

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CAMPUS DE ARARAQUARA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Síntese, caracterização e estudos da atividade biológica de peptídeos antimicrobianos derivados de Leucocinas TA33a

JESSELEINE CRISTINE MONTEIRO DA SILVA

Araraquara  
2017

JESSELEINE CRISTINE MONTEIRO DA SILVA

Síntese, caracterização e estudos da atividade biológica de peptídeos antimicrobianos derivados de Leucocinas TA33a

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Orientador: Saulo Santesso Garrido

Araraquara  
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

S586s Silva, Jesseleine Cristine Monteiro da  
Síntese, caracterização e estudos da atividade biológica de  
peptídeos antimicrobianos derivados de Leucocinas TA33a /  
Jesseleine Cristine Monteiro da Silva. –  
Araraquara : [s.n.], 2017  
73 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química

Orientador: Saulo Santesso Garrido

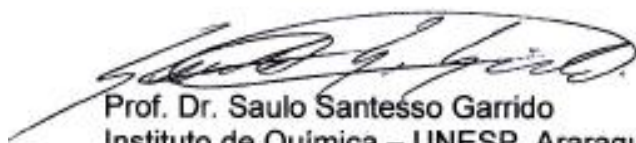
1. Peptídeos catiônicos antimicrobianos. 2. Bacteriocinas.  
3. Alimentos-Contaminação. 4. Alimentos-Conservação.  
5. Bactérias produtoras de ácido láctico. I. Título.

JESSELEINE CRISTINE MONTEIRO DA SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 06 de setembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Profa. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara – SP



Prof. Dr. Wilton Rogério Lustrí  
Universidade de Araraquara - UNIARA, Araraquara – SP

## DADOS CURRICULARES

### IDENTIFICAÇÃO

Nome: Jesseleine Cristine Monteiro da Silva

Nome em citações bibliográficas: SILVA, J. C. M.; Monteiro da Silva, J. C.

### ENDEREÇO PROFISSIONAL

UNESP-Instituto de Química (IQ - UNESP)

Rua Prof. Francisco Degni, 55, Araraquara -SP- Brasil - CEP:14800060

### FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2015

Mestrado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Orientador: Saulo Santesso Garrido.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

2010-2014

Graduação em Biomedicina

Universidade Federal do Triângulo Mineiro. UFTM, Brasil

### FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2013-2013

Extensão universitária em Liga de Diabetes da UFTM. (Carga Horária: 180h).

Universidade Federal do Triângulo Mineiro, UFTM, Brasil.

2012-2013

Extensão universitária em Liga de Hipertensão Arterial - LHA. (Carga Horária: 180h). Universidade Federal do Triângulo Mineiro, UFTM, Brasil.

### PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigo de revisão publicado

SANTOS-VAZ, A. B.; **SILVA, J. C. M.**; GARRIDO, S. S. Antimicrobial peptides: a new alternative for food preservation. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, volume 5, issue 3, 2016.

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

**SILVA, J. C. M.**; MENDONÇA, R. J. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE UMA FRAÇÃO OBTIDA DO LÁTEX DA SERINGUEIRA *HEVEA BRASILIENSIS* EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE EM CAMUNDONGOS. In: XXII Jornada de Iniciação Científica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2014, UBERABA. Anais da XXII Jornada de Iniciação Científica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. 2014

Apresentação de trabalhos e/ou palestra

**SILVA, J. C. M.;** VAZ, A. B. S.; ZAMBOM, C. R.; CRUZ, C. Z. P.; MONTI, R.; GARRIDO, S. S. Atividade antimicrobiana e antioxidante do peptídeo LeuB contra *Salmonella* sorovar Typhimurium e *Escherichia coli*. 2016, (Apresentação de Trabalho/Congresso)

VAZ, A. B. S.; **SILVA, J. C. M.;** ZAMBOM, C. R.; GARRIDO, S. S. Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Peptídeo LeuAB-2: Um Promissor Conservante de Alimentos. 2016, (Apresentação de Trabalho/Congresso)

ZAMBOM, C. R.; GARRIDO, S. S.; **SILVA, J. C. M.;** VAZ, A. B. S.; CHORILLI, M.; SILVA, P. B. Desenvolvimento e caracterização de lipossomas de diferentes composições lipídicas contendo o peptídeo antifúngico Histatina-5. 2016, (Apresentação de Trabalho/Congresso)

**SILVA, J. C. M.;** VAZ, A. B. S.; ZAMBOM, C. R.; GARRIDO, S. S. EFFECT OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE LEUCOCIN B FREE AND ENCAPSULATED AGAINST *SALMONELLA TYPHIMURIUM*. 2016, (Apresentação de Trabalho/Simpósio)

**Monteiro da Silva, J. C.;** SOUSA, B. C.; OLIVEIRA, C. J. F.; MENDONCA, R. J. Antiinflammatory activity of a fraction obtained from *Hevea brasiliensis* on experimental colitis in mice. 2015, (Apresentação de Trabalho/Congresso)

**SILVA, J. C. M.;** SOUSA, B. C.; ALMEIDA, Y. F.; MENDONCA, R. J.; OLIVEIRA, C. J. F. Estudo da atividade anti-inflamatória de uma fração obtida do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* em um modelo experimental de colite em camundongos. 2014, (Apresentação de Trabalho/Outra)

**SILVA, J. C. M.;** SOUSA, B. C.; ALMEIDA, Y. F.; OLIVEIRA, C. J. F.; MENDONCA, R. J. Estudo da atividade anti-inflamatória de uma fração obtida do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* em um modelo experimental de colite em camundongos. 2014, (Apresentação de Trabalho/Outra)

#### PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1° Workshop de Inovação e Empreendedorismo do Instituto de Química - Unesp. 2016. (Outra)

7th International Symposium of Graduate and Research (SINPOSPq). EFFECT OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE LEUCOCIN B FREE AND ENCAPSULATED AGAINST *SALMONELLA TYPHIMURIUM*. 2016. (Simpósio)

Course Oratory: 7th International Symposium of Graduate and Research (SINPOSPq). 2016. (Simpósio)

Course Statistic: 7th International Symposium of Graduate and Research (SINPOSPq). 2016. (Simpósio)

VI Congresso Científico da Unesp e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Atividade antimicrobiana e antioxidante do peptídeo LeuB contra *Salmonella* sorovar Typhimurium e *Escherichia coli*. 2016. (Congresso)

23rd International Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY OF A FRACTION

OBTAINED FROM *HEVEA BRASILIENSIS* ON EXPERIMENTAL COLITIS IN MICE. 2015. (Congresso)

Minicurso: o Biomédico no local do crime. 2014. (Outra)

XI Encontro Mineiro de Biomedicina. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATORIA DE UMA FRAÇÃO OBTIDA DO LÁTEX DA SERINGUEIRA *HEVEA BRASILIENSIS* EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE EM CAMUNDONGOS. 2014. (Outra)

I Simpósio e I Curso Introdutório à Liga Acadêmica de Fisiologia Endócrina. 2013. (Simpósio)

Curso de Perícia Criminal (Toxicologia Forense). 2012. (Simpósio)

IX Encontro Mineiro de Biomedicina. 2012. (Encontro)

Minicurso Células tronco: características gerais e perspectivas científicas. 2012. (Outra)

X Simpósio e Curso Introdutório da Liga de Hipertensão Arterial. 2012. (Simpósio)

XI Curso Introdutório da Liga de Geriatria e Gerontologia. 2012. (Simpósio)

I Jornada de Microbiologia. 2011. (Simpósio)

PRONE - Insuficiência Cardíaca e Morte Súbita. 2011. (Simpósio)

X Curso Introdutório à Liga de Geriatria e Gerontologia. 2011. (Simpósio)

II Curso Introdutório às Práticas Biomédicas. 2010. (Oficina)

Minicurso Química Forense. 2010. (Outra)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por essa longa jornada, aos meus pais que me deram a vida e que me ensinaram a ser quem eu sou hoje. Obrigada pelo amor, carinho, dedicação e apoio em todas as minhas decisões e escolhas, mesmo passando por esses momentos tão difíceis em que estamos vivendo.

Ao meu orientador Saulo, que me acolheu, ajudou, ensinou e orientou.

Ao meu namorado que esteve ao lado desde o primeiro dia desta etapa, sempre me dando forças, alegria e suportando os meus momentos de preocupações e desespero. Agradeço pelo companheirismo, atenção e amor.

Aos meus amigos de longa data, que permaneceram presentes em minha vida mesmo com a distância e com a falta de tempo e compromissos de cada um.

Aos meus novos colegas da salinha, que puderam me ajudar, dar conselhos, ensinar e tornaram essa fase complicada da pós-graduação muito mais tranquila e divertida.

Ao Instituto de Química pela estrutura, técnicos pelo auxílio nos equipamentos e funcionários pelas informações sobre os prazos, documentações e referências, que de alguma forma contribuíram para a realização do Mestrado.

Ao órgão financiador, CNPq, pela concessão da bolsa.



"Que vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível."

Charles Chaplin

## RESUMO

Devido ao crescente aumento de doenças transmitidas por alimentos, a segurança microbiológica se torna uma questão de saúde pública pelas suas características de endemicidade, alta morbidade e pela dificuldade da adoção de medidas de controle desses microrganismos. Diante deste fato, o objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar os análogos peptídicos LeuB e LeuC-1 derivados de bacteriocinas naturais denominadas Leucocinas. Os peptídeos foram sintetizados manualmente pelo método de síntese em fase sólida, submetidos à desproteção total e clivagem, com liberação dos peptídeos brutos. Foram realizadas as análises comparativas usando HPLC e ESI-MS, e com os respectivos peptídeos puros foram feitos os ensaios antimicrobiano, enzimático, permeabilização, antioxidante, hemolítico e de espectroscopia de dicroísmo circular. Com isso, observou-se que o método de síntese dos análogos foi adequado e o processo de purificação possibilitou a obtenção dos peptídeos com alto grau de pureza. O peso molecular teórico dos peptídeos foi confirmado por espectrometria de massas. O LeuB apresentou uma maior capacidade em inibir o crescimento de *Escherichia coli* O157:H7 e em *Salmonella* sorovar Typhimurium, enquanto que LeuC-1 apresentou efeito de inibição de crescimento de *Listeria monocytogenes* e também de *S. sorovar Typhimurium*. É importante destacar que todas essas bactérias são de interesse na área de alimentos, já que são as causadoras da maioria dos casos de infecção alimentar. O ensaio de inibição enzimática com DNA girase e Topoisomerase IV mostrou que apenas o peptídeo LeuB possui capacidade de inibição destas enzimas bacterianas, sugerindo um possível mecanismo de ação deste derivado de Leucocina. Este peptídeo também apresentou a capacidade de permeabilizar miméticos de membrana bacteriana composto de POPC/POPG (75/25). Por sua vez, o peptídeo LeuC-1 não apresentou capacidade significativa de inibição da atividade das enzimas DNA girase e Topoisomerase IV e também não apresentou capacidade de permeabilização de miméticos de membrana. Porém, LeuC-1 apresentou uma boa atividade antioxidante, obtida pelo método de ABTS. Ambos os peptídeos apresentaram baixa toxicidade em eritrócitos, comprovadas pelos ensaios hemolíticos. Estruturalmente, os peptídeos LeuB e LeuC-1 tendem a se estruturar em  $\alpha$ -hélice. Assim sendo, este trabalho possibilitou a obtenção de dois peptídeos com potencial de aplicação como conservantes alimentares a partir de mecanismos distintos de ação sem apresentar citotoxicidade para células vermelhas do sangue. LeuB possui uma suposta atuação como inibidor de topoisomerasas bacterianas e capacidade de permeabilização de miméticos de membrana. LeuC-1 possivelmente atua em diferentes vias metabólicas da bactéria, porém ainda não foi possível elucidar o mecanismo alvo deste mimético peptídico.

**Palavras-chave:** Peptídeos catiônicos antimicrobianos. Bacteriocinas. Alimentos-Contaminação. Alimentos-Conservação. Bactérias produtoras de ácido láctico.

## ABSTRACT

Due to the increase of foodborne diseases, microbiological safety becomes a public health issue due to its characteristics of endemicity, high morbidity and the difficulty of adopting control measures of these microorganisms. In view of this fact, the objective of this work was to synthesize and characterize LeuB and LeuC-1 peptidic analogues derived from natural bacteriocins called Leucocins. The peptides were synthesized manually by the solid phase synthesis method, subjected to total deprotection and cleavage, with release of the crude peptides. Comparative analyzes were performed using HPLC and ESI-MS, and with the respective pure peptides the antimicrobial, enzymatic, permeabilization, antioxidant, hemolytic and circular dichroism spectroscopy. With this, it was observed that the method of synthesis of the analogs was adequate and the purification process allowed to obtain the peptides with high purity. The theoretical molecular weight of the peptides was confirmed by mass spectrometry. LeuB showed a greater capacity to inhibit the growth of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* serovar Typhimurium, whereas LeuC-1 presented inhibition effect of growth of *Listeria monocytogenes* and also of *S. serovar Typhimurium*. It is important to highlight that all these bacteria are interesting in the area of food, since they are the cause of most cases of food infection. The enzyme inhibition assay with DNA gyrase and Topoisomerase IV showed that only the LeuB peptide has the ability to inhibit these bacterial enzymes, suggesting a possible mechanism of action of this Leucocin derivative. This peptide also showed the ability to permeabilize bacterial membrane mimetics composed of POPC/POPG (75/25). On the other hand, the LeuC-1 peptide did not present significant capacity to inhibit the activity of the enzymes DNA gyrase and Topoisomerase IV and also did not present permeabilization capacity of membrane mimetics. However, LeuC-1 presented a good antioxidant activity, obtained by the ABTS method. Both peptides had low erythrocyte toxicity, as demonstrated by hemolytic assays. Structurally, the LeuB and LeuC-1 peptides tend to be  $\alpha$ -helix structured. Therefore, this work enabled two peptides with application potential as food preservatives to be obtained from distinct mechanisms of action without presenting red blood cell cytotoxicity. LeuB has a supposed action as inhibitor of bacterial topoisomerases and permeabilization capacity of membrane mimetics. LeuC-1 possibly acts on different metabolic pathways of the bacterium, but it has not yet been possible to elucidate the target mechanism of this peptidic mimetic.

**Keywords:** Antimicrobial cationic peptides. Bacteriocins. Food-Contamination. Food-Preservation. Bacteria producing lactic acid.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Série histórica de surtos e doentes por DTAs, no Brasil, de 2007 a 2017*.	17
Figura 2 -	Esquema da SPFS. Os círculos vermelhos representam o protetor do grupo amina. Já os círculos rosa e verde representam os diferentes protetores de cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais (AA).	25
Figura 3 -	A) Estrutura primária dos peptídeos Leucocinas B-TA33a e C-TA33a. B) Peptídeos projetados para serem sintetizados: LeuB corresponde à Leucocina B-TA33a em sua íntegra e LeuC-1 corresponde a um derivado estrutural da Leucocina C-TA33a.	34
Figura 4 -	Inibição da atividade de superenovelamento do DNA pelo LeuB. Volume de reação de 30 $\mu$ L contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 relaxado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 relaxado e DNA girase (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBR322 relaxado, DNA girase (1U) e LeuB. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50 $\mu$ mol/L, respectivamente.	44
Figura 5 -	Inibição da atividade de superenovelamento do DNA pelo LeuC-1. Volume de reação de 30 $\mu$ L contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 relaxado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 relaxado e DNA girase (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBR322 relaxado, DNA girase (1U) e LeuC-1. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50 $\mu$ mol/L, respectivamente.	44
Figura 6 -	Inibição da atividade de relaxamento do DNA pelo LeuB. Volume de reação de 30 $\mu$ L contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 superenovelado e Topoisomerase IV (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, Topoisomerase IV (1U) e LeuB. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50 $\mu$ mol/L, respectivamente.	45
Figura 7 -	Inibição da atividade de relaxamento do DNA pelo LeuC-1. Volume de reação de 30 $\mu$ L contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 superenovelado e Topoisomerase IV (1U) na ausência de inibidor; (linha B) plasmídeo pBr322 superenovelado controle (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, Topoisomerase IV (1U) e LeuC-1. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50 $\mu$ mol/L, respectivamente.	46
Figura 8 -	Espectro de CD característicos das estruturas secundárias $\alpha$ -hélice, folha $\beta$ e estrutura randômica.	55
Figura 9 -	Espectros de CD dos peptídeos LeuB e LeuC-1 a 60 $\mu$ M em (A) TFE, (B) SDS e (C) solução aquosa.	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estrutura primária dos peptídeos sintetizados.	24
Tabela 2 -	Massas de peptidil-resinas de cada um dos análogos sintetizados.	35
Tabela 3 -	Massas moleculares teóricas e obtidas por espectroscopia de massas dos peptídeos LeuB e LeuC-1.	36
Tabela 4 -	Pureza relativa após o processo de purificação dos análogos da Leucocina.	37
Tabela 5 -	Porcentagem de redução do radical ABTS pelos peptídeos a 200 $\mu$ M.	52
Tabela 6 -	Porcentual de atividade hemolítica para os análogos LeuB e LeuC-1.	53

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Perfis cromatográficos obtidos por HPLC, em escala analítica, para o análogo peptídico LeuB, antes (A) e após a purificação (B).	35
Gráfico 2 -	Perfis cromatográficos obtidos por HPLC, em escala analítica, para o análogo peptídico LeuC-1, antes (A) e após a purificação (B).	36
Gráfico 3 -	Porcentagem de inibição de crescimento de <i>S. aureus</i> pelos peptídeos LeuC-1 e LeuB.	38
Gráfico 4 -	Porcentagem de inibição de crescimento de <i>L. monocytogenes</i> pelos peptídeos LeuC-1 e LeuB.	39
Gráfico 5 -	Porcentagem de inibição de crescimento de <i>E. coli</i> O157:H7 pelos peptídeos LeuC-1 e LeuB.	39
Gráfico 6 -	Porcentagem de inibição de crescimento de <i>S. sorovar Typhimurium</i> pelos peptídeos LeuC-1 e LeuB.	40
Gráfico 7 -	Efeito dos peptídeos LeuB e LeuC-1 no crescimento de <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> O157:H7 e <i>S. sorovar Typhimurium</i> .	42
Gráfico 8 -	Permeabilização de LUVs de POPC/POPG (75/25) pelo peptídeo LeuB.	48
Gráfico 9 -	Permeabilização de LUVs de POPC/POPG (75/25) pelo peptídeo LeuC-1.	48
Gráfico 10 -	Atividade antioxidante equivalente ao Trolox pelo método ABTS para os peptídeos LeuB e LeuC-1 a 200 µM.	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### 1. Aminoácidos

A – Alanina  
C – Cisteína  
F – Fenilalanina  
G - Glicina  
H – Histidina  
I – Isoleucina  
K - Lisina  
L – Leucina  
N – Asparagina  
P – Prolina  
Q – Glutamina  
R - Arginina  
S – Serina  
T – Treonina  
V – Valina  
W - Triptofano  
Y – Tirosina

### 2. Outras

ABTS - ácido [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)]  
ACN - Acetonitrila  
BAL - Bactérias ácido lácticas  
BHA - Butil-hidroxi-anisol  
BHT - Butil-hidroxi-tolueno  
CD - Circular dichroism (espectrometria de dicroísmo circular)  
CF - Carboxifluoresceína  
CMH - Caldo Muller Hinton  
DCM - Diclorometano  
DIC - N,N-diisopropilcarbodiimida  
DIEA - N-Etildiisopropilamina  
DMF - N,N – Dimetilformamida  
DO<sub>620</sub> - Densidade óptica a 620 nm  
DTAs - Doenças transmitidas por alimentos  
EDT - 1, 2-Etanoditiol  
EDTA - Ácido etileno-diamino-tetra-acético  
EFSA - Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos (European Food Safety Authority)  
Fmoc - 9- Fluorenilmetiloxicarbonila  
GRAS - Geralmente reconhecido como seguro (generally recognized as safe)  
HBTU - (O-Benzotriazolil-N,N,N',N'-tetrametiluronio-hexafluorofosfato)  
HOBt - N-Hidroxibenzotriazol  
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography)  
IC<sub>100</sub> - Concentração Inibitória de 100% (100% inhibitory concentration)  
LC/ESI-MS - Cromatografia Líquida de Fase Reversa acoplada a Espectrometro de Massas com Ionização por Eletrospray (Liquid Chromatography coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry)

LUVs - Vesículas unilamelares grandes (Large unilamellar vesicles)  
Man-PTS - Manose-fosfotransferase  
Mcc - Microcina  
MLVs - Vesículas multilamelares (Multilamellar vesicles)  
MS - Ministério da Saúde  
PAMs - Peptídeos antimicrobianos  
PBS - Tampão fosfato salino  
PG - Propil-galato  
POPC - 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina  
POPG - 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilglicerol  
SDS - Docecil Sulfato de Sodio  
SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação  
SPFS - Síntese de Peptídeos em Fase Sólida  
SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde  
TA - Sistema toxina-antitoxina  
TBHQ – Terc-butilhidroquinona  
tBu - terc-Butila  
TEAC - Capacidade antioxidante equivalente de Trolox  
TFA - Ácido Trifluoroacético  
TFE - 2,2,2-trifluoretanol  
TIS - Triisopropilsilano  
Trt - Tritila  
UFLC - Cromatografia Líquida Ultra Rápida (Ultra-Fast Liquid Chromatography)  
UV-Vis - Ultravioleta Visível



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1	Doenças transmitidas por alimentos (DTAs)	16
1.2	Bacteriocinas	18
1.2.1	Classificação das bacteriocinas	19
1.2.2	Mecanismo de ação	19
1.2.3	Bacteriocinas na conservação de alimentos	21
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>23</b>
3.1	Sínteses dos peptídeos	23
3.2	Purificação e caracterização dos peptídeos sintetizados	25
3.2.1	Escala Analítica	26
3.2.2	Escala Semi-preparativa	26
3.3	Ensaio de inibição do crescimento microbiano	27
3.3.1	Ensaio de microdiluição em placas	27
3.3.2	Ensaio de Time-Kill	28
3.4	Ensaio de inibição enzimática	28
3.4.1	DNA girase	28
3.4.2	Topoisomerase IV	30
3.5	Vazamento de carboxifluoresceína	30
3.6	Estudo da atividade antioxidante	31
3.7	Ensaio de toxicidade dos peptídeos: estudos de atividade hemolítica	32
3.8	Dicroísmo Circular	33
3.9	Análise Estatística	33
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>33</b>
4.1	Síntese, purificação e caracterização dos análogos peptídicos	33
4.2	Ensaio de inibição do crescimento microbiano	37
4.3	Ensaio de inibição enzimática	42
4.4	Vazamento de carboxifluoresceína	47
4.5	Ensaio antioxidante	49
4.6	Ensaio de toxicidade dos peptídeos: atividade hemolítica	52
4.7	Dicroísmo Circular	54
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>57</b>
	PERSPECTIVAS FUTURAS	58
	REFERÊNCIAS	59

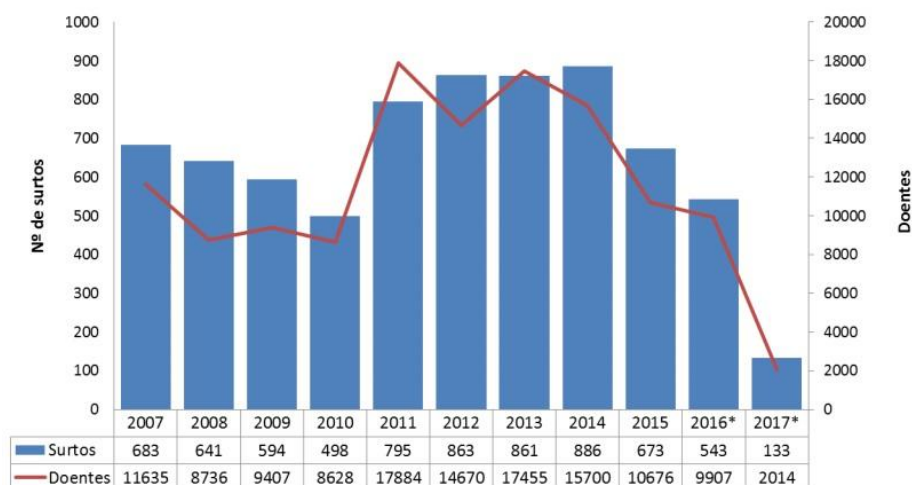
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doenças transmitidas por alimentos (DTAs)

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são um problema para a saúde pública global, em que a severidade da doença pode variar de sintomas moderados para uma ameaça a saúde dos seres humanos (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2011). É uma síndrome atribuída à ingestão de água ou alimentos contaminados que apresenta como sinais e sintomas: vômitos e/ou diarreia; náuseas; anorexia; acompanhada ou não de febre; mas que também pode manifestar afecções extraintestinais em diferentes sistemas e órgãos, dependendo do agente etiológico envolvido. Essas infecções podem ser causadas por: toxinas produzidas pelas bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *Bacillus cereus*, entre outras; bactérias como *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., etc.; vírus como rotavírus e norovírus; parasitas, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, etc; e substâncias tóxicas como os agrotóxicos, metais pesados, etc. (BRASIL, 2010).

De acordo com dados atuais do Ministério da Saúde (MS)/Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) os principais agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DTAs de 2007 a 2017 (2016 e 2017: dados sujeitos a atualização) no Brasil, mostraram 70,6% das causas de agentes não identificados. Entre os agentes etiológicos identificados nos surtos se encontra 95,9% causado por bactérias, como, *E. coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *B. cereus*, Coliformes e *Clostridium perfringens*, 7,7% foram causados por vírus como rotavírus, norovirus e vírus da hepatite A, 1,8% por agentes químicos e 1,2% por protozoários. A região mais afetada no Brasil foi a Sudeste. Os dados referentes ao número de surtos e de doentes neste período está representado na Figura 1, em que é possível identificar os maiores valores entre os anos de 2011 e 2014 (BRASIL, 2017). Além desses microrganismos, a *E. coli* O157:H7 é responsável por causar manifestações severas (BRASIL, 2010), bactéria de grande preocupação em alimentos refrigerados (LEE et al., 2003).

**Figura 1** - Série histórica de surtos e doentes por DTAs, no Brasil, de 2007 a 2017\*.



\*2016 e 2017: Dados sujeitos a atualização.

**Fonte:** Brasil (2017).

Nos Estados Unidos, a cada ano, 31 patógenos são responsáveis por causar 9,4 milhões de episódios de doenças transmitidas por alimentos, 55.961 internações, e 1.351 mortes. Segundo os dados obtidos principalmente de 2000-2008, estima-se que norovírus, *Salmonella* spp., *C. perfringens* e *Campylobacter* spp. foram as causas das doenças, enquanto *Salmonella* spp. não-tifóide, norovírus, *Campylobacter* spp. e *Toxoplasma gondii* causaram a maior parte das hospitalizações e, por sua vez, *Salmonella* spp. não tifóide, *T. gondii*, *Listeria monocytogenes*, e norovírus foram responsáveis pela maioria das mortes (SCALLAN et al., 2011). No ano de 2015, em 26 países da Europa foram reportados 4.362 surtos de DTAs, 45.874 doenças, 3.892 hospitalizações, e 17 mortes. Dentre as principais causas estão as bactérias com 33,7%, em particular a *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. com 21,8% e 8,9%, respectivamente. Em seguida, vem as toxinas bacterianas com 19,5%, vírus com 9,2%, e parasitas e outros agentes causadores com menos de 3% do total de surtos (EUROPEAN..., 2016). Diante deste cenário preocupante, é de fundamental importância proteger o alimento e a saúde do consumidor, adotando boas técnicas de conservação alimentar.

Muitas tecnologias para a preservação de alimentos vem sendo desenvolvidas a fim de diminuir o número de contaminação e aumentar o tempo de prateleira dos alimentos. Uma que vem atraindo atenções por também minimizar o impacto sobre as propriedades organolépticas e nutricionais dos alimentos perecíveis, é a biopreservação (GARCÍA et al., 2010). A biopreservação é um método de conservação por meio do uso do microrganismo ou seus produtos metabólicos

(GARCÍA et al, 2010; SCHILLINGER; GEISEN; HOLZAPFEL,1996). Na indústria de alimentos, um produto que possui potencial na biopreservação são as bacteriocinas, que podem estar ou não combinadas com outros métodos de preservação (CHEN; HOOVER, 2003; PEREZ; ZENDO; SONOMOTO, 2014). As bacteriocinas são peptídeos com efeito antimicrobiano naturalmente produzidos por algumas espécies de microrganismos. Esta classe de peptídeos vem surgindo como uma alternativa interessante para biopreservação de alimentos, já que não são considerados tóxicos aos seres humanos, podem reduzir ou evitar o uso de conservantes químicos nos alimentos, são altamente específicos quanto ao seu modo de ação no microrganismo alvo e podem ser aplicados conjuntamente com outros agentes antimicrobianos.

## 1.2 Bacteriocinas

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos (PAMs) sintetizados no ribossomo, principalmente, de bactérias ácido lácticas (BALs) que são um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas, ácido tolerantes, anaeróbias facultativas, que possuem como uma propriedade metabólica comum a produção de ácido láctico como produto final da fermentação de carboidratos (CHEN et al., 1997; FLEURY et al., 1996; KLAENHAMMER, 1993; MOZZI; RAYA; VIGNOLO, 2015; NISSEN-MEYER; NES, 1997).

Como exemplo de BALs produtoras de bacteriocinas, encontramos as bactérias *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Leuconostoc* spp., capazes de matar ou inibir outras espécies bacterianas pela formação de poros na membrana celular ou inibindo a síntese da membrana celular (MILLS et al., 2011a; O'SHEA et al., 2013; WAN; SARIS; TAKALA, 2015). Essas bacteriocinas produzidas por BALs são agentes promissores contra microrganismos patogênicos geralmente presentes naturalmente nos alimentos. Dessa forma, podem atuar na preservação de alimentos já que esses compostos de origem natural, são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS – “generally recognized as safe”) (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; CHALÓN et al., 2012; GÁLVEZ et al., 2007; PEDERSEN et al., 2005), não são tóxicos para células eucarióticas, geralmente são estáveis em diferentes valores de pH e são relativamente termoestáveis (GÁLVEZ et al., 2007).

### 1.2.1 Classificação das bacteriocinas

Vários esquemas foram sugeridos ao longo dos anos para classificar as bacteriocinas de BALs. Uma nova classificação foi sugerida por Cotter, Ross e Hill (2013) em que as bacteriocinas são agrupadas em dois grupos principais: classe I, são aquelas que passam por modificações pós-traducionais e as de classe II, que não são amplamente modificadas ou passam por discretas modificações. Existem também as microcinas (Mcc), que são peptídeos menores sintetizados no ribossomo de bactérias Gram-negativas, as quais foram previamente divididas em classe I, em que estão presente modificações, e em classe II, sem modificações (DUQUESNE et al., 2007).

Segundo essa nova classificação as bacteriocinas de classe I são subdividas, por exemplo, em lantibióticos onde se encontra a nisina (WILLEY; VAN DER DONK, 2007), peptídeos lineares contendo azol ou azolina (MELBY; NARD; MITCHELL, 2011), tiopeptídeos (LI; KELLY, 2010), microcina que não pertencem a outro grupo (Mcc C7-C51; SEVERINOV; NAIR, 2012), dentre outras. Já as bacteriocinas de classe II (não modificadas ou circular) podem ser subdividas em 5 subclasses: classe IIa (contêm a região YGNGV comum, em que o N representa qualquer aminoácido; semelhantes a pediocina PA-1); classe IIb (bacteriocinas de dois peptídeos); classe IIc (bacteriocinas circulares); classe IId (bacteriocinas não modificadas, lineares, não semelhantes a pediocina e peptídeo único que não pertence a outra subclasse); e classe IIe (bacteriocinas semelhantes a Mcc-E492, que podem carregar uma modificação pós-traducional do tipo sideróforo) (LAGOS et al., 2009)

As leucocinas, foco do nosso trabalho, são produzidas por cepas de bactérias *Leuconostoc* spp., que já vem sendo utilizadas na indústria de alimentos como culturas "starters" e protetoras (WAN; SARIS; TAKALA, 2015). Dentre suas bacteriocinas produzidas se encontram as leucocinas A e C da classe IIa e leucocina B pertencente à classe IId. A bactéria *Leuconostoc mesenteroides* TA33a é capaz de produzir essas três leucocinas (PAPATHANASOPOULOS et al., 1997).

### 1.2.2 Mecanismo de ação

As bacteriocinas exercem atividade antimicrobiana por diversos mecanismos como a inibição da síntese da parede celular, afetando a expressão gênica ou a

produção de proteínas fundamentais e formação de poros na membrana levando, portanto, à morte celular (COTTER; ROSS; HILL, 2013).

As nisinas, outros lantibióticos e algumas bacteriocinas de classe II inibem a síntese de peptídeoglicano pois tem como alvo o lipídeo II de bactérias Gram-positivas, o qual é um intermediário chave nesta síntese. Outros lantibióticos ainda podem usar o lipídeo II como encaixe, facilitando a formação de poros na membrana celular (BIERBAUM; SAHL, 2009; COTTER; ROSS; HILL, 2013; MARTIN; BREUKINK; 2007).

As bacteriocinas pertencentes à classe IIa e algumas outras da classe II também causam a formação de poros nas membranas celulares de bactérias. Mas este mecanismo se dá através da ligação destas bacteriocinas com um receptor presente na membrana, sistema manose-fosfotransferase (Man-PTS), que causa a formação de poros, como é o caso da lactococina A da classe IIc (DIEP et al., 2007). Um estudo mais recente mostrou que bacteriocinas da classe IIc, como a garvicina ML, da classe IIc, assim como a lactococina LsbB, apresentam receptores de membrana diferentes (COTTER, 2014). A Mcc E492 pertencente a classe IIe são reconhecidos por receptores de sideróforo de ferro (FepA, CirA ou Fiu) na membrana externa de bactérias Gram-negativas e transloca por esta membrana através da proteína TonB, que se encontra ancorada na membrana externa, para então formar poros na membrana interna (COTTER; ROSS; HILL, 2013; DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2003; DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2006).

Mas algumas bacteriocinas possuem um mecanismo de ação dentro das células, como é o caso da MccB17 que utiliza a porina OmpF da membrana externa e um transportador de peptídeo, SbmA, presente na membrana interna, para entrar na bactéria e causar a inibição da DNA girase, enzima importante na replicação do DNA (PARKS et al., 2007). Já a bacteriocina lasso MccJ25 é reconhecida pelo FhuA, um receptor de sideróforo de ferro da membrana externa e, na membrana interna, requer TonB e SbmA, para então bloquear a RNA polimerase e impedir a transcrição (VINCENT; MORERO, 2009). A MccC7-C51 é capaz de passar pela membrana plasmática de *E. coli* pelo transportador YejABEF (NOVIKOVA et al., 2007). No interior deste microrganismo, a bacteriocina é processada e inibe aspartil-RNA sintetase, que tem função no processo de tradução (METLITSKAYA et al., 2006).

### 1.2.3 Bacteriocinas na conservação de alimentos

A nisina, um lantibiótico descoberto por Rogers em 1928, é utilizada como conservante alimentar em aproximadamente 40 países (CLEVELAND et al., 2001) e foi aprovada para o uso como aditivo alimentar em 1969 pela Organização Mundial de Saúde (FOOD...; WORLD..., 1969). Possui atividade contra os patógenos transmitidos por alimentos como *L. monocytogenes* e *S. aureus* (CHUNG; DICKSON; CROUSE, 1989; LEE et al., 2003), Apesar de não possuir atividade contra *Salmonella* spp., pode ser combinada com outros agentes, como por exemplo agentes quelantes, a fim de inibir essa bactéria (CUTTER; SIRAGUSA, 1995; STEVENS et al., 1991). Um outro peptídeo também promissor como conservante é a pediocina PA-1, pertencente a subclasse IIa, que não foi reconhecida legalmente em todo o mundo como aditivo alimentar e está presente em algumas preparações comerciais (JEEVARATNAM; JAMUNA; BAWA 2005; SETTANNI; CORSETTI, 2008). É ativa contra patógenos alimentares como *S. aureus*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes* (BHUNIA; JOHNSON; RAY, 1988) não sendo capaz de inibir *Salmonella* spp., mas essa atividade pode ser conseguida quando combinada com altas pressões hidrostáticas, por exemplo (KALCHAYANAND et al., 2004). Além destes peptídeos, outros são encontrados na literatura, mas a nisina e a pediocina PA-1 são os melhores posicionados como conservantes em alimentos (CHALÓN et al., 2012).

De acordo com Schillinger, Geisen e Holzapfel (1996) para a utilização dessas bacteriocinas como biopreservativos, as mesmas podem ser aplicadas nos alimentos de diferentes maneiras: adição da bacteriocina purificada ou semi-purificada, como por exemplo a nisina comercial, Nisaplin® (CHIKINDAS et al., 2017); inoculação das BALs (culturas “starter” ou protetiva) para a produção *in situ*, por exemplo a inoculação de *Leuconostoc carnosum* (comercialmente disponível como Bactoferm™ B-SF-43) produtora de leucocina para a conservação de carnes embaladas a vácuo (AYMERICH; PICOUET; MONFORT, 2008); ou ainda o uso de um produto que foi previamente fermentado com uma bactéria produtora de bacteriocina como ingrediente no processamento do alimento, como o MicroGARD® testado em queijo cottage (MAKHAL; KANAWJIA; GIRI, 2015). As bacteriocinas purificadas também podem ser aplicadas em preparações imobilizadas, como a incorporação dos peptídeos à filmes de diferentes materias, objetivando o desenvolvimento de

embalagens com capacidade de prolongar a vida de prateleira dos alimentos (DAESCHEL; McGUIRE; AL-MAKHLAFI, 1992; GÁLVEZ et al., 2007).

Quando novos compostos são sintetizados ou obtidos a partir de fontes naturais, há uma necessidade de quantidades significativas de produtos para serem testados *in vitro* e *in vivo*, o que implica na realização de síntese ou extrações por diversas vezes, tornando o processo trabalhoso e demorado (MARQUARDT; EIFLER-LIMA, 2001). Uma metodologia para agilizar o desenvolvimento de uma substância, facilitar a sua purificação e seu estudo é a síntese química em fase sólida de peptídeos biologicamente ativos (GARRIDO, 2007), permitindo a síntese de moléculas idênticas ou análogas às naturais que apresentem propriedades de controle microbiológico para diferentes aplicações (MACHADO et al., 2004). Dentre esses peptídeos, estão os peptídeos antimicrobianos (PAMs).

Tendo em vista as diferentes classes de PAMs, nosso foco foi na síntese de bacteriocinas que constituem a classe II, por atuarem em alvos intracelulares, que já vem sendo aplicado em outros estudos paralelos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa. Pretendíamos, portanto, obter uma nova classe de moléculas com capacidade antibacteriana que possa ser promissora na aplicação como conservantes de alimentos.

## 2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo central a síntese de derivados estruturais de Leucocinas TA33a com potencial antimicrobiano para possível aplicação como conservante de alimentos. Além disso, obter compostos que apresente também propriedades antioxidantes e baixa toxicidade como forma de agregar valor a estes compostos.

Para alcançar estes resultados, este trabalho teve como objetivos específicos:

- Sintetizar, purificar e caracterizar os peptídeos antimicrobianos baseados nas Leucocinas B-TA33a e C-TA33a (LeuB e LeuC-1, respectivamente);
- Avaliar a atividade dos peptídeos *in vitro* contra *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, e *Salmonella* sorovar Typhimurium, que são bactérias importantes na área de contaminação de alimentos;
- Avaliar a inibição enzimática dos peptídeos frente às topoisomerasas bacterianas, DNA girase e Topoisomerase IV;



- Avaliar a permeabilização dos peptídeos em miméticos de membrana de bactérias;
- Avaliar a atividade antioxidante pelo método ABTS;
- Avaliar a citotoxicidade dos peptídeos em células humanas através de ensaios de capacidade hemolítica;
- Avaliar a predição das estruturas secundárias dos peptídeos através da espectroscopia de dicroísmo circular.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Sínteses dos peptídeos**

A principal ferramenta utilizada hoje na obtenção de peptídeos de até 60 resíduos de aminoácidos é a Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS) desenvolvida por Merrifield (1963). Este método é baseado no crescimento da cadeia peptídica, um L- $\alpha$ -aminoácido por vez, a partir do grupo carboxílico C-terminal que se encontra ligado covalentemente a uma resina (suporte polimérico insolúvel). Estes polímeros possuem grau de solvatação alto em solvente apolar dando acessibilidade dos sítios reativos aos reagentes que passam pelas partículas.

Para que ocorra condensação (ligação peptídica ou ligação amida) de maneira orientada é necessária uma proteção adequada dos outros grupos funcionais que não estão relacionadas com a ligação peptídica, portanto são utilizados protetores permanentes nestes grupos, pois devem permanecer até o final da síntese. Já no grupamento  $\alpha$ -amínico são protegidos temporariamente, removidos a cada passo de acoplamento. Para a síntese do peptídeo proposto neste projeto, LeuC-1 e para o peptídeo já utilizado no grupo de pesquisa e referenciado neste estudo à critério de comparação, LeuB (Tabela 1), foi utilizado grupamento Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonila) como protetor do grupo  $\alpha$ -amino e as cadeias laterais dos resíduos são protegidas por grupos terc-butil (tBu), tritil e terc-butiloxicarbonil, entre outros. O Fmoc é base lábil, ou seja, a sua retirada do grupo amino (desproteção) ligado à resina é realizada em um meio básico - solução de 20% piperidina em N,N – Dimetilformamida (DMF).

**Tabela 1** - Estrutura primária dos peptídeos sintetizados.

<b>Nome</b>	<b>Sequência primária de resíduos de aminoácidos</b>
<b>LeuB</b>	KGKGFWSWASKATSWLTGPQQPGSPLLKKHR
<b>LeuC-1</b>	YGNGVHCTKWGYAATNIANNSV

**Fonte:** elaborado pela autora.

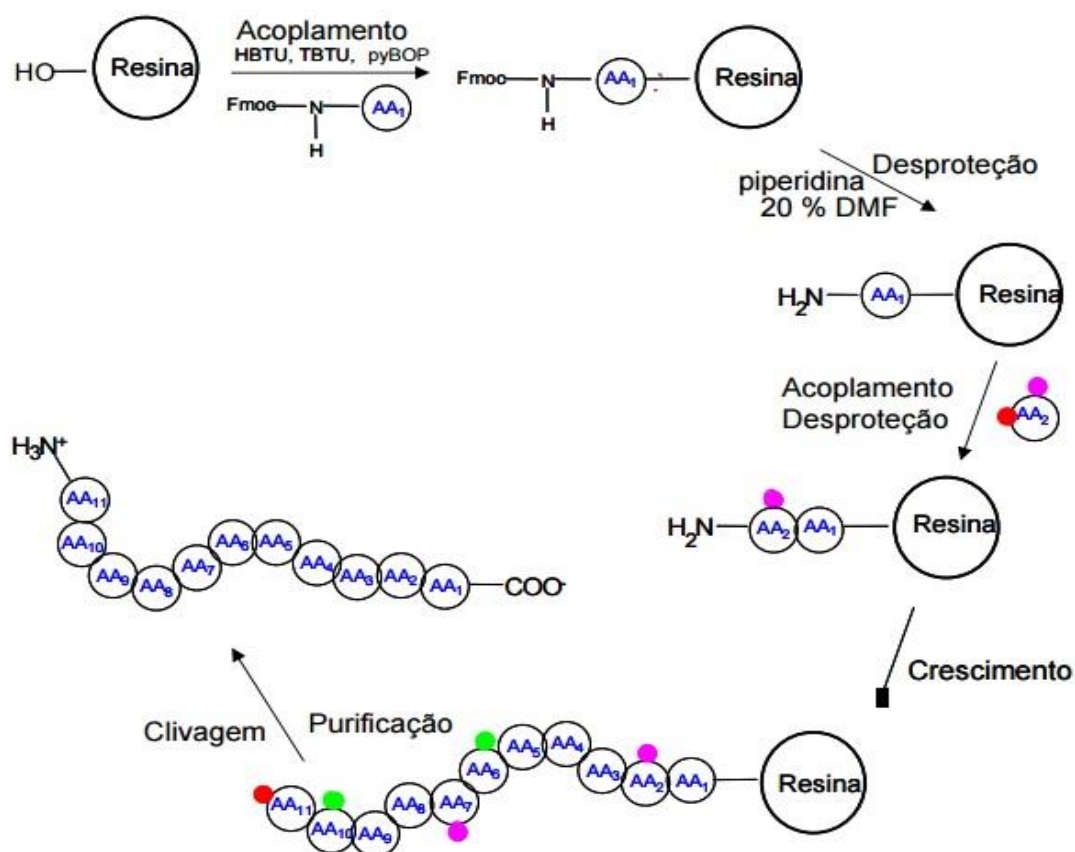
A etapa de acoplamento é a base da formação da ligação peptídica sendo necessário a ativação dos grupos carboxila do aminoácido a ser inserido para que ele possa ser atacado pelo grupo amina do aminoácido ligado à resina. Para isso, foram utilizados agentes de acoplamento como o N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC)/N-Hidroxibenzotriazol (HOBt), ou o O-(Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio hexafluorofosfato (HBTU)/ N-Etildiisopropilamina (DIEA), juntamente com o resíduo de aminoácido a ser adicionado. Nesta reação foram utilizadas três vezes de excesso em relação ao amino grupo da resina, durante duas horas de agitação. Entre cada passo foram efetuadas lavagens com DMF e diclorometano (DCM) para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos.

A eficiência das etapas de acoplamento de cada resíduo foi monitorada pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970). O aparecimento de coloração violeta (teste positivo), indicava a presença de  $\alpha$ -amino grupos livres (sem protetor), e nesse caso, o processo foi repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes. Acetilação, quando necessária, foi feita com anidrido acético e DIEA (10 equivalentes cada) em DMF, por 30 minutos. E quando apresentava coloração amarela, indicando a ausência de aminas livres, significava que o acoplamento foi efetuado, seguindo assim para os próximos passos de síntese.

Ao final dos acoplamentos de todos os resíduos de aminoácidos, foi realizada a clivagem dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais pelo tratamento com uma solução de clivagem (Reagente K) contendo ácido trifluoracético (TFA) (94%), água deionizada (2,5%), 1,2-etanoditiol (EDT) (2,5%) e triisopropilsilano (TIS) (1%), por 3 horas em agitação branda a 25 °C. Para cada 100 mg de resina, foi preparado 1,5 mL de solução. Em seguida, foi adicionado éter etílico gelado ao conteúdo do frasco e observado a formação de um precipitado branco, o qual representa o peptídeo bruto. A mistura foi agitada manualmente e transferida para tubos tipo "falcon" de centrífuga de 15 mL de

capacidade volumétrica, e foram submetidos a centrifugação por 15 minutos a 10.000 rpm. Após o período o sobrenadante foi descartado em frasco precaução. Este processo de lavagem com éter foi repetido mais 3 vezes. Após as lavagens, o precipitado foi seco em sistema a vácuo por cerca de 4-6 horas com as tampas semiabertas para evaporação do excesso de solventes orgânicos. Após a secagem a vácuo, o peptídeo foi extraído utilizando cerca de 100 mL de solução aquosa contendo 10% de acetonitrila (ACN) (v:v). Na Figura 2 está esquematizado o processo de SPFS.

**Figura 2** - Esquema da SPFS. Os círculos vermelhos representam o protetor do grupo amina. Já os círculos rosa e verde representam os diferentes protetores de cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais (AA).



Fonte: Garrido (2007).

### 3.2 Purificação e caracterização dos peptídeos sintetizados

Após o processo de síntese, os peptídeos foram obtidos na forma bruta, já que o processo de síntese em fase sólida pode gerar contaminantes peptídicos indesejados, dependendo do tamanho e da complexidade da cadeia polipeptídica a

ser sintetizada. Sendo assim, tornou-se comum a combinação de técnicas de cromatografia a fim de obter peptídeos sintéticos com um grau de pureza ideal para aplicações biotecnológicas. Dentre as técnicas utilizadas para purificação, a que apresenta destaque é a de cromatografia líquida de alta eficiência ou “high-performance liquid chromatography” (HPLC), a qual foi utilizada neste trabalho com as seguintes escalas e condições cromatográficas:

### 3.2.1 Escala Analítica

A cromatografia foi realizada em modo analítico em um cromatógrafo “ultra-fast liquid chromatography” (UFLC) Shimadzu LC20AD composto por detector, controlador e bomba, empregando uma coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm; diâmetro da partícula = 5 µm; porosidade 300 Å) como fase estacionária, com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA), como fase móvel, de 5% a 95% de B em 30 minutos com fluxo de 0,6 mL/min e detecção a 220 nm e 280nm. Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico e a água foi do tipo ultrapura.

### 3.2.2 Escala Semi-preparativa

A cromatografia em escala semipreparativa, foi efetuada em um sistema Shimadzu LC20AT também composto por detector, controlador e bomba. Foi empregada coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; diâmetro da partícula = 10 µm; porosidade 300 Å) como fase estacionária, com um gradiente linear de 20 a 50% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA), como fase móvel, em 120 minutos com fluxo de 3 mL/min e detecção a 220 nm e 280nm. Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico e a água foi do tipo ultrapura.

Após o procedimento de purificação dos peptídeos, a caracterização das moléculas foi feita por meio de espectrometria de massas. As análises foram realizadas em modo de eletrospray positivo por injeção direta das amostras dos peptídeos puros em um espectrômetro de massas do tipo Ion Trap Amazon SL, da marca Bruker® e também por HPLC acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray (LC/ESI-MS), permitindo determinar a qualidade e identidade da amostra simultaneamente. Os valores de massa molecular experimental

foram comparados com os valores teóricos calculados previamente para cada um dos peptídeos de acordo com seus resíduos de aminoácidos.

### **3.3 Ensaios de inibição do crescimento microbiano**

#### **3.3.1 Ensaio de microdiluição em placas**

Os testes de inibição do crescimento microbiano foram realizados a fim de avaliar a resposta dos peptídeos sintetizados e purificados, frente a bactérias de importância na área de alimentos.

As bactérias utilizadas *S. sorovar Typhimurium* (ATCC 6539), *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895), *S. aureus* (ATCC 14458) e *L. monocytogenes* (ATCC 7644) foram doadas pelo Laboratório de Microrganismos de Referência da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Para a realização dos testes, as suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de uma cultura em Caldo Muller Hinton (CMH) de 24 horas para as bactérias adicionado-se CMH até atingir a densidade do padrão 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL), que equivale a uma turbidez de 0,08 a 0,1 unidades de densidade óptica ( $DO_{620}$ ) medida no espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10, em CMH, obtendo-se uma suspensão de  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios. A atividade de inibição antimicrobiana foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A10 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015). Os poços das microplacas foram preenchidos com 80  $\mu$ L de CMH, acrescentados 100  $\mu$ L dos peptídeos em solução aquosa nas concentrações de: 200  $\mu$ M, 150  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 50  $\mu$ M. Adicionalmente foram distribuídos 20  $\mu$ L das suspensões dos microrganismos em cada orifício das microplacas. Como controle positivo foi utilizado a Ciprofloxacina 100  $\mu$ M (Sigma-N1628) e também foram realizados o controle do meio de cultura, em que foi utilizado apenas 200  $\mu$ L do CMH, e o controle de crescimento bacteriano, contendo 80  $\mu$ L de CMH, 100  $\mu$ L de água esterilizada e 20  $\mu$ L das suspensões dos microrganismos. As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas e os testes foram realizados em triplicata. Após o período de incubação, as microplacas foram submetidas à leitura de absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro de

microplacas (BioTeK). A partir da leitura espectrofotométrica foi determinada a porcentagem de inibição microbiana para cada microrganismo.

### 3.3.2 Ensaio de Time-Kill

Além do ensaio de microdiluição em placas para determinação das porcentagens de inibição dos peptídeos frente às bactérias, também foi realizado o ensaio de Time-Kill, pois fornece informações sobre a velocidade de ação do peptídeo em questão com o microrganismo e se a ação é bactericida ou bacteriostática.

O ensaio Time-Kill *in vitro* foi realizado, segundo metodologia adaptada de Zhou e colaboradores em 2013 (ZHOU et al., 2013) e avaliado a partir do dobro da concentração determinada nos testes de microdiluição que proporcionou maior inibição microbiana. O teste foi conduzido de acordo com a metodologia do item anterior 3.3.1 em que as amostras foram colocadas na placa de 96 poços, em triplicata e nos tempos de 0, 4, 6, 12, 18 e 24 após incubação a 37 °C, foram feitas as leituras das absorbâncias à 595 nm e foi determinada a cinética para cada peptídeo.

## 3.4 Ensaios de inibição enzimática

Os ensaios de inibição enzimática foram realizados com o intuito de avaliar a capacidade de inibição de cada peptídeo frente a DNA girase e a Topoisomerase IV, as quais são alvos de ação para agentes antimicrobianos.

### 3.4.1 DNA girase

Para realização do teste frente a enzima DNA girase, o Kit de superenovelamento do DNA pela girase de *E. coli* foi adquirido da empresa Inspirallis®, contendo a enzima DNA girase, plasmídeo pBR322 relaxado e os seguintes tampões:

Tampão de diluição: Tris.HCl 50 mM; KCl 100 mM; Ditiotritol 2 mM; ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) 1 mM; glicerol 50% (m/v); pH = 7,5.

Tampão de ensaio (concentrado 5x): Tris.HCl 35 mM; KCl 24 mM; MgCl<sub>2</sub>, 4 mM; Ditiotritol, 2 mM; Espermidina 1,8 mM; ATP 1 mM; glicerol 6,5% (m/v); Albumina 0,1 µg /mL; pH = 7,5.

Os estudos para avaliação da inibição da atividade de superenovelamento do DNA promovido pela DNA girase é realizado de acordo com o protocolo da Inspirallis® com modificações:

Com as amostras de peptídeos preparadas e solubilizadas em água adequadamente em uma solução estoque de 400  $\mu\text{M}$ , foi pipetado em cada tubo de 1,5 mL, um volume desta solução a fim de obter as concentrações de 200, 150, 100 e 50  $\mu\text{M}$  (considerando o volume final de 30  $\mu\text{L}$ ). Logo em seguida foi adicionado uma unidade (U) de DNA girase de *E. coli*, preparada com a enzima e seu tampão de diluição, em cada tubo. Foi preparado um MIX do tampão de ensaio (6,5  $\mu\text{L}$  de tampão 5X por ensaio) e o plasmídeo pBR322 relaxado (0,5  $\mu\text{L}$  por ensaio) totalizando 7  $\mu\text{L}$  do MIX para cada tubo. Para completar o volume de 30  $\mu\text{L}$  foi utilizada a mesma água ultrapura usada para a solubilização das amostras. Posteriormente foram incubadas por 30 minutos a 37 °C.

Após incubação, foi adicionado 3  $\mu\text{L}$  de dodecil sulfato de sódio (SDS) e novamente encubado a uma temperatura de 62 °C por 2 minutos. Com o intuito de parar a reação foi utilizado 15  $\mu\text{L}$  de STEB (Sacarose a 40% (p / v), Tris-HCl 100 mM, pH 8, EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0,5 mg/ml) e 60  $\mu\text{L}$  de clorofórmio. Os tubos foram então centrifugados a 13000 rpm por 3 minutos.

Em seguida as amostras foram submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris 89 mM / ácido bórico 89 mM /EDTA 2 mM, pH 8.2). As amostras (sobrenadante azul) foram aplicadas uma a uma nos poços do gel e submetidas à tensão constante de 60V, 250mA, à temperatura ambiente, por aproximadamente 2 horas. Ao término da corrida, o gel foi corado durante 30 minutos em tampão de corrida, contendo brometo de etídio (50 mg/mL). O gel foi então examinado em transiluminador de luz ultravioleta (Germetec LTDA.), e fotografado com luz ultravioleta incidente, utilizando-se câmera fotográfica Kodak Digital Screen DC40.

Os ensaios de eletroforese descritos foram realizados com o intuito de determinar as concentrações mínimas de cada um dos peptídeos sintetizados, capazes de inibir a ação da DNA girase.

### 3.4.2 Topoisomerase IV

Para realização do ensaio, o Kit de relaxamento do DNA pela Topoisomerase IV de *E. coli* foi adquirido da empresa Inspirallis® contendo a enzima Topo IV, plasmídeo pBR322 superenovelado e os seguintes tampões:

Tampão de diluição: HEPES.KOH 40 mM; glutamato de potássio 100 mM; DTT 1 mM; EDTA 1 mM; glicerol a 40% (v / v); pH = 7,6.

Tampão de ensaio (concentrado 5X): HEPES.KOH 40 mM; glutamato de potássio 100 mM; acetato de magnésio 10 mM; DTT 10 mM; ATP 1 mM; albumina 50 µg/ml; pH = 7,6.

Foi utilizada a mesma metodologia descrita no item 3.4.1 para DNA girase, o que difere apenas na enzima Topo IV, nos tampões fornecidos e no plasmídeo pBR322 superenovelado.

### 3.5 Vazamento de carboxifluoresceína

Este teste foi realizado visando o estudo da capacidade dos peptídeos permeabilizarem vesículas miméticas de membranas bacterianas, através da liberação da carboxifluoresceína.

Para isso, foram sintetizadas vesículas fosfolipídicas aniônicas como vesículas unilamelares grandes (LUVs) contendo 75% de 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC) e 25% de 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilglicerol (POPG) que correspondem a membranas típicas de bactérias (GLUKHOV; BURROWS; DEBER, 2008). Esses lipídeos, adquiridos da empresa Avanti Polar Lipids, foram pesados na proporção desejada e dissolvidos em uma solução de clorofórmio-metanol (4-1). Para a formação do filme delgado na parede do tubo, essa solução foi evaporada em N<sub>2</sub> e posteriormente foi mantido sob vácuo para eliminação dos solventes por aproximadamente 12 horas. Decorridas essas horas, o filme foi hidratado com uma solução do fluoróforo carboxifluoresceína (CF) 80 µM em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 e a solução foi submetida a seis ciclos de congelamento em nitrogênio líquido, banho a 60°C, vórtex e ultrassom, com o intuito de romper as camadas e diminuir o tamanho das vesículas. Após esses passos foram obtidas as vesículas multilamelares (MLVs) que foram passadas por um extrusor contendo uma membrana de policarbonato com poros de 100 nm de diâmetro (Whatman), por 30 ciclos de extrusão,



para a produção das LUVs. A CF não incorporada às vesículas foi removida por filtração em gel em uma coluna Sephadex G-50 estabilizada com o tampão fosfato.

O ensaio foi realizado em um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse VARIAN, com comprimentos de onda ajustados em 492 nm de excitação e 517 nm de emissão. O valor de 100% de permeabilização foi obtido pela adição de Triton x-100, o qual promove o rompimento total das vesículas e conseqüentemente a liberação de CF.

Durante o experimento, após o primeiro 1 minuto de análise da fluorescência foi adicionado ao sistema, contendo o tampão e as vesículas, o peptídeo em questão nas concentrações de 6,25, 12,5 e 25  $\mu\text{M}$  em solução aquosa, aos 9 minutos foi adicionado o Triton x-100.

### **3.6 Estudo da atividade antioxidante**

A atividade antioxidante dos peptídeos antimicrobianos, foi medida usando o método do radical  $\text{ABTS}^+$  (ácido [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)]) segundo Mann e colaboradores (2015), sendo este um dos parâmetros para determinar o potencial de inibição da oxidação de uma substância. Este método ocorre através da captura do cátion radical  $\text{ABTS}^+$  por antioxidantes, o que sofre uma descoloração do verde-escuro para verde-claro causando o decréscimo da absorbância, proporcional a concentração de antioxidantes no meio (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006; RUFINO et al., 2007). O radical ABTS foi preparado a partir de 5  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque de ABTS (7 mM) e adicionado 88  $\mu\text{L}$  de persulfato de potássio (140 mM), armazenado durante 16 horas no escuro e em temperatura ambiente. Após as 16 horas, foi diluído em álcool etílico até obter uma absorbância de  $0,7 \pm 0,02$  a 734 nm no ultravioleta visível (UV/VIS) por uma leitora de placas Biotek® - modelo Epoch.

Em uma placa de 96 poços foram adicionadas 5  $\mu\text{L}$  dos peptídeos a 400  $\mu\text{M}$ , a fim de obter uma concentração final de 200  $\mu\text{M}$ , ou do padrão de Trolox de 0 a 900  $\mu\text{M}$  a partir de uma solução estoque de 2 mM, em triplicata, e 245  $\mu\text{L}$  do radical ABTS. Após 6 minutos de reação no escuro e em temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorbância a 734nm. Os resultados foram expressos como Capacidade Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC) em  $\mu\text{M}$  baseado na curva padrão de Trolox de 0 a 900  $\mu\text{M}$ . Obteve-se  $\epsilon = 0,0004 (\mu\text{M})^{-1}\text{cm}^{-1}$  para LeuB e  $\epsilon = 0,0003 (\mu\text{M})^{-1}\text{cm}^{-1}$

para LeuC-1 e as atividades antioxidantes foram dadas pela concentração (C) de Trolox em  $\mu\text{M}$  obtidas pelas fórmulas:

$C = (\text{Abs} + 0,0019)/0,0004$  no caso do peptídeo LeuB e  $C = (\text{Abs} - 0,0025)/0,0003$  para LeuC-1, provenientes da equação da reta das curva analíticas. Os resultados também foram representados por porcentagem de redução de ABTS pela fórmula:

$$\% \text{ de redução de ABTS} = \frac{(\text{Abranco} - \text{Aamostra})}{\text{Abranco}} \times 100$$

Onde: Abranco= absorbância do branco e Aamostra= absorbância da amostra.

### 3.7 Ensaio de toxicidade dos peptídeos: estudos de atividade hemolítica

Os testes de atividade hemolítica dos peptídeos referentes a este trabalho, foram realizados com o intuito de investigar a toxicidade dos mesmos em células eucarióticas. O projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Faculdade de Ciências Campus de Bauru/Unesp e foi aprovado sob o protocolo de número 46212515.0.0000.5398. A metodologia utilizada foi o de Onuma e colaboradores (1999) com modificações. Os eritrócitos de uma amostra de sangue humano foram submetidos a centrifugação e lavados 3 vezes com tampão fosfato salino (PBS) (35 mmol/L fosfato de sódio; 0,15 mol/L de cloreto de sódio) pH 7,4. Uma suspensão celular a 2% (v/v) e os peptídeos foram usados na determinação da concentração hemolítica que lisa 50% das hemácias ( $\text{HC}_{50}$ ) (volume final 200  $\mu\text{L}$ , no qual 100  $\mu\text{L}$  foi da solução diluída do peptídeo e 100  $\mu\text{L}$  da suspensão celular).

Após a incubação por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ , os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos e alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram pipetadas em microplacas de 96 poços. A absorbância a 405 nm foi definida usando leitor de microplaca (BioTek, modelo Epoch). O valor de 100% de hemólise foi determinado utilizando 100  $\mu\text{L}$  da suspensão celular com 100  $\mu\text{L}$  de Triton X-100 1% (v/v), já o valor de 0% de hemólise utilizando 100  $\mu\text{L}$  da suspensão celular com 100  $\mu\text{L}$  de tampão PBS.

Neste estudo, foram utilizadas as concentrações de 200, 150, 100 e 50  $\mu\text{M}$  para cada um dos peptídeos em solução aquosa, LeuB e LeuC-1. Aplicando a seguinte equação:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{(\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do tampão})}{(\text{Absorbância do Triton} - \text{Absorbância do tampão})} \times 100$$

### **3.8 Dicroísmo Circular**

O dicroísmo circular (CD) foi realizado neste trabalho a fim de fornecer informações sobre a possível estrutura tridimensional dos peptídeos sintetizados, uma vez que a espectroscopia de CD permite investigar a estrutura secundária, em solução, de proteínas e peptídeos, por exemplo (BEROVA; DI BARI; PESCITELLI, 2007; GREENFIELD, 1999; WHITMORE; WALLACE, 2007).

As propriedades conformacionais dos peptídeos LeuB e LeuC-1, a uma concentração de 60  $\mu$ M em solução aquosa, foram estudados em três ambientes distintos: em tampão fosfato, em um indutor de estrutura como o 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) 60% e em meio de SDS 25 mM, todos à 25°C. O equipamento utilizado foi um espectropolarímetro Jasco J-815 em celas de 1,0 mm de caminho óptico e 6 varreduras nos comprimentos de onda de 190 a 280 nm.

### **3.9 Análise Estatística**

Os resultados dos ensaios antimicrobianos foram submetidos ao Teste-t de comparação entre duas médias, no caso de avaliação da diferença entre um peptídeo e outro em uma dada concentração, e também à ANOVA – fator único, na avaliação da diferença das quatro concentrações de cada peptídeo e comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5%.

Os ensaios antioxidantes foram submetidos ao Teste-t de comparação entre duas médias das amostras e os ensaios hemolíticos foram submetidos à análise de variância (ANOVA – fator único) e as quatro médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5%, com o auxílio do software Excel 2013.

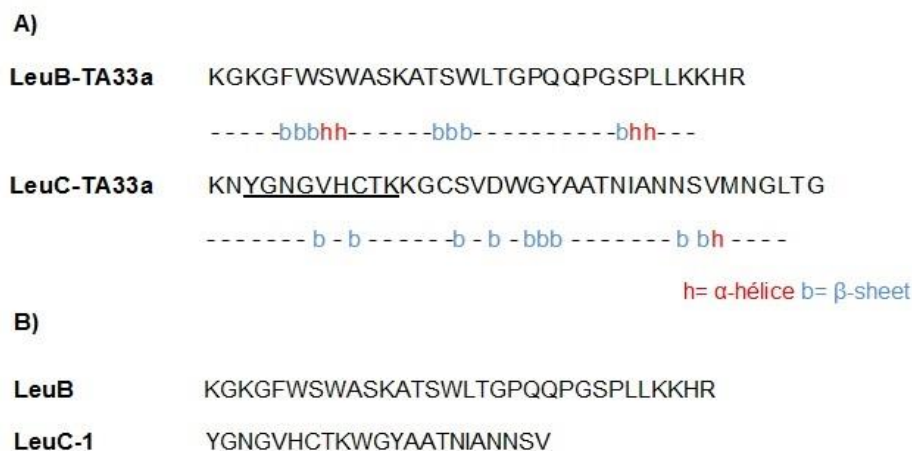
## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Síntese, purificação e caracterização dos análogos peptídicos**

As sequências peptídicas sintetizadas foram projetadas com base na estrutura secundária de Leucocinas B- e C-TA33a, proposta por Papathanasopoulos e colaboradores (1998), para estudos de inibição de diferentes espécies bacterianas de interesse alimentar na tentativa de compreender o mecanismo de ação destes peptídeos. Portanto levou-se em consideração algumas características estruturais destas leucocinas, sendo que o LeuB foi sintetizado na íntegra baseado na sequência

de aminoácidos da Leucocina B-TA33a para análise comparativa com uma estrutura nativa de uma leucocina. O peptídeo LeuC-1 foi montado contendo os aminoácidos que se estruturam em cadeia  $\beta$  da porção N-terminal, a qual é conservada de maneira quase idêntica em diferentes leucocinas, mas que não é presente na Leucocina B-TA33a. O objetivo é avaliar o efeito desta região na interação e possível inibição de topoisomerasas bacterianas. Além desta região, a estrutura primária do peptídeo LeuC-1, apresenta uma sequência de aminoácidos que também se estruturam em forma de cadeia  $\beta$ , porém localizados mais próximo da porção C-terminal da Leucocina C-TA33a. O objetivo deste design foi produzir uma molécula menor que a Leucocina C-TA33a, mas que mantenha, ou mesmo, apresente uma maior capacidade antimicrobiana. As sequências de aminoácidos das moléculas de LeuB e LeuC-1, estão esquematizadas na Figura 3.

**Figura 3** - A) Estrutura primária dos peptídeos Leucocinas B-TA33a e C-TA33a. B) Peptídeos projetados para serem sintetizados: LeuB corresponde à Leucocina B-TA33a em sua íntegra e LeuC-1 corresponde a um derivado estrutural da Leucocina C-TA33a.



**Fonte:** adaptado de Papathanasopoulos et al. (1998).

Para a síntese de LeuB e LeuC-1 partiu-se de 300 mg de resina Fmoc-Arg-Wang e Fmoc-Val-Wang, com graus de substituição de 0,69 e 0,76mmol/g, respectivamente. Foram utilizados DIC/HOBt como agentes de condensação para o acoplamento dos resíduos de aminoácidos um a um para o crescimento da cadeia polipeptídica. Após desproteção do primeiro aminoácido, iniciou-se o acoplamento dos demais, seguindo sempre os passos de lavagens e desproteções. As massas de peptidil-resina obtidas no final da síntese de cada um dos análogos podem ser observadas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Massas de peptidil-resinas de cada um dos análogos sintetizados.

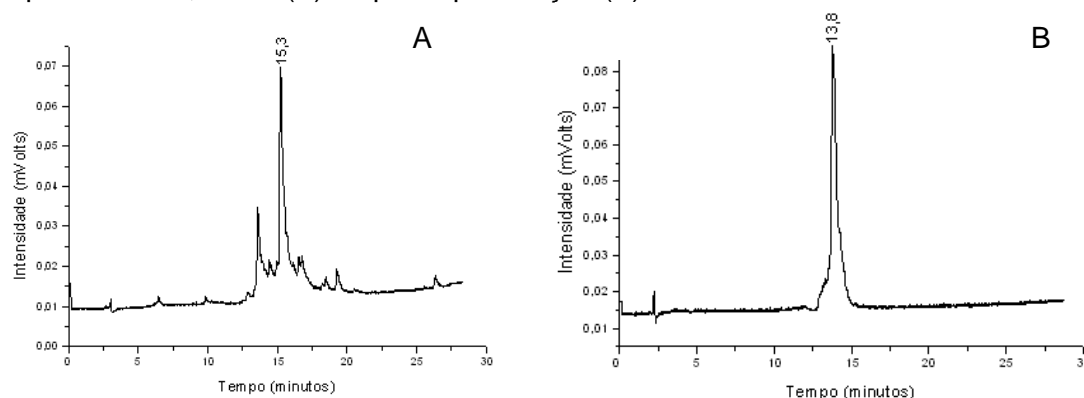
Análogos	Massa final de peptidilresina (g)
LeuB	1,20
LeuC-1	1,093

**Fonte:** elaborado pela autora.

Após o procedimento de clivagem uma fração da massa do extrato bruto de cada peptídeo liofilizado, aproximadamente 100 mg, foi dissolvido em cerca de 8 mL de solvente A (água + TFA 0,036%), com adição de pequenos volumes de ACN para auxiliar na solubilização completa do material bruto. A solução resultante deste processo foi então submetida a análise qualitativa em HPLC, sob condições já descritas anteriormente.

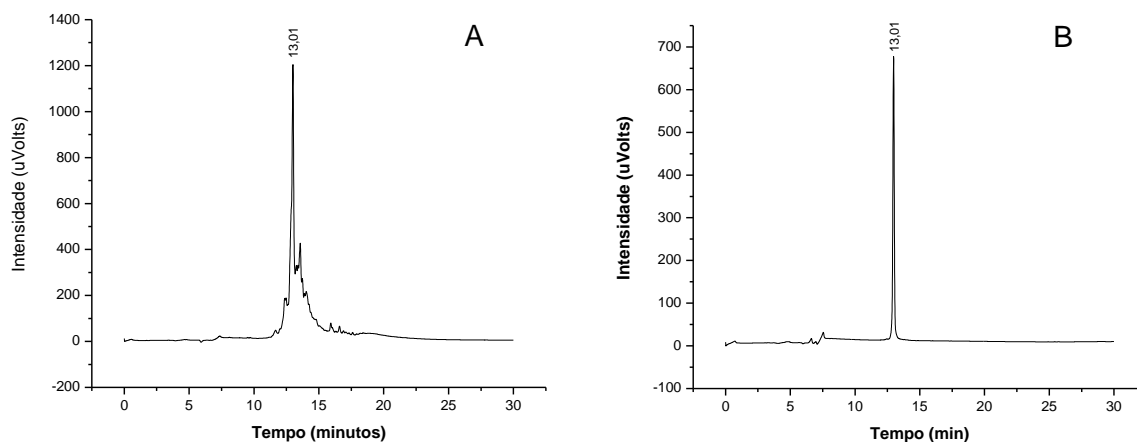
A partir dos resultados de tempo de retenção dos peptídeos e porcentagem de solventes obtidos nestas análises, foram definidas as condições relativas à concentração de solvente para a purificação em escala semi-preparativa. Os cromatogramas obtidos, para os análogos LeuB e LeuC-1, antes e após o processo de purificação, estão representados nos gráficos 1 e 2.

**Gráfico 1** - Perfis cromatográficos obtidos por HPLC, em escala analítica, para o análogo peptídico LeuB, antes (A) e após a purificação (B).



**Fonte:** elaborado anteriormente pelo grupo de pesquisa (dados não publicados).

**Gráfico 2** - Perfis cromatográficos obtidos por HPLC, em escala analítica, para o análogo peptídico LeuC-1, antes (A) e após a purificação (B).



**Fonte:** elaborado pela autora.

Com os resultados dos perfis cromatográficos obtidos por HPLC, em escala analítica, pode-se verificar que após a purificação os peptídeos LeuB e LeuC-1 apresentaram um único pico em relação ao extrato bruto e o tempo de retenção dos análogos purificados foram mantidos em relação ao pico correspondente no extrato bruto, dados comprovados por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC/ESI-MS), previamente a purificação dos peptídeos. Além disso, os valores de massa molecular, obtidos por espectrometria de massas no modo electrospray positivo [ES  $m/z$ :  $(M + H)^+$ ], foram coincidentes com o teórico esperado (calculado através da sequência de aminoácidos dos peptídeos), obtendo a confirmação do peptídeo desejado (Tabela 3).

**Tabela 3** - Massas moleculares teóricas e obtidas por espectroscopia de massas dos peptídeos LeuB e LeuC-1.

<b>Análogo peptídico</b>	<b>Massa Molecular Teórica (g/mol)</b>	<b>Massa Molecular Obtida (g/mol)</b>
<b>LeuB</b>	3466,01	3466
<b>LeuC-1</b>	2340,53	2343

**Fonte:** elaborado pela autora.

Após o procedimento de purificação, foi possível obter a pureza relativa aos peptídeos LeuB e LeuC-1. Este resultado é obtido pelo software do cromatógrafo através da análise da área do pico obtido em escala analítica correspondente ao peptídeo purificado. Os graus de pureza estão representados na Tabela 4. Não foi o foco deste trabalho avaliar o rendimento do procedimento de purificação, pois foi

purificado somente o material necessário para realização dos ensaios propostos no projeto.

**Tabela 4** - Pureza relativa após o processo de purificação dos análogos da Leucocina.

Peptídeo	Massa de Peptídeo Bruto que foi purificado (mg)	Pureza Relativa (%)
LeuB	150	92,4
LeuC-1	300	97,9

**Fonte:** elaborado pela autora.

De maneira geral pode-se concluir através da observação dos resultados anteriores, que os procedimentos utilizados para a síntese, clivagem da peptidil-resina e metodologias desenvolvidas para purificação foram adequados para obtenção dos peptídeos desejados, confirmados através dos dados de análise de massa molecular e com grau de pureza acima de 90%, possibilitando a utilização dos mesmos nas próximas etapas do trabalho.

## 4.2 Ensaio de inibição do crescimento microbiano

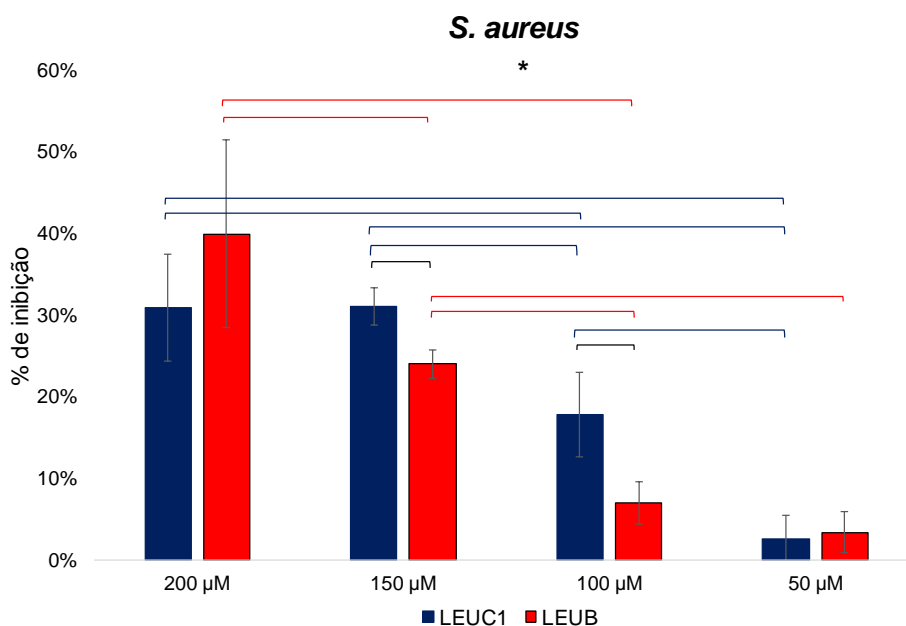
Os resultados das porcentagens de inibição de crescimento microbiano obtidos estão expressos nos gráficos de 3 a 6, assim como os desvios padrão e a análise estatística dos dados. É possível observar que para a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, o peptídeo LeuB apresentou uma maior atividade antimicrobiana na maior concentração testada (200  $\mu$ M), inibindo 40% dos microrganismos viáveis. Embora o peptídeo LeuC-1 ter apresentado uma porcentagem de inibição desta bactéria de 31%, não houve diferença estatística entre os dois peptídeos testados, portanto a escolha do peptídeo para ser possivelmente utilizado como conservante em alimentos seria a critério da toxicidade de cada um. Já para a bactéria também Gram-positiva *L. monocytogenes*, ficou evidente que LeuC-1 apresentou uma capacidade de inibição maior (67%), em relação ao LeuB que inibiu 41% dos microrganismos, havendo uma diferença estatística entre eles.

Uma hipótese para a menor porcentagem de inibição de *S. aureus* apresentada pelos peptídeos estudados, pode estar relacionada com a morfologia desta espécie bacteriana, a qual se desenvolve em unidades celulares na forma de esferas (cocos),

os quais se agrupam durante o desenvolvimento das colônias em arranjos do tipo cachos. Este arranjo das colônias, diminui a superfície de contato para os peptídeos atuarem principalmente nas células localizadas nas porções mais internas dos cachos, as quais podem continuar a se desenvolverem e multiplicar.

Os resultados obtidos através do estudo com bactérias Gram-negativas mostraram que para *E. coli* O157:H7, o LeuB apresentou uma maior atividade inibitória com 69% de inibição a uma concentração de 200  $\mu$ M, enquanto que o LeuC-1 apenas 20% de inibição, havendo diferença estatisticamente significativa entre eles. Os resultados sobre a *S. sorovar Typhimurium*, demonstraram porcentagens de inibição de 71% e 67% para LeuB e LeuC-1, respectivamente, na maior concentração testada, sendo que não foi observado diferença estatística nesses valores. Embora para o LeuB a concentração de 150  $\mu$ M mostrou inibição de 63%, não há diferença estatística em relação à concentração de 200  $\mu$ M, o que proporciona a utilização de uma menor concentração do peptídeo para a inibição deste microrganismo. No caso do LeuC-1, não houve diferença estatística entre as concentrações de 200  $\mu$ M e 150  $\mu$ M e entre 200  $\mu$ M e 100  $\mu$ M, podendo também ser utilizado uma concentração ainda menor comparado com o peptídeo LeuB.

**Gráfico 3** - Porcentagem de inibição de crescimento de *S. aureus* pelos peptídeos LeuC-1 e LeuB.

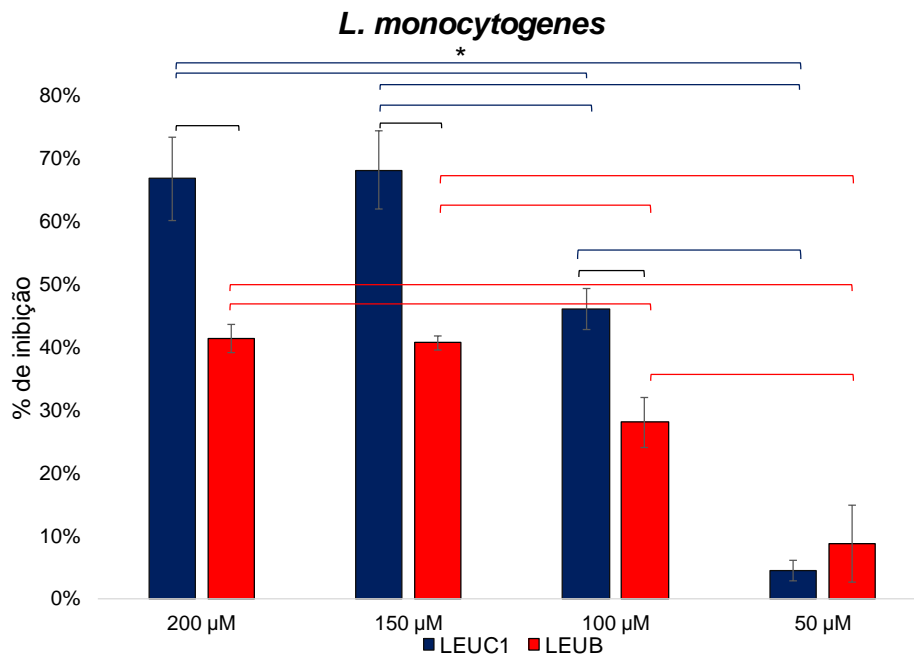


\* As médias diferem pelos testes estatísticos sob o nível de significância de 5%.

**Fonte:** elaborado pela autora.



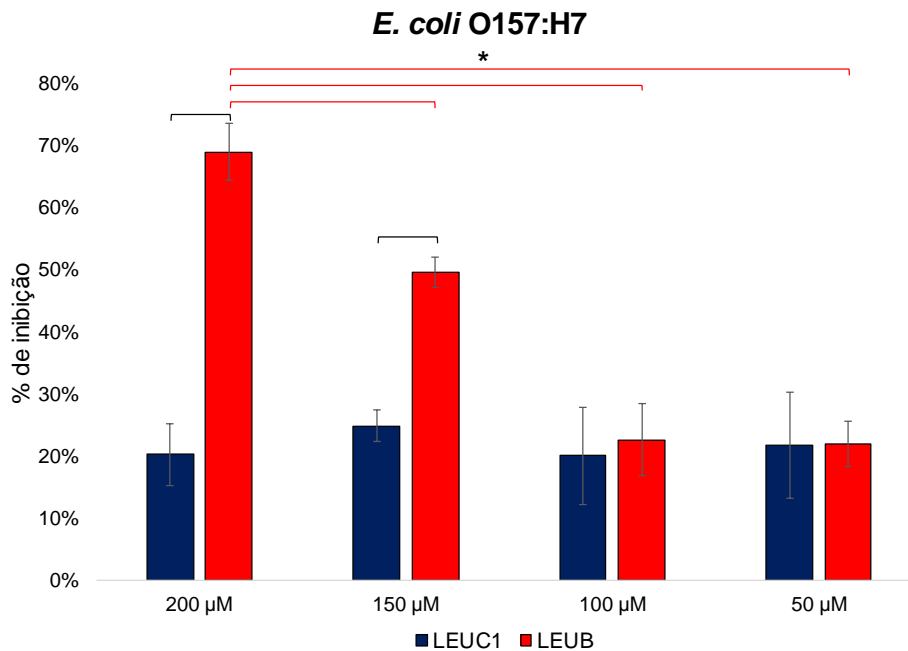
**Gráfico 4** - Porcentagem de inibição de crescimento de *L. monocytogenes* pelos peptídeos LeuC-1 e LeuB.



\* As médias diferem pelos testes estatísticos sob o nível de significância de 5%.

Fonte: elaborado pela autora

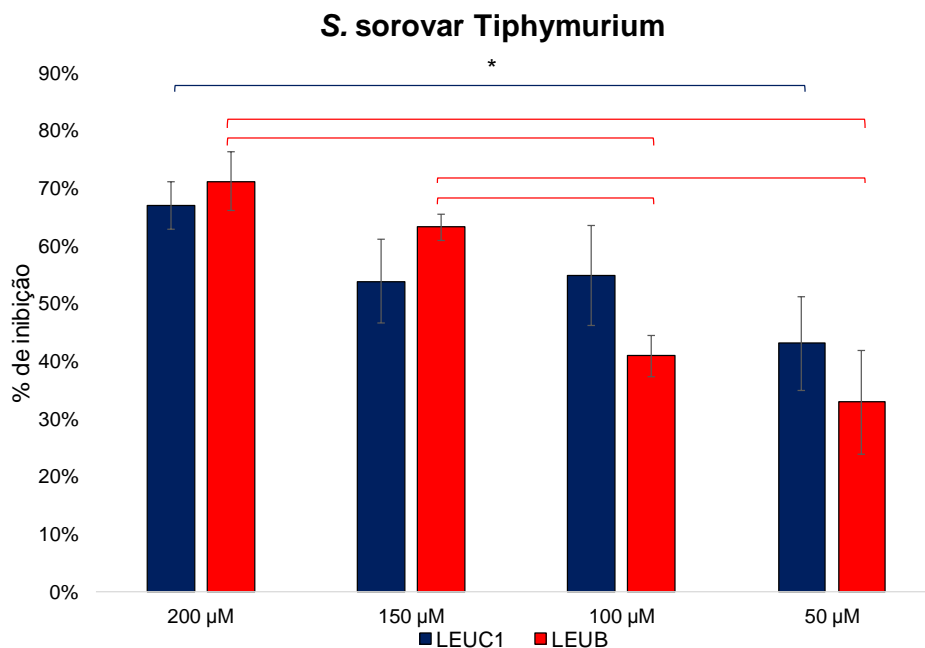
**Gráfico 5** - Porcentagem de inibição de crescimento de *E. coli* O157:H7 pelos peptídeos LeuC-1 e LeuB.



\* As médias diferem pelos testes estatísticos sob o nível de significância de 5%.

Fonte: elaborado pela autora.

**Gráfico 6** - Porcentagem de inibição de crescimento de *S. sorovar Tiphymurium* pelos peptídeos LeuC-1 e LeuB.



\* As médias diferem pelos testes estatísticos sob o nível de significância de 5%.

**Fonte:** elaborado pela autora.

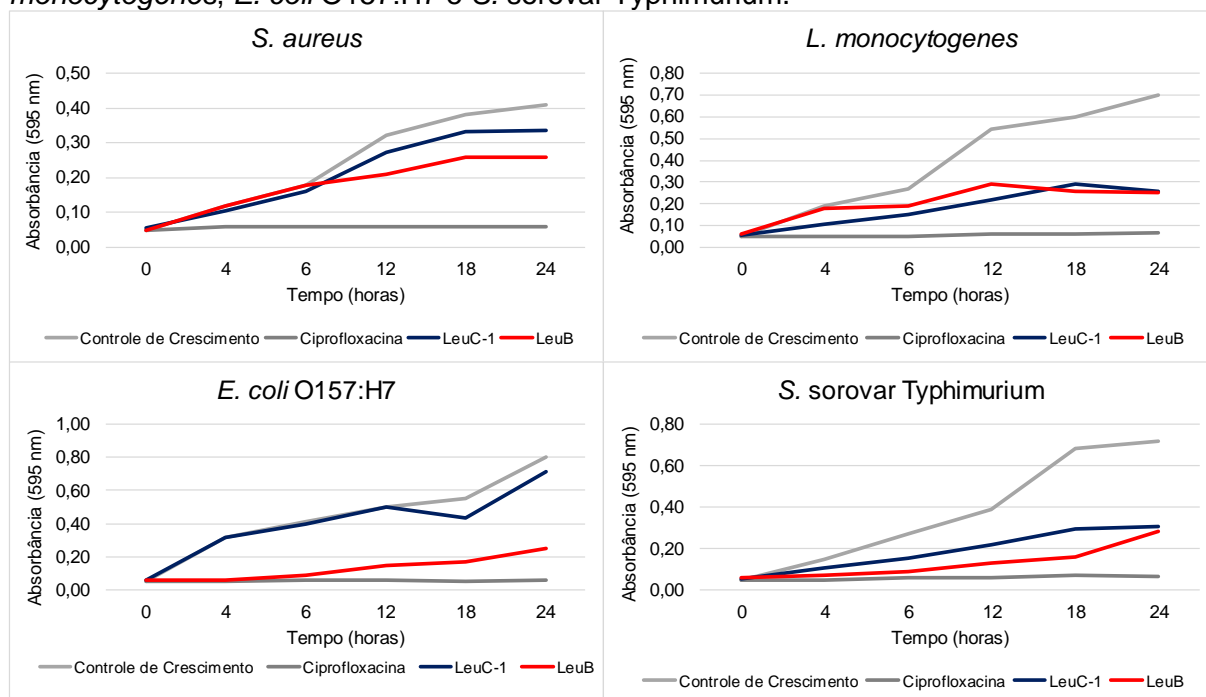
Como já havia sido mencionado anteriormente, outras bacteriocinas amplamente estudadas como a nisina, já havia apresentado inibição comprovada contra bactérias Gram-positivas, a exemplo de *L. monocytogenes* e *S. aureus*. No entanto, a nisina não apresentou atividade contra bactéria Gram-negativa como *S. sorovar Typhimurium* (CHUNG; DICKSON; CROUSE, 1989). Outra bacteriocina descrita na literatura, a PA-1, é ativa contra patógenos alimentares como *S. aureus*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes* (BHUNIA; JOHNSON; RAY, 1988; GONZALEZ; KUNKA, 1987). No entanto, PA-1 também não é capaz de inibir sozinha bactérias Gram-negativas (RODRÍGUEZ; MARTÍNEZ; KOK, 2002). Por outro lado, são encontradas bacteriocinas que apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas, como é o caso das microcinas, a exemplo da MccC7-C51, a qual apresenta atividade contra algumas cepas de *Escherichia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Proteus spp.* e *Yersinia spp.* (GARCIA-BUSTOS; PEZZI; MENDEZ, 1985). A microcina MccJ25, apresenta atividade contra algumas espécies de *Escherichia spp.* e *Salmonella spp.* (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2005; SOUDY; WANG; KAUR, 2012) e MccB17 contra *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* e *Pseudomonas spp.* (ASENSIO et al., 1976; BAQUERO; MORENO, 1984).

Segundo Stiles (1994) todas as bacteriocinas produzidas por *Leuconostoc* spp. encontradas na literatura, apresentam atividade anti-listeria. Mas há relatos de inibição de apenas cepas de *Leuconostoc* spp. e *Weissella* spp. por bacteriocinas como a Leucocina B-TA33a (PAPATHANASOPOULOS et al., 1997), dextranicina 24 produzida a partir de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* J24, mesenterocina 52B de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52. (REVOL-JUNELLES et al., 1996; REVOL-JUNELLES; LEFEBVRE, 1996). No presente estudo é observado que o LeuB mostrou, na maior concentração testada, uma menor capacidade de inibir as células bacterianas de *L. monocytogenes*, 41%, comparado com o LeuC-1 que apresentou 67% de inibição. Segundo Blom e colaboradores (1999) a leucocina H, bacteriocina de dois peptídeos produzida por *Leuconostoc* MF15B, mostrou atividade contra *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *C. perfringens* e *S. aureus*.

O LeuC-1 e o LeuB apresentam uma carga líquida em pH 7 de +1 e +6,1, respectivamente. Isso mostra que o LeuB é um peptídeo catiônico, o que pode explicar a sua melhor atividade em bactérias Gram-negativas. É conhecido que as naturezas hidrofóbicas e catiônicas dos peptídeos são importantes para a sua interação com a membrana da bactéria (HANCOCK; FALLA; BROWN, 1995). Peptídeos catiônicos se ligam aos lipopolissacarídeos (LPS), perturbando a membrana externa da bactéria, provocando a formação de fissuras que permitem a passagem de moléculas do meio interno para o externo, e vice-versa. Este processo, portanto, pode desencadear em um segundo estágio, a morte celular, já que o mecanismo da morte bacteriana por peptídeos catiônicos, ainda não é claro (HANCOCK; CHAPPLE, 1999).

Já os resultados obtidos através do ensaio de Time-Kill estão ilustrados no Gráfico 7. É possível observar que para o peptídeo LeuB, os valores de absorvância para *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 e *S. sorovar* Typhimurium, obtiveram um pequeno acréscimo ao longo das 24 horas comparado com os controles de crescimento microbiano. Já para o LeuC-1 os valores de absorvância apresentaram um menor acréscimo para as bactérias *L. monocytogenes* e *S. sorovar* Typhimurium. Estes resultados evidenciam um efeito bacteriostático destes peptídeos nos microrganismos mencionados.

**Gráfico 7** - Efeito dos peptídeos LeuB e LeuC-1 no crescimento de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 e *S. sorovar Typhimurium*.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

Embora a capacidade de inibição dos peptídeos nos microrganismos testados não tenha atingido 100%, eles podem ser combinados com outras bacteriocinas ou com outros métodos de conservação, como já havia sido mencionado anteriormente, a fim de potencializar a inibição ou até mesmo ampliar o espectro de ação, visando a segurança do consumidor e o aumento da vida de prateleira dos alimentos. Ao mesmo tempo, o efeito bacteriostático também é de interesse para a indústria alimentícia, pois impede que novas bactérias deteriorantes ou patogênicas se multipliquem em determinados alimentos, além de impedir a proliferação de microrganismos naturalmente encontrados nos alimentos.

### 4.3 Ensaios de inibição enzimática

As enzimas DNA topoisomerases são responsáveis pelas mudanças na topologia do DNA (MAXWELL, 1997; SHARMA; MONDRAGÓN, 1995; WIGLEY, 1995). Elas são divididas em tipo I e II, catalisando reações de clivagem de uma ou de ambas as cadeias de DNA (CORBETT; BERGER, 2004; MAXWELL, et al., 2005). As bactérias são capazes de codificar duas enzimas essenciais do tipo II, as quais são elas a DNA girase e a Topoisomerase IV (Topo IV), que atuam rompendo a dupla cadeia de DNA (CORBETT; BERGER, 2004). Essas enzimas desempenham papéis

importantes na replicação do DNA, segregação cromossômica e compactação do DNA, portanto são necessárias para o funcionamento regular da célula (HARDY; COZZARELLI, 2003; LEVINE; HIASA; MARIANS, 1998).

A DNA girase e a Topo IV possuem duas subunidades GyrA e GyrB, e ParC e ParE, respectivamente, formando uma estrutura heterotetramérica ativa, GyrA<sub>2</sub>GyrB<sub>2</sub> em DNA girase e ParC<sub>2</sub>ParE<sub>2</sub> em Topo IV. Enquanto isso, as topoisomerases eucarióticas do tipo II são grandes subunidades únicas e ativas como homodímeros (CHAMPOUX, 2001; POMMIER et al., 2010). As subunidades GyrA e ParC são responsáveis pela ligação do DNA e processo união-quebra do DNA e as GyrB e ParE pela ligação do ATP e hidrólise (PENG; MARIANS, 1993; REECE; MAXWELL, 1991).

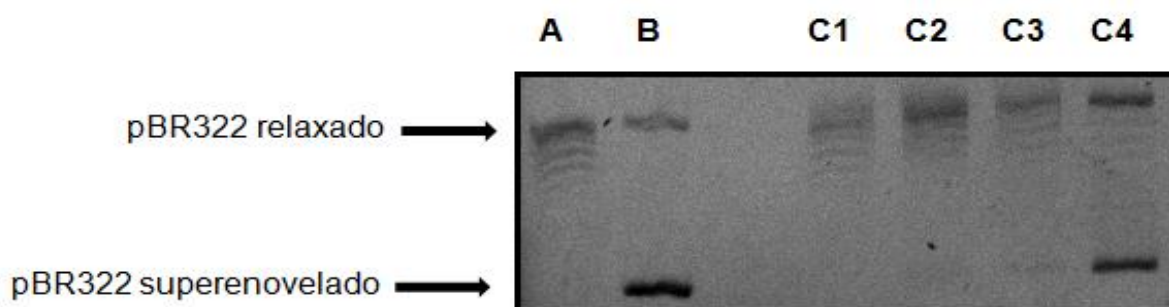
As quinolonas, antimicrobianos sintéticos que possuem como alvo de ação as topoisomerases, se ligam à enzima e ao DNA, bloqueando a reação de quebra-união do DNA (COLLIN; KARKARE; MAXWELL, 2011; LAPONOGOV et al., 2009; MARCHETTO, 2006). As cumarinas, produtos naturais de *Streptomyces* spp., se ligam às subunidades ParE e GyrB das enzimas Topo IV (HARDY; COZZARELLI, 2003) e DNA girase (GORMLEY et al., 1996), respectivamente, inibindo a atividade ATPase. Outros inibidores como o CcdB (COUTURIER; BAHASSI; VAN MELDEREN, 1998), uma toxina natural que compõe o sistema toxina-antitoxina (TA) ccd, e o ParE (JIANG et al., 2002) inibem a ação da DNA girase ou são capazes de inibir a topo IV também, no entanto necessitam de concentrações maiores (HOOPER, 1998).

A enzima bacteriana DNA girase é responsável por produzir um superenovelamento negativo no DNA. Esta enzima é essencial para a bactéria e é o alvo de muitos agentes antibacterianos (MAXWELL, 1997; REECE; MAXWELL, 1991; WIGLEY, 1995). Por ser a DNA girase uma enzima encontrada em organismos procariotos, como em bactérias, embora mais recentemente foi descoberto a presença de DNA girase no protozoário *Plasmodium falciparum* (GARDNER et al., 2002; LIM; McFADDEN, 2010; NAGANO et al., 2015), sua importância como alvo para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos é indiscutível, especialmente para aplicação como bioconservantes que tem como propósito inibir o crescimento de microrganismos de grande interesse na indústria alimentícia como a *S. sorovar Typhimurium*, *E. coli* e *S. aureus*, as principais bactérias causadoras de DTAs.

O ensaio de eletroforese mostrou que o análogo LeuB (Figura 4) apresentou inibição da atividade da DNA girase a partir da concentração de 100 µM, já que não é

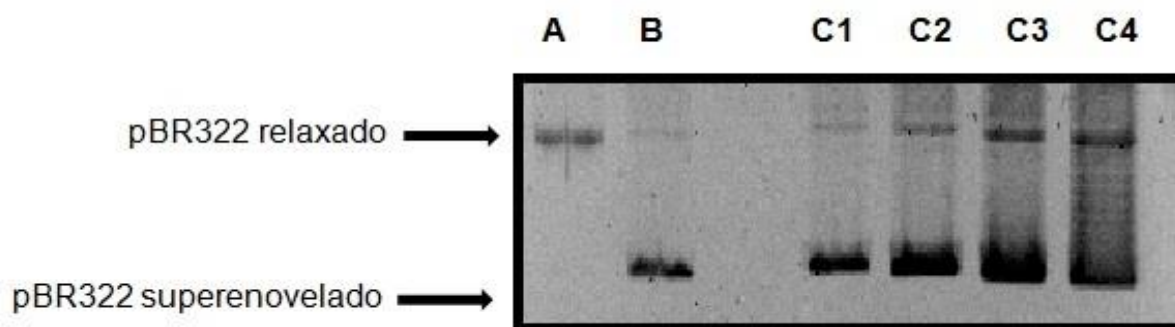
possível visualizar a existência da banda do plasmídeo superenovelado, evidenciando a capacidade de interação deste peptídeo com a enzima. O ensaio de eletroforese também mostrou que o análogo LeuC-1 (Figura 5) não apresenta capacidade de inibição da enzima DNA girase nas concentrações testadas.

**Figura 4** - Inibição da atividade de superenovelamento do DNA pelo LeuB. Volume de reação de 30  $\mu$ L contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 relaxado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 relaxado e DNA girase (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBr322 relaxado, DNA girase (1U) e LeuB. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50  $\mu$ mol/L, respectivamente.



**Fonte:** elaborado anteriormente pelo grupo de pesquisa (dados não publicados).

**Figura 5** - Inibição da atividade de superenovelamento do DNA pelo LeuC-1. Volume de reação de 30  $\mu$ L contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 relaxado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 relaxado e DNA girase (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBr322 relaxado, DNA girase (1U) e LeuC-1. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50  $\mu$ mol/L, respectivamente.



**Fonte:** elaborado pela autora.

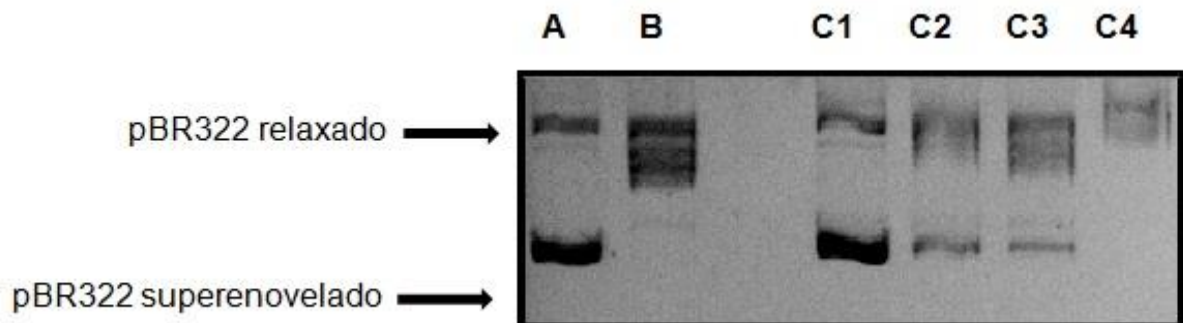
Em contraste com a DNA girase, que apresenta uma atividade no superenovelamento negativo do DNA, a Topo IV atua preferencialmente no relaxamento do DNA superenovelado (CHARVIN; BENSIMON; CROQUETTE, 2003; CRISONA et al., 2000; STONE et al., 2003). Portanto, é evidente que a Topo IV desempenhe um papel importante no processo de replicação, assim como a DNA girase, sendo um outro alvo de ação para agentes antimicrobianos, despertando assim o interesse em testar a atividade inibitória dos análogos das leucocinas, frente

à Topo IV. Para isso, a mesma técnica de eletroforese em gel de agarose foi utilizada, já que com ela é possível detectar alterações topológicas no DNA plasmídial, resultantes de reações catalisadas por esta enzima.

O ensaio de eletroforese com Topo IV (Figuras 6 e 7) revelou que LeuB apresenta capacidade de inibir a enzima em concentrações a partir de 100  $\mu\text{M}$ . Por sua vez, o análogo LeuC-1 não inibiu a enzima em nenhuma das concentrações testadas.

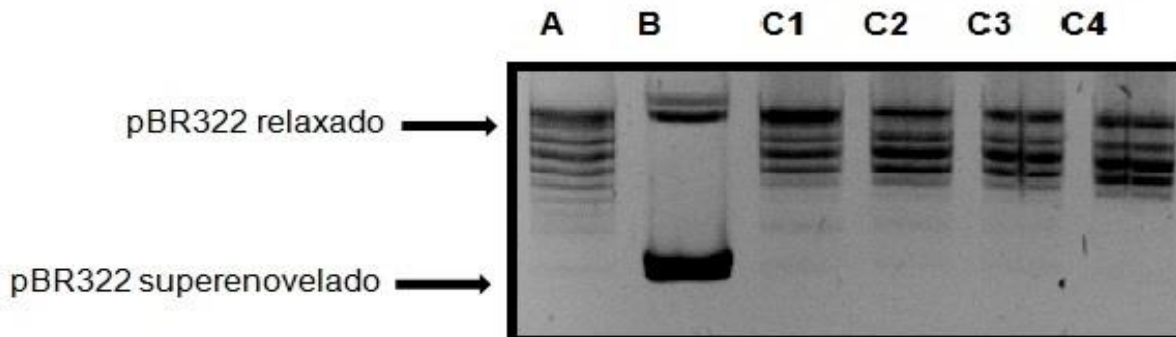
Estes resultados podem ser comparados com estudos utilizando outras bacteriocinas, como algumas Mcc, que apresentam capacidade de interferir na síntese de DNA como a MccB17 que inibe a DNA girase (HEDDLE et al., 2001; PARKS et al., 2007), e outras que atuam bloqueando outras enzimas ou formando poros nas membranas das bactérias (COTTER, 2014).

**Figura 6** - Inibição da atividade de relaxamento do DNA pelo LeuB. Volume de reação de 30  $\mu\text{L}$  contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 superenovelado e Topoisomerase IV (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, Topoisomerase IV (1U) e LeuB. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente.



**Fonte:** Elaborado anteriormente pelo grupo de pesquisa (dados não publicados).

**Figura 7** - Inibição da atividade de relaxamento do DNA pelo LeuC-1. Volume de reação de 30  $\mu$ L contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 superenovelado e Topoisomerase IV (1U) na ausência de inibidor; (linha B) plasmídeo pBr322 superenovelado controle (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, Topoisomerase IV (1U) e LeuC-1. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50  $\mu$ mol/L, respectivamente.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

Um estudo utilizando análogos peptídicos sintetizados com base na proteína ParE, demonstrou que alguns desses peptídeos foram capazes de inibir a atividade da DNA girase com  $IC_{100}$  (concentração inibitória de 100%) entre 20 e 40  $\mu$ M. Esses mesmo peptídeos também inibiram a atividade da Topo IV em concentrações entre 10 e 50  $\mu$ M. Esses resultados mostraram que a sequência de aminoácidos na estrutura secundária que representam na proteína original, foi importante para a promover a interação desses peptídeos com as topoisomerases bacterianas, promovendo sua inibição (BARBOSA et al., 2012).

Há também exemplos de análogos peptídicos sintéticos do CcdB atuando como inibidores enzimáticos, se destacando o análogo 3Cb, em que houve uma substituição do resíduo de serina por cisteína na posição 70, obtendo uma concentração inibitória na ordem de 15  $\mu$ M para DNA girase, valor inferior àqueles obtidos para a molécula de CcdB natural, e também de 15  $\mu$ M para a Topo IV (GARRIDO, 2007).

A partir destes resultados preliminares, observam-se indícios de uma possível relação estrutura-atividade entre os peptídeos sintetizados, como já havia sido relatado anteriormente (BARBOSA et al., 2012; GARRIDO, 2007; TROVATTI et al., 2008). Embora o modo de ação não tenha sido completamente elucidado, há indícios de que, esses peptídeos análogos de algumas leucocinas, possam ter alvos intracelulares, por exemplo, em topoisomerases e/ou outras enzimas que atuam em diferentes vias metabólicas das bactérias.

Conclui-se que o análogo LeuB foi mais eficiente, uma vez que inibiu, na mesma concentração, a atividade da DNA girase e Topo IV. Isto o torna um potencial



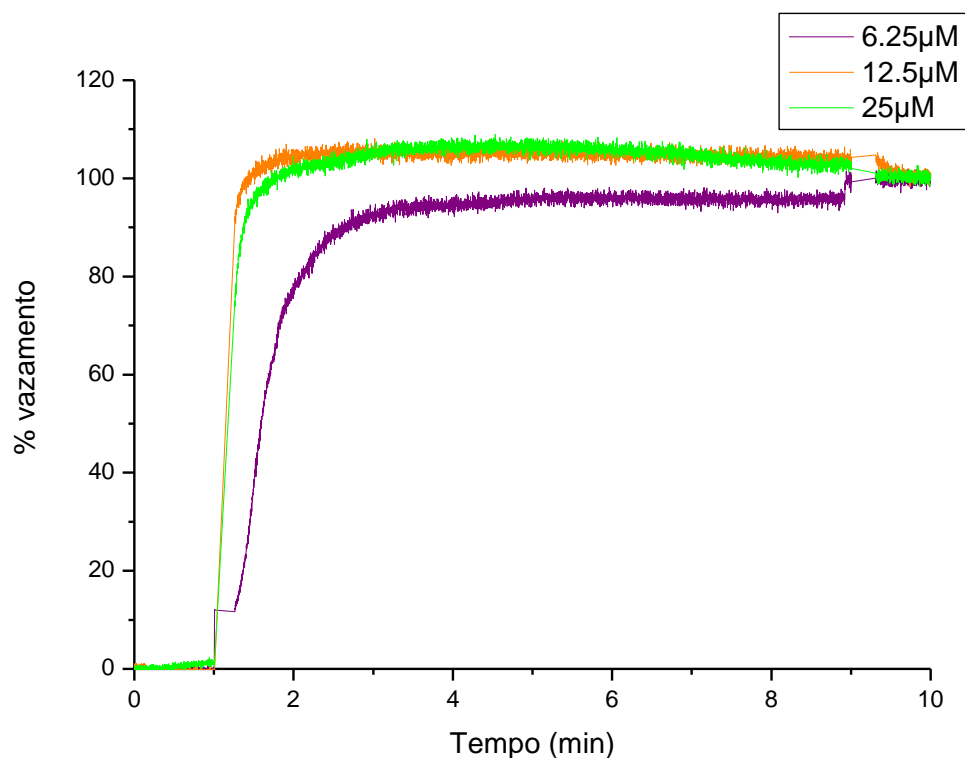
agente antimicrobiano de aplicação desejável na conservação de alimentos. Mas ao mesmo tempo não foi possível observar inibição das enzimas pelo peptídeo LeuC-1 nas concentrações testadas, podendo apresentar um mecanismo de ação diferente da inibição da síntese de DNA em bactérias. Portanto, é importante reforçar que as bacteriocinas desempenham diversos mecanismos de ação tanto exercendo atividade sobre membranas plasmáticas, quanto em alvos intracelulares, mecanismos estes já mencionados e exemplificados anteriormente.

#### **4.4 Vazamento de carboxifluoresceína**

Peptídeos antimicrobianos são atraídos para a superfície de bactérias através de interação eletrostática entre as estruturas dos componentes da superfície da membrana bacteriana e peptídeos aniônicos ou catiônicos (BROGDEN, 2005). Estes podem apresentar afinidade por um determinado componente lipídico constituinte das membranas de eucariotos e procariotos (CRUSCA et al., 2011; LORENZON et al., 2012). Esta afinidade pode ser estudada utilizando LUVs, produzidas a partir lipídeos neutros, carregados negativamente e/ou positivamente, comumente encontrados nessas membranas (LORENZON, 2015). Nos eucariotos encontramos em sua maioria, na face externa, fosfolipídeos zwitteriônicos (dipolares), enquanto que os procariotos apresentam em sua maioria fosfolipídeos negativos (GLUKHOV; BURROWS; DEBER, 2008; LORENZON, 2015; TOKE, 2005). LUVs contendo a CF encapsulada, permitem estudar o mecanismo de ação e seletividade de peptídeos antimicrobianos, que possuem como mecanismo de ação, a formação de poros em membranas (LORENZON et al., 2012). Estes peptídeos, ao interagirem com as membranas por mecanismos diversos, podem promover a formação de poros nas LUVs, permitindo assim a liberação do fluoróforo CF, o qual é então dosado por espectroscopia de fluorescência.

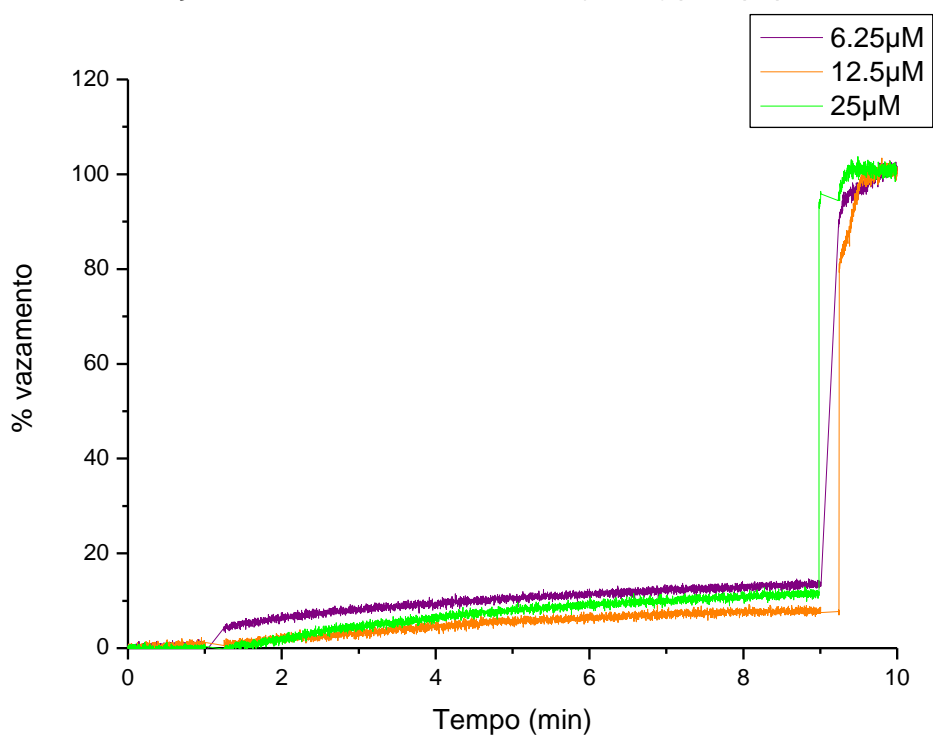
Os perfis de liberação de CF para os miméticos de membranas, LUVs contendo 75% de POPC e 25% de POPG, em diferentes concentrações dos peptídeos sintetizados, estão representados nos Gráficos 8 e 9. No valor da porcentagem de vazamento de CF para o LeuB, pode-se observar que as concentrações 12,5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  atingiram 100% e a concentração de 6,25  $\mu\text{M}$  aproximadamente 95% de rompimento. Por outro lado, o peptídeo LeuC-1 apresentou valores entre 7 e 11% para as mesmas concentrações testadas.

**Gráfico 8** - Permeabilização de LUVs de POPC/POPG (75/25) pelo peptídeo LeuB.



Fonte: elaborado pela autora.

**Gráfico 9** - Permeabilização de LUVs de POPC/POPG (75/25) pelo peptídeo LeuC-1.



Fonte: elaborado pela autora.

No presente estudo é observado para o peptídeo LeuB, o qual apresenta uma carga líquida de +6,1, que em baixa concentração (6,25 μM), este peptídeo é capaz

de permeabilizar as vesículas LUVs e liberar 95% do fluoróforo CF. Além disso, há uma pequena variação da porcentagem de permeabilização no mimético de membrana estudado de acordo com a alteração da concentração do peptídeo, o que pode estar relacionado a um processo de interação do peptídeo com a membrana, possibilitando o extravasamento de CF. Este resultado é bastante interessante pois demonstra um segundo possível mecanismo de ação associado a este peptídeo. Como foi observado nos ensaios de inibição da atividade de topoisomerasas bacterianas, este peptídeo inibiu a ação tanto da DNA girase, quanto da Topo IV a partir da concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Estes resultados podem contribuir em estudos futuros, onde pretendemos explorar mais as relações estruturais deste peptídeo com sua atividade antimicrobiana, tanto através da permeabilização de membranas, como também na inibição de topoisomerasas bacterianas.

No caso de LeuC-1, com uma carga líquida de +1, não foi observado liberação significativa de CF em nenhuma das concentrações de peptídeo testadas. A pequena porcentagem de CF detectada pode ter sido consequência de um fenômeno de formação de poros transitórios, em que há uma perturbação seguida pela restabilização transitória da bicamada lipídica, nivelando assim a quantidade de fluoróforo extravasado em função do tempo a uma concentração constante do peptídeo (ARBUZOVA; SCHWARZ, 1999) fato este também encontrado em outros estudos (HUGONIN et al., 2006; MAGZOUN et al., 2005; MATSUZAKI et al., 1998). Estes poros transitórios podem permitir a penetração do peptídeo para o interior das LUVs. No entanto, se este for o possível mecanismo de penetração de LeuC-1 nas células bacterianas, certamente seu alvo intracelular não são as topoisomerasas, já que este peptídeo não demonstrou inibição de DNA girase e Topo IV. Portanto, para elucidar o mecanismo de ação deste peptídeo, são necessários diversos estudos adicionais.

#### **4.5 Ensaio antioxidante**

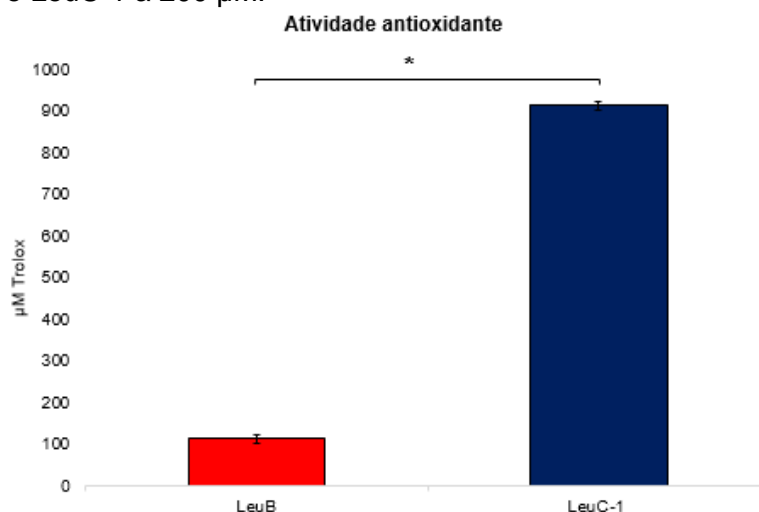
A oxidação no organismo de seres humanos é de extrema importância, pois os radicais livres devem ser eliminados do corpo por seus mecanismos de defesa e, quando não há um balanço na geração e destruição destes, ocorrem efeitos letais nas células o que é a causa de muitas doenças (SARMADI; ISMAIL, 2010). Além disso, há importância também da oxidação em alimentos, já que durante o seu

processamento e estocagem, a oxidação de óleos e gorduras causam deterioração do valor nutricional, sabor, textura, vida útil, e também produz toxinas (DONG et al., 2010; XIONG; DECKER, 1995).

Portanto, aumentou a utilização de antioxidantes sintéticos como o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), a fim de impedir a deterioração oxidativa em alimentos (HUBER; PIKE; HUBER; 1995). Entretanto, os efeitos adversos em humanos tem estimulado a busca por antioxidantes naturais (KIM et al., 2001; ZHANG; LI; ZHOU, 2010). A utilização de bacteriocinas também como antioxidantes, pode reduzir os danos ao organismo humano, por se tratar de compostos atóxicos. Neste aspecto, esta propriedade atribuída aos PAMs seria uma forma de agregar propriedades a esta classe de moléculas com grande interesse para a indústria processadora de alimentos.

Os resultados da atividade antioxidante dos peptídeos sintetizados a 200  $\mu\text{M}$  estão demonstrados no Gráfico 10, o qual apresenta os valores de atividade antioxidante em equivalentes Trolox. Dentre os peptídeos, o de maior atividade foi o LeuC-1 (913,33  $\mu\text{Mol Trolox}$ ). Já LeuB, apresentou atividade antioxidante inferior (114  $\mu\text{Mol Trolox}$ ). Embora vários estudos tenham sido realizados, o mecanismo responsável pela atividade antioxidante de peptídeos, não foi completamente elucidado, mas estão mais relacionados com a hidrofobicidade, estrutura e composição de aminoácidos dos peptídeos (CHEN et al., 1998).

**Gráfico 10** - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox pelo método ABTS para os peptídeos LeuB e LeuC-1 a 200  $\mu\text{M}$ .



\* As médias diferem pelo Teste-t com variâncias equivalentes. As amostras foram avaliadas sob o nível de significância de 5%.

**Fonte:** elaborado pela autora.

Os aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos, como o triptofano (presente nos dois análogos) e tirosina (presente apenas no LeuC-1), de acordo com Rajapakse e colaboradores (2005a) tem a capacidade de doar prótons aos radicais deficientes em elétrons e o triptofano serve como doador de hidrogênio através de seu grupo indol. Segundo Dávalos e colaboradores (2004) os aminoácidos como o triptofano, tirosina e metionina apresentam uma atividade antioxidante maior, seguidos pelos resíduos de cisteína, histidina e fenilalanina. A histidina também está relacionada com a doação de hidrogênio, aprisionamento do radical peroxidil e/ou com a habilidade de quelar íons metálicos através do seu grupo imidazol (CHAN; DECKER; FEUSTMAN, 1994; RAJAPAKSE et al., 2005a). Já a cisteína, aminoácido presente apenas no análogo LeuC-1, possui um papel crucial na ação antioxidante, pois seu grupo -SH interage diretamente com radicais livres (QIAN; JUNG; KIM, 2008). Há relatos de que a lisina, aminoácido presente em ambos os peptídeos estudados, também é responsável pela atividade antioxidante (WANG; MEJIA; GONZALEZ, 2005). Em outros estudos a leucina (ALEMÁN et al., 2011; LI et al., 2007; PARK et al., 2001), a glicina e prolina, mostraram aumentar a atividade sequestradora de radicais livres dos peptídeos (CHEN et al, 1996; MENDIS; RAJAPAKSE; KIM, 2005; RAJAPAKSE et al., 2005b). Os aminoácidos hidrofóbicos permitem o aumento da solubilidade do peptídeo em ambiente apolares, facilitando a interação com radicais livres e assim promovendo a atividade antioxidante (KIM; JE; KIM, 2007). Embora muitos peptídeos não apresentem em sua sequência estes aminoácidos doadores de prótons, alguns tem mostrado atividade antioxidante (ALEMÁN et al., 2011). Portanto, são necessários mais estudos para esclarecer tal mecanismo.

Contudo, estes resultados não corroboram com estudos que dizem que peptídeos de baixos pesos moleculares possuem uma atividade antioxidante melhor (DONG et al., 2010; REN et al., 2008; ZHU et al., 2008) em que peptídeos com massa molecular entre 500 e 1500 Da apresentam uma atividade antioxidante maior do que os que possuem acima de 1500 e abaixo de 500 Da (LI; HAN; CHEN, 2008; SARMADI; ISMAIL, 2010). Segundo Abeyrathne e colaboradores (2016), a formação de pequenos peptídeos provenientes do fracionamento de hidrolisados da ovomucina proporcionou a diminuição da atividade antioxidante devido a redução do tamanho.

As porcentagens de redução do radical ABTS estão expressos na Tabela 5, mostrando que os análogos LeuB e LeuC-1 apresentaram diferença significativa, onde

LeuC-1 apresentou 37,5% de propriedade redutora à uma concentração de 200µM. Além de apresentar em sua estrutura aminoácidos que favorecem a atividade antioxidante, este peptídeo também é mais hidrofóbico, evidenciando que a propriedade antioxidante é resultante de vários fatores como a hidrofobicidade, estrutura e composição de aminoácidos, e não somente da ação de cada aminoácido presente na sequência do peptídeo. O aumento da hidrofobicidade contribui para a solubilidade do peptídeo em lipídeos, o que melhora a atividade antioxidante (RAJAPAKSE et al., 2005b; ZHU; ZHOU; QIANG, 2006).

**Tabela 5** - Porcentagem de redução do radical ABTS pelos peptídeos a 200 µM.

<b>Peptídeos</b>	<b>% de Redução de ABTS</b>
<b>LeuB</b>	5,4 % ± 0,47 <sup>A</sup>
<b>LeuC-1</b>	37,5 % ± 0,47 <sup>B</sup>

\*Médias seguidas por letras distintas diferem pelo Teste-t com variâncias não equivalentes. As amostras foram avaliadas sob o nível de significância de 5%.

**Fonte:** elaborado pela autora.

Observamos que a propensão em inibir a oxidação é considerada baixa no peptídeo LeuB, mas no peptídeo LeuC-1 o valor obtido é relevante. Entretanto, o uso de bacteriocinas na biopreservação de alimentos requer a associação com outros sistemas de conservação, com os quais agem sinergicamente, garantindo à extensão da vida de prateleira e melhoria da segurança dos alimentos.

#### **4.6 Ensaio de toxicidade dos peptídeos: atividade hemolítica**

Muitos estudos são realizados com o intuito de compreender as características químicas e estruturais das bacteriocinas, mas são poucos os estudos que relatam sobre o potencial toxigênico. Apesar disso, é de extrema importância o conhecimento da toxicidade destes peptídeos em relação às células eucarióticas sustentando seu papel como conservante de alimentos. Portanto, há a necessidade de estudar a relação da atividade antimicrobiana com a citotoxicidade dos peptídeos.

As embalagens ativas são utilizadas na Austrália, Estados Unidos, e no Japão, mas a sua utilização na Europa tem sido limitada (DE KRUIJF; VAN BEEST, 2003). Em 2009 novas regras e orientações foram introduzidas na Europa, como por exemplo, substâncias que não foram avaliadas pela Autoridade Europeia de

Segurança dos Alimentos (EFSA) exigirá estudo de migração para os alimentos e testes toxicológicos (HARRINGTON, 2010). E quando há migração do antimicrobiano da embalagem para o alimento é considerado como aditivo alimentar, por isso deve satisfazer os padrões de aditivos alimentares (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; MILLS et al., 2011b).

O desenvolvimento de novos conservantes de alimentos requer que eles não atuem nas células eucarióticas. Portanto, o ensaio de atividade hemolítica foi realizado com o intuito de investigar a toxicidade dos peptídeos, o qual permite quantificar o dano causado por substâncias sobre a membrana plasmática dos eritrócitos e a consequente liberação da hemoglobina (hemólise) (ALVES, 2003, PAPE, HOPPE, 1990). Quando livre no plasma, a hemoglobina causa danos aos órgãos vitais como coração, fígado e rins, portanto se faz necessário a avaliação desta atividade (BEDNARCZUK et al., 2010; CARVALHO et al., 2007).

Obtivemos o percentual de atividade hemolítica para estes análogos nas diferentes concentrações testadas, cujos resultados estão representados, a seguir, na Tabela 6. Estes resultados não foram observados no ensaio de vazamento de CF, o que pode estar relacionado com a diferença na composição lipídica das membranas de eucariotos e procariotos, já mencionados anteriormente no item 4.4.

**Tabela 6** - Percentual de atividade hemolítica para os análogos LeuB e LeuC-1.

<b>Peptídeos</b>	<b>200 µM</b>	<b>150 µM</b>	<b>100 µM</b>	<b>50 µM</b>
<b>LeuB</b>	1,34% ± 0,01 <sup>b</sup>	1,58% ± 0,01 <sup>a</sup>	0,21% ± 0,05 <sup>c</sup>	0,03% ± 0,08 <sup>d</sup>
<b>LeuC-1</b>	2,13% ± 0,85 <sup>a</sup>	1,20% ± 0,40 <sup>a</sup>	1,66% ± 0,89 <sup>a</sup>	1,42% ± 1,63 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não apresentam diferença estatística sob o nível de significância de 5%. O teste foi realizado pelo ANOVA.

**Fonte:** elaborado pela autora.

Como é possível observar, os valores de porcentagem de hemólise para ambos os análogos peptídicos foram menores que 12% na maior concentração testada (200 µM). Este valor percentual é considerado mínimo, estando dentro do valor de segurança (OLIVEIRA, 2014).

A listeriolisina O, uma hemolisina, produzidas por estirpes de *L. monocytogenes*, apresenta atividade citotóxica para células eucarióticas, que causam danos às membranas (MOUNIER et al., 1990; SAMPATHKUMAR et al., 1999;

TILNEY; PORTNOY, 1989). Em um estudo em que uma cepa *Bacillus subtilis* que produz a listeriolisina O, fora encapsulada em uma membrana de composição bastante elaborada, o composto exerceu uma atividade citotóxica e hemolítica (STACHOWIAK et. al., 2011). De acordo com Fermanian e Wong (2000), a hemolisina BL produzida por *B. cereus* é composta de três proteínas distintas, as quais não são tóxicas, mas quando combinadas são hemolíticas e citotóxicas para diversas células e tecidos (SCHULZ et al., 2008). Esta característica, portanto, não foi observada no estudo da toxicidade em hemácias para os peptídeos testados.

De acordo com os resultados expostos acima, os análogos possuem uma baixa atividade em eritrócitos, um fator que os tornam potenciais conservadores de alimentos. No entanto, são necessários outros ensaios mais detalhados para a investigação de citotoxicidade em outros alvos em humanos e sua especificidade em células bacterianas.

#### **4.7 Dicroísmo Circular**

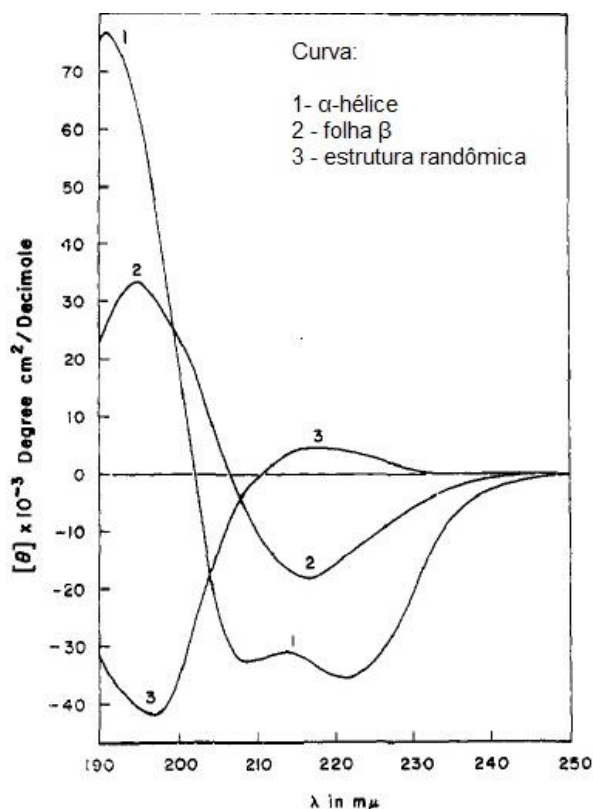
O CD foi realizado neste trabalho a fim de fornecer informações sobre a possível estrutura tridimensional dos peptídeos sintetizados, uma vez que a espectroscopia de CD permite investigar a estrutura secundária, em solução, de proteínas e peptídeos, por exemplo (BEROVA; DI BARI; PESCIPELLI, 2007; GREENFIELD, 1999; WHITMORE; WALLACE, 2007). Muitos peptídeos que não possuem pontes dissulfeto apresentam, em água, estruturas aleatórias, mas quando entram em contato com membrana, meio auto-agregado ou hidrofóbico, esses peptídeos não capazes de formar uma estrutura (BELLO; BELLO; GRANADOS, 1982; FALLA; KARUNARATNE; HANCOCK, 1996). Portanto, este ensaio é importante para obter uma relação entre a estruturas dos peptídeos e as suas atividades e/ou mecanismos de ação.

Cada aminoácido da cadeia polipeptídica apresenta três ligações covalentes. Os ângulos de ligação  $\Phi$  (phi) e  $\psi$  (psi) são formados em torno das ligações HN-C $\alpha$  e C $\alpha$ -C=O, respectivamente, pois essas regiões são possíveis de rotacionar. Enquanto isso, as ligações C-N apresentam caráter de dupla ligação, por isso a rotação livre ao redor da ligação peptídica é impedida. Portanto, os ângulos  $\Phi$  e  $\psi$  que são responsáveis pelos espectros de CD característicos das  $\alpha$ -hélice, folha  $\beta$  e estrutura randômica (NELSON; COX, 2011). Os espectros característicos observados são:



bandas negativas a 222 nm e 208 nm e uma banda positiva em 193 nm para cadeias polipeptídicas estruturadas em  $\alpha$ -hélice; bandas negativas a 218 nm e positiva a 195 nm para folha  $\beta$ ; e para estruturas randômicas que possuem uma elipticidade baixa acima de 210 nm e bandas negativas próximas de 195 nm (Figura 8) (GREENFIELD; FASMAN, 1969; GREENFIELD, 2006).

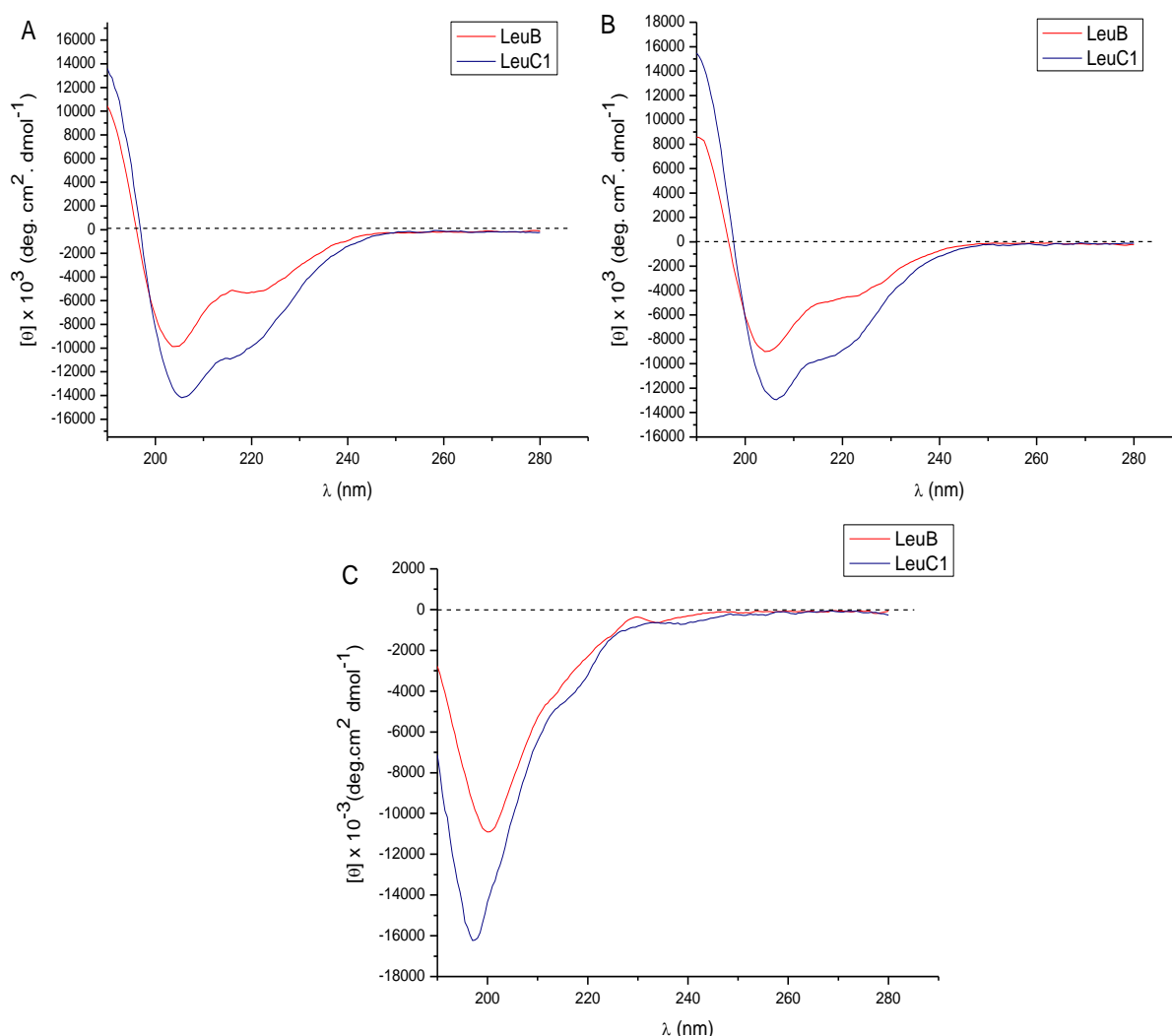
**Figura 8** - Espectro de CD característicos das estruturas secundárias  $\alpha$ -hélice, folha  $\beta$  e estrutura randômica.



**Fonte:** Greenfield; Fasman (1969).

Os resultados obtidos através da espectroscopia de CD estão apresentados na Figura 9. Os dados revelam que ambos os peptídeos em solução aquosa não apresentam uma estrutura secundária definida (Figura 9c). Enquanto isso, os peptídeos LeuB e LeuC-1 adquiriram uma tendência à formação de uma estrutura helicoidal em TFE 60% e SDS 25 mM. Isso pode ser observado devido a presença dos picos positivos em torno de 195 nm, negativos a 208 nm e a 222 nm, característicos de  $\alpha$ -hélice (Figuras 9a e 9b).

**Figura 9** - Espectros de CD dos peptídeos LeuB e LeuC-1 a 60  $\mu$ M em (A) TFE, (B) SDS e (C) solução aquosa.



**Fonte:** elaborado pela autora.

Na literatura, já foram reportados estudos relacionados às estruturas secundárias das Leucocinas B-TA33a e C-TA33a. Segundo Papathanasopoulos e colaboradores (1998) que determinaram a sequência das Leucocinas A, B e C produzidas pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* TA33a e também analisaram a estrutura secundária, em que mostraram, através da técnica de CD, que elas parecem ter uma estrutura menos ordenada em água e, em SDS micelar 10 mM, espectros mais típicos de folhas- $\beta$  do que  $\alpha$ -hélice. Este dado obtido em SDS, não condiz com os nossos resultados, já que os peptídeos sintetizados apresentaram espectros característicos de  $\alpha$ -hélice. De acordo com Corbier e colaboradores (2001) em um estudo com a B-TA33a obtida através da SPFS, mostrou que em solução aquosa, o peptídeo permanece essencialmente desordenado. Entretanto, na presença de SDS

(5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  e 10 mM) é obtida uma aparência helicoidal e com TFE a 50% apresenta espectro típico de peptídeos parcialmente  $\alpha$ -helicoidais, com teor máximo de 43% de hélice. Estes últimos dados com SDS e TFE corroboram com os resultados do LeuB, em que também obtivemos a tendência à formação de  $\alpha$ -hélice nessas duas condições testadas.

Uma hipótese para essa variação, seria a obtenção das bacteriocinas em questão, pois no estudo em que os resultados não foram concordantes, as leucocinas foram produzidas de formas naturais, já o outro em que mostrou dados semelhantes, foram sintetizadas pela mesma metodologia de SPFS. No entanto, outros estudos devem ser realizados, como a estimativa das porcentagens que cada peptídeo adota uma determinada estrutura secundária e a predição da estrutura secundária.

## 5 CONCLUSÕES

De modo geral, os peptídeos LeuB e LeuC-1 objetos deste estudo, demonstraram capacidade de inibição do crescimento bacteriano tanto de bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, o que os diferem de outras bacteriocinas relatadas na literatura.

Foi possível concluir que os mecanismos de ação apresentado pelos peptídeos são diferentes, evidenciando que LeuB apresenta um alvo intracelular, demonstrado pela capacidade de inibição da atividade das enzimas DNA girase e Topo IV a partir da concentração de 100  $\mu\text{M}$ , além de ter uma grande capacidade de permeabilização em miméticos de membrana bacteriana. Em contrapartida, não foi encontrado atividade inibitória em topoisomerases bacterianas e, tampouco, capacidade de permeabilização em miméticos de membranas para o peptídeo LeuC-1. No entanto, uma possível interação com a membrana bacteriana, pode ser a maneira que torna este peptídeo capaz de inibir o crescimento bacteriano das espécies testadas.

O peptídeo LeuC-1 apresentou maior atividade antioxidante, podendo inibir a oxidação lipídica e deterioração dos alimentos. Esta capacidade não foi encontrada em valores expressivos para o peptídeo LeuB. É possível que a maior capacidade antioxidante de LeuC-1 seja atribuída à presença de alguns resíduos de aminoácidos e hidrofobicidade deste peptídeo.

Com relação à toxicidade, ambos os peptídeos apresentaram baixo potencial toxigênico em eritrócitos, estando dentro da faixa de segurança. Esta característica

dos peptídeos objeto deste trabalho é um fator bastante favorável para a aplicação como agentes de conservação de alimentos.

Com relação à conformação dos peptídeos, ambos apresentaram tendência em se estruturar em  $\alpha$ -hélice, fato este que contradiz um relato da literatura. Esta característica pode estar relacionada ao fato dos peptídeos terem sido obtidos através da técnica de SPFS, no entanto estudos complementares devem ser realizados para tal conclusão.

Diante destes fatos, as leucocinas constituem uma classe de biomoléculas com grande potencial para aplicação na indústria de alimentos e processamento de alimentos, podendo ser utilizadas como modelo de estudo para o desenvolvimento de novos agentes para a conservação e manutenção das propriedades naturais de alimentos.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Tendo em vista que os peptídeos estudados se mostraram promissores para aplicação como conservantes de alimentos, esperamos realizar estudos futuros mais aprofundados em relação a sua citotoxicidade, inibição de crescimentos em outros microrganismos de importância na área de alimentos. Vislumbramos também, aplicar estes compostos, por exemplo para o desenvolvimento de embalagens à vácuo, a fim de controlar a contaminação dos alimentos e também permitir um tempo prolongado de vida útil (tempo de prateleira) para aqueles que estiverem em contato com estas possíveis embalagens. Esta possibilidade deve-se ao fato dos peptídeos desenvolvidos neste trabalho terem sido classificados como bacteriostático podendo, portanto, controlar o crescimento dos microrganismos naturalmente encontrados em alimentos. Pretendemos também associar os peptídeos LeuB e LeuC-1 em testes frente a estes microrganismos. Esperamos que juntos possam apresentar efeito sinérgico ao serem combinados, potencializando e/ou ampliando o espectro de ação destes conjugados de bacteriocinas.

## REFERÊNCIAS

- ABEYRATHNE, E. D. N. S.; LEE, H. Y.; JOC, C.; SUH, J. W.; AHN, D. U. Enzymatic hydrolysis of ovomucin and the functional and structural characteristics of peptides in the hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 192, p. 107-113, 2016.
- ALEMÁN, A.; GIMÉNEZ, B.; PÉREZ-SANTIN, E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 334-341, 2011.
- ALVES, E. N. **Red Blood Cell (RBC) – teste de hemólise**: uma alternativa ao teste de Draize – irritação ocular na avaliação do poder tóxico de produtos cosméticos no controle de qualidade. 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.
- APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, n. 2, p. 113-126, 2002.
- ARBUZOVA, A.; SCHWARZ, G. Pore-forming action of mastoparan peptides on liposomes: a quantitative analysis. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1420, n. 1, p. 139-152, 1999.
- ASENSIO, C.; PÉREZ-DÍAZ, J. C.; MARTÍNEZ, M. C.; BAQUERO, F. A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 69, n. 1, p. 7-14, 1976.
- AYMERICH, T.; PICOUET, P. A.; MONFORT, J. M. Decontamination technologies for meat products. **Meat Science**, v. 78, n. 1, p. 114-129, 2008.
- BAQUERO, F.; MORENO, F. The microcins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 23, n. 2/3, p. 117-124, 1984.
- BARBOSA, L. C. B.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; DELFINO, D. B.; SANTOS, L. do N.; MARCHETTO, R. Design and synthesis of peptides from bacterial ParE toxin as inhibitors of topoisomerases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 591-596, 2012.
- BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, p. 43-50, 2010.
- BELLO, J.; BELLO, H. R.; GRANADOS, E. Conformation and aggregation of melittin: dependence of pH and concentration. **Biochemistry**, v. 21, n. 3, p. 461-465, 1982.
- BEROVA, N.; DI BARI, L.; PESCIPELLI, G. Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 6, p. 914-931, 2007.

BHUNIA, A. K.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 261-268, 1988.

BIERBAUM, G.; SAHL, H. G. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 2-18, 2009.

BLOM, H.; KATLA, T.; HOLCK, A.; SLETTEN, K.; AXELSSON, L.; HOLO, H. Characterization, production, and purification of leucocin H, a two-peptide bacteriocin from *Leuconostoc* MF215B. **Current Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 43-48, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília, DF, 2010. (Série A: normas e manuais técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. [Brasília, DF], maio 2017.

Disponível em:

<<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>>. Acesso em: 8 jul. 2017.

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

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CARVALHO, E. B.; BORGES, E. L.; CARLOS, L. M. B.; SILVA, M. A. M.; MAGALHÃES, S. M. M.; GOMES, F. V. B. A. F.; CARVALHO, M. J. C.; QUIXADÁ, A. T. S.; PITOMBEIRA, M. H. S. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrado de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 149-152, 2007.

CHALÓN, M. C.; ACUÑA, L.; MORERO, R. D.; MINAHK, C. J.; BELLOMIO, A. Membrane-active bacteriocins to control *Salmonella* in foods: are they the definite hurdle? **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 735-744, 2012.

CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 369-413, 2001.

CHAN, K. M.; DECKER, E. A.; FEUSTMAN, C. Endogenous skeletal muscle antioxidants. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 34, n. 4, p. 403-426, 1994.

CHARVIN, G.; BENSIMON, D.; CROQUETTE, V. Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 17, p. 9820-9825, 2003.

CHEN, H.; HOOVER, D. G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 3, p. 82-100, 2003.

CHEN, H. M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; NOKIHARA, K. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2619-2623, 1996.

CHEN, H. M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; FUJIMOTO, K.; NOKIHARA, K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 49-53, 1998.

CHEN, Y.; SHAPIRA, R.; EISENSTEIN, M.; MONTVILLE, T. J. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 524-531, 1997.

CHIKINDAS, M. L.; WEEKS, R.; DRIDER, D.; CHISTYAKOV, V. A.; DICKS, L. M. T. Functions and emerging applications of bacteriocins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 23-28, 2018.

CHUNG, K. T.; DICKSON, J. S.; CROUSE, J. D. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1329-1333, 1989.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001.

COLLIN, F.; KARKARE, S.; MAXWELL, A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 479-497, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M07-A10**: methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved guideline. Wayne, 2015. v. 35, n. 2. Disponível em: <<http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2015-M07-A10-original.pdf>>. Acesso em: 11 jul. 2016.

CORBETT, K. D.; BERGER, J. M. Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. **Annual Review of Biophysics Biomolecular Structure**, v. 33, p. 95-118, 2004.

CORBIER, C.; KRIER, F.; MULLIERT, G.; VITOUX, B.; REVOL-JUNELLES, A. M. Biological activities and structural properties of the atypical bacteriocins mesenterocin 52B and leucocin B-TA33a. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1418-1422, 2001.

COTTER, P. D. An 'Upp'-turn in bacteriocin receptor identification. **Molecular Microbiology**, v. 92, n. 6, p. 1159-1163, 2014.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 95-105, 2013.

COUTURIER, M.; BAHASSI, E. M.; VAN MELDEREN, L. Bacterial death by DNA gyrase poisoning. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 7, p. 269-275, 1998.

CRISONA, N. J.; STRICK, T. R.; BENSIMON, D.; CROQUETTE, V.; COZZARELLI, N. R. Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. **Genes & Development**, v. 14, n. 22, p. 2881-2892, 2000.

CRUSCA, E.; REZENDE, A. A.; MARCHETTO, R.; MENDES-GIANNINI, M. J.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. Influence of N-terminus modifications on the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide Hylin-a1. **Biopolymers**, v. 96, n. 1, p. 41-48, 2011.

CUTTER, C. N.; SIRAGUSA, G. R. Population reductions of Gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 9, p. 977-983, 1995.

DAESCHEL, M. A.; MCGUIRE, J.; AL-MAKHLAFI, H. Antimicrobial activity of nisin adsorbed to hydrophilic and hydrophobic silicon surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 9, p. 731-735, 1992.

DÁVALOS, A.; MIGUEL, M.; BARTOLOMÉ, B.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 9, p. 1939-1944, 2004.

DE KRUIJF, N.; VAN BEEST, M. D. Active packaging. In: HELDMAN, D. R. (Ed.). **Encyclopedia of agricultural, food, and biological engineering**. London: Marcel Dekker, 2003. p. 5-9.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; THOMAS, X.; SANTAMARIA, M.; GOULARD, C.; BARTHÉLÉMY, M.; BOSCHER, B.; BESSIN, Y.; MOLLE, G.; PONS, A. M.; LETELLIER, L.; PEDUZZI, J.; REBUFFAT, S. Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1031-1041, 2003.



DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; DUQUESNE, S.; PEDUZZI, J.; GOULARD, C.; DESMADRIL, M.; LETELLIER, L.; REBUFFAT, S.; BOULANGER, P. The iron-siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val11–Pro16  $\beta$ -hairpin region in the recognition mechanism. **Biochemical Journal**, v. 389, n. 3, p. 869-876, 2005.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; PEDUZZI, J.; THOMAS, X.; DJEDIAT, C.; REBUFFAT, S. Parasitism of iron-siderophore receptors of *Escherichia coli* by the siderophore-peptide microcin E492m and its unmodified counterpart. **Biometals**, v. 19, n. 2, p. 181-191, 2006.

DIEP, D. B.; SKAUGEN, M.; SALEHIAN, Z.; HOLO, H.; NES, I. F. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 104, n. 7, p. 2384-2389, 2007.

DONG, X. P.; ZHUINFFLA, B. W.; ZHAO, H. X.; ZHOU, D. Y.; WU, H. T.; YANG, J. F.; LI, D. M.; MURATA, Y. Preparation and in vitro antioxidante activity of enzymatic hydrolisates from oyster (*Crassostrea talienwhannensis*) meat. **International Journal of Food Science and Techonology**, v. 45, p. 978-984, 2010.

DUQUESNE, S.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; PEDUZZI, J.; REBUFFAT, S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 4, p. 708-734, 2007.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **EFSA explains zoonotic diseases: food-borne zoonotic diseases**. Parma, 2011. 4 p.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY; EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. **EFSA Journal**, v. 14, n. 12, 2016. doi:10.2903/j.efsa.2016.4634.

FALLA, T. J.; KARUNARATNE, D. N.; HANCOCK, R. E. W. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 32, p. 19298-19303, 1996.

FERMANIAN, C. F.; WONG, A. C. L. Improved in vitro detection of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 1-8, 2000.

FLEURY, Y.; DAYEM, M. A.; MONTAGNE, J. J.; CHABOISSEAU, E.; LE CAER, J. P.; NICOLAS, P.; DELFOUR, A. Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 10537, a defensive peptide from Gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 24, p. 14421-14429, 1996.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Specifications for identity and purity of food additives and their toxicological evaluation**: some antibiotics. Geneva, 1969.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 51-70, 2007.

GARCÍA, P.; RODRÍGUEZ, L.; RODRÍGUEZ, A.; MARTÍNEZ, B. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 8, p. 373-382, 2010.

GARCIA-BUSTOS, J. F.; PEZZI, N.; MENDEZ, E. Structure and mode of action of microcin 7, an antibacterial peptide produced by *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, n. 5, p. 791-797, 1985.

GARDNER, M. J.; HALL, N.; FUNG, E.; WHITE, O.; BERRIMAN, M.; HYMAN, R. W.; CARLTON, J. M.; PAIN, A.; NELSON, K. E.; BOWMAN, S.; PAULSEN, I. T.; JAMES, K.; EISEN, J. A.; RUTHERFORD, K.; SALZBERG, S. L.; CRAIG, A.; KYES, S.; CHAN, M.-S.; NENE, V.; SHALLOM, S. J.; SUH, B.; PETERSON, J.; ANGIUOLI, S.; PERTEA, M.; ALLEN, J.; SELENGUT, J.; HAFT, D.; MATHER, M. W.; VAIDYA, A. B.; MARTIN, D. M. A.; FAIRLAMB, A. H.; FRAUNHOLZ, M. J.; ROOS, D. S.; RALPH, S. A.; McFADDEN, G. I.; CUMMINGS, L. M.; SUBRAMANIAN, G. M.; MUNGALL, C.; VENTER, J. C.; CARUCCI, D. J.; HOFFMAN, S. L.; NEWBOLD, C.; DAVIS, R. W.; FRASER, C. M.; BARRELL, A. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 498-511, 2002.

GARRIDO, S. S. **Novos inibidores peptídicos de topoisomerasas bacterianas estruturalmente derivados da proteína CcdB**. 2007. 115 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

GLUKHOV, E.; BURROWS, L. L.; DEBER, C. M. Membrane interactions of designed cationic antimicrobial peptides: the two thresholds. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 360-371, 2008.

GREENFIELD, N. J. Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 236-244, 1999.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876-2890, 2006.

GREENFIELD, N.; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108-4116, 1969.

GONZALEZ, C. F.; KUNKA, B. S. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 10, p. 2534-2538, 1987.

GORMLEY, N. A.; ORPHANIDES, G.; MEYER, A.; CULLIS, P. M.; MAXWELL, A. The interaction of coumarin antibiotics with fragments of the DNA gyrase B protein. **Biochemistry**, v. 35, n. 15, p. 5083-5092, 1996.

HANCOCK, R. E. W.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1317-1323, 1999.

HANCOCK, R. E. W.; FALLA, T.; BROWN, M. Cationic bactericidal peptides. **Advances in Microbial Physiology**, v. 37, p. 135-175, 1995.

HARDY, C. D.; COZZARELLI, N. R. Alteration of *Escherichia coli* topoisomerase IV to novobiocin resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 941-947, 2003.

HARRINGTON, R. Active and intelligent packaging regs-evolution and innovation. **Confectionery News.com**, 2010. Disponível em: <<http://www.confectionerynews.com/Processing-Packaging/Active-and-intelligent-packaging-regs-evolution-and-innovation>>. Acesso em: 17 jul. 2017.

HEDDLE, J. G.; BLANCE, S. J.; ZAMBLE, D. B.; HOLLFELDER, F.; MILLER, D. A.; WENTZELL, L. M.; WALSH, C. T.; MAXWELL, A. The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterisation of the mode of inhibition. **Journal of Molecular Biology**, v. 307, n. 5, p. 1223-1234, 2001.

HOOPER, D. C. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. S54-S63, 1998. Suppl. 1.

HUBER, K. C.; PIKE, O. A.; HUBER, C. S. Antioxidant inhibition of cholesterol oxidation in a spray-dried food system during accelerated storage. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 5, p. 909-912, 1995.

HUGONIN, L.; VUKOJEVIĆ, V.; BAKALKIN, G.; GRÄSLUND, A. Membrane leakage induced by dynorphins. **FEBS Letters**, v. 580, n. 13, p. 3201-3205, 2006.

JEEVARATNAM, K.; JAMUNA, M.; BAWA, A. S. Biological preservation of foods—bacteriocins of lactic acid bacteria. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 446-454, 2005.

JIANG, Y.; POGLIANO, J.; HELINSKI, D. R.; KONIECZNY, I. ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 971-979, 2002.

KAISER, E.; COLESCOTT, T. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, p. 595-598, 1970.

KALCHAYANAND, N.; DUNNE, P.; SIKES, A.; RAY, B. Viability loss and morphology change of foodborne pathogens following exposure to hydrostatic pressures in the presence and absence of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 91-98, 2004.

KIM, S. K.; KIM, Y. T.; BYUN, H. G.; PARK, P. J.; ITO, H. Purification and characterization of antioxidative peptides from bovine skin. **BMB Reports**, v. 34, n. 3, p. 219-224, 2001.

KIM, S. Y.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 1, p. 31-38, 2007.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1/3, p. 39-85, 1993.

LAGOS, R.; TELLO, M.; MERCADO, G.; GARCÍA, V.; MONASTERIO, O. Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 74-85, 2009.

LAPONOGOV, I.; SOHI, M. K.; VESELKOV, D. A.; PAN, X. S.; SAWHNEY, R.; THOMPSON, A. W.; McAULEY, K. E.; FISHER, L. M.; SANDERSON, M. R. Structural insight into the quinolone–DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 6, p. 667-669, 2009.

LEE, C. H.; AN, D. S.; PARK, H. J.; LEE, D. S. Wide-spectrum antimicrobial packaging materials incorporating nisin and chitosan in the coating. **Packaging Technology and Science**, v. 16, n. 3, p. 99-106, 2003.

LEVINE, C.; HIASA, H.; MARIANS, K. J. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. **Biochimica et Biophysica Acta: Gene Structure and Expression**, v. 1400, n. 1, p. 29-43, 1998.

LI, B.; CHEN, F.; WANG, X.; JI, B.; WU, Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1135-1143, 2007.

LI, C.; KELLY, W. L. Recent advances in thiopeptide antibiotic biosynthesis. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 2, p. 153-164, 2010.

LI, X. X.; HAN, L. J.; CHEN, L. J. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 9, p. 1660-1666, 2008.

LIM, L.; McFADDEN, G. I. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1541, p. 749-763, 2010.

LORENZÓN, E. N. **Efeitos da dimerização na estrutura e atividade biológica dos peptídeos antimicrobianos Aureína 1.2 e Magainina 2**. 2015. 117 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

LORENZON, E. N.; CESPEDES, G. F.; VICENTE, E. F.; NOGUEIRA, L. G.; BAUAB, T. M.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. Effects of dimerization on the structure and biological activity of antimicrobial peptide Ctx-Ha. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3004-3010, 2012.

MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M. T. M. Síntese química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

MAGZOUB, M.; OGŁĘCKA, K.; PRAMANIK, A.; ERIKSSON, L. G.; GRÄSLUND, A. Membrane perturbation effects of peptides derived from the N-termini of unprocessed prion proteins. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1716, n. 2, p. 126-136, 2005.

MAKHAL, S.; KANAWJIA, S. K.; GIRI, A. Effect of microGARD on keeping quality of direct acidified Cottage cheese. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 936-943, 2015.

MANN, B.; KUMARI, A.; KUMAR, R.; SHARMA, R.; PRAJAPATI, K.; MAHBOOB, S.; ATHIRA, S. Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3235-3241, 2015.

MARCHETTO, R. **A química de peptídeos e o mecanismo de inibição da atividade da DNA girase**. 2006. 95 f. Tese (Livre-docência) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

MARQUARDT, M.; EIFLER-LIMA, V. L. A síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 846-855, 2001.

MARTIN, N. I.; BREUKINK, E. The expanding role of lipid II as a target for lantibiotics. **Future Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 513-525, 2007.

MATSUZAKI, K.; MITANI, Y.; AKADA, K. Y.; MURASE, O.; YONEYAMA, S.; ZASLOFF, M.; MIYAJIMA, K. Mechanism of synergism between antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa. **Biochemistry**, v. 37, n. 43, p. 15144-15153, 1998.

MAXWELL, A. DNA gyrase as a drug target. **Trends In Microbiology**, v. 5, p. 102-109, 1997.

MAXWELL, A.; COSTENARO, L.; MITELHEISER, S.; BATES, A. D. Coupling ATP hydrolysis to DNA strand passage in type IIA DNA topoisomerases. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, pt. 6, p. 1460-1464, 2005.

MELBY, J. O.; NARD, N. J.; MITCHELL, D. A. Thiazole/oxazole-modified microcins: complex natural products from ribosomal templates. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 3, p. 369-378, 2011.

MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S. K. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 581-587, 2005.

MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. I: the synthesis of a tetrapeptide. **Journal of American Chemical Society**, v. 85, p. 2149-2154, 1963.

METLITSKAYA, A.; KAZAKOV, T.; KOMMER, A.; PAVLOVA, O.; PRAETORIUS-IBBA, M.; IBBA, M.; KRASHENINNIKOV, I.; KOLB, V.; KHMEL, I.; SEVERINOV, K. Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptide nucleotide antibiotic microcin C. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 26, p. 18033-18042, 2006.

MILLS, S.; SERRANO, L. M.; GRIFFIN, C.; O'CONNOR, P. M.; SCHAAD, G.; BRUINING, C.; HILL, C.; ROSS, R. P.; MEIJER, W. C. Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. **Microbial Cell Factories**, v. 10, 2011a. Suppl. 1. doi:10.1186.2859-10-S1-S7.

MILLS, S.; STANTON, C.; HILL, C.; ROSS, R. P. New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, p. 299-329, 2011b.

MOUNIER, J.; RYTER, A.; COQUIS-RONDON, M.; SANSONETTI, P. J. Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocytelike cell line Caco-2. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 4, p. 1048-1058, 1990.

MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. **Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications**. 2nd ed. John Wiley & Sons, 2015. 392 p.

NAGANO, S.; SEKI, E.; LIN, T. Y.; SHIROUZU, M.; YOKOYAMA, S.; HEDDLE, J. G. Investigating the roles of the c-terminal domain of *Plasmodium falciparum* GyrA. **PloS One**, v. 10, n. 11, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0142313.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1328 p.

NISSEN-MEYER, J.; NES, I. F. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. **Archives of Microbiology**, v. 167, n. 2, p. 67-77, 1997.

NOVIKOVA, M.; METLITSKAYA, A.; DATSENKO, K.; KAZAKOV, T.; KAZAKOV, A.; WANNER, B.; SEVERINOV, K. The *Escherichia coli* Yej transporter is required for the uptake of translation inhibitor microcin C. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 8361-8365, 2007.

OLIVEIRA, I. C. **Síntese e estudos de sistemas de bioencapsulação associados a peptídeos antimicrobianos miméticos da toxina natural CcdB**. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

ONUMA, Y.; SATAKE, M.; UKENA, T.; ROUX, J.; CHANTEAU, S.; RASOLOFONIRINA, N.; RATSIMALOTO, M.; NAOKI, R.; YASUMOTO, T. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. **Toxicon**, v. 37, n. 1, p. 55-65, 1999.

O'SHEA, E. F.; COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Strategies to improve the bacteriocin protection provided by lactic acid bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 130-134, 2013.

PAPE, W. J.; HOPPE, U. Standardization of an in vitro red blood cell test for evaluating the acute cytotoxic potential of tensides. **Arzneimittel-Forschung**, v. 40, n. 4, p. 498-502, 1990.

PARK, P. J.; JUNG, W. K.; NAM, K. S.; SHAHIDI, F.; KIM, S. K. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 6, p. 651-656, 2001.

PARKS, W. M.; BOTTRILL, A. R.; PIERRAT, O. A.; DURRANT, M. C.; MAXWELL, A. The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. **Biochimie**, v. 89, n. 4, p. 500-507, 2007.

PAPATHANASOPOULOS, M. A.; KRIER, F.; REVOL-JUNELLES, A. M.; LEFEBVRE, G.; LE CAER, J. P.; VON HOLY, A.; HASTINGS, J. W. Multiple bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* TA33a and other *Leuconostoc/Weissella* strains. **Current Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 331-335, 1997.

PAPATHANASOPOULOS, M. A.; DYKES, G. A.; REVOL-JUNELLES, A. M.; DELFOUR, A.; VON HOLY, A.; HASTINGS, J. W. Sequence and structural relationships of leucocins A-, B- and C-TA33a from *Leuconostoc mesenteroides* TA33a. **Microbiology**, v. 144, p. 1343-1348, 1998.

PEDERSEN, M. B.; IVERSEN, S. L.; SØRENSEN, K. I.; JOHANSEN, E. The long and winding road from the research laboratory to industrial applications of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 611-624, 2005.

PENG, H.; MARIANS, K. J. *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 32, p. 24481-24490, 1993.

PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. **Microbial Cell Factories**, v. 13, 2014. Suppl. 1. Disponível em: <<https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-13-S1-S3>>. Acesso em: 20 jul. 2016.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.

POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, H.; MARCHAND, C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. **Chemistry & Biology**, v. 17, n. 5, p. 421-433, 2010.

QIAN, Z. J.; JUNG, W. K.; KIM, S.; K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1690-1698, 2008.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; JUNG, W. K.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. **Food Research International**, v. 38, n. 2, p. 175-182, 2005a.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; BYUN, H. G.; KIM, S. K. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 9, p. 562-569, 2005b.

REECE, R. J.; MAXWELL, A. DNA gyrase: structure and function. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 3/4, p. 335-375, 1991.

REN, J.; ZHAO, M.; SHI, J.; WANG, J.; JIANG, Y.; CUI, C.; KAKUDA, Y.; XUE, S. J. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 727-736, 2008.

REVOL-JUNELLES, A. M.; LEFEBVRE, G. Purification and N-terminal amino acid sequence of dextranin 24, a bacteriocin of *Leuconostoc* sp. **Current Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 136-137, 1996.

REVOL-JUNELLES, A. M.; MATHIS, R.; KRIER, F.; FLEURY, Y.; DELFOUR, A.; LEEBVRE, G. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 synthesizes two distinct bacteriocins. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 120-124, 1996.

RODRÍGUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, M. I.; KOK, J. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. **Critical Reviews in Food science and Nutrition**, v. 42, n. 2, p. 91-121, 2002.

ROGERS, L. A. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Bacteriology**, v. 16, n. 5, p. 321, 1928.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Comunicado Técnico on line**, n. 128, jul. 2007.



SAMPATHKUMAR, B.; XAVIER, I. J.; LINDA, S. L.; KHACHATOURIANS, G. G. Production of listeriolysin O by *Listeria monocytogenes* (Scott A) under heat-shock conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 131-137, 1999.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949-1956, 2010.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 5, p. 158-164, 1996.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M. A.; NUNES, M. M.; BATISTA, C. R. V. Atividade antimicrobiana e hemolítica do extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens*. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 2, p. 115-117, 2008.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 123-138, 2008.

SEVERINOV, K.; NAIR, S. K. Microcin C: biosynthesis and mechanisms of bacterial resistance. **Future Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 281-289, 2012.

SHARMA, A.; MONDRAGÓN, A. DNA topoisomerases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 5, n. 1, p. 39-47, 1995.

SOUDY, R.; WANG, L.; KAUR, K. Synthetic peptides derived from the sequence of a lasso peptide microcin J25 show antibacterial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 1794-1800, 2012.

STACHOWIAK, R.; GRANIKA, L. H.; WISNIEWSKI, J.; LYSNIAK, M.; KAWIAK, J.; BIELICKI, J. Citotoxicity of listeriolysin o produced by membrane encapsulated *Bacillus subtilis* on leukemia cells. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 1193-1198, 2011.

STEVENS, K. A.; SHELDON, B. W.; KLAPES, N. A.; KLAENHAMMER, T. R. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 3613-3615, 1991.

STILES, M. E. Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 9, p. 2718-2724, 1994.

STONE, M. D.; BRYANT, Z.; CRISONA, N. J.; SMITH, S. B.; VOLOGODSKII, A.; BUSTAMANTE, C.; COZZARELLI, N. R. Chirality sensing by *Escherichia coli* topoisomerase IV and the mechanism of type II topoisomerases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 15, p. 8654-8659, 2003.

TILNEY, L. G.; PORTNOY, D. A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. **The Journal of Cell Biology**, v. 109, n. 4, p. 1597-1608, 1989.

TOKE, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. **Peptide Science**, v. 80, n. 6, p. 717-735, 2005.

TROVATTI, E.; COTRIM, C. A.; GARRIDO, S. S.; BARROS, R. S.; MARCHETTO, R. Peptides based on CcdB protein as novel inhibitors of bacterial topoisomerases. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 6161-6164, 2008.

VINCENT, P. A.; MORERO, R. D. The structure and biological aspects of peptide antibiotic microcin J25. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 538-549, 2009.

WANG, W.; MEJIA, D.; GONZALEZ, E. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 4, n. 4, p. 63-78, 2005.

WAN, X.; SARIS, P. E. J.; TAKALA, T. M. Genetic characterization and expression of leucocin B, a class II d bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* 4010. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 6, p. 494-503, 2015.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392-400, 2007.

WIGLEY, D. B. Structure and mechanism of DNA gyrase. In: ECKSTEIN, F.; LILEY, D. M. J. (Ed.). **Nucleic acids and molecular biology**. New York: Springer-Verlag, 1995. v. 9, p. 165-176.

WILLEY, J. M.; VAN DER DONK, W. A. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. **Annual Review Microbiology**, v. 61, p. 477-501, 2007.

XIONG, Y. L.; DECKER, E. A. Alterations of muscle protein functionality by oxidative and antioxidative processes. **Journal of Muscle Foods**, v. 6, n. 2, p. 139-160, 1995.

ZHANG, L.; LI, J.; ZHOU, K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2084-2089, 2010.

ZHOU, Y.; HOU, Z.; FANG, C.; XUE, X.; DA, F.; WANG, Y.; BAI, H.; LUO, X. Comparison of microplate and macrodilution methods in time-kill study of new antimicrobial drugs. **Folia Microbiologica**, v. 58, n. 1, p. 9-16, 2013.

ZHU, K.; ZHOU, H.; QIAN, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1296-1302, 2006.

ZHU, L.; CHEN, J.; TANG, X.; XIONG, Y. L. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2714-2721, 2008.