

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 13/04/2020.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP  
Instituto de Química – Araraquara  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia  
Doutorado

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE BIOLÓGICA E  
SINÉRGICA DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS ANÁLOGOS  
ÀS BACTERIOCINAS DE *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES*  
TA33a**

**ALINE BUDA DOS SANTOS VAZ**

ARARAQUARA

2018

**ALINE BUDA DOS SANTOS VAZ**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE BIOLÓGICA E  
SINÉRGICA DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS ANÁLOGOS  
ÀS BACTERIOCINAS DE *LEUCONOSTOC MESENEROIDES*  
TA33a**

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientador:** Saulo Santesso Garrido

ARARAQUARA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

V393s Vaz, Aline Buda dos Santos  
Síntese, caracterização, atividade biológica e sinérgica de peptídeos antimicrobianos análogos às bacteriocinas de *Leuconostoc mesenteroides* TA33a / Aline Buda dos Santos Vaz. – Araraquara : [s.n.], 2018  
102 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Saulo Santesso Garrido

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

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: "Síntese, caracterização, atividade biológica e sinérgica de peptídeos antimicrobianos análogos às bacteriocinas de *Leuconostoc Mesenteroides* TA33a"

**AUTORA: ALINE BUDA DOS SANTOS VAZ**

**ORIENTADOR: SAULO SANTESSO GARRIDO**

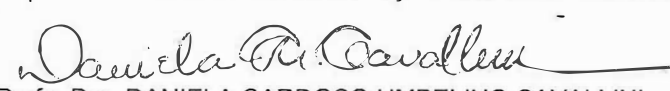
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Profa. Dra. KATIA SIVIERI

Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade Ciências Farmacêuticas/UNESP - Araraquara

  
Profa. Dra. DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI

Departamento Alimentos e Nutrição / Faculdade Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

  
Prof. Dr. ADILSON CÉSAR ABREU BERNARDI

Departamento Ciências Biológicas e Saúde / Centro Universitário de Araraquara/UNIARA - Araraquara

  
Profa. Dra. LUCIANA MIYGUSKU

Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública / Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS -  
Campo Grande - MS

Araraquara, 13 de abril de 2018

## **DADOS CURRICULARES**

### **Dados pessoais:**

**Nome:** Aline Buda dos Santos Vaz

**Nome em citações bibliográficas:** SANTOS-VAZ, A. B.; VAZ, A. B. S.

**Endereço profissional:** Instituto de Química – UNESP - R. Francisco Degni, 55.  
Bairro Quitandinha – Araraquara - SP – Cep: 14800900 – Brasil. Telefone: 16  
3301 9822

**Endereço eletrônico:** alinebuda@zootecnista.com.br

### **Formação acadêmica/titulação**

2010-2012

Mestrado em Zootecnia Produção Animal.

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

Título: Impacto do Estresse térmico na Qualidade Física e Química da Carne e Avaliação Microbiológica em Frangos de Corte, Ano de obtenção: 2012

Orientador: Pedro Alves de Souza.

Co-orientadoras: Hirasilva Borba e Luciana Miyagusku.

2003-2008

Graduação em Zootecnia.

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

Título: Efeitos do Alcalóide Pirrolizidínico Monocrotalina em Mitocôndrias Isoladas de Fígado de Ratos.

Orientador: Fábio Herminio Mingatto.

### **Formação complementar**

2011-2011

Curso de curta duração em Melhorando o Bemestar  
Animal no Abate. (Carga horária: 27h).

World Animal Protection Brasil, WSPA, Rio De Janeiro, Brasil

2010-2010

Curso de curta duração em Métodos de Análises Microbiológicas em Carnes.  
(Carga horária: 30h). Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, Campinas,  
Brasil

2006-2006

Curso de curta duração em I Curso de Avaliação de Carcaça. (Carga horária:  
12h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao  
Paulo, Brasil

2005-2005

Curso de curta duração em AutoCad 2D para Zootecnistas. (Carga horária: 30h).  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo,  
Brasil

2005-2005

Curso de curta duração em Comportamento Animal. (Carga horária: 30h).  
Sociedade de Zoológicos Brasileiros, SZB, Brasil

2005-2005

Curso de curta duração em Nutrição de Animais Silvestres. (Carga horária: 30h).  
Sociedade de Zoológicos Brasileiros, SZB, Brasil

2005-2005

Curso de curta duração em Inseminação Artificial em Bovino de Leite. (Carga  
horária: 30h). Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, SENAR, Vicoso, Brasil

2004-2004

Curso de curta duração em Qualidade e controle da carne. (Carga horária: 35h).  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo,  
Brasil

2003-2003

Curso de curta duração em Empreendedorismo no Agronegócio. (Carga horária:  
8h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo,  
Brasil

### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. SANTOS-VAZ, A. B.; GANECO, A. G.; MELLO, J. L. M.; DOURADO, R. T.; BERTON, M. P.; MORENO, G. M. B.; BOIAGO, M. M.; BORBA, H.; MIYAGUSKU, L.; SOUZA, P. A. Broiler Meat Quality Evaluation Created in Simulated Conditions of Heat. JOURNAL FOOD PROCESS TECHNOL, v. 7, p. 2-8, 2016.

2. BASSAN, J. C.; BEZERRA, T.; PEIXOTO, G.; CRUZ, C. Z. P.; GALAN, J.; SANTOS VAZ, A. B.; GARRIDO, S. S.; FILICE, M.; MONTI, R. Immobilization of Trypsin in Lignocellulosic Waste Material to Produce Peptides with Bioactive Potential from Whey Protein. Materials (Basel), v. 9, p. 357, 2016.

3. GARRIDO, S. S.; OLIVEIRA, I. C.; ZAMBOM, C. R.; SANTOS VAZ, A. B.; MARCHETTO, R.; BARBOSA, L. C. B. Avaliação quantitativa da susceptibilidade do crescimento de Staphylococcus aureus na presença de sistemas antimicrobianos de alta complexidade. Eclética Química, v. 40, p. 95- 105, 2015.

4. SCATOLINI-SILVA, A. M.; BORBA, H.; GIAMPIETRO-GANECO, A.; SOUZA, P. A.; BOIAGO, M. M.; MELLO, J. L. M.; SANTOS-VAZ, A. B. Qualidade física de ovos armazenados em diferentes condições de embalagens sob temperatura ambiente. Archivos de Zootecnia, v. 62, p. 247-254, 2013.

5. SILVA, A. M. S.; BORBA, H.; GANECO, A. G.; SOUZA, P. A.; BOIAGO, M. M.; MELLO, J. L. M.; SANTOS-VAZ, A. B. Qualidade físico-química de ovos



armazenados em diferentes condições de embalagens sob temperatura ambiente. Archivos de Zootecnia (Internet), v. 62, p. 247-254, 2013.

6. SANTOS-VAZ, A. B.; YOTSUYANAGI, S. E; MIYAGUSKU, L.; BORBA, H.; SOUZA, P. A. Avaliação da qualidade microbiológica de ovos proveniente de criação tipo “caipira” e de granja de produção comercial. Higiene Alimentar, v. 26, p. 138-142, 2012.

7. SANTOS-VAZ, A. B.; DORTA, D. J.; PESTANA, C. R.; MAIOLI, M. A.; CURTI, C.; MINGATTO, F. E. Dehydromonocrotaline induces cyclosporine Ainsensitive mitochondrial permeability transition/cytochrome c release. Toxicon (Oxford), v. 54, p. 16-22, 2009.

8. MINGATTO, F. E.; DORTA, D.; SANTOS-VAZ, A.B.; CARVALHO, I.; SILVA, C. H. T. P.; SILVA, V. B.; UYEMURA, S.A.; SANTOS, A.C.; CURTI, C. Dehydromonocrotaline inhibits mitochondrial complex I. A potencial mechanism accounting for hepatotoxicity of monocrotaline. Toxicon (Oxford), v. 50, p. 724-730, 2007.

9. LOPES, J; POIATTI, M. L; SCHOKENITURRINO, R. P.; KOIAYMA, N. T. G.; HIDALGO, G. R.; SANTOS VAZ, A. B. Bactérias Aeróbias Mesófilas Isoladas de Leite Cru da Região de DracenaSP. Higiene Alimentar, v. 21, p. 25-26, 2006.

10. POIATTI, M. L; KOIAYMA, N. T. G.; LOPES, J; HIDALGO, G. R.; SANTOS-VAZ, A.B.; SCHOKENITURRINO, R. P. Fungos Isolados de Leite Cru da Região de Dracena-SP. Higiene Alimentar, v. 21, p. 34-35, 2006.

### **Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)**

1. BASSAN, J. C.; PEIXOTO, G.; CRUZ, C. Z. P.; MARTINEZ, J; VAZ, A. B. S.; MONTI, R. Diasibilidade de peptídeos do soro de queijo obtidos em reatores enzimático de leite fixo In: Enzitec 2016 XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2016, Caxias do Sul. In: Enzitec 2016 XII. Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2016.

2. CRUZ, C. Z. P.; VAZ, A. B. S.; TANIGUCHI, E. T.; BASSAN, J. C.; BASSAN, N.; GARRIDO, S. S. Hidrólise das proteínas do soro do queijo utilizando a alcalase imobilizada em pó de sabugo de milho In: Enzitec 2016 XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2016, Caxias do Sul. In: Enzitec 2016 XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2016.

### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

1. SANTOS-VAZ, A. B.; GARRIDO, S. S. INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DA SALMONELLA SOROVAR TYPHIMURIUM POR PEPTÍDEOS DERIVADOS DE LEUCOCINAS In: Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos 11 Slaca, 2015, Campinas. In: Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos 11 Slaca.

2. CRUZ, C. Z. P.; BASSAN, J. C.; DAVANSO, M.; SANTOS-VAZ, A. B.; GARRIDO, S. S.; MONTI, R. PRODUCTION OF BIOACTIVE PEPTIDES DERIVED FROM MILK PROTEINS IN A PAKED BED REACTOR WITH DERIVATIVE ALCALASE CORN COB POWDER GLYOXYL In: Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos 11 Slaca, 2015, Campinas. In: Anais do Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos 11. Slaca. , 2015.

3. SANTOS-VAZ, A. B.; ZENATTI, S. P.; SOUZA, R. C.; GARRIDO, S. S. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO LEUA1 PARA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS In: XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 2015, Fortaleza CE. In: XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 2015.

4. GARRIDO, S. S.; OLIVEIRA I. C.; SANTOS-VAZ, A. B.; ZENATTI, S. P.; SOUZA, R. C.; MARCHETTO, R. STUDIES OF NANOSYSTEMS ASSOCIATED TO DE NOVO ANTIMICROBIAL PEPTIDES BASED ON NATURAL TOXIN CcdB In: 23 Congresso Internacional da IUBMB e 44a. Reunião Anual da SBBq, 2015, Foz do Iguaçu. In: 23 Congresso Internacional da IUBMB e 44ª. Reunião Anual da SBBq, 2015.

5. SOUZA, R. C.; SANTOS-VAZ, A. B.; GARRIDO, S. S. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIOCINAS PARA APLICAÇÃO COMO BIOCONSERVANTES NATURAIS DE ALIMENTOS In: XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2014, Araraquara. In Anais XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2014.

6. ZENATTI, S. P.; SANTOS-VAZ, A. B.; GARRIDO, S. S. Síntese e caracterização de peptídeo antimicrobiano análogo da Leucocina A para conservação de alimentos industrializados In: XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2014, Araraquara. In: Anais do XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2014.

7. SANTOS-VAZ, A. B.; DOURADO, R. T; BORBA, H.; SOUZA, P. A.; LIMA, T. M. A.; BARBOSA, J. C. Avaliação da qualidade da carne de frangos criados sob estresse térmico In: XXI Congresso Brasileiro de Zootecnia, 2011, Maceió. Anais do XXI Congresso Brasileiro de Zootecnia, 2011.

8. SANTOS-VAZ, A. B.; YOTSUYANAGI, S. E; MIYAGUSKU, L.; BORBA, H.; SOUZA, P. A. Avaliação da qualidade microbiológica de ovos provenientes de produção tipo caipira e de granja de produção comercial In: IX Congresso de Produção e Comercialização de Ovos APA, 2011. Anais do IX Congresso de Produção e Comercialização de Ovos, 2011.

9. BORBA, H.; MELLO, J. L. M.; SOUZA, P. A.; LIMA, T. M. A.; SANTOS VAZ, A. B. Impacto do estresse térmico durante a fase de crescimento sobre o ganho de peso e o rendimento de carcaça de frangos de corte In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2011, Maceió. In: Anais do XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA. Maceió, 2011.

10. BORBA, H.; SILVA, A. M. S.; GANECO, A. G; DOURADO, R. T; SANTOS VAZ, A. B.; SOUZA, T. A. Qualidade do albúmen e da gema de ovos armazenados em diferentes In: IX Congresso de Produção e Comercialização de Ovos APA, 2011. Anais do IX Congresso de Produção e Comercialização de Ovos, 2011.

11. SANTOS-VAZ, A. B.; BORBA, H.; MORENO, G. M. B.; BOIAGO, M. M.; SOBRINHO, A. G. S. Análise sensorial de linguiças ovinas elaboradas com diferentes antioxidantes naturais In: VI Encontro de Pós-Graduandos da UNESP/FCAV, 2010, Jaboticabal. Anais do VI Encontro de Pós-Graduandos da UNESP/FCAV, 2010.

12. COSTA, T. I. R.; BORBA, H.; BERTON, M. P.; SANTOS-VAZ, A. B.; SOUZA, P. A. Características físicas da paleta maturada de cordeiros alimentados com diferentes níveis de feno de erva sal In: VI Encontro de Pós-Graduandos da UNESP/FCAV, 2010, Jaboticabal. Anais do VI Encontro de Pós-Graduandos da UNESP/FCAV, 2010.

13. SANTOS-VAZ, A. B.; BORBA, H.; MORENO, G. M. B.; BOIAGO, M. M.; SOUZA, P. A. Metodologias para avaliar a força de cisalhamento da carne bovina In: VI Encontro de Pós-Graduandos da UNESP/FCAV, 2010, Jaboticabal. Anais do VI Encontro de Pós-Graduandos da UNESP/FCAV, 2010.

14. MELLO, J. L. M.; VIEIRA, L. D. C.; BORBA, H.; COSTA, T. I. R.; SANTOS VAZ, A. B. Peso e rendimento de carcaça quente de cordeiros da raça Santa Ines suplementados com ionóforo In: VI Encontro de Pós-Graduandos da UNESP/FCAV, 2010, Jaboticabal. Anais do VI Encontro de Pós-Graduandos da UNESP/FCAV, 2010.

15. MINGATTO, F. E.; SANTOS-VAZ, A. B.; DOMENICI, P.; KOJIMA, J. T.; DORTA, D.; PESTANA, C.; CURTI, C. Effects of dehydromonocrotaline on mitochondrial processes In: XXXVI Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2007, Salvador. Infectious Diseases: Biochemistry of Parasites, Vectors and Hosts, 2007.

16. SANTOS-VAZ, A. B.; DORTA, D.; CALGARO-HELENA, A. F.; PESTANA, C.; CURTI, C.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; CARVALHO, I.; MINGATTO, F. E. Efeitos da Alcalóide pirrolizidínico monocrotalina e do seu metabólito dehidromonocrotalina na Bioenergética Mitochondrial In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq, 2006, Águas de

Lindóia. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq, 2006.

17. SANTOS-VAZ, A.B.; MINGATTO, F. E.; LUPATINI, G. C.; FURIO, C. A. Estudo de Caso de Intoxicação por *Enteroblobium Contortisiliquum* em Bovinos do Município de Pacaembu. In: XVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2005, Ilha Solteira. Anais Eletrônicos XVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2005.

18. TONI, G. M.; BENEDITO, S. C.; GONÇALVES, A. F. N.; SILVA, F. G.; TRIBUCCI, A. M. O.; SANTOS-VAZ, A. B.; PIRES, M. P.; VIEIRA, F. V. R.; GIMBO, R. Y.; FONSECA, R. Estudo do Nível de Informação da população de Dracena-SP sobre a Fauna Silvestre Local In: XXIX Congresso da Sociedade de Zoológicos do Brasil, 2005, Balneário Camboriú. Anais Eletrônicos do XXIX Congresso da Sociedade de Zoológicos do Brasil, 2005.

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)**

1. BORBA, H.; SANTOS-VAZ, A. B.; DOURADO, R. T; BERTON, M. P.; LIMA, T. M. A.; SOUZA, P. A. Aspectos qualitativos do peito de frangos submetidos ao estresse térmico In: 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2011, Belem PA. Anais da 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2011.

2. GANECO, A. G; BORBA, H.; SANTOS-VAZ, A. B.; SILVA, A. M. S.; BOIAGO, M. M.; SOUZA, P. A.; MELLO, J. L. M.; DOURADO, R. T; BERTON, M. P.; LIMA, T. M. A. Avaliação da qualidade da carne de frangos submetidos ao estresse térmico aos 21 dias de idade In: XXII Congresso Latino Americano de Avicultura, 2011, Buenos Aires. In: Anais do XXII Congresso Latino Americano de Avicultura, 2011.

3. GUSHIKEN, V. O.; MIYAGUSKU, L.; SANTOS-VAZ, A. B.; SANTOS, I. Avaliação da qualidade microbiológica em frango de corte criado sob estresse térmico In: 5º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica CIIC 2011,

2011, Campinas. In: 5º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica CIIC 2011., 2011.

4. SANTOS-VAZ, A. B.; GANECO, A. G; YOTSUYANAGI, S. E; MIYAGUSKU, L.; BORBA, H.; SOUZA, P. A. Identificação de *Salmonella* em frangos de corte submetidos ao impacto do estresse térmico agudo In: XXII Congresso Latino Americano de Avicultura, 2011, Buenos Aires. In: Anais do XXII Congresso Latino Americano de Avicultura, 2011.

5. SANTOS-VAZ, A. B.; MIYAGUSKU, L.; GANECO, A. G; BORBA, H.; SOUZA, P. A. Incidência de *Campylobacter spp* em frangos de corte criados sob estresse térmico In: VI Congresso Brasileiro de Tecnologia de Carnes, 2011, São Pedro. In: Anais do VI Congresso Brasileiro de Tecnologia de Carnes, 2011.

6. SOUZA, P. A.; SANTOS-VAZ, A. B.; BERTON, M. P.; BOIAGO, M. M.; BORBA, H.; LIMA, T. M. A.; BARBOSA, J. C. Influência do estresse térmico na qualidade da carne de frangos de corte In: XXII Congresso Latino Americano de Avicultura, 2011, Buenos Aires. In: Anais do XXII Congresso Latino Americano de Avicultura, 2011.

7. MIYAGUSKU, L.; SANTOS-VAZ, A. B.; GANECO, A. G; BORBA, H.; SOUZA, P. A.; GUSHIKEN, V. O. *Listeria monocytogenes* em frangos de corte criados sob estresse térmico In: VI Congresso Brasileiro de Tecnologia de Carnes, 2011, São Pedro. In: Anais do VI Congresso Brasileiro de Tecnologia de Carnes, 2011.

8. SANTOS-VAZ, A. B.; MIYAGUSKU, L.; BOIAGO, M. M.; VIEIRA, L. D. C.; BORBA, H.; SOUZA, P. A. Propriedades qualitativas da carne de frango com 42 dias submetidos ao estresse térmico In: VI Congresso Brasileiro de Tecnologia de Carnes, 2011, São Pedro. In: Anais do VI Congresso Brasileiro de Tecnologia de Carnes, 2011.

9. GANECO, A. G; BORBA, H.; SANTOS-VAZ, A. B.; SILVA, A. M. S.; BOIAGO, M. M.; SOUZA, P. A.; MELLO, J. L. M.; DOURADO, R. T; BERTON, M. P.; LIMA, T. M. A. Qualidade interna de ovos brancos embalados à vácuo e armazenados em condições ambiente In: XXII Congresso Latino Americano de Avicultura,

2011, Buenos Aires. In: Anais do XXII Congresso Latino Americano de Avicultura, 2011.

10. COSTA, T. I. R.; BORBA, H.; BERTON, M. P.; SANTOS-VAZ, A. B.; SILVA, A. M. S.; SOUZA, P. A. Aspectos quantitativos da carne maturada de cordeiros alimentados com diferentes níveis de feno In: 47<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2010, Salvador. Anais da 47<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2010.

11. LOPES, J; POIATTI, M. L; SANTOS-VAZ, A. B.; HIDALGO, G. R.; KOIAYMA, N. T. G. Bactérias aeróbias mesófilas isoladas de leite “in natura” produzidos em Dracena – SP In: II Simpósio de Ciências da UNESP de Dracena Sicud, 2006, Dracena. II Simpósio de Ciências da UNESP de Dracena Sicud, 2006.

12. SANTOS-VAZ, A. B.; MINGATTO, F. E.; DOMENICI, P.; DORTA, D. J.; CURTI, C.; SANTOS, A. C. Efeitos da Dehidromonocrotalina na Bioenergética de Mitocôndrias Isoladas de Fígado de Rato In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2006, Jaboticabal. In: XVIII CIC Unesp, 2006.

13. KOIAYMA, N. T. G.; POIATTI, M. L; SANTOS-VAZ, A. B.; HIDALGO, G. R.; LOPES, J. Mastite clínica e subclínica: reflexos sobre a qualidade do leite In: II Simpósio de Ciências da UNESP de Dracena SICUD, 2006, Dracena. II Simpósio de Ciências da UNESP de Dracena SICUD, 2006.

14. LOPES, J; POIATTI, M. L; HIDALGO, G. R.; KOIAYMA, N. T. G.; SANTOS-VAZ, A. B. Microrganismos isolados de leite cru produzido em Dracena-SP: aeróbios mesófilos e fungos In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2006, Jaboticabal. XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2006.

15. HIDALGO, G. R.; POIATTI, M. L; SANTOS-VAZ, A. B.; LOPES, J; KOIAYMA, N. T. G. Presença de fungos em leite “in natura” bovino. In: II Simpósio de Ciências da UNESP de Dracena SICUD, 2006, Dracena. II Simpósio de Ciências da UNESP de Dracena SICUD, 2006.

16. TRIBUCCI, A. M. O.; KOJIMA, J. T.; SANTOS-VAZ, A. B.; LUPATINI, G. C.; MINGATTO, F. E. Efeitos tóxicos da Planta *Palicourea marcgravii* In: I Simpósio de Ciências da Unesp de Dracena SICUD, 2005, Dracena. Anais Eletrônicos do I Simpósio de Ciências da Unesp de Dracena, 2005.

17. SANTOS-VAZ, A. B.; TRIBUCCI, A. M. O.; KOJIMA, J. T.; LUPATINI, G. C.; MINGATTO, F. E. Efeitos Tóxicos da Planta *Asclepias curassavica* In: I Simpósio de Zootecnia da Unesp, 2005, Dracena. Anais Eletrônicos do I Simpósio de Zootecnia da Unesp, 2005.

18. SANTOS-VAZ, A. B.; SANTOS, L. L. P.; MEDEIROS, S. F.; LUPATINI, G. C.; MINGATTO, F. E. Levantamento de Plantas com Potencial Toxicológico Presentes nas Pastagens da Nova Alta Paulista In: I Simpósio de Zootecnia da Unesp, 2005, Dracena. Anais Eletrônicos do I Simpósio de Zootecnia da Unesp, 2005.

19. KOJIMA, J. T.; TRIBUCCI, A. M. O.; SANTOS-VAZ, A. B.; LUPATINI, G. C.; MINGATTO, F. E. Toxicidade da Planta *Pteridium aquilinum* In: I Simpósio de Ciências da Unesp de Dracena SICUD, 2005, Dracena. Anais Eletrônicos do I Simpósio de Ciências da Unesp de Dracena SICUD, 2005.

#### **Artigos em revistas (Magazine)**

1. 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*. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences. Brasil, p.11, 2016.

2. VAZ, A. B. S.; SILVA, J. C. M.; ZAMBOM, C. R.; GARRIDO, S. S. Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Peptídeo LeuAB2: Um Promissor Conservante de Alimentos. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences. Brasil, p.11, 2016.

3. 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 Histatina5. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences. Brasil, p.1 1, 2016.

4. CRUZ, C. Z. P.; VAZ, A. B. S.; GARRIDO, S. S.; NASSER, A. L. M.; MONTI, R. Peptídeos lácteos multifuncionais obtidos com alcalase imobilizada em resíduo lignocelulósico. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences. Brasil, p.11, 2016.

5. SANTOS-VAZ, A. B.; MIYAGUSKU, L.; BORBA, H. Enfermidades que podem ser adquiridas pelo consumo de carne e de produtos industrializados de frango. Revista Nacional da Carne. Brasil, p.96 100, 2011.

6. MINGATTO, F. E.; SANTOS-VAZ, A. B.; LUPATINI, G. C. Intoxicação por Enterolobium contortisiliquum em bovinos no município de Pacaembu, SP. Pubvet (Londrina). Londrina, p.71 73, 2008.

### **Prêmios e títulos**

2016 Menção Honrosa na Área de Bioprocessos e Biotecnologia, pelo trabalho: "Peptídeos lácteos multifuncionais obtidos com alcalase imobilizada em resíduo lignocelulósico". 63 Jornada Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara - VI Congresso Farmacêutico da UNESP.

2016 Primeira Melhor Apresentação Oral, obtida pela apresentação do trabalho: "Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Peptídeo LeuAB2: Um Promissor Conservante de Alimentos". 63 Jornada Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara - VI Congresso Farmacêutico da UNESP.

2007 Primeira Melhor Apresentação de Trabalho Científico na Forma Oral, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho - Unidade de Dracena.

## **Apresentação de trabalho**

1. SILVA, J. C. M.; VAZ, A. B. S.; ZAMBOM, C. R.; GARRIDO, S. S. Atividade antimicrobiana e antioxidante do peptídeo LeuB contra Salmonella sorovar Typhimurium e Escherichia coli, 2016. (Congresso/Apresentação de Trabalho) Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp; Cidade: Araraquara; Evento: Congresso Farmacêutico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp.

2. 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. (Congresso/Apresentação de Trabalho). Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara.

3. BASSAN, J. C.; PEIXOTO, G.; CRUZ, C. Z. P.; MARTINEZ, J; VAZ, A.B.S.; MONTI, R. Diasibilidade de peptídeos do soro de queijo obtidos em reatores enzimático de leito fixo, 2016. (Seminário, Apresentação de Trabalho): Local: Universidade de Caxias do Sul; Cidade: Caxias do Sul - RS; Evento: Enzitec 2016 - XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, Universidade de Caxias do Sul.

4. CRUZ, C. Z. P.; VAZ, A. B. S.; TANIGUCHI, E. T.; BASSAN, J. C.; BASSAN, N; GARRIDO, S. S.; MONTI, R. Hidrólise das proteínas do soro do queijo utilizando a alcalase imobilizada em pó de sabugo de milho, 2016. (Seminário, Apresentação de Trabalho). Local: Universidade de Caxias do Sul; Cidade: Caxias do Sul; Evento: Enzitec 2016 - XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, Universidade de Caxias do Sul.

5. CRUZ, C. Z. P.; VAZ, A. B. S.; GARRIDO, S. S.; NASSER, A. L. M.; MONTI, R. Peptídeos lácteos multifuncionais obtidos com alcalase imobilizada em resíduo lignocelulósico, 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara.

6. SANTOS-VAZ, A. B.; ZENATTI, S. P.; SOUZA, R. C.; GARRIDO, S. S. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO LEUA-1 PARA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS, 2015. (Simpósio, Apresentação de Trabalho). Local: Hotel Praia Centro; Cidade: Fortaleza – CE. Evento: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM) e o XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (SHEB).
7. GARRIDO, S. S.; OLIVEIRA I. C.; SANTOS-VAZ, A. B.; ZENATTI, S. P.; SOUZA, R. C.; MARCHETTO, R. STUDIES OF NANOSYSTEMS ASSOCIATED TO DE NOVO ANTIMICROBIAL PEPTIDES BASED ON NATURAL TOXIN CcdB, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Cidade: Foz do Iguaçu. Evento: 23 Congresso Internacional da IUBMB e 44ª. Reunião Anual da SBBq.
8. SOUZA, R. C.; GARRIDO, S. S.; SANTOS-VAZ, A. B. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIOCINAS PARA APLICAÇÃO COMO BIOCONSERVANTES NATURAIS DE ALIMENTOS, 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Local: Instituto de Química da Unesp de Araraquara. Evento: XXVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP.
9. ZENATTI, S. P.; GARRIDO, S. S.; SANTOS-VAZ, A. B. Síntese e caracterização de peptídeo antimicrobiano análogo da Leucocina A para conservação de alimentos industrializados, 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Local: Instituto de Química da Unesp de Araraquara. Evento: XXVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP.
10. BORBA, H.; SANTOS-VAZ, A. B.; DOURADO, R. T; BERTON, M. P.; LIMA, T. M. A.; SOUZA, P. A. Aspectos qualitativos do peito de frangos submetidos ao estresse térmico, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Cidade: Belém-PA. Evento: 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia.
11. SANTOS-VAZ, A. B.; DOURADO, R. T; BORBA, H.; SOUZA, P. A.; LIMA, T. M. A.; BARBOSA, J. C. Avaliação da qualidade da carne de frangos criados sob estresse térmico, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho). In: Anais do XXI Congresso Brasileiro de Zootecnia; Cidade: Maceió - AL; Evento: Congresso Brasileiro de Zootecnia.

12. GANECO, A. G.; BORBA, H.; SANTOS-VAZ, A. B.; SILVA, A. M. S.; BOIAGO, M. M.; SOUZA, P. A.; MELLO, J. L. M.; DOURADO, R. T.; BERTON, M. P.; LIMA, T. M. A. Avaliação da qualidade da carne de frangos submetidos ao estresse térmico aos 21 dias de idade, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Cidade: Buenos Aires. Evento: XXII Congresso Latino Americano de Avicultura.

13. SANTOS-VAZ, A. B.; YOTSUYANAGI, S. E.; MIYAGUSKU, L.; BORBA, H.; SOUZA, P. A. Avaliação da qualidade microbiológica de ovos provenientes de produção tipo caipira e de granja de produção comercial, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Cidade: Ribeirão Preto. Evento: IX Congresso de Produção e Comercialização de Ovos - APA.

14. SANTOS-VAZ, A. B.; GANECO, A. G.; YOTSUYANAGI, S. E.; MIYAGUSKU, L.; BORBA, H.; SOUZA, P. A. Identificação de Salmonella em frangos de corte submetidos ao impacto do estresse térmico agudo, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Cidade: Buenos Aires; Evento: XXII Congresso Latino Americano de Avicultura.

15. BORBA, H.; MELLO, J. L. M.; SOUZA, P. A.; LIMA, T. M. A.; SANTOS-VAZ, A. B. Impacto do estresse térmico durante a fase de crescimento sobre o ganho de peso e o rendimento de carcaça de frangos de corte, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Cidade: Maceio-AL; Evento: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA.

16. SANTOS-VAZ, A. B.; MIYAGUSKU, L.; GANECO, A. G.; BORBA, H.; SOUZA, P. A. Incidência de *Campylobacter* spp em frangos de corte criados sob estresse térmico, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Cidade: São Pedro. Evento: VI Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Carnes.

17. SOUZA, P. A.; SANTOS-VAZ, A. B.; BERTON, M. P.; BOIAGO, M. M.; BORBA, H.; LIMA, T. M. A.; BARBOSA, J. C. Influência do estresse térmico na qualidade da carne de frangos de corte, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Cidade: Buenos Aires. Evento: XXII Congresso Latino Americano de Avicultura.

18. MIYAGUSKU, L.; SANTOS-VAZ, A. B.; GANECO, A. G; BORBA, H.; SOUZA, P. A.; GUSHIKEN, V. O. *Listeria monocytogenes* em frangos de corte criados sob estresse térmico, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho) Cidade: São Pedro; Evento: VI Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Carnes.

19. SANTOS-VAZ, A. B.; MIYAGUSKU, L.; BOIAGO, M. M.; VIEIRA, L. D. C.; BORBA, H.; SOUZA, P. A. Propriedades qualitativas da carne de frango com 42 dias submetidos ao estresse térmico, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Cidade: São Pedro. Evento: VI Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Carnes.

20. BORBA, H.; SILVA, A. M. S.; GANECO, A. G; DOURADO, R. T; SANTOS VAZ, A. B.; SOUZA, T. A. Qualidade do albúmen e da gema de ovos armazenados em diferentes, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Evento: IX Congresso de Produção e Comercialização de Ovos – APA.

21. GANECO, A. G; BORBA, H.; SANTOS-VAZ, A. B.; SILVA, A. M. S.; BOIAGO, M. M.; SOUZA, P. A.; MELLO, J. L. M.; DOURADO, R. T; BERTON, M. P.; LIMA, T. M. A. Qualidade interna de ovos brancos embalados à vácuo e armazenados em condições ambiente, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Cidade: Buenos Aires. Evento: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA.

22. SANTOS-VAZ, A. B.; BORBA, H.; MORENO, G. M. B.; BOIAGO, M. M.; SOBRINHO, A. G. S. Análise sensorial de linguças ovinas elaboradas com diferentes antioxidantes naturais, 2010. (Outra, Apresentação de Trabalho). Cidade: Jaboticabal. Evento: VI Encontro de Pós-Graduandos da UNESP Campus de Jaboticabal.

23. COSTA, T. I. R.; BORBA, H.; BERTON, M. P.; SANTOS-VAZ, A. B.; SILVA, A. M. S.; SOUZA, P.A. Aspectos quantitativos da carne maturada de cordeiros alimentados com diferentes níveis de feno de erva sal, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Cidade: Salvador; Evento: 47a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia.

24. COSTA, T. I. R.; BORBA, H.; BERTON, M. P.; SANTOS-VAZ, A. B.; SOUZA, P. A. Características físicas da paleta maturada de cordeiros alimentados com diferentes níveis de feno de erva sal, 2010. (Outra, Apresentação de Trabalho). Cidade: Jaboticabal; Evento: VI Encontro de Pós-Graduandos da UNESP Campus de Jaboticabal.

25. SANTOS-VAZ, A. B.; BORBA, H.; MORENO, G. M. B.; BOIAGO, M. M.; SOUZA, P. A. Metodologia para avaliar a força de cisalhamento da carne bovina, 2010. (Outra, Apresentação de Trabalho). Cidade: Jaboticabal. Evento: VI Encontro de Pós-Graduandos da UNESP Campus de Jaboticabal.

26. MELLO, J. L. M.; VIEIRA, L. D. C.; BORBA, H.; COSTA, T. I. R.; SANTOS-VAZ, A. B. Peso e rendimento da carcaça quente de cordeiros da raça Santa Inês suplementados com ionóforo, 2010. (Outra, Apresentação de Trabalho). Cidade: Jaboticabal. Evento: VI Encontro de Pós-Graduandos da UNESP Campus de Jaboticabal.

27. SANTOS-VAZ, A. B.; DORTA, D.; CALGARO-HELENA, A.F.; PESTANA, C.; CURTI, C.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; CARVALHO, I.; MINGATTO, F. E. Efeitos da monocrotalina e do seu metabólito dehidromonocrotalina na bioenergética mitocondrial, 2006. (Congresso, Apresentação de Trabalho) Cidade: Jaboticabal. Evento: VI Encontro de Pós-Graduandos da UNESP Campus de Jaboticabal.

28. SANTOS-VAZ, A. B.; DORTA, D.; CALGARO-HELENA, A. F.; PESTANA, C.; CURTI, C.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; MINGATTO, F. E. Efeitos do Metabólito Dehidromonocrotalina na Bioenergética de Mitocôndrias Isoladas de Fígado de Rato, 2006. (Simpósio, Apresentação de Trabalho). Cidade: Dracena.

29. SANTOS-VAZ, A. B.; TRIBUCCI, A. M. O.; KOJIMA, J. T.; LUPATINI, G. C.; MINGATTO, F. E. Efeitos Tóxicos da Planta *Asclepias curassavica*, 2005. (Simpósio, Apresentação de Trabalho). Cidade: Dracena.

30. SANTOS-VAZ, A. B.; MINGATTO, F. E.; LUPATINI, G. C.; FURIO, C. A. Estudo de Caso de Intoxicação por *Enterolobium contortisiliquum* em Bovinos no

Município de Pacaembu, 2005. (Congresso, Apresentação de Trabalho) Cidade: Ilha Solteira.

31. SANTOS-VAZ, A. B.; MINGATTO, F. E.; LUPATINI, G. C.; SANTOS, L. L. P.; MEDEIROS, S. F. Levantamento de Plantas com Potencial Toxicológico Presentes nas Pastagens da Nova Alta Paulista, 2005. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Cidade: Goiânia.

### **Patente**

SANTOS-VAZ, A. B.; GARRIDO, S. S. Método de Obtenção de Bacteriocinas e uso das Mesmas, 2017. Categoria: Produto e Processo. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020170049566. Data de depósito: 10/03/2017. Depositante/Titular: Instituto de Química da Unesp.

### **Participação em eventos**

Congresso Farmacêutico da Unesp, 2016. (Congresso). Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Peptídeo LeuAB2: Um Promissor Conservante de Alimentos.

Apresentação de Pôster / Painel no 23 Congresso Internacional da IUBMB e 44a. Reunião Anual da SBBq, 2015. (Congresso). STUDIES OF NANOSYSTEMS ASSOCIATED TO DE NOVO ANTIMICROBIAL PEPTIDES BASED ON NATURAL TOXIN CCDB.

Apresentação de Pôster / Painel no(a) Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos - 11 Slaca, 2015. (Simpósio). INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DA SALMONELLA SOROVAR TYPHIMURIUM POR PEPTÍDEOS DERIVADOS DE LEUCOCINAS.

Apresentação de Pôster / Painel no(a) XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 2015. (Simpósio). SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO LEUA-1 PARA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS.

Apresentação de Pôster / Painel no(a) XXVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2014. (Congresso). SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIOCINAS PARA APLICAÇÃO COMO BIOCONSERVANTES NATURAIS DE ALIMENTOS.

“ENTREPRENEURSHIP FOR GRADUATE IN CHEMISTRY: A GLANCE FOR BRAZILIAN COMPETITIVENESS INNOVATION & DEVELOPMENT”, 2014. (Outra)

Apresentação de Pôster / Painel no(a) IX Congresso de Produção e Comercialização de Ovos - APA, 2011. (Congresso). Avaliação da qualidade microbiológica de ovos provenientes de criação tipo caipira e de granja de produção comercial.

VI Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Carnes, 2011. (Congresso)

XXII Congresso Latino Americano de Avicultura, 2011. (Congresso)

Treinamento: Sistema Assurance GDS método de análise de microrganismos patogênicos pela técnica de PCR em formato tempo-real e separação imunoenzimática, 2010. (Outra)

VI Encontro de Pós-Graduandos da UNESP Campus de Jaboticabal, 2010.

1º Workshop sobre nutrição de suínos - Instituto de Zootecnia (IZ-APTA), 2008. (Outra)

Workshop Internacional Sobre Integridade Intestinal em Frangos de Corte - USP – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2008. (Outra)

Dia de Campo sobre Alimentos Alternativos para Bovinos no Período da Seca, 2006. (Encontro)

I Simpósio de Ovinocultura da Unesp de Dracena, 2006. (Simpósio)



Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2006. (Congresso)

42 Reunião Anual da SBZ - A Produção Animal e o Foco no Agronegócio, 2005. (Congresso). Levantamento de Plantas com Potencial Toxicológico Presentes nas Pastagens da Nova Alta Paulista.

Adubação verde em grandes culturas, 2005. (Outra).

I Encontro de Ovinocultura do Noroeste Paulista, 2005. (Encontro)

IV Encontro sobre Plantio Direto, 2005. (Encontro). Palavras-chave: Zootecnia. Áreas do conhecimento: Pastagem e Forragicultura, Avaliação, Produção e Conservação de Forragens, Melhoramento de Plantas Forrageiras e Produção de Sementes. Setores de atividade: Produção Vegetal

XXIX Congresso Brasileiro de Zoológicos do Brasil, 2005. (Congresso) Palavras-chave: Animais Silvestres. Áreas do conhecimento: Zootecnia

I Encontro de Zootecnia da Unesp de Dracena, 2004. (Encontro). Organização de evento. Santos-Vaz, A.B.

I Simpósio de Ovinocultura da Unesp de Dracena, 2006. (Outro, Organização de evento).

II Encontro de Zootecnia e I Simpósio de Ciências da Unesp de Dracena-Sicud, 2005. (Outro, Organização de evento).

### **Participação em banca de trabalhos de conclusão**

1. GARRIDO, S. S.; SANTOS-VAZ, A. B.; CRUSCA-JUNIOR, E. Participação em banca de Priscila Marangoni Porto. Avaliação da atividade antifúngica de peptídeos derivados da Histatina-5 para o tratamento de candidose bucal, 2015 (Farmácia) Instituto de Química da Unesp.

2. GARRIDO, S. S.; CRUSCA-JUNIOR, E.; SANTOS-VAZ, A. B. Participação em banca de Alberto Guilherme Faria de Oliveira. Derivados Estruturais do Peptídeo Histatina-5: Síntese e Aplicação no Tratamento de Candidose, 2014. (Farmácia e Bioquímica) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

3. GARRIDO, S. S.; MARCHETTO, R.; SANTOS-VAZ, A. B. Participação em banca de Carolina Reis Zambom. Estudos de Permeação e liberação de peptídeos antimicrobianos estruturalmente derivados da toxina CcdB, 2014. (Farmácia e Bioquímica) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

4. MIYAGUSKU, L.; PRATA, L. F.; SANTOS-VAZ, A. B. Participação em banca de Suzana Eri Yotsuyanagi. Detecção de *Salmonella* em frangos de corte submetidos ao impacto do estresse térmico agudo, 2010 (Medicina Veterinária) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade”.

(Albert Einstein)

Aos maiores mestres que a vida me deu,

Exemplos de luta, conquistas, dedicação, amor e superação;

Ao Roberto, Angela, Carol e Carmem;

Pai, mãe, irmã e Avó;

Que sempre tornaram cada passo mais fácil e cada caminho mais bonito e

prazeroso;

Ao meu marido Rodrigo pelo companheirismo incentivo e amor;

Ao meu filho Leonardo motivação para as minhas conquistas e luta.

Dedico e ofereço

## AGRADECIMENTOS

À DEUS, por sempre estar à frente de minha vida ajudando-me nos momentos de incerteza e desânimo. Agradeço pela minha vida e por ser meu refúgio e atender às minhas preces, pela minha família, por meus amigos e pelo amor a nós dedicado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido por todo ensinamento;

A todos os professores, especialmente a Katia Sivieri e ao Rubens Monti que ajudaram na correção e discussão deste trabalho, o meu sincero reconhecimento;

Aos meus colegas do Laboratório do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, quero agradecer a disponibilidade, ajuda e carinho manifestados durante todos estes anos;

À equipe do laboratório de Enzimologia, Juliana, Clariana e Ana Nasser, do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade oferecida no qual realizei alguns ensaios;

Aos funcionários do departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, pelos serviços prestados;

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e à FAPESP, pelo auxílio financeiro dessa pesquisa;

Ao Instituto de Química da Unesp de Araraquara, por mais uma oportunidade de crescimento;

Aos que aqui não foram citados, mas que direta ou indiretamente fizeram e fazem parte dessa caminhada.

## **SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE BIOLÓGICA E SINÉRGICA DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS ANÁLOGOS ÀS BACTERIOCINAS DE *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* TA33a**

As leucocinas são peptídeos antimicrobianos, sintetizados no ribossomo de bactérias lácticas do gênero *Leuconostoc* que são capazes de inibir microrganismos patogênicos e indicadores higiênico sanitários. Este trabalho tem como objetivo central, testar a atividade antimicrobiana de peptídeos derivados leucocinas em diferentes espécies de microrganismos de interesse na área de contaminação alimentar. Para atingir os objetivos, foram projetados peptídeos com base na estrutura secundária de Leucocinas A- e B-TA33a, os quais foram posteriormente sintetizados pelo método de síntese em fase sólida. As purificações dos peptídeos foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência e a caracterização das moléculas por meio de espectrometria de massas. O análogo nativo LeuB, apresentou maior porcentagem de inibição de crescimento de *Salmonella* sorovar Typhimurium (71%) e *Escherichia coli* O157:H7 (69%). O análogo LeuA1 apresentou maior inibição contra as bactérias *Listeria monocytogenes* (79%) e *Staphylococcus aureus* (96%) e o análogo LeuAB2 para *Pseudomonas aeruginosa* (91%). Neste trabalho, evidencia-se ação bacteriostática para todos os peptídeos e ação parcialmente sinérgica entre os peptídeos LeuB e LeuA1, pelo ensaio de Chickerboard ( $\Sigma CIF \leq 0,75$ ) contra *Listeria monocytogenes*. No ensaio de inibição enzimática o peptídeo LeuB, foi capaz de inibir a atividade da enzima DNA Girase e Topoisomerase IV a partir de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e o LeuA1 inibiu a atividade de relaxamento da Topoisomerase IV em concentrações a partir de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os peptídeos LeuB e LeuA1, atingiram 100% de vazamento de CF a concentração de 6,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , no primeiro minuto e para o peptídeo LeuAB2 aos 8 minutos houve uma porcentagem de vazamento em torno de 80%. Os peptídeos não apresentaram inibição da atividade da enzima topoisomerase I humana. No entanto, em concentrações de  $\geq 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ , foram capazes de inibir a enzima humana topoisomerase II $\alpha$ . Mesmo assim, o percentual de hemólise dos peptídeos em hemácias humanas foi de no máximo 2%, resultados que indicam uma reduzida ação citotóxica em células eucarióticas. O análogo LeuA1 apresentou propriedade antioxidante de 406  $\mu\text{Mol}$  em equivalentes de Trolox o que corresponde a 24% de capacidade redutora, podendo inibir a deterioração oxidativa nos alimentos. Os espectros de dicroísmo demonstraram flexibilidade conformacional predominando estrutura de  $\alpha$ -hélice em TFE 60% e SDS, para os peptídeos LeuB, LeuA1 e LeuAB2.

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

## **SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL AND SYNERGISTIC ACTIVITY OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE ANALOGS TO THE BACTERIOCINES *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* TA33a**

Leucocins are antimicrobial peptides, synthesized on the ribosome of lactic acid bacteria of the genus *Leuconostoc* that are capable of inhibiting pathogenic and /or deteriorating microorganisms. This work aims to test the antimicrobial activity of peptides derived from leucocins in different species of microorganisms of interest in food contamination scenario. Peptides were designed based on the secondary structure of Leucocin A- and B-TA33a, which were later synthesized by the solid-phase synthesis method. Peptide purifications were performed by high performance liquid chromatography and the characterization of the molecules was performed by mass spectrometry. The native analog LeuB showed a higher percentage of growth inhibition against *Salmonella sorovar* Typhimurium (71%) and *Escherichia coli* O157: H7 (69%). The LeuA1 analog showed the highest inhibition against the bacteria *Listeria monocytogenes* (79%) and *Staphylococcus aureus* (96%) while the LeuAB2 analogue presented highest inhibition against *Pseudomonas aeruginosa* (91%). In this work, the bacteriostatic action for all peptides and partially synergistic action between the LeuB and LeuA1 peptides were evidenced by the Checkerboard test ( $\Sigma \text{CIF} \leq 0.75$ ) against *Listeria monocytogenes*. In the enzymatic inhibition assay the LeuB peptide was able to inhibit the activity of the DNA Gyrase enzyme from 100  $\mu\text{g} / \text{ml}$  and inhibit Topoisomerase IV from 100  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . LeuA1 inhibited the relaxation activity of Topoisomerase IV at concentrations of 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . LeuB and LeuA1 peptides reached 100% CF leaching at 6.25  $\mu\text{g} / \text{ml}$  in the first minute and for LeuAB2 peptide at 8 minutes there was a leakage rate of around 80%. The peptides did not show inhibition of the activity of the enzyme topoisomerase I human. However, at concentrations of  $\geq 200 \mu\text{g} / \text{mL}$ , they were able to inhibit the human enzyme topoisomerase II $\alpha$ . Nevertheless, the percentage of hemolysis of the peptides in human red blood cells was lower than 2%, indicating a reduced cytotoxic action in eukaryotic cells. The LeuA1 analog presented an antioxidant property of 406  $\mu\text{Mol}$  in Trolox equivalents, corresponding to 24% reducing capacity, which could supply oxidative deterioration in food. Dichroism spectra demonstrated conformational flexibility predominating  $\alpha$ -helix structure in 60% TFE and SDS for the LeuB, LeuA1 and LeuAB2 peptides.

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

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema da nitrosação endógena.....	41
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de toxicidade dos nitratos sobre a hemoglobina. ....	42
<b>Figura 3.</b> Fluxograma para avaliação do efeito sinérgico do LeuA1 e LeuB frente a <i>Listeria monocytogenes</i> .....	54
<b>Figura 4.</b> Predição da estrutura secundária de leucocinas A-, B- e C-TA33a. 61	
<b>Figura 5.</b> Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o análogo peptídico LeuA1.....	63
<b>Figura 6.</b> Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o análogo ..... 63	
<b>Figura 7.</b> Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o análogo peptídico LeuB.....	63
<b>Figura 8.</b> Inibição da atividade de superenovelamento do DNA pelo LeuA1. Volume de reação de 30 µL 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 LeuA1. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50 µg/mL, respectivamente. ....	76
<b>Figura 9.</b> Inibição da atividade de superenovelamento da DNA pelo LeuAB2. Volume de reação de 30 µL 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 LeuAB2. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50 µg/mL, respectivamente. ....	77
<b>Figura 10.</b> Inibição da atividade de superenovelamento da DNA pelo LeuB. Volume de reação de 30 µL 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 µg/mL, respectivamente. ....	77
<b>Figura 11.</b> Inibição da atividade de relaxamento do DNA pelo LeuA1. Volume de reação de 30 µL 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 LeuA1. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50 µg/mL, respectivamente. ....	78
<b>Figura 12.</b> Inibição da atividade de relaxamento do DNA pelo LeuAB2. Volume de reação de 30 µL 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 LeuAB2. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50 µg/mL, respectivamente.....	79
<b>Figura 13.</b> Inibição da atividade de relaxamento do DNA pelo LeuB. Volume de reação de 30 µL 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 µg/mL, respectivamente.....	79
<b>Figura 14.</b> Ensaio de inibição enzimática com o LeuA1 em topoisomerase I humana. Volume de reação de 30 µL contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 superenovelado e	



topoisomerase I (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, topoisomerase I (1U) e LeuA1. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50 µg/ml, respectivamente. .... 82

**Figura 15.** Ensaio de inibição enzimática com o LeuAB2 em topoisomerase I humana. Volume de reação de 30 µL contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 superenovelado e topoisomerase I (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, topoisomerase I (1U) e LeuAB2. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50 µg/ml, respectivamente. .... 82

**Figura 16.** Ensaio de inibição enzimática com o LeuB em topoisomerase I humana. Volume de reação de 30 µL contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 superenovelado e topoisomerase I (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, topoisomerase I (1U) e LeuB. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50 µg/ml, respectivamente. .... 82

**Figura 17.** Ensaio de inibição enzimática com o LeuA1 em topoisomerase II $\alpha$  humana. Volume de reação de 30 µL contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 superenovelado e topoisomerase II $\alpha$  (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, topoisomerase II $\alpha$  (1U) e LeuA1. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas de 200, 150, 100 e 50 µg/ml, respectivamente. .... 83

**Figura 18.** Ensaio de inibição enzimática com o LeuAB2 em topoisomerase II $\alpha$  humana. Volume de reação de 30 µL contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 superenovelado e topoisomerase II $\alpha$  (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, topoisomerase II $\alpha$  (1U) e LeuAB2. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas de 200, 150, 100 e 50 µg/ml, respectivamente. .... 83

**Figura 19.** Ensaio de inibição enzimática com o LeuB em topoisomerase II $\alpha$  humana. Volume de reação de 30 µL contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 superenovelado e topoisomerase II $\alpha$  (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, topoisomerase II $\alpha$  (1U) e LeuB. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas de 200, 150, 100 e 50 µg/ml, respectivamente. .... 84

**Figura 20.** Espectros de dicroísmo circular típicos de conformações peptídicas. .... 87

**Figura 21.** Espectros de CD dos peptídeos LeuB, LeuA1 e LeuAB2 a 60 µM em (A) TFE, (B) SDS e Tampão (C)..... 88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequências primária de aminoácidos dos análogos peptídicos LeuB, LeuA1 e LeuAB2. ....	49
<b>Tabela 2.</b> Valores de $\Sigma$ CIF correspondentes às diferentes interações. ....	55
<b>Tabela 3.</b> Massas de peptidil-resinas de cada um dos análogos sintetizados. ....	62
<b>Tabela 4.</b> Massas moleculares teóricas e obtidas por espectrometria de massas dos análogos de leucocinas sintetizados. ....	64
<b>Tabela 5.</b> Rendimento da purificação e pureza relativa dos análogos da Leucocina. ....	64
<b>Tabela 6.</b> Porcentagem de inibição dos análogos peptídicos LeuB, LeuA1 e LeuAB2, frente <i>Escherichia coli</i> O157:H7 pelo ensaio de Microdiluição em placas. [Controle de crescimento: CMH + <i>Escherichia coli</i> O157:H7; ciprofloxacina (100 $\mu$ g/mL)]. ....	66
<b>Tabela 7.</b> Porcentagem de inibição dos análogos peptídicos LeuB, LeuA1 e LeuAB2, frente <i>Salmonella</i> sorovar Typhimurium pelo ensaio de Microdiluição em placas. [Controle de crescimento: CMH + <i>Salmonella</i> sorovar Typhimurium; ciprofloxacina (100 $\mu$ g/mL)]. ....	66
<b>Tabela 8.</b> Porcentagem de inibição dos análogos peptídicos LeuB, LeuA1 e LeuAB2, frente <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pelo ensaio de Microdiluição em placas. [Controle de crescimento: CMH + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; ciprofloxacina (100 $\mu$ g/mL)]. ....	67
<b>Tabela 9.</b> Porcentagem de inibição dos análogos peptídicos LeuB, LeuA1 e LeuAB2, frente <i>Listeria monocytogenes</i> pelo ensaio de Microdiluição em placas. [Controle de crescimento: CMH + <i>Listeria monocytogenes</i> ; ciprofloxacina (100 $\mu$ g/mL)]. ....	67
<b>Tabela 10.</b> Porcentagem de inibição dos análogos peptídicos LeuB, LeuA1 e LeuAB2, frente <i>Staphylococcus aureus</i> pelo ensaio de Microdiluição em placas. [Controle de crescimento: CMH + <i>Staphylococcus aureus</i> ; ciprofloxacina (100 $\mu$ g/mL)]. ....	67
<b>Tabela 11.</b> Efeito sinérgico dos análogos peptídicos LeuB e LeuA1 (400 $\mu$ g/ml) frente <i>Listeria monocytogenes</i> pelo ensaio de Checkerboard. [Controle de crescimento: CMH + <i>Listeria monocytogenes</i> ; ciprofloxacina (100 $\mu$ g/mL)]. ....	73
<b>Tabela 12.</b> Atividade antioxidante dos análogos peptídicos LeuA1, LeuAB2 e LeuB (400 $\mu$ g/ml) pelo método do radical ABTS <sup>+</sup> . ....	75
<b>Tabela 13.</b> Porcentagem de hemólise dos análogos peptídicos LeuAB2, LeuA1 e LeuB nas diferentes concentrações (200, 150, 100 e 50 $\mu$ g/ml) pelo ensaio hemolítico. ....	81

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Atividade antibacteriana dos análogos peptídicos LeuA1, LeuAB2 e LeuB (400 µg/ml) frente *Escherichia coli* O157:H7 pelo ensaio Time-Kill. [Controle de crescimento: CMH + *Escherichia coli* O157:H7; ciprofloxacina (100µg/mL)]...... 70
- Gráfico 2.** Atividade antibacteriana dos análogos peptídicos LeuA1, LeuAB2 e LeuB (400 µg/ml) frente *Salmonella* Typhimurium pelo ensaio Time-Kill. [Controle de crescimento: CMH + *Salmonella* Typhimurium; ciprofloxacina (100 µg/ml)]. ..... 70
- Gráfico 3.** Atividade antibacteriana dos análogos peptídicos LeuA1, LeuAB2 e LeuB (400 µg/ml) frente *Pseudomonas aeruginosa* pelo ensaio Time-Kill. [Controle de crescimento: CMH + *Pseudomonas aeruginosa*; ciprofloxacina (100 µg/ml)]. ..... 71
- Gráfico 4.** Atividade antibacteriana dos análogos peptídicos LeuA1, LeuAB2 e LeuB (400 µg/ml) frente *Listeria monocytogenes* pelo ensaio Time-Kill. [Controle de crescimento: CMH + *Listeria monocytogenes*; ciprofloxacina (100 µg/ml)]. 71
- Gráfico 5.** Atividade antibacteriana dos análogos peptídicos LeuA1, LeuAB2 e LeuB (400 µg/ml) frente *Staphylococcus aureus* pelo ensaio Time-Kill. [Controle de crescimento: CMH + *Staphylococcus aureus*; ciprofloxacina (100 µg/ml)]. . 72
- Gráfico 6.** Permeabilização de LUVs de POPG/POPC (25/75) pelos análogos LeuB, LeuA1 e LeuAB2 a uma concentração de 6,25 µg/ml. .... 85

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Sequência de aminoácidos das bacteriocinas da classe II.....	44
<b>Quadro 2.</b> Protocolo utilizado para síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS). .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

### 1. Aminoácidos

Ala (A) - alanina  
Arg (R) - arginina  
Asp (D) - ácido aspártico  
Gln (Q) – glutamina  
Gly (G) - glicina  
His (H) - histidina  
Ile (I) - isoleucina  
Leu (L) - leucina  
Lys (K) - lisina  
Met (M) - metionina  
Phe (F) - fenilalanina  
Pro (P) - prolina  
Ser (S) - serina  
Thr (T) - treonina  
Trp (W) - triptofano  
Tyr (Y) - tirosina  
Val (V) - Valina

### 2. Outras terminologias

ABTS - ácido [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)  
ABS – absorbância  
ACN - acetonitrila  
ATP - adenosine triphosphate (trifosfato de adenosina)  
BAL – bactérias lácticas  
BHA - butil-hidroxi-anisol  
BHT - butil-hidroxi-tolueno  
CF - carboxifluoresceína  
CMH – Caldo Müeller-Hinton  
CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência  
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

DC - dicroísmo circular  
DCM - diclorometano  
DIC - N,N'- diisopropilcarbodiimida  
DIEA - N- Diisopropiletilamina  
DMF - dimetilformamida  
DNA - ácido desoxirribonucleico  
DTA – doenças transmitidas por alimentos  
EDT - 1, 2-Etanoditiol  
EHEC – Escherichia coli enterohemorrágica  
FDA - Food and drug administration  
Fmoc - 9-fluorenilmetiloxycarbonila  
HEPES - N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)  
HOBT - N-hidroxibenzotriazol  
HBTU - (O-Benzotriazolil-N,N,N',N'-tetrametilurônio-hexafluorofosfato)  
LPS - Lipopolissacarídeos  
LUV - vesícula unilamelar grande  
MLV - vesícula multilamelar  
NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido  
PAMs - peptídeos antimicrobianos  
PBS – tampão fosfato-salino  
PG - propil galato  
POPC - 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina  
POPG - 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)  
RNA - ácido ribonucleico  
SPFS – síntese de peptídeos em fase sólida  
SUV - vesícula unilamelar pequena  
TBHQ - terc-butilhidroquinona  
tBu - terc-butílicos  
TFA - ácido trifluoroacético  
TIS – triisopropilsilano  
UFC – unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	38
1.1. Contaminação de Alimentos .....	38
1.2. O uso de bacteriocinas em alimentos .....	40
1.3. Peptídeos Antimicrobianos Derivados de Leucocinas .....	43
1.4. Síntese em Fase Sólida de Peptídeos Antimicrobianos.....	46
1.5. Efeito Sinérgico dos peptídeos antimicrobianos.....	47
2. OBJETIVOS .....	48
2.1. Objetivo Geral .....	48
2.2. Objetivos Específicos .....	48
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1. Sínteses dos Peptídeos .....	49
3.1.1. Purificação dos Peptídeos Sintetizados.....	51
3.2. Ensaio de Inibição do Crescimento Bacteriano .....	51
3.2.1. Ensaio de Microdiluição em Placas .....	51
3.2.2. Ensaio Time Kill .....	52
3.2.3. Ensaio Checkerboard .....	53
3.3. Estudo da Atividade Antioxidante.....	55
3.4. Ensaio de Inibição Enzimática.....	56
3.4.1. Ensaio de Inibição do Superenovelamento do DNA pela DNA Girase 56	
3.4.2. Ensaio de Inibição do Relaxamento do DNA pela Topoisomerase IV 57	
3.5. Ensaio de Toxicidade dos Peptídeos .....	58
3.5.1. Ensaio de Inibição do Relaxamento do DNA pelas Topoisomerasas Humanas.....	58
3.5.2. Estudo da Atividade Hemolítica .....	58
3.6. Vazamento de Carboxifluoresceína .....	59
3.7. Dicroísmo Circular.....	60
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
5.1. Design, Síntese e Caracterização dos Análogos Peptídicos das Leucocinas.....	60
5.2. Ensaio de Inibição de Crescimento Microbiano.....	65
5.3. Ensaio Antioxidante .....	74
5.4. Ensaio de Inibição Enzimática.....	76
5.5. Ensaio de Toxicidade dos Análogos em Células Eucarióticas .....	80
5.6. Vazamento de Carboxifluoresceína .....	84
5.7. Dicroísmo Circular.....	86
6. CONCLUSÕES .....	89
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	91

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
------------------------------------	----



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Contaminação de Alimentos

A segurança microbiológica dos alimentos é uma questão de saúde pública que se torna cada vez mais importante. Governos em todo o mundo estão intensificando seus esforços para garantir a produção de alimentos seguros, em resposta ao crescente aumento de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (TAYLOR et al., 2012). De acordo com dados atuais do Ministério da Saúde (MS)/Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) entre os agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DTAs de entre os anos de 2007 a 2017 no Brasil, foram 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 (SINAN, 2017).

O perfil epidemiológico das enfermidades transmitidas por alimentos, mudou na última década devido à: expansão dos mercados de consumo, globalização econômica, alterações dos hábitos alimentares, aumento no consumo de alimentos industrializados ou produzidos fora do lar, intensificação da produção, o que dificulta o controle das DTAs pelas autoridades de saúde pública (CARDOSO & ARAÚJO, 2003).

Como exemplo, podemos citar a ocorrência de infecções alimentares em seres humanos ocasionadas por microrganismos do gênero *Salmonella* spp, a qual continua sendo um dos principais problemas para a avicultura. A ingestão de alimentos e água contendo células viáveis da bactéria é a via mais comum de infecção do hospedeiro (OMWANDHO & KUBOTA, 2010).

Outras bactérias frequentemente envolvidas em infecções alimentares humanas são as integrantes do gênero *Listeria* spp. Entre essas, *Listeria monocytogenes* é a única espécie desse gênero que é patogênica para humanos. A listeriose lidera o posto de doenças associadas a alimentos que causam maior número de mortes e hospitalizações (91%), envolvendo principalmente gestantes, recém-nacidos e pessoas imunocomprometidas (EFSA, 2007).

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria comumente encontrada no ambiente e estabelecimentos processadores de alimentos, sendo associado à deterioração de uma grande variedade de alimentos, por ser capaz de sobreviver a baixas concentrações de nutrientes e de se multiplicar mesmo sob-refrigeração (BATISTA et al., 2014; YASSUNAKA et al., 2014). Alimentos como frutas e hortaliças, dentre outros vegetais, podem ser uma fonte de microrganismos contendo genes de resistência aos antibióticos, sobretudo quando estes não são devidamente higienizados antes do consumo. A preocupação é ainda maior com relação aos alimentos consumidos crus, onde já foram encontradas cepas resistentes de *Pseudomonas aeruginosa* (MOKHTARI et al., 2012).

O principal habitat de *Escherichia coli* é o trato intestinal dos humanos e de outros animais de sangue quente. A maioria dos sorogrupos de *Escherichia coli* faz parte da microbiota comensal do intestino dos mamíferos. No entanto, certos sorotipos são patogênicos para o homem e para outros animais, não fazendo parte da microbiota intestinal natural. A transmissão das infecções causadas por *Escherichia coli* seguem principalmente três vias: o contato direto com animais, o contato com humanos e o consumo de alimentos contaminados (PELCZAR et al., 1997). Entre os grupos das *E. coli*, as enterohemorrágicas (EHEC) são consideradas as mais patogênicas para os seres humanos, e podem ser transmitidas das fezes do bovino para a água, vegetais ou alimentos de origem animal, como o leite e seus derivados, assim como as carnes e seus derivados. Um dos maiores pontos críticos para a contaminação de *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC) na carne é a evisceração, em que pode ocorrer uma contaminação da carcaça, em decorrência do extravasamento do conteúdo gastrointestinal, tornando-se a principal via de transmissão para os humanos que ingerem a carne mal cozida (NESPOLO et al., 2014; SHAH et al., 2010).

Outro microrganismo que pode ser transmitido por alimentos é o *Staphylococcus aureus*, cuja importância epidemiológica está vinculada a graves intoxicações alimentares, devido às toxinas que formam durante o armazenamento inadequado dos alimentos (SOUZA et al., 2015). *Staphylococcus aureus* é uma bactéria encontrada na mucosa nasal, capaz de contaminar as mãos, desempenhando papel importante na disseminação de infecções através dos alimentos (ALMEIDA et al., 2016).

Surtos de DTAs resultam em um grande número de pessoas doentes e o "recall" de produtos alimentícios (recolhimento e substituição de lotes de

produtos alimentícios contaminados) pode reduzir a confiança dos consumidores, diminuindo a demanda por esses produtos e resultando em perdas econômicas significativas para todas as partes da cadeia de abastecimento (BERGER et al., 2010).

Diante do que foi exposto acima, existe uma grande preocupação em proteger o alimento e a saúde do consumidor, adotando boas técnicas de produção e conservação dos alimentos.

## **1.2. O uso de bacteriocinas em alimentos**

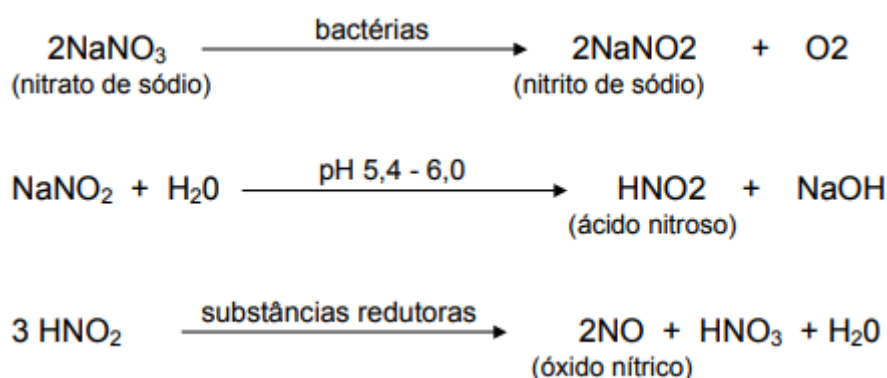
Os estudos envolvendo bacteriocinas começaram em 1925 com Gratia, pesquisador que fez a descoberta das colicinas produzidas por *Escherichia coli* (FREDERICQ, 1957). Devido ao seu potencial de aplicação como conservante natural, um elevado número de bacteriocinas têm sido identificadas e caracterizadas, principalmente aquelas produzidas por bactérias lácticas (LEWUS, 1991). As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizadas no ribossomo da maioria das bactérias e que têm a capacidade de inibir o crescimento de outras bactérias. Possuem diversas estruturas químicas e o seu papel na imunidade inata é essencial. Estes peptídeos são geralmente pequenos (3-10 kDa) e são inativados por enzimas proteolíticas. Sabe-se, também, que em uma única bactéria, podem ser produzidos diversos peptídeos com estas características (AUNPAD & NA-BANGCHANG, 2007).

Por serem descritas como conservantes naturais, a utilização de bacteriocinas em alimentos é muito promissora, além disso, vem sendo observado uma redução no potencial inibitório de alguns conservantes químicos devido ao aparecimento de cepas microbianas multirresistentes, principalmente após o uso contínuo desses compostos. Neste sentido, há um grande interesse por parte da indústria sobre o potencial de utilização de bacteriocinas como conservantes de alimentos, as quais apresentam mecanismos de ação específicos e alternativos aos agentes químicos (RODRIGUES, 2010).

Os conservantes tornaram-se importantes para a fabricação de alimentos, devido à busca por alimentos com uma vida de prateleira maior, impulsionando estudos sobre a utilização de conservantes naturais. O uso de nitritos e nitratos é discutível devido ao seu efeito adverso quando utilizado a longo prazo (TERRA et al., 2004). As finalidades da utilização de nitrato de sódio ou potássio e nitrito

de sódio ou potássio são de desenvolver cor característica da carne curada e funcionar como bacteriostático em meio ácido (ROÇA, 2000). A principal preocupação do uso de nitritos e nitratos em alimentos é decorrente dos efeitos tóxicos por excesso na dieta e pela formação endógena de compostos n-nitrosos, como a N-nitrosodimetilamina e monometilnitrosamina, pela nitrosação endógena (Figura 1), que apresentam efeitos carcinógenos, teratogênicos e mutagênicos (MARTINS E MÍDIO, 2000).

**Figura 1.** Esquema da nitrosação endógena.

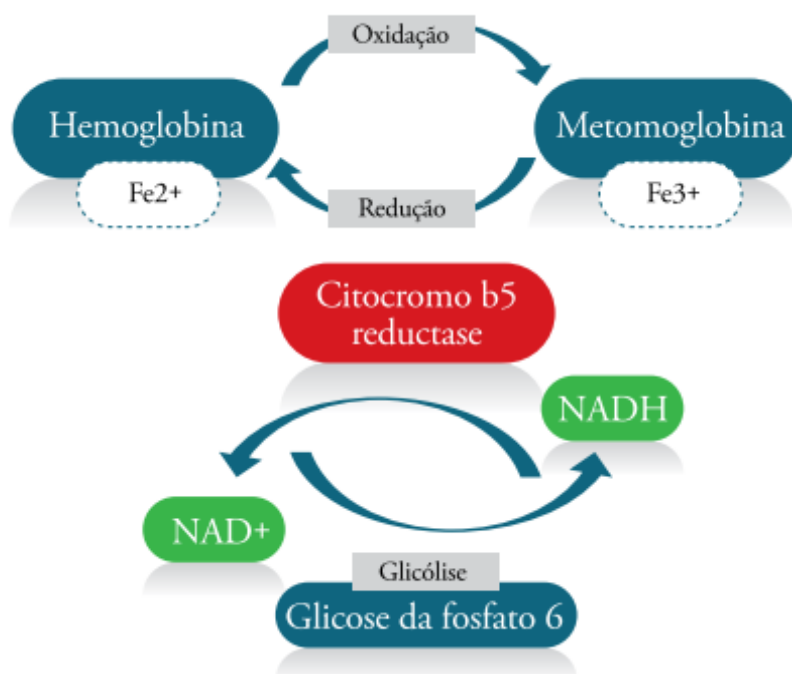


**Fonte:** ROÇA (2000).

A ingestão de nitritos deve ser bem restrita, principalmente por crianças, pois, uma vez absorvido, o nitrito pode agir sobre o grupo heme da hemoglobina, também chamado de grupo ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) desencadeando a oxidação a um grupo férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), ocorrendo a passagem da hemoglobina a meta-hemoglobina, impedindo que ela exerça a função normal de transportar o oxigênio (CORTAS & WAKID, 1991). O acúmulo de meta-hemoglobina é prevenida pela ação de vários mecanismos que reduzem a meta-hemoglobina a hemoglobina, numa cadeia de transferência de elétrons (Figura 2), um mecanismo fisiológico importante desencadeado pela redutase citocromo b5 (CARVALHO et al., 2011). Desde 1968 a agência estadunidense – Food and Drug Administration (FDA) – se preocupa com a presença de nitrosaminas nos alimentos e, juntamente com a indústria norte-americana de alimentos, despense grandes esforços para reduzir os níveis de nitrosaminas e encontrar substitutos para o nitrito (HAVERY & FAZIO, 1985; SEBRANEK & FOX, 1979; SOFOS & BUSTA, 1980). A legislação brasileira vigente prevê limites máximos de 0,015 g/100 g e 0,03 g/100 g, respectivamente para nitrito e nitrato de sódio,

para carnes e produtos cárneos, mas não existe um monitoramento para avaliar a presença de nitrosaminas em alimentos (BRASIL, 1998).

**Figura 2.** Mecanismo de toxicidade dos nitratos sobre a hemoglobina.



**Fonte:** CARVALHO et al. (2011)

As bacteriocinas estão sendo empregadas na bioconservação de alimentos com o objetivo de controlar o desenvolvimento de microrganismos indicadores e deteriorantes. Vários estudos demonstram a efetividade destes compostos na bioconservação de alimentos (NASCIMENTO et al., 2008). SOBRAL et al. (2013) avaliaram o efeito da adição de diferentes concentrações de nisina sobre o comportamento de dois grupos de bactérias lácticas, *Lactococcus spp* e *Lactobacillus spp*, em queijo Minas artesanal da região de Araxá, durante o período de 60 dias de maturação. O resultado da pesquisa foi satisfatório, pois verificou-se que a nisina não interferiu na multiplicação destes microrganismos ao longo da maturação dos queijos Minas artesanais da região de Araxá. Esta observação é importante, pois a nisina atua como um peptídeo antimicrobiano de espécies contaminantes do queijo, porém não afeta a viabilidade das espécies lácticas naturalmente encontradas neste tipo de alimento.

GIROLDO et al. (2014) analisaram o efeito da nisina na inativação do *Alicyclobacillus acidoterrestris*, microrganismo encontrado em sucos

industrializados pasteurizados e concluíram que o uso desse antimicrobiano inibiu o crescimento bacteriano e o seu uso pode ser muito promissor no processamento de sucos de frutas.

Esses recentes estudos, nos motivaram a explorar o potencial antimicrobiano de um grupo específico de bacteriocinas, denominado leucocinas, por atuarem em alvos intracelulares, que já vem sendo aplicado em outros estudos paralelos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, com o objetivo de propormos uma medida alternativa aos conservantes alimentares.

### **1.3. Peptídeos Antimicrobianos Derivados de Leucocinas**

Vários estudos com bacteriocinas são realizados para avaliar o potencial das mesmas como conservantes de alimentos. Devido à sensibilidade de algumas bacteriocinas à degradação por enzimas proteolíticas e pelo fato de não afetarem de maneira negativa a microbiota intestinal, são consideradas seguras para serem aplicadas em alimentos (CHALÓN et al., 2012; MORENO et al., 2000).

As leucocinas são peptídeos antimicrobianos (PAMs) sintetizados no ribossomo, principalmente, de bactérias ácido lácticas (BALs) como, por exemplo, *Lactococcus spp*, *Lactobacillus spp* e *Leuconostoc spp*. Estes PAMs são capazes de matar ou inibir outras espécies bacterianas, geralmente pela formação de poros na membrana celular ou inibindo a síntese da membrana celular (WAN et al., 2015).

As leucocinas fazem parte de uma grande família de PAMs, conhecida como bacteriocinas. Vários esquemas foram sugeridos ao longo dos anos para classificar as bacteriocinas de bactérias Gram-negativas incluindo as BALs. COTTER et al. em 2005 sugeriram um esquema em que as bacteriocinas são agrupadas em dois grupos principais: os lantibióticos (classe I) e as bacteriocinas que não contém lantionina (classe II). As bacteriocinas de classe I ou lantibióticos são peptídeos pequenos, menores do que 5kDa, possuem lantionina ou lantionina-3-metil, resíduos modificados pós-transducionais não usuais, como exemplo a nisina. Já as bacteriocinas de classe II, contêm os peptídeos não modificados, são menores do que 10 kDa, estável ao calor, não contém lantionina já que não passam por extensa modificação pós-transducionais.

Este grupo ainda pode ser subdividido em quatro subclasses como: as de classe IIa (bacteriocinas semelhantes a pediocina), bacteriocinas de dois componentes (classe IIb), bacteriocinas circulares (classe IIc), e as bacteriocinas de classe II d (não modificadas, lineares, e não semelhantes a pediocina) (PEREZ et al., 2014). Exemplos de bacteriocinas pertencentes à classe II são as leucocinas, que são produzidas por cepas de bactérias *Leuconostoc spp*, que já vem sendo utilizadas na indústria de alimentos como culturas "starters" e protetoras. Dentre suas bacteriocinas produzidas se encontram as leucocinas A e C da classe IIa e leucocina B pertencente à classe IIb. A bactéria *Leuconostoc mesenteroides* TA33a é capaz de produzir essas três leucocinas (WAN et al., 2015). No quadro 1, é possível observar as diferentes bacteriocinas da classe II e suas respectivas sequencias de aminoácidos.

**Quadro 1.** Sequência de aminoácidos das bacteriocinas da classe II.

Bacteriocin	Sequence	Amino acids
Leucocin C-TA33a	-----KNYGNG-VECTKKGCSVDWGYAAT----NIANNNSVMNGLTG-----	36
Sakacin P	-----KYYGNG-VFCGKHSCTVDWGTAIG----NIGNNAAANWATGGNAGWNK-	43
Bavaricin A	-----KYYGNG-VHXGKHSXTVDWGTAIG----NIGNNAAANXATGXNAGG---	41
Piscicolin 126	-----KYYGNG-VSCNKGCTVDWSKAIG----IIGNNAAANLTTGGAAGWNKG	44
Pediocin PA-1	-----KYYGNG-VTCGKHSVCSVDWGKATT----CIINNGAMAWATGGHQGNHKC	44
Enterocin A	TTHSGKYYGNG-VYCTKNKCTVDWAKATT----CIAGSMIGGFLGGAIPGKC--	47
Leucocin A-UAL 187	-----KYYGNG-VECTKSGCSVNWGEAFS----AGVHRLANGGNGFW-----	37
Leucocin B-TA11a	-----KYYGNG-VECTKSGCSVNWGEAFS----AGVHRLANGGNGFW-----	37
Mesentericin Y105	-----KYYGNGVVECTKSGCSVNWGEAAS----AGIHRLANGGNGFW-----	38
Sakacin A	----ARSYGNG-VYCNKCKCWVNRGEATQ----SIIGGMISGWASGLAGM----	41
Carnobacteriocin BM1	----AISYGNG-VYCNKCKCWVNRKAENKQ----AITGIVIGGWASSLAGMGH--	43
Carnobacteriocin B2	-----VNYGNG-VSCSKTKCSVNWQAFQERYTAGINSFVSGVASGAGSIGRRP	48

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

O registro e a utilização de bacteriocinas em alimentos requerem uma boa caracterização da molécula, além da realização de estudos toxicológicos (CLEVELAND et al., 2001). Sendo assim, é de suma importância a condução de ensaios que permitem quantificar os efeitos adversos dessas moléculas sobre a membrana plasmática dos eritrócitos e a consequente liberação da hemoglobina, em decorrência da hemólise (ALVES, 2003). A hemoglobina livre no plasma

causa sérios danos aos órgãos vitais como coração, fígado e rins, portanto se faz necessário a avaliação desta atividade (CARVALHO et al., 2007; BEDNARCZUK et al., 2010).

Segundo MARUGG (1991), estudos realizados com várias bacteriocinas indicaram que elas não são tóxicas nem provocam reações imunológicas e, por isso, possuem grande potencial como conservadores naturais em alimentos. A natureza química das bacteriocinas e de várias toxinas (hemolisinas) faz com que essas substâncias sejam facilmente degradadas no trato gastrointestinal do homem e animais, muitas vezes perdendo sua toxicidade (PIARD et al., 1992)

Recentemente têm sido realizados vários estudos do potencial citotóxico de cepas industriais de *Bacillus* spp utilizando ensaios in vitro. PEDERSEN et al., (2002) investigaram o potencial citotóxico das bacteriocinas produzidas por *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* em células de óvário de hamsters utilizando o ensaio do sal de tetrazolium (MTT) e ensaios imunológicos. Os autores concluíram que as espécies de *Bacillus* pertencentes ao grupo subtilis são seguras para uso industrial.

Conseqüentemente, a possibilidade de aplicação de conservantes naturais que não apresentem efeito tóxico, como os peptídeos antimicrobianos torna-se de grande interesse para a comunidade científica, porque são considerados seguros para a saúde humana e animal. Pelo fato das bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas ocorrerem naturalmente em alimentos fermentados, a adição de peptídeos antimicrobianos como aditivos alimentares será mais facilmente aceita pelas autoridades de saúde e pelos consumidores (LEE & KIM, 2011).

Há indícios de que as leucocinas, exibam atividades antimicrobianas específicas e, acima de tudo, que as exerçam através de mecanismos de ação alternativos aos conservantes químicos disponíveis, devido à alta especificidade que essa classe de biomoléculas apresenta em relação ao seu alvo celular, além de não serem potencialmente tóxicos ao organismo humano (RODRIGUES, 2010). Diferente de outras classes de PAMs relatados na literatura, que já foram alvos de estudos paralelos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, como: hilina a1 (CRUSCA et al., 2011); aureina e mangainina (LORENZON, 2015), que apresentam boa atividade antimicrobiana acompanhada de alta toxicidade.



#### **1.4. Síntese em Fase Sólida de Peptídeos Antimicrobianos**

Quando novos compostos são 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 extrações dessas fontes naturais por repetidas vezes, tornando-se o processo trabalhoso e demorado. Uma metodologia para agilizar o desenvolvimento de uma substância, facilitar a sua purificação e seu estudo é a síntese de peptídeo, permitindo a síntese de moléculas idênticas ou análogas aos naturais a fim de realizar estudos posteriores de aplicação desses compostos (GARRIDO, 2007).

A principal ferramenta utilizada hoje na obtenção de peptídeos é a Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS) desenvolvida por Merrifield em 1963. Este método é baseado no crescimento da cadeia peptídica, um resíduo por vez, a partir de sua região carboxi-terminal que se encontra ligado covalentemente a uma resina (suporte polimérico).

A SPFS destaca-se em relação à síntese enzimática, à síntese via DNA recombinante e a síntese de cultivo de microrganismos, técnica amplamente utilizadas para a obtenção da maioria das bacteriocinas, pela facilidade de purificação do produto e também por ser uma técnica muito eficiente na obtenção de peptídeos com até 60 resíduos de aminoácidos (MACHADO et al., 2004).

Outros aspectos relevantes a serem destacados na metodologia de SPFS estão diretamente relacionados a dois problemas muito comuns relacionados à síntese clássica ou, também conhecida como síntese em solução. O primeiro é a natural rapidez do processo de síntese como um todo, em oposição à tradicional lentidão da síntese clássica, pois procedimentos geralmente laboriosos são substituídos pela rápida lavagem com solventes no momento da purificação entre cada uma das etapas da síntese. Essa vantagem é provavelmente a mais notória da SPFS. O segundo, não menos importante, é o aumento global no rendimento da reação, que é uma consequência direta da rapidez na purificação, diminuindo a possibilidade de degradação dos produtos. Por fim a clivagem do produto final por meio de um reagente pré-determinado fornece um produto em tempo relativamente curto e com um índice de pureza consideravelmente alto (MARQUARDT & LIMA, 2001).

A síntese de moléculas idênticas ou análogas aos naturais (derivados estruturais com algumas modificações pontuais), permite a realização de

estudos fisiológicos, químicos, físicos, farmacológicos, bioquímicos e clínicos de grande parte dos peptídeos biologicamente ativos conhecidos até o presente momento (MACHADO et al., 2004).

Além de todas estas características, estas moléculas sintéticas, também denominadas miméticos peptídicos, são também utilizadas como padrões, permitindo a quantificação dos peptídeos correspondentes contidos em extratos brutos ou em frações obtidas durante seus isolamentos dos mais variados tipos de microrganismos, plantas ou até mesmo de diferentes espécies de animais (GIADA et al., 1998).

### **1.5. Efeito Sinérgico dos peptídeos antimicrobianos**

Como barreira para promover maior preservação dos alimentos é vantajoso combinar métodos diferentes para inibir o crescimento microbiano. Sinergismo é uma relação positiva, em que a combinação dos antimicrobianos proporciona uma eficácia maior. O antagonismo é uma relação negativa, no qual a combinação dos antimicrobianos prejudicará a atividade dos mesmos, resultando em um efeito menor (PILLAI, 2005).

Várias pesquisas, têm realizado o ensaio Checkerboard para avaliar combinações antimicrobianas *in vitro* que apresentaram sinergismo, ou seja, tiveram sua atividade potencializada, quando comparados com os testes realizados com as substâncias isoladamente (MITCHELL et al., 2011; KUMAR et al., 2012; LEE et al., 2012). O Checkerboard é um teste de microdiluição que avalia a concentração inibitória mínima (CIM) das combinações de antimicrobianos e são realizados os cálculos para saber se houve uma interação sinérgica, antagônica ou indiferente. Uma das vantagens do referido ensaio é a simplicidade do método, no qual é fácil de ser executado, requer materiais que são facilmente encontrados em laboratórios de microbiologia, de fácil interpretação, além dos cálculos necessários serem simples (PILLAI, 2005).

O Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH), tem estimulado a busca por novas formulações de antimicrobianos, que podem ter sua ação reforçada em decorrência da combinação com novos antimicrobianos derivados de produtos naturais (ALGBURI et al., 2017; CAVERA et al., 2015). De fato, o êxito observado nos estudos *in vitro* com a combinação de antimicrobianos pode ser explicado pela existência de mecanismos de ação distintos, estratégia que

estrutura helicoidal. Na presença de solução aquosa (Figura 21C), ambos os peptídeos LeuB, LeuA1 e LeuAB2, apresentaram uma conformação desordenada, com uma tendência para a estrutura randômica, conforme os espectros encontrados na literatura (GREENFIELD & FASMAN, 1969). Isso indica que, quando os peptídeos se encontram livres em solução aquosa, os mesmos não têm uma estrutura definida, mas ao entrarem em contato com a membrana da bacteriana os mesmos apresentam uma tendência em se estruturar em  $\alpha$ -hélice, importante para a efetiva interação dos peptídeos com seu alvo intracelular. Este fato pode explicar o potencial de inibição das topoisomerases bacterianas pelos peptídeos derivados de leucocinas, assim como outros PAMs inibidores desta classe de enzimas, já descritos na literatura (HAYES, 2003).

Outra relação importante a ser observada na questão que envolve estrutura e mecanismo de ação é que peptídeos que apresentam estrutura preferencialmente helicoidal, podem interagir com membranas e formar poros na mesma. Os mecanismos de formação de poros podem ser distintos e os poros formados podem ser transitórios ou permanentes (LORENZÓN, 2015). Sendo assim, as duas atividades descritas como possíveis modos de ação para esta classe de PAMs, contempladas nos peptídeos objetos deste trabalho. Estas características somadas, são bastante importantes para a efetiva ação desses compostos como agentes antimicrobianos, principalmente com a aplicação desejada de bioconservantes de alimentos.

## **6. CONCLUSÕES**

Diante dos resultados que foram exibidos, conclui-se que os processos de síntese, purificação e caracterização, mostraram-se eficazes para a produção dos peptídeos LeuA1, LeuAB2 e LeuB.

Os ensaios realizados com as topoisomerases bacterianas, DNA Girase e Topoisomerase IV, em eletroforese em gel de agarose, indicaram que os peptídeos LeuA1 e LeuAB2 não apresentam capacidade de inibição da enzima DNA Girase. Para o análogo LeuB, é possível observar que a inibição da atividade da DNA girase foi atingida a partir da concentração 100  $\mu\text{g/mL}$ . Os análogos LeuA1 e LeuB, foram capazes de inibir a enzima Topoisomerase IV a partir da concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

A atividade antimicrobiana dos análogos peptídicos foi satisfatória, em que o LeuB apresentou alta porcentagem de inibição para as bactérias *Escherichia coli* O157:H7 (69%), *Salmonella* sorovar Typhimurium (71%) e *Staphylococcus aureus*; o LeuA1 para as bactérias *Salmonella* sorovar Typhimurium (69%), *Pseudomonas aeruginosa* (49%), *Listeria monocytogenes* (79%) e *Staphylococcus aureus* (96%); e o LeuAB2 para as bactérias *Salmonella* sorovar Typhimurium (59%), *Pseudomonas aeruginosa* (91%), *Listeria monocytogenes* (69%) e *Staphylococcus aureus* (78%).

O ensaio “Time-Kill” evidenciou que os peptídeos apresentam efeito bacteriostático. Os análogos LeuB e LeuA1 apresentaram ação parcialmente sinérgica pelo ensaio de Checkerboard ( $\Sigma CIF \leq 0,75$ ) contra *Listeria monocytogenes*.

O análogo LeuA1 apresentou uma atividade antioxidante satisfatória, reduzindo em 24% o radical ABTS, diferentemente do LeuA1 e do LeuAB2 que não tem capacidade antioxidante.

Com relação aos ensaios realizados, para investigar a citotoxicidade dos análogos, é possível observar que, a porcentagem de hemólise para todos os peptídeos foi de no máximo 2% a uma concentração de 200 µg/mL. Ainda nessa concentração, os análogos LeuA1 e LeuB, inibiram a ação da enzima topoisomerase II, nas concentrações de 200, 150 e 100 µg/mL somente o análogo LeuAB2 interferiu na ação da enzima humana.

Nos ensaios de permeabilização de miméticos de membrana observou-se que a porcentagem de vazamento de carboxifluoresceína aumentou significativamente em contato com os peptídeos. Sendo assim, é possível notar que os peptídeos aparentemente possuem capacidade de interagir com as membranas bacterianas, produzindo poros parciais ou permanentes, os quais permitem a internalização dos peptídeos, bem como o extravasamento de carboxifluoresceína.

Com relação à conformação dos peptídeos, ambos apresentaram tendência em se estruturar em  $\alpha$ -hélice, fato esse que explica a possível interação dos peptídeos LeuB e LeuA1 com as enzimas DNA Girase e Topoisomerase IV.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYRATHNE, E. D. N. S.; LEE, H. Y.; JOC, C.; SUH, J. W. D.; AHN, B. 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.

ALGBURI, A.; COMITO, N.; KASHTANOV, D.; DICKS, L. M.; CHIKINDAS, M. L. Control of biofilm formation: antibiotics and beyond. **Applied Environment Microbiologic**, v. 83, 2017.

ALMEIDA, M. S. C.; MENDONÇA, R. L.; FREITAS, M. Z. C; VANDESMET, L. C. *Staphylococcus*. In Anais: Mostra Científica em Biomedicina, v. 1, n. 1, 2016.

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.

AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Fundamentals of modern peptide synthesis. **Methods Mol. Biol.**, v. 298, p. 3-24, 2005.

ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, v. 47, n. 6, p. 415-433, 1998.

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.

ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, E.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Antimicrobial Activity of Nisin, Reuterin, and the Lactoperoxidase System on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in Cuajada, a Semisolid Dairy Product Manufactured in Spain. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 1, p. 70-75, 2008.

AUNPAD R & NA-BANGCHANG K. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-mrsa and anti-vre activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. **Current Microbiology**, n. 55, p. 308-313, 2007.

BAKSHI, K.; LIYANAGE, M. R.; VOLKIN, D. B.; MIDDAUGH, C. R. **Circular dichroism of peptides**. *Methods Molecular Biologic*, v. 1088, p. 247-53, 2014.

BARBOSA, L. C. B. **Peptídeos derivados da toxina bacteriana ParE: Síntese, estrutura e inibição na atividade de topoisomerases**. 2012. 113 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

BATISTA, N. N.; CAMARGOS, N. G.; OLIVEIRA, M. M. M.; PICCOLI, R. H. Formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* sobre aço inoxidável em

contato com leite e seu 373 controle por óleos essenciais. **Brazilian Journal Food Nutrition**, v. 25, p. 19-24, 2014.

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.

BERGER, C. N.; SODHA, S. V.; SHAW, R. K.; GRIFFIN, P. M.; PINK, D.; HAND, P.; FRANKEL, G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. **Environmental Microbiology**, Chichester, v. 12, n. 9, p. 2385-2397, 2010.

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.

BOMAN, H. G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **Journal International Medical**, v.254, p.197-215, 2003.

BRASIL. **Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde**. Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998, republicada no Diário Oficial da União de 22 de março de 1999. Aprova Regulamento Técnico: "Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 – carne e produtos cárneos". Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos>. Acessado em fevereiro de 2018.

BROMBERG. R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R.; CINTRA H. C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 135-144, 2006.

CARDOSO, L.; ARAÚJO, W. M. C. Parâmetros de qualidade em produtos prontos para consumo imediato e congelados artesanais comercializados no distrito Federal no período de 1997-2001. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 109, p. 40-44, 2003.

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.

CARVALHO, C.; RIBEIRO, N.; ALVES, C. L.; GOMES, H.; SARMENTO, A. Methemoglobinemia: case report and review. **Arquivos de Medicina**, v. 25, n. 3, 2011.

CAVERA, V. L.; ARTHUR, T. D.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 46, p. 494-501, 2015.

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.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.; 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.

CLSI – **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Appoved guideline - CLSI document M27- A7, v. 26, n. 2, Wayne, Pennsylvania, USA, 2016.

CORTAS, N. K.; WAKID, N. W. Pharmacokinetics aspects of inorganic nitrate ingestion in man. **Pharmacology and Toxicology**, v. 68, p. 192- 193, 1991.

COSTA, E. F.; LIMA, M. S. F.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H. Avaliação antagonista de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho artesanal produtoras de bacteriocinas, p. 3642-3648, 2014. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2015**.

COTTER, P. D. An 'Upp'-turn in bacteriocin receptor identification. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 92, n. 6, p. 1159-1163, 2013.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005.

CRUSCA, E. et al. 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.

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 hydrolyses from oyster (*Crassostrea talienwhannensis*) meat. **International Journal of Food Science and Techonology**, v. 45, p. 978-984, 2010.

DRIDER, D.; BENDALI, F.; NAGHMOUCHI, K.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: not only antibacterial agents. **Probiotcs Antimicrob Proteins**, v. 08, p. 177-182, 2016.

EFSA - European Food Safety Authority. The Community Summary Report On Trends And Sources Of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance And Foodborne Outbreaks In The European Union In 2007.

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

FERNÁNDEZ-CUENCA, F.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; CONEJO, M. C.; AYALA, J. A.; PEREA, E. J.; PASCUAL, A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the

activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal Antimicrobial Chemother**, v. 51, p. 565-574, 2003.

FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. **Int. J. Pept. Prot. Res.**, v. 35, n. 3, p. 161-214, 1990.

FREDERICQ, P. Colicins. **Annu Review Microbiology**, v. 11, p. 7–22, 1957.

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.

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.

GIADA, M. L. R.; MIRANDA, M. T. M.; MARQUEZ, U. M. L. Sulphur-glutamyl peptides in mature seeds of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 61, p. 177–184, 1998.

GIROLDO, J. O; NASCIMENTO, M. S; FERREIRA, J. S. Estudo da aplicação de nisina para a inativação de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. In: **São Paulo: Blucher**, p. 572-576, 2014.

GÓMEZ-RUIZ, J. A.; LÓPEZ-EXPÓSITO, I.; PIHLANTO, A.; RAMOS, M.; RECIO, I. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS. **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 1061-1067, 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. J; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108-4116, 1969.

GUESSAS, B.; HADADJI, M.; SAIDI, N.; KIHAL, M. Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by lactic acid bacteria in milk. **African Crop Science Conference Proceedings**, v. 8, p. 1159-1163, 2007.

GUIMARÃES, C. F. R. C. **Síntese de peptídeos: cinética de dimerização via formação de ligação de dissulfeto, obtenção e estudos biofísicos de glicotriazol-peptídeos**. 2017. 184f. Tese (Doutorado em Ciências Químicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.



HALL, M. J., MIDDLETON, R. F.; WESTMACOTT, D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. **Journal Antimicrobial Chemother**, v. 11, p. 427-433, 1983.

HAMAMA, A.; HANKOURI, E. L. N.; EL AYADI, M. Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 933–938, 2002.

HANCOCK, R. E.; FALLA, T.; BROWN, M. Cationic bactericidal peptides. **Advanced Microbiology Physiology**, v.37, p.135-175, 1995.

HAVERY, D.C.; FAZIO, T. Human exposure to nitrosamines from foods. **Food Technology**, v. 39, p. 80-3, Jn.1985.

HAYES, F. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. **Science**, v. 301, p. 1496-1499, 2003.

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

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.

KENT, S. B. H. Chemical synthesis of peptides and proteins. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 5, p. 957-989, 1988.

KHALID, K.; KIONG, L. H.; CHOWDHURY, Z. Z.; KHALID, K. Antimicrobial interaction of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* against some pathogenic bacteria. **International Journal of Biosciences**, v. 1, p. 39-44, 2011.

KIM, S. B.; SEO, I. S.; KHAN, M. A.; KI, K. S.; NAM, M. S.; KIM, H. S. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 625–631, 2007.

KUMAR, S.N.; SIJI, J.V.; NAMBISAN, B.; MOHANDAS, C. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 3143-3150, 2012.

LEE H & KIM, H. Lantibiotics, Class I Bacteriocins from Genus *Bacillus*. **Journal Microbiology Biotechnology**, n. 21, p. 229-235, 2011.

LEE, Y.S.; JANG, K.A.; CHA, J.D. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

LEWUS, C. B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied Environment Microbiology**, v. 57, n.6, p. 1683-1688, 1991.

LOHNER, K.; STAUDEGGER, E. Are we on the threshold of the post-antibiotic era. In: LOHNER, K. (Ed.). Development of novel antimicrobial agents: emerging strategies. **Wymondham: Horizon Scientific Press**, p. 149-165, 2001.

LORENZÓN, E. N. **Efeito do comprimento e da polaridade do espaçador entre cadeias do peptide Hylina-C na forma dimérica**. 2011. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

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.

LORENZÓN, E. N. et al. Effects of dimerization on the structure and biological activity of antimicrobial peptide Ctx-Ha. **Antimicrobians Agents Chemother**, v. 56, n. 6, p. 3004-3010, 2012.

LORIS, R.; DAO-THI, M. H.; BAHASSI, E. M.; VAN MELDEREN, L.; POORTMANS, F.; LIDDINGTON, R.; COUTURIER, M.; WYNS, L. Crystal structure of CcdB, a topoisomerase poison from E-coli. **J. Mol. Biol.**, v. 285, p. 1667-1677, 1999.

LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERICIO, F.; GIRALT, E. **Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins**. Boca Raton: CRC, 1997.

IMARINO, L. Z.; OLIVEIRA, M. C.; ANTUNES, M. M.; OLIVEIRA, M.; RODRIGUES, R. O.; BUENO, C. I. C. Z.; SCHIMILE, M.; LIMA, A. A. NITRITOS E NITRATOS EM PRODUTOS CÂRNEOS ENLATADOS E/OU EMBUTIDOS. **Gestão em Foco**, ed. 7, 2015.

MacDONALD, R. C.; MacDONALD, R. I.; MENCO, B. P. M.; TAKESHITA, K.; SUBBARAO, N. K.; HU, L. R. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1061, p. 297-303, 1991.

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.

MAGZOUN, 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.

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.

MARTINS, A. P. **Atividade de antimicrobianos naturais sobre endósporos de *Clostridium perfringens* em mortadelas**. 2013. 131F. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

MARTINS, D. I.; MIDIO, A. F. Toxicologia dos alimentos. 2 Ed. São Paulo: **Varela**, 2000.

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.

MARUGG, J. D. Bacteriocins, their role in developing natural products. *Food Biotechnol*, v.5, p. 305-312, 1991.

MAXWELL, A. The molecular basis of quinolone action. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 30, p. 409-414, 1992.

MAYER, L. D.; HOPE, M. J.; CULLIS, P. R. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 858, p. 161-168, 1986.

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

MITCHELL, G.; LAFRANCE, M.; BOULANGER, S.; SÉGUIN, D. L.; GUAY, I.; GATTUSO, M.; MARSAULT, E.; BOUARAB, K.; MALOUIN, F. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 559- 568, 2011.

MOKHTARI, W.; NSAIBIA, S.; MAJOURI, D.; GHARBI, A. Detection and characterization of *Shigella* species isolated from food and human stool samples in Nabeul, Tunisia, by molecular methods and culture techniques. **Journal Applied Microbiology**, v. 113, n. 209– 222, 2012.

MORENO, I. Efeito e modo de ação das bactericinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 23-28, 2000.

MULLER, D. M.; CARRASCO, M. S.; SIMONETTA, A. C.; BELTRAMINI, L. M.; TONARELLI, G. G. A synthetic analog of Plantaricin 149 inhibiting food-borne pathogenic bacteria-membrane interaction. **Journal of Peptide Science**, v. 13, n. 3, p. 171-178, 2007.

NASCIMENTO, M. S.; FINATTI, D. P.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Atividade antimicrobiana de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* ATCC 11454 produtor de nisina sobre patógenos gram-positivos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 322- 328, 2008.

NCCLS- **National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: Approved guideline M26-A. Wayne, Pennsylvania, USA, 1999.

NESPOLO, N. M.; SABA, R. Z.; ROSSATELLI, D. A.; FAIRBROTHER, J. M.; JUNIOR, O. D. R. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 e O26 sorbitol negativas em matadouro frigorífico de bovino e suscetibilidade a antimicrobianos Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 and O26 sorbitol negative in a cattle slaughterhouse and susceptibility to antimicrobials. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 81, n. 3, p. 209-217, 2014.

OMWANDHO, C. O. A.; KUBOTA, T. *Salmonella* enterica sorovar Enteritidis: a Mini-review of contamination routes and limitations to effective control. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 44, n. 1, p. 7-16, 2010.

ONUMA, Y. et al. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. **Toxicon**, v. 37, n. 1, p. 55-65, 1999.

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, P. B. et al. Cytotoxic potencial of industrial strains of *Bacillus* sp. **Regulamentation Toxicology Pharmacology**, v. 36, p. 155-161, 2002.

PELCZAR, J. R. M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceito e aplicações**. São Paulo-SP: McGraw-Hill, v.2, 1997. Cap. 30, p. 371-397.

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

PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. **Microbial Cell Factories**, v. 13, 2014.

PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs. **Plos Pathogens**, v. 6, n. 10, 2010.

PIARD, J. C. et al. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine- containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNR 481. **Applied Environment Microbiology**, v. 58, p. 279-284, 1992.

PILLAI, S. K.; MOELLERING, R. C.; ELIOPOULOS, G. M. Antimicrobial combinations *In V. Lorian (ed.), Antibiotics in laboratory medicine*. The Lippincott Williams & Wilkins Co., Philadelphia, Pa, ed. 5, p. 365-440, 2005.

PIMENTEL-FILHO, N. J.; MANTOVANI, H. C.; CARVALHO, A. F.; DIAS, R. S.; VANETTI, M. C. D. Efficacy of bovicin HC5 and nisin combination against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in fresh cheese. **International Journal Food Science Technology**, v. 49, p. 416–422, 2014.

RODRIGUES, T. T. **Revisão bibliográfica da utilização de bacteriocinas como conservantes alimentícios na última década**. 53 f. Monografia de conclusão de curso (Graduação em farmácia) – Unochapecó, Chapecó. 2010.

RODRIGUEZ-HERNANDEZ, M. J.; SAUGAR, J.; DOCOBO-PEREZ, F.; DE LA TORRE, B. G.; PACHON-IBANEZ, M. E.; GARCIA-CURIEL, A.; FERNANDEZ-CUENCA, F.; ANDREU, D.; RIVAS, L.; PACHON, J. Studies on the antimicrobial activity of cecropin A–melittin hybrid peptides in colistin-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal Antimicrobial Chemother**, v. 58, p. 95–100, 2006.

ROÇA, R. O. Tecnologia das carnes e produtos derivados. Botucatu: Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, 2000.

RUFINO, M.S.M et al. Comunicado Técnico on line. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS<sup>•+</sup>** ISSN 1679 – 6535, Fortaleza, CE, julho, 2007.

SALAMI, M.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; EHSANI, M. R.; YOUSEFI, R.; HAERTLE, T.; CHOBERT, J. M.; RAZAVI, S. H.; HENRICH, R.; BALALAIE, S.; EBADI, S. A.; POURTAKDOOST, S.; NIASARI-NASLAJI, A. Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 58, n. 6, p.3297 – 3302, 2010.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics**. Release 9.1. Cary. 2012.

SEBRANEK, J.G.; FOX, J.B. Nitrosamines. A Review. **Journal Milk Food Technology**, v. 36, n. 2, p. 76-91, 1979.

SHAH, D.H.; SHRINGI, S.; BESSER, T.E.; CALL, D.R. Escherichia. In: LIU, D. (Ed.). **Molecular detection of foodborne pathogens**. BocaRaton: CRC Press, p.369-389, 2010.

SHI, C.; ZHANG, X., ZHAO, X.; MENG, R.; LIU, Z.; CHEN, X.; GUO, N. Synergistic interactions of nisin in combination with cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *Food Control*, v. 71, p. 10-16, 2017.

SILVA, J. C. M. **Síntese, caracterização e estudos da atividade biológica de peptídeos antimicrobianos derivados de Leucocinas TA33a**. 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN – Ministério da Saúde), 2017. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Acessado em: 09 de junho de 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>.

SOBRAL, D.; TEODORO, V. A. M.; PINTO, M. S.; MACHADO, G. M.; COSTA, R. G. B.; CARVALHO, F. Efeito da nisina na contagem de *Lactococcus* e *Lactobacillus* em queijo minas artesanal da região de araxá – MG. **Revista Instituto Laticínios Candido Tostes**, v. 68, n. 391, p. 5-10, 2013.

SOFOS, J. N.; BUSTA, F. F. Alternatives to use nitrite as an antibotulinal agent. **Food Technology**, v. 34, p. 244-51, 1980.

SOUZA, R. O.; CRUZ, L. F.; COELHO, M. B.; SOARES, L. A.; GOMES, A. A.; SOARES, J. O.; OLIVEIRA, L. F.; MAGALHÃES, J. T. Avaliação de *Staphylococcus aureus* em alimentos comercializados no município de Divinópolis, Minas Gerais. **Blucher Biochemistry Proceedings**, v. 1, n.1, 2015.

STACHOWIAK, R.; GRANIK, 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.

STEWART, J. M.; YOUNG, J. D. In: MERRIFIELD, R. B. (Ed.). Solid phase peptide synthesis. 2nd. ed. New York: Pierce Chemical Company, 1984.

TAYLOR, A. W.; COVENEY, J.; WARD, P. R.; HENDERSON, J.; MEYER, S. B.; PILKINGTON, R.; GILL, T. K. Fruit and vegetable consumption - the influence of aspects associated with trust in food and safety and quality of food. **Public Health Nutrition**, v. 15, p. 208-217, 2012.

TERRA, A. B.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. Particularidades na fabricação de salame. São Paulo: **Livraria Varela**, 2004.

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

VALLVERDÚ-QUERALT, A.; REGUEIRO, J.; ALVAREANGA, R.J.F.; TORRADO, X.; LAMUELA-RAVENTOS, RM. Home Cooking and Phenolics: Effect of Thermal Treatment and Addition of Extra Virgin Olive Oil on the Phenolic Profile of Tomato Sauces. **Journal Agriculture Food Chemical**, p. 3314-3320, 2014.

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

WANG, H.; CHENG, H.; WANG, F.; WEI, D.; WANG, X.; **Journal of microbiological Methods**, v. 82, p. 330, 2010.

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.

YASSUNAKA, N. N.; PENHA, C. B.; SILVA, A. F.; SANTOS, P. R.; SOUZA, K. S.; FREITAS, C. F.; MIKCHA, J. M. G. Inativação Fotodinâmica de *Pseudomonas aeruginosa* com Eritrosina e Seus Derivados. **Blucher Food Science Proceedings**, v. 1, n. 1, 2014.

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.