

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 MENSENTEROIDES*
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
lático. 5. Bacteriocinas. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

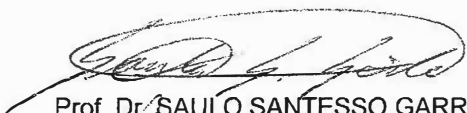
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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:



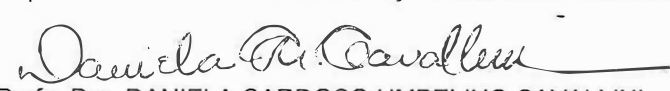
Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO

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



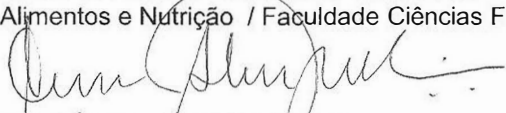
Profa. Dra. KATIA SIVIERI

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



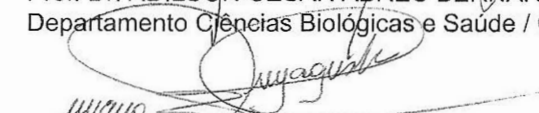
Profa. Dra. DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI

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, Viosa, 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 leito 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 PACKED 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 Mitocondrial In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia MolecularSBBq, 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: 47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2010, Salvador. Anais da 47ª 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 44^a. 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: 48^a 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 MENTEROIDES* 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 Checkerboard ($\Sigma CIF \leq 0,75$) 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 µg/mL e o LeuA1 inibiu a atividade de relaxamento da Topoisomerase IV em concentrações a partir de 100 µg.mL⁻¹. Os peptídeos LeuB e LeuA1, atingiram 100% de vazamento de CF a concentração de 6,25 µg/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 ≥ 200 µg/mL, foram capazes de inibir a enzima humana topoisomerase II α . 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 µMol 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 α -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 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. 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 α . 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 μMol in Trolox equivalents, corresponding to 24% reducing capacity, which could supply oxidative deterioration in food. Dichroism spectra demonstrated conformational flexibility predominating α -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

Figura 1. Esquema da nitrosação endógena.	41
Figura 2. Mecanismo de toxicidade dos nitratos sobre a hemoglobina.	42
Figura 3. Fluxograma para avaliação do efeito sinérgico do LeuA1 e LeuB frente a <i>Listeria monocytogenes</i>	54
Figura 4. Predição da estrutura secundária de leucocinas A-, B- e C-TA33a.	61
Figura 5. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o análogo peptídico LeuA1.	63
Figura 6. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o análogo	63
Figura 7. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o análogo peptídico LeuB.	63
Figura 8. 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
Figura 9. 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
Figura 10. 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
Figura 11. 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
Figura 12. 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
Figura 13. 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
Figura 14. 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 α humana. Volume de reação de 30 µL contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 superenovelado e topoisomerase II α (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, topoisomerase II α (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 α humana. Volume de reação de 30 µL contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 superenovelado e topoisomerase II α (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, topoisomerase II α (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 α humana. Volume de reação de 30 µL contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 superenovelado e topoisomerase II α (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, topoisomerase II α (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

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

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Atividade antibacteriana dos análogos peptídicos LeuA1, LeuAB2 e LeuB (400 µg/ml) frente <i>Escherichia coli</i> O157:H7 pelo ensaio Time-Kill. [Controle de crescimento: CMH + <i>Escherichia coli</i> O157:H7; ciprofloxacina (100µg/mL)].....	70
Gráfico 2. Atividade antibacteriana dos análogos peptídicos LeuA1, LeuAB2 e LeuB (400 µg/ml) frente <i>Salmonella</i> Typhimurium pelo ensaio Time-Kill. [Controle de crescimento: CMH + <i>Salmonella</i> Typhimurium; ciprofloxacina (100 µg/ml)].	70
Gráfico 3. Atividade antibacteriana dos análogos peptídicos LeuA1, LeuAB2 e LeuB (400 µg/ml) frente <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pelo ensaio Time-Kill. [Controle de crescimento: CMH + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; ciprofloxacina (100 µg/ml)].	71
Gráfico 4. Atividade antibacteriana dos análogos peptídicos LeuA1, LeuAB2 e LeuB (400 µg/ml) frente <i>Listeria monocytogenes</i> pelo ensaio Time-Kill. [Controle de crescimento: CMH + <i>Listeria monocytogenes</i> ; ciprofloxacina (100 µg/ml)]. .	71
Gráfico 5. Atividade antibacteriana dos análogos peptídicos LeuA1, LeuAB2 e LeuB (400 µg/ml) frente <i>Staphylococcus aureus</i> pelo ensaio Time-Kill. [Controle de crescimento: CMH + <i>Staphylococcus aureus</i> ; 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

Quadro 1. Sequência de aminoácidos das bacteriocinas da classe II.....	44
Quadro 2. 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 láticas
BHA - butil-hidroxi-anisol
BHT - butil-hidroxi-tolueno
CF - carboxifluoresceína
CMH – Caldo Mueller-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

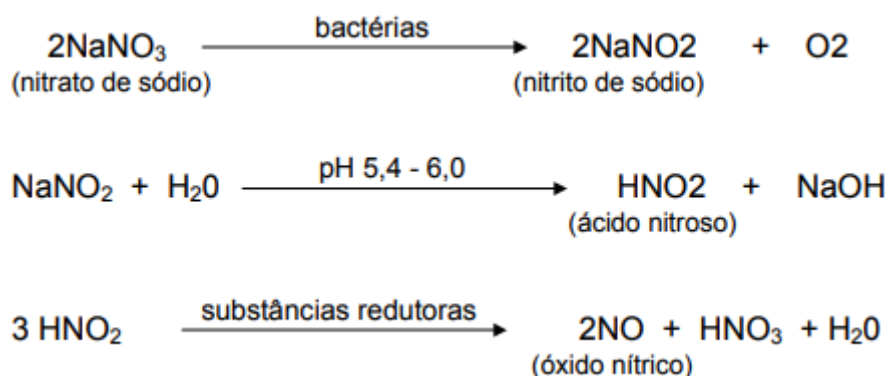
Os estudos envolvendo bacteriocinas começaram em 1925 com Gratia, pesquisador que fez a descoberta das colicinas produzidas por *Escherichia coli* (FREDERICQ, 1957). Devido ao seu potencial de aplicação como conservante natural, um elevado número de bacteriocinas têm sido identificadas e caracterizadas, 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.

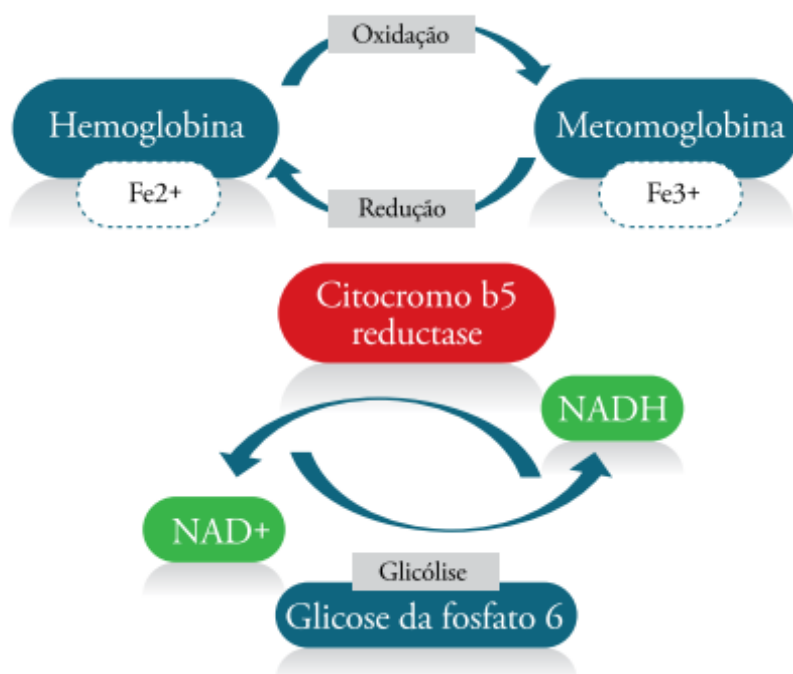


Fonte: ROÇA (2000).

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 (Fe^{2+}) desencadeando a oxidação a um grupo férrico (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, despende 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 IId (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	-----K NYGNG -V ECTKKGCSVDWGYAAT ----N IANNSVMNGLTG -----	36
Sakacin P	-----K YYGNG -V ECGKHSC TV DWGTAIG ----N IGNNAAANWATGGNAGWNK -	43
Bavaricin A	-----K YYGNG -V HXGKHSXTVDWGTAIG ----N IGNNAAANXATGXNAGG ---	41
Piscicolin 126	-----K YYGNG -V SCNKGCTVDWSKAIG ----I IGNNAAANLTTGGAAGWNKG	44
Pediocin PA-1	-----K YYGNG -V TCGKHSCSVDWGKATT ----C IINNGAMAWATGGHQGNHKC	44
Enterocin A	T THSGKYYGNG -V YCTKNKCTVDWAKATT ----C IAGSMIGGFLGGAIPGKC --	47
Leucocin A-UAL 187	-----K YYGNG -V ECTKSGCSVNWGEAFS ----A GVHRLANGGNGFW -----	37
Leucocin B-TA11a	-----K YYGNG -V ECTKSGCSVNWGEAFS ----A GVHRLANGGNGFW -----	37
Mesentericin Y105	-----K YYGNGVVECTKSGCSVNWGEAAS ----A GIHRLANGGNGFW -----	38
Sakacin A	----A RSYGNG -V YCNKCKCWNRGEATQ ----S IIGGMISGWASGLAGM ----	41
Carnobacteriocin BM1	----A ISYGNG -V YCNKEKCWVNKAENKQ ----A ITGIVIGGWASSLAGMGH --	43
Carnobacteriocin B2	-----V NYGNG -V SCSKTKCSVNWQAFQERYTAGINSFVSGVASGAGSIGRRP	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.

Consequentemente, 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

pode ser considerada vantajosa, no que diz respeito a resistência aos antimicrobianos (DRIDER et al., 2016).

Estudos mostram que as bacteriocinas têm efeito sinérgico quando usadas em combinação com outros tratamentos ou outras bacteriocinas que tenha mecanismos de ação diferentes, podendo potencializar a ação contra bactérias patogênicas veiculadas em alimentos. GÁLVEZ et al. (2007), enfatizam que as bacteriocinas poderão ser utilizadas no desenvolvimento de embalagens bioativas em alimentos associadas com outros agentes antimicrobianos. Além disso, os autores citados acima reforçam que o efeito sinérgico seria útil, para evitar a sobrevivência de células adaptadas ou resistentes as bacteriocinas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar novos PAMs derivados das Leucocinas, que atuem como agentes de bioconservação de alimentos para controlar o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e indicadores higiênico sanitários.

2.2. Objetivos Específicos

1. Sintetizar, purificar e caracterizar diferentes peptídeos derivados da Leucocina;
2. Avaliar a atividade *in vitro* de inibição de crescimento contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* sorovar Typhimurium, os quais são microrganismos importantes na área de contaminação alimentar;
3. Avaliar a ação dos peptídeos contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* sorovar Typhimurium pelo ensaio “Time Kill”.
4. Determinar a eficiência da combinação dos peptídeos com atividade antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* pelo ensaio Checkerboard;
5. Realizar estudos comparativos quanto à capacidade de inibição dos diferentes peptídeos frente às topoisomerases bacterianas (DNA girase e topoisomerase IV) a fim de explorar um dos possíveis mecanismos de ação dos peptídeos;

6. Avaliar a citotoxicidade dos peptídeos em células humanas através de ensaios de capacidade hemolítica e de inibição de topoisomerasas humanas (topoisomerase I e topoisomerase II α);

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Sínteses dos Peptídeos

Os peptídeos sintetizados neste trabalho, cuja as sequências dos aminoácidos encontram-se na tabela 1, utilizou-se a metodologia de síntese em fase sólida (STEWART & YOUNG; 1984; KENT, 1988; LLOYD-WILLIAMS e col., 1997; AMBLARD e col., 2005), de acordo com o protocolo padrão que emprega o grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos α -amino grupos, e derivados t-butilicos (t-Bu) para a proteção da maioria das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos (FIELDS & NOBLE, 1990), partindo-se de 300 mg das resinas do tipo Fmoc-AA-Wang (0,67 mmol/g) para o LeuA1, Fmoc-Ala-Wang (0,69 mmol/g) para o LeuAB2 e Fmoc-Arg-Wang (0,69 mmol/g) para o LeuB. DIC/HOBt como agentes de condensação. O Fmoc é base lábil, ou seja, sua remoção do grupo α -amino, conhecido como processo de desproteção, é realizada em um meio básico (solução 20% de piperidina em dimetilformamida (DMF) (Quadro 2).

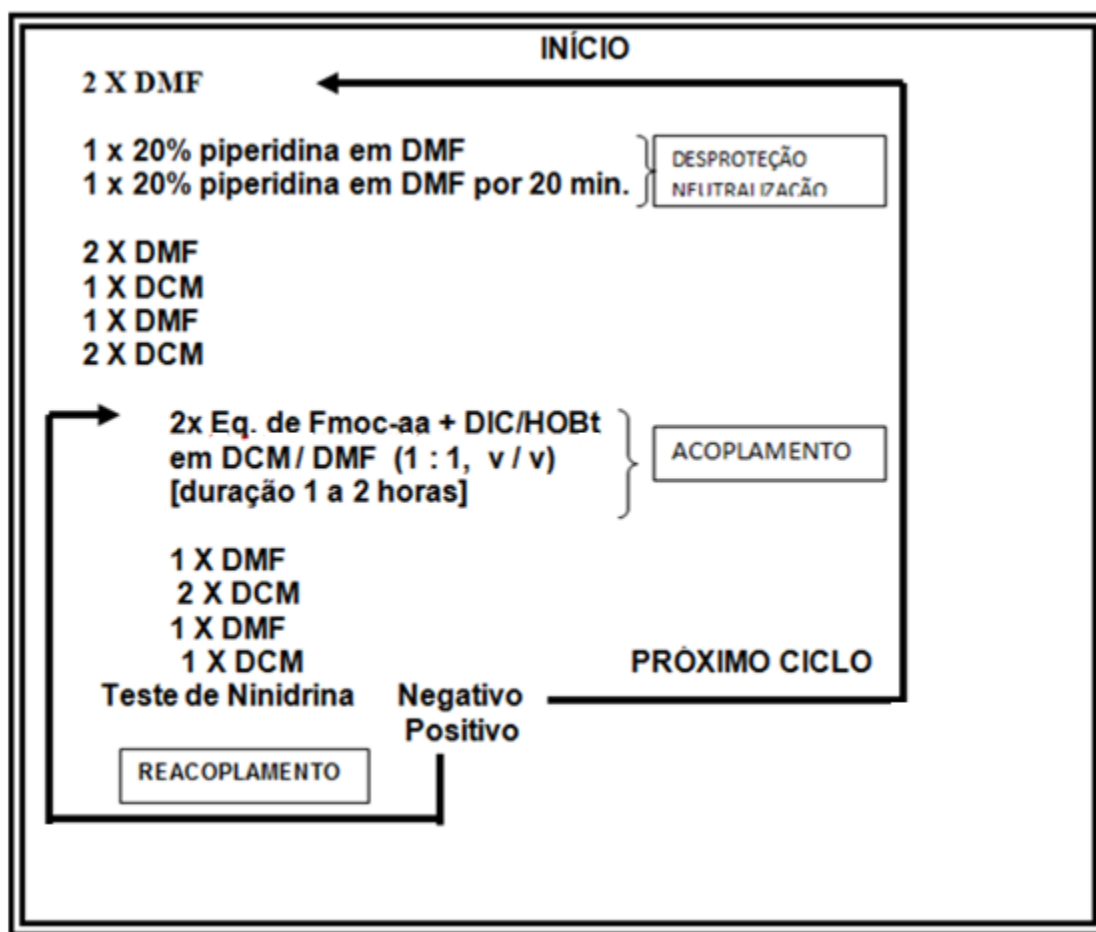
Tabela 1. Sequências primária de aminoácidos dos análogos peptídicos LeuB, LeuA1 e LeuAB2.

Nome	Sequência Primária de Aminoácidos
LeuB	KGKGFWSWASKATSWLTGPQQPGSPLLKKHR
LeuA1	YGNGVHCTKWGEAFSAGVHRLA
LeuAB2	GFWSWAAFSAGVHR

Fonte: Elaborado pela autora.

A etapa de acoplamento foi realizada pela ativação dos grupos carboxila do Fmoc aminoácido a ser inserido com N,N-diisopropilcarbodiimida (Dic)/N-Hidroxibenzotriazol (HOBt), ou O-(Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio hexafluorofosfato (HBTU)/ N-Etildiisopropilamina (DIEA). Nesta reação foi utilizada, três vezes de excesso em relação ao amino grupo da resina, durante duas horas de agitação. Entre cada passo foram efetuadas lavagens com DMF e diclorometano (DCM) para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos.

Quadro 2. Protocolo utilizado para síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS).



Fonte: Adaptado de Lorenzón (2011).

A eficiência das etapas de acoplamento de cada aminoácido foi monitorada pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) e quando positivo, indicando a presença de α -amino grupos livres, o processo foi repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes. A clivagem final dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi efetuada pelo tratamento das respectivas peptidil-resinas com uma solução de clivagem contendo ácido trifluoracético (TFA) (94%), água deionizada (2,5%), 1, 2-Etanoditiol (EDT) (2,5%) e triisopropilsilano (TIS) (1%), a 25°C por 3 horas em agitação branda. Para cada 100 mg de resina, 1,5 mL de solução foi preparada. Após o período de 3 horas, foi adicionado éter etílico gelado ao conteúdo do frasco e observado a formação de um precipitado branco (peptídeo bruto). A mistura foi agitada manualmente e transferida para tubos tipo "falcon" de centrífuga de 15 mL de capacidade volumétrica, sendo submetidos à centrifugação por 15 minutos a 10.000 rpm. Após o período o sobrenadante foi

descartado em frasco precaução e o processo de lavagem com éter foi repetido por mais 3 vezes. Após as lavagens, o precipitado secou em sistema vácuo por cerca de 4-6 horas com as tampas semiabertas para evaporação do excesso de solventes orgânicos. Após a secagem a vácuo, o peptídeo foi extraído utilizando cerca de 100 mL de solução aquosa contendo 10% de acetonitrila (v:v).

3.1.1. Purificação dos Peptídeos Sintetizados

A purificação dos produtos das sínteses foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa no modo semipreparativo, utilizando uma coluna C18 Phenomenex de 15 x 4,6 mm. Durante a purificação foram recolhidas frações de 5 mL, e a pureza dessas determinada por CLAE no modo analítico com coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18, utilizando cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A, com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm. Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico e a água empregada foi a ultrapura. Os tubos contendo o material puro foram juntados e liofilizados, obtendo-se frações que foram analisadas na mesma coluna analítica acima descrita. Após o procedimento de purificação dos peptídeos, a caracterização das moléculas foi feita por meio de espectrometria de massas. As análises foram realizadas em modo de eletrospray positivo, por injeção direta das amostras dos peptídeos puros em um espectrômetro de massas do tipo Ion Trap Amazon SL, da marca Brucker. Os valores de massa molecular experimental foram comparados com os valores teóricos calculados previamente para cada um dos peptídeos.

3.2. Ensaios de Inibição do Crescimento Bacteriano

3.2.1. Ensaio de Microdiluição em Placas

As suspensões bacterianas das espécies *Salmonella* sorovar Typhimurium (ATCC 6539), *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) foram padronizadas a partir de

uma cultura mantida por 24 horas em caldo Muller Hinton (CMH) até atingir turbidez igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland, a qual corresponde à, aproximadamente, $1,0 \times 10^8$ UFC/mL (NCCLS, 1999). Em seguida, foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620 nm para confirmação da concentração de microrganismos, pela densidade ótica (0,08-0,1). Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10, em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

A atividade de inibição antimicrobiana foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016). Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 µL de CMH, acrescentados 100 µL das soluções aquosas dos diferentes peptídeos, nas concentrações de 200 µg/mL, 150 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL. Adicionalmente foram distribuídos 20 µL das suspensões dos microrganismos em cada orifício das microplacas e, quando necessário, foi acrescentado água autoclavada até completar 200 µL de volume final, a fim de equiparar todos os volumes dos poços da microplaca. Como controle positivo foi utilizado 100 µL solução aquosa de Ciprofloxacina 100 µg/mL (Sigma-N1628), a qual foi adicionada em um poço da microplaca contendo 80 µL de CMH e 20 µL da suspensão bacteriana. Foi feito também, o controle do meio de cultura utilizando 200 µL do CMH, o controle de crescimento bacteriano contendo 180 µL de CMH e 20 µL da suspensão bacteriana. As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas e os testes foram realizados em triplicata. Após o período de incubação, as microplacas foram submetidas à leitura de absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro de microplacas (BioTeK). A partir da leitura espectrofotométrica foi determinada a porcentagem de inibição microbiana para cada microrganismo.

3.2.2. Ensaio Time Kill

O ensaio Time-Kill *in vitro* foi realizado, segundo metodologia adaptada de Zhou et al. (2013) e avaliado a partir do dobro da concentração que proporcionou maior inibição microbiana, determinada nos testes de microdiluição. As suspensões bacterianas de *Salmonella* sorovar Typhimurium (ATCC 6539), *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895), *Pseudomonas*

aeruginosa (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) foram padronizadas, seguindo a metodologia do item 3.2.1.

Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80µL de CMH, acrescentados de 100µL de solução aquosa dos peptídeos nas concentrações de: 200 µg/mL, 150 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL. Adicionalmente foram distribuídos 20µL das suspensões dos microrganismos em cada poço das microplacas, quando necessário foi acrescentado água autoclavada até completar 200 µL totais. Como controle positivo foi utilizado 100 µL solução aquosa de Ciprofloxacina 100 µg/mL (Sigma-N1628), a qual foi adicionada em um poço da microplaca contendo 80 µL de CMH e 20 µL da suspensão bacteriana. Foi feito também, o controle do meio de cultura utilizando 200 µL do CMH, o controle de crescimento bacteriano contendo 180 µL de CMH e 20 µL da suspensão bacteriana. Nos tempos de 0, 4, 6, 12, 18 e 24 horas após incubação a 37 °C, foram feitas as leituras, no leitor de microplacas (BioTek), das absorbâncias à 595 nm e foi determinada a cinética de inibição de crescimento microbiano para cada peptídeo.

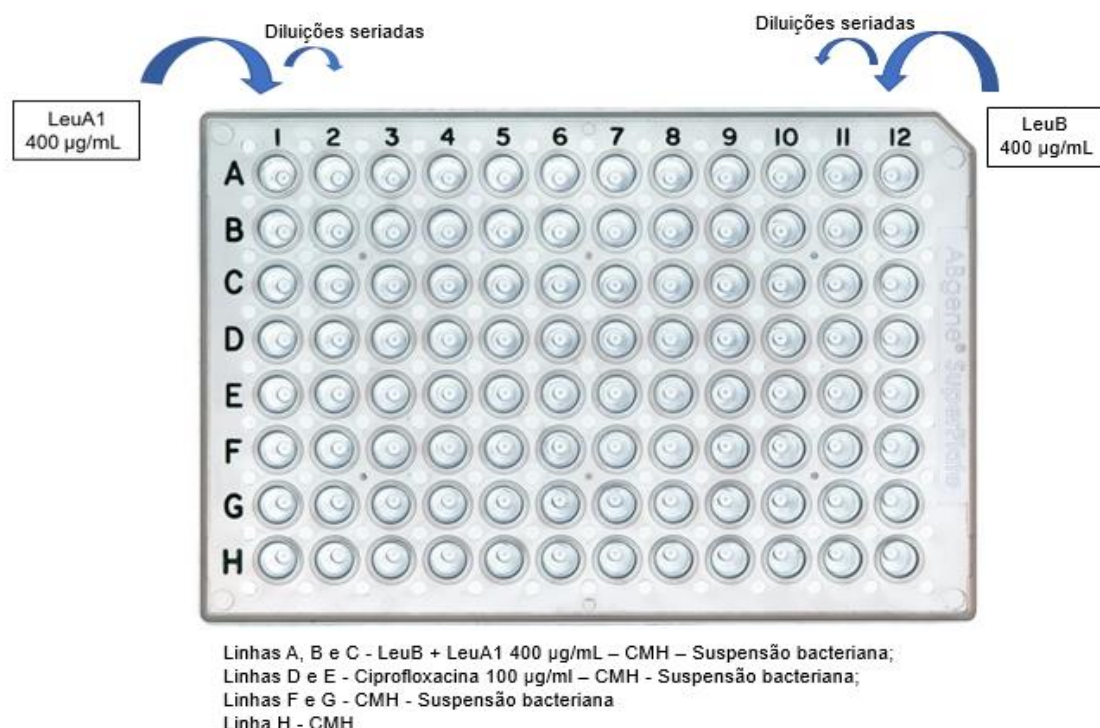
3.2.3. Ensaio Checkerboard

Para avaliar o efeito sinérgico dos peptídeos frente a *Listeria monocytogenes*, foi realizada a técnica de microdiluição modificado para o ensaio Checkerboard de acordo com a metodologia descrita segundo Pillai & Moellering (2005). Foi escolhida a bactéria *Listeria monocytogenes*, pois é um dos patógenos mais importantes veiculados em alimentos.

A suspensão de *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) foi padronizada a partir de uma cultura de 24 horas, em caldo Muller Hinton (CMH) até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL) (NCCLS, 1999). Em seguida, foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620 nm para confirmação da concentração de microrganismos, pela densidade ótica (0,08-0,1). Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10, em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

Os poços das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 μL de CMH e 20 μL da suspensão bacteriana de *Listeria monocytogenes*. No primeiro poço da linha A, da microplaca de 96 poços, foi adicionado 100 μL da solução de LeuA1 a uma concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ para realização da diluição seriada, transferindo-se sequencialmente 100 μL do poço anterior para o próximo até o primeiro poço. De maneira semelhante, adicionou-se 100 μL da solução de LeuB a uma concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ para realização da diluição seriada, transferindo-se sequencialmente 100 μL do poço anterior para o próximo até o primeiro poço da linha A. Dessa maneira, a linha A contém a combinação dos dois peptídeos que deram maior atividade antimicrobiana, o que foi comprovado nos ensaios de atividade antimicrobiana, os quais serviram de “screening” para esse ensaio de checkerboard. Nas linhas B e C, foi feito o mesmo procedimento que a linha A. Como controle positivo foi utilizado 100 μL solução aquosa de Ciprofloxacina 100 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma-N1628), a qual foi adicionada em um poço da microplaca contendo 80 μL de CMH e 20 μL da suspensão bacteriana. Foi feito também, o controle do meio de cultura utilizando 200 μL do CMH e o controle de crescimento bacteriano contendo 180 μL de CMH e 20 μL da suspensão bacteriana (Figura 3).

Figura 3. Fluxograma para avaliação do efeito sinérgico do LeuA1 e LeuB frente a *Listeria monocytogenes*.



Fonte: Elaborada pela autora.

As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas e os testes foram realizados em triplicata. Após o período de incubação, as microplacas foram submetidas à leitura de absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro de microplacas (BioTeK). A partir da leitura espectrofotométrica foi determinada a CIM e a porcentagem de inibição microbiana para cada microrganismo. Para a avaliação da interação entre os diferentes tratamentos foi calculado a somatória da concentração inibitória fracionária (CIF), de acordo com as equações abaixo:

$$\text{CIF (LeuB)} = \text{CIM na combinação} / \text{CIM sozinho}$$

$$\text{CIF (LeuA1)} = \text{CIM na combinação} / \text{CIM sozinho}$$

$$\Sigma \text{CIF} = \text{CIF (LeuB)} + \text{CIF (LeuA1)}$$

A partir da ΣCIF obtida, foi avaliada a interação seguindo a classificação descrita por Hall et al. (1983) e Fernández Cuenca et al. (2003), na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de ΣCIF correspondentes às diferentes interações.

Interação	ΣCIF
Sinérgico	$\Sigma \text{CIF} \leq 0,5$
Parcialmente sinérgico	$0,5 < \Sigma \text{CIF} \leq 0,75$
Indiferente	$0,75 < \Sigma \text{CIF} \leq 4$

ΣCIF : somatória da concentração inibitória fracionária; CIF: concentração inibitória fracionária.

Fonte: Adaptado de Hall et al. (1983) e Fernández Cuenca et al. (2003)

3.3. Estudo da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos peptídeos antimicrobianos, foi medida usando o método do radical ABTS^+ (ácido [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)]) por antioxidantes acompanhada do decréscimo da absorbância (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006; RUFINO et al., 2007). O radical ABTS foi preparado com a reação de 5,0 μL de uma solução estoque de ABTS

(7 mM) adicionado de 88 µL da solução de persulfato de potássio (140 mM), armazenado durante 16 horas em temperatura ambiente e no escuro. Completada a reação, a solução do radical foi diluída em álcool etílico até se obter absorvância aproximada de 0,7 a 734 nm no UV/VIS (Leitora de placas Biotek® - Epoch).

Nas placas de 96 poços foram adicionados os peptídeos LeuA1, LeuAB2 e LeuB na concentração de 400 µg/mL, o dobro da concentração que apresentou maior inibição microbiana, em triplicata e com a pipeta multicanal, 245 µL do radical ABTS⁺, previamente preparado. Após 6 minutos de reação foi feita a leitura da absorvância a 734 nm. Os resultados foram expressos em *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) em µM, proveniente da equação da reta da curva analítica, feita a partir de uma solução estoque de Trolox 2 mM (50 mg de Trolox em 100 mL de etanol) (VALLVERDÚ-QUERALT et al., 2011).

Obteve-se $\epsilon = 0,000394 \text{ (}\mu\text{M)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e a atividade antioxidante foi dada pela concentração (C) de trolox em µM obtida pela fórmula $C = (\text{Abs} + 0,01358)/0,000394$. Os resultados para a atividade antioxidante de cada análogo peptídico, LeuA1, LeuB e LeuAB2 foram calculados pela fórmula:

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

Onde: A branco = absorvância do branco e A amostra = absorvância da amostra.

3.4. Ensaio de Inibição Enzimática

3.4.1. Ensaio de Inibição do Superenovelamento do DNA pela DNA Girase

Os estudos para avaliação da inibição da atividade de superenovelamento do DNA promovido pela DNA girase foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante Inspiralis (2003), descrito abaixo:

Uma unidade (U) de DNA girase foi incubada com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 relaxado contendo os análogos peptídicos sintetizados, nas concentrações de 200, 150, 100 e 50 µg/mL, em um volume de reação de 30 µL, a 37 °C por 60 minutos em tampão de ensaio. A reação foi interrompida pela

adição de 1 µL de solução de proteinase K (2,5 mg/mL) e posterior incubação por 30 minutos a uma temperatura de 37 °C.

Em seguida, as amostras foram submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris 89 mM / ácido bórico 89 mM / EDTA 2 mM, pH 8.2). As amostras foram aplicadas uma a uma nos poços do gel e submetidas à tensão constante de 24 V, à temperatura ambiente, por 2 horas. Ao término da corrida, o gel foi corado durante 30 minutos em tampão de corrida, contendo brometo de etídio (50 mg/mL). O gel foi então, examinado em transiluminador de luz ultravioleta (Germetec LTDA.) e fotografado com luz ultravioleta incidente, utilizando-se câmera fotográfica Kodak Digital Screen DC40.

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

3.4.2. Ensaios de Inibição do Relaxamento do DNA pela Topoisomerase IV

Em contraste à DNA girase, que possui maior atividade no superenovelamento negativo do DNA, a topoisomerase IV atua preferencialmente no relaxamento do DNA superenovelado positivamente, bem como no processo de desencadeamento do DNA. Assim, é evidente que a topoisomerase IV desempenha também importante papel no processo de replicação e que a DNA girase não deve ser o único alvo intracelular efetivo para os diversos agentes terapêuticos.

Os ensaios para avaliação da inibição da atividade da topoisomerase IV, foram realizados incubando-se 1 unidade (U) da enzima com 0,3 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado contendo cada um dos análogos peptídicos nas concentrações 200, 150, 100 e 50 µg/mL, em um volume de reação de 30 µL, a 37 °C por 2 horas, em tampão de ensaio. As amostras foram submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose, nas mesmas condições descritas no item 3.2.1.

3.5. Ensaios de Toxicidade dos Peptídeos

3.5.1. Ensaios de Inibição do Relaxamento do DNA pelas Topoisomerases Humanas

Realizou-se ensaios de inibição enzimática com as enzimas topoisomerases humanas (topoisomerase I e topoisomerase II α). Assim como a topoisomerase IV bacteriana, as topoisomerases humanas citadas possuem a função de relaxamento do DNA. Sendo assim, as condições dos ensaios realizados aqui foram semelhantes às descritas no item 3.2.2, apenas com substituição das enzimas.

3.5.2. Estudo da Atividade Hemolítica

O protocolo utilizado neste trabalho foi o de ONUMA et al. (1999) com algumas modificações. Para o estudo de atividade hemolítica o projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos (protocolo de nº 46212515.0.0000.5398). Para este ensaio foram utilizadas hemácias de sangue humano separadas do plasma por centrifugação e lavadas 3 vezes com tampão PBS (35 mmol/L fosfato de sódio; 0,15 mol/L de cloreto de sódio) pH 7,4. Quatro diferentes concentrações dos peptídeos foram utilizadas (200 µg/mL, 150 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL) para determinar a concentração capaz de promover a lise das hemácias. Depois da incubação a 37°C por 1 h, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 min e alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram pipetadas em microplacas de 96 poços, em triplicata. A absorbância a 405 nm foi determinada usando leitor de microplaca (BioTek, modelo Epoch). A porcentagem de hemólise, foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

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

Onde: A amostra = absorbância da amostra; A tampão = absorbância do controle negativo, com tampão PBS; A triton = absorbância do controle positivo, que causa 100% de hemólise.

3.6. Vazamento de Carboxifluoresceína

Foi realizado um ensaio de permeabilização de miméticos de membranas bacterianas, com o intuito de verificar o mecanismo de ação dos peptídeos, preparando vesículas que contém os principais componentes de membranas de procariotos. Foram utilizados os lipídeos 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) e o 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (POPG) na proporção de 75:25, adquiridos da empresa Avanti Polar Lipids. A preparação das vesículas foi baseada em métodos descritos na literatura (MAYER; HOPE; CULLIS, 1986; MACDONALD et al., 1991). Os lipídeos foram pesados nas proporções desejadas, na concentração de 15 mmol.L⁻¹, e dissolvidos em uma solução de clorofórmio-metanol (4-1). Posteriormente, a solução foi evaporada em nitrogênio até formar um filme fino aderido na parede de um tubo. Esse filme foi mantido sob vácuo, durante 12 h para eliminação total dos solventes. Posteriormente, o filme foi hidratado com uma solução de carboxifluoresceína (CF) 80 mmol/L em tampão HEPES 0,01 mol/L pH 7,2 (HEPES). Durante uma hora, o filme foi submetido repetidamente a banho a 60°C, vortex e ultrassom, para que as camadas fossem quebradas e o tamanho das vesículas diminuídas. Para obter as vesículas unilamelares (LUVs), as MLVs foram passadas por um extrusor contendo um filtro de policarbonato com poros de 100 nm de diâmetro (Avanti Polar Lipids). Para a homogeneização do tamanho das vesículas foram realizados 52 ciclos de extrusão. A CF não incorporada às vesículas foi removida por filtração em gel em uma coluna Sephadex G-50 (Amersham Biosciences) estabilizada com tampão HEPES 0,01 mmol/L, glicose 0,15 mmol/L e pH 7,2. Neste estudo foi utilizado um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse VARIAN, com comprimentos de onda ajustados em 492 nm e 517 nm, para a excitação e emissão, respectivamente. As análises foram realizadas em triplicata usando o dobro da concentração determinada nos testes de microdiluição, que proporcionou maior inibição microbiana. Devido à instabilidade das vesículas, a suspensão de LUVs foi usada no mesmo dia.

3.7. Dicroísmo Circular

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

As propriedades conformacionais dos peptídeos LeuA1, LeuB e LeuAB2, a uma concentração de 60 μ M em solução aquosa, foram estudados em três ambientes distintos: em tampão fosfato, em um indutor de estrutura como o 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) 60% e em meio de SDS 25 mM, todos à 25°C. O equipamento utilizado foi um espectropolarímetro Jasco J-815 em celas de 1,0 mm de caminho óptico e 6 varreduras nos comprimentos de onda de 190 a 280 nm.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios de inibição de crescimento bacteriano, antioxidante e hemolítico foram submetidos à análise de variância e as médias das triplicatas, foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de significância, com o auxílio do software estatístico SAS (2012).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Design, Síntese e Caracterização dos Análogos Peptídicos das Leucocinas

As sequências peptídicas sintetizadas foram projetadas baseada na estrutura secundária de Leucocinas A-, B- e C-TA33a (Figura 4), proposta por Papathanasopoulos et al. (1998), para estudos de inibição de diferentes espécies bacterianas de interesse em alimentos, principalmente por atuarem em alvos intracelulares a partir de mecanismos ainda pouco elucidados.

Figura 4. Predição da estrutura secundária de leucocinas A-, B- e C-TA33a.



Fonte: Adaptado de PAPATHANASOPOULOS et al., 1998.

O design dos peptídeos derivados das leucocinas, levaram-se em consideração algumas características estruturais das leucocinas A e B-TA33a, sendo que o peptídeo LeuA1 apresenta em sua estrutura os aminoácidos que se estruturam em cadeia β da porção N-terminal e também os aminoácidos que se estruturam como a única α -hélice da leucocina A-TA33a. Acredita-se que este peptídeo possa interagir em uma dessas regiões, com as topoisomerases bacterianas, principalmente pela estrutura em α -hélice, a qual se assemelha com outros inibidores proteicos dessa enzima, como é o caso da toxina CcdB, já descrita na literatura (LORIS et al., 1999). O peptídeo LeuAB2 foi projetado contendo os aminoácidos que se estruturam em α -hélice da leucocina A-TA33a, juntamente com os aminoácidos que se estruturam em α -hélice da leucocina B-TA33a. Com isso, uniram-se duas regiões distintas de duas proteínas diferentes para avaliar seu efeito de interação e possível inibição de topoisomerases bacterianas. O peptídeo LeuB foi sintetizado na íntegra, baseado na sequência de aminoácidos da leucocina B-TA33a, para análise comparativa com uma estrutura nativa de uma leucocina.

Inicialmente, partiu-se de 300mg de uma resina tipo Fmoc-AA-Wang (0,67 mmol/g) para o LeuA1, Fmoc-Ala-Wang (0,69 mmol/g) para o LeuAB2 e Fmoc-Arg-Wang (0,69 mmol/g) para o LeuB. Os agentes de condensação DIC e HOBt, foram utilizados para ativação dos grupos α -carboxilas dos Fmoc-aminoácidos durante as etapas de acoplamento dos resíduos de aminoácidos de cada um dos peptídeos. Após desproteção do primeiro aminoácido, iniciou-se o acoplamento dos demais, seguindo sempre os passos de lavagens e desproteções. As massas de peptidil-resina obtidas, no final da síntese de cada um dos análogos, podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 3. Massas de peptidil-resinas de cada um dos análogos sintetizados.

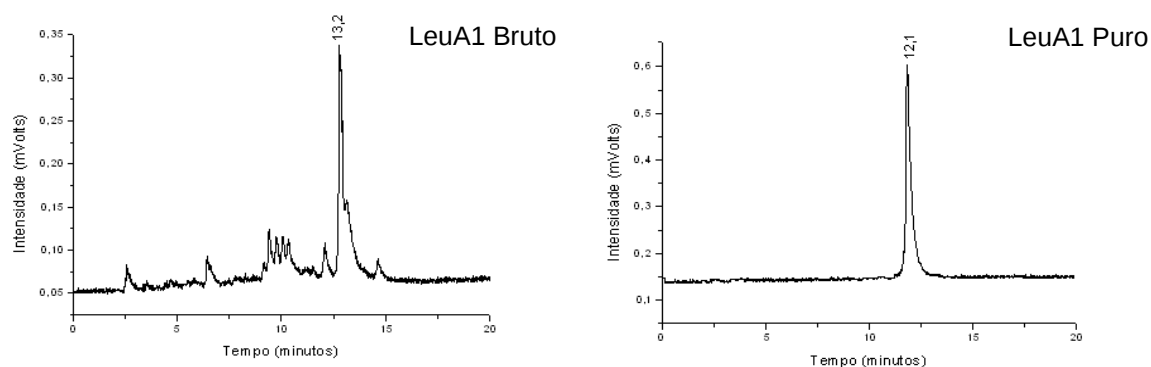
Análogos	Massa final de peptidilresina (g)
LeuA1	0,70
LeuAB2	0,44
LeuB	1,20

Fonte: Elaborado pela autora.

Cada uma das peptidil-resinas resultantes do processo sintético (cerca de 400 mg cada), foi submetida ao procedimento de clivagem, a partir do tratamento com aproximadamente 5 mL de reagente K, durante 120 minutos. Após o procedimento de clivagem, uma fração da massa do extrato bruto de cada peptídeo liofilizado, aproximadamente 100 mg, foi dissolvido em cerca de 10 mL de solvente A (água + TFA 0,036%), com adição de pequenos volumes de acetonitrila para auxiliar na solubilização completa do material bruto. A solução resultante deste processo foi então submetida a análise qualitativa em HPLC, sob condições já descritas anteriormente.

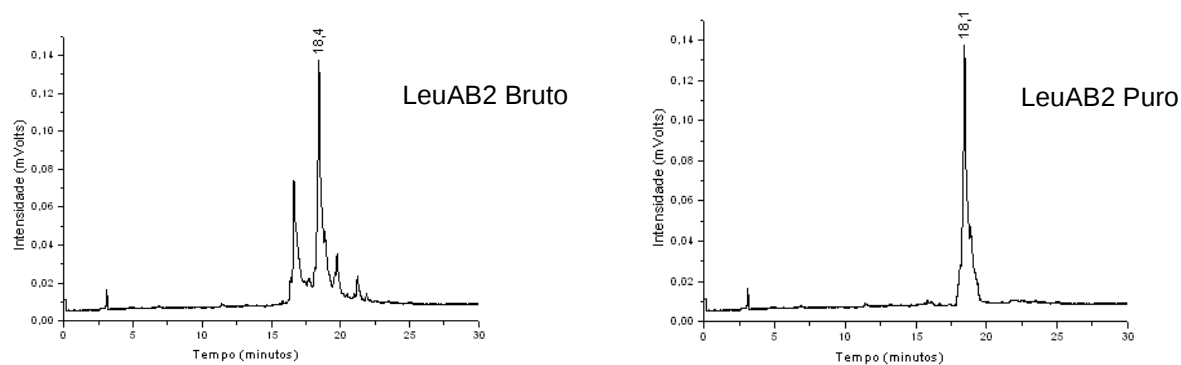
A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solventes obtidos nestas análises, foram definidas as condições relativas à concentração de solvente para purificação dos peptídeos em escala semi-preparativa (condições descritas no item 3.1.1). Os cromatogramas obtidos, para os análogos LeuA1, LeuAB2 e LeuB, antes e após o processo de purificação, estão representados nas figuras 5, 6 e 7.

Figura 5. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o análogo peptídico LeuA1.



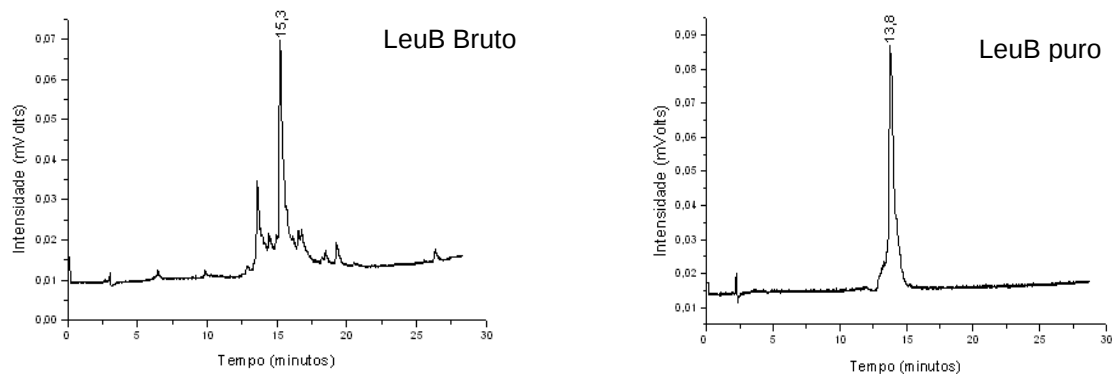
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 6. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o análogo peptídico LeuAB2.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 7. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o análogo peptídico LeuB.



Fonte: Elaborado pela autora.

Verifica-se nas figuras 5, 6 e 7 o perfil cromatográfico obtido por CLAE, em escala analítica, para os peptídeos LeuAB2, LeuA1 e LeuB após a purificação, apresentaram um único pico em relação ao extrato bruto. O parâmetro tempo de retenção dos análogos purificados (LeuA1 12,5; LeuAB2 13,5 e LeuB 11,7), foram mantidos em relação ao pico que corresponde aos respectivos análogos no extrato bruto. Os valores de massa molecular, obtidos por espectrometria de massas no modo electrospray positivo [ES m/z: (M + H)+], foram coincidentes com o teórico esperado, obtendo a confirmação do peptídeo desejado (Tabela 4).

Tabela 4. Massas moleculares teóricas e obtidas por espectrometria de massas dos análogos de leucocinas sintetizados.

Análogos	Massa Molecular Teórica (g/mol)	ES m/z (MW)
LeuA1	2360,64	2360,64
LeuAB2	1578,75	1578,75
LeuB	3466,01	3466,01

Fonte: Elaborado pela autora.

O rendimento da purificação de cada análogo foi calculado através de uma relação com a massa do peptídeo em seu estado bruto. Alguns valores de rendimento da purificação, com as respectivas purezas relativas dos peptídeos purificados estão exemplificados na Tabela 5.

Tabela 5. Rendimento da purificação e pureza relativa dos análogos da Leucocina.

Peptídeo	Massa Peptídeo Bruto (mg)	Massa Após a Purificação (mg)	Rendimento da Purificação (mg)	Pureza Relativa (%)
LeuA1	150	8,4	16,8	90,8
LeuAB2	150	9,6	19,2	93,5
LeuB	150	4,4	8,8	92,4

Fonte: Elaborado pela autora

De maneira geral pode-se concluir, através da observação dos resultados anteriores, que os procedimentos utilizados para a síntese, clivagem peptídeo-resina e metodologias desenvolvidas para purificação foram todos bem-sucedidos, levando a obtenção das sequências desejadas, confirmadas através dos dados de análise de aminoácidos, massa molecular e pureza relativa dos produtos sintetizados.

5.2. Ensaio de Inibição de Crescimento Microbiano

Os testes de inibição de crescimento bacteriano, encontrados nas tabelas 6 a 10, são indicados para avaliar a ação dos análogos frente aos microrganismos, que possam contribuir para um processo de contaminação do alimento e que justifique o uso de um peptídeo antimicrobiano para a conservação do mesmo.

Para a bactéria *Escherichia coli* O157:H7 é possível observar que o peptídeo LeuB apresentou maior atividade antimicrobiana, inibindo 69% dos microrganismos viáveis. Para *Salmonella* Typhimurium ambos os peptídeos LeuB, LeuA1 e LeuAB2 apresentaram elevada inibição 71%, 69% e 59% respectivamente, na maior concentração utilizada. Os análogos LeuA1 e LeuAB2 foram capazes de apresentar uma porcentagem de inibição de 49 e 91% para *Pseudomonas aeruginosa*. No caso da bactéria *Listeria monocytogenes*, os peptídeos LeuA1 e LeuAB2 demonstraram maior propriedade antimicrobiana para esses patógenos, inibindo 79% e 69%, respectivamente. Frente a *Staphylococcus aureus* ambos os peptídeos LeuB, LeuA1 e LeuAB2 apresentaram elevada inibição 40%, 96% e 78% respectivamente, na maior concentração utilizada.

Os resultados da porcentagem de inibição microbiana apresentados nesse trabalho, foram muito satisfatórios. Evidencia-se que a técnica de síntese em fase sólida, a qual proporcionou unir em uma só molécula, as características desejadas encontradas em mais de uma bacteriocina, possibilitou a síntese de análogos peptídicos com uma atividade antimicrobiana maior. Os análogos LeuA1 e LeuAB2, foram sintetizados levando-se em consideração algumas características estruturais das leucocinas A e B-TA33a, unindo duas regiões distintas de duas proteínas diferentes para avaliar a atividade biológica, os quais apresentaram inibição bacteriana maior que o análogo LeuB, que foi sintetizado

na íntegra baseado na sequência de aminoácidos da leucocina B-TA33a. A maioria dos peptídeos híbridos relatados até o momento, apresentou maior atividade antibacteriana, em relação aos seus precursores (BOMAN, 2003). RODRIGUEZ-HERNANDEZ et al. (2006) sintetizaram um peptídeo composto pela porção N-terminal da cecropina, juntamente com diferentes partes da melitina, isolada de abelha (cecropina A-melitina), resultando em um híbrido com atividade antibacteriana maior.

Tabela 6. Porcentagem de inibição dos análogos peptídicos LeuB, LeuA1 e LeuAB2, frente *Escherichia coli* O157:H7 pelo ensaio de Microdiluição em placas. [Controle de crescimento: CMH + *Escherichia coli* O157:H7; ciprofloxacina (100µg/mL)].

Peptídeos Antimicrobianos			
Concentração (µg/ml)	LeuB	LeuA1	LeuAB2
200	69% Aa ± 0,16	36% Ab ± 0,46	33% Ab ± 0,47
150	50% Aa ± 0,30	24% ABb ± 0,62	23% ABb ± 0,60
100	23% Ba ± 0,65	20% Ba ± 0,69	22% ABA ± 0,64
50	22% Ba ± 0,66	20% Ba ± 0,71	20% Ba ± 0,69

- Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem, na coluna, pelo teste de Tukey 5%; - Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem, na linha, pelo teste de Tukey 5%.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 7. Porcentagem de inibição dos análogos peptídicos LeuB, LeuA1 e LeuAB2, frente *Salmonella* sorovar Typhimurium pelo ensaio de Microdiluição em placas. [Controle de crescimento: CMH + *Salmonella* sorovar Typhimurium; ciprofloxacina (100µg/mL)].

Peptídeos Antimicrobianos			
Concentração (µg/ml)	LeuB	LeuA1	LeuAB2
200	71% Aa ± 0,71	69% Aab ± 0,69	59% Ab ± 0,59
150	63% Aa ± 0,63	63% Aa ± 0,63	58% ABA ± 0,56
100	41% Ba ± 0,41	22% Bb ± 0,22	45% Ba ± 0,44
50	33% Ba ± 0,33	7% Bb ± 0,07	16% Da ± 0,28

- Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem, na coluna, pelo teste de Tukey 5%; - Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem, na linha, pelo teste de Tukey 5%.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 8. Porcentagem de inibição dos análogos peptídicos LeuB, LeuA1 e LeuAB2, frente *Pseudomonas aeruginosa* pelo ensaio de Microdiluição em placas. [Controle de crescimento: CMH + *Pseudomonas aeruginosa*; ciprofloxacina (100µg/mL)].

Peptídeos Antimicrobianos			
Concentração (µg/ml)	LeuB	LeuA1	LeuAB2
200	20% Ac $\pm$ 0,31	49% Ab $\pm$ 0,49	91% Aa $\pm$ 0,91
150	20% Ac $\pm$ 0,20	39% Bb $\pm$ 0,39	51% Ba $\pm$ 0,72
100	17% Ab $\pm$ 0,17	19% Cb $\pm$ 0,18	38% Ca $\pm$ 0,64
50	7% Ba $\pm$ 0,07	13% Ca $\pm$ 0,13	12% Da $\pm$ 0,08

- Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem, na coluna, pelo teste de Tukey 5%; - Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem, na linha, pelo teste de Tukey 5%.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 9. Porcentagem de inibição dos análogos peptídicos LeuB, LeuA1 e LeuAB2, frente *Listeria monocytogenes* pelo ensaio de Microdiluição em placas. [Controle de crescimento: CMH + *Listeria monocytogenes*; ciprofloxacina (100µg/mL)].

Peptídeos Antimicrobianos			
Concentração (µg/ml)	LeuB	LeuA1	LeuAB2
200	41% Ac $\pm$ 0,41	79% Aa $\pm$ 0,79	69% Ab $\pm$ 0,62
150	41% Ac $\pm$ 0,40	74% ABa $\pm$ 0,74	67% Ab $\pm$ 0,53
100	28% Bab $\pm$ 0,28	23% Bb $\pm$ 0,22	31% Ba $\pm$ 0,42
50	9% Cb $\pm$ 0,08	19% Ca $\pm$ 0,19	15% Bab $\pm$ 0,09

- Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem, na coluna, pelo teste de Tukey 5%; - Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem, na linha, pelo teste de Tukey 5%.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 10. Porcentagem de inibição dos análogos peptídicos LeuB, LeuA1 e LeuAB2, frente *Staphylococcus aureus* pelo ensaio de Microdiluição em placas. [Controle de crescimento: CMH + *Staphylococcus aureus*; ciprofloxacina (100µg/mL)].

Peptídeos Antimicrobianos			
Concentração (µg/ml)	LeuB	LeuA1	LeuAB2
200	40% Ab $\pm$ 0,40	96% Aa $\pm$ 0,95	78% Ab $\pm$ 0,36
150	24% Bb $\pm$ 0,24	89% Ba $\pm$ 0,89	70% Ab $\pm$ 0,30
100	7% Cc $\pm$ 0,07	20% Cb $\pm$ 0,19	25% Ba $\pm$ 0,28
50	3% Ca $\pm$ 0,03	14% Da $\pm$ 0,14	17% Ba $\pm$ 0,15

- Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem, na coluna, pelo teste de Tukey 5%; - Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem, na linha, pelo teste de Tukey 5%.

Fonte: Elaborado pela autora.

No caso de bactérias Gram-negativas, um possível modo de ação dos PAMS implica na interação prévia com a parede celular, que possui uma membrana externa composta de lipopolissacarídeos (LPS) mantido por íons magnésio e cálcio, que formam pontes entre os açúcares fosforilados carregados negativamente. Sugere-se que os PAMs catiônicos causaram o deslocamento destes íons, danificando a membrana externa e facilitando a entrada do peptídeo para o espaço periplasmático, permitindo então, a interação dos peptídeos com a membrana plasmática (HANCOCK et al., 1995). Este fato pode justificar a elevada porcentagem de inibição dos microrganismos Gram-negativos, *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* Typhimurium, pelo análogo LeuB que apresenta maior carga positiva, o que possibilitou maior interação com os fosfolipídeos aniônicos presentes na membrana externa da bactéria, acarretando em um desbalanço eletrolítico e possível morte bacteriana. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, é uma bactéria que está envolvida em uma capsula polissacarídica, a maior porcentagem de inibição foi pelo análogo LeuAB2, 91%. Uma possível explicação para isso é que a menor hidrofobicidade do análogo LeuAB2 proporcionou maior interação com a capsula rica em polissacarídeo que tem característica polar, acarretando na morte celular e maior porcentagem de inibição.

As bactérias, podem assumir basicamente três formas: cocos, bacilos e espiralada. Estas diferentes formas bacterianas, por sua vez, podem se associar em arranjos que são características de cada gênero ou espécie. No caso das bactérias do gênero *Streptococcus*, os cocos estão agrupados em cadeia e as do gênero *Staphylococcus* os cocos se dispõem em arranjos irregulares, semelhantes a cachos de uva. O conhecimento das formas e dos arranjos das bactérias auxilia na identificação das mesmas e no entendimento da sensibilidade ou resistência a certos agentes antimicrobianos. Um estudo feito por Silva (2017) evidenciou a relação entre a menor porcentagem de inibição antimicrobiana do peptídeo LeuC frente a *Staphylococcus aureus* em decorrência dessas bactérias se agruparem em forma de “cachos”. Uma das hipóteses sugerida é a diminuição da superfície de contato para os peptídeos atuarem, principalmente nas células localizadas nas porções mais internas dos cachos, as quais podem continuar a se desenvolverem e multiplicarem, fato esse que não foi observado neste estudo.

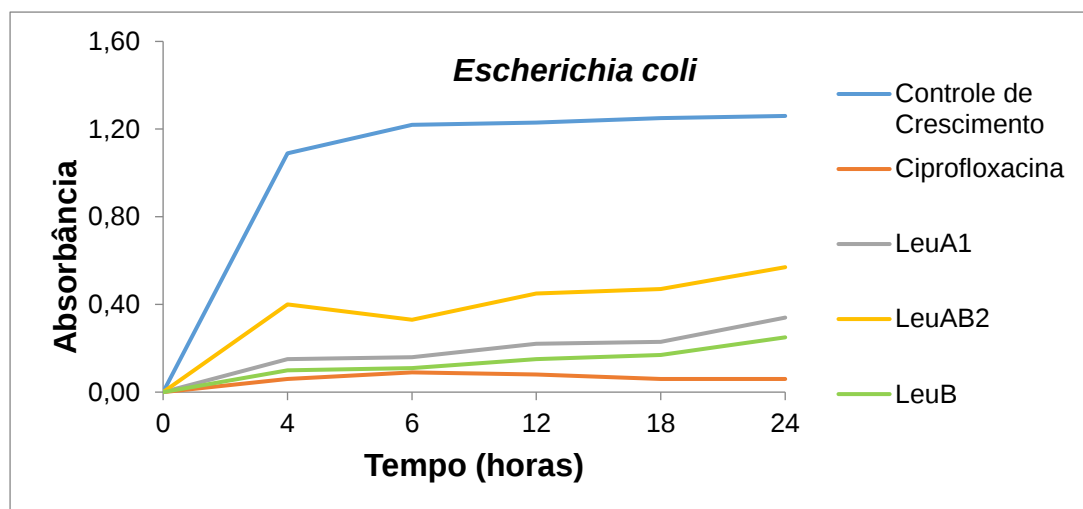
Até o presente, nisina é a única bacteriocina comumente aplicada na preservação de alimentos (GÁLVEZ et al., 2007). Porém, a mesma, apresenta amplo espectro inibitório apenas contra bactérias Gram-positivas, como *Listeria spp* e *Staphylococcus spp*. Os resultados deste trabalho mostraram que peptídeos derivados de leucocinas LeuB, LeuA1 e LeuAB2, apresentam capacidade inibitória do crescimento de bactérias Gram-negativas, as quais são citadas como um dos agentes etiológicos de maior contágio em alimentos.

Bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas são capazes de inibir *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonella spp* sendo que esses peptídeos antimicrobianos apresentam atividade tanto em meio de cultivo quanto em alimentos (HAMAMA et al., 2002; BROMBERG et al., 2006; GUESSAS et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2008; KHALID et al., 2011).

COSTA et al. (2015) avaliaram o antagonismo de 30 bactérias ácido lácticas (BALs), isoladas de queijos de Coalho artesanais do Estado de Pernambuco. Este estudo demonstrou que 40% dessas BALs inibiram o crescimento de *Listeria innocua*, 89% foram eficientes para *Enterococcus faecalis* e 100% inibiram o crescimento do *Bacillus cereus*.

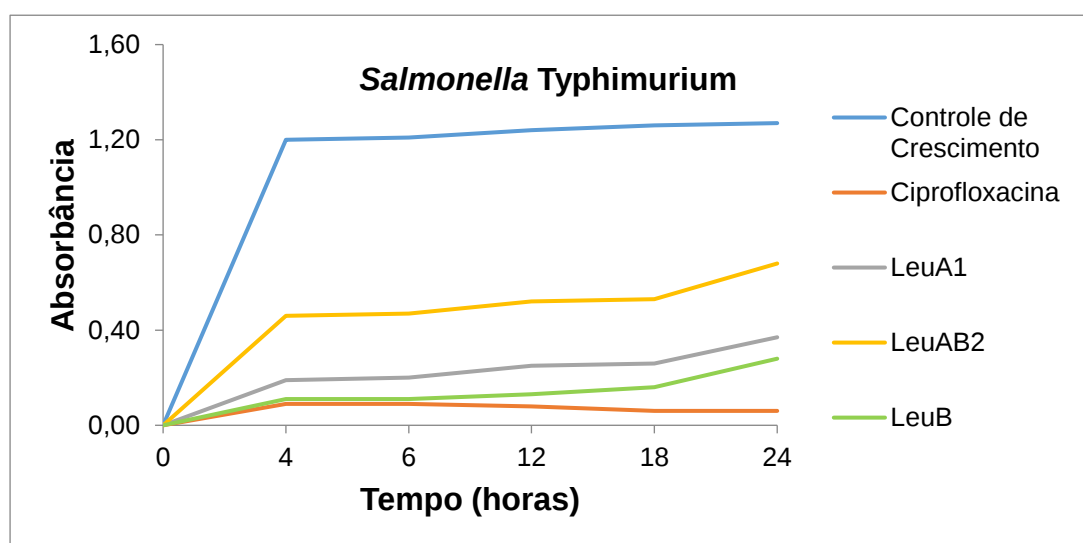
As bacteriocinas podem apresentar ação bactericida ou bacteriostática sobre as bactérias. Em virtude disso, foi realizado o ensaio “*Time Kill*”, o qual oferece informações importantes referentes à velocidade de ação dos peptídeos em estudo. Este teste foi realizado utilizando o dobro da maior concentração testada, o que corresponde a 400 µg/mL, pois foi a que apresentou maior inibição no ensaio de microdiluição em placas, de acordo com a metodologia descrita na norma M26-A do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1999). Os resultados estão apresentados nos gráficos 1 a 5.

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)].



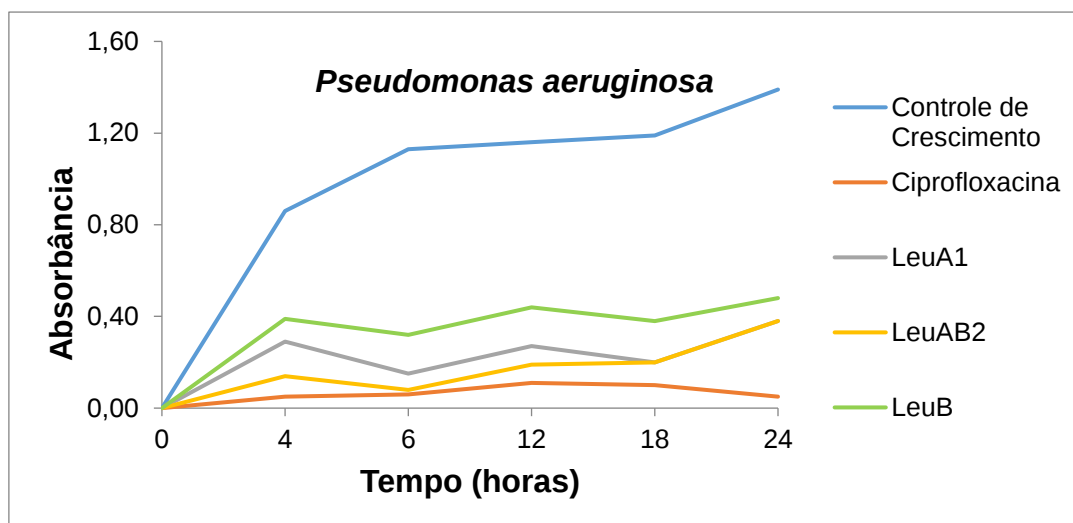
Fonte: Elaborado pela autora.

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)].



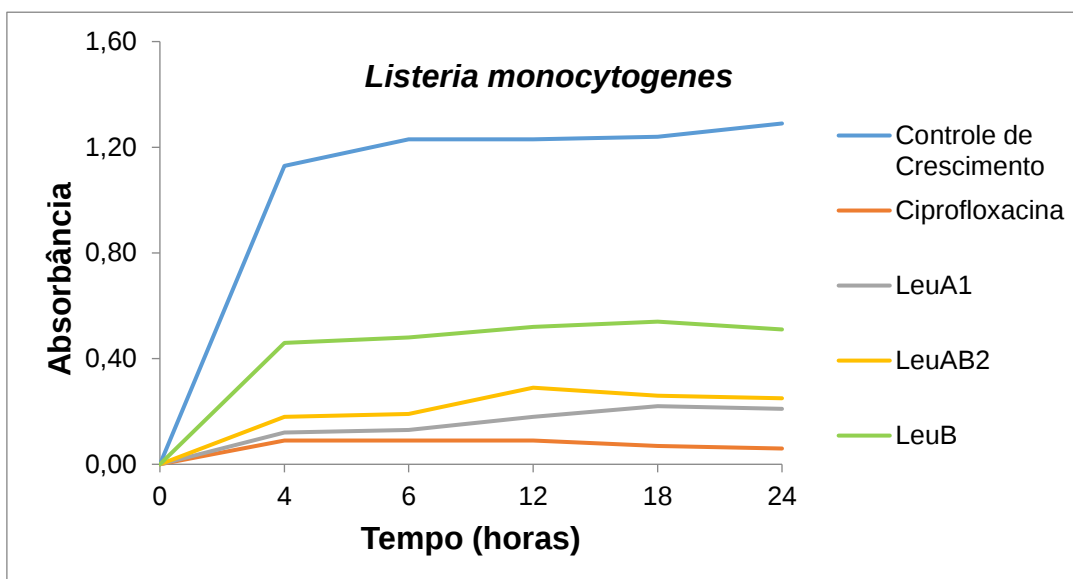
Fonte: Elaborado pela autora.

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)].



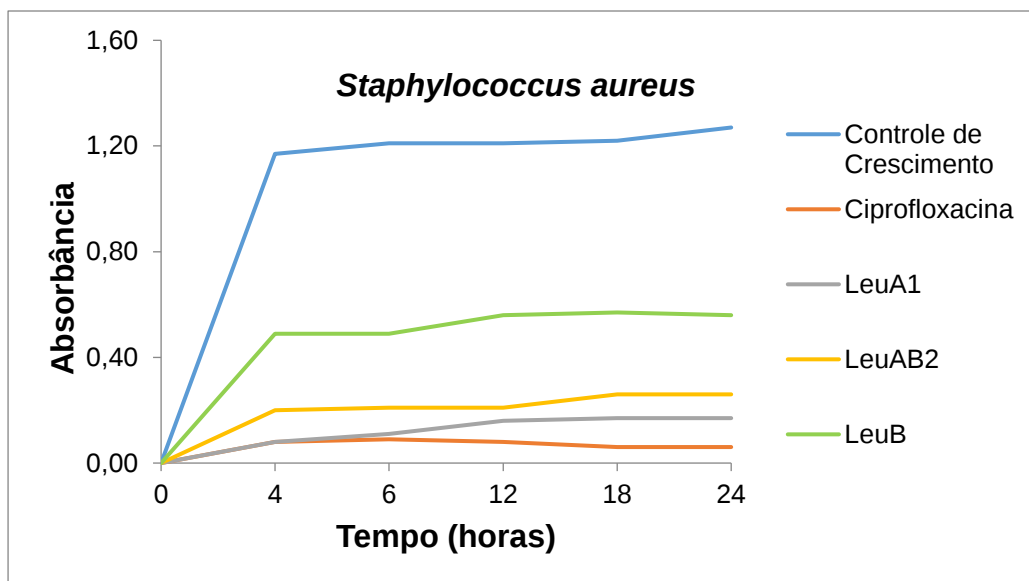
Fonte: Elaborado pela autora.

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)].



Fonte: Elaborado pela autora

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)].



Fonte: Elaborado pela autora.

Observa-se que os valores de absorbâncias, nos ensaios realizados com as bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* sorovar Typhimurium e *Pseudomonas aeruginosa* e para as bactérias Gram-positivas permaneceram constante até o final do tempo de amostragem, evidenciando um possível efeito bacteriostático para os análogos, LeuA1, LeuAB2 e LeuB, corroborando com os resultados da porcentagem de inibição de crescimento microbiano. Há indícios de que os peptídeos, tenham proporcionado um aumento do tempo de latência dos microrganismos, fase de intensa atividade metabólica, inibindo a produção de metabólitos, como enzimas, essenciais para o crescimento e multiplicação dos microrganismos. Esse fato minimizou a taxa de crescimento das bactérias, podendo ser eficiente para aumentar a vida de prateleira dos alimentos perecíveis, em decorrência do controle do crescimento microbiano.

A combinação dos peptídeos LeuB e LeuA1 apresentou efeito parcialmente sinérgico ($\Sigma CIF \leq 0,75$) como mostrado na tabela 11. O LeuB testado isoladamente apresentou 41 % e o LeuA1 79% de porcentagem de inibição e a concentração mínima inibitória foi de 150 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente. Quando testados em combinação apresentaram porcentagem de inibição de 72 % e 81 % e a concentração mínima inibitória foi de 52 µg/mL e 62 µg/mL, respectivamente.

Tabela 11. Efeito sinérgico dos análogos peptídicos LeuB e LeuA1 (400 µg/ml) frente *Listeria monocytogenes* pelo ensaio de Checkerboard. [Controle de crescimento: CMH + *Listeria monocytogenes*; ciprofloxacina (100µg/mL)].

Peptídeo	Porcentagem de Inibição (%)		CIF	ΣCIF	Resultado
	Concentração Mínima Inibitória (µg/mL)				
	Sozinho	Combinado			
LeuB	41 (150µg/mL)	72 (52µg/mL)	0,35	0,66	Parcialmente sinérgico
LeuA1	79 (200µg/mL)	81 (62µg/mL)	0,31		

CIF: Concentração Inibitória Fracionária. ICIF; Índice de Concentração Inibitória Fracionária.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nenhuma pesquisa que avalie o efeito sinérgico de peptídeos antimicrobianos análogos de leucocinas foi realizada até o momento, entretanto, há relatos na literatura sobre o efeito sinérgico de outras bacteriocinas e antimicrobianos. MARTINS (2013) observou o efeito sinérgico da combinação de óleos essenciais, nisina e nitrito de sódio em mortadelas sobre endósporos de *Clostridium perfringens* em que, houve um resultado satisfatório na redução do número de endósporos viáveis durante todo o período de armazenamento. PIMENTEL-FILHO et al. (2014), notaram que a combinação das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina apresentou um efeito sinérgico, pois inibiu o crescimento de *Listeria monocytogenes* em concentrações inferiores do que quando usadas isoladamente. SHI et al. (2017), ao realizarem o ensaio de checkerboard com o óleo essencial cinamaldeído e nisina, confirmaram a atividade sinérgica contra a bactéria *Staphylococcus aureus*. Estudos realizados por Arqués et al. (2008), a combinação de reuterina e da nisina teve efeito sinérgico sobre *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em leite.

Bacteriocinas tem ação nas chamadas tecnologias de barreiras, podendo ser utilizadas combinadas a outros tratamentos ou antimicrobianos na preservação de alimentos (PIMENTEL-FILHO, 2014). O uso de conservantes em alimentos que apresentem efeito sinérgico, seria útil para fazer associações de bacteriocinas com outros conservantes que já são amplamente utilizados na indústria de alimentos. Esta seria uma possível forma de evitar os problemas causados pelo excesso de nitritos e nitratos, impedindo desta forma que os conservantes se encontrem em grandes concentrações no organismo

(IAMARINO et al., 2015). Isso justificam as pesquisas para ampliar os estudos de efetividade das leucocinas adicionadas individualmente ou associadas, visando ampliar o controle de patógenos, para reduzir as doses dos conservantes.

5.3. Ensaio Antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante, pelo mecanismo de sequestro do radical ABTS, é um dos parâmetros para determinar o potencial de uma substância em inibir a oxidação. A oxidação de óleos e gorduras durante o processamento e estocagem de produtos alimentícios causa deterioração no sabor, textura, valor nutricional e vida útil, levando à produção de toxinas (DONG et al., 2010). Para suprir este problema de deterioração oxidativa em alimentos, aumentou-se a utilização de antioxidantes sintéticos como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG). Entretanto, o potencial tóxico desses antioxidantes em humanos, tem estimulado a busca por antioxidantes naturais. Neste sentido, se peptídeos com ação antimicrobiana apresentar também propriedade antioxidante, seria muito interessante para a indústria processadora de alimentos, haja visto que a ingestão alimentos que contenham esses compostos, não acarretam danos ao organismo humano, devido à reduzida toxicidade.

O análogo LeuA1 apresentou atividade antioxidante de 406 μMol em equivalentes ao Trolox, um análogo a vitamina E, enquanto que o LeuB e o LeuAB2 não apresentaram atividade antioxidante. Houve diferença significativa, entre a porcentagem de redução do radical ABTS para os análogos, em que o LeuA1 apresentou 24% (Tabela 12), de propriedade redutora em 400 $\mu\text{g/mL}$. O análogo LeuA1 possui em sua estrutura mais resíduos de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos como: triptofano e fenilalanina, respectivamente. O triptofano pode doar prótons aos radicais deficientes em elétrons e o seu grupo indol, serve como doador de hidrogênio.

Tabela 12. Atividade antioxidante dos análogos peptídicos LeuA1, LeuAB2 e LeuB (400 µg/ml) pelo método do radical ABTS⁺.

Peptídeos	% de Redução de ABTS
LeuA1	24 % B $\pm$ 0,47
LeuAB2	0 % B $\pm$ 0,07
LeuB	0 % A $\pm$ 0,65

- Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey 5%.

Fonte: Elaborado pela autora.

Esses resultados corroboram com GOMÉZ-RUIZ et al. (2008), que relataram que a histidina, leucina, prolina e fenilalanina como importantes inibidores da oxidação de ácido linoleico. Além de apresentar em sua estrutura aminoácidos que favorecem a atividade antioxidante o LeuA1 é mais hidrofóbico, evidenciando que a propriedade antioxidante é resultante de uma somatória de fatores relacionados à composição, estrutura e hidrofobicidade e não somente a ação peculiar dos aminoácidos. KIM et al. (2007), relataram que os aminoácidos hidrofóbicos atuam como antioxidantes, aumentando a solubilidade dos peptídeos em ambientes não polares facilitando assim uma melhor interação com os radicais livres. Nota-se ainda que o análogo LeuA1, que foi sintetizado levando-se em consideração algumas características estruturais das leucocinas A- e B-TA33a, unindo duas regiões distintas, apresentou além de atividade antimicrobiana satisfatória apresenta propriedade antioxidante.

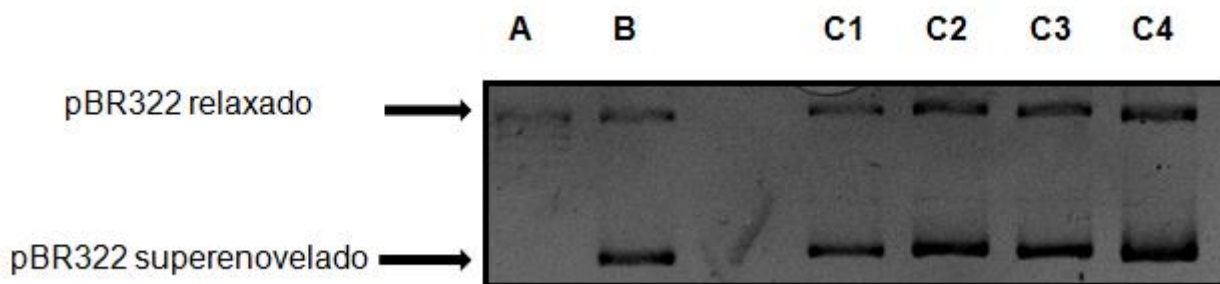
Embora o análogo LeuAB2, apresente em sua estrutura aminoácidos, que possam favorecer a propriedade antioxidante, o mesmo não apresenta propriedade antioxidante. Uma das hipóteses, para tal ocorrência, pode estar relacionada ao tamanho deste análogo que apresenta somente 14 resíduos de aminoácidos. Segundo ABEYRATHNE et al. (2016), a formação de pequenos peptídeos decorrentes do fracionamento de hidrolisados da ovomucina, ocasionou a diminuição da atividade antioxidante devido à redução no tamanho e modificação na sequência de aminoácidos. Embora vários estudos tenham sido realizados, o mecanismo responsável pela atividade antioxidante de peptídeos, não foi completamente elucidado. Os dados referentes à atividade antioxidante de peptídeos são escassos sendo necessários mais estudos para esclarecer tal mecanismo.

5.4. Ensaio de Inibição Enzimática

Presentes nos eucariotos e nos procariotos, as DNA topoisomerasas são um grupo de enzimas que possuem funções essenciais à viabilidade celular. São responsáveis por modulações topológicas no DNA, essenciais ao metabolismo celular (LOHNER & STRAUDEGGER, 2001). A sequência do DNA determina a constituição genética de um organismo, entretanto, são as relações topológicas dentro desta mesma molécula que modulam todas as funções fisiológicas do genoma (WANG, 2010).

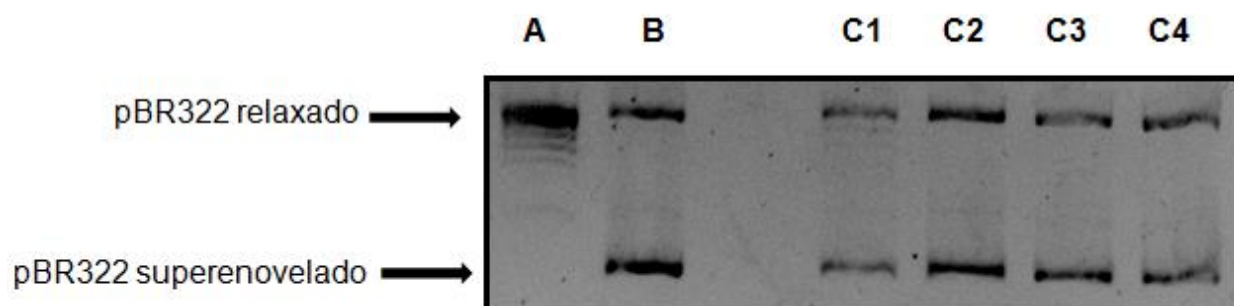
Os ensaios de inibição enzimática foram realizados com o intuito de avaliar a capacidade de inibição de cada peptídeo frente a DNA girase e a Topoisomerase IV, ambas bacterianas, as quais são descritos como excelentes alvos de ação para agentes antimicrobianos. O ensaio de eletroforese com DNA girase (Figuras 8, 9 e 10) revelou que os análogos LeuA1 e LeuAB2 não apresentam capacidade de inibição da enzima. Para o análogo LeuB, é possível observar que a inibição da atividade da DNA girase foi atingida a partir da concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, um valor bastante significativo comparado com outros peptídeos inibidores de DNA girase (TROVATTI e al., 2008).

Figura 8. 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 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.



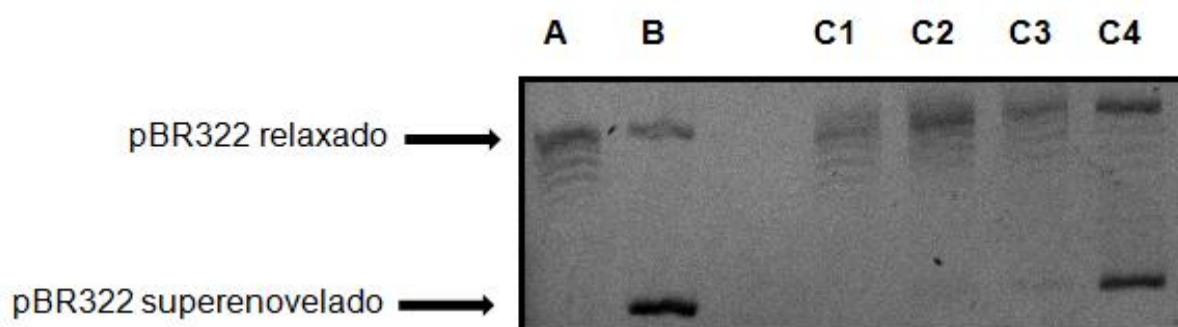
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 9. Inibição da atividade de superenovelamento da DNA pelo LeuAB2. Volume de reação de 30 μ L contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 relaxado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 relaxado e DNA girase (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBr322 relaxado, DNA girase (1U) e LeuAB2. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50 μ g/mL, respectivamente.



Fonte: Elabora pela autora.

Figura 10. Inibição da atividade de superenovelamento da DNA pelo LeuB. Volume de reação de 30 μ L contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 relaxado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 relaxado e DNA girase (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBr322 relaxado, DNA girase (1U) e LeuB. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50 μ g/mL, respectivamente.



Fonte: Elabora pela autora.

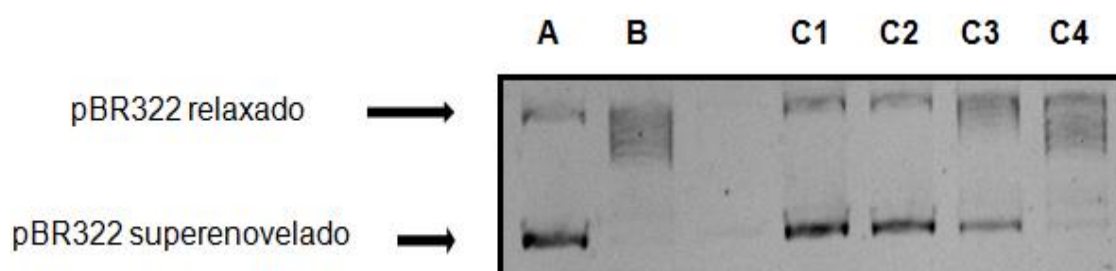
A enzima bacteriana DNA girase é responsável por controlar um processo bastante específico durante a replicação do DNA nas células. Além de compartilhar do mecanismo geral das topoisomerases, possui características de mecanismos especiais, que determinam sua habilidade única em introduzir super hélices negativas no DNA (TROVATTI et al., 2008). Tal reação de superenrolamento do DNA (torção da dupla hélice sobre seu próprio eixo) requer além de ATP, um cátion bivalente, tal como Mg^{2+} (MAXWELL, 1992). A capacidade da DNA girase em introduzir super hélices negativas em um anel ou loop do DNA relaxado, faz com que esta enzima desempenhe um papel essencial para os passos de iniciação e elongação durante a replicação do DNA,

bem como para os processos de condensação e segregação, sendo, portanto de fundamental importância para a manutenção celular (BARBOSA et al., 2012). Por ser a DNA girase uma enzima encontrada somente em organismos procariotos, sua importância, como alvo para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos é indiscutível, especialmente para aplicação como bioconservantes, que tem como propósito inibir o crescimento e a multiplicação celular de microrganismos de grande interesse na indústria de alimentos.

Em contraste à DNA girase, que possui maior atividade no superenovelamento negativo do DNA, a topoisomerase IV atua preferencialmente no relaxamento do DNA superenovelado positivamente, bem como no processo de desencadeamento do DNA. Assim, é evidente que a topoisomerase IV desempenhe também importante papel no processo de replicação e que a girase não deve ser o único alvo intracelular efetivo para os diversos agentes antimicrobianos, despertando-nos interesse em testar a atividade inibitória, dos análogos a leucocinas, frente à ação da topoisomerase IV. Para isso, a mesma técnica de eletroforese em gel de agarose foi utilizada, já que com ela é possível detectar alterações topológicas no DNA plasmídial, resultantes de reações catalisadas por esta enzima.

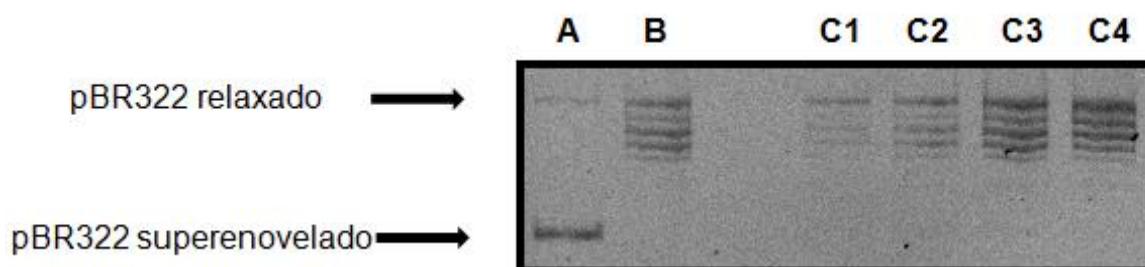
O ensaio de eletroforese com Topoisomerase IV (Figuras 11, 12 e 13) revelou os análogos LeuA1 e LeuB, apresentaram capacidade de inibir a enzima em concentrações a partir de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mas o análogo LeuAB2 não inibiu a enzima em nenhuma das concentrações testadas.

Figura 11. 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 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.



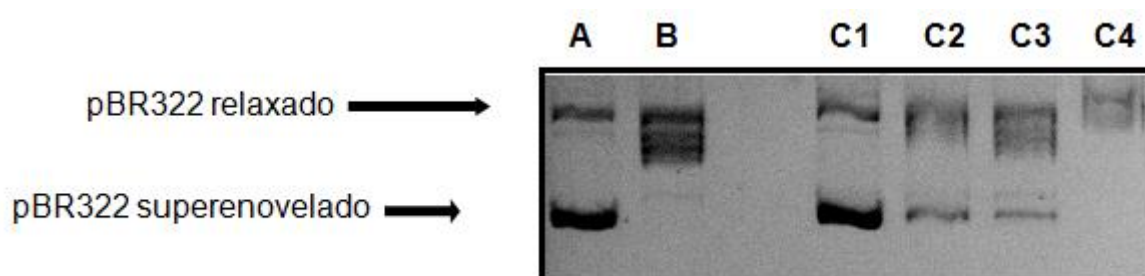
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 12. Inibição da atividade de relaxamento do DNA pelo LeuAB2. Volume de reação de 30 μ L contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 superenovelado e Topoisomerase IV (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBr322 superenovelado, Topoisomerase IV (1U) e LeuAB2. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50 μ g/mL, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 13. Inibição da atividade de relaxamento do DNA pelo LeuB. Volume de reação de 30 μ L contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 superenovelado e Topoisomerase IV (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBr322 superenovelado, Topoisomerase IV (1U) e LeuB. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações ensaiadas 200, 150, 100 e 50 μ g/mL, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

É interessante destacar que, além da atividade sobre membranas plasmáticas que as bacteriocinas apresentam, este trabalho demonstrou que outros alvos intracelulares também devem ser considerados como possíveis mecanismos de ação desta classe de moléculas. Um grande número de PAMs têm a capacidade de atravessar à membrana plasmática e interferir em uma grande variedade de processos biológicos, como o metabolismo de ácidos nucleicos, a síntese e enovelamento de proteínas, a síntese da parede celular, a alteração da membrana mitocondrial e a síntese de ATP/NADH, entre outros (ANDREU & RIVAS, 1998; PETERS et al., 2010).

A partir destes resultados preliminares, observam-se indícios de uma possível relação estrutura-atividade entre os peptídeos sintetizados. Embora o

mecanismo de ação não tenha sido completamente elucidado, há uma forte premissa de que, esses peptídeos análogos as Leucocinas, tenham alvos intracelulares podendo atuar em vias metabólicas. Estudos recentes relatam como algumas microcinas (Mcc) apresentam capacidade de interferir na síntese de DNA, RNA e proteínas: a MccB17 inibe a DNA-girase, a MccJ25 inibe a RNA polimerase e a MccC7-C51 inibe a aspartil-RNAt sintase. Há também exceções, como a MccE4492, que atua por meio da formação de poros em membranas (COTTER et al., 2013). Esses resultados estão de acordo com o ensaio de Time-Kill, em que se evidencia ação bacteriostática pelos peptídeos LeuB e LeuA1, em que os mesmos inibiram a enzima DNA Girase controlando o desenvolvimento bacteriano.

Conclui-se, portanto, que peptídeos inibidores da DNA girase também podem apresentar ação inibitória das reações catalisadas pela topoisomerase IV. É possível afirmar que o análogo LeuB foi o mais eficiente, uma vez que inibiu a reação de supernovelamento e relaxamento do DNA em uma menor concentração, resultando em eficiências inibitórias equivalentes para as duas enzimas. Esta característica é muito desejável, uma vez que estes compostos poderiam atuar como agentes antimicrobianos mais efetivos, capazes de inibir a ação de duas enzimas com perfis de atividade distintos, proporcionando maior conservação para o alimento e aumento de vida de prateleira.

5.5. Ensaio de Toxicidade dos Análogos em Células Eucarióticas

Com relação às características químicas e estruturais das bacteriocinas, há uma vasta informação, porém, são poucos os estudos que relatam sobre o potencial toxigênico desta classe de moléculas. Alguns estudos recentes têm comparado a relação atividade antimicrobiana *versus* citotoxicidade, principalmente quando a atividade do composto está relacionada ao mecanismo de formação de poros em membranas. Um exemplo é a listeriolisina O, produzida por estirpes de *Bacillus subtilis*, a qual apresenta atividade citotóxica para células eucarióticas de seres humanos (STACHOWIAK et. al., 2011).

Segundo FERMANIAN & WONG (2000), a hemolisina BL produzida por *Bacillus cereus* é composta de três proteínas distintas B, L1 e L2, as quais não são tóxicas individualmente, mas quando combinadas são hemolíticas, enterotoxigênicas, dermonecróticas e citotóxicas para vários tipos de células e

tecidos. O desenvolvimento de novos conservantes de alimentos requer necessariamente que eles não atuem nas células eucariotas. O ensaio de atividade hemolítica, cujo os resultados da porcentagem de hemólise, estão na Tabela 13, foi realizado com o intuito de investigar a toxicidade dos peptídeos. Neste estudo, foram utilizadas as concentrações de 200 µg/ml, 150 µg/ml, 100 µg/ml e 50 µg/ml para cada um dos peptídeos, LeuA1, LeuAB2 e LeuB.

Tabela 13. Porcentagem de hemólise dos análogos peptídicos LeuAB2, LeuA1 e LeuB nas diferentes concentrações (200, 150, 100 e 50 µg/ml) pelo ensaio hemolítico.

Concentração (µg/mL)	LeuAB2	LeuA1	LeuB
200	2,0 A $\pm$ 0,07	0,9 A $\pm$ 0,06	1,3 A $\pm$ 0,01
150	0,8 B $\pm$ 0,06	0,4 A $\pm$ 0,05	1,6 A $\pm$ 0,01
100	0,9 B $\pm$ 0,04	0,2 B $\pm$ 0,01	0,2 B $\pm$ 0,05
50	0,5 B $\pm$ 0,03	0,4 A $\pm$ 0,07	0,0 B $\pm$ 0,08

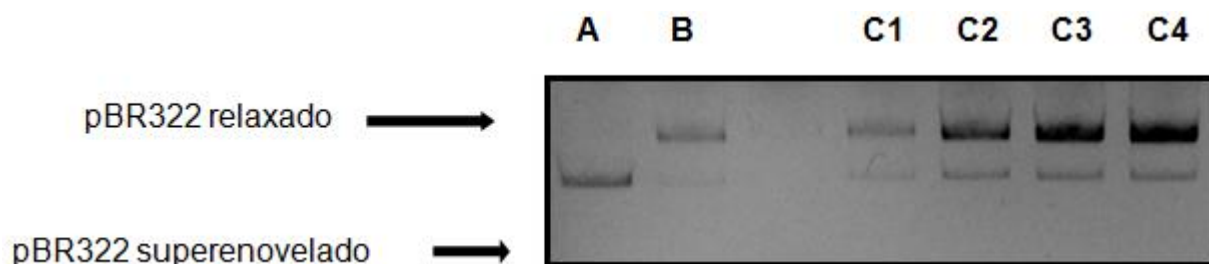
- Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem, na coluna, pelo teste de Tukey 5%.

Fonte: Elaborado pela autora

Como é possível observar, os valores de porcentagem de hemólise para ambos os análogos peptídicos foram no máximo de 2%, a uma concentração de 200 µg/ml. Além da citotoxicidade frente às hemácias, foi investigada a influência dos peptídeos antimicrobianos na inibição das topoisomerase I e topoisomerase II α , ambas enzimas da classe de topoisomerases humanas, mais um ponto de referência para a citotoxicidade em células eucarióticas. Assim como a topoisomerase IV bacteriana, as topoisomerases humanas citadas possuem a função de relaxamento do DNA. Sendo assim, as enzimas em contato com um DNA superenovelado, tende a torná-lo relaxado.

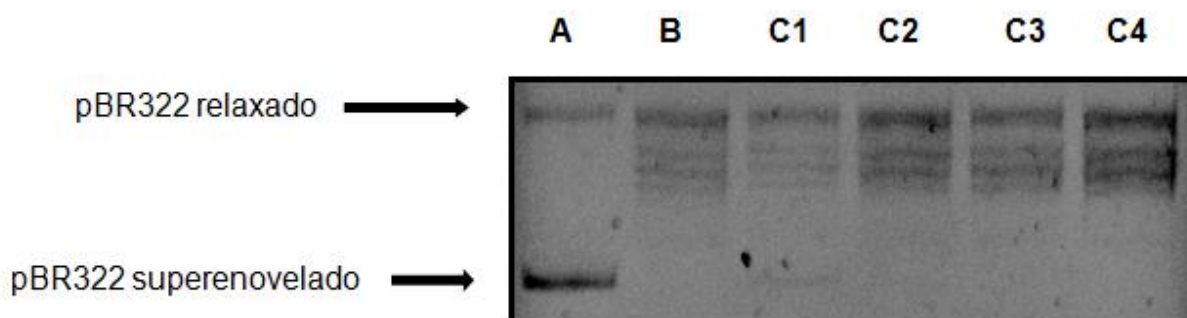
Nas figuras 14, 15 e 16, observa-se que os análogos LeuA1, LeuAB2 e LeuB, não apresentaram atividade de inibição da ação da topoisomerase I humana em nenhuma das concentrações testadas.

Figura 14. Ensaio de inibição enzimática com o LeuA1 em topoisomerase I humana. Volume de reação de 30 μ L 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 μ g/ml, respectivamente.



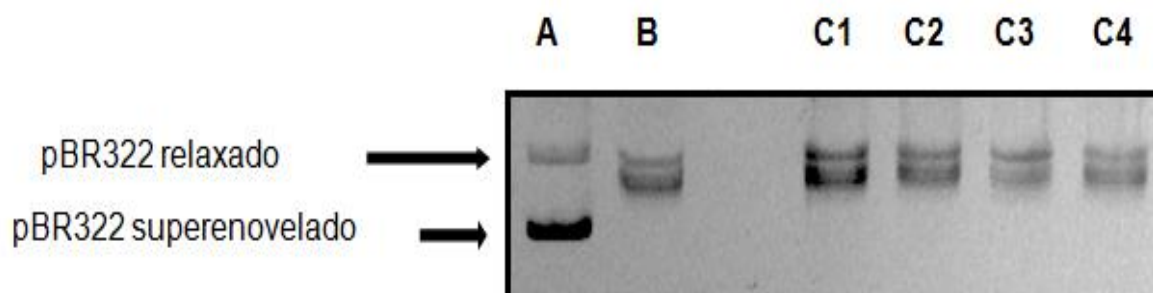
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 15. Ensaio de inibição enzimática com o LeuAB2 em topoisomerase I humana. Volume de reação de 30 μ L 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 μ g/ml, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

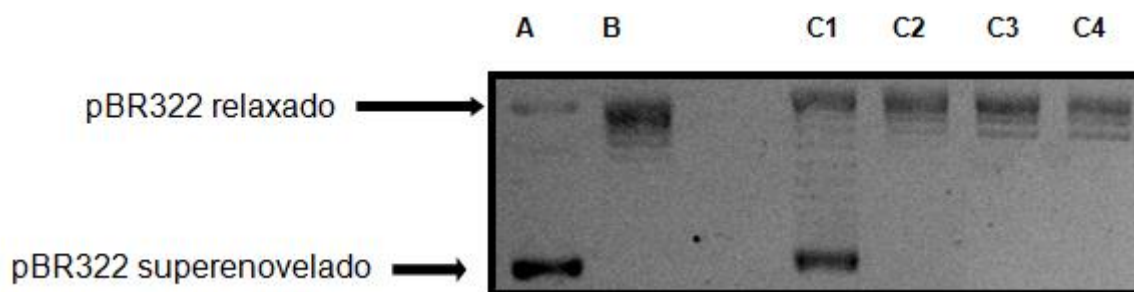
Figura 16. Ensaio de inibição enzimática com o LeuB em topoisomerase I humana. Volume de reação de 30 μ L contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 superenovelado e topoisomerase I (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBr322 superenovelado,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



Fonte: Elaborado pela autora.

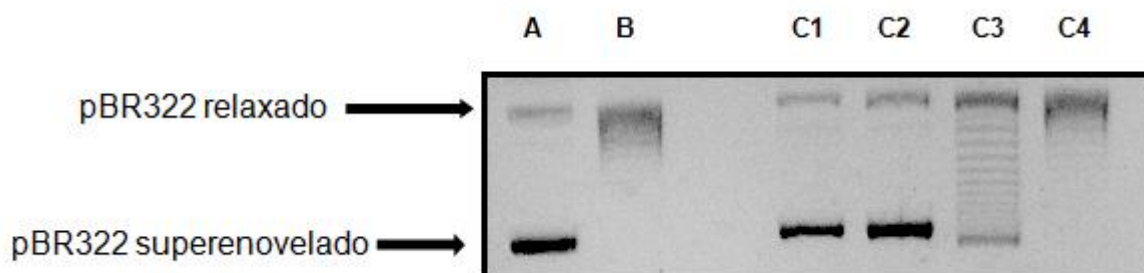
Observa-se nas figuras 17 e 18, que na concentração de 200 µg/ml os análogos LeuA1 e LeuB, inibiram a ação da enzima topoisomerase II α , porém, nas demais concentrações (200, 150 e 100 µg/ml) somente o análogo LeuAB2 (Figura 19) interferiu na ação desta enzima.

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



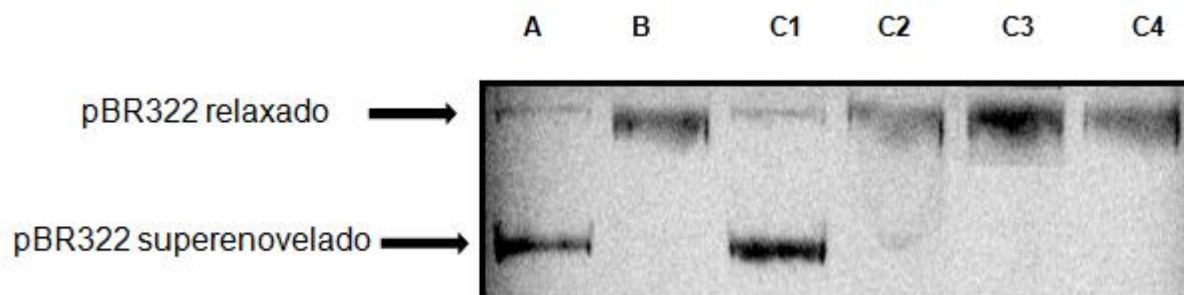
Fonte: Elaborado pela autora

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



Fonte: Elaborado pela autora.

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



Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com os resultados expostos acima, os análogos das leucocinas demonstraram potencial inibitório de topoisomerases bacterianas, porém não possuem significativa ação inibitória frente à topoisomerases humanas. Esta característica representa um grande potencial para aplicação desses compostos como bioconservantes de alimentos, pois agem especificamente em células bacterianas, não possuindo ação citotóxica significativa em células humanas, satisfazendo o objetivo dessa pesquisa.

5.6. Vazamento de Carboxifluoresceína

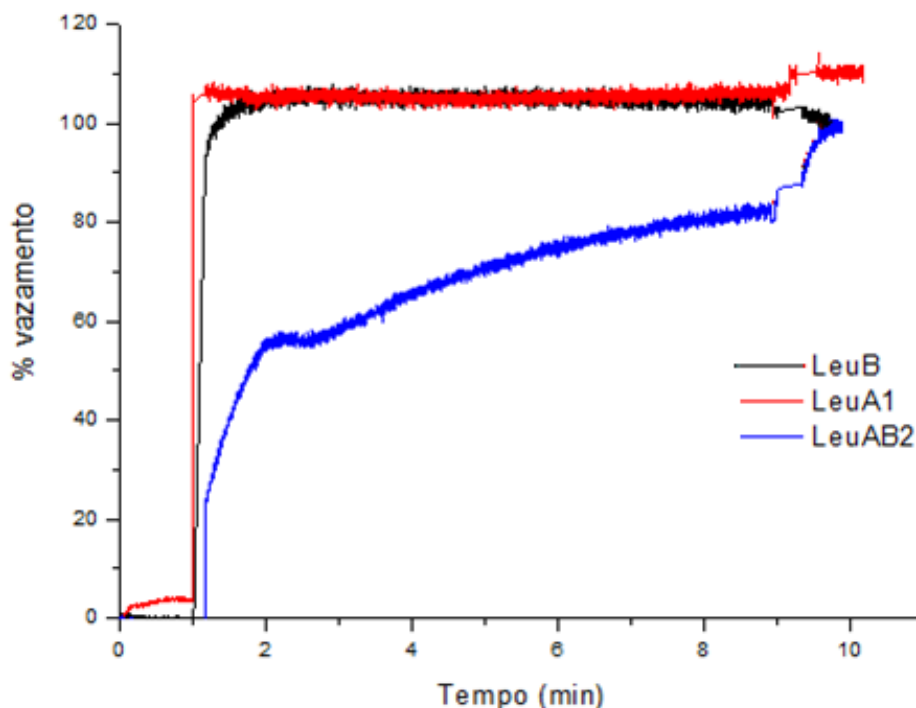
Neste ensaio, a carboxifluoresceína (CF), uma molécula fluorescente, é encapsulada em LUVs de diferentes composições lipídicas, as quais têm sido usadas para estudar a seletividade e o mecanismo de ação de PAMs. Desta forma, é possível monitorar o vazamento de CF do interior de membranas lipídicas, caso os peptídeos sejam capazes de formar poros nas membranas, levando-as a lise.

A afinidade de um determinado peptídeo por uma composição lipídica específica, pode ser estudada utilizando LUVs que possuam os principais lipídeos, que constituem as membranas procarióticas e eucarióticas (LORENZÓN et al., 2012).

LUVs com 75 % de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) e 25% de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (POPG), foram confeccionadas, com o intuito de mimetizar a composição de membranas de células procarióticas. Desta forma, acompanhou-se o vazamento de CF com o

objetivo de obter informações a respeito da possível interação dos peptídeos com miméticos de membrana e capacidade de formação de poros nas mesmas. Para isso, 20 µl da concentração de 6,25 µg/ml de peptídeos foram adicionados ao meio contendo as LUVs e monitorou-se a cinética de emissão de fluorescência referente à CF (Gráfico 6).

Gráfico 6. Permeabilização de LUVs de POPG/POPC (25/75) pelos análogos LeuB, LeuA1 e LeuAB2 a uma concentração de 6,25 µg/ml.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os peptídeos LeuB e LeuA1, atingiram 100% de vazamento de CF a concentração de 6,25 µg/ml, no primeiro minuto. No caso do peptídeo LeuAB2, o rompimento da membrana não ocorreu de imediato, o qual proporcionou o vazamento de CF aos poucos durante o tempo de corrida do experimento, em que aproximadamente aos 8 minutos houve uma porcentagem de vazamento em torno de 80%.

Os peptídeos LeuB e LeuA1 por apresentar carga líquida de +6,1 e +1,1 respectivamente, foram capazes de permeabilizar as vesículas LUVs e liberar 100% do fluoróforo CF em baixa concentração (6,25 µg/ml). Esse fato é explicado em decorrência da cationicidade contribuir principalmente para interagir com os componentes das membranas sintetizadas. Este resultado é

bastante interessante pois demonstra um segundo possível mecanismo de ação associado a este peptídeo. Como foi observado nos ensaios de inibição da atividade de topoisomerasas bacterianas, este peptídeo inibiu a ação tanto da DNA girase, quanto da Topo IV a partir da concentração de 100 μ M. Estes resultados podem contribuir em estudos futuros, onde pretendemos explorar mais as relações estruturais deste peptídeo com sua atividade antimicrobiana, tanto através da permeabilização de membranas, como também na inibição de topoisomerasas bacterianas.

No caso de LeuAB2, com uma carga líquida de +1,1, foi observado liberação gradativa de CF ao longo do tempo em que o experimento foi realizado, alcançando 80% de permeabilização. Essa liberação progressiva de CF detectada pode ter sido consequência de um fenômeno de formação de poros transitórios. Esse mecanismo culmina na perturbação seguida pela restabilização transitória da bicamada lipídica, nivelando assim a quantidade de fluoróforo extravasado em função do tempo a uma concentração constante do peptídeo (ARBUZOVA & SCHWARZ, 1999) fato este também encontrado em outros estudos (HUGONIN et al., 2006; MAGZOUN et al., 2005; MATSUZAKI et al., 1998). Estes poros transitórios podem permitir a penetração do peptídeo para o interior das LUVs. No entanto, se este for o possível mecanismo de penetração de LeuAB2 nas células bacterianas, certamente seu alvo intracelular não são as topoisomerasas, já que este peptídeo não demonstrou inibição de DNA girase e Topo IV. Portanto, para elucidar o mecanismo de ação deste peptídeo, são necessários outros estudos adicionais.

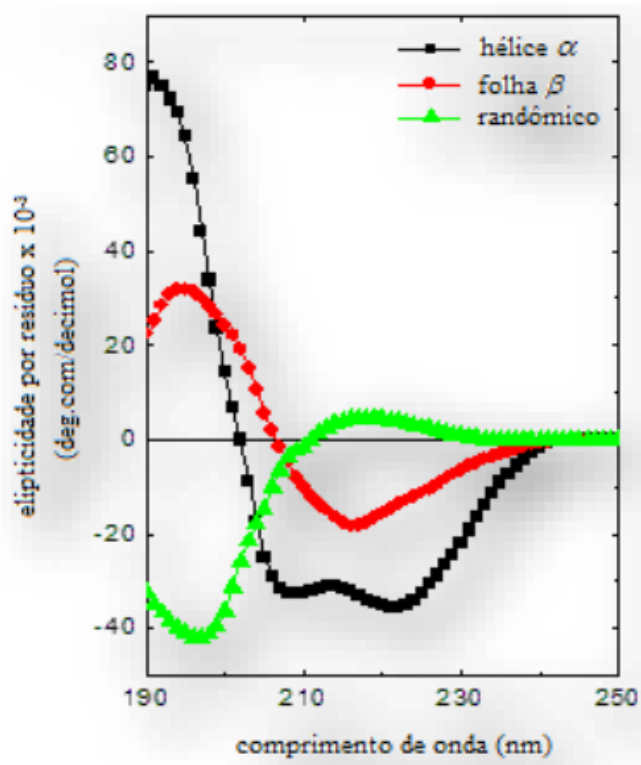
5.7. Dicroísmo Circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é uma das técnicas mais valiosas em estudos biofísicos envolvendo peptídeos e fornece importantes informações a respeito da conformação geral e do percentual de estrutura de biomoléculas livres em soluções aquosas ou também quando em interação com algum meio biomimético de membrana (BAKSHI et al., 2014). Como as informações obtidas por CD indicam as preferências conformacionais do peptídeo em um dado meio e como as análises são relativamente rápidas e demandam pequena quantidade de amostra, é prática comum utilizar essa

técnica para se investigar a estrutura secundária de peptídeos antimicrobianos (GUIMARÃES, 2017).

Os espectros característicos observados são: bandas negativas a 222 nm e 208 nm e uma banda positiva em 193 nm para cadeias polipeptídicas estruturadas em α -hélice; bandas negativas a 218 nm e positiva a 195 nm para folha β ; e para estruturas randômicas que possuem uma elipticidade baixa acima de 210 nm e bandas negativas próximas de 195 nm (Figura 20) (GREENFIELD & FASMAN, 1969; GREENFIELD, 2006).

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

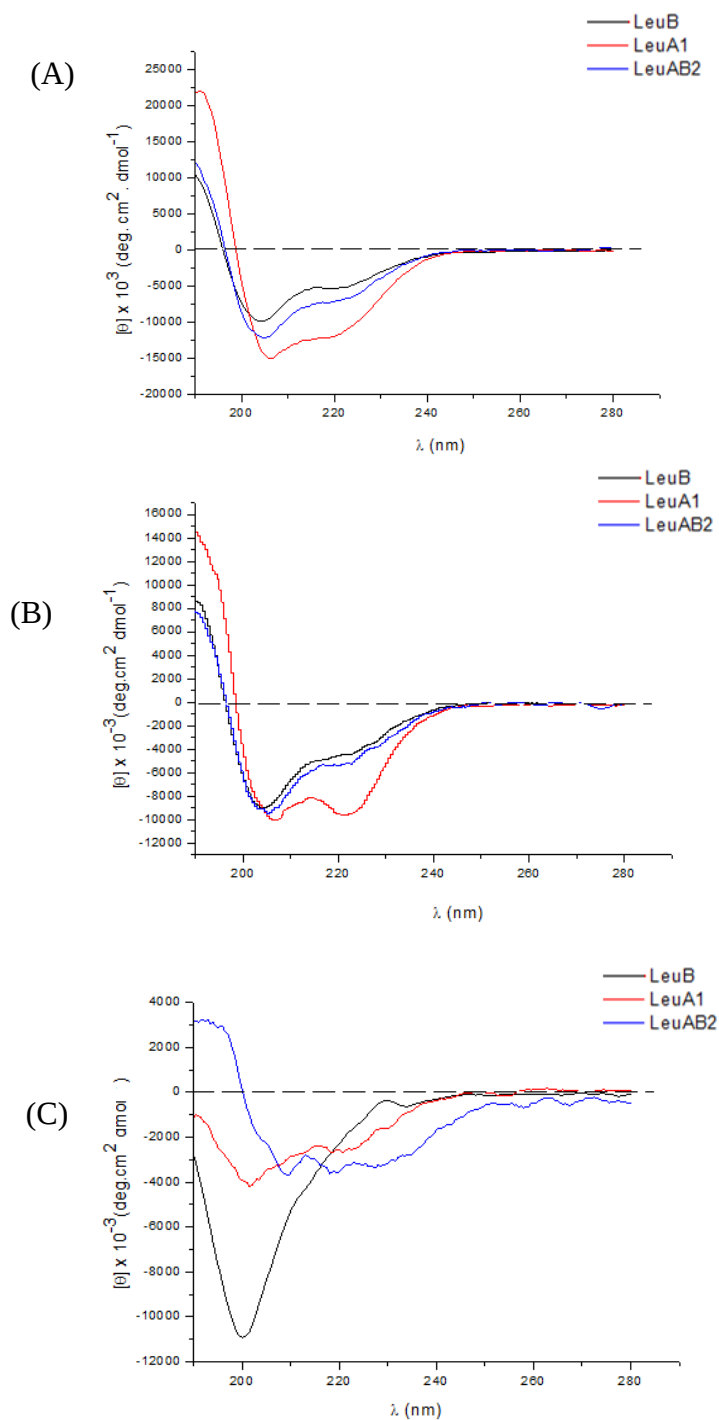


Fonte: GREENFIELD & FASMAN (1969).

Do ponto de vista estrutural, os ensaios por dicroísmo circular na presença de TFE 60% (v/v) e SDS 25 mM, indicam que os resíduos dos peptídeos desenvolvidos neste trabalho, participam preferencialmente de conformação em α -hélice (Figura 19A e B). Os presentes resultados corroboram com SILVA (2017), em que ao estudar peptídeos derivados de leucocinas verificou que os mesmos tendem a se estruturar em α -hélice em TFE 60% (v/v) e SDS. MULLER et al. (2007) ao estudarem a plantaricina, uma bacteriocina produzida por bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus* muito utilizada na preservação de alimentos, confirmou que a mesma é capaz de formar uma hélice anfipática, ao

interagir com os componentes da membrana induzindo alterações conformacionais.

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



Fonte: Elaborado pela autora.

Na presença de TFE (Figura 21A) e SDS (Figura 21B), ambos os peptídeos LeuB, LeuA1 e LeuAB2 apresentam uma tendência em formar uma

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 α -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 α -hélice, fato esse que explica a possível interação dos peptídeos LeuB e LeuA1 com as enzimas DNA Girase e Topoisomerase IV.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando que este estudo é inédito, o que comprova a concessão do depósito do pedido de patente de invenção junto ao INPI (BR 10 2017 004956-6), os peptídeos estudados se mostraram promissores para aplicação como conservantes de alimentos. Desta forma, pretende-se realizar estudos futuros mais aprofundados para elucidar outros mecanismos de ação e ação sinérgica, ampliando o espectro de ação destes conjugados de bacteriocinas. Além de estudar o desenvolvimento de filmes contendo compostos bioativos, como os análogos peptídicos derivados de leucocinas, para o desenvolvimento de embalagens bioativas, a fim de controlar a contaminação dos alimentos e permitir um aumento da vida útil dos alimentos. Esta possibilidade deve-se ao fato dos peptídeos desenvolvidos neste trabalho terem sido classificados como bacteriostático podendo, portanto, controlar o crescimento dos microrganismos naturalmente encontrados em alimentos.

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 hydrolisates 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.; KIHALL, 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 CÁRNEOS 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^{•+}** 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.; GRANIKA, L. H.; WISNIEWSKI, J.; LYSNIAK, M.; KAWIAK, J.; BIELICKI, J. Citotoxicity of listeriolysin o produced by membrane encapsulated *Bacillus subtilis* on leukemia cells. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 1193-1198, 2011.

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.