



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020022048-9 A2



(22) Data do Depósito: 28/10/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 10/05/2022

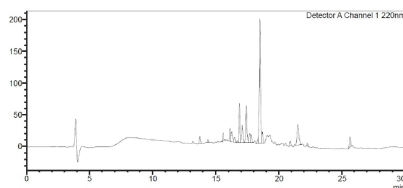
(54) **Título:** MÉTODO DE MICROENCAPSULAÇÃO DE PEPTÍDEO SINTETIZADO, COMPOSIÇÃO MICROENCAPSULADA E SEU USO EM AVES POEDEIRAS

(51) **Int. Cl.:** A61K 38/16; A61K 9/50; A61P 31/04.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** EDUARDO FESTOZO VICENTE; PRISCILLA AYLEEN BUSTOS MAC-LEAN MEGNA; CESAR AUGUSTO ROQUE BORDA; ANDREIA BAGLIOTTI MENEGUIN; DOUGLAS D'ALESSANDRO SALGADO; EDSON CRUSCA JUNIOR; ELISABETE APARECIDA LOPES GUASTALLI; HANYENY RAIELY LEITE SILVA; LARISSA PIRES PEREIRA; MARLUS CHORILLI; NILCE MARIA SOARES.

(57) **Resumo:** MÉTODO DE MICROENCAPSULAÇÃO DE PEPTÍDEO SINTETIZADO, COMPOSIÇÃO MICROENCAPSULADA E SEU USO EM AVES POEDEIRAS. Trata-se de método de microencapsulação de peptídeo sintetizado e composição encapsulada para o combate de diferentes microrganismos patógenos da flora intestinal de aves poedeiras; dito método de microencapsulação compreende procedimentos executados no peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile21)-Ha para obtenção de composição microencapsulada e atuação contra as bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus subtilis* (ATCC 19659) e contra as Gram-negativas como *Salmonella* sp., *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) em aves poedeiras.



“MÉTODO DE MICROENCAPSULAÇÃO DE PEPTÍDEO SINTETIZADO, COMPOSIÇÃO ENCAPSULADA E SEU USO EM AVES POEDEIRAS”.

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

[001] A presente patente de invenção trata de método de microencapsulação de peptídeo sintetizado, composição microencapsulada e seu uso em aves poedeiras para redução de mortalidade por *Salmonella* sp. e outros patógenos das aves de postura onde, notadamente, dito inovado método permite a obtenção de microcápsulas revestidas do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, sendo uma opção na substituição aos antibióticos convencionais como primeira linha frente ao combate de diferentes microrganismos patógenos da flora intestinal de aves poedeiras, além de não deixar resíduos por ser uma cadeia peptídica totalmente degradável e/ou absorvida a nível digestório (intestinal).

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[002] A *Salmonella* sp. é a bactéria causadora da salmonelose, uma zoonose de importância mundial que preocupa as autoridades sanitárias e torna-se uma barreira ao comércio internacional de alimentos e um problema de saúde pública em diversos países. Infecções por *Salmonella* sp. causam várias doenças agudas e crônicas em aves, sendo clinicamente classificadas de enfermidades típicas de aves como pulorose causada por *Salmonella pullorum* e tifo aviário causado por *Salmonella gallinarum*. Infecções paratíficas não são específicas de aves e podem originar intoxicações alimentares em humanos, sendo causadas por cerca de 2.500 sorovares. A maioria dos sorovares coloniza o intestino das aves sem causar patologias, enquanto as *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis* podem causar enfermidades em aves e intoxicações alimentares graves no ser humano (Cardoso et al., 2008). É importante salientar que a utilização frequente de antibióticos como promotores de crescimento vem sendo questionado em virtude de sua provável indução à resistência bacteriana, expondo o desafio sanitário aos animais e aos seres humanos, além da presença residual química em produtos de origem animal e riscos à segurança alimentar (Montagne et al., 2003).

[003] O uso de peptídeos antimicrobianos (AMPs - antimicrobial peptides) tem sido uma área de pesquisa interessante e atual porque estas moléculas não são consideradas medicamentos e geralmente não geram resistência bacteriana (Haffner et al., 2019). Estes AMPs possuem atividade biológica numa dosagem muito baixa e são muito eficazes para combater diversos microrganismos patogênicos, tais como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (Lorenzón et al., 2012), mesmo em bactérias multirresistentes (MDR) a antimicrobianos, como as pertencentes ao grupo de patógenos ESKAPE (acrônimo utilizado para se referir as bactérias dos grupos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*), obtendo-se resultados bem-sucedidos (de Breij et al., 2018).

[004] A microencapsulação é um método utilizado como fator protetor e estabilizador de compostos bioativos, facilitando o seu armazenamento e também prolongando a vida útil destas moléculas bioativas, sem influenciar adversamente suas propriedades físicas, químicas ou funcionais (Ye, Georges & Selomulya, 2018). O ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP) é amplamente utilizado como um revestimento, devido ao seu comportamento plástico e também à sua resistência gástrica (ambiente com pH ácido). Por outro lado, dissolve-se rapidamente a um pH superior a 5,5 (Wang, Wang e Huang, 2007) disponibilizando o conteúdo interno a nível de intestino, sendo considerado um excelente transportador e agente protetor microencapsulante no *drug-delivery*.

PESQUISA

[005] Entende-se que o peptídeo e sua ação antimicrobiana são conhecidos, no entanto o método de microencapsulação de peptídeo sintetizado, composição encapsulada e seu uso em aves poedeiras encapsulamento são novos e inventivos onde nesta invenção é desenvolvida a microencapsulação do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, a qual, de acordo com Vicente et al. (2013), demonstrou ser ativo em dosagens muito baixas (micromolares) contra as bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus subtilis* (ATCC 19659) e contra as Gram-negativas como *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

A formulação via microencapsulação do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha é seguida de um revestimento de HPMCP derivado de celulose, aplicando-se métodos combinados de tecnologia de alimentos (gelificação ionotrópica) e tecnologia farmacêutica (leito fluidizado), com a finalidade de se utilizar o peptídeo como aditivo nutricional para aves poedeiras para redução ou prevenção da taxa de mortalidade frente ao combate a *Salmonella* sp. e outros patógenos da flora intestinal das aves. Desta forma, foi aplicada e estudada a formulação final *in vitro* e *in vivo*, adicionando a molécula formulada na ração das aves nas suas primeiras quatro semanas de vida.

[006] As aves poedeiras, nos primeiros dias de vida, são muito susceptíveis a diferentes patógenos e a taxa de mortalidade é acrescentada potencialmente, representando um problema econômico para o produtor e de saúde pública para o consumidor. Neste estudo, os ensaios *in vitro* apresentaram alta eficiência do peptídeo contra o crescimento da *Salmonella* sp. e outras bactérias patógenas da flora intestinal. Na etapa seguinte, os estudos *in vivo* em aves, durante as primeiras quatro semanas de vida, apresentaram uma queda na mortalidade quando tratadas com a composição encapsulada, sem necessidade de utilizar drogas convencionais que poderiam levar a resistência bacteriana ou rastro de moléculas químicas sintéticas antibióticas.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[007] É objetivo da invenção apresentar método de microencapsulação de peptídeo sintetizado, composição microencapsulada e seu uso em aves poedeiras para redução de mortalidade por salmonelose e outros patógenos das aves de postura onde, notadamente, dito inovado método permite a obtenção de microcápsulas revestidas do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, sendo uma opção na substituição aos antibióticos convencionais como primeira linha frente ao combate de diferentes microrganismos patógenos da flora intestinal de aves poedeiras, além de não deixar resíduos por ser uma cadeia peptídica totalmente degradável e/ou absorvida a nível digestório (intestinal).

[008] É objetivo da invenção apresentar método de microencapsulação de peptídeo sintetizado, composição microencapsulada cujo peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha apresenta efeito

positivo e significativo em relação à redução da mortalidade das aves e na contagem de bactérias nas duas doses de peptídeo antimicrobiano testados.

[009] É objetivo da invenção apresentar método de microencapsulação de peptídeo sintetizado, composição microencapsulada que viabiliza um grande avanço nas áreas correlatas, devido à praticidade e fácil manejo dos componentes estudados, além de proporcionar uma solução natural e efetiva no combate a *Salmonella* sp. e outros microrganismos patógenos da flora intestinal, principalmente sem deixar resíduos químicos.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[010] A complementar a presente descrição de modo a obter uma melhor compreensão das características do presente invento e de acordo com uma preferencial realização prática do mesmo, acompanha a descrição, em anexo, um conjunto de figuras, onde, de maneira exemplificada, embora não limitativa, representou-se seu funcionamento:

[011] a figura 1 representa um gráfico do perfil do cromatograma do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha em sua forma bruta;

[012] a figura 2 mostra um gráfico do perfil do cromatograma do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha purificado;

[013] a figura 3 revela um gráfico do espectro de massas do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha purificado, confirmando a sua correta caracterização;

[014] a figura 4 ilustra um gráfico da análise do FTIR nas amostras microencapsuladas;

[015] a figura 5 representa um gráfico dos espectros FT-Raman do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha e monitoramento das fases de encapsulamento;

[016] a figura 6 revela micrografias do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha encapsulado;

[017] a figura 7 mostra difratogramas análise dos perfis de DRX do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha microencapsulado;

[018] a figura 8 ilustra um gráfico da análise termogravimétrica das micropartículas contendo o peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha;

[019] a figura 9 representa um gráfico da análise de caracterização das micropartículas por calorimetria diferencial de varredura (DSC);

[020] a figura 10 mostra gráficos da liberação controlada dos sistemas de simulação da liberação gástrica (A e B) e intestinal (C e D);

[021] a figura 11 mostra um gráfico representando a cinética da atividade hemolítica da formulação;

[022] a figura 12 revela um gráfico da taxa de mortalidade das pintainhas nos tratamentos;

[023] a figura 13 representa um gráfico da mortalidade em função do tempo das pintainhas nos tratamentos;

[024] a figura 14 mostra números mínimos de unidades amostrais por tratamento; e

[025] a figura 15 revela um gráfico da taxa média de UFC/mL em função do tempo de infecção (em dias); e

[026] a figura 16 mostra o gráfico de *boxplots* para ilustrar as pesagens obtidas dos animais.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[027] Com referência aos desenhos ilustrados, a presente patente de invenção se refere à “MÉTODO DE MICROENCAPSULAÇÃO DE PEPTÍDEO SINTETIZADO, COMPOSIÇÃO MICROENCAPSULADA E SEU USO EM AVES POEDEIRAS”, mais precisamente trata-se de método de microencapsulação de peptídeo sintetizado e composição encapsulada para o combate de diferentes microrganismos patógenos da flora intestinal de aves poedeiras.

[028] Segundo a presente invenção, dito método de microencapsulação compreende procedimentos executados no peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha para obtenção de composição microencapsulada para atuação contra as bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus subtilis* (ATCC 19659), e contra as Gram-negativas como *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e uso em aves poedeiras.

[029] As fases e procedimentos que compõe o método de microencapsulação compreendem as etapas:

- Etapa de síntese e purificação do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha

[030] A síntese é a peptídica em fase sólida (SPFS). O peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha (Gly-Trp-Leu-Asp-Val-Ala-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Ala-Ala-Phe-Asn-Val-Ala-Lys-Asn-Phe-Ile) é sintetizado manualmente, utilizando-se a resina a Rink Amide com um grau de substituição 0,6 mmol/g. A cadeia peptídica é sintetizada aminoácido por aminoácido com 3 vezes de excesso em relação à escala de utilizada de resina - 0,4 mmol, utilizando 185,9 µL de diisopropilcarbodiimida (DIC) e 172,92 mg de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) em N,N-dimetilformamida (DMF)/diclorometano (DCM), na proporção 1:1 (v:v), por duas horas, sendo a reação iniciada pela C-terminal do aminoácido e avaliada a cada acoplamento pelo Teste de Kaiser, onde se detecta grupamentos amino livres, comprovando se o acoplamento foi completo. A desproteção, ou retirada do grupamento Fmoc dos α-aminoácidos, foi realizada com uma solução a 20% da base 4-metilpiperidina em DMF, por 20 min. Para o teste de Kaiser, preparou-se alguns poucos grãos de resina, misturando duas gotas das soluções 1 (contendo 5% de ninidrina em etanol), solução 2 (80 g de fenol em 20 mL de etanol) e solução 3 (2 mL de cianeto de potássio 0,001 mol L⁻¹ em 98 mL de piridina) a 120°C por 4 min.

[031] Para a clivagem, método de quebra da ligação do peptídeo com a resina, é adicionado um coquetel de clivagem contendo 95% de ácido trifluoroacético (TFA), 2,5% de triisopropilsilano (TIS) e 2,5% de água ultrapura e homogeneizou-se a mistura em agitação por 2 h, a temperatura ambiente. Posteriormente, adiciona-se éter etílico gelado e a mistura foi então centrifugada por 5 min. Após isto, reserva-se o sobrenadante etéreo contendo os subprodutos hidrofóbicos produzidos pela reação e secou-se a resina com o peptídeo para evaporar todo éter restante do material. Com as amostras secas, adiciona-se uma solução contendo o solvente A (0,045% de TFA em água ultrapura) e solvente B (0,036% de TFA em acetonitrila) numa proporção 1:1 (v:v) e centrifuga-se por 5 min, processo repetido por três vezes, a temperatura ambiente, para separar as duas fases remanescentes: a resina (fase sólida) e o peptídeo (fase líquida). Por fim, o sobrenadante contendo o peptídeo bruto é acondicionado e liofilizado num liofilizador por 48 h para a secagem total das amostras. O produto obtido

é um pó branco e floculoso, que representa a obtenção final do peptídeo bruto de interesse.

[032] A avaliação da pureza do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha é realizada com um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), acoplado a um detector de luz ultravioleta UV, configurado para leitura em comprimento de onda a 220 nm, usando uma coluna analítica em fase reversa de 18C modelo Shimpack, marca Shimadzu, dimensões 4,6 x 25 mm, tamanho de partícula 5 µm, tendo como fase móvel as soluções A e B, descritas anteriormente, para o processo de clivagem. Utiliza-se como programa de análise para purificação preparativa um gradiente de concentração de 30 a 60% de solvente B em 90 minutos, com fluxo a 5 mL min⁻¹, numa coluna preparativa Shimadzu Shim-Pack, modelo PREP-ODS, 20 mm x 25cm - diâmetro de partícula 15 µm. O programa de análise das purezas das frações coletadas em modo semipreparativo é de 5 a 95% de solvente B, com fluxo de 1 mL min⁻¹ por 30 min. O peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha também é avaliado em 280 nm no HPLC/UV devido à presença na sua sequência primária do aminoácido triptofano, que absorve neste comprimento de onda e facilita a sua identificação e quantificação. A análise final permite a obtenção do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha com uma pureza maior que 95%, com massa em quantidade suficiente para as etapas de caracterização (Figura 1 e 2).

- Etapa de caracterização

[033] A espectrometria de massas é realizada para a identificação do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, utilizando a mesma metodologia de análise aplicado no HPLC convencional, com fluxo de 1 mL min⁻¹. No HPLC, o tempo de retenção observado de 18,82 min pela área do pico e confirmado pelo LC-MS em 23 min, devido à mudança de condições do sistema acoplado à Espectrometria de Massas (UHPLC e coluna com tamanho menor). No espectro, os picos de valores de razão massa/carga 573 (Z = +4), 763,6 (Z = +3) e 1.144,9 (Z = +2) correspondem aos picos da razão massa/carga de uma molécula com um peso molecular de 2.289,72 g mol⁻¹, o qual é exatamente o peso molecular teórico do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, confirmando a sua correta obtenção e caracterização (Figura 3).

Etapa de Microencapsulação do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha

[034] O método utilizado para a microencapsulação consiste na gelificação ionotrópica. Como material gelificante, são preparadas duas soluções para o pré-encapsulamento:

- solução (H1), contendo 20 g de alginato com 16 mg do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, em 500 mL, obtendo-se uma concentração final de 0,032 g L⁻¹;
- solução (H2), contendo 20 g de alginato com 32 mg do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha em 500 mL, obtendo-se uma concentração final de 0,064 g L⁻¹.

[035] Ditas soluções (H1) e (H2) são homogeneizadas e dispersadas a 25.000 rpm. Como solução reticulante de 500 mL de cloreto de alumínio (AlCl₃) 5%, o processo de microencapsulação é executado por gotejamento por uma bomba de seringa a uma velocidade de 1,2 µL h⁻¹, a temperatura ambiente. As microcápsulas são secas em estufa com ar de circulação a 20°C por 72 h.

Revestimento das microcápsulas

[036] A solução de revestimento é preparada com 10% (p:p) de HPMCP (doadamente pela empresa Shin-Etsu Pharma & Food Materials®), diluída em 25% (p:p) de hidróxido de amônio, 2,5% (p:v) de trietilcitrato e 62,5% (p:v) de água. As amostras foram colocadas num leito fluidizado a 50°C, contendo um soprador a 0,2 L min⁻¹, bomba peristáltica a 0,4 mL min⁻¹ e sistema de vibração com 70% com 40 mL da solução de revestimento. As microcápsulas são colocadas no leito fluidizado com os parâmetros descritos, até o esgotamento dos 20 mL da solução de revestimento.

[037] São obtidas capsulas de 0,5 mm de tamanho médio inicial antes de serem secas e 0,2 mm após a secagem. O processo de microencapsulação foi realizado com sucesso e com alta eficiência, como pode se observar na Tabela 1. Este será considerado o produto final ou (ERCtx). Os dados são analisados e processados pela seguinte equação de concentração:

$$Cf = ERCtx / ERCtx_{mf}$$

[038] onde (ERCtx) é a quantidade total de peptídeo em cada microcápsula revestida (mg de Ctx(Ile²¹)-Ha - este dado pode ser obtido pela eficiência do procedimento) e “ERCtx_{mf}” é a massa final do peptídeo (mg de ERCtx) após o microencapsulamento e

revestimento. Finalmente, a análise da quantidade de peptídeo por microcápsula é multiplicada pela massa média de cada ERCtx.

[039] Tabela 1. Resumo das análises físicas após do produto desenvolvido.

Microcápsula revestida	Concentração (μg peptídeo/microcápsula revestida)	Tamanho (mm)	Eficiência (%)	Solubilidade (%)
H1	$13,58 \pm 0,10$	0.11 ± 0.0007	84.70 ± 0.03	$1.42 \pm 0,0012$
H2	$20,37 \pm 0,04$	0.11 ± 0.0005	87.50 ± 0.06	$1.63 \pm 0,0017$

TESTES

Avaliação de parâmetros físico-químicos

[040] As microcápsulas de peptídeos revestidas foram analisadas nos parâmetros físico-químicos, quais sejam:

- Eficiência de encapsulamento

[041] A eficiência do encapsulamento foi avaliada por espectrofotômetro na luz UV para comprovar a capacidade de encapsulamento dos polímeros utilizados frente ao peptídeo, utilizando como parâmetro equivalente ao aminoácido triptofano com absorvidade molar de $5690 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. As absorbâncias foram lidas a 280 nm e a concentração foi calculada pela Lei de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon \times \ell \times c$$

[042] onde 'A' é absorbância, ' ϵ ' é absorvidade molar ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), ' ℓ ' é comprimento do caminho da amostra (cm), e ' c ' a concentração da amostra (mol L^{-1}). A eficiência do encapsulamento (EE) foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{EE (\%)} = (\text{TPC} - \text{SPC}) / \text{TPC} \times 100$$

[043] onde "TPC" é a concentração de peptídeo final e "SPC" é a concentração do peptídeo inicial. Os resultados da eficiência foram mostrados na Tabela 1, obtendo-se valores acima do 80%, evidenciando com estes dados o poder de incorporação da matriz encapsulante com o peptídeo estudado, mostrando-se adequada para um efetivo encapsulamento.

Solubilidade

[044] Baseado na metodologia proposta por Cano-Chauca et al. (2005), modificada para este trabalho, este ensaio de solubilidade foi realizado para avaliar a porcentagem de solubilidade dos ERCtx em água. Pesaram-se 0,2 g de ERCtx de cada concentração, misturados a 30 mL de água em agitação magnética por 2 min. Após isso, foram centrifugadas a 6.500 rpm por 5 min, depois coletou-se uma alíquota de 25 mL que foram levadas para uma estufa a 107°C. Os cálculos foram feitos pela diferença de peso. HPMCP é um derivado de celulose, o que faz com que a solubilidade das ERCtx diminua potencialmente, o que garante não desestabilizar a molécula na digestão. A celulose presente no HPMCP permite também liberar os peptídeos num pH mais básico, como o intestinal.

Análise pela Transformada de Fourier no Infravermelho (FTIR)

[045] A análise pela Transformada de Fourier no Infravermelho foi realizada para identificar os grupos funcionais e avaliar a estabilidade do peptídeo após o microencapsulamento. Foi utilizado o espectrômetro Perkin-Elmer. As amostras foram moídas e misturadas com KBr na faixa de 4.000 - 400 cm^{-1} . Os espectros da refletância total atenuada (ATR) foram obtidas num Bruker Vertex 70 FTIR com o detector DLaTGS. As bandas dos polímeros em questão também foram consideradas, sendo comparadas com alginato de sódio e HPMCP, também o peptídeo sintetizado Ctx(Ile²¹)-Ha puro foi usado como padrão para as avaliações; os picos característicos dos aminoácidos aromáticos como o triptofano e da fenilalanina da sequência são observados (de acordo com a Figura 4), em 1.136, 1.180, 1.202 cm^{-1} (Ciobanu et al., 2016; Ayodhya et al., 2015) e os picos de ~1.650 cm^{-1} (alongamento C=O) e ~1.540 cm^{-1} (vibrações por flexão N-H e alongamento C-N do eixo principal do peptídeo) indicando a presença das bandas de amida I e amida II, respectivamente, as quais são característica de todos os aminoácidos presentes. Além disso, nota-se a banda em 1.620 cm^{-1} , que estaria relacionada à natureza hidrofóbica do peptídeo (Miller et al., 2013). Em todas as amostras são mostradas as bandas 1.304 cm^{-1} (vibração de alongamento, P=O). A banda a ~1.457 cm^{-1} pode estar relacionada a -CH₃, -CH₂, anéis aromáticos e/ou β-folha da estrutura secundária, que estaria relacionada aos aminoácidos aromáticos, onde as vibrações seriam a vibração de flexão (δ) de C-H e a vibração de alongamento de aromático

(Oliveira et al., 2016; Miller et al., 2013).

Análise pela Transformada de Fourier no Raman (FTRaman)

[046] A espectrometria pela Transformada de Fourier no Raman foi feita para complementar as análises do FTIR e avaliar se a presença da água poderia ter influenciado nos resultados. Este ensaio foi realizado com um espectrômetro Burker Ram II, laser de 1.064 nm com potência máxima de 200 mW e detector de Ge na faixa de 4.000-400 cm^{-1} .

[047] O espectro FT-Raman confirmou a presença do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha (Figura 5) pela presença das bandas dos aminoácidos aromáticos que o compõem, como o triptofano, apresentado suas próprias bandas em 760 cm^{-1} (fraco), 885 cm^{-1} (fraco), 1.616 cm^{-1} (mediana), além da fenilalanina em 622 cm^{-1} (fraca), 1.333 cm^{-1} (forte), 1.585 cm^{-1} (fraca), 1.605 cm^{-1} (média) e, finalmente, uma banda a 1.004 cm^{-1} (forte) de ambos os aminoácidos. Outros resultados confirmam o exposto acima, como demonstrados em *Shao et al.* (2005).

[048] As características do peptídeo também foram localizadas, como a estrutura secundária: i) Amida I: alongamento C=O, C=C e a estrutura secundária α -hélice detectado em 1.661,5 cm^{-1} (muito forte); ii) Amida III: deformação (CH_2), 1.299,5 cm^{-1} (ombro); fita- β em 1.232 cm^{-1} (fraca) e fita- β e desordenada em 1.264 cm^{-1} (fraca). Também em 1.447 cm^{-1} (muito forte) um modo de flexão de CH_2 , CH_3 foi encontrado (*Balgon et al.*, 2018). Desta maneira, a técnica de FT-Raman ajudou a verificar se havia alguma interferência com a água nas análises do FTIR, pois a água não interfere no espalhamento do FT-Raman.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

[049] A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliação morfológica das microcápsulas, as quais foram imobilizadas em fita adesiva de dupla face e montadas sobre o suporte para análise de microscópio com diâmetro e altura de 1 cm. As amostras foram cobertas com carbono em uma câmara de vácuo para depois serem visualizadas com o equipamento operando a 2,0 kV, a corrente de emissão de 10 μA , sonda de corrente de 9, distância de trabalho de 6,5 mm, modo de imagem eletrônica secundária e ampliação de 30.000x (1 pixel = 0,935 nm).

[050] Na avaliação morfológica, foi possível visualizar a estrutura da microcápsula, confirmar a formação e o tamanho do revestimento (Figura 6). Foram escolhidas aleatoriamente seis microcápsulas de (ERCtx H1) e (ERCtx H2), dos quais três foram para a visualização longitudinal e outras três para o corte transversal. O revestimento apresentou tamanhos de $35,8 \pm 8,2 \mu\text{m}$ e $46,7 \pm 12,2 \mu\text{m}$, respectivamente.

Difração de Raios X (DRX)

[051] A cristalinidade do pó microencapsulado foi estudada para avaliação da estabilidade do sistema encapsulado (ERCtx). As medidas foram realizadas a 35 kV e 20 mA de radiação Cu-Ka em um difratômetro de raios X (XRD-6000 Shimadzu, Alemanha). Os dados foram registrados em uma faixa angular de 2° a 50° (2θ) com uma taxa de varredura de 2° min^{-1} .

[052] Segundo as difratogramas (Figura 7), o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha apresenta as intensidades em 2θ com características bem definidas de proteínas e de peptídeos, como os localizados a 10° , que representa a estrutura secundária de α -hélice e a 20° , representando a estrutura da fita- β , evidenciando que o peptídeo possui, portanto, uma estrutura cristalina (Zhao et al., 2015). O uso de polímeros como protetores bioativos são comumente usados na indústria farmacêutica, pois ajuda a reduzir a cristalinidade dos medicamentos e, por sua vez, permite aumentar sua estabilidade (Al-Obaidi & Buckton, 2009), que também pode ser observada em micrografias SEM e confirmado pelos dados do FT-IR e FT-Raman. Os (ERCtx) mostraram picos característicos de alginato e celulose (conformação do HPMCP), além disso, a diminuição da intensidade da região cristalina do peptídeo confirma que este produto seria classificado como um material semicristalino e, portanto, com alta estabilidade.

Análises térmicas

[053] A análise termogravimétrica (TGA) associada à análise termogravimétrica derivada (DTG) e a análise por calorimetria diferencial de varredura (DSC) também foram realizadas com as micropartículas baseados no protocolo de Tan et al. (2020), peptídeo puro e controle negativo. Aproximadamente 10 a 12 mg de cada tipo de amostra foram acondicionados em um cadinho de alumina e mantidos em atmosfera de ar sintético, com vazão de 100 mL min^{-1} na faixa de temperatura de 30 a 600°C , a uma

taxa de aquecimento de 5°C min⁻¹. Os resultados foram obtidos e processados com equipamento DSC-TGA (SDT Q600 V20.9 Build 20, TA Instruments) com o software Universal Analysis 2000.

[054] A análise termogravimétrica (Figura 8) auxiliou a analisar a perda de material e foi expressa como uma porcentagem da temperatura. A perda de massa pelo aumento de temperatura é um problema de muitos peptídeos e proteínas estudados e é provocada pela desnaturação que sofre na estrutura e que geralmente é um processo irreversível. Exatamente o contrário acontece se a transição vítrea (T_g) for encontrada, cujo processo de desnaturação é reversível (Ricci et al., 2018). No entanto, o peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha não apresenta perda de massa abaixo dos 100°C. Além disso, as amostras (ERCtx) apresentam comportamento similar, pois não há perda de massa no eixo alimentar, porém apresentaram T_g nesse eixo, o que é um efeito natural dos polímeros utilizados como referência (alginato e HPMCP). No entanto, esses valores são observados apenas quando não se excede altas temperaturas, como 80°C. Em valores superiores de temperatura, é possível visualizar uma queda mínima de massa. Este efeito é dado pela capacidade de retenção de energia dos polímeros que são utilizados na microencapsulação que desestabiliza notavelmente o peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha e alguns polímeros. Nas amostras, o efeito endotérmico aparece devido à perda total de água. Por outro lado, esse fato em cristais de proteínas e peptídeos leva à destruição do grupo hidroxila (Tang, Chen, Li & Yang, 2006). Portanto, é possível inferir que os (ERCtx) são semitolerantes a altas temperaturas, porém termoestável em temperaturas que são cruciais na indústria alimentar.

[055] Nas análises de DSC, foi utilizada como base também um microcápsula sem peptídeo (branco) e, com isso, foi possível observar que os picos por ela emitidos são das microcápsulas que continha o peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha, indicadas pelas curvas H1 (verde) e H2 (marrom), como se pode evidenciar na Figura 9.

Avaliação da atividade biológica

[056] A atividade biológica do (ERCtx) foi analisada pelos seguintes testes:

Análise *in vitro*

[057] Liberação controlada

[058] As análises de liberação controlada foram realizadas em duas etapas baseado no protocolo de Morgan (Natalie et al., 2020), com algumas modificações:

[059] Simulação da liberação gástrica (SG): este procedimento mimetiza ao proventrículo e moela (considerados estômagos químicos e mecânicos, respectivamente, das aves), foram colocadas $50,8 \pm 3,54$ mg de ERCtx numa solução SG que foi preparada com 10 mL de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,5 ajustado com HCl 1 mol L^{-1} , a 42°C por 20 min. Foram coletados 1 mL de SG após 1, 2, 5, 10, 15 e 20 min, mensurados e calculados pelo espectro UV a 280 nm pela lei de Lambert-Beer.

[060] Simulação da liberação intestinal (SI): este procedimento mimetiza o duodeno e o jejuno (primeira e segunda porções do intestino delgado das aves) e foram colocadas $46,75 \pm 4,92$ mg de ERCtx numa solução SI que foi preparada com 10 mL de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6 ajustado com NaOH 1 mol L^{-1} , a 42°C por 60 min.

[061] A liberação demonstrou que entre 30 a 40% do peptídeo é liberado no estômago, devido a possíveis falhas no revestimento da encapsulação, onde algumas micropartículas não foram completamente revestidas, fazendo com que algumas moléculas peptídicas escapassem para o meio externo. No entanto, observou-se que há uma liberação controlada no intestino com valores de entre 65 e 70%, o que é primordial no experimento para que a atividade antimicrobiana tenha sucesso na eliminação de bactérias patogênicas da flora intestinal sem a degradação prévia do peptídeo na porção gástrica (Figura 10).

Atividade antimicrobiana do peptídeo

[062] Teste de sensibilidade: Foi realizado o teste de sensibilidade por halo de inibição e, para isso, foram cultivadas as bactérias *Escherichia coli* (E. coli), *Salmonella enteritidis* (SE) e *Salmonella typhimurium* (ST) no meio de cultura caldo Infuso Cérebro-coração (BHI) por 18 h a 37°C e diluídas até a concentração de 7×10^5 UFC/mL, as quais foram padronizadas através do uso do espectrofotômetro com comprimento de onda de 590 nm. Para o doseamento do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, foi preparada uma solução estoque de peptídeo, pesando-se 1 mg de peptídeo em 1 mL em água Milli-Q. Utilizou-se um espectrofotômetro UV-visível (Marte-Spectro 560UV, Brasil) para a quantificação do peptídeo pela Lei de Lambert-Beer, num comprimento de onda a 280

nm. Obteve-se uma solução estoque de $308 \mu\text{mol L}^{-1}$ e, a partir desta, o peptídeo foi diluído em 10 diferentes concentrações por diluição seriada, compondo as seguintes concentrações finais: 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 e $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e que estão expressos nas Tabelas 2 a 4. Logo após as diluições, as placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (MH) foram impregnadas com as bactérias alvo e o peptídeo foi adicionado em um disco de difusão de 8 mm. O volume utilizado para embeber totalmente o disco foram de $30 \mu\text{L}$ em cada um. Os testes foram realizados em triplicata, onde em cada placa foram dispostos cinco discos, com concentrações no entorno da placa e no centro foi utilizado um antibiótico comercial (gentamicina) como controle positivo para comparação dos resultados, observados com 12 h de incubação.

[063] Tabela 2. Resultados obtidos para o halo de inibição em milímetros (mm) contra a bactéria *E. coli* durante 12 h de incubação a 37°C .

<i>Escherichia coli</i>	Halo de inibição (mm) da concentração do peptídeo Ctx(Ile ²¹)-Ha				
	$256 \mu\text{mol L}^{-1}$	$128 \mu\text{mol L}^{-1}$	$64 \mu\text{mol L}^{-1}$	$32 \mu\text{mol L}^{-1}$	$16 \mu\text{mol L}^{-1}$
R1	12	11	10	10	*
R2	12	11	11	10	*
R3	12	10	10	10	*
Média	12	10,6	10.3	10	*

[064] Tabela 3. Resultados obtidos para o halo de inibição em milímetros (mm) contra a bactéria SE durante 12 h de incubação a 37°C .

<i>Salmonella enteritidis</i>	Halo de inibição (mm) da concentração do peptídeo Ctx(Ile ²¹)-Ha				
	$256 \mu\text{mol L}^{-1}$	$128 \mu\text{mol L}^{-1}$	$64 \mu\text{mol L}^{-1}$	$32 \mu\text{mol L}^{-1}$	$16 \mu\text{mol L}^{-1}$
R1	12	12	12	11	10
R2	12	11	11	11	10
R3	12	12	11	11	10
Média	12	11,7	11.3	11	10

[065] Tabela 4. Resultados obtidos para o halo de inibição em milímetros (mm) contra a bactéria ST durante 12 h de incubação a 37°C .

<i>Salmonella typhimurium</i>	Halo de inibição (mm) da concentração do peptídeo Ctx(Ile ²¹)-Ha				
	256 $\mu\text{mol L}^{-1}$	128 $\mu\text{mol L}^{-1}$	64 $\mu\text{mol L}^{-1}$	32 $\mu\text{mol L}^{-1}$	16 $\mu\text{mol L}^{-1}$
R1	13	13	13	*	*
R2	12	12	*	*	*
R3	13	13	13	*	*
Média	12,7	12,7	8,7	*	*

[066] Pela interpretação das Tabelas 2, 3 e 4, pode-se observar que o peptídeo antimicrobiano foi ativo contra as bactérias testadas, apresentando uma concentração inibitória mínima (CIM) de 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a *Escherichia coli* e halo médio de 10 mm; para *Salmonella enteritidis*, o CIM apresentado foi de 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com halo médio 10 mm e, finalmente, para *Salmonella typhimurium* o CIM encontrado foi de 64 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com halo médio de 8,7 mm. A título de comparação, o antibiótico comercial gentamicina apresentou o halo médio de inibição de 24,7 mm nas bactérias patogênicas estudadas. Assim, diante dos resultados obtidos, em comparação com o antibiótico comercial, o peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha mostrou-se ativo diante as cepas bacterianas estudadas, apresentando 40,7% do tamanho do halo em comparação com o antibiótico comercial para *E. coli*, 40,7% para SE e 35,2% para ST, ou seja, apresentou em média 40% da atividade bactericida da gentamicina para este tipo de teste antimicrobiano. De maneira geral, pode-se inferir que o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha apresentou atividade antimicrobiana contra as cepas de patógenos testados.

[067] Teste de ELISA: os testes de atividade biológica utilizando-se de uma microplaca ELISA de 96 poços foram realizados devido a maior sensibilidade e precisão desta técnica espectrofotométrica. Essa placa foi preparada com as bactérias sob fluxo de ar para evitar contaminação da mesma. Em cada micropoço, foram colocados 50 μL da solução do caldo BHI com a concentração da bactéria e 50 μL do peptídeo antimicrobiano nas mesmas concentrações do apartado anterior. Para maior confiabilidade do teste, foram feitos controles negativos contendo 50 μL de água estéril e 50 μL de gentamicina; já nos controles positivos, foi utilizado 50 μL da solução do caldo BHI com a concentração da bactéria e 50 μL do caldo BHI estéril. Todos estes testes foram feitos em triplicata.

Logo após o preparo, a placa foi levada para estufa e incubada a 37°C durante 21 h. Após esse período de incubação, a placa foi levada até o equipamento de ELISA, para realizar as leituras das densidades óticas das amostras. A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 405 e 650 nm. Os resultados para o teste de ELISA estão apresentados na Tabela 5.

[068] Observa-se que as cepas estudadas também apresentaram sensibilidade ao peptídeo antimicrobiano testado, confirmando que o peptídeo testado apresentou atividade biológica contra as bactérias patogênicas *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* e *E. coli*. Nesta técnica, uma inibição menor que 80% das bactérias analisadas não é levada em consideração para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Desta forma, pode-se concluir que a atividade biológica média para a *Salmonella enteritidis* foi de 80% no comprimento de onda de 405 nm e de 50% em 650 nm e, portanto, considera-se a sua concentração inibitória mínima igual a 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

[069] Tabela 5. Resultados obtidos no através do Teste de ELISA contra as bactérias alvo.

<i>Bactéria</i>	λ (nm)	Atividade Antimicrobiana (%)								
		128 $\mu\text{mol L}^{-1}$	64 $\mu\text{mol L}^{-1}$	32 $\mu\text{mol L}^{-1}$	16 $\mu\text{mol L}^{-1}$	8 $\mu\text{mol L}^{-1}$	4 $\mu\text{mol L}^{-1}$	2 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1 $\mu\text{mol L}^{-1}$	C+**
<i>Escherichia coli</i>	405	82	86	88	88	89	25	*	*	90
	650	84	90	92	92	92	26	*	*	95
<i>Salmonella enteritidis</i>	405	78	85	81	89	90	48	*	*	92
	650	82	89	89	93	93	80	5	*	91
<i>Salmonella typhimurium</i>	405	78	77	83	84	2	*	*	*	74
	650	80	86	89	88	15	2	*	*	94,7

[070] Para *Salmonella typhimurium*, a porcentagem de inibição de crescimento foi de 84% no comprimento de onda de 405 nm e de 89% em 650 nm, considerando-se, neste caso, a última concentração que apresentou uma inibição eficiente, que foi de 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

[071] Finalmente, para *Escherichia coli*, a porcentagem de inibição de crescimento foi de 89% no comprimento de onda de 405 nm e de 92% em 650 nm, considerando-se a sua concentração inibitória mínima de 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Este último resultado é corroborado pelo estudo de Vicente et al. (2013), que apresentou nos ensaios antimicrobianos o mesmo CIM para este peptídeo em cepas de *E. coli* padrão (ATCC 25922), o que confere maior confiabilidade aos resultados deste trabalho.

Atividade hemolítica

[072] A atividade hemolítica dos peptídeos puros e encapsulados foi determinada simulando o tempo de digestão das aves poedeiras, a partir da análise da liberação da hemoglobina dos eritrócitos. Para a realização deste ensaio, foram utilizados eritrócitos humanos separados do plasma por centrifugação (10 min a 1.600 x g) e lavadas três vezes em solução tampão PBS a um pH de 7,4. Posteriormente, uma suspensão celular a 2% (v:v) de eritrócitos em tampão PBS foi incubada com cada uma das formulações de micropartículas a $4,29 \pm 0,27 \text{ mg mL}^{-1}$ e foram incubadas em triplicata no mesmo tampão. As amostras foram incubadas a 37°C, sob agitação (100 rpm). Após 1, 4, 8 e 24 h de incubação, as amostras foram centrifugadas (10 min a 2,300 x g). A atividade hemolítica foi analisada a partir dos valores de absorbância do sobrenadante a 570 nm. Como referência de 100% de lise, foi utilizada uma alíquota de 1% (v/v) de Triton X-100. Os resultados foram expressos em porcentagem de hemólise de acordo com a equação:

$$\text{Hemólise (\%)} = ((\text{Abs}_a - \text{Abs}_b)) / ((\text{Abs}_t - \text{Abs}_b)) \times 100$$

[073] onde Abs_a é a absorbância da amostra, Abs_b é a média da absorbância em tampão e Abs_t corresponde a lise total da amostra.

[074] Segundo os estudos de Vicente et al. (2013), a atividade hemolítica (HC_{50}) do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha é de 7,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. De acordo com os resultados obtidos deste estudo, este nível de hemólise testada individualmente para o peptídeo encontrada na literatura foi controlada e reduzida numa taxa maior que 95%, quando o peptídeo se encontra em sua forma microencapsulada (ERCtx). Assim, esta análise demonstra que, no período simulado da digestão das aves (o período digestivo em aves é inferior a duas h) (Morgan et al., 2020), nota-se que os testes de hemólise inferiores a 10% significam que o produto não tem atividade hemolítica. Assim, é possível inferir que

os (ERCtx) não apresentam hemólise considerável, o que novamente comprova o adequado microencapsulamento da molécula. A cinética da atividade hemolítica está apresentada na Figura 11.

Análise *in vivo*

[075] O experimento foi realizado com 135 aves poedeiras, adquiridas de um incubatório comercial e foram inspecionadas para presença/ausência de *Salmonella* sp., no momento do recebimento, por suabe cloacal, uma a uma.

[076] Para o desenvolvimento do experimento *in vivo* foram utilizados três tratamentos, sendo alojadas 45 pintainhas para cada um. As aves identificadas com esparadrapo enumerado envolvendo a perna direita. As aves receberam água e ração à vontade e as doses do peptídeo antimicrobiano foram adicionadas à ração e administradas às pintainhas desde o primeiro dia de vida.

[077] O tratamento controle (CTRL) foi definido como aquele que recebeu apenas a ração comercial inicial para pintainhas de postura sem nenhum aditivo; já o tratamento PEP1 recebeu a (ERCtx H1) e o tratamento PEP2 recebeu a (ERCtx H2), ambas micropartículas adicionadas a ração comercial do tratamento controle (isoproteica e isoenergética para pintainhas de postura nos primeiros 28 dias de vida). Vale ressaltar que as pintainhas receberam as micropartículas contendo o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha na sua forma ERCtx (ração com PEP1 e PEP2) desde o primeiro dia do experimento. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências e Engenharia, UNESP, sob o protocolo nº 06/2018 – CEUA, e realizado no Instituto Biológico/APTA/Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos.

[078] No segundo dia de vida, todas as pintainhas receberam o inóculo de *Salmonella enteritidis* (SE NaIRSpCR), a qual foi escolhida por ser a bactéria mais patogênica para aves poedeiras (Price et al., 2020). A infecção das pintainhas foi realizada numa concentração de 10⁹ UFC/ml, processo chamado “desafio”, sendo ministrado exatamente 1 mL por animal, para todos os animais do experimento. Após a inoculação ser ministrada às pintainhas, foram realizadas avaliações de mortalidade, presença de

unidades formadoras de colônia (UFC) na excreção fecal, peso vivo dos animais e conteúdo cecal durante os 28 dias de experimento.

[079] Logo após o inóculo ser ministrado às pintainhas, foram realizadas avaliações mortalidade pós-inoculação (unidade), conteúdo cecal (UFC/mL), infecção nas excretas (suabe; presença ou ausência) e pesagem das pintainhas (gramas). A mortalidade do segundo ao quarto dia pós-inoculação (4, 5 e 6 dias de vida das pintainhas, respectivamente) foi registrada em cada um dos tratamentos.

[080] O conteúdo cecal foi registrado por meio da análise da estimativa da SE NaIRSpCR do macerado do ceco, após o abate de cinco aves pré-definidas de cada tratamento nos dias 2, 5, 7, 14, 21 e 28 de vida, perfazendo o total de 30 aves por tratamento abatidas durante o experimento. As amostras foram colhidas assepticamente, com auxílio de pinças e tesouras estéreis e individuais para cada ave.

[081] As amostras de conteúdo cecal serão colocadas em tubos previamente pesados. O tubo com a amostra foi novamente pesado e o conteúdo cecal foi diluído em solução salina (PBS pH 7,4) na proporção de 1:10 (m:v) e homogeneizado com auxílio de um vortex. As amostras foram diluídas decimalmente em PBS pH 7,4 até a diluição de 10^{-5} , sendo que a primeira diluição é o conteúdo cecal em PBS. De cada diluição foi retirado 0,1 mL e adicionado em ágar VB NaI/Spec. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. A leitura foi realizada após 24 h de incubação a 37°C, tendo-se como resultado o número de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama. Estes valores foram transformados em log₁₀ para análise e interpretação dos resultados. Na ausência de crescimento de SE NaIRSpCR, aos tubos contendo a amostra em PBS, foi acrescentado caldo SN preparado em concentração dupla, acrescentando-se volume igual ao volume de PBS anteriormente adicionado. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 h, estático. A seguir, o conteúdo foi semeado em ágar VB NaI/SpC e incubado a 37°C por 24 h.

[082] A presença ou ausência de infecção nas excretas foi realizada por meio do suabe colocado na cloaca de 15 aves selecionadas e inspecionada duas vezes por semana quanto a excreção fecal de SE NaIRSpCR, por meio de suabes de cloaca (Berchieri et al., 2001). Os suabes foram imersos em 3 mL de caldo SN, homogeneizados em vortex e plaqueados diretamente em caldo VB NaI/Spec. Os tubos e as placas foram incubados a

37°C por 24 h. Na ausência de crescimento nas placas, a amostra correspondente foi novamente semeada em placas contendo ágar VB Nal/Spec, as quais foram incubadas a 37°C por 24 h.

[083] Por fim, a pesagem foi feita nas mesmas 15 aves avaliadas anteriormente em cinco dias não consecutivos, sendo pesadas em balança comercial, em gramas. Esta parcela de 15 aves de cada grupo será identificada e mantida durante todo o experimento.

Mortalidade pós-inoculação

[084] Os resultados de mortalidade foram submetidos ao teste Qui-quadrado, evidenciando de forma contundente a influência significativa dos tratamentos nas percentagens de mortalidade registradas ($P < 0,03$). Desta forma, a incidência de mortalidade difere entre os tratamentos significativamente. A Tabela 6 permite que sejam calculadas as estimativas dos riscos de morte de pintainhas em função do tratamento, que são, na verdade, probabilidades condicionais.

[085] Existem três riscos a serem estimados a partir da Tabela 6:

[086] - Risco de morte para uma pintainha sob o tratamento controle (CTRL), que corresponde a estimativa da probabilidade de morte da pintainhas dado a não ingestão das micropartículas com peptídeo antimicrobiano. Isto é, $P(M \mid \text{CTRL}) = 13/45 = 28,89\%$;

[087] - Risco de morte para uma pintainha sob o tratamento PEP1, que é a estimativa da probabilidade de morte da pintainhas dado a ingestão de 0,032 g/L de peptídeo. Ou seja, $P(M \mid \text{PEP1}) = 4/45 = 8,89\%$;

[088] - Risco de morte para uma pintainha sob o tratamento PEP1, que corresponde a estimativa da probabilidade de morte da pintainhas dado a ingestão de 0,064 g/L de peptídeo. Ou ainda, $P(M \mid \text{PEP2}) = 6/45 = 13,33\%$.

[089] Os resultados de mortalidade puderam ser melhor explorados com a distribuição percentual condicionada por tratamento, onde a proporção dos resultados apresentados em função do correspondente tratamento em que as aves se submeteram (Figura 12).

[090] Tabela 6. Distribuição da mortalidade das pintainhas por tratamento após 4 dias de infecção.

Tratamento	Mortalidade		
	Ausência	Presença	Total
CTRL	32	13	45
PEP1	41	4	45
PEP2	39	6	45
Total	112	23	135

[091] Devido à estatística ilustrada nesta figura, os riscos de morte podem ser comparados dois a dois, por meio do Risco Relativo (RR), estatística que quantifica a relação do aumento de mortalidade por meio da razão entre riscos, sendo no numerador o maior risco e no denominador o menor.

[092] Nesse estudo, os tratamentos PEP1 e PEP2 tem a função de proteger as pintainhas dos efeitos nocivos diretos e indiretos da inoculação de *Salmonella enteritidis*, por esse motivo o grupo controle, corresponde àquele de exposição e consequentemente de maior risco. Assim, poderiam ser produzidas três estimativas de Risco Relativo (RR), porém apenas duas foram de real interesse para análise.

A primeira foi o Risco Relativo da mortalidade entre animais dos tratamentos CTRL e PEP1 ($RR_{CTRL-PEP1}$):

$$RR_{CTRL-PEP1} = P(M \mid CTRL) / P(M \mid PEP1)$$

[093] onde se tem $28,89\% / 8,89\% = 3,25$ ($P < 0,01$). Isto implica que o risco de morte das pintainhas é 3,25 vezes maior na condição CTRL quando comparado ao PEP1.

A segunda, o estimado risco relativo da mortalidade entre animais do tratamento CTRL e PEP2 ($RR_{CTRL-PEP2}$):

$$RR_{CTRL-PEP2} = P(M \mid CTRL) / P(M \mid PEP2)$$

[094] sendo $28,89\% / 13,33\% = 2,17$ ($P < 0,04$), sinalizando que o risco de morte das pintainhas é 2,17 vezes maior na condição CTRL quando comparado ao PEP2.

[095] É importante frisar que o uso do teste de hipótese realizado foi unilateral, já que o tratamento não é passível de aumentar a mortalidade. Dessa forma, a hipótese nula ($H_0: RR = 1$) rejeitada, em ambos os testes de risco ($P < 0,04$) em favor da hipótese alternativa ($H_1: RR > 1$), dá condição ao uso do Intervalo de Confiança dos Riscos

Relativos como forma de estimação intervalar para o RR populacionais. Assim, tem-se que:

$$IC_{95\%}(RR_{CTRL-PEP1}) = [1,36; \infty)$$

[096] Em outras palavras, com confiança de 95% é possível afirmar que o verdadeiro Risco Relativo em questão (o populacional) é, ao menos, maior ou igual a 1,36, implicando que a mortalidade verdadeira em uma população seja ao menos 36% maior para animais do grupo controle em comparação com a do grupo tratado com PEP1. Da mesma forma, tem-se que:

$$IC_{95\%}(RR_{CTRL-PEP2}) = [1,04; \infty)$$

[097] Ou seja, com uma confiança de 95%, é possível afirmar que o verdadeiro Risco Relativo em questão (o populacional) é, ao menos, 1,04, implicando que a mortalidade verdadeira em uma população seja ao menos 4% maior para pintainhas do grupo controle em comparação com a do grupo tratado com PEP2.

[098] É notório constatar neste experimento que não houve redução de mortalidade quando se aumentou a concentração de peptídeo. Portanto, não há necessidade de testar a diferença estatística do risco de mortalidade entre estas duas dosagens; afinal, foi obtido uma maior proteção (menos mortalidade) com menos recursos (massa de peptídeo), o que é importante do ponto de vista de utilização e validação do produto. Isto é, pelos resultados, a redução de mortalidade não melhora em função do aumento de concentração, mas, no melhor cenário, mantem-se a mesma. Adicionalmente, é importante frisar que existe evidência estatística de o tratamento PEP1 reduzir a mortalidade total, não somente da infecção por *Salmonella*.

[099] Pela natureza da ação do peptídeo, que é de proteger as pintainhas contra o patógeno o qual foram desafiadas, pode-se usar os mesmos resultados apresentados (Tabela 6 e Figura 12) para estabelecer uma métrica que quantifica a proteção adquirida pelas pintainhas, por terem sido submetidas ao tratamento com peptídeos (seja PEP1 ou PEP2).

[100] O Fator Protetivo (FP), ou de proteção, é a estatística que quantifica a redução do risco à mortalidade pelo uso de PEP1 ou PEP2. Nesse caso, matematicamente, o FP nada mais é que o oposto de RR, isto é, $FP = 1 - (RR-1)$. Portanto, a estimação do Fator

de Proteção que o tratamento PEP1 exerce sobre a mortalidade, quando comparado ao grupo controle (CTRL) é dado por:

$$FP_{CTRL-PEP1} = 1 - (RR_{CTRL-PEP1})^{-1}$$

[101] Logo, $1 - (8,89\% / 28,89\%) = 1 - (1/3,25) = 1 - 0,31 = 0,69$. Assim, estima-se pontualmente que o tratamento PEP1 reduz em 69% o risco de morte das pintainhas ($P < 0,01$), quando comparada com o grupo sem ingestão de peptídeo (CTRL). Quando se faz uso da estimação intervalar unilateral, com uma confiança e 95%, para $FP_{CTRL-PEP1}$, tem-se que:

$$IC_{95\%}(FP_{CTRL-PEP1}) = [0,26 ; 1,00]$$

[102] Isso implica que redução da mortalidade pelo uso do PEP1 é, pelo menos, de 26%, quando comparada ao grupo controle. A estimativa do fator de proteção que tratamento PEP2 exerce sobre o grupo controle é dado por:

$$FP_{CTRL-PEP2} = 1 - (RR_{CTRL-PEP2})^{-1}$$

[103] Assim, $1 - (13,33\% / 28,89\%) = 1 - (1 / 2,17) = 1 - 0,46 = 0,54$. Este resultado sinaliza que o tratamento PEP2 reduz em 54% o risco de mortalidade, quando comparado com o grupo CTRL ($P < 0,04$). Já com uso da estimação intervalar unilateral para $FP_{CTRL-PEP1}$, tem-se, com uma confiança de 95%:

$$IC_{95\%}(FP_{CTRL-PEP2}) = [0,04 ; 1,00]$$

[104] Consequentemente, a redução da mortalidade pelo uso do PEP2 é, no mínimo, de 4% (com maior precisão, de 4,05%), em comparação ao grupo controle.

[105] Apesar de não ser apresentada, a taxa de mortalidade a partir do 5º dia de infecção (7º dia de vida) foi nula para as pintainhas submetidas a todos os tratamentos estudados. Assim, o período crítico de análise concentrou-se no 2º ao 4º dia de experimento, com nítidas evidências de que, nos tratamentos contendo as micropartículas com o peptídeo antimicrobiano, já no 3º dia de infecção, a taxa de mortalidade chega a zero (Figura 13).

[106] Em relação ao PEP2, houve uma única morte no 4º dia de infecção, fato que foge da tendência apresentada pelos tratamentos, podendo ser causado por alguma eventualidade, mas não é possível concluir ao certo. De certa forma, há uma grande diferença entre a taxa de mortalidade do grupo CTRL comparado aos tratamentos PEP1

e PEP2, no 2º e no 3º dia de infecção ($P < 0,05$), evidenciando que o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha tem um efeito de diminuição de risco de mortalidade já no início da infecção, quando as pintainhas ingerem o peptídeo microencapsulado e que corresponde à fase mais aguda de sua mortalidade.

Dimensionamento de amostra e Poder do teste estatístico

[107] Foi decidido entre os pesquisadores envolvidos que a proporção de mortalidade de pintainhas seria a variável norteadora para o cálculo de tamanho de amostra. Todavia, em função de ausência de trabalhos similares com estimativas dos parâmetros necessários para o cálculo, não se determinou o número mínimo de pintainhas necessário para evidenciar a eficiência do tratamento na redução da mortalidade.

[108] Entretanto, o grau de invasividade presente nesse estudo, juntamente com as exigências da ética no uso de animais em experimentos, adicionado a preservação de qualidade do manejo durante o período de experimentação, levaram ao uso de 45 animais por tratamento, totalizando 135 animais. Tal número foi também concordante com Montgomery e Runger (2012), quando relatam sobre as condições mínimas para uso de aproximação da distribuição Binomial pela Normal, o que é necessário durante o cálculo de tamanho de amostra que envolvem a estimação de proporção. Os autores relatam as condições de aproximação são: $n.p > 5$ e $n.p.(1-p) > 5$, sendo “n” o tamanho de amostra, “p” a proporção do evento de interesse: no caso, a morte das pintainhas. Esses mesmos autores alertam que, de forma geral, a boa aproximação se dá para tamanhos grandes de amostra ($n > 40$).

[109] O intervalo de 95% confiança unilateral apresentou que a redução, em pontos percentuais, da taxa de mortalidade do grupo controle para o grupo do tratamento PEP1 teria o limite inferior (LI = 0,07 = 7%). Isso significa que a redução existente na população seria pelo menos 7%, o que é extremamente satisfatório. Já para a redução do CTRL para PEP2 seria com LI = 0,02 = 2%, o que é inferior ao satisfatório. Por esse motivo, não há necessidade de aumento de tamanho de amostra para comprovação da eficácia do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, quando se considera o desempenho do tratamento PEP1 na redução da taxa de mortalidade.

Utilizando o poder do teste para o cálculo do tamanho de amostras

[110] Na avaliação da suficiência do tamanho amostral, pode incluir a análise com o Poder do Teste, que corresponde à sensibilidade do teste em rejeitar a hipótese nula inequivocamente, o que pode melhorar ainda mais o desempenho no teste. Para tanto, foi elaborado uma simulação para diferentes proporções de mortalidade inferiores às obtidas no tratamento controle, conforme a hipótese alternativa.

[111] A simulação para os cálculos de tamanho de amostra deu-se com base das estimativas obtidas, com nível de significância de 5% e poder do teste de 80%, considerado por Cohen (1988) como aceitável. Na Figura 14, são apresentados os números mínimos de unidades amostrais por tratamento (e.g. número de pintainhas) para que o teste detecte a redução de mortalidade para as proporções de 25 a 5%.

[112] Conforme essa figura, fica claro que quanto mais a proporção de mortalidade se reduzir, menor será o tamanho da amostra necessário para se detectar a diminuição na mortalidade, com um poder de 80% e significância de 5%. É notório que as proporções de mortalidade entre 5 e 10% necessitariam entre 28 e 49 pintainhas por tratamento, respectivamente. Esse resultado não coloca dúvida de que as 45 aves utilizadas por tratamento neste experimento seriam suficientes para se detectar a redução de mortalidade no tratamento controle na ordem de 20 pontos percentuais ou mais, o que ocorre no tratamento com menor dose de peptídeo (PEP1). Em outra situação, se for considerada apenas da comparação (CTRL para PEP2), então adotar-se-ia ou um nível de significância maior que 5%, ou um poder menor que 80%, o que poderia comprometer sensibilidade do teste, ou por fim, testar mais 4 animais para cada tratamento para completar 49 animais por tratamento, o que seria desnecessário neste momento, dado os presentes resultados encontrados.

Conteúdo Cecal (UFC/mL)

[113] Os dados de contagem de *Salmonella enteritidis* em UFC/mL necessitaram da transformação em logaritmo neperiano (Ln) para adequação do modelo preconizado na ANOVA (Tabela 7). O teste F para efeitos de tratamentos apontou evidência ($P < 0,02$) de que há diferença entre os tratamentos. Da mesma forma, o efeito do tempo de infecção sobre o Ln da contagem foi fortemente significativo ($P = 0,00$), principalmente

no segundo dia de infecção (5 dias de vida). Além dos efeitos principais, também foi averiguada o efeito da interação ($P = 0,24$).

[114] Tabela 7. Média da contagem de *Salmonella enteritidis* em UFC/mL por tratamento.

Tempo de infecção (dias)	Tratamento		
	CTRL	PEP1	PEP2
02	66050500	784000	57600000
05	14660000	1702000	16200000
07	181400	804800	360000
14	3600	4720	10200
20	60	0	0
27	0	0	0

[115] Tal resultado retrata não haver evidência de interação entre tratamento e idade, isto é, o tratamento que apresenta melhor desempenho ainda é o PEP1, principalmente na para o 2º dia de infecção, sendo que depois esse tratamento apenas passa não diferir significativamente dos demais, conforme ilustrada na Figura 15.

[116] Após a ANOVA, foi realizada o teste de para comparação do tratamento controle (CTRL) contra os demais tratamentos (PEP1 ou PEP2), utilizando-se do teste de Dunnett que, por sua vez, evidenciou (significativamente) apenas a diferença entre CTRL e PEP1 ($P < 0,05$).

Infecção nas excretas (Suabe/Swab)

[117] Os resultados do acompanhamento da infecção por meio do suabe do inóculo de *Salmonella enteritidis* na concentração de 10^9 UFC/mL foram submetidos ao teste Qui-quadrado ($P > 0,05$), onde o p-valor encontrado foi de 0,88, indicando que não há evidência de que a proporção de presença ou ausência seja diferente entre os tratamentos (Tabela 8). Portanto, com base nessa amostra, não se pode afirmar que existe influência do tratamento sobre a ausência ou presença do inóculo.

[118] Tabela 8. Acompanhamento da infecção por meio do suabe por tratamento.

Tratamento	Presença	Ausência	Total
CRTL	34	71	105
PEP1	31	74	105
PEP2	34	71	105

Pesagem

[119] A média e o desvio padrão dos resultados obtidos na pesagem durante o acontecimento do experimento estão apresentados na Tabela 9. Na perspectiva inferencial, o teste F para efeitos de tratamentos apontou moderada evidência ($P = 0,07$) de que há diferença entre os tratamentos. Já o efeito da idade sobre o peso foi fortemente significativo ($P = 0,00$), em função do intrínseco desenvolvimento da massa corporal das aves, principalmente nas primeiras semanas de vida. Além destes efeitos principais também foi averiguada a presença de efeito de interação ($P = 0,74$). Tal resultado retrata não haver evidência de interação entre tratamento e idade, isto é, o efeito dos tratamentos não depende da idade. Estes resultados puderam ser ilustrados através do gráfico de *boxplots* (Figura 16).

[120] Tabela 9. Estatísticas descritivas do peso (g) em função dos tratamentos e idade.

Idade (dias)	Tratamento	N	Média	DP	CV%	Mín.	Q1	Mediana	Q3	Máx.
12	CRTL	15	93,33	16,87	18,07	65,00	80,00	90,00	110,00	120,00
	PEP1	15	101,67	12,05	11,85	75,00	95,00	100,00	110,00	120,00
	PEP2	15	108,67	14,20	13,07	85,00	95,00	110,00	120,00	130,00
14	CRTL	15	107,00	18,40	17,20	75,00	95,00	105,00	125,00	140,00
	PEP1	15	114,33	11,33	10,17	95,00	105,00	110,00	120,00	140,00
	PEP2	15	118,33	14,35	12,13	90,00	110,00	120,00	130,00	135,00
19	CRTL	15	149,64	24,45	16,34	105,00	132,50	150,00	171,25	190,00
	PEP1	15	154,33	19,72	12,78	125,00	140,00	150,00	170,00	195,00
	PEP2	15	156,33	18,56	11,87	120,00	145,00	160,00	170,00	180,00
21	CRTL	15	167,14	26,73	15,99	120,00	143,75	165,00	196,25	205,00
	PEP1	15	156,33	20,48	13,10	130,00	140,00	150,00	175,00	200,00
	PEP2	15	163,33	22,81	13,96	125,00	145,00	165,00	185,00	195,00

28	CRTL	15	234,40	32,30	13,76	200,00	202,50	225,00	267,50	280,00
	PEP1	15	238,60	28,68	12,02	195,00	219,00	235,00	260,00	290,00
	PEP2	15	245,38	28,17	11,48	190,00	225,00	250,00	270,00	285,00

[121] É certo que quando o presente invento for colocado em prática, poderão ser introduzidas modificações no que se refere a certos detalhes, sem que isso implique afastar-se dos princípios fundamentais que estão claramente substanciados no quadro reivindicatório, ficando assim entendido que a terminologia empregada não teve a finalidade de limitação.

REIVINDICAÇÕES

1) **“MÉTODO DE MICROENCAPSULAÇÃO DE PEPTÍDEO SINTETIZADO, COMPOSIÇÃO MICROENCAPSULADA E SEU USO EM AVES POEDEIRAS”**, mais precisamente trata-se de método de microencapsulação de peptídeo sintetizado e composição encapsulada para o combate de diferentes microrganismos patógenos da flora intestinal de aves poedeiras; caracterizado por método de microencapsulação compreender procedimentos executados no peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha para obtenção de composição microencapsulada e atuação contra as bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus subtilis* (ATCC 19659), e contra as Gram-negativas como *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) em aves poedeiras; as fases e procedimentos que compõe o método de microencapsulação compreendem as etapas:

- etapa de síntese e purificação do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha - a síntese é a peptídica em fase sólida (SPFS); o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha (Gly-Trp-Leu-Asp-Val-Ala-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Ala-Ala-Phe-Asn-Val-Ala-Lys-Asn-Phe-Ile) é sintetizado manualmente, utilizando-se a resina a Rink Amide com grau de substituição 0,6 mmol/g; a cadeia peptídica é sintetizada aminoácido por aminoácido com 3 vezes de excesso em relação à escala de utilizada de resina - 0,4 mmol, utilizando 185,9 µL de diisopropilcarbodiimida (DIC) e 172,92 mg de 1- hidroxibenzotriazol (HOBt) em N,N-dimetilformamida (DMF)/diclorometano (DCM), na proporção 1:1 (v:v), por duas horas, sendo a reação iniciada pela C-terminal do aminoácido e avaliada a cada acoplamento pelo Teste de Kaiser, onde se detecta grupamentos amino livres, comprovando se o acoplamento foi completo; a desproteção ou retirada do grupamento Fmoc dos α-aminoácidos é realizada com uma solução de 20% da base 4-metilpiperidina em DMF por 20 min; para o teste de Kaiser, prepara-se alguns poucos grãos de resina, misturando duas gotas das soluções 1 (5% de ninidrina em etanol), solução 2 (80 g de fenol em 20 mL de etanol) e solução 3 (2 mL de cianeto de potássio 0,001 mol L⁻¹ em 98 mL de piridina) a 120°C por 4 min; para a clivagem, método de quebra da ligação do peptídeo com a resina, é adicionado um coquetel de clivagem contendo 95% de ácido trifluoroacético (TFA), 2,5% de triisopropilsilano (TIS) e 2,5% de água ultrapura e

homogeneizou-se a mistura em agitação por 2 h, a temperatura ambiente; posteriormente, adiciona-se éter etílico gelado e a mistura foi então centrifugada por 5 min; após isto, reserva-se o sobrenadante etéreo contendo os subprodutos hidrofóbicos produzidos pela reação e secou-se a resina com o peptídeo para evaporar todo éter restante do material; com as amostras secas, adiciona-se uma solução contendo o solvente A (0,045% de TFA em água ultrapura) e solvente B (0,036% de TFA em acetonitrila) numa proporção 1:1 (v:v) e centrifuga-se por 5 min, processo repetido por três vezes, a temperatura ambiente, para separar as duas fases remanescentes: a resina (fase sólida) e o peptídeo (fase líquida); por fim, o sobrenadante contendo o peptídeo bruto é acondicionado e liofilizado num liofilizador por 48 h para a secagem total das amostras; o produto obtido é um pó branco e floculoso, que representa a obtenção final do peptídeo bruto de interesse; a avaliação da pureza do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha é realizada com um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), acoplado a um detector de luz ultravioleta UV, configurado para leitura em comprimento de onda a 220 nm, usando uma coluna analítica em fase reversa de 18C modelo Shimpack, marca Shimadzu, dimensões 4,6 × 25 mm, tamanho de partícula 5 µm, tendo como fase móvel as soluções A e B, para o processo de clivagem; utiliza-se como programa de análise para purificação preparativa um gradiente de concentração de 30 a 60% de solvente B em 90 minutos, com fluxo a 5 mL min⁻¹, numa coluna preparativa Shimadzu (Shim-Pack), modelo PREP-ODS, dimensões de 20 × 250 mm - diâmetro de partícula 15 µm; o programa de análise das purezas das frações coletadas em modo semipreparativo é de 5 a 95% de solvente B, com fluxo de 1 mL min⁻¹ por 30 min; o peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha também é avaliado em 280 nm no HPLC/UV devido à presença na sua sequência primária do aminoácido triptofano, que absorve neste comprimento de onda e facilita a sua identificação e quantificação; a análise final permite a obtenção do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha com uma pureza maior que 95%, com massa em quantidade suficiente para as etapas de caracterização;

- etapa de caracterização - a espectrometria de massas é realizada para a identificação do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, utilizando a mesma metodologia de análise aplicado no HPLC convencional, com fluxo de 1 mL min⁻¹. No HPLC, o tempo de retenção

observado de 18,82 min pela área do pico e confirmado pelo LC-MS em 23 min, devido à mudança de condições do sistema acoplado à espectrometria de massas (UHPLC e coluna com tamanho menor); no espectro, os picos de 573 ($Z = +4$), 763,6 ($Z = +3$) e 1144,9 ($Z = +2$) representam os picos da razão massa/carga de uma molécula com um peso molecular de $2.289,72 \text{ g mol}^{-1}$, o qual é exatamente o peso molecular teórico do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, confirmando a sua correta obtenção e caracterização;

- etapa de microencapsulação do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha – o método utilizado para a microencapsulação consiste na gelificação ionotrópica; como material gelificante, são preparadas duas soluções para o pré-encapsulamento, sendo solução (H1), contendo 20 g de alginato com 16 mg do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, em 500 mL, obtendo-se uma concentração final de $0,032 \text{ g L}^{-1}$; solução (H2), contendo 20 g de alginato com 32 mg do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha em 500 mL, obtendo-se uma concentração final de $0,064 \text{ g L}^{-1}$; ditas soluções (H1) e (H2) são homogeneizadas e dispersadas a 25.000 rpm. Como solução reticulante de 500 mL de cloreto de alumínio (AlCl₃) 5%, o processo de microencapsulação é executado por gotejamento por uma bomba de seringa a uma velocidade de $1,2 \text{ pL h}^{-1}$, a temperatura ambiente; as microcápsulas são secas em estufa com ar de circulação a 20°C por 72 h;

- revestimento das microcápsulas – a solução de revestimento é preparada com 10% (p:p) de HPMCP, diluída em 25% (p:p) de hidróxido de amônio, 2,5% (p:v) de trietilcitrate e 62,5% (p:v) de água; as amostras foram colocadas num leito fluidizado a 50°C, contendo um soprador a $0,2 \text{ L min}^{-1}$, bomba peristáltica a $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ e sistema de vibração com 70% com 40 mL da solução de revestimento; as microcápsulas são colocadas no leito fluidizado com os parâmetros descritos, até o esgotamento dos 20 mL da solução de revestimento; são obtidas capsulas de 0,5 mm de tamanho médio inicial antes de serem secas e 0,2 mm após a secagem; este é considerado o produto final ou (ERCtx); os dados são analisados e processados pela seguinte equação de concentração $C_f = \text{ERCtx} / \text{ERCtx}_{mf}$; onde (ERCtx) é a quantidade total de peptídeo em cada microcápsula revestida (mg de Ctx(Ile²¹)-Ha - este dado pode ser obtido pela eficiência do procedimento) e “ERCtx_{mf}” é a massa final do peptídeo (mg de ERCtx) após

do microencapsulamento e revestimento; finalmente, a análise da quantidade de peptídeo por microcápsula é multiplicada pela massa média de cada (ERCtx).

2) **“COMPOSIÇÃO MICROENCAPSULADA”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por composição microencapsulada (ERCtx H1) apresentar concentração de peptídeo/microcápsula revestida $13,58 \pm 0,10$, tamanho 0.11 ± 0.0007 mm, eficiência 84.70 ± 0.03 %, solubilidade $1.42 \pm 0,0012$ %.

3) **“COMPOSIÇÃO MICROENCAPSULADA”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por composição microencapsulada (ERCtx H2) apresentar concentração de peptídeo/microcápsula revestida $20,37 \pm 0,04$, tamanho 0.11 ± 0.0005 mm, eficiência 87.50 ± 0.06 %, solubilidade $1.63 \pm 0,0017$ %.

4) **“COMPOSIÇÃO MICROENCAPSULADA”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por composição microencapsulada (ERCtx) ser natural, biodegradável e passível de produzir uma formulação protetora, estável e com função carreadora contendo a molécula ativa peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha para liberação controlada no intestino.

5) **“USO EM AVES POEDEIRAS”**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado por composição microencapsulada de peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha ser utilizada em aves poedeiras para redução de mortalidade por *Salmonella sp.* e outros patógenos das aves de postura.

6) **“USO EM AVES POEDEIRAS”**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado por composição microencapsulada de peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha combater diferentes microrganismos patógenos da flora intestinal de aves poedeiras.

7) **“USO EM AVES POEDEIRAS”**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado por composição microencapsulada de peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha ter um efeito de diminuição de risco de mortalidade já no início da infecção, quando as pintainhas ingerem o peptídeo microencapsulado e que corresponde à fase mais aguda de sua mortalidade.

7) **“USO EM AVES POEDEIRAS”**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado por composição microencapsulada de peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-

compor liberação controlada em pH básico para que o peptídeo apresente atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas da flora intestinal das aves.

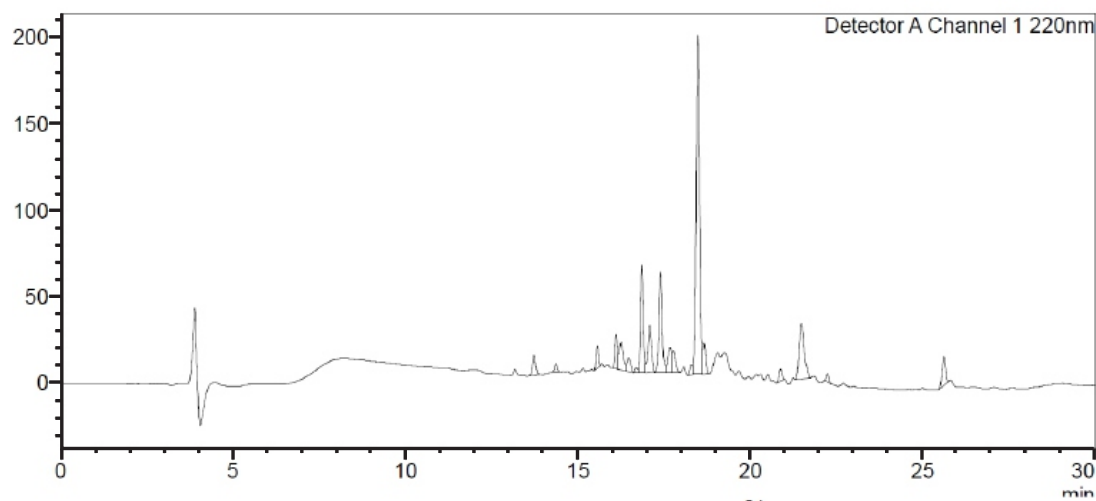


FIG.1

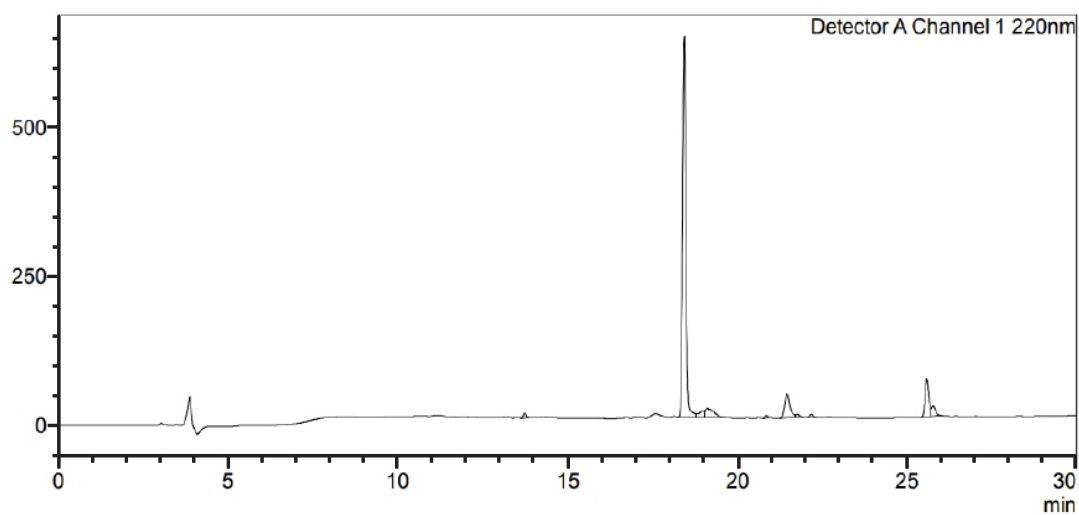
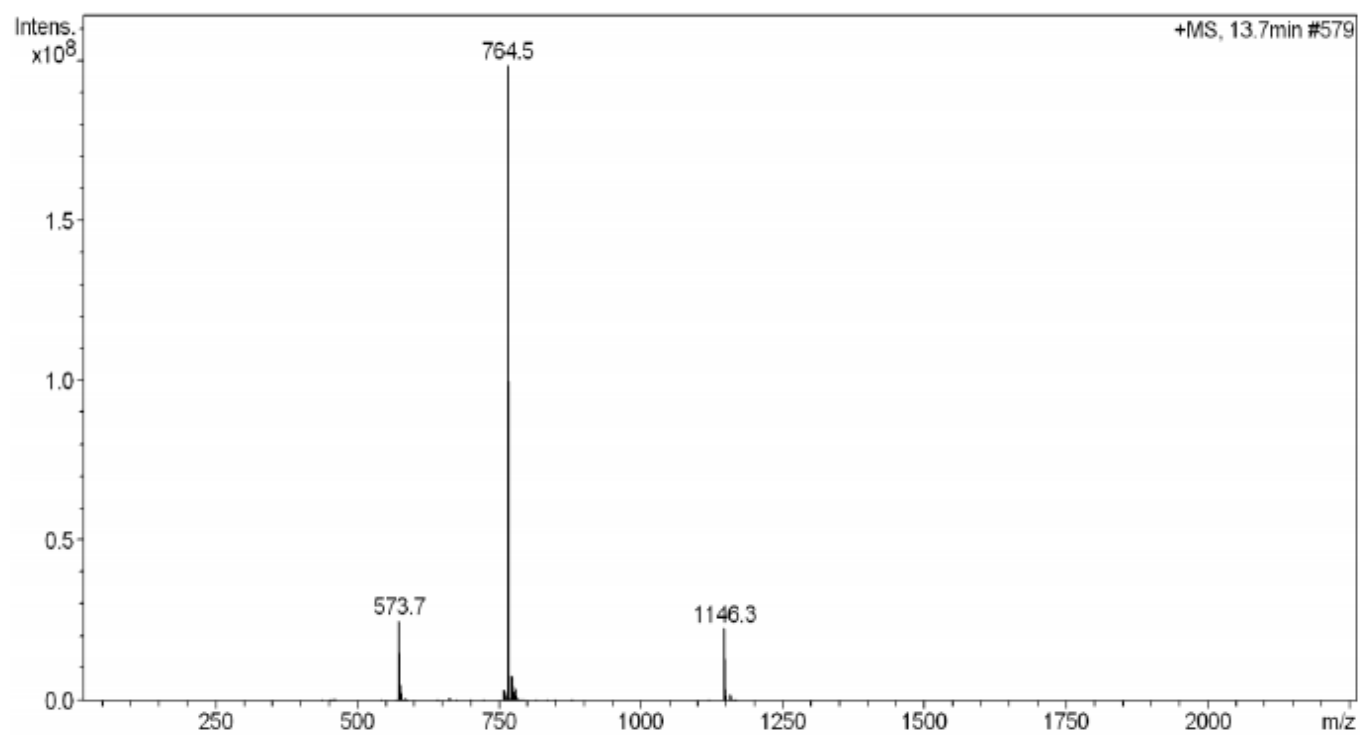


FIG.2

FIG.3



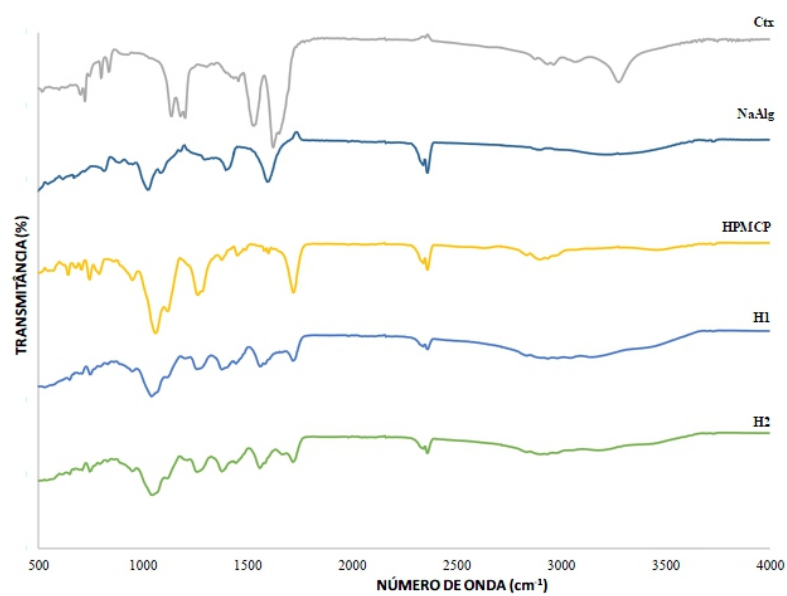


FIG.4

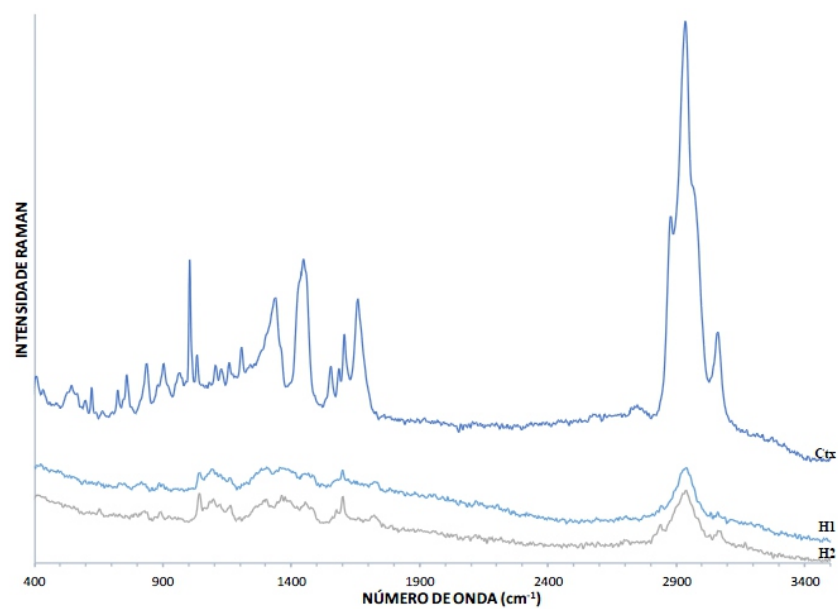


FIG.5

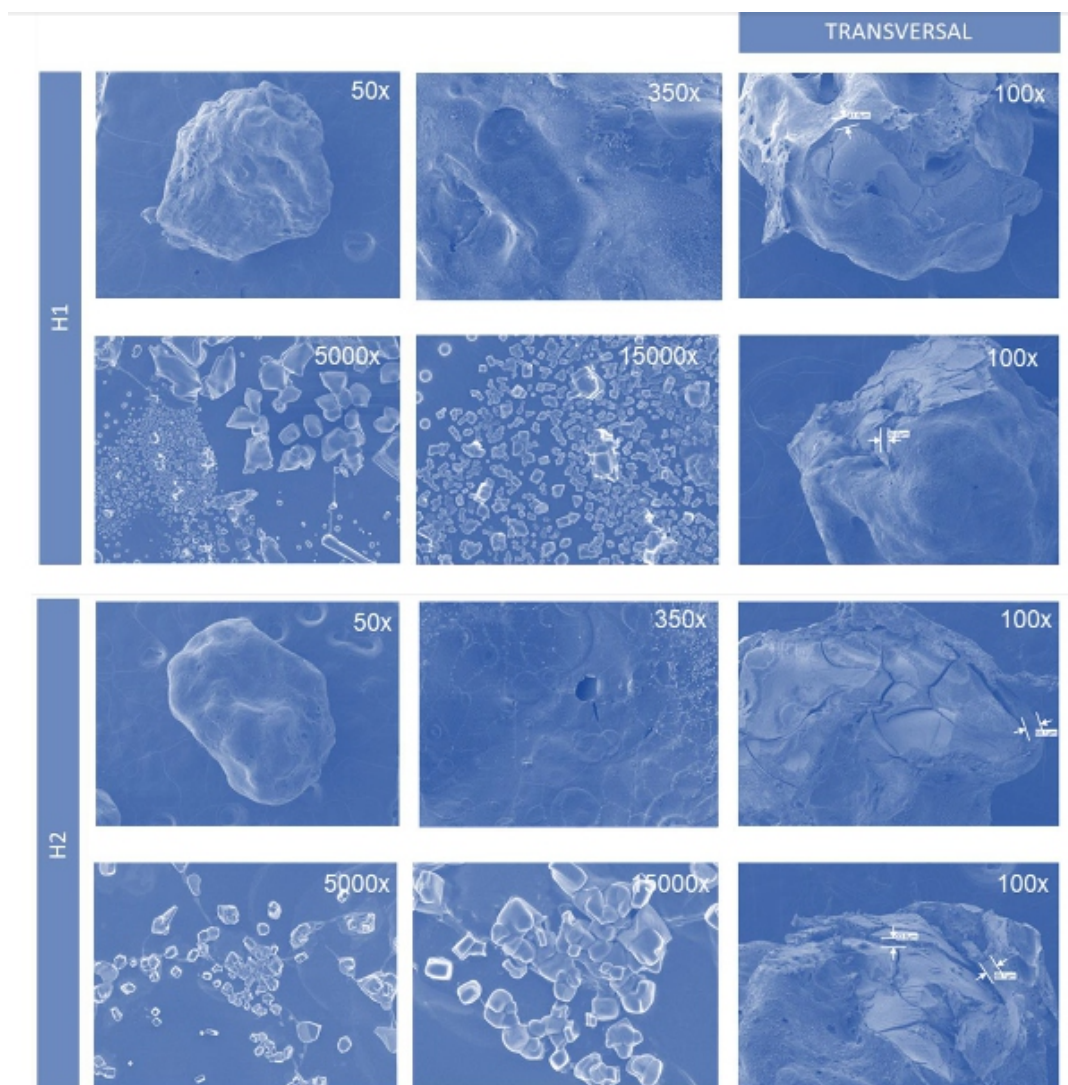


FIG.6

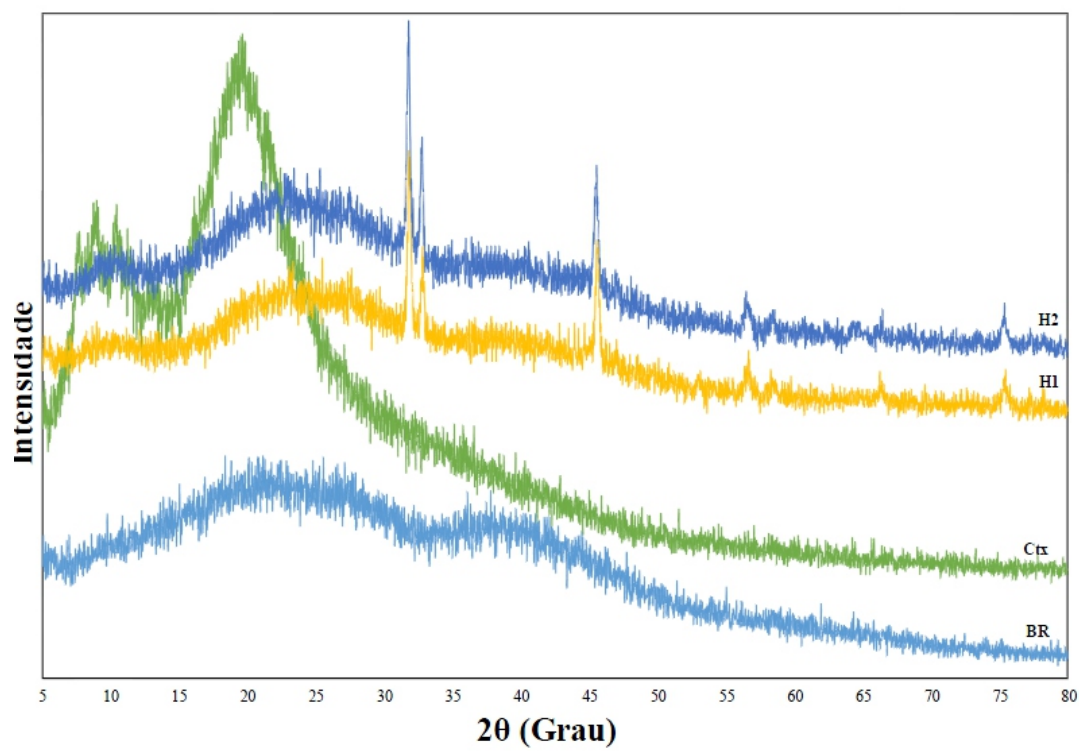


FIG.7

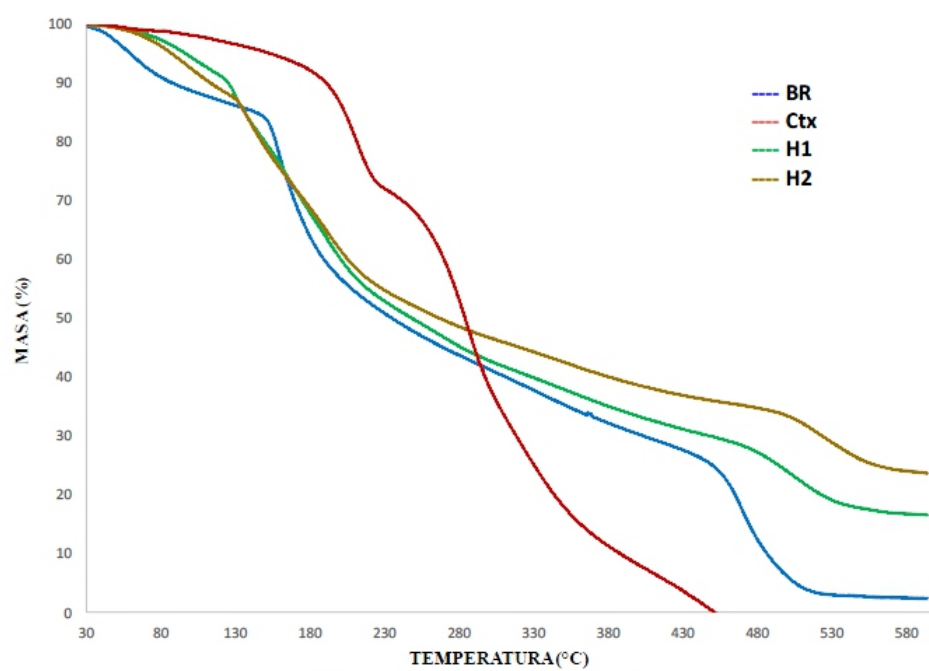


FIG.8

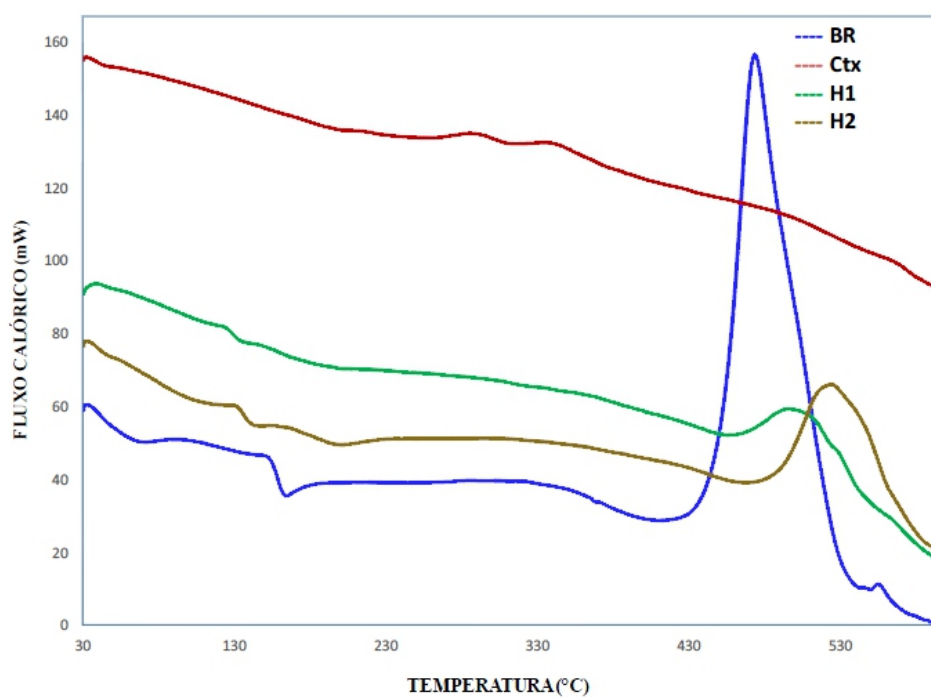


FIG.9

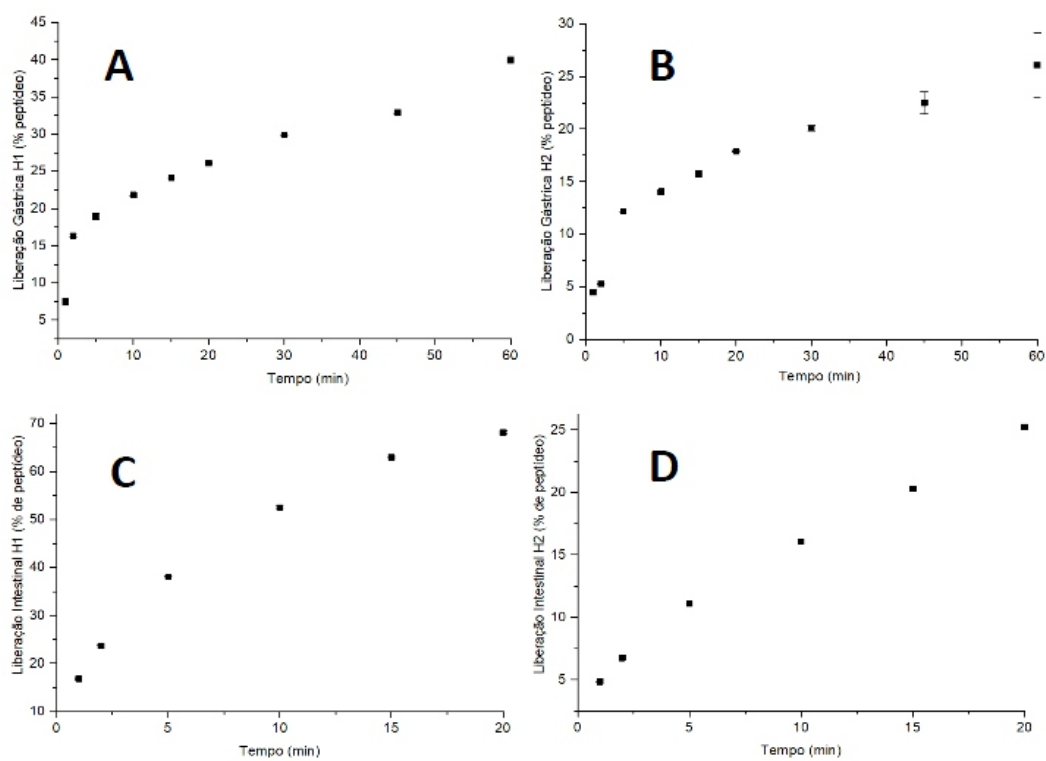


FIG.10

FIG.11

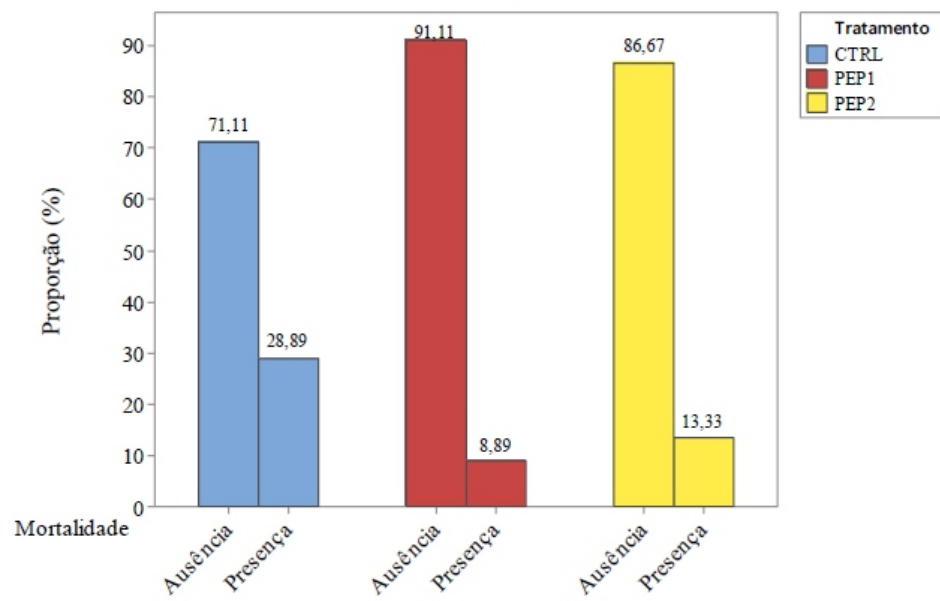
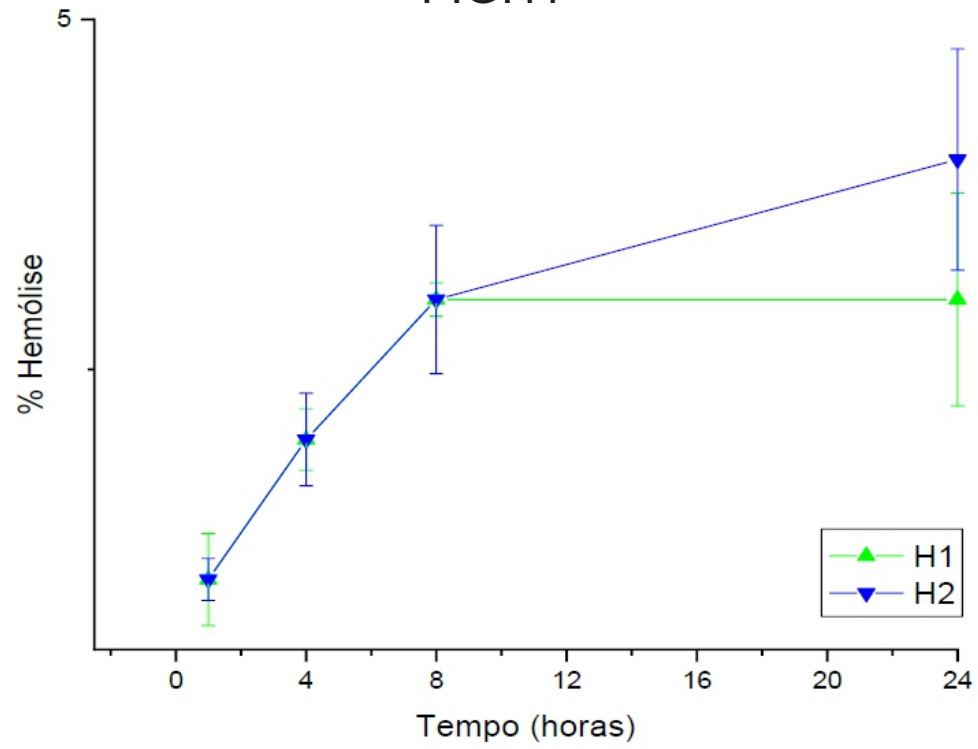


FIG.12

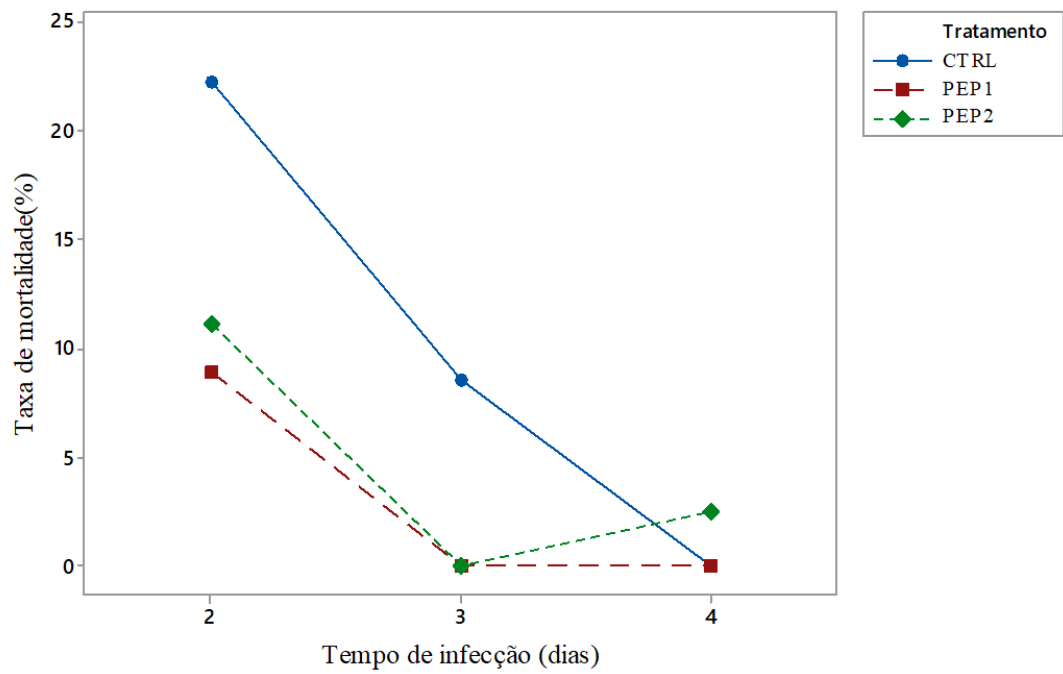


FIG.13

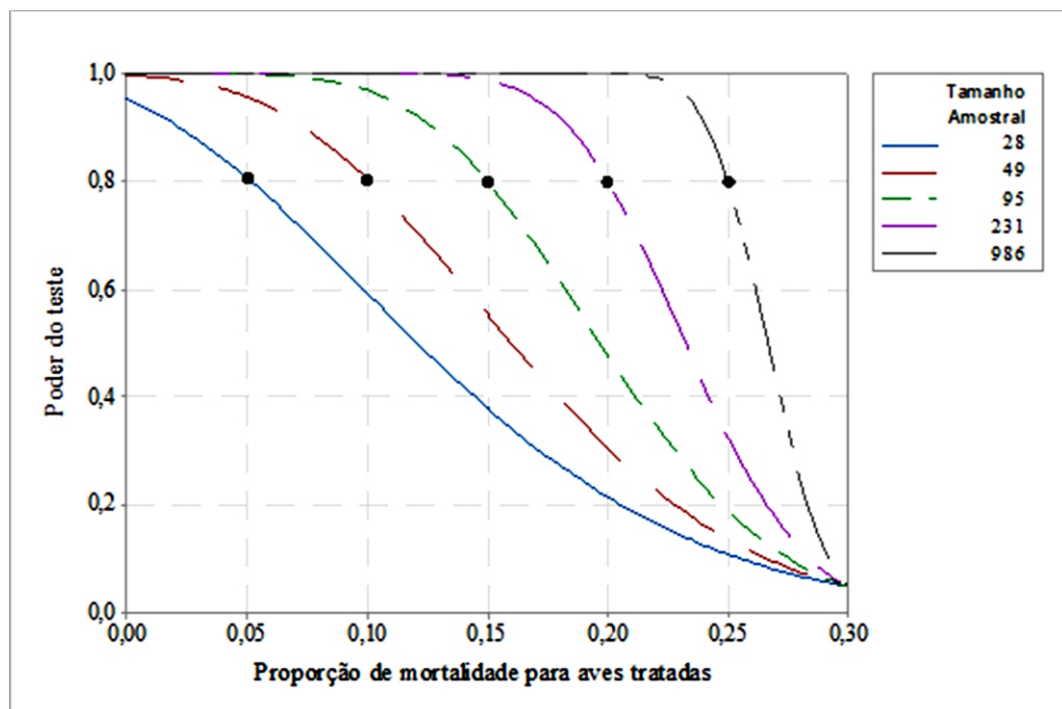


FIG.14

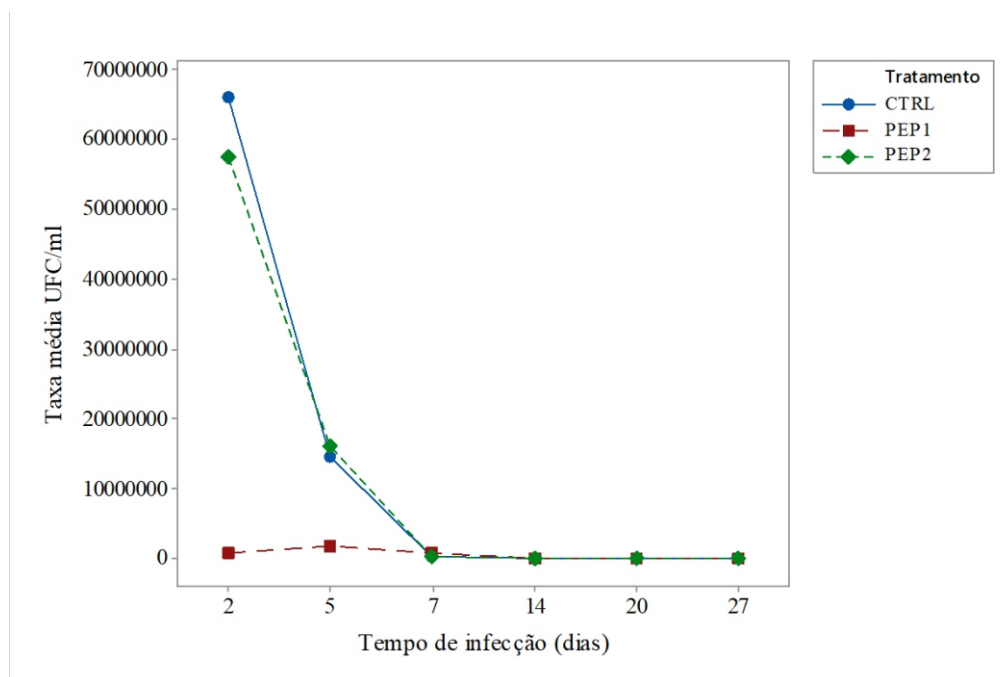


FIG.15

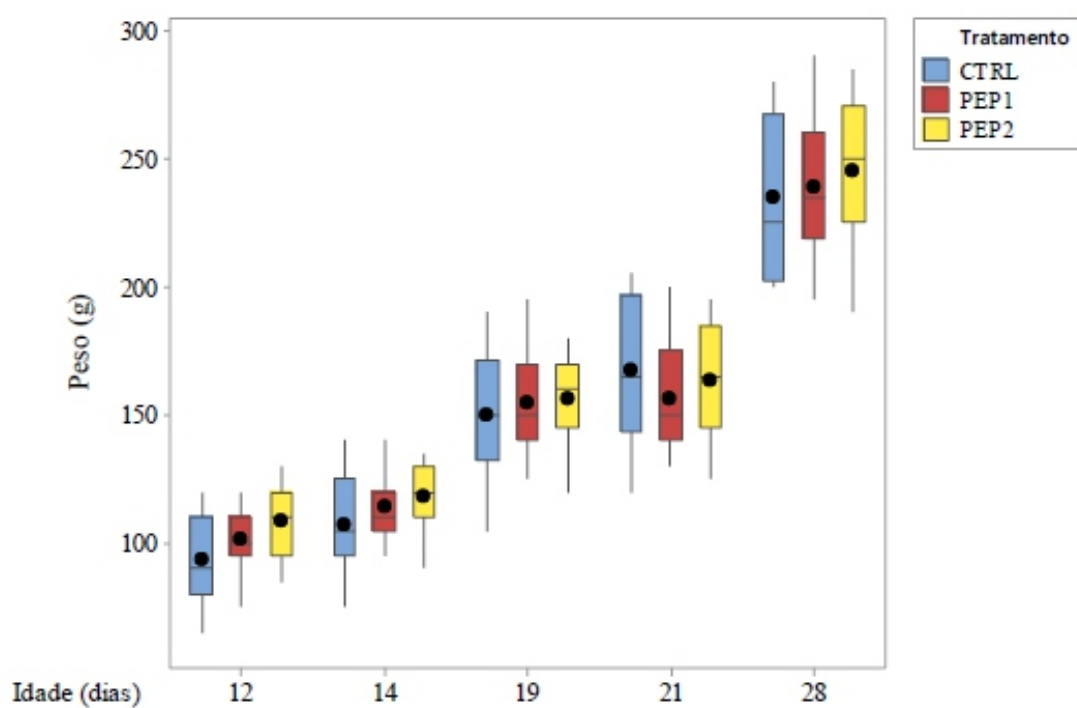


FIG.16

RESUMO

“MÉTODO DE MICROENCAPSULAÇÃO DE PEPTÍDEO SINTETIZADO, COMPOSIÇÃO MICROENCAPSULADA E SEU USO EM AVES POEDEIRAS”.

Trata-se de método de microencapsulação de peptídeo sintetizado e composição encapsulada para o combate de diferentes microrganismos patógenos da flora intestinal de aves poedeiras; dito método de microencapsulação compreende procedimentos executados no peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha para obtenção de composição microencapsulada e atuação contra as bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus subtilis* (ATCC 19659) e contra as Gram-negativas como *Salmonella* sp., *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) em aves poedeiras.