrana externa de *P. aeruginosa* que age desencadeando a resposta inflamatória no organismo humano, através do estímulo da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essa característica é conhecida como atividade de endotoxina e é mediada pelo lipídio A, um glicolipídio que compõe o LPS (Jurado-Martín; Sainz-Mejías; McClean, 2021). O alginato é um polissacarídeo extracelular que protege as células bacterianas da atividade de antibióticos e sanitizantes, e da resposta imune do hospedeiro, através da formação de uma cápsula mucoide que a protege da fagocitose. Apesar de não ser essencial para a formação de biofilme, essa estrutura facilita a sua maturação e desenvolvimento (Jurado-Martín; Sainz-Mejías; McClean, 2021).

Com relação às toxinas e enzimas, *P. aeruginosa* possui uma vasta diversidade, que são reguladas por diferentes sistemas de secreção. O sistema de secreção do tipo III, é o mais importante nessa espécie devido ao seu envolvimento direto na injeção de toxinas no citosol da célula hospedeira (Sawa *et al.*, 2014). Existem quatro Exoenzimas (Exo) efetoras que são injetadas por *P. aeruginosa*: ExoU, ExoS, ExoT e ExoY. As toxinas ExoS e ExoT possuem alta similaridade e funções biológicas semelhantes, causando ruptura da célula epitelial através do rearranjo de actina e interferência na fagocitose (Hasannejad-Bibalan *et al.*, 2021). A ExoU é uma citocina com atividade de fosfolipase A2, que atua modulando a resposta inflamatória do hospedeiro. Por fim, a ExoY possui atividade adenilato ciclase, e regula a expressão de diversos mensageiros intracelulares como cAMP, cCMP e cGMP,

causando a ruptura do citoesqueleto de actina e barreiras endoteliais (Ochoa *et al.*, 2012).

A exotoxina A (ETA) é descrita como o fator de virulência mais importante de *P. aeruginosa*. Essa toxina reconhece receptores na célula animal e se liga, permitindo a sua internalização. Uma vez em ambiente intracelular, a ETA interrompe a síntese de proteínas através da sua atividade de ribosilação do ADP, causando necrose no sítio de colonização (Michalska; Wolf, 2015). A atividade da ETA está associada à dermonecrose de feridas de queimaduras, danos nas córneas em infecções oculares e danos teciduais em infecções pulmonares crônicas (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2017).

*P. aeruginosa* ainda possui outros importantes fatores de virulência como a produção de piocianina e pioverdina, que além de servirem como diferenciais para sua identificação, também possuem funções relevantes na patogênese dessa espécie. A piocianina é um pigmento azul que catalisa a produção de ROS, como o superóxido e o peróxido de hidrogênio, e atua modulando o sistema imunológico do hospedeiro através do aumento da produção de interleucina-8 (El-Fouly *et al.*, 2015). Já a pioverdina é um pigmento amarelo-esverdeado que tem função de sideróforo, facilitando a captação de ferro para a utilização no metabolismo da bactéria (Díaz-Pérez *et al.*, 2023).

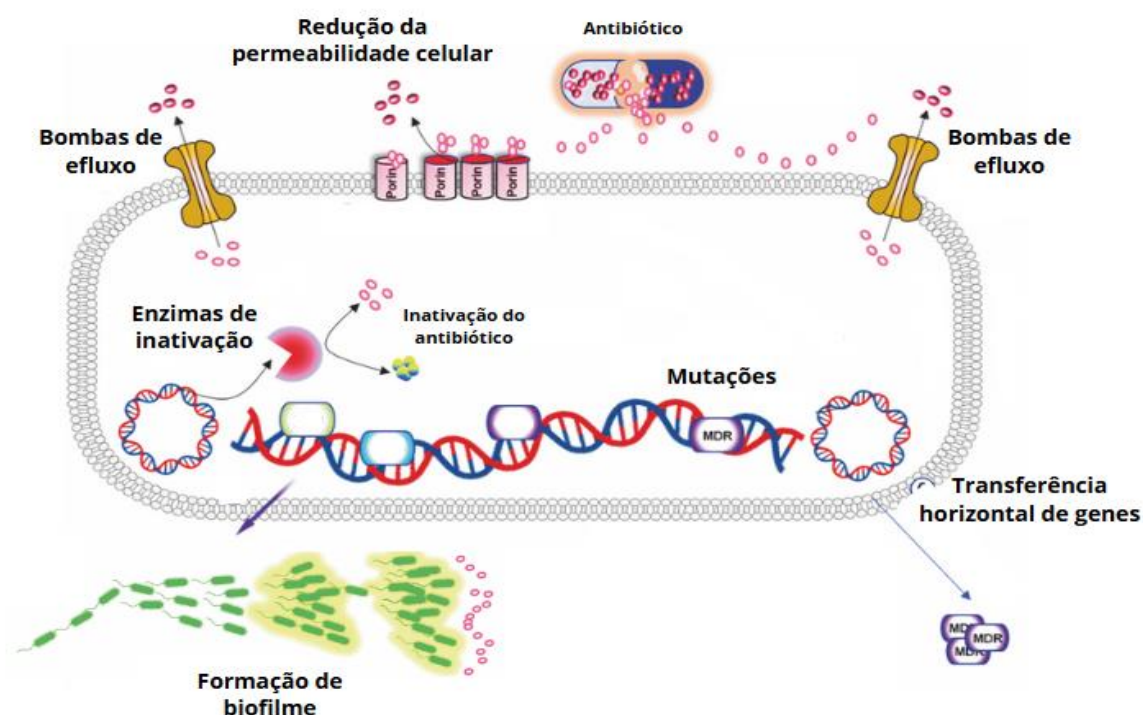
### **2.1.2 Mecanismos de resistência**

O uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana, veterinária e na agricultura é um problema que dificulta o controle da RAM. A pressão seletiva resultante da ação incompleta desses fármacos está associada à proliferação de cepas resistentes no ambiente (Rang *et al.*, 2020). Um estudo realizado nos Estados Unidos indicou que os principais fatores responsáveis pela RAM em países em desenvolvimento, como o Brasil, estão relacionados à falta de vigilância no desenvolvimento da resistência, a prescrição inadequada e o fácil acesso aos antibióticos (Chokshi *et al.*, 2019).

Para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*, geralmente são administrados antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, como gentamicina e tobramicina, além dos beta-lactâmicos, especialmente os carbapenêmicos, que em alguns casos são combinados (Rang *et al.*, 2020). As polimixinas, como a Polimixina B, também são uma opção terapêutica, embora seu uso se restrinja a infecções superficiais, como cutâneas ou oftálmicas, devido aos seus intensos efeitos adversos (Roberts *et al.*, 2015).

Até o momento, já foram isoladas cepas de *P. aeruginosa* resistentes a todas as classes de antibióticos disponíveis, incluindo os carbapenêmicos e as cefalosporinas de terceira geração, que são considerados medicamentos de última escolha (Rang *et al.*, 2020). Por esta razão, o tratamento dessa espécie está se tornando cada vez mais limitado, resultando em uma escassez de opções terapêuticas para tratar infecções causadas por cepas MDR. A Figura 1 demonstra os principais mecanismos de resistência apresentados por *P. aeruginosa*

Figura 1 – Principais mecanismos de resistência apresentados por *P. aeruginosa*.



Fonte: Qin *et al.*, 2022. (adaptado pelo autor)

Em relação à resistência adquirida, existem dois modos principais de aquisição desses mecanismos: por meio de mutações ou transferência horizontal de genes. As mutações estão associadas a modificações nos sítios de ação dos antibióticos, bem como ao aumento ou redução da expressão de bombas de efluxo, enzimas e receptores específicos. Já a transferência horizontal pode ocorrer entre a mesma espécie ou entre espécies diferentes, geralmente envolvendo elementos genéticos móveis, como plasmídeos ou transposons, que transportam genes de resistência a uma ou mais classes de compostos (Reygaert, 2018).

Como mencionado, *P. aeruginosa* possui diversos mecanismos de resistência intrínsecos, sendo as bombas de efluxo um dos mais importantes. Essas bombas atuam reconhecendo diferentes classes de antibacterianos e exportando esses compostos para o meio extracelular, impedindo ou dificultando a sua atividade (Du *et al.*, 2018). Esse sistema pode agir de forma seletiva, em apenas uma classe de moléculas, ou uma mesma bomba pode exportar diferentes substâncias. Existem relatos na literatura de bombas de efluxo em *P. aeruginosa* associadas ao extravasamento de desinfetantes, detergentes, biocidas, antibióticos e outras classes de medicamentos (Poole, 2001; Amsalu *et al.*, 2020; Nam; Yoo, 2024).

Outro mecanismo intrínseco dessa espécie é a alteração da permeabilidade da membrana celular. Isso ocorre através de porinas, proteínas transmembrana que formam canais que conectam os meios intracelular e extracelular e tem como função a passagem de metabólitos e nutrientes. Compostos antibacterianos podem penetrar na célula de duas formas diferentes de acordo com a sua polaridade, através da bicamada fosfolipídica da membrana ou das porinas. As porinas de maior importância em *P. aeruginosa* são OprF, a mais abundante na célula, e OprD, relacionada a entrada de carbapenêmicos (Ude *et al.*, 2021).

Além disso, *P. aeruginosa* possui naturalmente em seu genoma genes que codificam para enzimas inativadoras de antibióticos, como o AmpC, responsável pela produção de  $\beta$ -lactamases. Essas enzimas rompem a ligação amida do anel beta lactâmico inativando representantes dessa classe, como penicilinas e cefalosporinas. Outras enzimas encontradas comumente nessa espécie são aminoglicosídeo fosfotransferase, aminoglicosídeo acetiltransferase e aminoglicosídeo

nucleotidiltransferase, responsáveis pela inativação de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, como amicacina, gentamicina e tobramicina (Pang *et al.*, 2019).

### 2.1.3 Quorum sensing (QS) e formação de biofilme

As bactérias possuem a capacidade de se comunicar umas com as outras por meio de sinalização química, essa habilidade é conhecida como *quorum* sensing (QS). QS é um mecanismo regulatório que permite que as bactérias detectem quando determinada densidade populacional é atingida e, em resposta, moléculas sinalizadoras são liberadas. Essas moléculas podem se difundir ou ser exportadas para o meio extracelular. Com o aumento da densidade bacteriana, maior o acúmulo de moléculas sinalizadoras, que desencadeiam uma série de ações coordenadas dentro da célula, como formação de biofilme e a produção de fatores de virulência (Baltenneck; Reverchon; Hommais, 2021).

QS é o principal mecanismo regulatório para a expressão de genes relacionados à resistência e virulência em *P. aeruginosa* (Li *et al.*, 2022). O sistema de QS dessa bactéria funciona de maneira hierárquica, sendo acionado por diferentes moléculas autoindutoras. As duas principais vias de QS em *P. aeruginosa* são a via *las* e a via *rhl*. A via *las* é ativada pela ligação de moléculas de 3-oxo-C12-HSL (N-oxododecanil-homoserina lactona) ao receptor LasR, o que está diretamente relacionado à expressão de fatores de virulência, como a exotoxina A (ExoA), essencial para a patogenicidade da bactéria (Soukarieh *et al.*, 2018).

A via *rhl*, por sua vez, é regulada por C4-HSL (N-butanoyl-homoserina lactona), que se liga ao receptor RhIR. Essa via está associada à produção de ramnolipídios e elastase, moléculas que desempenham papéis fundamentais na formação de biofilmes e na virulência da bactéria. Além dessas duas vias principais, existe uma terceira via, a *pqs*, que é ativada por quinolonas sinalizadoras, como a PQS (2-heptil-3-hidroxiquinolina), e também está envolvida na regulação de fatores de virulência e no desenvolvimento de biofilmes (Soukarieh *et al.*, 2018). A interação entre as principais vias de QS em *P. aeruginosa* e seu envolvimento com a expressão de fatores de virulência estão representadas graficamente através da Figura 2.



novas células planctônicas no ambiente que reiniciam o ciclo (Vetrivel *et al.*, 2021). Como QS está diretamente relacionado à regulação da produção de biofilmes em bactérias, compostos que possam interferir em alguma das vias desse sistema representam uma estratégia promissora no combate à *P. aeruginosa*.

## **2.2 Peptídeos Antimicrobianos (AMPs)**

A utilização de compostos naturais ou derivados na busca por novas alternativas terapêuticas ou adjuvantes é uma estratégia promissora para contornar a RAM (Guglielmi; Pontecorvi; Rotondi, 2020; Stan *et al.*, 2021). Os AMPs são moléculas produzidas através do sistema de defesa de praticamente todos os organismos vivos como linha de frente na proteção contra patógenos exógenos. Os AMPs possuem amplo espectro de ação antimicrobiana, possuindo atividade relatada contra bactérias, fungos, vírus e alguns parasitas (Luo; Song, 2021). Além disso, atualmente a atividade antitumoral dos AMPs é alvo frequente de estudo e já obteve resultados promissores contra câncer de pulmão e melanomas (Kunda, 2020; Lewies *et al.*, 2018).

### **2.2.1 Estrutura dos AMPs**

A estrutura de um AMP está diretamente relacionada com a sua atividade biológica e os efeitos que irá gerar na célula hospedeira. Características e propriedades físico-químicas como carga, polaridade, tamanho e composição da sequência, peso molecular e estrutura secundária são frequentemente relatadas em estudos que visam estabelecer uma relação entre estrutura e a função desses peptídeos (Chen; Jiang, 2023; Li *et al.*, 2021).

Tipicamente, os AMPs possuem sequências curtas, que variam entre 5 e 50 resíduos de aminoácidos, e apresentam caráter catiônico, ou seja, possuem carga positiva. A carga da sequência de um AMP é conferida pelos resíduos presentes na sua estrutura, por isso peptídeos ativos normalmente contém aminoácidos carregados



positivamente, como lisina e arginina (Gagat *et al.*, 2024). Além disso, AMPs geralmente apresentam uma alta porcentagem de aminoácidos hidrofóbicos (>50%), entretanto, elevar a hidrofobicidade de um peptídeo para potencializar sua atividade antimicrobiana só funciona até certo ponto, e pode acarretar um aumento da atividade hemolítica (Hollmann *et al.*, 2016). A razão entre a hidrofobicidade e a carga positiva de um peptídeo é denominada balanço anfifílico e possui implicações na atividade e seletividade de um AMP. Isso é importante pois esse caráter anfipático permite uma melhor interação com a membrana dos microrganismos e dificulta o desenvolvimento de resistência.

Em relação à estrutura secundária de AMPs, as três conformações predominantes são a  $\alpha$ -hélice, a folha- $\beta$  e as estruturas estendidas. Dentre elas, a  $\alpha$ -hélice é a forma mais comum encontrada na natureza. Essa conformação ocorre devido à estrutura anfipática desses peptídeos, que apresentam uma porção hidrofóbica que facilita sua inserção na membrana (Liang *et al.*, 2020). Estudos demonstraram que alterações estruturais que resultam em mudanças conformacionais na estrutura helicoidal podem levar à perda da atividade antimicrobiana.

Os AMPs com estrutura de folha- $\beta$ , embora menos frequentes, apresentam características que contribuem para a sua atividade antimicrobiana, como a formação de superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas que facilitam sua interação com membranas celulares. Além disso, as folhas são interligadas por ligações dissulfeto, formadas por resíduos de cisteína, que mantêm a estabilidade desses peptídeos (Chen; Jiang, 2023). Já os AMPs de estrutura estendida apresentam uma configuração linear e são ricos em aminoácidos como prolina, arginina, triptofano e histidina. Essa conformação é a menos estudada, entretanto, já foram relatadas atividades desses AMPs na membrana e no interior da célula (Seo *et al.*, 2012).

### 2.2.2 Mecanismos de ação

Os mecanismos de ação dos AMPs podem ser classificados em duas categorias: aqueles que atuam na membrana celular e aqueles que exercem efeito em outras regiões da célula (Zhang *et al.*, 2021). No que diz respeito à interação dos AMPs com a membrana celular dos microrganismos, foram propostos três modelos de interação: barril-estave, poro-toroidal e carpete. A Figura 3 apresenta uma representação gráfica de cada um desses modelos.

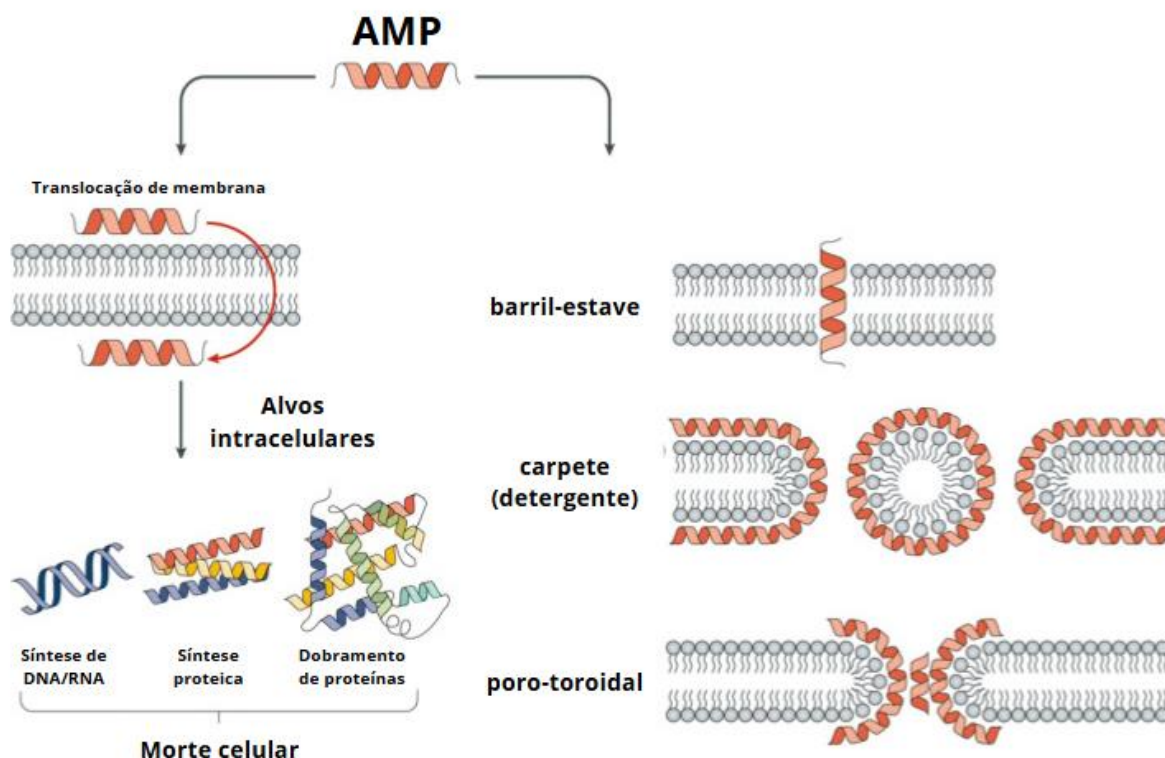
O modelo barril-estave propõe que os AMPs se aglomeram na membrana celular do microrganismo formando poros transmembrana que servem como canais. Devido ao seu caráter anfipático, a porção hidrofóbica do peptídeo interage com a membrana enquanto a porção hidrofílica se envolta para fora, formando um poro aquoso. Entende-se que nesse modelo, quanto maior a quantidade do AMP, maior será o tamanho do poro formado (Bechinger; Gorr, 2017).

No modelo toro-poroidal, o princípio é semelhante ao barril-estave, compreendendo a formação de poros na membrana. A principal diferença entre ambos é que no toro-poroidal, os poros formados são intercalados com os lipídeos da membrana, dessa forma, a sua parte externa compreende os AMPs e as “cabeças” dos fosfolipídios, como pode ser visualizado na Figura 3 (Corrêa *et al.*, 2019).

O último mecanismo de AMPs em membrana é o modelo carpete. Nele, os AMPs cobrem a superfície da membrana celular através da ligação com a cabeças polares dos fosfolipídios. Durante o alinhamento, os peptídeos ocasionam em uma curvatura na bicamada lipídica, semelhante à ação de um detergente, potencialmente formando micelas. Essa atividade detergente, aumenta a permeabilidade celular e com o tempo, leva a ruptura da membrana (Zhang *et al.*, 2021b).

Apesar da atividade dos AMPs em membrana ser amplamente estudada e a de maior relevância, existem outros possíveis mecanismos de ação dessas moléculas. Estudos demonstraram que os AMPs também agem por meio da interação com compostos intracelulares, como o RNA e o DNA, inibindo os processos que envolvem a síntese desses ácidos nucleicos e por consequência causando danos e morte celular (Bechinger; Gorr, 2017).

Figura 3 – Principais alvos celulares e mecanismos de ação dos AMPs.



Fonte: Cardoso *et al.*, 2021. (adaptado pelo autor)

### 2.2.3 Uso clínico e perspectivas futuras

Em 1955, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o primeiro AMP para fins de utilização terapêutica como um antibacteriano de ação tópica para o tratamento de conjuntivites, a gramicidina (Dijksteel *et al.*, 2021). Este peptídeo é derivado do metabolismo da *Bacillus brevis*, uma bactéria encontrada no solo, e atua formando canais iônicos na membrana das bactérias, provocando trocas iônicas que resultam na despolarização da membrana e, consequentemente, lise celular (Pavithrra *et al.*, 2020). Desde então, aproximadamente 70 AMPs, derivados naturais ou sintéticos, têm sido desenvolvidos e estão em diferentes fases de ensaios clínicos e pré-clínicos (Koo; Seo, 2019).

Contudo, a introdução de novos AMPs no mercado farmacêutico tem enfrentado alguns desafios. Um dos principais obstáculos é a toxicidade desses

compostos. A ação dos AMPs nas membranas celulares bacterianas, que envolve a formação de poros e a perturbação da integridade da membrana, não é completamente seletiva. Isso significa que, além de atacar as células bacterianas, esses peptídeos podem afetar células eucarióticas, como as humanas, resultando em fortes efeitos adversos (Dijksteel *et al.*, 2021). A seletividade da ação dos AMPs em relação às células-alvo é um aspecto importante para o desenvolvimento de terapias mais seguras e eficazes. A toxicidade pode ser diminuída por meio de modificações químicas e estruturais nesses AMPs (Gagat *et al.*, 2024).

No Brasil, a colistina (polimixina E) e a polimixina B são exemplos de AMPs amplamente utilizados como terapia de última linha para tratar infecções hospitalares causadas por bactérias Gram-negativas, como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*. Embora sejam altamente eficazes contra esses patógenos, estão associados a intensos efeitos colaterais, como nefrotoxicidade. Esses efeitos adversos estão relacionados à acumulação da droga nos rins, o que leva a complicações clínicas significativas, como falência renal (Quintanilha *et al.*, 2019).

Além da toxicidade, outro fator determinante no uso terapêutico de AMPs são suas propriedades farmacológicas. A estabilidade dos peptídeos no organismo, o tempo de meia-vida no plasma e a metabolização pela corrente sanguínea são aspectos determinantes para garantir a eficácia terapêutica. Como os AMPs são degradados rapidamente por proteases no organismo devido à sua estrutura peptídica, muitos desses compostos exigem administração contínua ou em doses elevadas para alcançar concentrações terapêuticas adequadas no local da infecção. Isso torna a administração desses peptídeos um desafio, pois muitos AMPs requerem administração intravenosa ou tópica para serem eficazes (Dijksteel *et al.*, 2021). A formulação de novos peptídeos com maior estabilidade e uma meia-vida prolongada seria um avanço significativo, permitindo a administração oral ou a utilização de esquemas terapêuticos menos invasivos.

Outro desafio significativo no desenvolvimento de AMPs é a resistência bacteriana. Embora os AMPs possuam um mecanismo de ação distinto e complexo, as bactérias podem desenvolver resistência por meio de várias estratégias, como a modificação das propriedades da membrana celular ou a expressão de enzimas que

degradam os peptídeos antimicrobianos. No entanto, a resistência a AMPs tende a ocorrer de maneira mais lenta do que a resistência a antibióticos tradicionais, o que os torna alvos promissores no estudo de novos compostos antimicrobianos (Bechinger; Gorr, 2017).

## **2.3 Bioinformática**

A bioinformática é definida como a aplicação de técnicas computacionais para a análise, organização e a solução de problemas relacionados a sistemas e macromoléculas biológicas (Luscombe; Greenbaum; Gerstein, 2001). Essa área não se limita apenas à análise de dados, mas também engloba a criação de ferramentas e bancos de dados para a gestão e interpretação de informações biológicas.

Com o aumento exponencial da quantidade de dados gerados por sequenciamento de nova geração e outros métodos de análise molecular, todos os dias novas ferramentas surgem a fim de processar e utilizar esses dados para gerar soluções para problemas biológicos, como a identificação de variantes genéticas de doenças, compreensão de mecanismos e rotas biológicas e o desenvolvimento de vacinas e novos fármacos (Gauthier *et al.*, 2019).

### **2.3.1 Estratégias computacionais para o desenvolvimento de fármacos**

Atualmente, uma das áreas de maior relevância dentro da bioinformática é a descoberta de drogas assistida computacionalmente (CADD). Este campo de pesquisa visa acelerar a identificação de novos compostos com potencial terapêutico e otimizar o desenvolvimento de medicamentos, reduzindo tanto o tempo quanto os custos envolvidos no processo. Dentro do CADD, destacam-se duas estratégias principais: a descoberta de drogas baseada em ligantes (LBDD) e a descoberta de drogas baseada em estruturas (SBDD) (Macalino *et al.*, 2015).

A LBDD envolve técnicas que estudam ligantes ativos ou inativos, utilizando informações sobre suas estruturas e propriedades físico-químicas (Vázquez *et al.*, 2020). Essa abordagem busca entender quais as principais características de um composto que estão relacionados com a sua atividade. Nesta estratégia, são utilizados extensos bancos de dados, como o PubChem ou o Zinc, que contém informações sobre compostos conhecidos e suas interações com alvos biológicos. Um exemplo de técnica do LBDD, é a modelagem QSAR, que emprega modelos matemáticos para prever propriedades físicas e biológicas utilizando compostos conhecidos (Bacilieri; Moro, 2006).

Por outro lado, a SBDD tem como foco de estudo a estrutura tridimensional de alvos biológicos, como receptores, e as interações com seus ligantes naturais (Vázquez *et al.*, 2020). O *docking* ou ancoragem molecular é um exemplo de técnica do SBDD, utilizada para analisar a interação entre moléculas (ligante-receptor) em nível atômico. Essa técnica envolve a predição da conformação do ligante e sua melhor orientação (pose) dentro do sítio de interação e também, a avaliação da afinidade de ligação através de cálculos matemáticos que atribuem um *score* final (Fan; Fu; Zhang, 2019). Além disso, a SBDD também utiliza simulações de dinâmica molecular para prever como os ligantes se comportam em ambientes biológicos.

### **2.3.2 Algoritmos de IA**

Nos últimos anos, a expansão do número de bancos de dados biológicos, juntamente com o acesso e manipulação facilitados dessas informações, resultou em um aumento no desenvolvimento de ferramentas de bioinformática. Muitas dessas ferramentas, são construídas em cima de algoritmos de IA, que são capazes de aprender e identificar padrões em conjuntos de dados a fim de solucionar problemas biológicos (Ezziane, 2006; Karim *et al.*, 2023). O termo IA engloba diferentes técnicas e algoritmos que são aplicadas a fim de que computadores sejam capazes de mimetizar tarefas humanas, como análise de dados, tradução de idiomas e tomada de decisões.

Na bioinformática, a IA pode ser utilizada para prever a estrutura de proteínas, analisar sequências genéticas e na aplicação de técnicas de CADD, como o QSAR, por exemplo. O AM é um subconjunto da IA. No AM, os algoritmos aprendem de forma autônoma através de grandes conjuntos de dados, melhorando seu desempenho com o tempo e volume de dados. Os dois tipos mais comuns de AM são os algoritmos supervisionados e não supervisionados. No aprendizado supervisionado, os algoritmos são treinados com dados rotulados, ou seja, dados que já possuem a resposta correta, permitindo que o modelo faça previsão sobre os novos dados. Modelos supervisionados comuns incluem regressão logística, árvores de decisão e máquinas de vetor de suporte (SVM). Por outro lado, no aprendizado não supervisionado, os algoritmos buscam padrões em dados não rotulados, identificando padrões e anomalias sem informações prévias. Um exemplo de algoritmo não supervisionado são as redes adversárias generativas (GANs) (Saravanan; Sujatha, 2018).

Outra técnica de IA é o aprendizado profundo (AP), um subconjunto do AM, que utiliza redes neurais profundas para simular a tomada de decisão do cérebro humano. Essas redes buscam simular os neurônios através da atribuição de pesos e vieses, e atuam em camadas de nós interconectados. À medida que os dados são processados, cada camada extrai características mais complexas. Um exemplo de modelo de AP são os *Transformers* (transformadores) (Shinde; Shah, 2018).

Os *Transformers* são uma rede neural que aprende através do contexto, ou seja, são capazes de capturar relações e atribuir pesos variáveis a diferentes partes de dados sequenciais. Eles utilizam um mecanismo de atenção que permite focar em elementos relevantes da sequência, processando informações de maneira paralela. No campo da bioinformática, esse modelo é de grande utilidade para buscar por relações dentro de sequências de proteínas, pois pode identificar interações e padrões entre aminoácidos que influenciam nas funções biológicas e estruturas moleculares (Chandra *et al.*, 2023).

### 2.3.3 *Design* computacional de AMPs

O número de estudos utilizando estratégias *in silico* para o desenvolvimento de novos AMPs dotados de atividade frente a algum gênero ou espécie específicos cresceu consideravelmente nos últimos anos. Um estudo de 2024, utilizou de estratégias de *design* racional para produzir uma nova sequência de AMP com potencial antibacteriano e antibiofilme contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Madni *et al.*, 2024). Outro trabalho de 2020, utilizou de abordagens semelhantes ao anterior, associadas a uma caracterização das propriedades físico-químicas *in silico* e *docking* molecular, para identificar “motivos” em 127 sequências de AMPs produzidas naturalmente por peixes. Motivos são sequências curtas de aminoácidos dentro de um AMP que podem estar interligados com alguma atividade ou função específica daquele peptídeo. Como resultado deste trabalho, dois novos AMPs foram identificados com o maior potencial de ligação a receptores relacionados à resistência bacteriana (Okella *et al.*, 2020).

Atualmente existem centenas de bancos de dados disponíveis *online* que juntos compõem mais de 30.000 sequências peptídicas, cada uma com pelo menos uma atividade antimicrobiana catalogada. Os principais e mais completos são o *Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides* (DBAASP), o *Antimicrobial Peptide Database* (APD) e o *Collection of Antimicrobial Peptides* (CAMP), que fornecem dados sobre AMPs naturais e sintéticos, além de informações sobre suas estruturas e atividades relatadas (Waghu *et al.*, 2016; Wang; Li; Wang, 2016; Pirtskhalava *et al.*, 2021). Além disso, alguns possuem informações de estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* sobre a toxicidade e atividade hemolítica dessas sequências.

Essa ampla gama de dados, permite a utilização de estratégias computacionais para a identificação de padrões entre as sequências e uma possível associação com sua atividade. A combinação desses dados com algoritmos de IA e modelagem computacional tem permitido avanços significativos no campo do *design* de AMPs. Modelos de AM podem ser treinados com todas as informações disponíveis a respeito das sequências para prever a eficácia de novos peptídeos.



Hoje, existem *softwares* disponíveis gratuitamente para a predição da atividade de AMPs. O AntiBP3, por exemplo, é uma ferramenta para a predição exclusiva de atividade antibacteriana em sequências peptídicas, treinada com algoritmos de AM e AP, e que possui alta precisão e acurácia em suas previsões (Bajiya *et al.*, 2024). Além disso, outra ferramenta é o CAMPR3. O CAMPR3 oferece uma plataforma *online* para predição de potenciais AMPs a partir de sequências fornecidas pelo usuário. Nela, é possível escolher o modelo de AM dentre as opções disponíveis que será empregado para classificar as suas sequências (Waghu *et al.*, 2016).

Diversas plataformas permitem calcular parâmetros físico-químicos e prever propriedades de interesse farmacológico, como toxicidade, alergenicidade, capacidade de penetrar em membranas celulares, entre outros (Dimitrov *et al.*, 2014; Meher *et al.*, 2017; De Oliveira *et al.*, 2022; Rathore *et al.*, 2024). Essas ferramentas auxiliam no processo de desenvolvimento de novos AMPs, uma vez que permitem otimizar a seleção de compostos, reduzindo o tempo e os custos associados aos ensaios experimentais. Com a capacidade de simular interações moleculares e prever comportamentos em sistemas biológicos, é possível focar nos candidatos mais promissores, minimizando as chances de erros. Isso não apenas acelera o processo de descoberta de novos fármacos, mas também potencializa a inovação na criação de terapias antimicrobianas mais eficazes.

### **3. Manuscrito**

#### **3.1 Novel Antimicrobial Peptides (AMPs) Targeting *Quorum Sensing* in *Pseudomonas aeruginosa***

O manuscrito apresentado segue as diretrizes de formatação da revista *Brazilian Journal of Microbiology*, disponíveis no seguinte endereço:  
<https://link.springer.com/journal/42770/submission-guidelines>

## **Novel Antimicrobial Peptides (AMPs) Targeting *Quorum* Sensing in *Pseudomonas aeruginosa***

Déborah Trota Farias de Albernaz<sup>a</sup>; Suzane Olachea Allend<sup>a</sup>; Amilton Clair Pinto Seixas Neto<sup>a</sup>; Danilo de Oliveira Della Senta<sup>b</sup>; Luciano da Silva Pinto<sup>b</sup>; Frederico Schmitt Kremer<sup>b</sup>; Daiane Drawanz Hartwig<sup>a,§</sup>

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

<sup>b</sup>Biotechnology Nucleus, Technological Development Center, Federal University of Pelotas, CEP: 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

<sup>§</sup>Corresponding author:

Daiane Drawanz Hartwig

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

Email: [daianehartwig@gmail.com](mailto:daianehartwig@gmail.com)

Fone: +555332757616

### **Abstract**

*Pseudomonas aeruginosa*, a Gram-negative opportunistic pathogen, is well known for its high antibiotic resistance and its ability to form biofilms, primarily regulated by *quorum* sensing (QS) systems. QS controls the expression of virulence factors, including biofilm formation, making it a critical target for novel antimicrobial strategies. In this study, antimicrobial peptide (AMP) sequences were generated using TACaPe, a deep learning tool based on the transformer model, to predict peptides with antibacterial activity. The AMPs were designed *in silico* and evaluated for their ability to interfere with the QS pathways in *P. aeruginosa*, specifically targeting the LasR, RhIR, and PqsR receptors through molecular docking analysis. The five AMPs with the highest binding affinities were chemically synthesized and subjected to *in vitro* assays to validate their antibacterial, antibiofilm, and synergistic activities with meropenem against *P. aeruginosa* ATCC® 27853. As a result, two peptides exhibited significant

antibacterial activity against *P. aeruginosa* and demonstrated dose-dependent biofilm inhibition. Additionally, these AMPs showed synergistic effects with meropenem, reducing its MIC in combination assays. The hemolytic and cytotoxic activities of the peptides were also evaluated to assess their potential for therapeutic application. This study underscores the potential of computationally designed AMPs to target QS systems in *P. aeruginosa*, highlighting their promise as novel therapeutic candidates.

**Keywords:** molecular docking, synergism, antibiofilm, artificial intelligence, cytotoxicity

## Introduction

Bacteria can communicate with each other, promoting the development of virulence factors and defense mechanisms, such as biofilm formation. This ability, known as *quorum* sensing (QS), is a bacterial cell-to-cell communication system mediated by chemical signals that activate autoinducer molecules [1]. QS plays a crucial role in bacterial pathogenesis, enabling bacteria to sense population density and release chemical signals that bind to specific receptors, triggering the expression of genes associated with virulence and resistance mechanisms [2].

*Pseudomonas aeruginosa* is a ubiquitous, opportunistic, Gram-negative bacterium that primarily infects immunocompromised patients in intensive care units (ICUs). It is commonly associated with infections of the urinary tract, respiratory system, cystic fibrosis patients, and burn victims [3]. Due to its prevalence and clinical significance, *P. aeruginosa* has become a widely used model for studying QS in bacteria [4]. The array of virulence factors in *P. aeruginosa*, including exotoxins, proteases, elastases, motility, and biofilm formation, is tightly regulated by two primary QS systems: *las* and *rhl*. Both systems use N-acylhomoserine lactones (AHLs) as signaling molecules and operate interdependently, activating a third system, *pqs* [5]. Compounds that can inhibit any stage of this hierarchical system are promising candidates for the development of novel therapies to control *P. aeruginosa* infections.

Antimicrobial peptides (AMPs) are naturally occurring defense molecules found in the innate immune systems of various organisms, including plants and animals. Typically composed of up to 60 amino acids, these peptides are cationic, hydrophobic,

and often exhibit an alpha-helix structure [6]. AMPs are well known for their antibacterial properties, which include broad-spectrum activity, and a reduced potential for promoting resistance [7, 8]. Today, hundreds of databases catalog AMPs, providing valuable information on their sequences, physicochemical properties, and spectrum of activity, thus enabling a deeper understanding of their structure-activity relationships [9–12].

The computational design of antimicrobial peptides (AMPs) has gained significant relevance in recent years. By utilizing artificial intelligence (AI) tools, such as machine learning (ML), researchers can analyze vast online datasets to identify structural patterns and enhance the efficacy of known compounds. These *in silico* approaches enable the rapid, automated screening of thousands of compounds, reducing the time, cost, and resources typically required for laboratory research [13–15]. In this study, AMP sequences were generated using a deep learning tool based on a transformer model and subjected to *in silico* analyses to evaluate their antibacterial potential against *P. aeruginosa*. Anti-QS potential was assessed through molecular docking with the LasR, RhIR, and PqsR receptors. The five sequences with the most promising results were chemically synthesized for *in vitro* validation of their activity.

## **Materials and Methods**

### **Data retrieval and processing**

Data for the positive dataset were obtained from the Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides (DBAASP) [11]. Sequences containing between 5 and 25 residues and exhibiting only antibacterial activity were selected. The negative dataset was created using sequences available from UniProt® [16]. The search for negative sequences was conducted with the following terms: "length:[5 TO 25] NOT antimicrobial NOT antibiotic NOT antiviral NOT antifungal NOT fungicide NOT antibacterial NOT antitumoral NOT anticancer NOT gram NOT biofilm NOT AMP." Duplicate sequences or those containing non-natural amino acids were removed from both datasets. A random number of sequences equivalent to the positive dataset was selected for the negative dataset. Both datasets were split 80%/20% into training and

test sets, respectively, with the test set used to evaluate the model's performance on new data.

## Peptide classification and generation

The datasets were used to train the Transformer-based Anti-Cancer Peptide Classification and Generation tool, TACaPe (<https://github.com/omixlab/anticancer-peptide>). TACaPe is a command-line tool that utilizes a transformer neural network architecture, which follows an encoder-decoder model. The encoder processes the input text and maps it into vectors for the decoder to interpret. It employs a "self-attention" mechanism, assigning weights to different parts of the input to understand their influence and establish relationships. Sequences were converted into dense vectors using an embedding layer to generate input for the models. Each model was trained for 100 epochs using the Adam optimizer with default parameters and the binary cross-entropy loss function. Accuracy, defined as the proportion of correct predictions made by the model, was used as the evaluation metric, calculated as the number of correct predictions divided by the total number of predictions. To prevent overfitting, an early stopping mechanism was applied, halting training when performance began to decline. The classification model was trained using the `tacape-train-classifier` command. The autoregressive generative model, responsible for producing new sequences, was trained using the `tacape-train-generator` command. New peptide sequences were generated using the `tacape-generate` command, which takes the outputs from the trained models and specifies the number of sequences to be generated. By employing the program's default settings, 100 novel sequences of potential AMPs were created.

## Molecular docking with *P. aeruginosa* receptors

The interaction between the generated peptides (ligands) and the proteins (receptors) was assessed using AutoDock Vina v.1.2.3 [17]. Three receptors involved in the QS pathways of *P. aeruginosa*, LasR (PDB ID: 2UV0), PqsR (PDB ID: 4JVC), and RhIR (PDB ID: 7R3J) were utilized. The three-dimensional structures of the generated peptides were predicted using PEP-FOLD3 and validated with PROCHECK

by examining the amino acid positions in the Ramachandran plot [18, 19]. Receptor and ligand preparation were performed using AutoDock Tools v.4.2.6 [20], which included removing water molecules, adding hydrogen atoms, and assigning charges. The grid was configured to encompass the binding site regions of the natural ligands. The ligands with the best average binding energies were selected for further analysis of ligand-receptor interactions using PyMOL v.3.0 and LigPlot+ v.2.2 [21]. The structures of the natural ligands were obtained from PubChem® and subjected to docking analyses under the same conditions for comparative purposes.

### **Antimicrobial and hemolytic activity prediction**

The *in silico* antimicrobial activity of the generated sequences was verified using TACaPe's prediction component, along with two additional online tools: iAMPpred and CAMPr3 [10, 22]. Each of these tools employs different ML models to make predictions and generate numerical probabilities. The average antimicrobial activity was calculated based on the results obtained from all three tools. Additionally, the hemolytic potential of the peptides was assessed using the HLPpred-Fuse tool [23], which calculates the probability of an amino acid sequence being hemolytic and categorizes its hemolytic activity as either high or low.

### **Physicochemical properties, toxicity, and allergenicity prediction**

The physicochemical characteristics of the peptides were calculated using ProtParam [24]. The following parameters were considered: molecular weight, charge, hydrophobicity, estimated half-life, and grand average of hydropathy (GRAVY). The toxicity of the peptides was assessed using the ToxinPred 3.0 tool, while allergenicity was evaluated with the AllerTOP v.2 tool [25, 26].

### **Peptide synthesis**

The peptides that demonstrated the best performance in computational analyses were chemically synthesized by GenOne (São Paulo, Brazil). Their quality and purity ( $\geq 95\%$ ) were confirmed through reverse-phase high-performance liquid

chromatography (RP-HPLC) and mass spectrometry (MS). The peptides were then suspended in a 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) solution to achieve a final concentration of 1 mg/mL.

### **Bacterial strains and culture conditions**

The standard strain of *P. aeruginosa* ATCC® 27853 was used in this study to evaluate the *in vitro* activity of the synthesized peptides. This strain is part of the bacterial repository of the Laboratory of Bacteriology and Bioassays (LaBBio) at the Federal University of Pelotas, Brazil. It was kindly provided by the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) and stored at -20°C in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Kasvi®, Brazil) containing 10% glycerol (v/v). Prior to the experiments, the strain was reactivated in BHI broth at 37°C for 24 hours, followed by cultivation on Cetrimide agar (Kasvi®, Brazil) under the same conditions.

### **Antibacterial activity assay**

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the broth microdilution method, following the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [27]. In this assay, 50 µL of BHI broth was dispensed into a 96-well microplate. Subsequently, 50 µL of each peptide was added to the wells, resulting in concentrations of 15.6 to 250 µg/mL. For meropenem, concentrations ranged from 0.02 to 25 µg/mL. The bacterial inoculum was adjusted to a density of  $1.5 \times 10^6$  CFU/mL, and the plates were incubated at 37°C for 24 hours. The minimum bactericidal concentration (MBC) was determined based on the MIC results. Aliquots were taken from the wells where bacterial growth was inhibited and inoculated onto Cetrimide agar plates, which were then incubated at 37°C for 24 hours. The absence of bacterial growth on these plates indicated that the tested compounds were bactericidal. All assays were performed in triplicate, and sterility controls for the medium and peptides, as well as bacterial viability controls, were included.



## Antibiofilm activity

The standard strain *P. aeruginosa* ATCC® 27853 is a well-known biofilm-forming strain. The inhibition of biofilm formation was assessed using a modified methodology proposed by Halicki et al. (2020) [28]. For this assay, 180 µL of Mueller Hinton (MH) broth containing each peptide at concentrations of 62.5, 125, 250, and 500 µg/mL was added to a 96-well microplate. Subsequently, 20 µL of a bacterial suspension ( $1.5 \times 10^6$  CFU/mL) was added to each well and incubated at 37°C for 24 hours. Biofilm fixation, washing, and staining were performed according to the protocol described by Stepanovic et al. (2007) [29]. Absorbance readings of the wells were measured using a spectrophotometer at 540 nm. The results were expressed as a percentage of inhibition using the following formula: % biofilm inhibition =  $(1 - (OD_{\text{treatment}} - OD_{\text{negative control}})) / (OD_{\text{positive control}} - OD_{\text{negative control}}) \times 100$ .

## Synergistic activity with meropenem

The synergistic activity of AMPs in combination with meropenem was evaluated using the checkerboard assay [30]. Initial concentrations were set at 250 µg/mL for the peptides and 2 µg/mL for meropenem. In a 96-well plate containing MH broth (Kasvi®, Brazil), two-fold serial dilutions of the peptides were prepared across the horizontal rows, while serial dilutions of meropenem were prepared vertically. This cross-dilution approach allowed for a comprehensive assessment of both antimicrobials. The suspensions were homogenized, and the optical density was measured at 630 nm, corresponding to the 0.5 McFarland standard ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL). The plate was incubated at 37°C for 24 hours, followed by the addition of 20 µL of 0.02% resazurin as an indicator of cell viability. The fractional inhibitory concentration (FIC) was defined as the lowest concentration at which the combined peptides and meropenem inhibited bacterial growth. Checkerboard results were interpreted using the fractional inhibitory concentration index (FICI), calculated with the formula:  $FICI = (MIC \text{ of the combined peptide} / MIC \text{ of the peptide alone}) + (MIC \text{ of the combined meropenem} / MIC \text{ of meropenem alone})$ . The FICI values were categorized as follows:  $FICI \leq 0.50$  indicated synergism;  $0.50 < FICI \leq 1.0$  indicated additivity;  $1.0 < FICI \leq 4.0$  indicated indifference; and  $FICI > 4.0$  indicated antagonism. Additionally, the modulatory factor (MF) was

determined using the ratio: MIC of meropenem alone/MIC of meropenem combined with peptides. This value indicates how many times the peptides reduced the MIC of meropenem. Appropriate sterility controls (negative) for the peptides, meropenem, and MH broth, along with growth controls (positive) for the bacterial strains, were included. All experiments were conducted in triplicate.

### **Hemolytic Activity Assay**

The hemolytic activity of the peptides against red blood cells (RBCs) from mice was assessed by measuring the amount of hemoglobin released due to RBC lysis, following the modified protocol by Wang et al. (2021) [31]. Mice blood was centrifuged at 100 x g for 10 minutes, after which the concentrated red blood cells (RBCs) were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and suspended to achieve a final concentration of 10% (v/v). Subsequently, 25  $\mu$ L of the RBC suspension was incubated with 100  $\mu$ L of each peptide solution in PBS. The peptide solutions were prepared using a double dilution method with concentrations ranging from 15.6 to 1,000  $\mu$ g/mL and incubated at 37°C for 1 hour. After incubation, the solutions were centrifuged at 1,200 x g for 5 minutes, and the absorbance of the supernatant was measured at 450 nm. RBCs in PBS served as the negative control, while 1% Triton X-100 was used as the positive control. All tests were performed in triplicate, and the mean values were used for data analysis. The percentage of hemolysis was calculated using the following formula: % hemolysis =  $(\text{Abs}_{\text{peptide}} - \text{Abs}_{\text{PBS}}) / (\text{Abs}_{\text{Triton-100}} - \text{Abs}_{\text{PBS}}) \times 100$ .

### **Citotoxicity assay**

L929 cells (murine fibroblasts) were cultured in a complete medium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Trypsin-EDTA (0.25%) was employed to detach the cells during subculturing. Cells were seeded onto 96-well plates at a density of 5,000 cells per well in 100  $\mu$ L of medium. After 24 hours of

incubation, the cells were treated with serially diluted peptides at final concentrations ranging from 15.6 to 500 µg/mL and incubated for an additional 24 hours. The contents of the wells were discarded, and the plate was subjected to the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) reduction assay [32]. Absorbance was measured at 490 nm using a microplate reader to calculate cell viability, with untreated cells used as controls. The percentage of cell viability was calculated using the formula:  $\% \text{ CV} = (\text{Abs}_{\text{Treatment}} / \text{Abs}_{\text{Control}}) \times 100$ .

## **Data analysis**

Data analysis was conducted in the Google® Colab environment using Python. The Pandas library was utilized for data manipulation tasks, including tabulation, sorting, and grouping. Statistical analyses, including t-tests and ANOVA, were performed, with a significance threshold set at  $P < 0.05$ . Data visualization was carried out using GraphPad Prism v.8.

## **Results**

### **Data retrieval, model training, and peptide generation**

The DBAASP database contained a total of 22,358 sequences. After applying filters to isolate sequences with antibacterial activity, 14,854 sequences remained. Following the removal of duplicates and non-natural amino acids, a final dataset of 10,017 sequences was prepared for model training. The dataset was divided into a training set of 8,013 sequences (80%) and a test set of 2,004 sequences (20%). The model achieved an accuracy of 91.2% in classifying the sequences, demonstrating strong precision in identifying peptides with potential antibacterial activity. Using pre-trained classification and generation models, 100 new AMPs were generated, each consisting of a maximum of 25 amino acid residues. To ensure the uniqueness of these sequences, BLAST alignment was performed. The five most promising peptides selected for further studies were denominated TAC-p1, TAC-p2, TAC-p3, TAC-p4, and TAC-p5. The three-dimensional structures of the peptides were validated using Ramachandran plots, with all peptides passing validation by having at least 90% of

residues located in the most favorable regions. Figure 1 presents the three-dimensional structures and validation results for the five most promising peptides selected for subsequent *in vitro* antibacterial testing against *P. aeruginosa*. The amino acid sequences of these five AMPs, ranging from 7 to 9 amino acids in length, are displayed in Table 1.

### ***In silico* analyses**

Each peptide was evaluated *in silico* for toxicity, allergenicity, hemolytic activity, and antibacterial effectiveness (Table 1). All five peptides were classified as non-toxic and non-allergenic. However, they exhibited varying levels of hemolytic activity, with TAC-p1 demonstrating high hemolytic activity, while TAC-p2, TAC-p3, TAC-p4, and TAC-p5 showed low hemolytic activity. Regarding antibacterial effectiveness, TAC-p1 demonstrated the highest antibacterial activity, achieving a 99.9% inhibition rate, followed closely by TAC-p3 at 99.7%. TAC-p4 also demonstrated a notable antibacterial effect at 99.8%, while TAC-p2 and TAC-p5 exhibited slightly lower activity at 98.9%. These results indicate that all selected peptides have significant potential for further investigation as antimicrobial agents, particularly TAC-p1 due to its combination of high antibacterial activity and moderate hemolytic activity.

The calculated physicochemical properties of the AMPs are summarized in Table 2. The peptides exhibited varying charges (+1 to +6) and molecular weights ranged from 973.19 Da for TAC-p5 to 1447.71 Da for TAC-p1. The estimated half-lives in mammalian cells varied, with TAC-p4 having the longest half-life of 4.4 hours, while TAC-p1 and TAC-p3 had the shortest half-lives at 1 hour. The stability index indicated that TAC-p4 was the most stable with a value of 5.15, whereas TAC-p1 and TAC-p2 both had higher stability indices of 199.82, suggesting less stability. Hydrophobicity percentages varied among the peptides, with TAC-p1 exhibiting the highest hydrophobicity at 56% and TAC-p2 having the lowest at 33%. The GRAVY values further supported these findings, with TAC-p1 showing a GRAVY of -1.522, indicating it is more hydrophobic compared to the other peptides, particularly TAC-p2 and TAC-p3, which had GRAVY values of -2.478 and -2.871, respectively.

Peptides with the lowest average binding energies, indicating the most favorable scores in molecular docking analyses, were further evaluated for their ligand-receptor

interactions (Table 3). The binding energies for all receptors ranged from -6.8 to -9.033 kcal/mol, with each peptide interacting with at least one residue in every tested receptor. Table 3 provides details on the binding energies and favorable interactions of the five most promising peptides with their respective target proteins. The docking scores for the natural ligands with their corresponding receptors were -7.674 (LasR), -5.659 (RhIR), and -6.828 (PqsR).

### ***In vitro* antibacterial and synergistic activity of the peptides**

The MICs and synergistic activity of the AMPs alone and in combination with meropenem against *P. aeruginosa* ATCC® 27853 are summarized in Table 4. TAC-p1 demonstrated a MIC of 125 µg/mL and TAC-p3 showed a MIC of 250 µg/mL. TAC-p2, TAC-p4, and TAC-p5 did not have their MICs determined within the concentrations tested in the present study and were therefore reported as >250 µg/mL. Additionally, none of the five AMPs tested showed bactericidal activity. FICI values were calculated considering the lowest combinations of meropenem and AMPs, with which there was no visible growth. The FICI values ranged from 0.35 to 2.0 for *P. aeruginosa* ATCC® 27853, indicating a synergic ( $FICI \leq 0.50$ ), additive ( $0.50 < FICI \leq 1.0$ ) and indifferent ( $1.0 < FICI \leq 4.0$ ) interaction effect. For TAC-p1 and TAC-p4 the combination with meropenem showed synergism, for TAC-p3 and TAC-p5 additivity and for TAC-p2 indifference. Furthermore, it was observed that AMPs were able to 1 to 9.5-fold reduce the MIC of meropenem (Table 4).

### ***In vitro* antibiofilm activity**

TAC-p1 inhibited biofilm formation at three out of four tested concentrations, with inhibition rates ranging from 38% (125 µg/mL) to 88% (500 µg/mL). TAC-p2 and TAC-p3 also demonstrated substantial antibiofilm activity, inhibiting over 78% of biofilm formation at 500 µg/mL, with TAC-p2 additionally achieving approximately 50% inhibition at 250 µg/mL. The highest level of inhibition was achieved by TAC-p4, reaching 90.7% at the maximum concentration tested (500 µg/mL). In contrast, TAC-p5 showed the lowest antibiofilm potential, demonstrating activity only at the highest concentration (500 µg/mL), with an inhibition rate of 28.6%. None of the peptides

exhibited antibiofilm activity at the lowest concentration of 62.5 µg/mL. Further details of the antibiofilm assay results are presented in Figure 2. All results were statistically significant when compared to the control (untreated cells), with  $P < 0.05$ .

### ***In vitro* cytotoxicity assays**

As shown in Figure 3, all five peptides exhibited low hemolytic activity (<20%) when RBCs were exposed to concentrations up to 250 µg/mL. However, at 500 µg/mL, hemolysis increased significantly for TAC-p1 and TAC-p4, reaching 100%. Peptides TAC-p2 and TAC-p3 showed no hemolytic activity (0%) at concentrations of 15.6 and 31.25 µg/mL, while TAC-p5 did not cause hemolysis at any of the six concentrations tested. In the cytotoxicity assay using murine fibroblasts (L929 cells), all peptides caused a reduction in cell viability at concentrations of 500 and 250 µg/mL compared to the control (untreated cells) ( $P < 0.05$ ). At a concentration of 125 µg/mL, TAC-p1, TAC-p2, TAC-p3 and TAC-p5 present reduction in the cell viability ( $P < 0.05$ ). At lower concentrations (62.5 and 31.25 µg/mL), no significant reduction in cell viability was observed compared to the control ( $P < 0.05$ ) for TAC-p1, TAC-p2. Only TAC-p5 reduced cell viability below 50% at the highest concentrations tested. At concentrations below 125 µg/mL, all five peptides maintained cell viability above 75%.

### **Discussion**

Computational tools for drug design and discovery are widely employed worldwide. With advances in AI, it is possible to predict a compound's active potential and various pharmacological parameters such as bioavailability, toxicity, and metabolism [33]. Our study used a combination of different *in silico* and *in vitro* techniques to characterize new AMPs with antibacterial potential against *P. aeruginosa*. TACaPe, used to generate potential AMP sequences, is built on the deep learning Transformer model. This model employs a self-attention mechanism, which can capture dependencies between distant amino acids in the sequence. It has been previously described that the activity of AMPs may depend on interactions between different regions of their sequence. This model can identify these relationships and establish patterns more effectively than conventional ML models, such as Random

Forest. The training of TACaPe with the collected data resulted in an accuracy of 91.2%. Accuracy is a parameter used to measure the model's performance by calculating the proportion of correct predictions relative to the total predictions, meaning that our model was correct 91.2% of the time.

QS is the primary regulatory mechanism for the expression of genes related to resistance and virulence in *P. aeruginosa*. This system functions hierarchically and is triggered by autoinducer molecules. The two main pathways are *las* and *rhl*. The first, *las*, is activated by binding AHL to the LasR receptor and is involved in the expression of virulence factors such as exotoxin A. Similarly, *rhl* is regulated by AHL and is associated with producing rhamnolipids and elastase, essential in biofilm formation. In addition, the third pathway, *pqs*, is activated by signaling quinolones, such as PQS (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone), and plays an essential role in virulence production and biofilm development. The spread and persistence of *P. aeruginosa* in the environment make its control particularly challenging, mainly due to its ability to form biofilms [5]. This structure facilitates adherence to surfaces and significantly enhances resistance to antibiotics and the host immune response, making infections difficult to eradicate [34]. Since QS is directly related to the production of biofilms in bacteria, compounds capable of interfering with the pathways of this system represent a promising strategy to combat this species.

In our study, AMP sequences were selected based on their potential to interact with three receptors involved in the main QS metabolic pathways in *P. aeruginosa*: LasR, RhlR, and PqsR. The results from the docking analyses were considered in the selection of the most promising AMPs for synthesis and evaluation of their antibacterial activity *in vitro*. The analyses revealed the binding potential of five AMPs with the evaluated receptors. The binding interactions of the AMPs were compared to the natural ligands of the receptors, and although none of the AMPs formed hydrogen bonds with the same amino acids as the natural ligands, interactions were observed in regions very close to the active site. Molecular docking studies are essential for understanding interactions between ligands and receptors. These studies can provide valuable insights into the possible mechanisms of action and binding modes of active compounds. Generally, the lower the binding energy, the higher the affinity between the structures [35]. Our results showed significant interactions between the AMPs and the target receptors, with hydrogen bonds and hydrophobic interactions standing out.

Additionally, the docking scores indicated that most AMPs showed higher affinity compared to the natural ligands of the receptors, reinforcing their potential as therapeutic candidates.

The relationship between physicochemical parameters and the activity of AMPs is well elucidated in the literature [36, 37]. Characteristics such as cationic nature (positively charged amino acids), hydrophobicity, and secondary structure are directly associated with their mechanism of action and behavior in biological environments. The five potential AMPs evaluated *in vitro* in this study exhibited a positive charge and hydrophobic characteristics, except for TAC-p2, which showed only 33% hydrophobicity according to calculations from the ExPASy ProtParam tool. The GRAVY value is an index that measures the overall hydrophobicity of a protein, meaning the average hydropathy values of each amino acid in the sequence. Typically, peptides with a positive GRAVY value tend to have higher hydrophobicity [38]. In our study, the five AMPs evaluated had negative GRAVY values, indicating a greater hydrophilicity among the residues in the sequences.

When comparing the computational analysis results from iAMPpred, CAMPr3, and TACaPe, it was noted that the AMPs with the highest average predicted antimicrobial potential were the only ones to exhibit defined MIC values at the tested concentrations. Notably, TAC-p1 (99.9%) and TAC-p4 (99.8%) demonstrated antibacterial activity against *P. aeruginosa* ATCC® 27853, with MIC values of 125 µg/mL and 250 µg/mL, respectively. The action of these AMPs was classified as bacteriostatic, as no MBC values were obtained at the tested concentrations. Studies using similar approaches for designing new AMPs have found antibacterial activity against Gram-negative bacteria, including *P. aeruginosa*. Liu et al. (2018), in their work using predictive models to establish a correlation between AMP activity and their three-dimensional structures, found active sequences against various bacteria, including a standard strain of *P. aeruginosa* (CMCC 10104), determining the MIC at 256 µg/mL [39]. Another study by Lin et al. (2023) demonstrated the active potential of AMPs against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *P. aeruginosa*, developed through the training of a generative adversarial network. In this study, 8 peptides were generated, which exhibited antibacterial activity (MIC > 50 µg/mL) against two isolates of *P. aeruginosa*, one of them carbapenem-resistant [40].



To evaluate the anti-QS potential of AMPs in vitro, a biofilm formation inhibition assay was performed. Unlike antibacterial activity, the five AMPs exhibited antibiofilm activity at different concentrations. Similarly, the two best AMPs in the MIC assay, TAC-p1 and TAC-p4, also showed the highest percentages of biofilm inhibition in *P. aeruginosa* ATCC® 27853. The highest concentration tested demonstrated the greatest inhibitory potential, suggesting that the activity of these AMPs is possibly dose dependent. In studies by Gupta et al. (2016) on AMPs, it was observed that the amino acids most found in AMPs with experimentally reported antibiofilm activity are those that are positively charged, such as lysine (K) and arginine (R), or aromatic, such as tryptophan (W), tyrosine (Y), and phenylalanine (F). These results are consistent with our study, where all five sequences contain one or more of these amino acids in their composition [41].

Recently, *P. aeruginosa* resistance to carbapenems has become a global public health issue, prompting the World Health Organization (WHO) to include carbapenem-resistant *P. aeruginosa* on its list of priority pathogens for research and development of new drugs [42]. In this context, studies that combine new compounds to enhance the efficacy of antibiotics, such as carbapenems, have become increasingly relevant. Our study demonstrated that the AMPs, TAC-p1 and TAC-p4, showed a synergistic effect with meropenem, reducing the MIC of *P. aeruginosa* ATCC® 27853 from 0.19 µg/mL to 0.02 µg/mL and 0.04 µg/mL, respectively. Previous studies have already demonstrated the synergistic effect of AMPs against *P. aeruginosa* when combined with conventional antibiotics, enhancing their antibacterial activity [43–45]. This likely occurs due to the cationic nature of AMPs, which allows interaction with the bacterial membrane, increasing its permeability and facilitating the entry of antibiotics into the cells [46]. Carbapenem resistance in *P. aeruginosa* predominantly occurs through efflux pumps, which expel the antibiotic from the cell. However, the combination of AMPs with these antibiotics can be an alternative to overcome this issue, as these peptides compromise membrane integrity, allowing the antibiotic to enter the cell and reach its site of action [47].

One of the main challenges associated with the clinical use of AMPs is their hemolytic activity, a result of their membrane-targeting mechanism of action [48, 49]. Due to the structural similarity between bacterial and erythrocyte membranes, RBCs can also be affected. Sequence analysis using HLPpred-Fuse indicated that all five

peptides evaluated have hemolytic potential. However, only TAC-p1 was classified as highly hemolytic, while the others showed low potential. These findings are consistent with the results obtained from *in vitro* assays, where all peptides showed low hemolytic activity (<20%), except for TAC-p1 and TAC-p4, which at the highest tested concentration (500 µg/mL) demonstrated significant hemolysis, reaching 100%.

In addition to hemolytic activity, assessing the cytotoxicity of AMPs against mammalian cells is crucial for their potential clinical application. While hemolysis indicates a risk to RBCs, cytotoxic effects can extend to other cell types, affecting the overall safety profile of these peptides [50]. Cytotoxicity assessment is essential for determining the therapeutic window of AMPs and evaluating their selectivity and mechanism of action. For example, some AMPs selectively target bacterial membranes while sparing mammalian cells, which is a desirable trait for clinical use [31]. As demonstrated in Figure 4, all AMPs exhibited a reduction in the viability of L929 cells at various concentrations. However, they displayed low toxicity at lower concentrations, suggesting a favorable safety margin. Ultimately, a comprehensive understanding of both hemolytic and cytotoxic activities is essential for advancing AMPs as viable candidates in clinical settings.

## Conclusions

In conclusion, our study underscores the potential of AMPs as promising therapeutic agents against *P. aeruginosa*. By combining advanced computational tools, such as TACaPe and docking analysis, with *in vitro* assays, we successfully identified AMPs with significant antibacterial and antibiofilm activities. While our findings confirm the efficacy of AMPs, they also highlight critical limitations, particularly regarding hemolytic and cytotoxicity activities, which poses challenges for clinical applications. Future studies will need to focus on optimizing these peptides to reduce toxicity and enhance activity, paving the way for the development of safer, more effective AMP-based therapies. Overall, the integration of computational design with experimental validation proves to be a robust approach for accelerating the discovery of novel antimicrobial compounds, particularly in the fight against multidrug-resistant pathogens.

## **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 the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, <http://www.cnpq.br/>), which provided research and scholarship.

## **Data availability**

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

## **Ethics approval**

The hemolysis assay using mice blood was conducted in compliance with the guidelines of the Ethics Committee, adhering to the precepts of Law No. 11,794 of October 8, 2008, Decree No. 6,899 of July 15, 2009, as well as the standards established by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). The protocol received approval from the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Pelotas, under registration No. 23110.045561/2022-18.

## **Competing interests**

All the authors declare that they have no conflicts of interest related to this publication.

## **References**

1. Boo A, Ledesma Amaro R, Stan G-B (2021) *Quorum* sensing in synthetic biology: A review. *Current Opinion in Systems Biology* 28:100378. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2021.100378>

2. Santajit S, Sookrung N, Indrawattana N (2022) *Quorum* Sensing in ESKAPE Bugs: A Target for Combating Antimicrobial Resistance and Bacterial Virulence. *Biology* 11:1466. <https://doi.org/10.3390/biology11101466>
3. Reynolds D, Kollef M (2021) The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs* 81:2117–2131. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>
4. Matilla MA, Martín-Mora D, Gavira JA, Krell T (2021) *Pseudomonas aeruginosa* as a Model To Study Chemosensory Pathway Signaling. *Microbiol Mol Biol Rev* 85:e00151-20. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00151-20>
5. Li Q, Mao S, Wang H, Ye X (2022) The Molecular Architecture of *Pseudomonas aeruginosa* *Quorum-Sensing* Inhibitors. *Marine Drugs* 20:488. <https://doi.org/10.3390/md20080488>
6. Mahlapuu M, Björn C, Ekblom J (2020) Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology* 40:978–992. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1796576>
7. Garvey M (2023) Antimicrobial Peptides Demonstrate Activity against Resistant Bacterial Pathogens. *Infectious Disease Reports* 15:454–469. <https://doi.org/10.3390/idr15040046>
8. Yao L, Liu Q, Lei Z, Sun T (2023) Development and challenges of antimicrobial peptide delivery strategies in bacterial therapy: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 253:126819. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126819>
9. Ramazi S, Mohammadi N, Allahverdi A, Khalili E, Abdolmaleki P (2022) A review on antimicrobial peptides databases and the computational tools. *Database* 2022:baac011. <https://doi.org/10.1093/database/baac011>
10. Waghu FH, Barai RS, Gurung P, Idicula-Thomas S (2016) CAMP<sub>R3</sub>: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides: Table 1. *Nucleic Acids Res* 44:D1094–D1097. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1051>
11. Pirtskhalava M, Amstrong AA, Grigolava M, Chubinidze M, Alimbarashvili E, Vishnepolsky B, Gabrielian A, Rosenthal A, Hurt DE, Tartakovsky M (2021) DBAASP

- v3: database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. *Nucleic Acids Research* 49:D288–D297. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa991>
12. Wang G, Li X, Wang Z (2016) APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research* 44:D1087–D1093. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>
13. Cardoso MH, Orozco RQ, Rezende SB, Rodrigues G, Oshiro KGN, Cândido ES, Franco OL (2020) Computer-Aided Design of Antimicrobial Peptides: Are We Generating Effective Drug Candidates? *Front Microbiol* 10:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03097>
14. Aronica PGA, Reid LM, Desai N, Li J, Fox SJ, Yadahalli S, Essex JW, Verma CS (2021) Computational Methods and Tools in Antimicrobial Peptide Research. *J Chem Inf Model* 61:3172–3196. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00175>
15. Agüero-Chapin G, Galpert-Cañizares D, Domínguez-Pérez D, Marrero-Ponce Y, Pérez-Machado G, Teijeira M, Antunes A (2022) Emerging Computational Approaches for Antimicrobial Peptide Discovery. *Antibiotics* 11:936. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070936>
16. The UniProt Consortium (2023) UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research* 51:D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
17. Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack AF, Forli S (2021) AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *J Chem Inf Model* 61:3891–3898. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>
18. Lamiable A, Thévenet P, Rey J, Vavrusa M, Derreumaux P, Tufféry P (2016) PEP-FOLD3: faster *de novo* structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Res* 44:W449–W454. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw329>
19. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 26:283–291. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>

20. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30:2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
21. Laskowski RA, Swindells MB (2011) LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *J Chem Inf Model* 51:2778–2786. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>
22. Meher PK, Sahu TK, Saini V, Rao AR (2017) Predicting antimicrobial peptides with improved accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features into Chou's general PseAAC. *Sci Rep* 7:42362. <https://doi.org/10.1038/srep42362>
23. Hasan MM, Schaduengrat N, Basith S, Lee G, Shoombuatong W, Manavalan B (2020) HLPpred-Fuse: improved and robust prediction of hemolytic peptide and its activity by fusing multiple feature representation. *Bioinformatics* 36:3350–3356. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa160>
24. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker JM (ed) *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 571–607
25. Rathore AS, Choudhury S, Arora A, Tijare P, Raghava GPS (2024) ToxinPred 3.0: An improved method for predicting the toxicity of peptides. *Computers in Biology and Medicine* 179:108926. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2024.108926>
26. Dimitrov I, Bangov I, Flower DR, Doytchinova I (2014) AllerTOP v.2—a server for in silico prediction of allergens. *J Mol Model* 20:2278. <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2278-5>
27. M100 Ed34 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 34th Edition. In: Clinical & Laboratory Standards Institute. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>. Accessed 4 Oct 2024
28. Halicki PCB, Radin V, Von Groll A, Nora MV, Pinheiro AC, Da Silva PEA, Ramos DF (2020) Antibiofilm Potential of Arenecarbaldehyde 2-Pyridinylhydrazone

Derivatives Against *Acinetobacter baumannii*. Microbial Drug Resistance 26:1429–1436. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0185>

29. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura GD, Djukić S, Ćirković I, Ruzicka F (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS 115:891–899. [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)

30. Allend SO, Oliveira Garcia M, da Cunha KF, de Albernaz DTF, Panagio LA, Nakazaro G, Reis GF, Oliveira TL, Neto ACPS, Hartwig DD (2024) The synergic and additive activity of biogenic silver nanoparticle associated with meropenem against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal of Applied Microbiology 135:lxae046. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxae046>

31. Wang T, Zou C, Wen N, Liu X, Meng Z, Feng S, Zheng Z, Meng Q, Wang C (2021) The effect of structural modification of antimicrobial peptides on their antimicrobial activity, hemolytic activity, and plasma stability. Journal of Peptide Science 27:e3306. <https://doi.org/10.1002/psc.3306>

32. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65:55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

33. Sucharitha P, Ramesh Reddy K, Satyanarayana SV, Garg T (2022) Chapter 15 - Absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity assessment of drugs using computational tools. In: Parihar A, Khan R, Kumar A, Kaushik AK, Gohel H (eds) Computational Approaches for Novel Therapeutic and Diagnostic Designing to Mitigate SARS-CoV-2 Infection. Academic Press, pp 335–355

34. Uneputty A, Dávila-Lezama A, Garibo D, Oknianska A, Bogdanchikova N, Hernández-Sánchez JF, Susarrey-Arce A (2022) Strategies applied to modify structured and smooth surfaces: A step closer to reduce bacterial adhesion and biofilm formation. Colloid and Interface Science Communications 46:100560. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2021.100560>

35. Agu PC, Afiukwa CA, Orji OU, Ezech EM, Ofoke IH, Ogbu CO, Ugwuja EI, Aja PM (2023) Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of

nutraceuticals in diseases management. Sci Rep 13:13398. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2>

36. Li S, Wang Y, Xue Z, Jia Y, Li R, He C, Chen H (2021) The structure-mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. Trends in Food Science & Technology 109:103–115. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.005>

37. Ahmed TAE, Hammami R (2019) Recent insights into structure–function relationships of antimicrobial peptides. Journal of Food Biochemistry 43:e12546. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12546>

38. Fillería SG, Nardo AE, Paulino M, Tironi V (2021) Peptides derived from the gastrointestinal digestion of amaranth 11S globulin: Structure and antioxidant functionality. Food Chemistry: Molecular Sciences 3:100053. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100053>

39. Liu S, Bao J, Lao X, Zheng H (2018) Novel 3D Structure Based Model for Activity Prediction and Design of Antimicrobial Peptides. Sci Rep 8:11189. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29566-5>

40. Lin T-T, Yang L-Y, Lin C-Y, Wang C-T, Lai C-W, Ko C-F, Shih Y-H, Chen S-H (2023) Intelligent *De Novo* Design of Novel Antimicrobial Peptides against Antibiotic-Resistant Bacteria Strains. IJMS 24:6788. <https://doi.org/10.3390/ijms24076788>

41. Gupta S, Sharma AK, Jaiswal SK, Sharma VK (2016) Prediction of Biofilm Inhibiting Peptides: An In silico Approach. Front Microbiol 7:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00949>

42. Jesudason T (2024) WHO publishes updated list of bacterial priority pathogens. The Lancet Microbe 5:. <https://doi.org/10.1016/j.lanmic.2024.07.003>

43. Martinez M, Gonçalves S, Felício MR, Maturana P, Santos NC, Semorile L, Hollmann A, Maffía PC (2019) Synergistic and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P5 against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1861:1329–1337. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.05.008>

44. Ruden S, Rieder A, Chis Ster I, Schwartz T, Mikut R, Hilpert K (2019) Synergy Pattern of Short Cationic Antimicrobial Peptides Against Multidrug-Resistant



*Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol 10:2740.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02740>

45. Shang D, Han X, Du W, Kou Z, Jiang F (2021) Trp-Containing Antibacterial Peptides Impair *Quorum* Sensing and Biofilm Development in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and Exhibit Synergistic Effects With Antibiotics. Front Microbiol 12:611009. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.611009>

46. Zhang Q-Y, Yan Z-B, Meng Y-M, Hong X-Y, Shao G, Ma J-J, Cheng X-R, Liu J, Kang J, Fu C-Y (2021) Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. Military Med Res 8:48. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>

47. Taheri-Araghi S (2024) Synergistic action of antimicrobial peptides and antibiotics: current understanding and future directions. Front Microbiol 15:1390765. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1390765>

48. Maturana P, Martinez M, Noguera ME, Santos NC, Disalvo EA, Semorile L, Maffia PC, Hollmann A (2017) Lipid selectivity in novel antimicrobial peptides: Implication on antimicrobial and hemolytic activity. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 153:152–159. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.02.003>

49. Zhao J, Zhao C, Liang G, Zhang M, Zheng J (2013) Engineering Antimicrobial Peptides with Improved Antimicrobial and Hemolytic Activities. J Chem Inf Model 53:3280–3296. <https://doi.org/10.1021/ci400477e>

50. Seo M-D, Won H-S, Kim J-H, Mishig-Ochir T, Lee B-J (2012) Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. Molecules 17:12276–12286. <https://doi.org/10.3390/molecules171012276>

Table 1. AMP sequences and *in silico* assessment of toxicity, allergenicity, hemolytic, and antibacterial activity.

<sup>a</sup> AMP ID	Sequence	Length	<sup>b</sup> Toxicity	<sup>b</sup> Allergenicity	<sup>b</sup> Hemolytic activity	<sup>b</sup> Antibacterial activity (%)
TAC-p1	RRWFRWWRV	9	Non-toxic	Non-allergenic	High	99.9
TAC-p2	WRFRRFRRR	9	Non-toxic	Non-allergenic	Low	98.9
TAC-p3	RWWRKWR	7	Non-toxic	Non-allergenic	Low	99.7
TAC-p4	AKWRVKWW	8	Non-toxic	Non-allergenic	Low	99.8
TAC-p5	WKPFLWP	7	Non-toxic	Non-allergenic	Low	98.9

<sup>a</sup>Peptide identification; <sup>b</sup>Computational analyses results.

Table 2. Calculated physicochemical properties of the AMPs.

<sup>a</sup> AMP ID	Charge	Molecular Weight	<sup>b</sup> Estimated half-life (hours)	Stability Index	Hidrofobicity (%)	GRAVY
TAC-p1	+4	1447.71	1	199.82	56	-1.522
TAC-p2	+6	1435.71	2.8	199.82	33	-2.478
TAC-p3	+4	1173.39	1	90.4	43	-2.871
TAC-p4	+3	1159.4	4.4	5.15	63	-1.125
TAC-p5	+1	973.19	2.8	59.14	57	-0.329

<sup>a</sup>Peptide identification; <sup>b</sup>in mammalian cells.

Table 3. Molecular docking analysis results for the top five AMPs against QS receptors of *P. aeruginosa*.

Receptors						
LasR		RhIR		PqsR		
Compound	Docking score (kcal/mol)	Hydrogen bonds	Docking score (kcal/mol)	Hydrogen bonds	Docking score (kcal/mol)	Hydrogen bonds
TAC-p1	-8.635	Thr <sup>150</sup> ; Asp <sup>29</sup> ; Ser <sup>146</sup> ; Gln <sup>45</sup> ; Arg <sup>71</sup> ; Glu <sup>145</sup>	-9.033	Asp <sup>232</sup> ; Ser <sup>236</sup> ; Leu <sup>242</sup> ; Gln <sup>295</sup> ; Arg <sup>296</sup> ; Asn <sup>3</sup> ; Asp <sup>4</sup> ; Val <sup>30</sup> ; Glu <sup>17</sup>	-6.8	Glu <sup>151</sup> ; Leu <sup>207</sup> ; Tyr <sup>258</sup> ; Glu <sup>259</sup> ; Thr <sup>265</sup>
TAC-p2	-8.385	Arg <sup>122</sup> ; Ala <sup>121</sup> ; Asp <sup>5</sup> ; Asp <sup>29</sup> ; Gln <sup>45</sup> ; Arg <sup>71</sup> ; Thr <sup>80</sup> ; Glu <sup>123</sup> ; Glu <sup>124</sup>	-8.27	Asp <sup>232</sup> ; Glu <sup>199</sup> ; Glu <sup>206</sup> ; Tyr <sup>238</sup> ; Leu <sup>242</sup> ; Gln <sup>296</sup> ; Gly <sup>6</sup>	-8.27	Glu <sup>151</sup> ; Glu <sup>152</sup> ; Asn <sup>206</sup> ; Tyr <sup>258</sup> ; Glu <sup>259</sup> ; Asp <sup>264</sup> ; Tyr <sup>268</sup>
TAC-p3	-7.4	Lys <sup>16</sup> ; Ser <sup>20</sup> ; Glu <sup>48</sup> ; Ile <sup>52</sup> ; Asn <sup>55</sup> ; Asp <sup>65</sup> ; Ala <sup>166</sup>	-8.881	Glu <sup>199</sup> ; Glu <sup>203</sup> ; Glu <sup>206</sup> ; Tyr <sup>238</sup> ; Leu <sup>298</sup> ; Asn <sup>3</sup> ; Glu <sup>34</sup>	-7.2	Glu <sup>151</sup> ; Pro <sup>207</sup> ; Pro <sup>209</sup> ; Pro <sup>210</sup> ; Ile <sup>236</sup>
TAC-p4	-7.121	Arg <sup>122</sup> ; Thr <sup>150</sup> ; Tyr <sup>47</sup> ; Arg <sup>71</sup> ; Thr <sup>80</sup>	-8.514	Glu <sup>199</sup> ; Glu <sup>206</sup> ; Tyr <sup>238</sup>	-7.717	Glu <sup>151</sup> ; Glu <sup>259</sup> ; Asp <sup>264</sup> ; Tyr <sup>268</sup>
TAC-p5	-8.745	Thr <sup>150</sup> ; Tyr <sup>47</sup> ; Ala <sup>70</sup>	-8.966	Leu <sup>242</sup> ; Arg <sup>246</sup>	-8.0	Pro <sup>210</sup>
Natural Ligand	-7.674	Thr <sup>64</sup>	-5.659	Thr <sup>239</sup>	-6.828	-

Ala: Alanine; Arg: Arginine; Asn: Asparagine; Asp: Aspartic acid; Glu: Glutamic acid; Gln: Glutamine; Gly: Glycine; Ile: Isoleucine; Leu: Leucine; Lys: Lysine; Pro: Proline; Ser: Serine; Thr: Threonine; Tyr: Tyrosine; Val: Valine.

Table 4. MIC and synergistic activity (checkerboard assay) of the AMPs with meropenem against *P. aeruginosa* ATCC® 27853.

<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853				
AMP ID <sup>a</sup>	<sup>b</sup> MIC (µg/mL)	MIC combined with meropenem (µg/mL)	<sup>c</sup> FICI	<sup>d</sup> MF
TAC-p1	125	31.25/0.02	0.35 (S)	9.5
TAC-p2	>250	250/0.19	2.0 (I)	1
TAC-p3	250	125/0.09	0.97 (A)	2.11
TAC-p4	>250	62.5/0.04	0.46 (S)	4.75
TAC-p5	>250	125/0.09	0.97 (A)	2.11

<sup>a</sup>Peptide identification; <sup>b</sup>Minimum Inhibitory Concentration; <sup>c</sup>Fractional inhibitory concentration index;

<sup>d</sup>Modulatory factor. (S): synergy; (A): additive; (I): indifference.

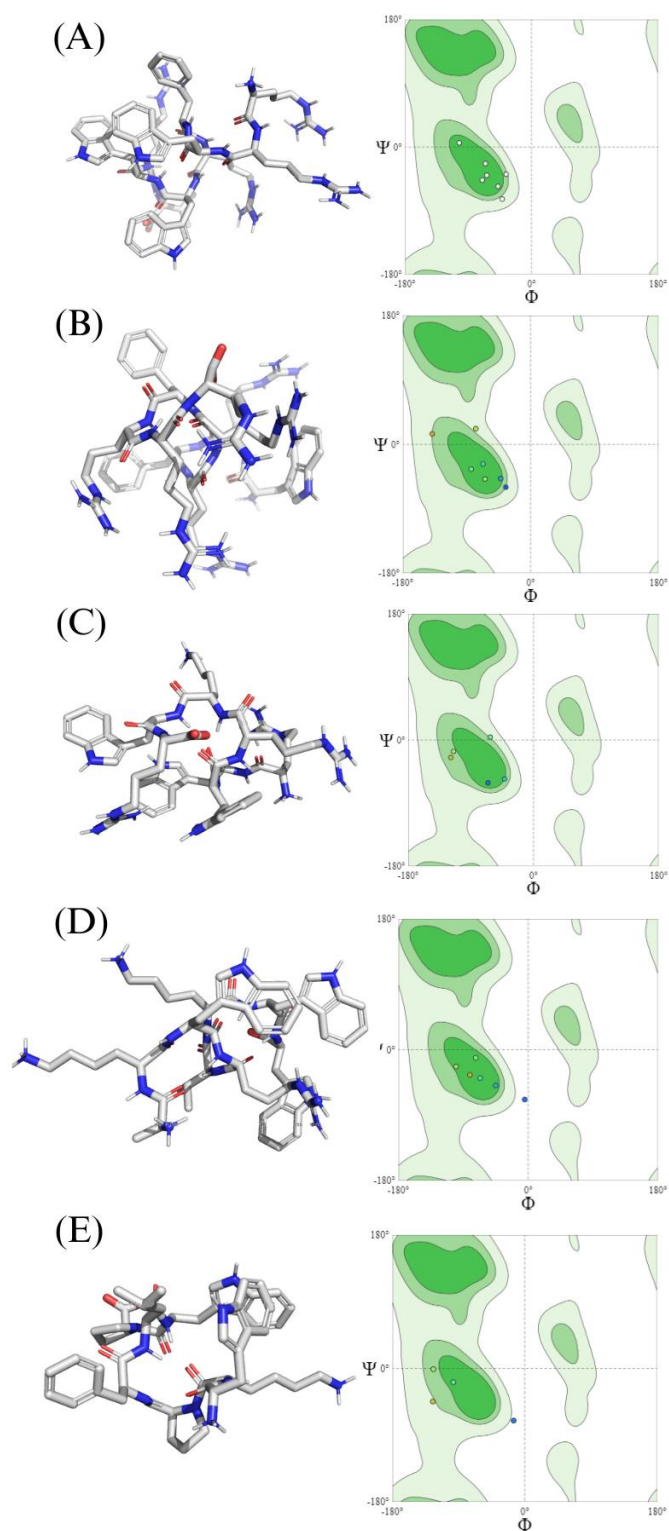


Figure 1. Three-dimensional structures and Ramachandran validation plots of TAC-p1 (A), TAC-p2 (B), TAC-p3 (C), TAC-p4 (D), and TAC-p5 (E) AMPs.

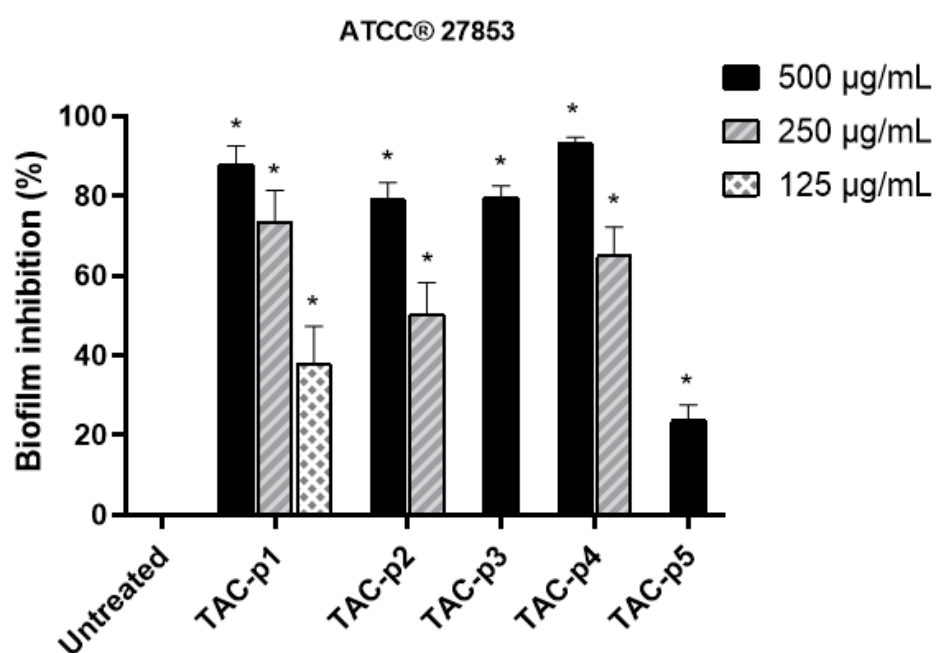


Figure 2. Biofilm inhibition of the *P. aeruginosa* ATCC® 27853 when exposed to different concentrations of AMPs. Control: untreated strain. \* $P < 0.05$  compared to the control.

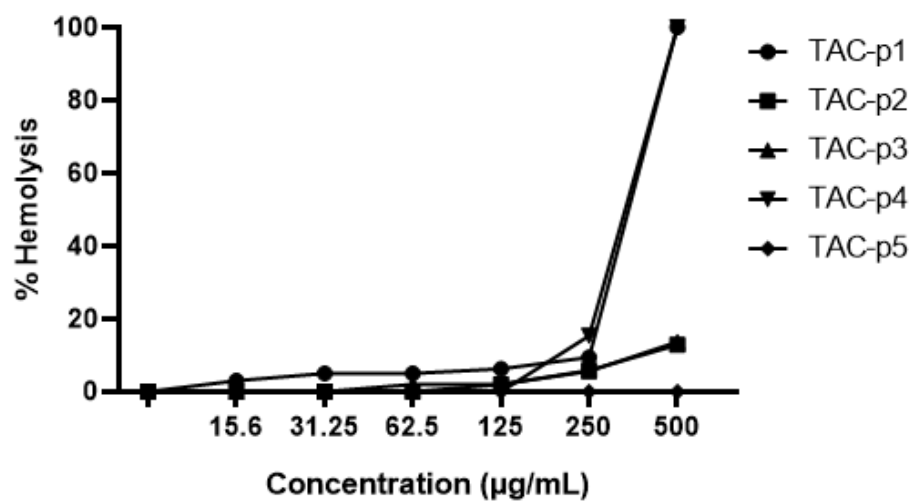


Figure 3. Hemolytic activity of the AMPs against mice RBCs.



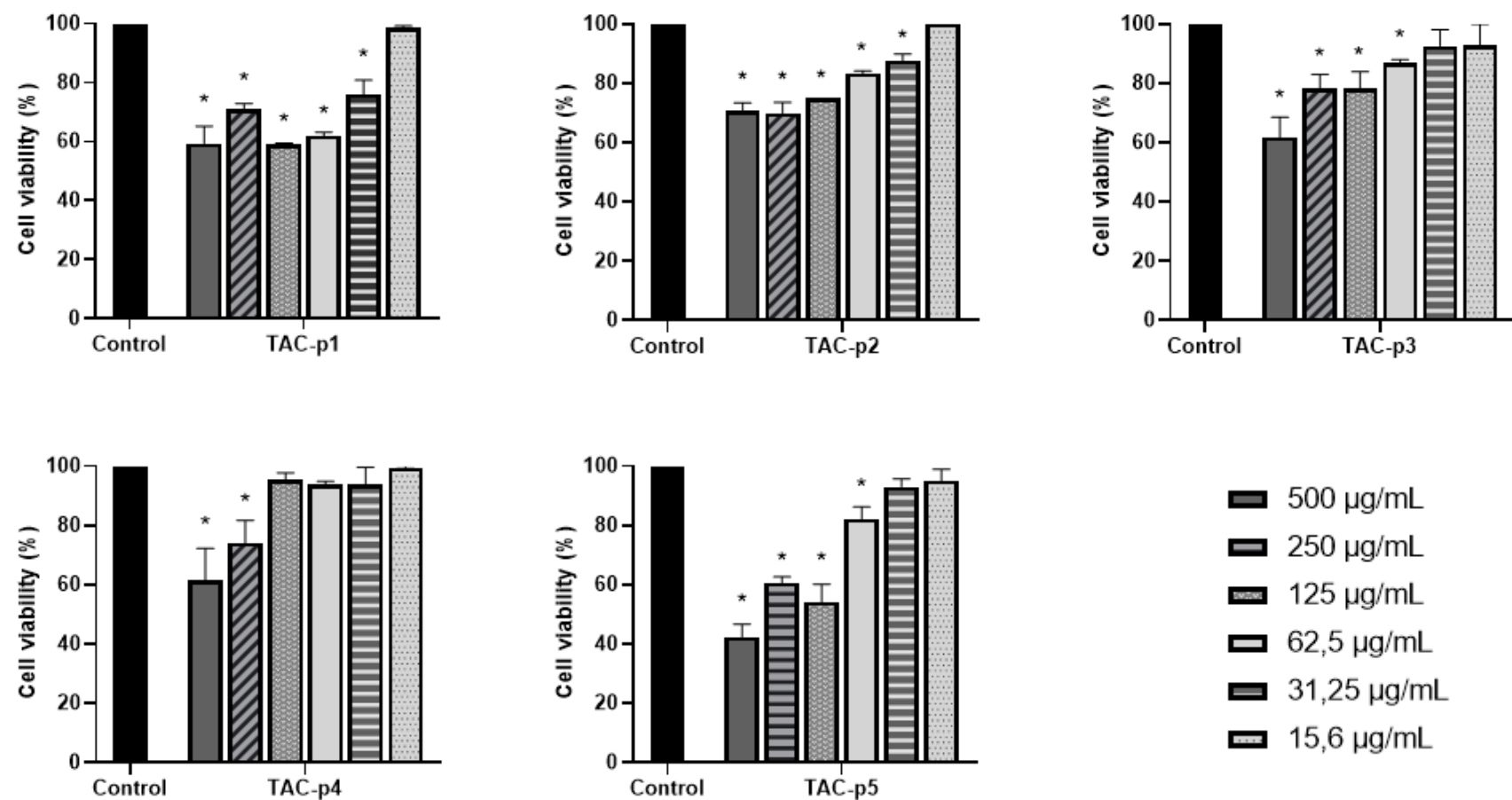


Figure 4. Cell viability of L929 cells treated with different concentrations of AMPs. Untreated: viability control (untreated cell). \*  $P < 0.05$  compared to the control.

#### 4. Considerações Finais

A partir das análises realizadas, conclui-se que os principais objetivos do projeto foram concretizados. Através de métodos *in silico* e *in vitro* foi possível gerar novos peptídeos com atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa*. O treinamento do TACaPe obteve uma acurácia de 91,2%, indicando uma alta confiabilidade nas previsões. Com relação as análises de docking molecular, os cinco peptídeos selecionados para síntese, resultaram em energias de ligação inferiores quando comparadas aos ligantes naturais, sugerindo uma maior afinidade dos peptídeos. Os cinco peptídeos sintetizados apresentaram atividade antibacteriana ou antibiofilme em diferentes concentrações. A combinação dos AMPs com o antibiótico meropenem resultou em efeitos sinérgico e aditivo, e somente um dos peptídeos foi indiferente. É válido ressaltar que os peptídeos apresentaram baixa atividade hemolítica (< 20%) nas concentrações necessárias para a sua atividade sozinha ou combinada. Além disso, o ensaio de citotoxicidade em fibroblastos murinos demonstrou que os AMPs mantiveram a viabilidade celular acima de 50% em todas as concentrações, enquanto o AMP mais promissor, TAC-p4, não resultou em diferenças significativas em relação ao controle em quatro das seis concentrações testadas. Esses resultados destacam o potencial dos AMPs desenvolvidos como alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*. A combinação de estratégias computacionais para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos mostrou-se promissora, e este estudo contribui significativamente para o avanço das opções terapêuticas no combate a RAM.

## Referências

- AGU, P. C. et al. Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 13, p. 13398, 2023.
- AGÜERO-CHAPIN, G. et al. Emerging Computational Approaches for Antimicrobial Peptide Discovery. **Antibiotics**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 936, 2022.
- AHMED, T. A. E.; HAMMAMI, R. Recent insights into structure–function relationships of antimicrobial peptides. **Journal of Food Biochemistry**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. e12546, 2019.
- ALLEND, S. O. et al. The synergic and additive activity of biogenic silver nanoparticle associated with meropenem against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 135, n. 3, p. lxae046, 2024.
- AMBREETHA, S. et al. Genomic and metabolic versatility of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to its inter-kingdom transmission and survival. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 001791, 2024.
- AMSALU, A. et al. Efflux Pump-Driven Antibiotic and Biocide Cross-Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Different Ecological Niches: A Case Study in the Development of Multidrug Resistance in Environmental Hotspots. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1647, 2020.
- ARONICA, P. G. A. et al. Computational Methods and Tools in Antimicrobial Peptide Research. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 61, n. 7, p. 3172–3196, 2021.
- BACILIERI, M.; MORO, S. Ligand-based drug design methodologies in drug discovery process: an overview. **Current Drug Discovery Technologies**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 155–165, 2006.

BAJIYA, N. et al. AntiBP3: A Method for Predicting Antibacterial Peptides against Gram-Positive/Negative/Variable Bacteria. **Antibiotics**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 168, 2024.

BALTENNECK, J.; REVERCHON, S.; HOMMAIS, F. *Quorum* Sensing Regulation in Phytopathogenic Bacteria. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 239, 2021.

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

BEHZADI, P.; BARÁTH, Z.; GAJDÁCS, M. It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 42, 2021.

BIN HAFEEZ, A. et al. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 21, p. 11691, 2021.

BOO, A.; LEDESMA AMARO, R.; STAN, G.-B. *Quorum* sensing in synthetic biology: A review. **Current Opinion in Systems Biology**, [s. l.], v. 28, p. 100378, 2021.

BROWNE, K. et al. A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 19, p. 7047, 2020.

CARDOSO, M. H. et al. Computer-Aided Design of Antimicrobial Peptides: Are We Generating Effective Drug Candidates?. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2020. Disponível em:  
<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.03097/full>. Acesso em: 5 out. 2024.

CARDOSO, P. et al. Molecular engineering of antimicrobial peptides: microbial targets, peptide motifs and translation opportunities. **Biophysical Reviews**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 35–69, 2021.

CHANDRA, A. et al. Transformer-based deep learning for predicting protein properties in the life sciences. **eLife**, [s. l.], v. 12, p. e82819, 2023.

- CHEN, N.; JIANG, C. Antimicrobial peptides: Structure, mechanism, and modification. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 255, p. 115377, 2023.
- CHOKSHI, A. et al. Global Contributors to Antibiotic Resistance. **Journal of Global Infectious Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 36, 2019.
- CORRÊA, J. A. F. et al. Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides. **Materialia**, [s. l.], v. 8, p. 100494, 2019.
- DE OLIVEIRA, E. C. L. et al. Biological Membrane-Penetrating Peptides: Computational Prediction and Applications. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 838259, 2022.
- DESLOUCHES, B.; DI, Y. P. Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 28, p. 46635–46651, 2017.
- DÍAZ-PÉREZ, S. P. et al. Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm-Associated Is Dependent on the Pyoverdine and Pyocyanin Siderophores by *Quorum* Sensing Modulation. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 727–741, 2023.
- DIJKSTEEL, G. S. et al. Review: Lessons Learned From Clinical Trials Using Antimicrobial Peptides (AMPs). **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 616979, 2021.
- DIMITROV, I. et al. AllerTOP v.2—a server for in silico prediction of allergens. **Journal of Molecular Modeling**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 2278, 2014.
- DU, D. et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 523–539, 2018.
- EBERHARDT, J. et al. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 61, n. 8, p. 3891–3898, 2021.
- EL-FOULY, M. Z. et al. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 36–48, 2015.

EZZIANE, Z. Applications of artificial intelligence in bioinformatics: A review. *Expert Systems with Applications*, [s. l.], v. 30, n. 1, **Intelligent Bioinformatics Systems**, p. 2–10, 2006.

FAN, J.; FU, A.; ZHANG, L. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 83–89, 2019.

FILLERÍA, S. G. et al. Peptides derived from the gastrointestinal digestion of amaranth 11S globulin: Structure and antioxidant functionality. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, [s. l.], v. 3, p. 100053, 2021.

FOLIC, M. M. et al. Epidemiology and risk factors for healthcare-associated infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Chemotherapy**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 294–301, 2021.

GAGAT, P. et al. Enhancing Antimicrobial Peptide Activity through Modifications of Charge, Hydrophobicity, and Structure. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 19, p. 10821, 2024.

GARVEY, M. Antimicrobial Peptides Demonstrate Activity against Resistant Bacterial Pathogens. **Infectious Disease Reports**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 454–469, 2023.

GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. (org.). *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 571–607. Disponível em: <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>. Acesso em: 4 out. 2024.

GAUTHIER, J. et al. A brief history of bioinformatics. **Briefings in Bioinformatics**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 1981–1996, 2019.

GUGLIELMI, P.; PONTECORVI, V.; ROTONDI, G. Natural compounds and extracts as novel antimicrobial agents. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, [s. l.], v. 30, n. 12, p. 949–962, 2020.

GUPTA, S. et al. Prediction of Biofilm Inhibiting Peptides: An In silico Approach. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00949/abstract>. Acesso em: 2 out. 2024.

HALICKI, P. C. B. et al. Antibiofilm Potential of Arenecarbaldehyde 2-Pyridinylhydrazone Derivatives Against *Acinetobacter baumannii*. **Microbial Drug Resistance**, [s. l.], v. 26, n. 12, p. 1429–1436, 2020.

HASAN, M. M. et al. HLPpred-Fuse: improved and robust prediction of hemolytic peptide and its activity by fusing multiple feature representation. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 36, n. 11, p. 3350–3356, 2020.

HASANNEJAD-BIBALAN, M. et al. Risk of type III secretion systems in burn patients with *Pseudomonas aeruginosa* wound infection: A systematic review and meta-analysis. **Burns**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 538–544, 2021.

HOLLMANN, A. et al. Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide–membrane interactions of three related antimicrobial peptides. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 141, p. 528–536, 2016.

HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica Et Biophysica Acta**, [s. l.], v. 1778, n. 2, p. 357–375, 2008.

JESUDASON, T. WHO publishes updated list of bacterial priority pathogens. **The Lancet Microbe**, [s. l.], v. 5, n. 9, 2024. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lanmic/article/PIIS2666-5247\(24\)00193-9/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanmic/article/PIIS2666-5247(24)00193-9/fulltext). Acesso em: 4 out. 2024.

JURADO-MARTÍN, I.; SAINZ-MEJÍAS, M.; MCCLEAN, S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 3128, 2021.

KARIM, M. R. et al. Explainable AI for Bioinformatics: Methods, Tools and Applications. **Briefings in Bioinformatics**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. bbad236, 2023.

KOO, H. B.; SEO, J. Antimicrobial peptides under clinical investigation. **Peptide Science**, [s. l.], v. 111, n. 5, p. e24122, 2019.

KUNDA, N. K. Antimicrobial peptides as novel therapeutics for non-small cell lung cancer. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 238–247, 2020.

LAI, Z. et al. Strategies employed in the design of antimicrobial peptides with enhanced proteolytic stability. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 59, p. 107962, 2022.

LAMIABLE, A. et al. PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. W1, p. W449–W454, 2016.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 51, n. 10, p. 2778–2786, 2011.

LEWIES, A. et al. The antimicrobial peptide nisin Z induces selective toxicity and apoptotic cell death in cultured melanoma cells. **Biochimie**, [s. l.], v. 144, p. 28–40, 2018.

LI, Q. et al. The Molecular Architecture of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Inhibitors. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 488, 2022.

LI, S. et al. The structure-mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 109, p. 103–115, 2021.

LIANG, Y. et al. Role and modulation of the secondary structure of antimicrobial peptides to improve selectivity. **Biomaterials Science**, [s. l.], v. 8, n. 24, p. 6858–6866, 2020.

LIAO, C. et al. Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 926758, 2022.

LIN, T.-T. et al. Intelligent De Novo Design of Novel Antimicrobial Peptides against Antibiotic-Resistant Bacteria Strains. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 6788, 2023.



LISCANO, Y.; OÑATE-GARZÓN, J.; DELGADO, J. P. Peptides with Dual Antimicrobial–Anticancer Activity: Strategies to Overcome Peptide Limitations and Rational Design of Anticancer Peptides. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 18, p. 4245, 2020.

LIU, S. et al. Novel 3D Structure Based Model for Activity Prediction and Design of Antimicrobial Peptides. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 11189, 2018.

LORUSSO, A. B. et al. Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, [s. l.], v. 23, n. 24, p. 15779, 2022.

LUO, Y.; SONG, Y. Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 21, p. 11401, 2021.

LUPO, A.; HAENNI, M.; MADEC, J.-Y. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 6.3.01, 2018.

LUSCOMBE, N. M.; GREENBAUM, D.; GERSTEIN, M. What is Bioinformatics? A Proposed Definition and Overview of the Field. **Methods of Information in Medicine**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 346–358, 2001.

M100 ED34 | PERFORMANCE STANDARDS FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 34TH EDITION. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>. Acesso em: 4 out. 2024.

MACALINO, S. J. Y. et al. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. **Archives of Pharmacal Research**, [s. l.], v. 38, n. 9, p. 1686–1701, 2015.

MADNI, H. et al. In silico-designed antimicrobial peptide targeting MRSA and *E. coli* with antibacterial and antibiofilm actions. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 12127, 2024.

MAHLAPUU, M.; BJÖRN, C.; EKBLOM, J. Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 978–992, 2020.

MARCOS, J. F. et al. Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. **Annual Review of Phytopathology**, [s. l.], v. 46, p. 273–301, 2008.

MARTINEZ, M. et al. Synergistic and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P5 against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s. l.], v. 1861, n. 7, p. 1329–1337, 2019.

MATILLA, M. A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* as a Model To Study Chemosensory Pathway Signaling. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. e00151-20, 2021.

MATURANA, P. et al. Lipid selectivity in novel antimicrobial peptides: Implication on antimicrobial and hemolytic activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 153, p. 152–159, 2017.

MEHER, P. K. et al. Predicting antimicrobial peptides with improved accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features into Chou's general PseAAC. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 42362, 2017.

MICHALSKA, M.; WOLF, P. *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 6, p. 963, 2015.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 55–63, 1983.

MURRAY, C. J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, [s. l.], v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

NAM, J.-H.; YOO, J. S. Sublethal Sodium Hypochlorite Exposure: Impact on Resistance-Nodulation-Cell Division Efflux Pump Overexpression and Cross-Resistance to Imipenem. **Antibiotics**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 828, 2024.

OCHOA, C. D. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin Y Is a Promiscuous Cyclase That Increases Endothelial Tau Phosphorylation and Permeability. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 287, n. 30, p. 25407–25418, 2012.

OKELLA, H. et al. New Putative Antimicrobial Candidates: In silico Design of Fish-Derived Antibacterial Peptide-Motifs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 8, p. 604041, 2020.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Infecções relacionadas à assistência à saúde: desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, [s. l.], v. 48, p. 995–1001, 2014.

PANG, Z. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 177–192, 2019.

PAVITHRRA, G.; RAJASEKARAN, R. Gramicidin Peptide to Combat Antibiotic Resistance: A Review. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 191–199, 2020.

PEARSON, C. S. et al. Combined Bioinformatic and Rational Design Approach To Develop Antimicrobial Peptides against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 2757–2764, 2016.

PIRTSKHALAVA, M. et al. DBAASP v3: database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 49, n. D1, p. D288–D297, 2021.

POOLE, K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 255–264, 2001.

QIN, S. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–27, 2022.

QUINTANILHA, J. C. F. et al. Colistin and polymyxin B for treatment of nosocomial infections in intensive care unit patients: pharmacoeconomic analysis. *International Journal of Clinical Pharmacy*, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 74–80, 2019.

RAMAZI, S. et al. A review on antimicrobial peptides databases and the computational tools. **Database**, [s. l.], v. 2022, p. baac011, 2022.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 9. ed. [S. l.]: Guanabara Koogan, 2020.

RATHORE, A. S. et al. ToxinPred 3.0: An improved method for predicting the toxicity of peptides. **Computers in Biology and Medicine**, [s. l.], v. 179, p. 108926, 2024.

REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 482, 2018.

REYNOLDS, D.; KOLLEF, M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. **Drugs**, [s. l.], v. 81, n. 18, p. 2117–2131, 2021.

ROBERTS, K. D. et al. Antimicrobial Activity and Toxicity of the Major Lipopeptide Components of Polymyxin B and Colistin: Last-Line Antibiotics against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. **ACS Infectious Diseases**, [s. l.], v. 1, n. 11, p. 568–575, 2015.

ROSSI, F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 52, n. 9, p. 1138–1143, 2011.

RUDEN, S. et al. Synergy Pattern of Short Cationic Antimicrobial Peptides Against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 2740, 2019.

SALEEM, Z. et al. Point prevalence surveys of health-care-associated infections: a systematic review. **Pathogens and Global Health**, [s. l.], v. 113, n. 4, p. 191–205, 2019.

SANTAJIT, S.; SOOKRUNG, N.; INDRAWATTANA, N. *Quorum* Sensing in ESKAPE Bugs: A Target for Combating Antimicrobial Resistance and Bacterial Virulence. **Biology**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 1466, 2022.

SARAVANAN, R.; SUJATHA, P. A State of Art Techniques on Machine Learning Algorithms: A Perspective of Supervised Learning Approaches in Data Classification. In: 2018 SECOND INTERNATIONAL CONFERENCE ON INTELLIGENT COMPUTING AND CONTROL SYSTEMS (ICICCS), 2018, Madurai, India. 2018 Second International Conference on Intelligent Computing and Control Systems (ICICCS). Madurai, India: **IEEE**, 2018. p. 945–949. Disponível em: <https://ieeexplore.ieee.org/document/8663155/>. Acesso em: 8 nov. 2024.

SAWA, T. et al. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. **Critical Care**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 668, 2014.

SEO, M.-D. et al. Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. **Molecules**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 12276–12286, 2012.

SHANG, D. et al. Trp-Containing Antibacterial Peptides Impair *Quorum* Sensing and Biofilm Development in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and Exhibit Synergistic Effects With Antibiotics. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 611009, 2021.

SHINDE, P. P.; SHAH, S. A Review of Machine Learning and Deep Learning Applications. In: 2018 FOURTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTING COMMUNICATION CONTROL AND AUTOMATION (ICCUBEA), 2018. **2018 Fourth International Conference on Computing Communication Control and Automation (ICCUBEA)**. [S. l.: s. n.], 2018. p. 1–6. Disponível em: <https://ieeexplore.ieee.org/document/8697857>. Acesso em: 8 nov. 2024.

SIERRA, J. M. et al. An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. **Expert Opinion on Biological Therapy**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 663–676, 2017.

SILVA FILHO, L. V. R. F. da et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnosis, and treatment. **Jornal Brasileiro De Pneumologia: Publicacao Oficial Da Sociedade Brasileira De Pneumologia E Tisiologia**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 495–512, 2013.

SOUKARIEH, F. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems as Drug Discovery Targets: Current Position and Future Perspectives. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 61, n. 23, p. 10385–10402, 2018.

SPERNOVASILIS, N.; PSICHOGIOU, M.; POULAKOU, G. Skin manifestations of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 72, 2021.

STAN, Diana et al. Natural Compounds With Antimicrobial and Antiviral Effect and Nanocarriers Used for Their Transportation. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 12, p. 723233, 2021.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, [s. l.], v. 115, n. 8, p. 891–899, 2007.

STREETER, K. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. **Infection, Epidemiology and Medicine**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 25–32, 2016.

SUCHARITHA, P. et al. Chapter 15 - Absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity assessment of drugs using computational tools. In: PARIHAR, A. et al. (org.). Computational Approaches for Novel Therapeutic and Diagnostic Designing to Mitigate SARS-CoV-2 Infection. [S. l.]: **Academic Press**, 2022. p. 335–355.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323911726000121>. Acesso em: 6 out. 2024.

TAHERI-ARAGHI, S. Synergistic action of antimicrobial peptides and antibiotics: current understanding and future directions. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 15, p. 1390765, 2024.

TALAPKO, J. et al. Antimicrobial Peptides—Mechanisms of Action, Antimicrobial Effects and Clinical Applications. **Antibiotics**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 1417, 2022.

TANG, K. W. K.; MILLAR, B. C.; MOORE, J. E. Antimicrobial Resistance (AMR). **British Journal of Biomedical Science**, [s. l.], v. 80, p. 11387, 2023.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 51, n. D1, p. D523–D531, 2023.

THI, M. T. T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 22, p. 8671, 2020.

TORNESELLO, A. L. et al. Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities. **Molecules** (Basel, Switzerland), [s. l.], v. 25, n. 12, p. 2850, 2020.

UDE, J. et al. Outer membrane permeability: Antimicrobials and diverse nutrients bypass porins in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 118, n. 31, p. e2107644118, 2021.

UGGERHØJ, L. E. et al. Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides: do's and don'ts. **Chembiochem**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 242–253, 2015.

UNEPUTTY, A. et al. Strategies applied to modify structured and smooth surfaces: A step closer to reduce bacterial adhesion and biofilm formation. **Colloid and Interface Science Communications**, [s. l.], v. 46, p. 100560, 2022.

VÁZQUEZ, J. et al. Merging Ligand-Based and Structure-Based Methods in Drug Discovery: An Overview of Combined Virtual Screening Approaches. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 20, p. 4723, 2020.

VEETILVALAPPIL, V. V. et al. Pathogenic Arsenal of *Pseudomonas aeruginosa*: An Update on Virulence Factors. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 465–481, 2022.

VETRIVEL, A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Its Control. **Biologics**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 312–336, 2021.

WAGHU, F. H. et al. CAMP R3 : a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides: Table 1. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. D1, p. D1094–D1097, 2016.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. D1, p. D1087–D1093, 2016.

WANG, T. et al. The effect of structural modification of antimicrobial peptides on their antimicrobial activity, hemolytic activity, and plasma stability. **Journal of Peptide Science**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. e3306, 2021.

YAO, L. et al. Development and challenges of antimicrobial peptide delivery strategies in bacterial therapy: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], v. 253, p. 126819, 2023.

YOU, Y. et al. Rational design of stapled antimicrobial peptides. **Amino Acids**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 421–442, 2023.

ZHANG, C.; YANG, M. Antimicrobial Peptides: From Design to Clinical Application. **Antibiotics** (Basel, Switzerland), [s. l.], v. 11, n. 3, p. 349, 2022.

ZHANG, Q.-Y. et al. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. **Military Medical Research**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 48, 2021.

ZHAO, J. et al. Engineering Antimicrobial Peptides with Improved Antimicrobial and Hemolytic Activities. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 53, n. 12, p. 3280–3296, 2013.



## **Apêndices**

## Apêndice A: Patente

### USO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS TAC-P1 E TAC-P4 NA FORMULAÇÃO DE MEDICAMENTOS ANTIBACTERIANOS CONTRA *Pseudomonas aeruginosa*

#### RESUMO

A presente invenção se trata de duas sequências de peptídeos sintéticos (TAC-p1 e TAC-p4) projetadas por meio de ferramentas computacionais para utilização como agentes antibacterianos e adjuvantes contra bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa*. O peptídeo TAC-p1 é composto por 9 aminoácidos, RRWFRWWR, e o peptídeo TAC-p4 é composto por 8 aminoácidos, AKWRVKWW. Infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa* representam um grave problema de saúde pública global visto que hoje já existem cepas resistentes a todas as alternativas terapêuticas disponíveis, incluindo os carbapenêmicos. Isso torna o desenvolvimento de novas opções terapêuticas no combate a essa espécie urgente. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são promissores, devido aos seus mecanismos de ação diferenciados, que incluem a capacidade de atuar na membrana celular bacteriana, evitando mecanismos de resistência comuns aos antibióticos convencionais. Nesse sentido, o uso de AMPs isoladamente ou em combinação com antibióticos pode aumentar a eficácia antibacteriana, proporcionando uma abordagem terapêutica mais eficaz. Os benefícios desse uso incluem menores efeitos colaterais, redução do risco de desenvolvimento de resistência e potencial sinérgico que melhora os resultados do tratamento.

# USO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS TAC-P1 E TAC-P4 NA FORMULAÇÃO DE MEDICAMENTOS ANTIBACTERIANOS CONTRA *Pseudomonas aeruginosa*

## RELATÓRIO DESCRITIVO

### Campo da Invenção

[0001] A presente invenção, classificada internacionalmente no setor técnico A61P (referente à atividade terapêutica específica de compostos químicos ou preparações medicinais) e A61P 31/04 (agentes antibacterianos), refere-se a dois peptídeos sintéticos (TAC-p1 e TAC-p4), para uso no desenvolvimento de medicamentos antibacterianos. Estes peptídeos podem ser utilizados de forma isolada ou associados a antibióticos já disponíveis, como os carbapenêmicos, no tratamento de infecções causadas pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

### Antecedentes da Invenção

[0002] Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência aos antimicrobianos (RAM) representa uma ameaça a saúde pública global. Infecções causadas por bactérias multirresistentes estão entre os maiores desafios terapêuticos atuais, resultando em mais de 1,27 milhões de mortes diretamente relacionadas e aproximadamente 5 milhões de óbitos associados no ano de 2019 (**MURRAY, Christopher JL et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The lancet, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022**). Em 2024, a OMS atualizou sua lista de bactérias patogênicas prioritárias para a pesquisa e o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção, controle e tratamento da RAM. Uma das espécies integrantes desta lista, é *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, listada como alta prioridade (**WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461> Acesso em: 01/11/2024**).

[0003] *P. aeruginosa* é a integrante do gênero *Pseudomonas* spp. de maior importância clínica. Essa espécie acomete indivíduos imunocomprometidos em unidades de terapia intensiva, causando quadros graves de infecções no pulmão, trato

urinário e pele. Diversos fatores de virulência estão presentes em *P. aeruginosa*, como as exotoxinas e as adesinas. Além disso, essa espécie é formadora de biofilme, uma característica que facilita a adesão e colonização, além de servir como proteção frente a ação de antibióticos e desinfetantes **(MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia Médica. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017).**

[0004] *P. aeruginosa* apresenta fatores de resistência intrínsecos e adquiridos, que agravam o problema e limitam as suas possibilidades terapêuticas. Essa espécie é intrinsecamente resistente a algumas classes de antibióticos, especialmente devido à regulação da expressão de genes que codificam para a produção de bombas de efluxo **(LORUSSO, Andre Bittencourt et al. Role of efflux pumps on antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa. International journal of molecular sciences, v. 23, n. 24, p. 15779, 2022).** Entre os mecanismos de resistência adquirida, pode-se citar as mutações espontâneas e a transferência horizontal de genes através de plasmídeos **(PANG, Zheng et al. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnology advances, v. 37, n. 1, p. 177-192, 2019).** É através desses mecanismos, que bactérias normalmente tornam-se um problema de saúde pública, visto que a pressão seletiva exercida pelo uso indiscriminado de antibacterianos atua como um facilitador, selecionando cepas multirresistentes **(MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia Médica. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017).**

[0005] Nesse sentido, iniciativas que visam a pesquisa e o desenvolvimento de novos compostos e/ou melhorias para aqueles que já estão disponíveis na clínica tornaram-se um alvo de estudo promissor, como os peptídeos antimicrobianos (AMPs). Usualmente, os AMPs se apresentam como sequências curtas, geralmente entre 5-50 aminoácidos, de caráter catiônico e com alta porcentagem de resíduos hidrofóbicos (>50%). São compostos produzidos como mecanismo de defesa pela resposta imune inata de diferentes organismos, como peixes, plantas, mamíferos e insetos. Sua atividade pode ser classificada em antiviral, antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e antitumoral **(BIN HAFEEZ, Ahmer et al. Antimicrobial peptides: an update on classifications and databases. International journal of molecular sciences, v. 22, n. 21, p. 11691, 2021).**

[0006] Os AMPs possuem diferentes mecanismos de ação, sendo o principal associado à interação com a membrana celular dos microrganismos. Estudos prévios

estabeleceram três modelos principais pelos quais essa interação pode ocorrer: o modelo tapete, o modelo poro-toroidal e o modelo barril-estave. No modelo tapete, os peptídeos se acumulam na superfície da membrana, desestabilizando sua integridade e causando a lise celular através da formação de micelas. Já nos modelos poro-toroidal e barril-estave, ambos formam um poro transmembrana, com diferença residindo na orientação das faces hidrofílicas e hidrofóbicas expostas ao longo da camada lipídica. Outros mecanismos de ação estão relacionados com a inibição da síntese de compostos intracelulares **(TALAPKO, Jasminka et al. Antimicrobial peptides—Mechanisms of action, antimicrobial effects and clinical applications. Antibiotics, v. 11, n. 10, p. 1417, 2022).**

[0007] A atividade antimicrobiana e os mecanismos de ação dos AMPs estão diretamente relacionados às suas características estruturais e parâmetros físico-químicos **(LI, Shuqin et al. The structure-mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. Trends in Food Science & Technology, v. 109, p. 103-115, 2021).** Propriedades como tamanho e composição da sequência de aminoácidos, constituição da cadeia lateral, carga e proporção dos resíduos são apenas alguns dos diversos parâmetros que contribuem para o potencial ativo desses peptídeos. A sua estrutura secundária também é um fator relevante. Peptídeos nas formas alfa-hélice e folha-beta são mais seletivos e demonstram maior capacidade de interagir com a membrana de microrganismos **(LIANG, Yangbin et al. Role and modulation of the secondary structure of antimicrobial peptides to improve selectivity. Biomaterials Science, v. 8, n. 24, p. 6858-6866, 2020).**

[0008] Com o aumento do número de bancos de dados biológicos, a utilização de estratégias computacionais para o desenvolvimento de novas drogas foi facilitada. Hoje, existem mais de 30.000 sequências de AMPs com atividade, propriedades físico-químicas e características estruturais catalogadas disponíveis *online*. A combinação desses dados com inteligência artificial (IA) e modelagem computacional tem permitido avanços significativos no campo do *design* de AMPs. Essa abordagem permite a previsão, triagem e *design* desses AMPs de forma rápida e automatizada, através da descoberta de padrões em milhares de sequências fornecidas por pesquisadores de todas as partes do mundo em diversos bancos de dados de AMPs disponíveis *online* **(BIN HAFEEZ, Ahmer et al. Antimicrobial peptides: an update on classifications and databases. International journal of molecular sciences, v.**

22, n. 21, p. 11691, 2021; LISCANO, Yamil; OÑATE-GARZÓN, Jose; DELGADO, Jean Paul. Peptides with dual antimicrobial–anticancer activity: Strategies to overcome peptide limitations and rational design of anticancer peptides. *Molecules*, v. 25, n. 18, p. 4245, 2020).

[0009] Diante do exposto, à medida que a RAM continua a desafiar abordagens convencionais de tratamento, a combinação entre pesquisa computacional e biologia molecular oferece uma nova perspectiva na luta contra *P. aeruginosa* MDR. O desenvolvimento racional de novos AMPs ativos contra esse patógeno, apoiado por métodos de IA, pode oferecer um caminho promissor para contornar os desafios da RAM, proporcionando alternativas terapêuticas inovadoras e potencialmente eficazes contra infecções resistentes causadas por *P. aeruginosa*.

### **Descrição da Invenção**

[00010] A presente invenção consiste em uma formulação antibacteriana a base dos AMPs sintéticos, TAC-p1 e TAC-p4, sozinhos ou associados ao meropenem, frente a *P. aeruginosa*.

[00011] **Passo 1:** Os dados para o conjunto positivo foram obtidos do Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptide (DBAASP). Foram selecionadas sequências contendo entre 5 e 25 resíduos e que exibiam apenas atividade antibacteriana. O conjunto negativo foi criado utilizando sequências disponíveis no UniProt®. A busca por sequências negativas foi realizada com os seguintes termos: "length:[5 TO 25] NOT antimicrobial NOT antibiotic NOT antiviral NOT antifungal NOT fungicide NOT antibacterial NOT antitumoral NOT anticancer NOT gram NOT biofilm NOT AMP." Sequências duplicadas ou que continham aminoácidos não naturais foram removidas de ambos os conjuntos. Um número aleatório de sequências equivalente ao conjunto positivo foi selecionado para o conjunto negativo. Ambos os conjuntos foram divididos em 80% para treinamento e 20% para teste, respectivamente, com o conjunto de teste sendo utilizado para avaliar o desempenho do modelo com dados novos.

[00012] **Passo 2:** Os conjuntos de dados foram usados para treinar a ferramenta baseada em Transformer para Classificação e Geração de Peptídeos Anticâncer, TACaPe (<https://github.com/omixlab/anticancer-peptide>). TACaPe é uma ferramenta de linha de comando que utiliza uma arquitetura de rede neural transformer, seguindo um modelo de codificador-decodificador. O codificador processa o texto de entrada e o mapeia em vetores para o decodificador interpretar. Ele emprega um mecanismo de "autoatenção", atribuindo pesos a diferentes partes da entrada para entender sua influência e estabelecer relações. As sequências foram convertidas em vetores densos utilizando uma camada de embedding para gerar a entrada para os modelos. Cada modelo foi treinado por 100 épocas usando o otimizador Adam com parâmetros padrão e a função de perda de entropia cruzada binária. A acurácia, definida como a proporção de previsões corretas feitas pelo modelo, foi utilizada como métrica de avaliação, calculada como o número de previsões corretas dividido pelo número total de previsões. Utilizando as configurações padrão do programa, foram geradas 100 novas sequências de potenciais AMPs.

[00013] **Passo 3:** A interação entre os peptídeos gerados (ligantes) e as proteínas (receptores) foi avaliada utilizando o AutoDock Vina (**TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. Journal of computational chemistry, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010**). Três receptores envolvidos nas vias de QS de *P. aeruginosa*, LasR (PDB ID: 2UV0), PqsR (PDB ID: 4JVC) e RhIR (PDB ID: 7R3J) foram utilizados. As estruturas tridimensionais dos peptídeos gerados foram previstas utilizando o PEP-FOLD3 e validadas com PROCHECK, examinando as posições dos aminoácidos no gráfico de Ramachandran (**SHEN, Yimin et al. Improved PEP-FOLD approach for peptide and miniprotein structure prediction. Journal of chemical theory and computation, v. 10, n. 10, p. 4745-4758, 2014; LASKOWSKI, Roman A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. Journal of applied crystallography, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993**). A preparação dos receptores e ligantes foi realizada utilizando o AutoDock Tools, que incluiu a remoção de moléculas de água, adição de átomos de hidrogênio e atribuição de cargas. O grid foi configurado para abranger as regiões do local de ligação dos ligantes naturais (**MORRIS, Garrett M. et al.**

**AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. Journal of computational chemistry, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009).**

Os ligantes com as melhores energias médias de ligação foram selecionados para análise adicional das interações ligante-receptor utilizando o PyMOL v.3.0 e o LigPlot+ v.2.2. As estruturas dos ligantes naturais foram obtidas no PubChem® e submetidas a análises de *docking* sob as mesmas condições para fins comparativos.

[00014] **Passo 4:** A atividade antimicrobiana *in silico* das sequências geradas foi verificada utilizando o componente de previsão do TACaPe, juntamente com duas ferramentas *online* adicionais: iAMPpred e CAMPr3 (MEHER, Prabina Kumar et al. **Predicting antimicrobial peptides with improved accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features into Chou's general PseAAC. Scientific reports, v. 7, n. 1, p. 42362, 2017;** WAGHU, Faiza Hanif et al. **CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. Nucleic acids research, v. 44, n. D1, p. D1094-D1097, 2016).** Cada uma dessas ferramentas emprega diferentes modelos de aprendizado de máquina para fazer previsões e gerar probabilidades numéricas. A atividade antimicrobiana média foi calculada com base nos resultados obtidos das três ferramentas. Além disso, o potencial hemolítico dos peptídeos foi avaliado utilizando a ferramenta HLPpred-Fuse (HASAN, Md Mehedi et al. **HLPpred-Fuse: improved and robust prediction of hemolytic peptide and its activity by fusing multiple feature representation. Bioinformatics, v. 36, n. 11, p. 3350-3356, 2020)**, que calcula a probabilidade de uma sequência de aminoácidos ser hemolítica e categoriza sua atividade hemolítica como alta ou baixa.

[00015] **Passo 5:** As características físico-químicas dos peptídeos foram calculadas utilizando o ProtParam (GASTEIGER, Elisabeth et al. **Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. Humana press, 2005).** Os seguintes parâmetros foram considerados: peso molecular, carga, hidrofobicidade, meia-vida estimada e média geral de hidropatia (GRAVY). A toxicidade dos peptídeos foi avaliada utilizando a ferramenta ToxinPred 3.0, enquanto a alergenicidade foi avaliada com a ferramenta AllerTOP v.2 (RATHORE, Anand Singh et al. **ToxinPred 3.0: An improved method for predicting the toxicity of peptides. Computers in Biology**



and Medicine, v. 179, p. 108926, 2024; DIMITROV, Ivan et al. AllerTOP v. 2—a server for *in silico* prediction of allergens. Journal of molecular modeling, v. 20, p. 1-6, 2014).

[00016] **Passo 6:** Os peptídeos que demonstraram o melhor desempenho nas análises computacionais foram sintetizados quimicamente pela GenOne (São Paulo, Brasil). Sua qualidade e pureza ( $\geq 95\%$ ) foram confirmadas por cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) e espectrometria de massas (MS). Os peptídeos foram ressuspensos em uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 5% em uma concentração final de 1 mg/mL.

[00017] **Passo 7:** A cepa padrão de *P. aeruginosa* ATCC® 27853 foi utilizada neste estudo para avaliar a atividade *in vitro* dos peptídeos sintetizados. Esta cepa faz parte do repositório bacteriano do Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios (LaBBio) da Universidade Federal de Pelotas, Brasil, e foi fornecida pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil) e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Kasvi®, Brasil) contendo 10% de glicerol (v/v). Antes dos experimentos, a cepa foi reativada em caldo BHI a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, seguida de cultivo em ágar Cetrimide (Kasvi®, Brasil) nas mesmas condições.

[00018] **Passo 8:** A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo as diretrizes do 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**). Neste ensaio, 50  $\mu\text{L}$  de caldo BHI foram distribuídos em uma microplaca de 96 poços. Em seguida, 50  $\mu\text{L}$  de cada peptídeo foi adicionado aos poços e diluídos na proporção 1:2, resultando em concentrações de 15,6 a 250  $\mu\text{g/mL}$ . Para o meropenem, as concentrações variaram de 0,02 a 25  $\mu\text{g/mL}$ . O inóculo bacteriano foi ajustado para uma densidade de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL, e as placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada com base nos resultados da CIM. Alíquotas

foram retiradas dos poços onde o crescimento bacteriano foi inibido e inoculadas em placas de ágar Cetrimide, que foram incubadas a 37°C por 24 horas. A ausência de crescimento bacteriano nas placas indicou que os compostos testados foram bactericidas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e controles de esterilidade para o meio de cultura e peptídeos, assim como controles de viabilidade bacteriana, foram incluídos.

[00019] **Passo 9:** A cepa padrão *P. aeruginosa* ATCC® 27853 é uma cepa formadora de biofilmes. A inibição da formação de biofilme foi avaliada utilizando uma metodologia modificada proposta por Halicki et al. (2020) (**HALICKI, Priscila Cristina Bartolomeu et al. Antibiofilm potential of arenecarbaldehyde 2-pyridinylhydrazone derivatives against *Acinetobacter baumannii*. Microbial Drug Resistance, v. 26, n. 12, p. 1429-1436, 2020**). Para este ensaio, 180 µL de caldo Mueller Hinton (MH) contendo cada peptídeo nas concentrações de 62,5, 125, 250 e 500 µg/mL foi adicionado a uma microplaca de 96 poços. Em seguida, 20 µL de uma suspensão bacteriana ( $1,5 \times 10^6$  UFC/mL) foi adicionada a cada poço e incubada a 37°C por 24 horas. A fixação do biofilme, lavagem e coloração foram realizadas conforme o protocolo descrito por Stepanovic et al. (2007) (**STEPANOVIĆ, Srdjan et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. Apmis, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007**). As leituras de absorbância dos poços foram feitas utilizando um espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos como uma porcentagem de inibição utilizando a seguinte fórmula: % inibição do biofilme =  $(1 - (\text{DOTRATAMENTO} - \text{DOCONTROLE NEGATIVO}) / (\text{DOCONTROLE POSITIVO} - \text{DOCONTROLE NEGATIVO})) \times 100$ .

[00020] A atividade sinérgica dos peptídeos em combinação com meropenem foi avaliada utilizando o ensaio de checkerboard (**ALLEND, Suzane Olachea et al. The synergic and addictive activity of biogenic silver nanoparticle associated with meropenem against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal of Applied Microbiology, v. 135, n. 3, p. 1946-1956, 2024**). As concentrações iniciais foram definidas em 250 µg/mL para os peptídeos e 2 µg/mL para o meropenem. Em uma placa de 96 poços contendo caldo MH (Kasvi®, Brasil), diluições seriadas em duas direções dos peptídeos foram preparadas nas linhas horizontais, enquanto

diluições seriadas do meropenem foram preparadas nas colunas verticais. As suspensões foram homogenizadas, e a densidade óptica (DO) foi medida a 630 nm, correspondente ao padrão McFarland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). A placa foi incubada a 37°C por 24 horas, seguida da adição de 20 µL de resazurina a 0,02% como indicador de viabilidade celular. A concentração inibitória fracionária (FIC) foi definida como a menor concentração na qual os peptídeos combinados com o meropenem inibiram o crescimento bacteriano. Os resultados do checkerboard foram interpretados utilizando o índice de concentração inibitória fracionada (FICI), calculado com a fórmula:  $FICI = (CIM \text{ do peptídeo combinado} / CIM \text{ do peptídeo sozinho}) + (CIM \text{ do meropenem combinado} / CIM \text{ do meropenem sozinho})$ . Os valores de FICI foram categorizados 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). Além disso, o fator modulatório (FM) foi determinado utilizando a fórmula:  $CIM \text{ do meropenem sozinho} / CIM \text{ do meropenem combinado com os peptídeos}$ . Esse valor indica quantas vezes os peptídeos reduziram a CIM do meropenem. Controles de esterilidade (negativos) para os peptídeos, meropenem e caldo MH, junto com controles de crescimento (positivos) para as cepas bacterianas, foram incluídos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

[00021] **Passo 10:** A atividade hemolítica dos peptídeos contra células vermelhas do sangue (CVS) de camundongos foi avaliada medindo a quantidade de hemoglobina liberada devido à lise das CVS, seguindo o protocolo modificado de Wang et al. (2021) (WANG, Taoran et al. **The effect of structural modification of antimicrobial peptides on their antimicrobial activity, hemolytic activity, and plasma stability. Journal of Peptide Science**, v. 27, n. 5, p. e3306, 2021). O sangue de camundongo foi centrifugado a 100 xg por 10 minutos, após o que as CVS foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e suspensas para alcançar uma concentração final de 10% (v/v). Em seguida, 25 µL da suspensão de CVS foi incubada com 100 µL de cada solução de peptídeo em PBS. As soluções de peptídeos foram preparadas utilizando o método de diluição dupla com concentrações variando de 15,6 a 500 µg/mL e incubadas a 37°C por 1 hora. Após a incubação, as soluções foram centrifugadas a 1.200 xg por 5 minutos, e a absorbância do sobrenadante foi medida a 450 nm. As células vermelhas em PBS serviram como controle negativo,

enquanto Triton X-100 a 1% foi utilizado como controle positivo. Todos os testes foram realizados em triplicata, e os valores médios foram utilizados para análise dos dados. A porcentagem de hemólise foi calculada utilizando a fórmula: % de hemólise =  $(\text{AbsPEPTÍDEO} - \text{AbsPBS}) / (\text{AbsTRITON-100} - \text{AbsPBS}) \times 100$ .

[00022] **Passo 11:** As células L929 (fibroblastos murinos) foram cultivadas em meio Eagle modificado da Dulbecco, suplementado com 10% de soro fetal bovino, em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. A tripsina-EDTA (0,25%) foi utilizada para desprender as células durante o subcultivo. As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5.000 células por poço em 100 µL de meio. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com peptídeos diluídos serialmente em concentrações finais variando de 15,6 a 500 µg/mL e incubadas por mais 24 horas. O conteúdo dos poços foi descartado, e a placa foi submetida ao ensaio de redução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-2H-tetrazólio brometo) (**MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983**). A absorbância foi medida a 490 nm utilizando um leitor de microplaca para calcular a viabilidade celular, com células não tratadas servindo como controles. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada usando a fórmula: % viabilidade celular =  $(\text{AbsTRATAMENTO} / \text{AbsCONTROLE}) \times 100$ .

[00023] **Passo 12:** A análise de dados foi realizada no ambiente Google® Colab utilizando Python. A biblioteca Pandas foi utilizada para tarefas de manipulação de dados. As análises estatísticas, incluindo testes t e ANOVA, foram realizadas, com o limiar de significância estabelecido em  $P < 0,05$ . A visualização dos dados foi realizada utilizando o GraphPad Prism v.8.

## Resultados

[00024] **Exemplo 1:** O banco de dados DBAASP continha um total de 22.358 sequências. Após a aplicação de filtros para selecionar sequências com atividade antibacteriana, restaram 14.854. Subsequentemente, foram removidas duplicatas e sequências contendo aminoácidos não naturais, resultando em um conjunto final de

10.017 sequências. Esse conjunto foi dividido em dados de treinamento (80%, 8.013 sequências) e de teste (20%, 2.004 sequências). O modelo alcançou uma precisão de 91,2% na classificação, demonstrando alta eficácia na identificação de peptídeos com potencial antibacteriano.

[00025] **Exemplo 2:** Com base nos modelos de classificação e geração pré-treinados, foram gerados 100 novos AMPs, com no máximo 25 resíduos de aminoácidos. Para garantir a exclusividade das sequências, foi realizado um alinhamento com BLAST, e os dois peptídeos mais promissores foram selecionados para estudos adicionais, denominados TAC-p1 e TAC-p4. As estruturas tridimensionais de ambos foram validadas por gráficos de Ramachandran, com mais de 90% de seus resíduos localizados nas regiões mais favoráveis. A Figura 1 apresenta as estruturas tridimensionais e os resultados de validação, enquanto as sequências de aminoácidos, com 8 e 9 resíduos, estão listadas na Tabela 1.

[00026] **Exemplo 3:** Os peptídeos TAC-p1 e TAC-p4 foram avaliados quanto à toxicidade, alergenicidade, atividade hemolítica e eficácia antibacteriana (Tabela 1). Ambos foram classificados como não tóxicos e não alergênicos. No entanto, diferiram em relação à atividade hemolítica: TAC-p1 apresentou alta atividade hemolítica, enquanto TAC-p4 demonstrou níveis baixos. Em relação à atividade antibacteriana, TAC-p1 destacou-se com uma taxa de inibição de 99,9%, enquanto TAC-p4 atingiu 99,8%. Esses resultados indicam que ambos têm potencial significativo como agentes antimicrobianos, embora TAC-p4 tenha a vantagem de menor atividade hemolítica.

[00027] **Exemplo 4:** Os parâmetros físico-químicos calculados (Tabela 2) revelaram diferenças entre os dois peptídeos. TAC-p1 apresentou maior hidrofobicidade (56%) e carga líquida de +6, com peso molecular de 1447,71 Da. Por outro lado, TAC-p4 foi menos hidrofóbico (39%), com carga líquida de +4 e peso molecular de 1159,4 Da. Quanto à estabilidade, TAC-p4 teve o índice mais favorável (5,15), indicando maior estabilidade em comparação com TAC-p1 (199,82). As meias-vidas estimadas em células de mamíferos também diferiram: TAC-p4 apresentou a mais longa (4,4 horas), enquanto TAC-p1 teve a mais curta (1 hora).

[00028] **Exemplo 5:** Os resultados de *docking* molecular mostraram que ambos os peptídeos interagiram favoravelmente com os receptores-alvo, apresentando energias de ligação entre -6,8 e -9,033 kcal/mol. Esses valores destacam o potencial de ligação de TAC-p1 e TAC-p4 com proteínas-alvo bacterianas (Tabela 3).

[00029] **Exemplo 6:** Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e as interações sinérgicas com meropenem são apresentados na Tabela 4. TAC-p1 apresentou MIC de 125 µg/mL, enquanto TAC-p4 não teve sua MIC definida dentro do intervalo de concentrações testadas (>250 µg/mL). Apesar disso, ambos demonstraram efeitos sinérgicos na combinação com meropenem contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, com FICI ≤ 0,50. A combinação dos AMPs com meropenem foi capaz de reduzir a CIM do antibiótico de 1 a 9,5 vezes.

[00030] **Exemplo 7:** Ambos peptídeos, TAC-p1 e TAC-p4, exibiram atividade antibiofilme significativa (Figura 2). TAC-p1 inibiu a formação de biofilme em até 88% na concentração de 500 µg/mL, enquanto TAC-p4 alcançou a maior taxa de inibição (90,7%) na mesma concentração. Ambos não mostraram atividade antibiofilme na menor concentração testada (62,5 µg/mL).

[00031] **Exemplo 8:** Conforme apresentado na Figura 3, TAC-p1 e TAC-p4 exibiram baixa atividade hemolítica (<20%) em concentrações de até 250 µg/mL, mas essa atividade aumentou significativamente a 500 µg/mL, alcançando 100% para ambos. Nos ensaios de citotoxicidade com fibroblastos murinos (células L929), ambos os peptídeos reduziram significativamente a viabilidade celular a 500 µg/mL (P<0,05). Entretanto, em concentrações abaixo de 125 µg/mL, a viabilidade celular permaneceu acima de 75%, indicando baixa citotoxicidade nessas condições.

### Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 apresenta a estrutura tridimensional e o gráfico de Ramachandran para validação das sequências peptídicas geradas computacionalmente.

A Figura 2 apresenta o gráfico de inibição da formação de biofilme dos peptídeos TAC-p1 e TAC-p4 contra a cepa padrão de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 com redução da formação entre 35 – 90%, variando conforme a concentração exposta.

A Figura 3 apresenta o gráfico da atividade hemolítica dos peptídeos TAC-p1 e TAC-p4 contra células vermelhas de camundongos Balb-C. As porcentagens de hemólise variaram entre 0 – 100% conforme a concentração dos peptídeos que as células foram expostas.

A Figura 4 apresenta o gráfico de viabilidade celular de fibroblastos murinos (células L929) expostos a diferentes concentrações do peptídeo TAC-p1. A viabilidade se manteve >50% em todas as concentrações avaliadas e não teve diferença significativa em relação ao controle na menor concentração testada.

A Figura 5 apresenta o gráfico de viabilidade celular de fibroblastos murinos (células L929) expostos a diferentes concentrações do peptídeo TAC-p4. A viabilidade se manteve >60% em todas as concentrações avaliadas e não teve diferença significativa em relação ao controle em 4 das 6 concentrações avaliadas.

**Tabela 1.** Sequências dos peptídeos TAC-p1 e TAC-p4 e avaliação *in silico* da toxicidade, alergenicidade, atividade hemolítica e antimicrobiana.

<b>Característica</b>	<b>Peptídeo</b>	
	<b>TAC-p1</b>	<b>TAC-p4</b>
Sequência	RRWFRWWRV	AKWRVKWW
Tamanho da sequência	9	8
Toxicidade	Não tóxico	Não tóxico
Alergenicidade	Não alergênico	Não alergênico
Atividade hemolítica	Alta	Baixa
Atividade antimicrobiana (%)	99,9	99,8



**Tabela 2.** Parâmetros físico-químicos calculados para os peptídeos TAC-p1 e TAC-p4.

Parâmetros físico-químicos	Peptídeo	
	TAC-p1	TAC-p4
Carga	+4	+3
Peso molecular	1447,71	1159,4
Meia-vida estimada (horas)	1	4,4
Índice de estabilidade	199,82	5,15
Hidrofobicidade (%)	56	63
GRAVY	-1,522	-1,125

**Tabela 3.** Resultados das análises de *docking* molecular para os ligantes naturais e os peptídeos TAC-p1 e TAC-p4 contra receptores de *quorum sensing* em *P. aeruginosa*.

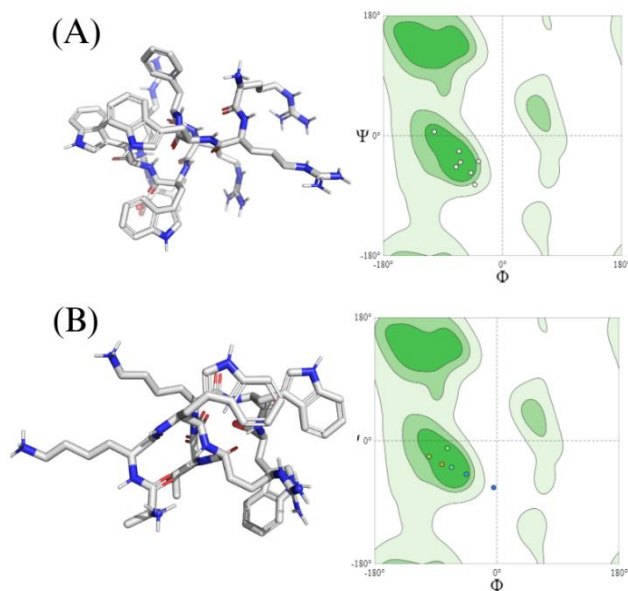
Receptores						
LasR		RhlR		PqsR		
Composto	Energia de ligação (kcal/mol)	Ligações de hidrogênio	Energia de ligação (kcal/mol)	Ligações de hidrogênio	Energia de ligação (kcal/mol)	Ligações de hidrogênio
TAC-p1	-8,635	Thr <sup>150</sup> ; Asp <sup>29</sup> ; Ser <sup>146</sup> ; Gln <sup>45</sup> ; Arg <sup>71</sup> ; Glu <sup>145</sup>	-9,033	Asp <sup>232</sup> ; Ser <sup>236</sup> ; Leu <sup>242</sup> ; Gln <sup>295</sup> ; Arg <sup>296</sup> ; Asn <sup>3</sup> ; Asp <sup>4</sup> ; Val <sup>30</sup> ; Glu <sup>17</sup>	-6,8	Glu <sup>151</sup> ; Leu <sup>207</sup> ; Tyr <sup>258</sup> ; Glu <sup>259</sup> ; Thr <sup>265</sup>
TAC-p4	-7,121	Arg <sup>122</sup> ; Thr <sup>150</sup> ; Tyr <sup>47</sup> ; Arg <sup>71</sup> ; Thr <sup>80</sup>	-8,514	Glu <sup>199</sup> ; Glu <sup>206</sup> ; Tyr <sup>238</sup>	-7,717	Glu <sup>151</sup> ; Glu <sup>259</sup> ; Asp <sup>264</sup> ; Tyr <sup>268</sup>
Ligante Natural	-7,674	Thr <sup>64</sup>	-5,659	Thr <sup>239</sup>	-6,828	-

Ala: Alanina; Arg: Arginina; Asn: Asparagina; Asp: Ácido aspártico; Glu: Ácido glutâmico; Gln: Glutamina; Gly: Glicina; Ile: Isoleucina; Leu: Leucina; Lys: Lisina; Pro: Prolina; Ser: Serina; Thr: Treonina; Tyr: Tirosina; Val: Valina.

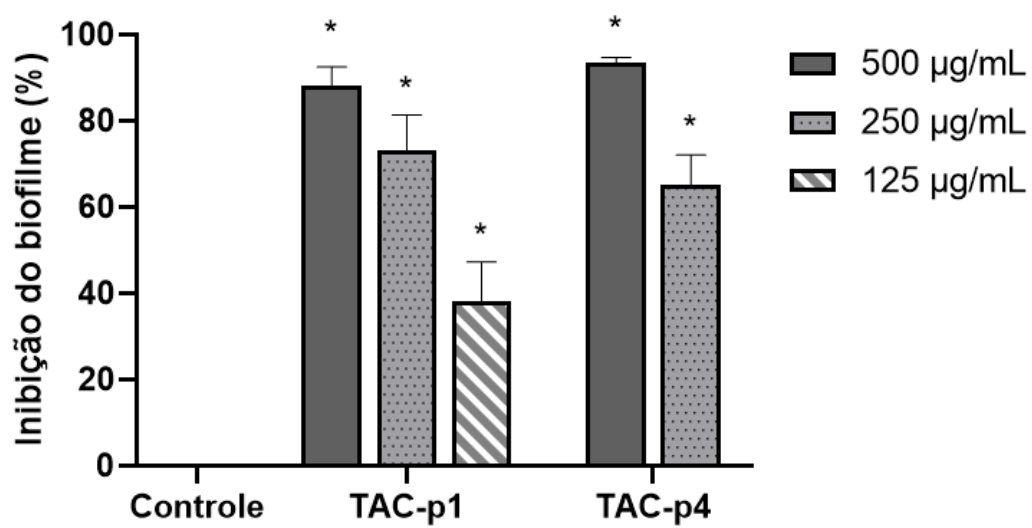
**Tabela 4.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e resultados do ensaio de sinergismo entre os peptídeos e o meropenem.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853					
Peptídeo	CIM (µg/mL)	CIM combinada com meropenem	FICI	Atividade	Fator modulatório
TAC-p1	125	31,25/0,02	0,35	Sinérgica	9,5
TAC-p4	250	62,5/0,04	0,46	Sinérgica	4,75

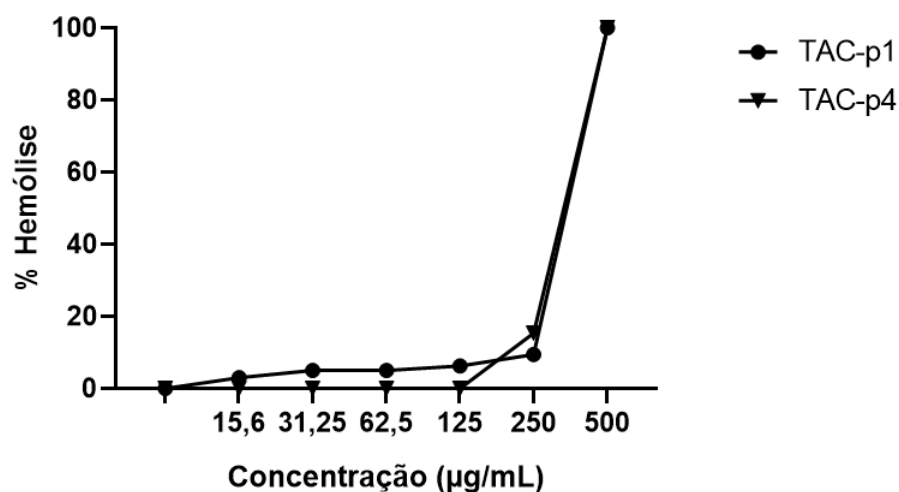
**Figura 1.** Estrutura tridimensional e gráficos de Ramachandran dos peptídeos TAC-p1 (A) e TAC-p4 (B).



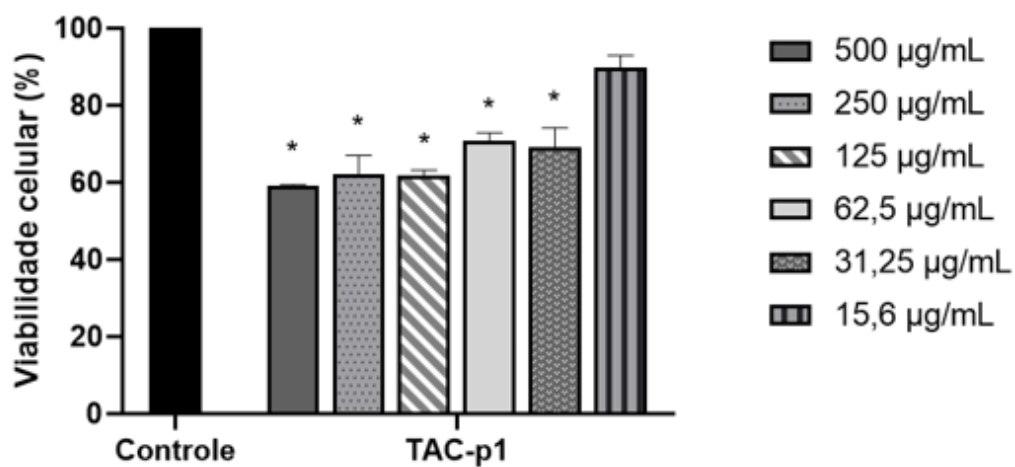
**Figura 2.** Inibição da formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 quando exposta a diferentes concentrações dos peptídeos TAC-p1 e TAC-p4. Controle: cepa não tratada. \*P < 0,05 quando comparado ao controle.



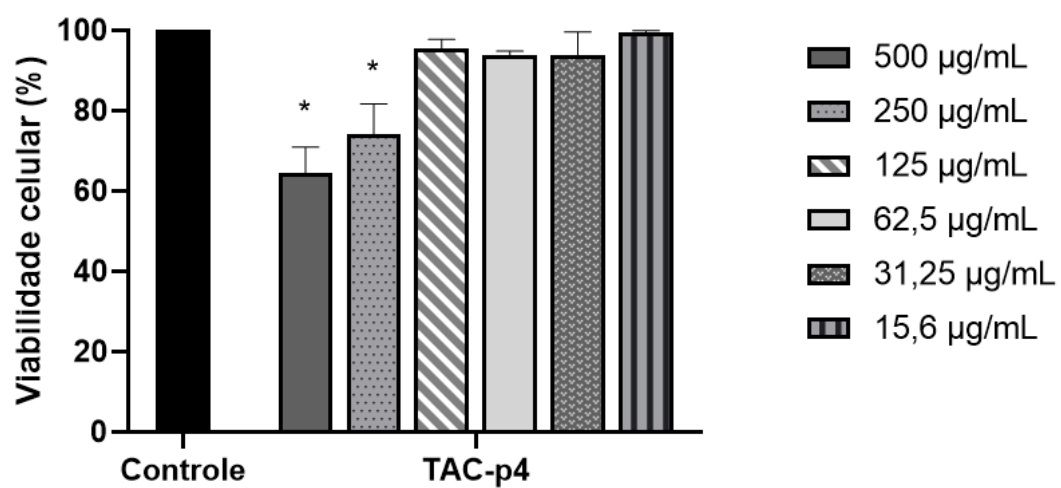
**Figura 3.** Atividade hemolítica dos peptídeos TAC-p1 e TAC-p4 contra células vermelhas de camundongos.



**Figura 4.** Viabilidade celular de células L929 (fibroblastos murinos) tratadas com diferentes concentrações do peptídeo TAC-p1. Controle: célula não tratada. \*P < 0,05 quando comparado ao controle.



**Figura 5.** Viabilidade celular de células L929 (fibroblastos murinos) tratadas com diferentes concentrações do peptídeo TAC-p4. Controle: célula não tratada. \*P < 0,05 quando comparado ao controle.



## **REIVINDICAÇÕES**

1) ANTIBACTERIANO A BASE DOS PEPTÍDEOS TAC-p1 (RRWFRWWR) E TAC-p4 (AKWRVKWW) PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Pseudomonas aeruginosa*, **caracterizado por** seu efeito antibacteriano e uso no tratamento de infecções ocasionadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

2) ANTIBACTERIANO A BASE DOS PEPTÍDEOS TAC-p1 (RRWFRWWR) E TAC-p4 (AKWRVKWW) PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Pseudomonas aeruginosa*, conforme a reivindicação 1, **caracterizado por** apresentar atividade antibacteriana com concentração inibitória mínima de 125 µg/mL para TAC-p1 e de 250 µg/mL para TAC-p4, quando utilizados isoladamente.

3) ANTIBACTERIANO A BASE DOS PEPTÍDEOS TAC-p1 (RRWFRWWR) E TAC-p4 (AKWRVKWW) PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Pseudomonas aeruginosa*, conforme a reivindicação 1, **caracterizado por** apresentar atividade antibiofilme de até 90% nas concentrações > 62,5 µg/mL para TAC-p1 e > 125 µg/mL para TAC-p4, quando utilizados isoladamente.

4) ANTIBACTERIANO A BASE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE TAC-p1(RRWFRWWR) E MEROPENEM PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Pseudomonas aeruginosa*, **caracterizado por** apresentar concentração inibitória mínima de 0,02 µg/mL para MEROPENEM e 31,25 µg/mL para TAC-p1, quando utilizados combinados.

5) ANTIBACTERIANO A BASE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE TAC-p4(AKWRVKWW) E MEROPENEM PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Pseudomonas aeruginosa*, **caracterizado por** apresentar concentração inibitória mínima de 0,04 µg/mL para MEROPENEM e 62,5 µg/mL para TAC-p4, quando utilizados combinados.

6) ANTIBACTERIANO A BASE DO PEPTÍDEO TAC-p1 (RRWFRWWR) E MEROPENEM PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR

*Pseudomonas aeruginosa*, conforme a reivindicação 1, 2 e 3, **caracterizado por**, quando combinados, TAC-p1 e MEROPENEM apresentam efeito sinérgico.

7) ANTIBACTERIANO A BASE DO PEPTÍDEO TAC-p4 (AKWRVKWW) E MEROPENEM PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Pseudomonas aeruginosa*, conforme a reivindicação 1, 2 e 4, **caracterizado por**, quando combinados, TAC-p4 e MEROPENEM apresentam efeito sinérgico.

8) ANTIBACTERIANO A BASE DOS PEPTÍDEOS TAC-p1 (RRWFRWWR) E TAC-p4 (AKWRVKWW) PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Pseudomonas aeruginosa*, **caracterizado por** manter a viabilidade celular acima de 70% quando expostos a concentrações inferiores a 62,5 µg/mL (TAC-p1) e 250 µg/mL (TAC-p4).

9) ANTIBACTERIANO A BASE DOS PEPTÍDEOS TAC-p1 (RRWFRWWR) E TAC-p4 (AKWRVKWW) PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Pseudomonas aeruginosa*, **caracterizado por** apresentar atividade hemolítica abaixo de 20% em concentrações inferiores a 250 µg/mL.

10) ANTIBACTERIANO A BASE DOS PEPTÍDEOS TAC-p1 (RRWFRWWR) E TAC-p4 (AKWRVKWW) PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Pseudomonas aeruginosa*, conforme a reivindicação 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, **caracterizado por** uso como antibacteriano através das seguintes vias de administração: via oral, sublingual, parenteral, cutânea, nasal, oftálmica, auricular, pulmonar, vaginal e retal;

11) ANTIBACTERIANO A BASE DOS PEPTÍDEOS TAC-p1 (RRWFRWWR) E TAC-p4 (AKWRVKWW) PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Pseudomonas aeruginosa*, conforme a reivindicação 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, **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.

[Pesquisa em documentos de patentes e outras publicações técnicas]

NOME DO PESQUISADOR (Gestor do Projeto): **Daiane Drawanz Hartwig**

Nº DO PROJETO:

UNIDADE / ÁREA: **Instituto de Biologia/Ciências Biológicas III**

**OBJETO DA PESQUISA:** Uso dos peptídeos sintéticos TAC-p1 e TAC-p4 como agentes antibacterianos contra *Pseudomonas aeruginosa*.

**PROJETO:** PREDIÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs) CONTRA *Pseudomonas aeruginosa* MULTIRRESISTENTE: UM ESTUDO *IN SILICO* E *IN VIVO*.

**BANCO E BASE DE DADOS: INPI** - (<http://www.inpi.gov.br/>)

PALAVRAS-CHAVE 01 / Nº DE DOCUMENTOS LOCALIZADOS:

*Pseudomonas aeruginosa* X RRWFRWWR X ANTIBACTERIANO / 0 incidências

PALAVRAS-CHAVE 02 / Nº DE DOCUMENTOS LOCALIZADOS:

*Pseudomonas aeruginosa* X AKWRVKWW X ANTIBACTERIANO / 0 incidências

**BANCO E BASE DE DADOS: Google Patents** - ([www.google.com/patents](http://www.google.com/patents))

PALAVRAS-CHAVE 01 / Nº DE DOCUMENTOS LOCALIZADOS

*Pseudomonas aeruginosa* X RRWFRWWR X ANTIBACTERIAL / 0 incidências

PALAVRAS-CHAVE 02 / Nº DE DOCUMENTOS LOCALIZADOS:

*Pseudomonas aeruginosa* X AKWRVKWW X ANTIBACTERIAL / 0 incidências

**BANCO E BASE DE DADOS: USPTO (EUA)** - (<https://ppubs.uspto.gov/pubwebapp/>)

PALAVRAS-CHAVE 01 / N° DE DOCUMENTOS LOCALIZADOS:

*Pseudomonas aeruginosa* X RRWFRWWR X ANTIBACTERIAL / 0 incidências

PALAVRAS-CHAVE 02 / N° DE DOCUMENTOS LOCALIZADOS:

*Pseudomonas aeruginosa* X AKWRVKWW X ANTIBACTERIAL / 0 incidências

**BANCO E BASE DE DADOS: ESPACENET (EUROPA)** (<http://worldwide.espacenet.com/>)

PALAVRAS-CHAVE 01 / N° DE DOCUMENTOS LOCALIZADOS:

*Pseudomonas aeruginosa* X RRWFRWWR X ANTIBACTERIAL / 0 incidências

PALAVRAS-CHAVE 02 / N° DE DOCUMENTOS LOCALIZADOS:

*Pseudomonas aeruginosa* X AKWRVKWW X ANTIBACTERIAL / 0 incidências

**BANCO E BASE DE DADOS: WIPO** - (<https://patentscope.wipo.int/search/pt/search.jsf>)

PALAVRAS-CHAVE 01 / N° DE DOCUMENTOS LOCALIZADOS:

*Pseudomonas aeruginosa* X RRWFRWWR X ANTIBACTERIANO / 0 incidências

PALAVRAS-CHAVE 02 / N° DE DOCUMENTOS LOCALIZADOS:

*Pseudomonas aeruginosa* X AKWRVKWW X ANTIBACTERIANO / 0 incidências

**AVISO IMPORTANTE**

A busca de anterioridade é uma amostragem e não verifica os documentos de patentes que estão em período de sigilo a partir da data de pedido de depósito, nos escritórios oficiais, que é de 18 meses. Portanto se algum documento similar ou igual estiver no período de sigilo, vale o recurso para o primeiro depositante. Além do que foi exposto anteriormente, a busca prévia não garante a abrangência do campo de pesquisa bibliográfica na totalidade da literatura técnica publicada no mundo.

## RESULTADO DAS PESQUISAS

Segundo sua pesquisa, foi encontrada anterioridades? ☒ Não ☐ Sim

Caso tenham sido encontradas anterioridades, preencha a tabela a seguir com as informações solicitadas.

Nºda Patente	Descrição	Base	Classificação Internacional

Você teve orientação para realizar a pesquisa de anterioridade? ☒ Sim ☐ Não

Especificar: CURSO

A unidade ou inventor tem interesse em patentear o invento? ☒ Sim ☐ Não

Existe alguma empresa interessada no projeto? ☐ Sim ☒ Não

### NOTA EXPLICATIVA DO RESULTADO DA PESQUISA:

A busca de anterioridade foi baseada em palavras chaves relacionada ao objeto de pesquisa,

Déborah Trota Farias de Albernaz

Daiane Drawanz Hartwig

--	--

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

Daiane Drawanz Hartwig; Deborah Trota Farias de Albernaz; Suzane Olachea Allend; Amilton Clair Pinto Seixas Neto; Danillo de Oliveira Della Senta; Frederico Schmitt Kremer; Luciano da Silva Pinto.

### **USO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS TAC-P1 E TAC-P4 NA FORMULAÇÃO DE MEDICAMENTOS ANTIBACTERIANOS CONTRA *Pseudomonas aeruginosa*.**

nº de sequencias no documento:

Seq ID número 1:

Sequência de aminoácidos

RRWFRWWR

Seq ID número 2:

Sequência de aminoácidos

AKWRVKWW