

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Estudo da relação estrutural e atividade antimicrobiana da Leucocina C-TA33a de
Leuconostoc mesenteroides TA33a

LEONARDO ALVES DOS SANTOS

Araraquara
2019

LEONARDO ALVES DOS SANTOS

Estudo da relação estrutural e atividade antimicrobiana da Leucocina C-TA33a de
Leuconostoc mesenteroides TA33a

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

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Araraquara
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

S237e Santos, Leonardo Alves dos
Estudo da relação estrutural e atividade antimicrobiana da Leucocina C-TA33a de *Leuconostoc mesenteroides* TA33a / Leonardo Alves dos Santos. – Araraquara-SP : [s.n.], 2019
84 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Saulo Santesso Garrido

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Estudo da relação estrutural e atividade antimicrobiana da Leuococina C-TA33a de *Leuconostoc mesenteroides* TA33a"

AUTOR: LEONARDO ALVES DOS SANTOS

ORIENTADOR: SAULO SANTESSO GARRIDO

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



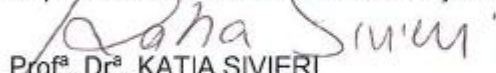
Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO

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



Profa. Dra. DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI

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



Profª. Drª. KATIA SIVIERI

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

Araraquara, 31 de julho de 2019

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Leonardo Alves dos Santos

Nome em citações bibliográficas: SANTOS, L.A.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

UNESP- Instituto de Química (IQ - UNESP) Rua Prof. Francisco Degni, 55,
Araraquara -SP- Brasil - CEP: 14800060.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2017

Mestrado em Biotecnologia.

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

Orientador: Saulo Santesso Garrido.

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

Grande área: Ciências Biológicas.

2010-2015

Graduação em Engenharia em Bioprocessos e Biotecnologia.

Universidade Federal do Tocantins, UFT, Brasil.

Título: Desenvolvimento de um banco de dados estrutural de proteínas
pertencentes ao grupo do fator de início de tradução de eucariotos 5A (EIF5A)
e suas enzimas relacionadas.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Wagner de Souza Aguiar

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2014-2014

ILUNO. (Carga horária: 504h).

University of Nebraska at Omaha, UNO, Estados Unidos.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigo científico publicado

BARBOSA, L. C. B.; **SANTOS, L. A.**; FERREIRA, J. S.; VIANA, K. F.; CANGUSSU, A. S. R.; AGUIAR, R. W. S. A web-based resource for structural information on eIF5A and its related proteins: new potential therapeutic targets in many human disorders. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 6, p. 610-612, 2014.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Santos, L.A.; Silva, E.M. Prospeção de Fungos Lipolíticos do Estado do Tocantins. In: IX Seminário de Iniciação Científica da UFT, Palmas, 2013.

Santos, L.A.; Marchetto, R.; Garrido, S.S. Study of structural relation and antimicrobial activity of Leucocin C-TA33a of *Leuconostoc mesenteroides* TA33a. In: 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Águas de Lindóia, 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter dado a mim essa oportunidade de crescimento pessoal e profissional, à minha família que mesmo de longe sempre me apoiou nas minhas escolhas, dificuldades e desafios, principalmente à minha irmã Letícia e minha mãe Maria por me ajudarem até aqui nesse longo percurso de formação e trabalho, sem vocês duas meus esforços não teriam sentido algum, muito obrigado mesmo.

Agradeço ao meu orientador Saulo por permitir que fosse orientado por ele. Muito obrigado pelo tempo disponível em tirar minhas dúvidas e me ajudar em meu trabalho. Sem dúvida nenhuma você é um exemplo pra mim não só como profissional, mas também como ser humano, espero lembrar sempre do seu exemplo como professor, orientador, pai e como pessoa e levar esses valores adiante em minha vida.

Muito obrigado aos meus amigos e colegas de laboratório que sempre se dispuseram em me ajudar em minhas dúvidas e procedimentos, sem a ajuda de vocês nada disso seria possível de realizar. Também agradeço aos momentos compartilhados e por fazerem dessa difícil vida de pós-graduação e ciência um caminho mais divertido e suave de se seguir.

Muito obrigado aos meus amigos de longa data por me apoiarem até aqui em minha escolha nessa jornada de pós-graduação e pela disposição em me escutar em momentos difíceis.

Muito obrigado ao Instituto de Química pela estrutura, técnicos, professores e todo auxílio que me prestaram durante toda a minha jornada durante meu mestrado, sem essa ajuda nada do proposto aqui seria viável e possível.

Meu muito obrigado, em especial, à seção técnica de Pós-Graduação pela prestatividade e atenção que me foi concedida durante todo período de desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigado ao meu órgão financiador, CNPq, pela bolsa concedida.

*“O impossível existe até que alguém
duvide dele e prove o contrário”*

Albert Einstein

RESUMO

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são uma alternativa interessante como bioconservantes de alimentos devido a sua eficiência e, principalmente, à baixa toxicidade quando comparados aos conservantes químicos tradicionais. As bacteriocinas, uma classe de PAMs, têm atividade antimicrobiana em espécies responsáveis pela degradação de alimentos e, portanto, atualmente são exploradas como bioconservadores. A Leucocina C-TA33a (LeuC), um tipo de bacteriocina produzida pela cepa bacteriana *Leuconostoc mesenteroides* TA33a, é conhecida por ter um amplo espectro antimicrobiano. Estudos de alinhamento da estrutura primária de diferentes bacteriocinas revelaram que LeuC conserva em sua estrutura regiões homólogas também compartilhadas por outras bacteriocinas, como Sacacina P, Bavaricina A e Enterocina A, possivelmente revelando uma importante relação entre essas sequências de aminoácidos e suas atividades antimicrobianas. Este estudo tem como objetivo sintetizar diferentes peptídeos baseados na estrutura primária da Leucocina C-TA33a, a fim de identificar as principais regiões responsáveis pela atividade antimicrobiana. Os peptídeos LeuC-Nt, LeuC-0Cys, LeuC-Ala9, LeuC-Ala14 e LeuC-Cys9,14 foram sintetizados por metodologia de fase sólida, purificados e analisados por HPLC e caracterizados por ESI-MS. Ensaios em meio líquido foram realizados para a determinação do percentual de inibição de crescimento microbianos dos peptídeos sobre espécies patogênicas. Os micro-organismos testados foram *Salmonella* sorotipo Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Também foram realizados estudos por dicroísmo circular, modelagem molecular e ensaios de citotoxicidade para a determinação da estrutura secundária e segurança na aplicação desses peptídeos como possíveis conservantes de alimentos. Os resultados demonstraram uma geral estruturação randômica e possível estruturação em folha β e que para uma boa atividade antimicrobiana, a ação em conjunto da extremidade N-terminal catiônica e uma região intermediária e C-terminal hidrofóbicas, além da presença das duas cisteínas na constituição, em alguns casos, promove uma boa ação de inibição. Tais informações mostram que essas características influenciam na atividade dos peptídeos e que a baixa citotoxicidade demonstrada pelos mesmos permite a possível utilização de tais análogos como bioconservantes de alimentos.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos. Doenças transmitidas por alimentos. Bactérias ácido-láticas. Bacteriocinas. Bioconservação de alimentos.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (PAMs) are an interesting alternative, because biopreservatives present high efficiency and low toxicity when compared to classic preservatives. Bacteriocins, a class of PAMs, have antimicrobial activity in species responsible for food degradation and are currently being exploited as biopreservatives. The Leucocin C-TA33a (LeuC), a type of bacteriocin, is produced by the *Leuconostoc mesenteroides* TA33a strain and is known for a broad antimicrobial spectrum. Studies of alignment of the primary structure of different bacteriocins revealed that LeuC retains in its structure homologous regions also shared by other bacteriocins, such as Sacacin P, Bavaricin A and Enterocin A, possibly revealing an important relationship between these amino acid sequences and their antimicrobial activities. This study aims to synthesize different peptides based on the primary structure of Leucocin C-TA33a, with the objective of identifying the main regions responsible for antimicrobial activity. The peptides LeuC-Nt, LeuC-0Cys, LeuC-Ala9, LeuC-Ala14 and LeuC-Cys9,14 were synthesized by solid phase methodology, purified by HPLC and characterized by ESI-MS. Liquid assays were performed to determine the percentage of inhibition of microorganisms of the peptides on pathogenic species. The microorganisms tested were *Salmonella* serotype Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. Studies were also conducted through circular dichroism, molecular modeling and cytotoxicity assays for the determination of the secondary structure and safety in the application of these peptides as possible food preservatives. The results demonstrated a general random structuring and possible structuring in α -helix and for a good antimicrobial activity, the joint action of the cationic N-terminal region and an intermediate and C-terminal hydrophobic regions, in addition to the presence of the two cysteines in the constitution in some cases, promote a good action of inhibition. These characteristics influence the activity of peptides and the low cytotoxicity demonstrated by them allows the possible use of such analogs as food biopreservatives.

Keywords: Antimicrobials peptides. Foodborne diseases. Acid latic bacteria. Bacteriocins. Food bioconservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modo de ação geral das bacteriocinas.....	29
Figura 2 - Modelo de formação de poros nas membranas bacterianas sobre ação de bacteriocinas de classe I e II..	31
Figura 3 - Esquema comparativo por alinhamento múltiplo entre as diferentes sequências primárias de bacteriocinas da classe IIa.	36
Figura 4 - Estrutura primária dos peptídeos análogos (LeuC-Nt, LeuC-OCys, LeuC-Ala14, LeuC-Ala9 e LeuC-Cys9,14) e do peptídeo de origem (LeuC-TA33a).	38
Figura 5 - Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS).	39
Figura 6 - Ciclo de inserção de um novo aminoácido seguindo a estratégia Fmoc durante a Síntese de Peptídeos em Fase Sólida.	40
Figura 7 - Fluxograma da síntese em paralelo dos cinco peptídeos análogos.	43
Figura 8 - Cromatogramas referentes aos peptídeos no estado bruto: (A) LeuC-Cys9,14; (B) LeuC-Ala9; (C) LeuC-Ala14; (D) LeuC-OCys e (E) LeuC-Nt.	52
Figura 9 - Cromatogramas referentes aos peptídeos purificados: (A) LeuC-Cys9,14; (B) LeuC-Ala9; (C) LeuC-Ala14 e (D) LeuC-OCys.	53
Figura 10 - Espectro de massa do peptídeo LeuC-OCys purificado.	54
Figura 11 - Espectros de dicroísmo circular das principais estruturas secundárias observadas em proteínas e peptídeos.	63
Figura 12 - Gráficos referentes aos espectros por dicroísmo circular do comportamento estrutural do peptídeo LeuC-Nt nos meios tampão fosfato (A), SDS (B) e TFE 60% (C).	64
Figura 13 - Gráficos referentes aos espectros por dicroísmo circular do comportamento estrutural do peptídeo LeuC-OCys nos meios tampão fosfato (A), SDS (B) e TFE 60% (C).	64
Figura 14 - Gráficos referentes aos espectros por dicroísmo circular do comportamento estrutural do peptídeo LeuC-Ala9 nos meios tampão fosfato (A), SDS (B) e TFE 60% (C).	65
Figura 15 - Gráficos referentes aos espectros por dicroísmo circular do comportamento estrutural do peptídeo LeuC-Cys9,14 nos meios tampão fosfato (A), SDS (B) e TFE 60% (C).	65

Figura 16 - Modelagem molecular dos peptídeos LeuC-Nt (A), LeuC-OCys (B), LeuC-Ala9 (C) e LeuC-Cys9,14 (D)..... 67

Figura 17 - Escala hidrofílica e hidrofóbica de cada resíduo constituintes dos peptídeos LeuC-Nt (A), LeuC-OCys (B), LeuC-Ala9 (C) e LeuC-Cys9,14 (D). . 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da solução de reação para o processo de clivagem..	44
Tabela 2 - Massa Molecular teórica e experimental dos peptídeos análogos sintetizados.	54
Tabela 3 - Percentuais de inibição referentes os ensaios do peptídeo análogo LeuC-Cys9,14 contra <i>Salmonella</i> sorotipo Typhimurium, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7 e <i>Listeria monocytogenes</i>	56
Tabela 4 - Percentuais de inibição obtidos os ensaios do peptídeo análogo LeuC-Ala9 contra <i>Salmonella</i> sorotipo Typhimurium, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7 e <i>Listeria monocytogenes</i>	56
Tabela 5 - Percentuais de inibição obtidos os ensaios do peptídeo análogo LeuC-OCys contra <i>Salmonella</i> sorotipo Typhimurium, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7 e <i>Listeria monocytogenes</i>	57
Tabela 6 - Percentuais de inibição obtidos os ensaios do peptídeo análogo LeuC-Nt contra <i>Salmonella</i> sorotipo Typhimurium, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7 e <i>Listeria monocytogenes</i>	57
Tabela 7 - Percentuais de atividade hemolítica dos peptídeos análogos LeuC-Nt, LeuC-OCys, LeuC-Ala9 e LeuC-Cys9,14.	61
Tabela 8 - Características físico-químicas dos peptídeos análogos sintetizados.	68

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

1. Aminoácidos

A – Alanina

C – Cisteína

D – Aspartato

G - Glicina

H – Histidina

I – Isoleucina

K - Lisina

L – Leucina

M – Metionina

N – Asparagina

S – Serina

T – Treonina

V – Valina

W - Triptofano

Y – Tirosina

2. Outras

AA - Aminoácido

ACN - Acetonitrila

ANOVA - Analysis Of Variance (Análise de Variância)

ATCC - American Type Culture Collection

ATP – Adenosina Trifosfato

BAL - Bactérias ácido lácticas

CD - Circular Dichroism (Espectrometria de Dicroísmo Circular)

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DCM - Diclorometano

DIC - N,N-diisopropilcarbodiimida

DIEA - N-Etildiisopropilamina

DMF - N,N – Dimetilformamida

DTAs - Doenças transmitidas por alimentos

EDT - 1, 2-Etanoditiol

EDTA - Ácido etileno-diamino-tetra-acético

EUA – Estados Unidos da América

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)

Fmoc - 9- Fluorenilmetiloxycarbonila

FPM - Força Próton-Motriz

FR – Fase Reversa

GRAS - Generally Recognized As Safe (Geralmente Reconhecido Como Seguro)

HBTU - (O-Benzotriazolil-N,N,N,N-tetrametiluronio-hexafluorofosfato)

HEPES - Ácido Hidroxi-Etil-Piperazina-Etano-Sulfônico

HOBt - N-Hidroxibenzotriazol

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

LC/ESI-MS - Liquid Chromatography coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massas com Ionização por Eletrospray)

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAM – Peptídeo Antimicrobiano

PBS - Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)

RPM – Rotações Por Minuto

SDS - Docecil Sulfato de Sódio

SPFS - Síntese de Peptídeos em Fase Sólida

TFA - Ácido Trifluoracético

TFE - 2,2,2-Trifluoroetanol

TIS - Triisopropilsilano

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UV – Ultravioleta

VIS – Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Doenças Transmitidas por alimentos (DTAs)	17
1.2	Bacteriocinas	23
1.2.1	Bactérias ácido-láticas (BALs)	23
1.2.2	Definição e histórico	24
1.2.3	Classificação	25
1.2.4	Modo de ação	29
1.2.5	Aplicações	32
1.2.6	Leucocinas	34
2	OBJETIVOS	37
3	METODOLOGIA.....	38
3.1	Design.....	38
3.2	Síntese	39
3.3	Clivagem.....	44
3.4	Purificação e caracterização	45
3.5	Ensaio de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido. 46	
3.6	Cálculo da viabilidade dos micro-organismos	47
3.7	Ensaio de toxicidade dos peptídeos: estudos de atividade hemolítica.....	48
3.8	Dicroísmo Circular.....	49
3.9	Modelagem Molecular e caracterização físico-química	50
3.10	Análise estatística.....	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	Síntese, purificação e caracterização	52
4.2	Desempenho dos peptídeos análogos quanto à inibição de crescimento microbiano	55
4.3	Ensaio de toxicidade dos peptídeos: estudos de atividade hemolítica.....	60
4.4	Dicroísmo Circular.....	62
4.5	Modelagem Molecular e Análise Físico-Química.....	67

4.6	Comparação entre os peptídeos análogos sem cisteína no quesito estrutura/atividade antimicrobiana.....	70
4.7	Comparação entre os peptídeos análogos com cisteína no quesito estrutura/atividade antimicrobiana.....	72
4.8	Comparação entre todos os peptídeos análogos no quesito estrutura/atividade antimicrobiana.....	73
5	CONCLUSÕES	77
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	78
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Transmitidas por alimentos (DTAs)

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são uma das maiores causas de morbidades e estão entre as preocupações mais graves e dispendiosas de saúde pública em todo o mundo (SANTANA, 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015), uma em cada dez pessoas no mundo apresenta algum tipo de enfermidade relacionada à ingestão de alimentos contaminados. Essas enfermidades podem ser muitas vezes fatais, cerca de 420.000 pessoas em todo o mundo morrem devido a essas doenças, onde aproximadamente um terço desse número corresponde a crianças com idade abaixo de cinco anos. De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015) 48 milhões de americanos ficam doentes devido às DTAs, 128.000 são hospitalizados e cerca de 3.000 morrem todos os anos devidos às DTAs, o que mostra que tais doenças não são um problema exclusivo de países em desenvolvimento.

Além do prejuízo humano, estima-se que em países como os EUA, os gastos com medicamentos, internamentos de pacientes e perdas com queda na produtividade devido à ausência dos trabalhadores doentes esteja na faixa de 5 a 17 bilhões de dólares por ano. O Departamento de Agricultura do mesmo país, no ano 2000, estimou que esses patógenos causaram um prejuízo de cerca de 6,9 bilhões de dólares aos cofres públicos daquele país durante esse período (SANTANA, 2010).

Alguns dos fatores que podem explicar o aumento das DTAs são o aumento da população, o aumento do grupo de pessoas vulneráveis a esse tipo de mazela (crianças, idosos, gestantes e imunocomprometidos), a expansão do mercado de consumo, a globalização econômica, a mudança nos hábitos alimentares da população e o aumento do consumo de produtos industrializados ou que são produzidos fora do ambiente caseiro, como por exemplo, em restaurantes (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SANTANA, 2010; SHINOHARA *et al.*, 2008).

Os surtos de doenças transmitidas por alimentos podem ser identificados quando uma ou mais pessoas desenvolvem alguns sintomas similares, após a

ingestão de alimentos de mesma procedência que possuem algum tipo de patógeno ou toxina produzida por um micro-organismo (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Os alimentos contaminados por agentes biológicos são a maior causa dessas afecções (VAN AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2007). Tais alimentos contaminados podem apresentar odor e sabor normais devido à dose de infectante ser menor do que a necessária para degradar os mesmos (OLIVEIRA *et al.*, 2010), o que faz com que a pessoa que os consuma não esteja ciente dos perigos de se ingerir tais alimentos, não conseguindo identificar o que poderia estar contaminado em suas refeições. Alguns dos sintomas que resultam dessa ingestão e, conseqüentemente, da evolução do quadro clínico do desenvolvimento dessas doenças são dor de estômago, náuseas, vômitos, diarreia e febre por um determinado período (VAN AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2007).

Infelizmente, os casos que são notificados são bem inferiores aos números de casos reais dessas enfermidades (SANTANA, 2010), principalmente no Brasil, onde há falhas no sistema de notificação e fiscalização (SHINOHARA *et al.*, 2008). Além disso, muitos casos não são notificados devido aos seus sintomas serem parecidos com gripes ou por provocar vômitos e diarreias que por vezes possuem aspectos brandos (VAN AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2007).

Existem aproximadamente 250 tipos de DTAs (OLIVEIRA *et al.*, 2010) e muitas são causadas por micro-organismos como bactérias, fungos, protozoários e vírus. Dentre estes, as bactérias, devido à sua diversidade e a grande presença de espécies patogênicas nesse grupo, correspondem ao maior percentual de micro-organismos associados às DTAs (OLIVEIRA *et al.*, 2010; PINTO, 1996). Mesmo com técnicas de higiene, segurança e tecnologias modernas, as DTAs causadas principalmente por essas bactérias patogênicas aumentaram na última década. Exemplos são as bactérias do gênero *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp, *Listeria* spp (GARCÍA *et al.*, 2010), *Clostridium* spp, *Staphylococcus* spp e *Bacillus* spp, além de alguns patógenos alimentares psicrótrófos, como a *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Aeromonas hydrophila* que emergiram devido ao aumento do consumo de produtos refrigerados (MOTLAGH; JOHNSON; RAY, 2016).

No Brasil, mesmo com a grande ocorrência de subnotificação, é possível perceber com os dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde que os maiores agentes etiológicos identificados em surtos de DTAs no país no período de 2009 a 2018 são as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* spp e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2019). Tendo em vista essa informação, um rápido panorama sobre essas bactérias e a sua atuação como patógenos mostra o impacto das mesmas quanto à ocorrência dessas doenças de origem alimentar, especialmente no Brasil.

Bactérias do gênero *Salmonella* spp são as bactérias que causam o maior impacto na economia e na saúde pública no mundo, devido à sua endemicidade, alta morbidade e pela dificuldade de aplicação de uma medida no seu controle (SHINOHARA *et al.*, 2008). Estima-se que tais bactérias provoquem cerca de 93,8 milhões de casos de gastroenterite e 155 mil mortes por ano no mundo (ALMEIDA *et al.*, 2018). Para se ter uma ideia, somente as bactérias desse gênero possuem em torno de 2.400 sorotipos patogênicos para o ser humano (BALBANI; BUTUGAN, 2001).

Tais bactérias Gram-negativas da família das *Enterobacteriaceae* possuem foco de infecção em fezes humanas e de animais, pois são normalmente encontradas no trato intestinal de aves, mamíferos e répteis (PINTO, 1996). Alimentos crus como leite e carne que entram em contato com as fezes contendo esses patógenos podem ser contaminados. Devido ao fato dessas bactérias do gênero *Salmonella* spp possuírem uma dose infectante que varia de dez a milhões de células, as mesmas podem se multiplicar facilmente em alimentos de origem animal, logo, sua ausência em produtos é exigida em diversos países (VAN AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2007). Alimentos como ovos se destacam por serem os principais vetores de contaminação dessas bactérias devido ao seu contato com a cloaca da ave e, consequentemente, com possíveis fezes contaminadas (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

As bactérias da estirpe *Salmonella enterica* são as responsáveis por causar a maior parte das infecções bacterianas de origem alimentar (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Dentre estas, se destacam as do sorotipo Typhimurium, uma das mais isoladas em todo o mundo e predominante em infecções como a salmonelose infantil (SHINOHARA *et al.*, 2008). Este sorotipo produz uma enterotoxina de

composição lipopolissacarídica com alto peso molecular que quando ingerida pode trazer uma série de complicações. Os sintomas relacionados a sua ingestão são diarreias, dores abdominais, febre e vômitos (PINTO, 1996).

Outras bactérias patogênicas que causam preocupação na saúde pública são as pertencentes do gênero *Staphylococcus* spp. Dentre as mesmas, a espécie *Staphylococcus aureus* é a mais associada aos casos de intoxicações alimentares, representando cerca de 98% dos surtos associados a essa espécie (BALBANI; BUTUGAN, 2001; SANTANA, 2010). Tal espécie Gram-positiva é bastante associada à má manipulação de alimentos, pois tal bactéria é normalmente encontrada nas mucosas do trato respiratório, pele e intestino humano (OLIVEIRA *et al*, 2010). Devido à sua versatilidade nutricional e a capacidade de crescer em diferentes ambientes, a *Staphylococcus aureus* consegue desenvolver-se com muita facilidade em diversos alimentos (SANTANA, 2010), como leite e derivados, tendo o leite cru como importante fonte de isolamento dessa espécie (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

Várias das cepas de *Staphylococcus aureus* são capazes de produzir enterotoxinas, desde que haja as devidas condições, como por exemplo, a presença de uma faixa de temperatura entre 10 e 46° C (OLIVEIRA *et al*, 2010). Tais toxinas apresentam uma elevada resistência térmica, permitindo sua sobrevivência aos tratamentos térmicos normalmente aplicados ao leite, como a pasteurização (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004). Algumas de suas toxinas podem causar choque térmico e normalmente estão associadas com intoxicações alimentares. Os sintomas da ingestão dessas toxinas são náuseas, vômitos, contrações musculares abdominais, diarreia, cefaleia e sudorese (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

Outra espécie que causa preocupação na saúde pública são as bactérias pertencentes à espécie Gram-negativa *Escherichia coli*, micro-organismo conhecido por ser o mais estudado pelo ser humano. Tal bactéria anaeróbica facultativa tem seu habitat natural localizado no intestino humano e no intestino de outros animais e algumas cepas possuem uma tendência de se converter de um micro-organismo comensal para patógeno oportunista e extremamente especializado (SOUSA *et al.*, 2006). Existem três cepas dessa bactéria que causam infecções, as quais são denominadas oportunistas (não patogênicas em seu habitat natural, mas que causam problema quando atingem outros

tecidos e locais no hospedeiro), enteropatogênicas (causam ações lesivas na mucosa pertencente ao do trato intestinal, provocando assim as chamadas gastroenterites agudas, principalmente em grupos de recém-nascidos e crianças com faixa etária até dois anos) e as enterotoxigenias (não invasivas, porém, produzem enterotoxinas que podem atuar sobre as membranas das células epiteliais (PINTO, 1996)).

As infecções causadas pela *Escherichia coli* podem ser limitadas às regiões de superfícies mucosas colonizadas ou podem se disseminar através do organismo, tendo sido relacionadas com processos de infecção, meningite e infecções gastrintestinais. Vários sorotipos dessa bactéria causam doenças diarreicas, um grave problema de saúde pública que resulta em mais de dois milhões de mortes relatadas a cada ano (SOUSA *et al.*, 2006).

Somente nos Estados Unidos, a espécie *E. coli* O157:H7 representa um dos maiores agentes etiológicos causadores de gastroenterocolite aguda, doença normalmente ocasionada pela ingestão de água e alimentos contaminados. Tal cepa (*E. coli* O157:H7) é conhecida por ter a capacidade de sobreviver em meios ácidos, tanto em alimentos como no estômago, podendo provocar colite hemorrágica, diarreia com sangue e a síndrome hemolítica-urêmica (BALBANI; BUTUGAN, 2001; SOUSA *et al.*, 2006). Os sintomas relacionados à ingestão de alimentos contaminados por essa bactéria são diarreia, febre e náuseas, geralmente de 6 a 36 horas após a ingestão desses alimentos (PINTO, 1996).

Por fim, o último exemplo de bactéria patogênica que provoca preocupação de saúde pública a ser mencionada é a bactéria *Listeria monocytogenes*, que apesar de não figurar entre as bactérias com maior incidência em casos de doenças transmitidas por alimentos, possui uma alta taxa de fatalidade quanto à sua atuação como patógeno, cerca de 20 a 30% das pessoas que sofrem de listeriose vão a óbito (CARPENTIER; CERF, 2011; LIU *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Essa espécie Gram-positiva e anaeróbica facultativa é amplamente encontrada na natureza, podendo multiplicar-se em alimentos como carnes frescas e leite, mesmo em temperaturas normalmente aplicadas na refrigeração (BALBANI; BUTUGAN, 2001; PINTO, 1996).

Assim como a espécie *E. coli* O157:H7, a *L. monocytogenes* possui doses infectantes muito baixas, permitindo que a simples contaminação e ausência de alguma etapa de eliminação desse micro-organismo ocasione surtos

(OLIVEIRA *et al.*, 2010). Pode se multiplicar em temperaturas em torno de 0°C e em ambientes como chão, tubos e equipamentos industriais, especialmente onde há boa umidade (CARPENTIER; CERF, 2011), por isso, o controle da espécie *Listeria monocytogenes* na indústria de alimentos requer uma constante atenção (BUCHANAN *et al.*, 2017). Essa espécie tem uma alta taxa de infecção em pessoas pertencentes ao grupo dos idosos, gestantes, recém-nascidos e imunocomprometidos e podem provocar aborto em grávidas, gastroenterites médias, febre e severas infecções na corrente sanguínea e no sistema nervoso central (BUCHANAN *et al.*, 2017; CARPENTIER; CERF, 2011; PINTO, 1996).

Tendo em vista todos esses exemplos de doenças transmitidas por alimentos e a presente demanda pelo consumo de alimentos naturais e frescos (LEISTNER; GORRIS, 1995; SOOMRO; MASUD; ANWAAR., 2009), muitas tecnologias para a preservação de alimentos vêm sendo desenvolvidas a fim de diminuir o número de contaminação e aumentar o tempo de prateleira dos alimentos (em relação as doses de micro-organismos que podem deteriorar os mesmos), como por exemplo embalagens a vácuo, alta pressão, radiação ionizante, radiação não ionizante, campo elétrico pulsante e ozônio (NOVAIS *et al.*, 2012; SOOMRO; MASUD; ANWAAR., 2009).

Outro exemplo promissor de tecnologia é a biopreservação que vem atraindo atenções por também minimizar o impacto sobre as propriedades nutricionais e organolépticas dos alimentos perecíveis (GARCÍA *et al.*, 2010). A biopreservação é um método de conservação que visa a utilização de uma microbiota natural ou controlada, assim como seus produtos antimicrobianos (VÁSQUEZ *et al.*, 2009). Na indústria de alimentos, um produto que possui um grande potencial na biopreservação são as bacteriocinas, podendo estar sozinhas ou combinadas com outros métodos de preservação (PEREZ; ZENDO; SONOMOTO, 2014).

1.2 Bacteriocinas

1.2.1 Bactérias ácido-láticas (BALs)

As bactérias ácido-láticas (conhecidas como BALs) são um importante e um dos principais grupos de bactérias produtoras de bacteriocinas. É um conjunto de bactérias conhecido por estar associado à atividade humana no decorrer da história da civilização (SAUER *et al.*, 2017). Estas bactérias são comumente utilizadas na produção de silagem e, em sua maioria, em processos de produção de alimentos fermentados (AHLBERG; JOUTSJOKI; KORHONEN, 2015).

Industrialmente, sua utilização parte do ano de 1890, onde as primeiras culturas foram usadas para a produção de queijo e coalhadas, e a partir desse período, sua aplicação industrial permanece importante (SAUER *et al.*, 2017). Estima-se que cerca de 100 bilhões de euros (cerca de 450 bilhões de reais) por ano são gerados pela utilização das BALs em diversos processos fermentativos, obtendo produtos como iogurtes, queijos, chucrutes, pães, presuntos, azeitonas, pickles e salsichas (TEUSINK; MOLENAAR, 2017).

O termo “bactérias ácido-láticas” descreve um grupo heterogêneo de micro-organismos Gram-positivos que compartilham uma série de características físicas e metabólicas. Atualmente, o termo BALs se refere a micro-organismos da ordem *Lactobacillales*. Cinco das seis famílias presentes na ordem das BALs incluem micro-organismos responsáveis pela fermentação de alimentos. As famílias *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae* são compostas predominantemente por bactérias não patogênicas, culturas tradicionalmente seguras que são utilizadas na fermentação de uma série de alimentos e reconhecidas pela sigla GRAS (generally recognized as safe) (CHALÓN *et al.*, 2012; GÄNZLE, 2015; GHANBARI; JAMI, 2013).

As bactérias ácido-láticas são bactérias que possuem como propriedade metabólica comum a produção de ácido lático como produto final da fermentação de carboidratos. Além do ácido lático, podem produzir durante o processo fermentativo, substâncias como o manitol e 1,3-propanodiol e, por isso, podem ser classificadas de acordo com o produto formado durante a fermentação, podendo ser homofermentativas, heterofermentativas facultativas e heterofermentativas estritas (GÄNZLE, 2015). São bactérias geralmente sem

motilidade, não esporulantes, catalase negativo, ácido tolerante, além de serem organismos anaeróbios facultativos e são isoladas de diversas partes do meio ambiente, especialmente de alimentos (GHANBARI; JAMI, 2013; SAUER *et al.*, 2017).

Tais bactérias são excelentes competidoras e agem dessa forma por meio da rápida utilização de fontes de carbonos disponíveis, como carboidratos, e pela liberação de compostos como ácido lático e ácido acético (GÄNZLE, 2015). Sua ação antagônica e inibitória proveniente de seu comportamento competitivo pelos nutrientes disponíveis e liberação de compostos antimicrobianos como os ácidos orgânicos, o peróxido de hidrogênio e os peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas), demonstra que tais micro-organismos são bastante interessantes na área de biopreservação (GHANBARI; JAMI, 2013).

1.2.2 Definição e histórico

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos (PAMs), sintetizados nos ribossomos e liberados de forma extracelular. São em geral de baixo peso molecular, catiônicas, anfifílicas, modificadas ou não pós-traducionalmente, termoestáveis e possuem atividade antimicrobiana contra outras bactérias pertencentes à mesma espécie da cepa produtora (sendo assim classificadas como bacteriocinas de ação específica) ou contra bactérias pertencentes a outras espécies (sendo consideradas bacteriocinas de ação ampla) (AHMAD *et al.*, 2017; CHIKINDAS *et al.*, 2018; FIELD; ROSS; HILL, 2018; GHANBARI; JAMI, 2013; JUTURU; WU, 2018; ZACHAROF; LOVITT, 2012; ZOU *et al.*, 2018). Vale destacar que esses peptídeos antimicrobianos são produzidos durante a fase exponencial de crescimento bacteriano (como metabólito primário), em detrimento dos antibióticos que são produzidos durante a fase estacionária (como metabólitos secundários) (ZACHAROF; LOVITT, 2012).

O primeiro trabalho que relata a produção de uma bacteriocina é datado do ano de 1925, onde o peptídeo produzido era proveniente da espécie bacteriana *Escherichia coli* e tal peptídeo foi denominado “Colicina” devido à fonte bacteriana de sua produção (JUTURU; WU, 2018). Com a descoberta de novos peptídeos antimicrobianos proveniente de outros grupos bacterianos (Gram-

positivos e Gram-negativos), foi proposto que o termo que indicaria tais compostos seria denominado como “bacteriocinas” (NASCIMENTO; MORENO, 2008; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015). No ano de 1947, um tipo de peptídeo produzido pela espécie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* foi isolado e concentrado, o qual apresentava um amplo espectro de atividade antimicrobiana. Essa bacteriocina foi denominada Nisina, sendo a mesma apenas comercializada no ano de 1953 na Inglaterra (NASCIMENTO; MORENO, 2008).

Muitas das bacteriocinas citadas em diversos artigos possuem atividade contra patógenos de humanos e animais, como por exemplo, contra espécies de *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina ou contra cepas da espécie *Enterococcus* spp. resistentes à Vancomicina. As vantagens em se utilizar essa classe de antimicrobianos são a sua estabilidade e não toxicidade, sendo bastante interessantes como agentes terapêuticos ou de controle microbiológico (AHMAD *et al.*, 2017).

Além disso, a utilização das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas e, em especial, as produzidas por bactérias ácido lácticas como conservantes de alimentos, demonstra ser bastante interessante devido a estas possuírem o status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015), ou seja, são geralmente reconhecidas como seguras para o consumo, expandindo ainda mais as possíveis aplicações dessas biomoléculas.

1.2.3 Classificação

As bacteriocinas podem ser classificadas de acordo com a sua massa molecular, estabilidade térmica, características bioquímicas e genéticas, estabilidade à atividade enzimática (proteolítica), modo de ação, presença de resíduos modificados pós-traducionalmente e espectro de atividade antimicrobiana (AHMAD *et al.*, 2017; TODD R., 1993; ZOU *et al.*, 2018). Existem várias classificações existentes para essas biomoléculas, onde a maioria dos autores usualmente classificam as bacteriocinas produzidas pelas bactérias ácido-láticas (FIELD; ROSS; HILL, 2018; MAIA, 2015; OGAKI; FURLANETO; ROSA; FRANCO, 2002; SCHULZ; PEREIRA; BONELLI, 2003;

TODD R., 1993; ZACHAROF; LOVITT, 2012) por esse grupo possuir a maioria das bacteriocinas conhecidas, porém, também é possível observar a divisão das mesmas pelo tipo de micro-organismo produtor (bactérias Gram-positivas, Gram-negativas ou arqueobactérias) (JUTURU; WU, 2018). Também se observa que mesmo para as bacteriocinas produzidas pelas BALs, há certa confusão quanto à nomenclatura desses peptídeos, onde uma mesma bacteriocina pode ter dois nomes, dependendo do autor (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

De acordo com a literatura, as bacteriocinas de bactérias Gram-negativas são divididas em duas classes, a classe das colicinas e a classes das microcinas. Os genes que codificam essas classes podem estar no plasmídeo ou cromossomo da bactéria produtora, onde os mesmos estão agrupados em conjuntos de três genes, um codificante para a bacteriocina, outro codificante para uma proteína responsável por conferir resistência da bactéria à sua bacteriocina (proteína de imunidade) e o terceiro envolvido com a liberação desse composto pelas células. As colicinas ainda podem ser divididas em dois grupos baseado na forma em que é liberada ou em três grupos baseado na sua forma de ação. As microcinas podem ser divididas em dois grupos (I e II), sendo que o grupo II pode ser subdividido em IIa e IIb (JUTURU; WU, 2018).

As bacteriocinas produzidas pelas arqueobactérias podem ser divididas em dois tipos, as halocinas e as sulfolobocinas, onde as halocinas são produzidas pelas halobactérias e podem ser classificadas em microhalocinas (<3.4kDa) e halocinas de tamanho maior (35kDa). Já as sulfolobocinas são bacteriocinas produzidas pelo micro-organismo *Sulfolobus islandicus* e possuem ação estrita, normalmente contra arqueobactérias do mesmo gênero (*Sulfolobus*) (JUTURU; WU, 2018).

Já em relação às bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram-positivas, que são normalmente bacteriocinas produzidas pelas bactérias ácido-láticas, são classificadas tradicionalmente pela classificação proposta por Klaenhammer, onde as bacteriocinas das BALs são divididas em quatro classes (I, II, III e IV), cada uma com uma série de subdivisões. Essas divisões e subdivisões são baseadas na sequência primária do peptídeo, propriedade físico-química e principalmente, no modo de ação de cada bacteriocina.

(NASCIMENTO; MORENO, 2008; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015; ROSA; FRANCO, 2002; TODD R., 1993).

A classe I é constituída de pequenos peptídeos termoestáveis (<5 kDa) que variam em número de aminoácidos na faixa entre 19 e 37 aminoácidos. São conhecidos como lantibióticos devido ao fato de possuírem em sua constituição a lantionina ou β -metil lantionina, resíduos derivados de uma modificação pós-traducional não usual. Fazem parte dessa classe as bacteriocinas nisina A e Z, lactosina S, Enterocina W e carnocina U149 (AHMAD *et al.*, 2017; FIELD; ROSS; HILL, 2018; NASCIMENTO; MORENO, 2008; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015; PEREZ; ZENDO; SONOMOTO, 2014; SCHULZ; PEREIRA; BONELLI, 2003; TODD R., 1993; ZOU *et al.*, 2018).

A classe II é subdividida em três subclasses, IIa, IIb, IIc. Tais bacteriocinas são pequenos peptídeos termoestáveis (<10 kDa) que não possuem lantionina ou β -metil lantionina em sua constituição, além de possuírem caráter anfifílico (FIELD; ROSS; HILL, 2018; SCHULZ; PEREIRA; BONELLI, 2003).

A subclasse IIa é constituída de peptídeos conhecidos por ter boa ação antimicrobiana contra bactérias do gênero *Listeria* e possuem em sua sequência primária algumas regiões conservadas como por exemplo, a região N-terminal YGNGVXC (onde “X” significa um ponto variável de aminoácido) (ENNAHAR *et al.*, 2000). Fazem parte dessa subclasse as bacteriocinas Pediocina PA-1, Enterocina A, Sacacina A, Carnobacteriocina BM1, Leucocina A e Leucocina C (ENNAHAR *et al.*, 2000; NASCIMENTO; MORENO, 2008; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015; PAPATHANASOPOULOS *et al.*, 1998; ROSA; FRANCO, 2002; TODD R., 1993; ZOU *et al.*, 2018).

Já a classe IIb é constituída por peptídeos de dois componentes, ou seja, tais bacteriocinas são compostas por dois diferentes peptídeos ligados, não modificados pós-traducionalmente, que juntos possuem sinergia quanto à sua atividade antimicrobiana. Fazem parte desse grupo as bacteriocinas Lactococcinas F e G e a Lactacina F (NASCIMENTO; MORENO, 2008; ROSA; FRANCO, 2002; TODD R., 1993; ZOU *et al.*, 2018).

Por fim, a subclasse IIc é composta por peptídeos que requerem a presença de resíduos de cisteína reduzidos em sua constituição para que os mesmos tenham atividade. Compõe essa subclasse, por exemplo, a bacteriocina Lactococcina B (ROSA; FRANCO, 2002; TODD R., 1993; ZOU *et al.*, 2018).

Por sua vez, as bacteriocinas da classe III são basicamente grandes peptídeos termolábeis de alta massa molecular (>30 kDa), classificadas como bacteriolíticas, ou seja, peptídeos que possuem ação lítica. Pertencem a esse grupo as bacteriocinas Helveticina J, Lactacinas A e B e a acidophilucina A (NASCIMENTO; MORENO, 2008; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015; ROSA; FRANCO, 2002; SCHULZ; PEREIRA; BONELLI, 2003; TODD R., 1993; ZOU *et al.*, 2018).

Finalizando o esquema de classificação proposto por Klaenhammer, o último grupo de bacteriocinas sugerido é a classe IV, composta por peptídeos de composição complexa, ou seja, composta por uma parte proteica e outra parte ou de composição lipídica ou formada por algum carboidrato. Tais partes não proteicas, possuem funções essenciais para a atividade do peptídeo. Fazem parte dessa classe as bacteriocinas Leuconocina S, Pediocina SJ1, Plantaricina S e Lactocina 27 (NASCIMENTO; MORENO, 2008; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015; ROSA; FRANCO, 2002; TODD R., 1993; ZOU *et al.*, 2018).

Outra classificação normalmente utilizada é a proposta por Cotter e colaboradores em 2005 onde as bacteriocinas são agrupadas em três classes: os lântibióticos (classe I), os não lântibióticos (classe II) e as bacteriolisinas (classe III). A classe I dessa classificação equivale à classificação I proposta por Klaenhammer, ou seja, tal grupo é composto por peptídeos termoestáveis que contém lantionina ou β -metil lantionina (NASCIMENTO; MORENO, 2008; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

No caso da classe II, a mesma é dividida em quatro subclasses IIa, IIb, IIc e IId (e não três como propõe Klaenhammer), as subclasses diferenciais são a subclasses IIc e IId, onde a subclasse IIc é composta por peptídeos que possuem sua estrutura cíclica, ou seja, a extremidade N-terminal é ligada covalentemente a extremidade C-terminal, o que lhe garante uma boa estabilidade estrutural. São exemplos dessa subclasse as bacteriocinas Leucociclicina Q e Lactociclicina Q. Já a subclasse IId é composta por peptídeos lineares, não semelhantes à Pediocina (ou seja, não possuem a região N-terminal conservada mencionada na classe IIa proposta por Klaenhammer) e não são modificados pós-traducionalmente. Fazem parte dessa classe as bacteriocinas Lacticina Q e Leucocina Q (COTTER; ROSS;

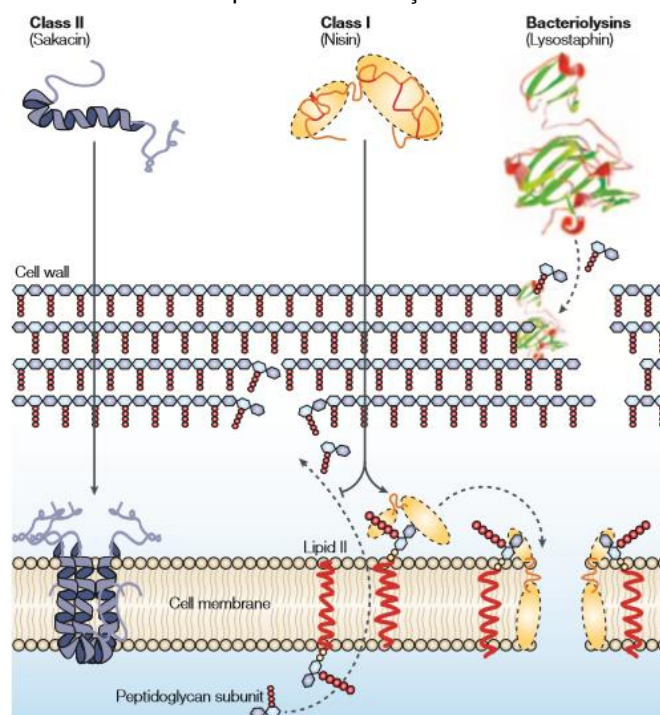
HILL, 2005; COTTER; ROSS; HILL, 2013; PEREZ; ZENDO; SONOMOTO, 2014).

A última classe proposta por Cotter e colaboradores é a classe III que equivalem à classe III proposta por Klaenhammer, sendo reclassificada aqui como bacteriolisinas, já que são mencionadas como enzimas líticas ao invés de peptídeos. O autor ainda sugere a não inclusão da classe IV (bacteriocinas de composição complexa), presente antes na classificação tradicional (COTTER; ROSS; HILL, 2005; COTTER; ROSS; HILL, 2013; PEREZ; ZENDO; SONOMOTO, 2014; NASCIMENTO; MORENO, 2008; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015 ZACHAROF; LOVITT, 2012).

1.2.4 Modo de ação

As bacteriocinas podem atuar tanto na formação de poros na bicamada lipídica da membrana bacteriana ou na lise direta da parede celular desses micro-organismos, dependendo da classe de bacteriocina avaliada (AHMAD *et al.*, 2017). A figura 1 abaixo ilustra o mecanismo de ação de cada uma das classes de bacteriocinas:

Figura 1 - Modo de ação geral das bacteriocinas. A ilustração mostra um exemplo de bacteriocina para cada classe e qual modo de ação relacionado a cada uma delas.



Fonte: COTTER; ROSS; HILL, 2005.

O mecanismo de ação tanto das bacteriocinas da classe I (representada na figura 1 pela Nisina) quanto das bacteriocinas de classe II (representada na figura 1 pela Sacacina) envolve a formação de poros na membrana bacteriana, enquanto o mecanismo de ação das bacteriocinas da classe III (representada pela Lisoestafina) envolve a lise direta da parede celular e morte da bactéria (COTTER; ROSS; HILL, 2005).

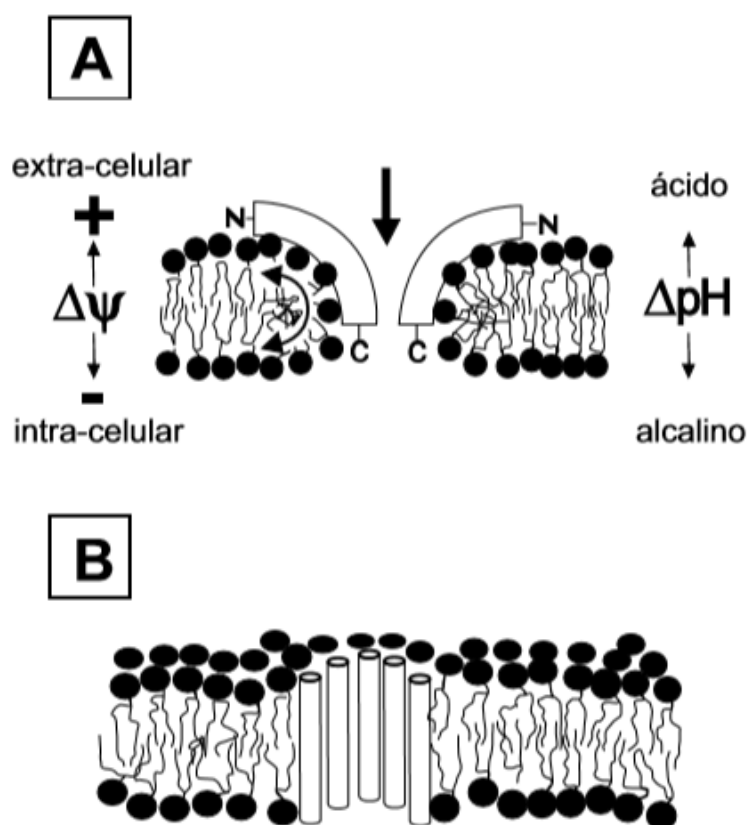
É interessante notar que no caso das bacteriocinas de classe I e classe II, para a formação dos poros na membrana é necessário que haja, especificamente ou não, a interação da bacteriocina com algum receptor ou molécula presente na superfície da membrana celular. As bacteriocinas de classe I podem atuar na formação de poro através da interação dessas biomoléculas com um peptídeo presente na membrana bacteriana, o denominado de Lipídio II, permitindo a ancoragem da bacteriocina e, posteriormente, sua inserção. Alguns autores também sugerem que essa classe de peptídeos possa interagir com outra biomolécula na superfície da membrana, a enzima manose fosfotransferase (AHMAD *et al.*, 2017; CHIKINDAS *et al.*, 2018; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015; ZACHAROF; LOVITT, 2012). Além disso, no caso da nisina, essa interação com essas biomoléculas permite que tal bacteriocina interfira na síntese da parede celular, levando também a morte da bactéria, evidenciando assim mais um mecanismo de ação antimicrobiana desse peptídeo (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

No caso das bacteriocinas de classe II, a interação acontece de forma não específica, havendo a interação de uma porção catiônica dessas bacteriocinas com os fosfolipídios aniônicos na membrana (ENNAHAR *et al.*, 2000; SCHULZ; PEREIRA; BONELLI, 2003). O caráter anfifílico desses peptídeos permite que os mesmos possam se inserir na membrana bacteriana (NASCIMENTO; MORENO, 2008), algo também observado nos peptídeos de classe I (SCHULZ; PEREIRA; BONELLI, 2003).

A formação dos poros resultante da ação dessas duas classes pode ser explicada através de dois modelos propostos: o modelo *Barrel Stave* (barril estável) que diz que a bacteriocina interage com a membrana bacteriana, se insere através da mesma e por meio da agregação de vários peptídeos, formam-se os poros. Já o modelo *Wedge-like* (modelo em forma de cunha) diz que há

uma interação dos grupos laterais do peptídeo com os grupos polares presente nos componentes da bicamada, onde o peptídeo é puxado para dentro da membrana pela força protônica, fazendo com que o peptídeo não entre em contato com a parte hidrofóbica da membrana e sim, como já mencionado, com os lipídeos de cabeça da bicamada (grupos polares). O modelo *Barrel Stave* é denotado como o que explica a formação de poros das bacteriocinas de classe II e o modelo *Wedge-like* o que explica a formação de poros para as bacteriocinas de classe I (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015; ROSA; FRANCO, 2002; ZACHAROF; LOVITT, 2012). A figura 2 a seguir mostra um esquema desses dois modelos propostos:

Figura 2 - Modelo de formação de poros nas membranas bacterianas sobre ação de bacteriocinas de classe I e II. O esquema A representa o modelo *Wedge-like* e o esquema B representa o modelo *Barrel Stave*.



Fonte: ROSA; FRANCO, 2002.

É importante ressaltar que em qualquer de um desses modelos, tanto na ação das bacteriocinas de classe I quanto na ação das bacteriocinas de classe

II, a formação de poros permite a dissipação da força próton-motriz (FPM), levando a interferência de geração de ATP (98,9% do ATP disponível é hidrolisado na tentativa de manutenção da FPM). Essa interferência leva a ausência do transporte ativo de aminoácidos essenciais para as bactérias e também a geração de energia necessária para outros processos essenciais no micro-organismo, que por fim colapsa e morre (AHMAD *et al.*, 2017; ENNAHAR *et al.*, 2000; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015; ROSA; FRANCO, 2002; SCHULZ; PEREIRA; BONELLI, 2003).

Por fim, também é importante ressaltar que o mecanismo de ação das bacteriocinas de classe III, ou seja, bacteriocinas que agem na lise direta da parede celular bacteriana, ocorre devido à presença de uma endopeptidase na região N-terminal dessa biomolécula, permitindo assim a catálise da parede bacteriana. (NASCIMENTO; MORENO, 2008).

1.2.5 Aplicações

Como as bacteriocinas possuem atividade contra uma gama de micro-organismos patogênicos ou ação específica contra outros, ausência de grande resistência à sua aplicação e geralmente são de natureza não tóxica. Tais biomoléculas são fonte de vários estudos quanto às suas aplicações em várias áreas, principalmente na parte da saúde e na indústria de alimentos, (AHMAD *et al.*, 2017; CHIKINDAS *et al.*, 2018).

Na área da saúde, existe uma infinidade de possíveis aplicações quanto à sua utilização, podendo ser citadas a utilização das bacteriocinas como possíveis alternativas quanto aos antibióticos utilizados (aplicando tais biomoléculas contra micro-organismos resistentes a algumas classes de antibióticos, a exemplo da já citada cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), utilização como antivirais (Subtilosina A de *Bacillus subtilis*), contraceptivos (Fermenticina HV6b de *Lactobacillus fermentum* HV6b), como protetores intestinais (Turicina CD de *Bacillus thuringiensis* DPC) e como biomoléculas usadas no tratamento de doenças na área de Medicina Veterinária (Lacticina 3147 de *Lactococcus lactis* DPC3147), (AHMAD *et al.*, 2017; CHIKINDAS *et al.*, 2018; COTTER; ROSS; HILL, 2013).

Já na área da indústria de alimentos, as bacteriocinas podem ser utilizadas como bioconservantes (AHMAD *et al.*, 2017), com a utilização dessas biomoléculas em derivados de leite, ovos, vegetais e produtos cárneos, sendo esta última, a aplicação mais estudada (ZACHAROF; LOVITT, 2012). A aplicação desses peptídeos nessa área pode ser realizada através da adição de culturas de bactérias produtoras de bacteriocinas (produção *in situ*) que vão produzir e liberar tais biomoléculas no alimento no qual as mesmas foram aplicadas, pela adição de um extrato bruto proveniente da fermentação de alguma bactéria bacteriogênica ou pela adição direta das bacteriocinas já purificadas (NASCIMENTO; MORENO, 2008; ZACHAROF; LOVITT, 2012).

O exemplo mais clássico e citado na literatura é a da bacteriocina Nisina, a qual foi descoberta no ano de 1928 por Rogers, sendo concentrada de uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* em 1947, recebendo a sua nomenclatura atual. A sua utilização como extrato puro e comercial partiu do ano de 1953 na Inglaterra, sendo reconhecida como segura apenas no ano de 1959 pela Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial da Saúde. Em 1988, o FDA nos EUA autorizou a sua utilização em queijos processados e apenas no ano de 1996 a sua utilização em queijos foi autorizada no Brasil (NASCIMENTO; MORENO, 2008; SCHULZ; PEREIRA; BONELLI, 2003). Atualmente a sua utilização como conservante de alimentos é aprovada em mais de 40 países (CHALÓN *et al.*, 2012).

Comercialmente a Nisina é vendida com a denominação *Nisaplin*, onde tal produto é formado basicamente de nisina e cloreto de sódio. É aplicado em produtos como queijo, carne suína e leite fermentado. O fabricante do produto *Nisaplin* recomenda a aplicação desse peptídeo em uma faixa de 10 a 20 g (250 a 500 mg de nisina) em cerca de 100 kg de produto final, dependendo da condição microbiológica da matéria-prima (COTTER; ROSS; HILL, 2005; NASCIMENTO; MORENO, 2008; SCHULZ; PEREIRA; BONELLI, 2003). É importante ressaltar que essa bacteriocina sozinha não é muito efetiva contra bactérias do gênero *Salmonella* spp. devido a presença da membrana externa (Gram-negativas) que dificulta o acesso da bacteriocina à membrana plasmática e, por este motivo, esse peptídeo antimicrobiano é combinado com outros agentes para ser efetivo contra esses micro-organismos (CHALÓN *et al.*, 2012).

Outros exemplos a serem mencionados de bacteriocinas utilizadas como conservantes de alimentos são a Pediocina PA-1 de *Pediococcus acidilactici*, aplicada na conservação de queijos, onde esse peptídeo é ativo contra bactérias da espécie *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*, porém não capazes de inibir *Salmonella* spp e a Enterocina de *Enterococcus faecalis*, utilizada contra bactérias da espécie *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* e aplicada na conservação de leite e salsichas. Formulações entre vários peptídeos também estão disponíveis como a Micocina[®], uma combinação entre três bacteriocinas (Carnociclina A, Carnobacteriocina BM1 e Piscolicina 126) e a Bactoferm[™] (Sacacina A e Pediocina PA-1). (CHIKINDAS *et al.*, 2018; FIELD; ROSS; HILL, 2018; NASCIMENTO; MORENO, 2008; SCHULZ; PEREIRA; BONELLI, 2003).

1.2.6 Leucocinas

Tendo em vista as diferentes classes de bacteriocinas, suas formas de ação e suas aplicações, uma classe de bacteriocina interessante para uma possível aplicação como conservante de alimentos é a classe IIa, classe de bacteriocinas que são naturalmente ativas contra bactérias do gênero *Listeria* spp. e, mais especificamente, a classe das leucocinas, as quais são produzidas por cepas de bactérias *Leuconostoc* spp.

As bactérias do gênero *Leuconostoc* spp. são bactérias ácido-láticas Gram-positivas de importância econômica (HEMME; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004). São culturas que já vem sendo utilizadas na indústria de alimentos como culturas iniciadoras, ou seja, como uma preparação microbiana de um grande número celular de pelo menos um tipo de micro-organismo que é adicionada em um substrato para a produção de alimentos fermentados, conferindo uma série de características organolépticas desejáveis aos fermentados, como acidificação e aromatização (LEROY; DE VUYST, 2004) e como culturas protetoras, que são bactérias com potencial de garantir a segurança microbiológica dos alimentos através de seus metabólitos (HOLZAPFEL; GEISEN; SCHILLINGER, 1995). Estão relacionadas à produção de chucrutes, pickles, produtos cárneos, produção de CO₂ em queijos, produção de

flavorizantes e produção de dextrana (HEMME; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004; PUJATO *et al.*, 2017; RUIZ *et al.*, 2018).

Esse gênero de bactéria heterofermentativa é geralmente considerada GRAS e seu papel é fundamental na garantia da formação de aroma e textura de alguns produtos lácteos (HEMME; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004; PUJATO *et al.*, 2017). São bactérias normalmente encontradas na vegetação verde e em raízes, não sendo encontradas naturalmente na microbiota intestinal. Um exemplo de espécie pertencente a esse gênero é a espécie *Leuconostoc mesenteroides*, utilizada na indústria alimentícia na produção de manteiga, cremes e alguns vegetais fermentados (HEMME; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004; JUNG *et al.*, 2012).

Quanto a essa espécie, a cepa bacteriana *Leuconostoc mesenteroides* TA33a produz uma série de bacteriocinas, as leucocinas, que atuam como uma espécie de metabólitos produzidos para sua defesa em relação a possíveis bactérias concorrentes. Dentre essas leucocinas, encontram-se a Leucocina A-TA33a, Leucocina B-TA33a e a Leucocina C-TA33a (PAPATHANASOPOULOS *et al.*, 1998). Estudos comparativos da estrutura primária de diferentes bacteriocinas revelaram uma grande homologia entre as bacteriocinas da classe IIa (BODAPATI *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2013), incluindo a Leucocina C-TA33a, a Sacacina P, a Bavaricina A e a Enterocina A, dentre outras, as quais são produzidas por diferentes espécies bacterianas (PAPATHANASOPOULOS *et al.*, 1998). Todas essas bacteriocinas demonstraram um amplo espectro antimicrobiano, tornando-se interessantes em aplicações como conservantes de alimentos. A figura 3 a seguir mostra um esquema comparativo entre a estrutura primária desses peptídeos antimicrobianos:

Figura 3 - Esquema comparativo por alinhamento múltiplo entre as diferentes sequências primárias de bacteriocinas da classe IIa.

Bacteriocin	Sequence	Amino acids
Leucocin C-TA33a	-----KYYGNG-VECTKKGCSVDWGYAAT-----NIANN SVMNGLTG-----	36
Sakacin P	-----KYYGNG-VHCGKHSCTVDWGTAIG-----NIGNNAAANWATGGNAGWNK-	43
Bavaricin A	-----KYYGNG-VHXGKHSXTVDWGTAIG-----NIGNNAAANXATGXNAGG---	41
Piscicolin 126	-----KYYGNG-VSCNKNKCTVDWSKAIG-----IIGNNAAANLTTGGAAGWNKG	44
Pediocin PA-1	-----KYYGNG-VTCGKHSCTVDWGKATT-----CIINNGAMAWATGGHQGNHKC	44
Enterocin A	TTHSGKYYGNG-VYCTKNKCTVDWAKATT-----CIAGSMIGGFLGGAIPGKC--	47
Leucocin A-UAL 187	-----KYYGNG-VHCTKSGCSVNWGEAFS-----AGVHRLANGNGFW-----	37
Leucocin B-TA11a	-----KYYGNG-VHCTKSGCSVNWGEAFS-----AGVHRLANGNGFW-----	37
Mesentericin Y105	-----KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAAS-----AGIHRLANGNGFW-----	38
Sakacin A	----ARSYNG-VYCNKKCWVNRGEATQ-----SIIGGMISGWASGLAGM----	41
Carnobacteriocin BM1	----AISYNG-VYCNKEKCWNKAENKQ-----AITGIVIGGWASSLAGMGH--	43
Carnobacteriocin B2	-----VNYGNG-VSCSKTKCSVNWGAQAFQERYTAGINSFVSGVASGAGSIGRRP	48

Fonte: PAPATHANASOPOULOS *et al.*, 1998.

Até o momento, são escassos na literatura estudos sobre a importância de sequências específicas de aminoácidos presentes na estrutura dessas biomoléculas, com o efeito antimicrobiano das mesmas. Neste sentido, este estudo visa realizar uma investigação da correlação estrutura/potencial antimicrobiano dessas bacteriocinas que apresentam grande homologia estrutural, com o objetivo de explorar esta classe de PAMs para aplicação na conservação de alimentos.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo central desenhar e sintetizar diferentes peptídeos com a estrutura baseada na sequência primária de aminoácidos do peptídeo Leucocina C-TA33a de *Leuconostoc mesenteroides* TA33a e estudar a influência de regiões específicas deste peptídeo com a atividade antimicrobiana. Para alcançar este objetivo, este trabalho teve basicamente como objetivos específicos:

- Design, síntese via fase sólida, purificação e caracterização dos peptídeos derivados da Leucocina C-TA33a;
- Realização dos estudos estruturais por Dicroísmo Circular e Modelagem Molecular dos peptídeos produzidos;
- Avaliação da atividade dos peptídeos *in vitro* contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sorotipo Thyphimurium, que são bactérias importantes na área de contaminação de alimentos;
- Avaliação da citotoxicidade dos peptídeos em células humanas por meio de ensaios de capacidade hemolítica de eritrócitos humanos;
- Avaliação da relação estrutural dos peptídeos com o potencial antimicrobiano e a citotoxicidade.

3 METODOLOGIA

3.1 Design

A figura 4 mostra a sequência primária tanto dos análogos sintetizados (denominados LeuC-Nt, LeuC-0Cys, LeuC-Ala14, LeuC-Ala9 e LeuC-Cys9,14) quanto do peptídeo original (LeuC-TA33a). Esses análogos foram desenhados com o intuito de se avaliar a relação da sequência primária presente em cada um deles com sua atividade antimicrobiana, além de se avaliar o impacto da presença ou não de resíduos de cisteína nos peptídeos, no que se refere a sua atividade contra os micro-organismos testados.

O análogo LeuC-Nt foi projetado para apenas conter a região N-terminal conservada. Já o análogo LeuC-0Cys foi projetado para conter tanto a região N-terminal conservada quanto a região intermediária conservada (valina posição 16 até treonina posição 23), não contendo cisteína em sua estrutura. Os peptídeos LeuC-Ala9, LeuC-Ala14 e LeuC-Cys9,14, além de possuírem essas regiões, possuem variação pontual da presença de cisteína, o que permite o estudo da importância do impacto desse aminoácido na função desses análogos.

É importante ressaltar que as regiões utilizadas para a composição de quase todos os análogos são regiões conservadas nas bacteriocinas de classe IIa, o mesmo observado pela presença pontual das cisteínas nessa posição em diferentes peptídeos pertencentes à essa classe. Dessa forma, o estudo permite a investigação da importância dessas regiões e resíduos não somente no peptídeo de origem escolhido, mas também um indicativo da importância nas demais bacteriocinas que contém tais regiões.

Figura 4 - Estrutura primária dos peptídeos análogos (LeuC-Nt, LeuC-0Cys, LeuC-Ala14, LeuC-Ala9 e LeuC-Cys9,14) e do peptídeo de origem (LeuC-TA33a).

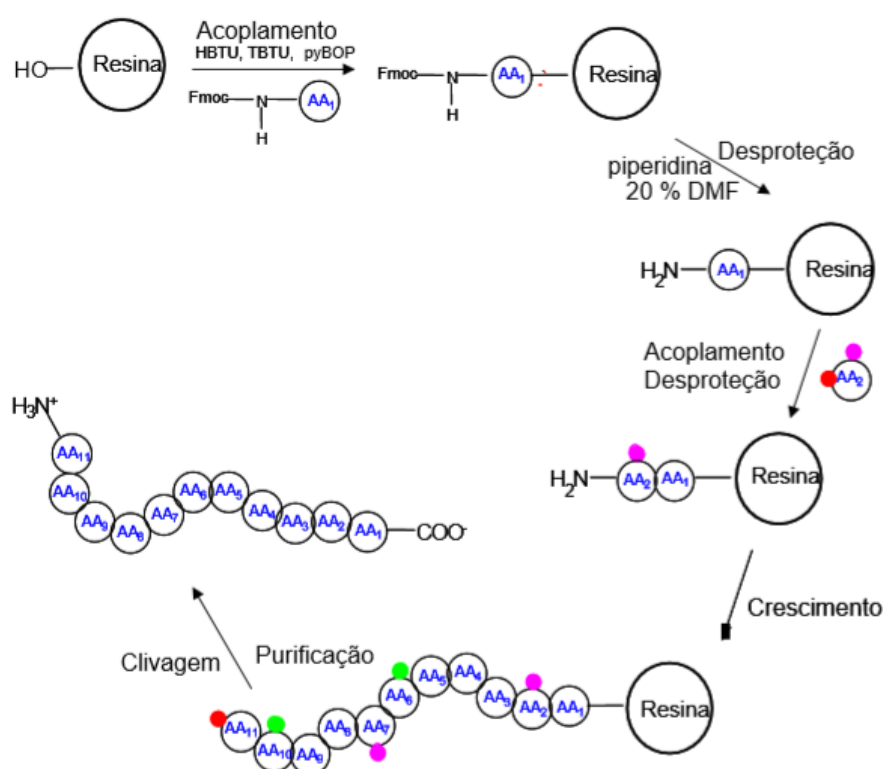
LeuC-Nt	¹ KNYGNGVH ⁸
LeuC-0Cys	¹ KNYGNGVH ⁸ ¹⁶ VDWGYAAT ²³
LeuC-Ala ₁₄	¹ KNYGNGVHCTKKGASVDWGYAAT ²³
LeuC-Ala ₉	¹ KNYGNGVHATKKGCSVDWGYAAT ²³
LeuC-Cys _{9,14}	¹ KNYGNGVHCTKKGCSVDWGYAAT ²³
LeuC-TA33a	¹ KNYGNGVHCTKKGCSVDWGYAATNIANN SVMNGLTG ³⁶

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2017.

3.2 Síntese

O procedimento de síntese peptídica seguiu a metodologia proposta por Merrifield (MERRIFIELD, 1963), que consiste no crescimento linear de uma cadeia peptídica a partir de um aminoácido ligado covalentemente a uma resina (suporte polimérico insolúvel), onde cada resíduo é adicionado sequencialmente, um por vez, a uma cadeia peptídica em formação. Diferentemente do que acontece na natureza, a síntese em fase sólida parte da extremidade C-terminal em direção à extremidade N-terminal, ou seja, cada resíduo é adicionado à extremidade N-terminal do peptídeo, ao contrário da adição na extremidade C-terminal que acontece na síntese nos ribossomos (MARCHETTO, 2006). A figura 5 exemplifica o procedimento de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida:

Figura 5 - Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS). Os círculos laterais representam os grupos protetores permanentes para cada grupo lateral de cada aminoácido (AA). Os círculos na extremidade à esquerda da cadeia representam os grupos protetores temporários do grupamento amina.



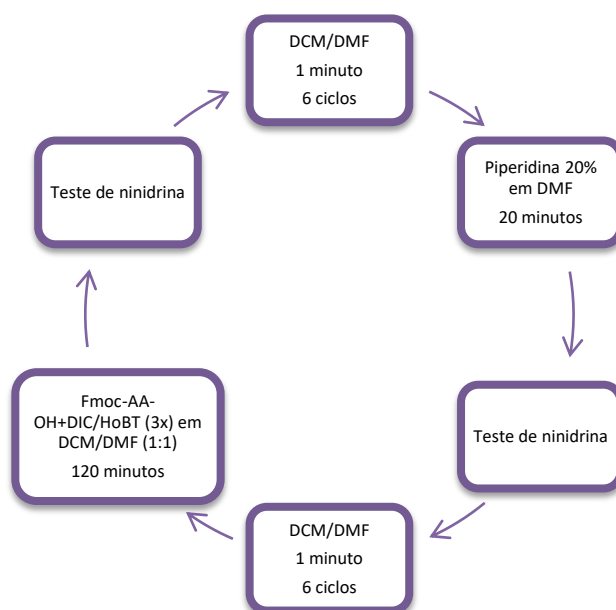
Fonte: GARRIDO, 2007.

Como ilustra a figura 5, para que os resíduos a serem adicionados sejam acoplados na região correta, ou seja, na extremidade N-terminal, utilizam-se grupos protetores tanto nas cadeias laterais reativas dos aminoácidos como nos aminoácidos a serem adicionados, evitando a geração de subprodutos indesejáveis e direcionando o acoplamento.

Neste trabalho utilizou-se a estratégia Fmoc, que consiste na utilização do grupamento base-lábel Fluorenilmetiloxicarboxil (Fmoc) como grupo protetor temporário para a extremidade N-terminal, o qual era removido nas etapas de desproteção com a aplicação de uma solução básica. No caso dos aminoácidos trifuncionais, foram utilizados os grupos terc-butil, tritil e terc-butiloxicarbonil para a sua proteção, os quais são ácidos-lábeis e somente foram removidos na etapa final de clivagem pela aplicação de uma solução ácida. Quanto às resinas utilizadas, ou seja, a fase polimérica contendo o primeiro aminoácido já acoplado, foram utilizadas resinas do tipo Wang.

Para se ter uma boa compreensão de como ocorre o procedimento de síntese utilizando a estratégia Fmoc aplicada, é necessário compreender as etapas de lavagem, desproteção, testes de ninidrina e acoplamento presente nesse procedimento. A figura 6 ilustra cada etapa do ciclo de inserção de um novo aminoácido durante a SPFS:

Figura 6 - Ciclo de inserção de um novo aminoácido seguindo a estratégia Fmoc durante a Síntese de Peptídeos em Fase Sólida.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

A primeira etapa do ciclo de síntese presente na figura 6 é a etapa denominada etapa de lavagem. Essa parte do procedimento consiste na lavagem da resina com os aminoácidos acoplados por meio do uso dos solventes dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM), com o intuito de se retirar algum subproduto formado durante a síntese ou para propiciar um aumento de tamanho na resina, processo denominado solvatação, ou seja, para que a resina possa melhor disponibilizar estericamente os grupos reativos envolvidos na formação da ligação peptídica entre dois aminoácidos.

Partindo do conhecimento de que o grupo Fmoc tem a característica de ser base-lável, o mesmo era removido da extremidade α -amino, conforme a necessidade de inserção de um novo aminoácido, utilizando-se uma solução de 20% (v/v) piperidina/dimetilformamida (DMF) (solução básica). Essa etapa de remoção do grupamento Fmoc era denominada desproteção e corresponde a segunda etapa presente na figura 6.

A terceira etapa do ciclo é a etapa do teste de ninidrina, que consiste na utilização de uma solução contendo o composto ninidrina, que em altas temperaturas reage com grupos amino livres, gerando um composto de cor azul. Caso a reação da ninidrina apresentasse uma coloração azulada, era evidenciada a presença de extremidades α -amino livres no peptídeo em formação, logo, o próximo passo era tomado na síntese.

A quarta etapa do ciclo corresponde à primeira etapa, onde novamente eram aplicados os solventes dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM) em seis ciclos, cada ciclo de um minuto, para se eliminar qualquer subproduto formado durante a etapa de desproteção, incluindo o excesso de solução básica aplicada na etapa 2.

A quinta etapa do ciclo, denominada etapa de acoplamento, consiste em uma etapa de inserção de um novo Fmoc-aminoácido à cadeia peptídica em formação. Como a única extremidade livre para a inserção era a extremidade N-terminal devido à etapa de desproteção, eram adicionados no recipiente contendo cada peptídeo em síntese, uma mistura de N, N-diisopropilcarbodiimida (DIC) / N-Hidroxibenzotriazol (HOBt), os quais são agentes ativadores do grupo α -carboxílico dos Fmoc-aminoácidos, para catalisar a formação da ligação peptídica. Nos casos em que a etapa de

acoplamento demonstrou maior dificuldade, uma mistura de O-(Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio hexafluorofosfato(HBTU) / N-Etildiisopropilamina (DIEA) foi utilizada para a ativação dos grupos α -carboxílicos dos Fmoc-aminoácidos.

Durante todas as etapas de acoplamento, foram utilizados três vezes de excesso molar de todos os reagentes (Fmoc-aminoácidos e agentes ativadores) em relação ao grupo amino da resina. A reação de acoplamento aconteceu por um período de, no mínimo, duas horas sob agitação.

Por fim, a sexta etapa da figura 6 consiste mais uma vez na etapa do teste de ninidrina. Dessa vez, se a coloração do teste apresentasse coloração amarelada, era evidenciada a ausência de grupos amino livres, evidenciando que a etapa de acoplamento do Fmoc-aminoácido ocorreu com sucesso e o próximo passo do ciclo era tomado. Caso contrário, se a coloração apresentasse a mesma cor do teste de desproteção (azul), era evidenciado que ainda haviam grupos amino livres e a etapa anterior (acoplamento) era realizada mais uma vez, até que o teste apresentasse coloração desejada (amarelada). Após o sucesso da sexta etapa era iniciado mais uma etapa de lavagem, correspondendo à primeira etapa do ciclo de inserção de um novo aminoácido.

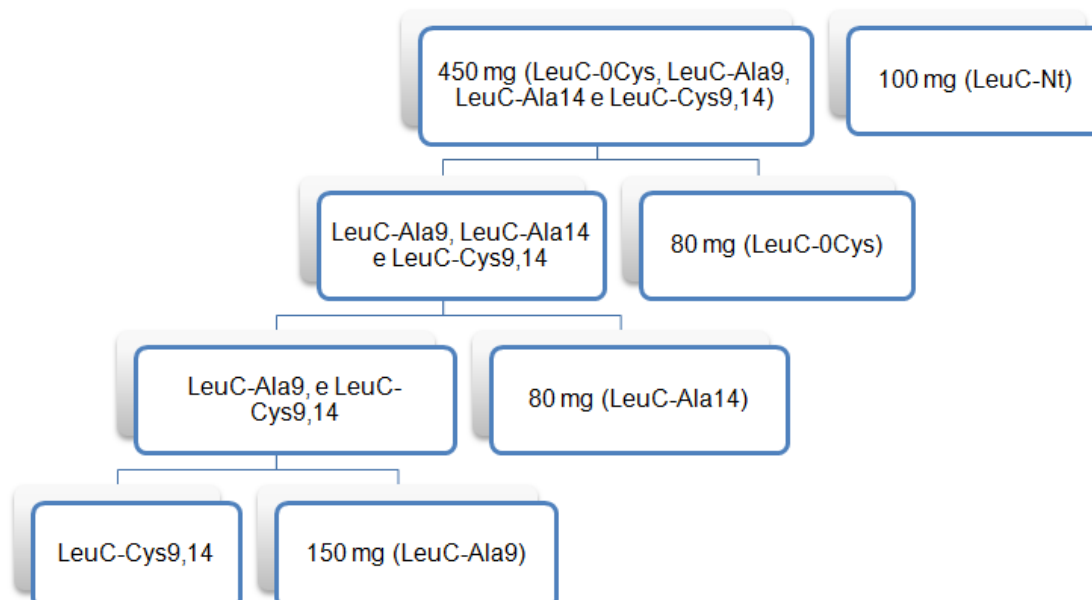
Para a síntese dos peptídeos deste trabalho, denominados como LeuC-OCys, LeuC-Ala9, LeuC-Ala14 e LeuC-Cys9,14 (Figura 4) foram utilizadas resinas Fmoc-Thr(tbu)-Wang com grau de substituição $0,60 \text{ mmol.g}^{-1}$. Para a síntese do peptídeo denominado LeuC-Nt (Figura 4), foi utilizado a resina Fmoc-His(Trt)-Wang com grau de substituição de $0,34 \text{ mmol.g}^{-1}$.

É interessante salientar que quatro dos cinco análogos sintetizados (a exceção do análogo LeuC-Nt) possuem uma região C-terminal em comum (vide a figura 4). Tendo em vista esses aspectos, optou-se por realizar uma série de sínteses em paralelo partindo-se de uma grande quantidade de resina de origem, ou seja, partiu-se de uma mesma quantidade de massa para produzir diferentes peptídeos devido aos mesmos possuírem muitos aminoácidos em comum na extremidade de origem (a partir da treonina na posição 23, no caso). A figura 7 permite uma melhor visualização dessa estratégia.

A síntese partiu inicialmente de 450 mg de resina Fmoc-Thr(tbu)-Wang em uma seringa para dar origem aos peptídeos LeuC-OCys, LeuC-Ala9, LeuC-

Ala14 e LeuC-Cys9,14, enquanto em outra seringa iniciou-se em paralelo a síntese do peptídeo LeuC-Nt (primeiro nível no fluxograma da figura 7) utilizando-se cerca de 100 mg de resina Fmoc-His(Trt)-Wang. Quando a síntese alcançou o aminoácido valina na posição 16, a massa da primeira seringa foi dividida, onde parte da mesma (80 mg) foi utilizada para a síntese do peptídeo LeuC-OCys em outra seringa e o restante permaneceu na seringa inicial para a síntese dos peptídeos LeuC-Ala9, LeuC-Ala14 e LeuC-Cys9,14 (segundo nível do fluxograma). Da mesma forma, quando a síntese alcançou o aminoácido serina na posição 15, a massa foi dividida mais uma vez, onde parte da resina (80 mg) foi utilizada para a síntese do peptídeo LeuC-Ala14 em mais uma seringa diferente e o restante permaneceu na seringa inicial para a síntese dos peptídeos LeuC-Ala9 e LeuC-Cys9,14 (terceiro nível do fluxograma). Por fim, quando a síntese alcançou o aminoácido timina na posição 10, a massa foi mais uma vez dividida, onde cerca de 150 mg de resina foram utilizadas para a síntese do análogo LeuC-Ala9 em mais uma nova seringa e o restante de massa permaneceu na seringa inicial para a síntese do peptídeo LeuC-Cys9,14 (quarto nível do fluxograma).

Figura 7 - Fluxograma da síntese em paralelo dos cinco peptídeos análogos.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

3.3 Clivagem

A etapa final para a obtenção do peptídeo após sua síntese, consiste no procedimento de clivagem, o qual promove a separação do peptídeo recém-formado da resina em que o mesmo estava ligado pela sua extremidade carboxila, além da remoção dos grupos protetores dos aminoácidos trifuncionais por meio da aplicação de uma solução ácida. Para tal procedimento, foi utilizado uma solução contendo água deionizada, triisopropilsilano (TIS) (Acros Organics®) e ácido trifluoracético (TFA) (Merck®) para os peptídeos que não continham o aminoácido cisteína em sua estrutura (LeuC-Nt e LeuC-OCys) e água deionizada, triisopropilsilano (TIS), etanoditiol (EDT) e ácido trifluoracético (TFA) para os peptídeos que continham cisteína em sua composição (LeuC-Ala9, LeuC-Ala14 e LeuC-Cys9,14). A composição da solução, bem como a proporção de cada reagente utilizada para a clivagem de cada um dos peptídeos é indicada na tabela 1.

Tabela 1 - Composição da solução de reação para o processo de clivagem. Cada componente da solução é representado pelo seu percentual na solução de clivagem. A quantidade de solução final de clivagem é especificada para cada peptídeo.

Peptídeos	Solução (%)				Solução Total (ml)
	TFA	TIS	H ₂ O	EDT	-
LeuC-Nt	95	2,5	2,5	-	1,4
LeuC-OCys	95	2,5	2,5	-	0,98
LeuC-Ala9	94	1	2,5	2,5	2,52
LeuC-Ala14	94	1	2,5	2,5	1,3
LeuC-Cys9,14	94	1	2,5	2,5	3,35

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2018.

A reação foi mantida sob agitação branda durante um período de 3 horas e a proporção de solução aplicada foi de 1 mL de solução de clivagem para cada 100 mg de peptídeo final obtido com a resina. Logo após esse período, a solução contendo cada peptídeo bruto foi submetida à precipitação pela adição de éter etílico gelado e, em seguida, centrifugada a 3000 RPM por 5 minutos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, totalizando três ciclos de aplicação de éter etílico e centrifugação. Logo após estes ciclos, o precipitado contendo cada peptídeo bruto (precipitado de coloração branca) foi

mantido sob repouso por um período “overnight” em capela sob fluxo de ar comprimido constante para a evaporação do excesso de solvente. Após esse período, uma solução aquosa de ácido acético 10% foi aplicada sobre o precipitado, seguida de uma centrifugação e filtração para extração do peptídeo bruto, o qual se encontra agora solubilizado no sobrenadante e não no precipitado. Houve a repetição desse ciclo de aplicação de solução de ácido acético, centrifugação e filtração mais três vezes, totalizando quatro ciclos desse procedimento para uma melhor extração do peptídeo bruto. Após esses ciclos, o sobrenadante foi submetido à evaporação dos solventes orgânicos residuais em um aparelho de evaporação rotativa e, em seguida, liofilizado, gerando um pó de coloração branca, o qual corresponde ao peptídeo no estado bruto que posteriormente foi submetido à purificação.

3.4 Purificação e caracterização

Após a etapa de clivagem dos peptídeos, os mesmos foram submetidos a uma avaliação prévia do conteúdo bruto para a verificação do perfil de cada peptídeo quanto ao grau de pureza e tempo de retenção, dado importante para o desenvolvimento de um método adequado para o procedimento de purificação.

O processo de purificação foi realizado por meio da utilização do método de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (FR-CLAE), onde o equipamento utilizado operou em modo semi-preparativo. O cromatógrafo utilizado foi o modelo Shimadzu LC-20AT, equipado com detector UV/VIS modelo SPD-20A, controlador e bomba. A coluna utilizada foi o modelo Júpiter Phenomenex C18 (250 x10 mm; diâmetro da partícula = 10 μ m; porosidade 300 Å) como fase estacionária, onde a faixa de gradiente aplicada variou entre 5% a 45% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) como fase móvel, em 90 minutos com fluxo de 3,0 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm e 280nm. Todos os solventes utilizados foram de grau cromatográfico e a água do tipo ultrapura.

Após a purificação dos peptídeos, efetuou-se a caracterização das frações por meio da utilização de espectrometria de massa. As análises foram feitas em modo de eletrospray positivo por injeção direta das amostras dos peptídeos puros em um espectrômetro de massas de modelo Ion Trap Amazon SL, da

marca Brucker®, além da utilização de CLAE acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray (LC/ESI-MS), possibilitando a determinação e identidade das amostras concomitantemente. Os dados obtidos experimentalmente (massa molecular) foram comparados com os valores teóricos calculados previamente para cada peptídeo de estudo.

3.5 Ensaios de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por meio da técnica de diluição em microplacas de 96 poços, utilizando como base a metodologia proposta pela norma M7-A6 (Clinical and Laboratory Standards institute) (NCCLS, 2003). Os orifícios utilizados na placa de 96 poços foram preenchidos com 80 µL de meio de cultura Mueller Hinton, 100 µL de solução contendo os peptídeos avaliados (25, 50 e 100 µM) e 20 µL de suspensão bacteriana testada. Nos poços de Controle Positivo (crescimento), foram utilizados 180 µL de meio de cultura e 20 µL de suspensão bacteriana e nos poços de Controle Negativo foram utilizados 80 µL de meio de cultura, 20 µL de suspensão bacteriana e 100 µL do antibiótico Ciprofloxacina (500 µM). As placas foram incubadas sob agitação a 37°C por 24 horas e após esse período foi feita uma leitura para cada placa em um aparelho de leitura ELISA utilizando o comprimento de onda de 595 nm. Os ensaios foram realizados em triplicatas para cada concentração de peptídeo avaliada e para cada bactéria testada.

As bactérias testadas em todas as concentrações dos peptídeos avaliadas nesse experimento foram: *Salmonella* sorotipo Typhimurium (ATCC 6539), *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644). As bactérias utilizadas foram obtidas por meio de doação do Laboratório de Micro-organismos de Referência da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Logo após serem retirados do armazenamento a -80°C, os micro-organismos foram transferidos para tubos de vidro estéreis contendo cerca de 9 mL de meio de cultura Mueller Hinton, incubados e colocados sob agitação (75 RPM à 37°C) durante 24 horas para estimular o crescimento dos mesmos. Depois desse período, os micro-organismos foram transferidos para placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton esterilizado e condicionados em freezer à -9°C, essa parte do

procedimento teve como objetivo a obtenção de um estoque viável de bactérias a serem testadas.

Para a obtenção das soluções de peptídeos testadas, foram utilizadas, por peptídeo, cerca de 1 mL de água deionizada e o correspondente de cada peptídeo em mg para que a solução final (solução padrão) tivesse a concentração final de 600 μ M. Como as concentrações avaliadas foram de 25, 50 e 100 μ M para cada peptídeo, foram realizadas uma série de diluições em água deionizada para que a alíquota aplicada (100 μ L de peptídeo) em cada poço correspondente apresentasse a concentração desejada, ou seja, a dose sempre apresentava o mesmo volume de 100 μ L, porém a concentração de peptídeo variava entre 25, 50 e 100 μ M por meio da diluição da solução padrão.

Para a realização de cada teste foi necessária a padronização da suspensão bacteriana a partir de uma cultura bacteriana de 24 horas em meio líquido (Mueller Hinton) para cada micro-organismo testado, colônias antes presentes nas placas de petri com meio sólido Mueller Hinton (colônias estoque) foram transferidas, por meio da utilização de uma alça estéril, para tubos de vidros estéreis contendo meio líquido e incubadas sob agitação (75 RPM à 37°C) para favorecer o seu crescimento.

Logo após esse período, cerca de 500 μ L de cada um dos tubos estocados por aproximadamente 24 horas contendo cada uma das bactérias foram transferidos para outros tubos estéreis contendo 5 ml de meio de cultura. Após a transferência dessas alíquotas, foi realizada uma leitura espectrofotométrica dessas amostras a um comprimento de onda de 620 nm para a confirmação da concentração bacteriana desejada. As leituras no espectrofotômetro deveriam estar na faixa entre 0,08 e 0,10, faixa que corresponde ao Padrão de McFarland 0,5, ou seja, que indicava que as amostras de bactérias que foram testadas continham cerca de $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/ml.

3.6 Cálculo da viabilidade dos micro-organismos

Com as medidas espectrofotométricas obtidas para cada peptídeo em relação a cada concentração testada por bactérias avaliada, a determinação da viabilidade microbiana foi obtida através de uma fórmula matemática, o cálculo

de porcentagem de inibição do crescimento microbiano (GUDIÑA *et al.*, 2010), que pode ser descrita pela seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição de crescimento microbiano} = [1 - (Ac/A0)] \times 100$$

No qual **Ac** representa a média das absorbâncias por concentração de peptídeo testado, onde o mesmo já apresenta a subtração do valor da absorbância obtida para cada concentração de peptídeo sem a adição de inóculo e **A0** a média das absorbâncias do controle de crescimento microbiano sem a substância em avaliação quanto ao seu efeito (que no caso do experimento foi o controle positivo para crescimento).

3.7 Ensaio de toxicidade dos peptídeos: estudos de atividade hemolítica

Os testes de atividade hemolítica foram executados com a finalidade de se avaliar se os peptídeos análogos sintetizados demonstravam algum indício de toxicidade em células eucarióticas. Tendo em vista esse objetivo, os testes foram executados de acordo com o protocolo modificado de Onuma e colaboradores (ONUMA *et al.*, 1999).

Inicialmente, uma amostra de cerca de 3 mL de sangue de um doador foi coletada para a realização dos testes. Tal amostra foi lavada 3 vezes, utilizando-se o tampão fosfato salino (PBS) (35 mmol/L fosfato de sódio; 0,15 mol/L de cloreto de sódio) com um pH em torno de 7,4. O precipitado resultante das lavagens (cerca de 50 µL) era então transferido para um tubo do tipo eppendorf contendo cerca de 950 µL de tampão PBS. Tal solução final obtida (precipitado + tampão PBS) foi a solução de eritrócitos utilizada nos testes de determinação de taxa hemolítica.

Os peptídeos utilizados para a avaliação de sua atividade hemolítica foram os análogos LeuC-Nt, LeuC-OCys, LeuC-Ala9 e LeuC-Cys9,14. A concentração avaliada de cada peptídeo foi de 100 µM. Os controles utilizados nos testes foram o controle positivo para hemólise (solução de Triton X-100 1% em tampão PBS) e o controle negativo para hemólise (solução de tampão PBS).

Para a realização dos ensaios hemolíticos, foram transferidos para tubos eppendorf cerca de 100 µL de peptídeo, juntamente com cerca de 100 µL de

solução de hemácias. Os tubos de controle positivo continham cerca de 100 µL de solução de Triton 1% e 100 µL de solução de hemácias e os tubos de controle negativo continham cerca de 100 µL solução de tampão PBS e 100 µL de solução de hemácias. O período de incubação dos tubos durou aproximadamente 1 hora a 37°C. Os ensaios foram realizados em duplicatas para cada peptídeo avaliado e para cada teste realizado.

Após o período de incubação, o conteúdo de cada tubo foi centrifugado por volta de 3 minutos a 3000 RPM e uma alíquota de 100 µL do sobrenadante de cada amostra e controle foram transferidas para microplacas de 96 poços. Após a transferência, foi realizada leitura em comprimento de onda de 540 nm, utilizando-se um leitor de placas (BioTek, modelo Epoch). Para o cálculo da taxa de hemólise utilizou-se a seguinte equação:

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

3.8 Dicroísmo Circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD, de *Circular Dicroism*) é um método de análise de moléculas quirais, como proteínas, polipeptídeos, peptídeos e biopolímeros e é utilizada desde a década de 60. Parte do princípio de que qualquer molécula assimétrica possui diferenças na absorção de luz circularmente polarizada da esquerda em relação à direita, onde essa diferença observada é justamente a medida dessa espectroscopia. Por definição é o levantamento de informações físico-químicas de certo sistema através da transmissão, reflexão e absorção da energia radiante, que no caso do dicroísmo circular, é a faixa de radiação ultravioleta (NELSON; COX, 2014; VERLI, 2014; WHITMORE; WALLACE, 2008).

Em proteínas, polipeptídeos e peptídeos, a estrutura secundária pode ser definida por meio da análise dos espectros resultantes dos diferentes ângulos presentes nas ligações dessas biomoléculas (ângulos Φ e ψ). Tendo essa informação como base e o conhecimento de que cada estrutura secundária proteica possui um espectro característico, é possível definir as estruturas de α -

hélice, folha β e estruturas randômicas aplicando-se a espectroscopia de dicroísmo circular para gerar tais informações (NELSON; COX, 2014; WHITMORE; WALLACE, 2008).

Para a estrutura em α -hélice, os espectros de CD possuem duas fortes bandas negativas nas faixas de 208 e 222 nm, além de uma forte banda positiva na faixa de 190 nm. Já para a estrutura em folha β , os espectros de CD possuem uma banda de absorbância negativa na faixa em torno de 217 nm e uma positiva na faixa que varia entre 195 a 200 nm. Por fim, as estruturas randômicas possuem espectros de CD com uma forte banda negativa em torno de 200 nm (VERLI, 2014).

Tendo como base essas informações, as estruturas secundárias de cada peptídeo análogo sintetizado no projeto foram obtidas pela utilização da espectroscopia de dicroísmo circular, utilizando o equipamento Jasco J-815, o qual pertence ao laboratório multiusuário do Instituto de Química UNESP de Araraquara. Para a análise de cada peptídeo, utilizou-se a concentração de 15 μ M, tendo um volume final na cubeta de análise em torno de 500 μ L. Os espectros foram gerados com acúmulo de 6 varreduras entre as faixas de 190 e 280 nm. As condições dos ensaios utilizadas para as análises foram: tampão HEPES 1 mM, solução 60% TFE (2,2,2-trifluoroetanol) e 40% tampão HEPES 1mM e meio de SDS 15 mM, aplicando-se uma temperatura em torno de 25°C para todos os ensaios.

3.9 Modelagem Molecular e caracterização físico-química

Foram realizados trabalhos de modelagem molecular e caracterização físico-química dos peptídeos sintetizados por meio da aplicação de ferramentas disponíveis na web, onde a modelagem molecular foi executada por meio da utilização de ferramentas presentes no site “*Pepfold3*” (LAMIABLE *et al.*, 2016) e a caracterização físico-química por meio da utilização de opções presentes no site “*Peptide Calculator*” (INNOVAGEN, 2015).

As informações obtidas tanto na predição de estrutura tridimensional quanto na caracterização físico-química serão utilizadas para o desenvolvimento de uma melhor discussão dos resultados, conflitando as mesmas com os dados obtidos por dicroísmo circular e sua correlação com a taxa de inibição microbiana observada.

3.10 Análise estatística

O trabalho estatístico realizado nos dados experimentais foi executado por meio da utilização da ferramenta ANOVA (Análise de Variância, One Way) que permite verificar se há uma diferença estatística significativa entre as médias dos grupos avaliados, ou seja, utilizando-se essa ferramenta, é possível inferir nos dados experimentais se há alguma diferença estatística entre os grupos controles e os peptídeos testados, permitindo assim a verificação da presença ou não da eficácia das diferentes concentrações dos diferentes análogos em cada bactéria quanto à inibição de seu crescimento.

Para a aplicação desse importante método estatístico, vale salientar que os dados devem se apresentar em distribuição normal, ou seja, os valores devem se distribuir segundo uma curva gaussiana. Logo, dados que apresentaram grande desvio não foram considerados, já que podem estar relacionados a erros experimentais como, por exemplo, erros de pipetagem tanto das soluções contendo os peptídeos, quanto do inóculo contendo as bactérias. Assim, com a distribuição normal dos grupos avaliados em cada bactéria, o método ANOVA foi aplicado considerando um nível de significância de 5%.

Por se tratar de um método que só permite saber se há diferença significativa entre os grupos e não quais são os grupos diferentes entre si, além do método ANOVA, foi aplicado também o teste T com o mesmo nível de significância (5%) tanto para se avaliar a diferenciação ou não das concentrações testadas em relação ao grupo controle, quanto da diferenciação ou não das concentrações testadas entre si, permitindo assim identificar isoladamente quais concentrações de fato tiveram efeito de inibição significativamente.

Para demonstrar tais diferenças, utilizou-se as letras a, b, c ou d, como forma de se evidenciar tais diferenças entre cada grupo controle e as concentrações dos peptídeos utilizadas (100, 50 e 25 μ M). Tanto para a aplicação do método ANOVA quanto do Teste T, foram utilizadas ferramentas disponíveis no programa Microsoft Excel 2007 e no programa estatístico Past3.

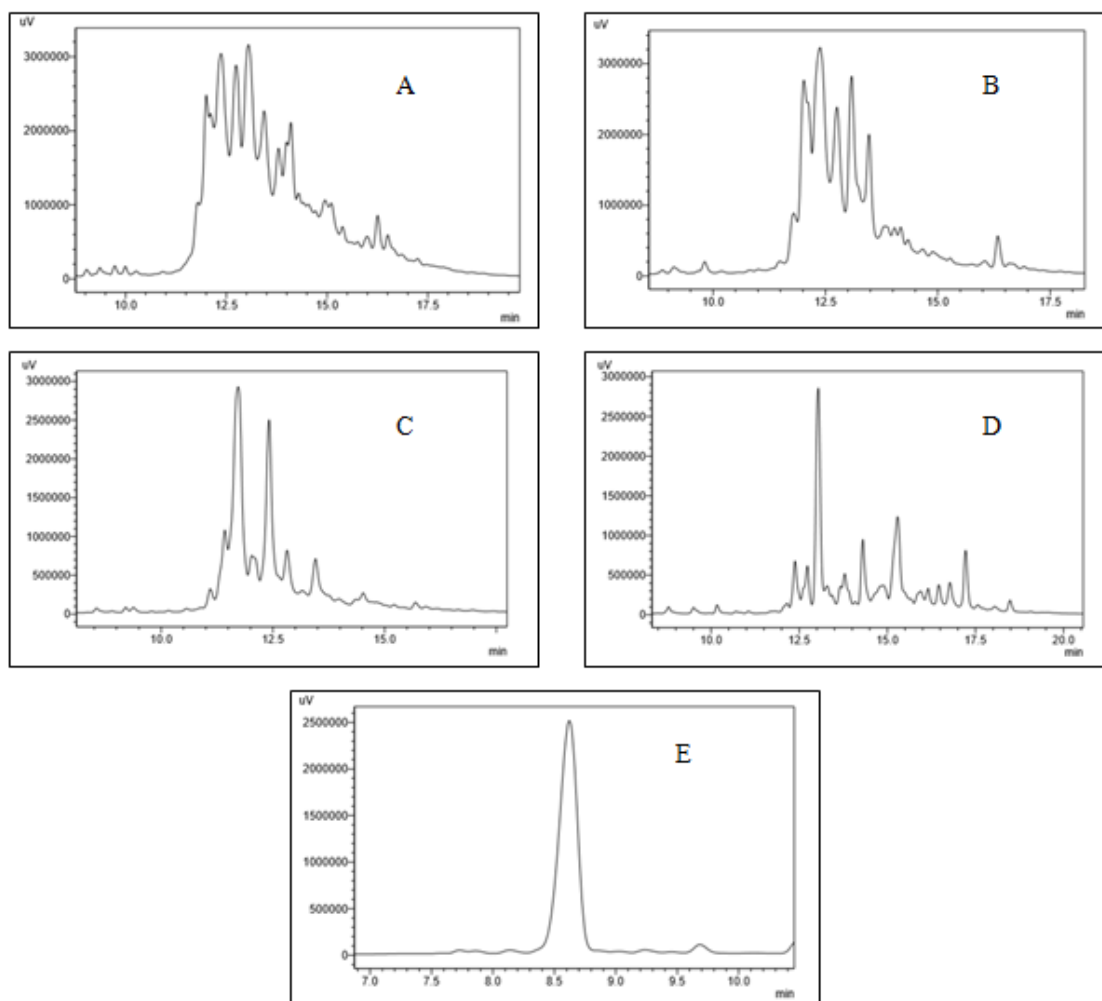
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese, purificação e caracterização

A etapa de síntese peptídica teve como resultado a obtenção de cerca de 335 mg do peptídeo LeuC-Cys9,14, 130 mg do peptídeo LeuC-Ala14, 252 mg do peptídeo LeuC-Ala9, 95 mg do peptídeo LeuC-OCys e 130 mg do peptídeo LeuC-Nt. É importante ressaltar que em cada um dos casos, a massa final obtida é referente à resina contendo o peptídeo formado, ou seja, que não sofreu o processo de clivagem e remoção dos grupos permanentes.

Os perfis dos cromatogramas dos peptídeos brutos obtidos após o processo de clivagem podem ser observados na Figura 8.

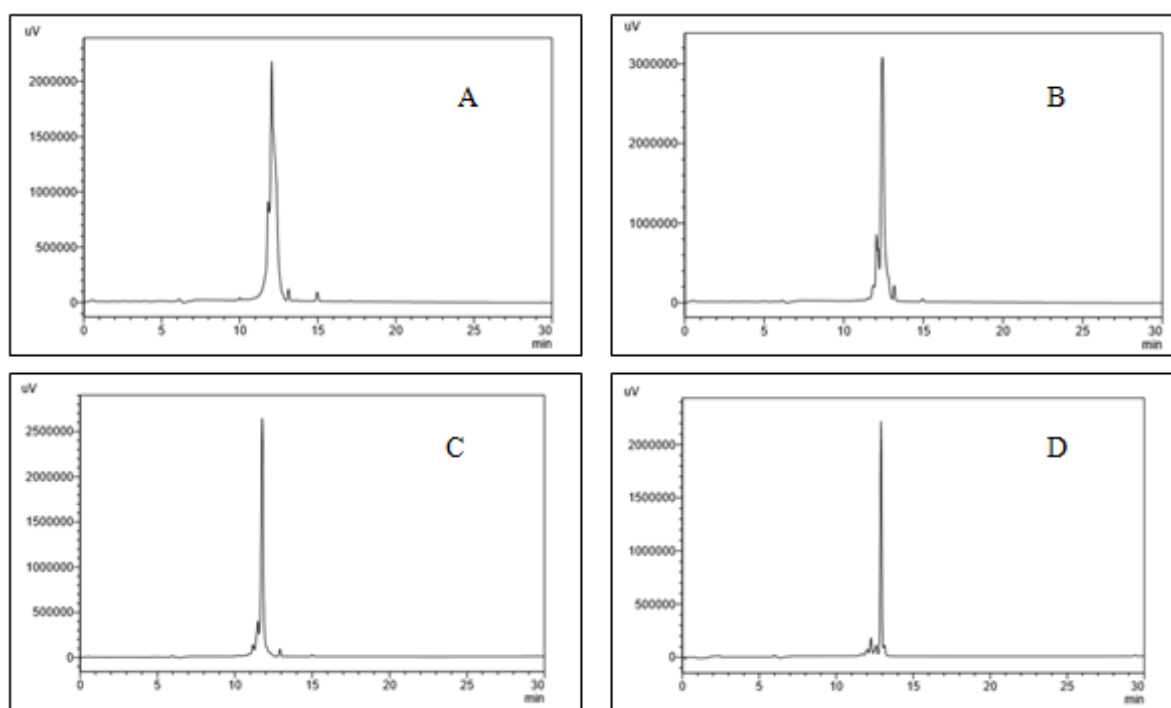
Figura 8 - Cromatogramas referentes aos peptídeos no estado bruto: (A) LeuC-Cys9,14; (B) LeuC-Ala9; (C) LeuC-Ala14; (D) LeuC-OCys e (E) LeuC-Nt.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2018.

Apenas o análogo LeuC-Nt apresentou um grau de pureza acima de 90% (dado esse confirmado por análise do extrato bruto em espectrometria de massa), representado pelo pico único majoritário no cromatograma (Figura 8E). Por este motivo, o mesmo não precisou ser submetido a uma posterior etapa de purificação. Os perfis dos cromatogramas dos peptídeos após a purificação podem ser observados na Figura 9.

Figura 9 - Cromatogramas referentes aos peptídeos purificados: (A) LeuC-Cys9,14; (B) LeuC-Ala9; (C) LeuC-Ala14 e (D) LeuC-0Cys.



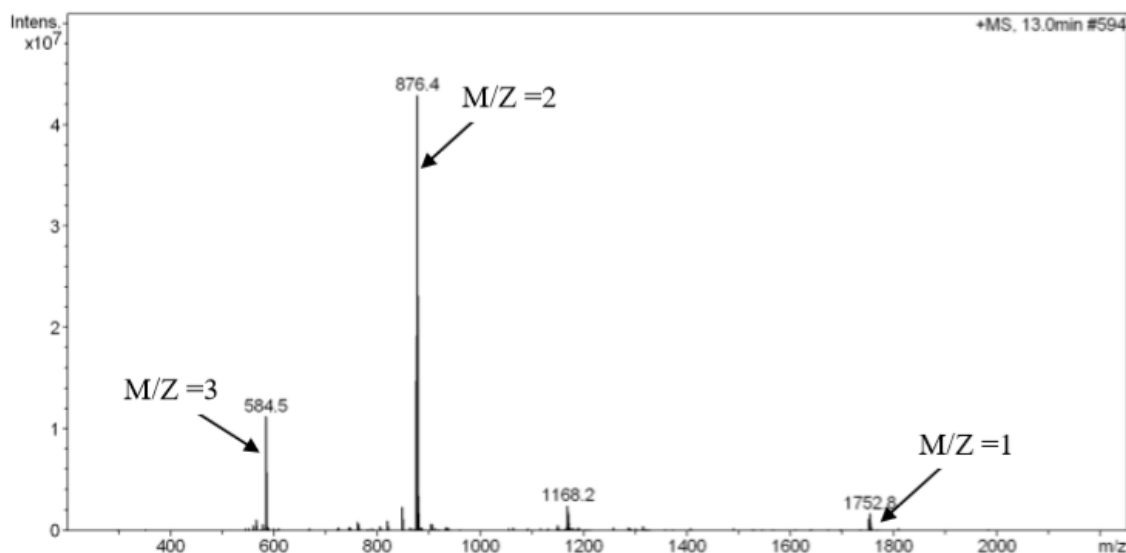
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2018.

Após a purificação dos peptídeos, efetuou-se a caracterização das frações por meio da utilização de espectrometria de massa. Como pode ser observado nos cromatogramas da Figura 9, mesmo após a purificação, os picos apresentaram um certo grau de impureza. No entanto, a confirmação por meio de análise de espectrometria de massas nos permitiu ter a certeza da presença majoritária do peptídeo de interesse.

Um exemplo do espectro de massas obtido para o peptídeo LeuC-0Cys pode ser observado na Figura 10. Os dados obtidos experimentalmente (massa molecular) foram comparados com os valores teóricos calculados previamente para cada peptídeo de estudo (tabela 2). Com os valores das massas obtidas

experimentalmente por espectrometria de massas, foi possível concluir que quase todos os peptídeos sintetizados foram obtidos com sucesso podendo dessa forma serem utilizados nas etapas posteriores do trabalho.

Figura 10 - Espectro de massa do peptídeo LeuC-OCys purificado. O sinal de maior intensidade (876,4) é referente ao sinal com relação massa/carga (M/Z) igual a 2.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2018.

Tabela 2 - Massa Molecular teórica e experimental dos peptídeos análogos sintetizados.

Peptídeos	Massa Teórica (g/mol)	Massa Experimental (g/mol)
LeuC-Nt	887,94	888,4
LeuC-OCys	1751,85	1752,8
LeuC-Ala 09	2427,65	2429,2
LeuC-Ala 14	2427,65	2429
LeuC-Cys 9,14	2459,72	2461,2

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2018.

À exceção dos outros análogos, o peptídeo LeuC-Ala14 foi obtido em estado puro, porém em baixa quantidade. Duas tentativas adicionais de síntese foram desempenhadas para que o mesmo fosse obtido novamente e, infelizmente, os extratos brutos possuíram uma quantidade muito alta de impurezas, inviabilizando em tempo hábil a sua purificação e, conseqüentemente, o seu uso em múltiplos ensaios de inibição de crescimento

microbiano, além dos estudos de citotoxicidade. Devido a esse fato e a baixa quantidade obtida, tal análogo foi submetido à apenas um ensaio em duplicata de inibição bacteriano e à avaliação de estrutura por dicroísmo circular, o que resultou em uma baixa disponibilidade de informações a seu respeito e, consequentemente, a inviabilização de uma boa avaliação sobre sua atividade e correlação com sua estrutura. Por esses fatores, optou-se por não utilizar suas informações na discussão desse trabalho.

4.2 Desempenho dos peptídeos análogos quanto à inibição de crescimento microbiano

Com base nos dados obtidos por meio da análise estatística e da utilização do cálculo de porcentagem de inibição de crescimento microbiano, foi possível estimar quais concentrações foram eficazes quanto à inibição (no que diz respeito a sua diferenciação ao nível de significância de 5% em relação ao grupo controle positivo de crescimento), quanto a sua eficiência (em termos de porcentagem de inibição), além da diferenciação ou não entre as concentrações testadas dos peptídeos (100, 50 e 25 μ M).

Tendo em vista esses parâmetros, foi possível verificar quais peptídeos tiveram os melhores desempenhos em relação à concentração aplicada e à espécie do micro-organismo trabalhado. É importante ressaltar que as concentrações mínimas de 100, 50 e 25 μ M foram estipuladas devido ao baixo rendimento da massa obtida dos peptídeos após a purificação (cerca de 3 a 6 mg por peptídeo purificado). Por este motivo, foi planejado a utilização de concentrações que pudessem realizar os testes de inibição de crescimento em triplicata, obtendo uma quantidade de dados suficiente. Além disso, seria necessário a reserva de uma certa quantidade de peptídeos para executar estudos de espectroscopia por dicroísmo circular e avaliação de citotoxicidade.

Devido à pouca quantidade de massa obtida do peptídeo LeuC-Ala14 em sua forma pura, pelo motivo já mencionado, o mesmo não foi posto sobre efeito comparativo com os demais análogos.

As figuras e tabelas abaixo representam os valores das porcentagens de inibição de crescimento obtidas para cada um dos peptídeos e para cada espécie de bactéria testada.

Tabela 3 - Percentuais de inibição referentes os ensaios do peptídeo análogo LeuC-Cys9,14 contra *Salmonella* sorotipo Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*.

Peptídeo LeuC-Cys9,14					
<i>Salmonella</i> sorotipo Typhimurium			<i>Staphylococcus aureus</i>		
Grupo	% Inibição	Teste T	Grupo	% Inibição	Teste T
C+	-	a	C+	-	a
100 µM	32% ± 0,06	b	100 µM	4% ± 0,12	a
50 µM	21% ± 0,18	b	50 µM	7% ± 0,10	a
25 µM	22% ± 0,07	b	25 µM	0% ± 0,12	a
<i>Escherichia coli</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>		
Grupo	% Inibição	Teste T	Grupo	% Inibição	Teste T
C+	-	a	C+	-	a
100 µM	38% ± 0,24	b	100 µM	67% ± 0,22	b
50 µM	21% ± 0,09	b	50 µM	45% ± 0,09	c
25 µM	19% ± 0,07	b	25 µM	47% ± 0,06	c

Letras diferentes representam diferença estatística com nível de significância de 5% entre os grupos avaliados.

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Tabela 4 - Percentuais de inibição obtidos os ensaios do peptídeo análogo LeuC-Ala9 contra *Salmonella* sorotipo Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*.

Peptídeo LeuC-Ala9					
<i>Salmonella</i> sorotipo Typhimurium			<i>Staphylococcus aureus</i>		
Grupo	% Inibição	Teste T	Grupo	% Inibição	Teste T
C+	-	a	C+	-	a
100 µM	19% ± 0,05	b	100 µM	24% ± 0,12	b
50 µM	26% ± 0,04	b	50 µM	12% ± 0,09	a
25 µM	15% ± 0,06	b	25 µM	9% ± 0,09	a
<i>Escherichia coli</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>		
Grupo	% Inibição	Teste T	Grupo	% Inibição	Teste T
C+	-	a	C+	-	a
100 µM	20% ± 0,04	b	100 µM	30% ± 0,02	b
50 µM	12% ± 0,03	b	50 µM	20% ± 0,11	b
25 µM	9% ± 0,08	a	25 µM	19% ± 0,13	b

Letras diferentes representam diferença estatística com nível de significância de 5% entre os grupos avaliados.

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Tabela 5 - Percentuais de inibição obtidos os ensaios do peptídeo análogo LeuC-0Cys contra *Salmonella* sorotipo Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*.

Peptídeo LeuC-0Cys					
<i>Salmonella</i> sorotipo Typhimurium			<i>Staphylococcus aureus</i>		
Grupo	% Inibição	Teste T	Grupo	% Inibição	Teste T
C+	-	a	C+	-	a
100 µM	45% ± 0,07	b	100 µM	27% ± 0,10	b
50 µM	43% ± 0,09	b	50 µM	29% ± 0,11	b
25 µM	55% ± 0,21	b	25 µM	25% ± 0,10	b
<i>Escherichia coli</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>		
Grupo	% Inibição	Teste T	Grupo	% Inibição	Teste T
C+	-	a	C+	-	a
100 µM	17% ± 0,03	b	100 µM	20% ± 0,03	b
50 µM	17% ± 0,02	b	50 µM	16% ± 0,05	a
25 µM	18% ± 0,03	b	25 µM	10% ± 0,05	a

Letras diferentes representam diferença estatística com nível de significância de 5% entre os grupos avaliados.

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Tabela 6 - Percentuais de inibição obtidos os ensaios do peptídeo análogo LeuC-Nt contra *Salmonella* sorotipo Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*.

Peptídeo LeuC-Nt					
<i>Salmonella</i> sorotipo Typhimurium			<i>Staphylococcus aureus</i>		
Grupo	% Inibição	Teste T	Grupo	% Inibição	Teste T
C+	-	a	C+	-	a
100 µM	16% ± 0,07	b	100 µM	25% ± 0,14	b
50 µM	21% ± 0,06	b	50 µM	8% ± 0,08	a
25 µM	11% ± 0,07	b	25 µM	10% ± 0,11	a
<i>Escherichia coli</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>		
Grupo	% Inibição	Teste T	Grupo	% Inibição	Teste T
C+	-	a	C+	-	a
100 µM	2% ± 0,04	a	100 µM	18% ± 0,10	b
50 µM	3% ± 0,08	a	50 µM	18% ± 0,08	b
25 µM	0% ± 0,08	a	25 µM	12% ± 0,08	a

Letras diferentes representam diferença estatística com nível de significância de 5% entre os grupos avaliados.

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

A análise dos resultados revelaram que o peptídeo LeuC-Cys9,14 (tabela 3) apresentou efeito de inibição contra as bactérias *Salmonella* sorotipo Typhimurium, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, não apresentando, segundo uma análise com 95% de confiabilidade, inibição contra bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*, o que pode ser verificado por meio da observação da não diferença significativa entre o grupo controle e as concentrações aplicadas e os baixos percentuais de inibição obtidos em cada concentração do peptídeo.

Contra as duas bactérias Gram-negativas (*Salmonella* sorotipo Typhimurium e *Escherichia coli*), todas as concentrações aplicadas (25, 50 e 100 μ M) tiveram efeito de inibição, porém, quando comparadas entre as mesmas, verificou-se que não houve diferença significativa entre suas atividades. Nas concentrações de 25 e 50 μ M, tal análogo apresentou cerca de 20% de inibição contra essas espécies. Com a concentração de 100 μ M, a porcentagem de inibição passou para cerca de 35%. Apesar de não ser uma porcentagem alta de inibição, devemos considerar aqui que este peptídeo apresentou inibição de duas espécies Gram-negativas, inclusive a *Salmonella* sorotipo Typhimurium, o qual apresenta maior resistência à agentes antimicrobianos. Neste sentido, a aplicação deste peptídeo em conjunto com outro peptídeo antimicrobiano ou mesmo outro agente de conservação de alimentos, pode representar um aspecto vantajoso para este composto.

Contra as bactérias da espécie *Listeria monocytogenes*, o análogo LeuC-Cys9,14 apresentou efeito de inibição em todas as concentrações testadas, diferenciando-se das demais atividades de inibição por apresentar o maior percentual observado na concentração de 100 μ M (65% de inibição), além do fato de que duas concentrações apresentaram diferença significativa importante: tanto a concentração de 100 μ M quanto a concentração de 50 μ M obtiveram diferença significativa entre si e entre o grupo controle, ressaltando que não houve diferença significativa de atividade de inibição entre as concentrações de 50 e 25 μ M, o que pode ser facilmente observado pela proximidade do percentual de suas inibições. Logo, sua aplicação é interessante contra essa bactéria Gram-positiva tanto na concentração de 100 μ M quanto na concentração de 25 μ M (por apresentar o mesmo efeito da concentração de 50 μ M, de um ponto de vista estatístico).

Com isso podemos observar que mesmo em proporções distintas, este peptídeo possui múltipla ação contra bactérias do tipo Gram-negativo e Gram-positivo, o que representa uma característica desejável do termo de vista da aplicação para a qual foi proposto, a de bioconservante de alimentos.

Os resultados de inibição do peptídeo LeuC-Ala9 (tabela 4) mostram que tal peptídeo teve efeito inibitório contra todas as bactérias testadas, em pelo menos uma das concentrações aplicadas. Contra *Salmonella* sorotipo Typhimurium, todas as concentrações testadas tiveram efeito inibitório, porém estatisticamente, não possuem diferença significativa entre si, ou seja, todas as concentrações avaliadas possuem o mesmo efeito de inibição de um ponto de vista estatístico. O mesmo foi observado nos ensaios contra a bactéria *Listeria monocytogenes*, com a diferença, nesse caso, de possuir um percentual de inibição maior (em valores absolutos) em relação ao observado nos ensaios com *Salmonella* sorotipo Typhimurium (o maior percentual observado foi de 30% de inibição com a concentração de 100 μ M contra *Listeria monocytogenes*, em comparação com os 19% de inibição observados com a mesma concentração contra *Salmonella* sorotipo Typhimurium).

Contra *Staphylococcus aureus*, a única concentração que apresentou significativamente diferença para o grupo controle e para os demais foi a concentração de 100 μ M, ou seja, foi a única que estatisticamente apresentou efeito de inibição. As demais concentrações não foram diferentes entre si e entre o grupo controle, além de apresentarem percentual de inibição muito abaixo da concentração de 100 μ M. Por fim, contra a bactéria *Escherichia coli*, tal peptídeo teve efeito de inibição nas concentrações de 100 e 50 μ M, não havendo diferença estatística entre as duas concentrações.

Os resultados referentes ao análogo LeuC-OCys (tabela 5) mostraram que houve efeito de inibição contra todas as bactérias testadas. No caso das bactérias *Salmonella* sorotipo Typhimurium, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, as três concentrações aplicadas possuíram efeito inibitório, porém, estatisticamente, não tiveram diferenças significantes entre si, ou seja, todas as concentrações aplicadas nessas bactérias tiveram o mesmo efeito de inibição. O que pode ser evidenciado nesses casos é a faixa de inibição exibida por cada uma das concentrações aplicadas, onde em *Salmonella* sorotipo Typhimurium variou entre 45 e 55% de inibição, em *Escherichia coli* entre 17 e

18% e *Staphylococcus aureus* entre 25 e 29% para todas as concentrações aplicadas. Em relação a bactéria *Listeria monocytogenes*, somente a concentração de 100 μ M apresentou efeito inibitório, com um percentual de inibição em torno de 20%.

Por fim, os resultados referentes ao peptídeo LeuC-Nt (tabela 6) demonstraram efeitos variados dependendo da bactéria avaliada. Em *Salmonella* sorotipo Typhimurium todas as concentrações possuíram efeito inibitório (diferenciação do grupo controle), porém, estatisticamente, não são diferentes entre si, logo, possuem o mesmo efeito de inibição na faixa entre 11 e 21%. Em *Staphylococcus aureus* somente a concentração de 100 μ M apresentou efeito inibitório, em torno de 25%. Contra bactérias da espécie *Escherichia coli*, esse mesmo peptídeo não apresentou nenhum efeito significativo de inibição, não havendo diferenciação entre as concentrações e o grupo controle trabalhado, além dos percentuais de inibição exibirem valores próximos de 0%. Por fim, contra a bactéria da espécie *Listeria monocytogenes*, as concentrações que apresentaram efeito inibitório foram as concentrações de 100 e 50 μ M, não havendo estatisticamente diferença entre as mesmas possuindo mesmo efeito de inibição em torno de 18%.

4.3 Ensaio de toxicidade dos peptídeos: estudos de atividade hemolítica

Como o trabalho visa o estudo da correlação entre estrutura e função de peptídeos miméticos para o desenvolvimento de biomoléculas que podem ser utilizadas como conservantes de alimentos, é imprescindível que haja estudos de citotoxicidade desses análogos para a avaliação do percentual de toxicidade desses peptídeos contra células eucariontes, garantindo que aqueles peptídeos que possam ser propostos como bioconservantes, não sejam agressivos ou citotóxicos para o suposto consumidor final do alimento contendo este supostos bioconservantes.

Os ensaios de atividade hemolítica foram realizados com a finalidade de se avaliar a toxicidade dos peptídeos sintetizados em eritrócitos humanos. Este teste seguiu o protocolo aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com humanos (protocolo de nº 46212515.0.0000.5398). A tabela 7 contém os dados

provenientes dessa avaliação. É importante ressaltar que apenas a concentração de 100 μM foi utilizada nesse teste, pois segundo o observado nos testes de inibição, ou apenas essa concentração teve de fato efeito de inibição no crescimento bacteriano ou tal concentração teve o efeito muito próximo, pelas análises estatísticas, de inibição em relação às outras concentrações aplicadas (50 e 25 μM). Além disso, com a aplicação da maior concentração testada, buscou-se também atingir as maiores taxas hemolíticas possíveis, estipulando-se um percentual máximo de citotoxicidade a ser observado por peptídeo.

Tabela 7 - Percentuais de atividade hemolítica dos peptídeos análogos LeuC-Nt, LeuC-OCys, LeuC-Ala9 e LeuC-Cys9,14.

Peptídeo	Concentração	% Hemólise
LeuC-Nt	100 μM	13% $\pm$ 0,03 ^a
LeuC-OCys	100 μM	15% $\pm$ 0,03 ^a
LeuC-Ala9	100 μM	12% $\pm$ 0,07 ^a
LeuC-Cys9,14	100 μM	14% $\pm$ 0,09 ^a

Médias seguidas pela mesma letra evidenciam a não diferença significativa a nível de significância de 5%. O teste estatístico aplicado foi o teste T.

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Como é possível observar, os percentuais de atividade hemolítica da maior concentração aplicada para todos os peptídeos avaliados estiveram abaixo de 20%, não havendo diferença significativa entre eles. Tal faixa percentual é considerada mínima, estando dentro do valor de segurança (OLIVEIRA, 2014).

Os percentuais expostos mostram que os peptídeos análogos sintetizados possuem baixa atividade hemolítica, informações que podem potencialmente ser utilizadas para a construção de peptídeos capazes de serem utilizados como conservantes de alimentos. Porém, são necessários outros testes detalhados de citotoxicidade para a garantia de que tais biomoléculas de fato não sejam tóxicas ao organismo que irá ingeri-las.

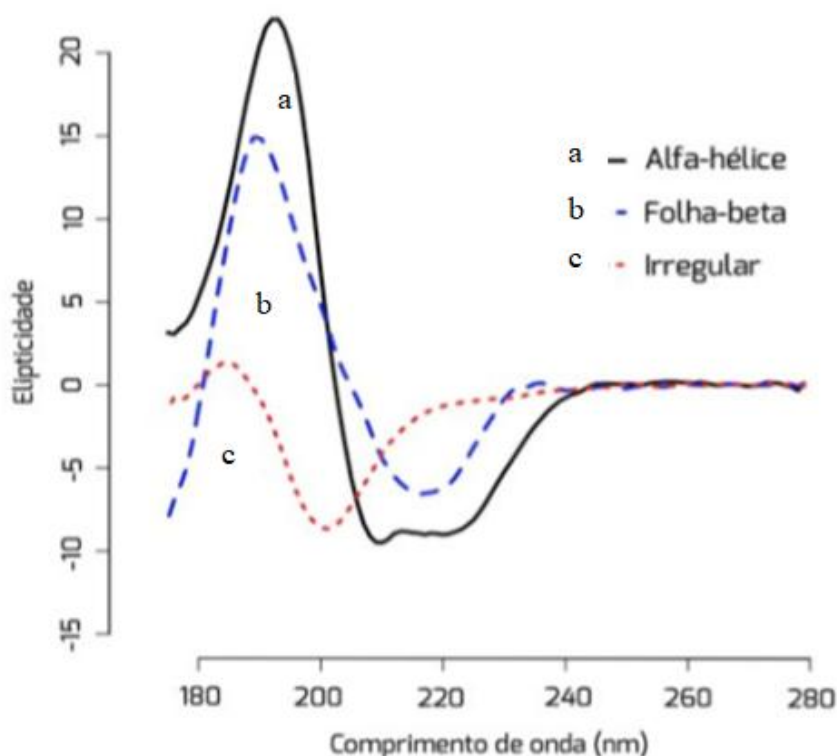
4.4 Dicroísmo Circular

A espectroscopia por dicroísmo circular (CD) foi utilizada nesse trabalho para a predição da estrutura secundária de cada peptídeo análogo e a possível correlação da mesma com a atividade antimicrobiana observada nos testes de inibição de crescimento bacteriano. Os meios utilizados para a avaliação por CD foram o tampão fosfato (HEPES), TFE 60% e SDS.

O primeiro meio (HEPES) foi utilizado com o intuito de se avaliar a estrutura de cada peptídeo sem a influência ou presença de algum composto capaz de induzir alguma conformação nos peptídeos, ou seja, visualizar a estruturação dos peptídeos em meio aquoso comum, com valor de pH próximo ao fisiológico (pH = 7,1). Já o segundo meio (TFE 60%) foi utilizado para induzir a estruturação dos peptídeos e assim verificar se há alguma tendência de conformação para os peptídeos análogos. O terceiro meio (SDS) foi utilizado para se avaliar o comportamento dos peptídeos quanto a sua estruturação perante um composto capaz de mimetizar de forma simples uma superfície de micela, ou seja, visualizar a estruturação dos peptídeos perante um composto que tende a formar uma estrutura lipídica simples, mimetizando o comportamento dos peptídeos interagindo com uma bicamada lipídica de uma membrana celular.

Para a inferência das informações em relação a cada gráfico gerado pelos dados obtidos por CD, utilizou-se a figura 15 como base para a determinação da presença de cada um dos tipos de estruturas secundárias normalmente observadas em peptídeos e proteínas. Como já mencionado anteriormente, as estruturas em α -hélice tendem a possuir duas bandas negativas nas faixas de 208 e 222 nm, além de uma banda positiva na faixa de 190 nm (figura 15, curva a). Já as estruturas em folha β tendem a possuir uma banda negativa em torno de 217 nm e uma positiva na faixa que varia entre 195 a 200 nm (figura 15, curva b). Por fim, as estruturas randômicas tendem a possuir uma forte banda negativa em torno de 200 nm (figura 15, curva c).

Figura 11 - Espectros de dicroísmo circular das principais estruturas secundárias observadas em proteínas e peptídeos.

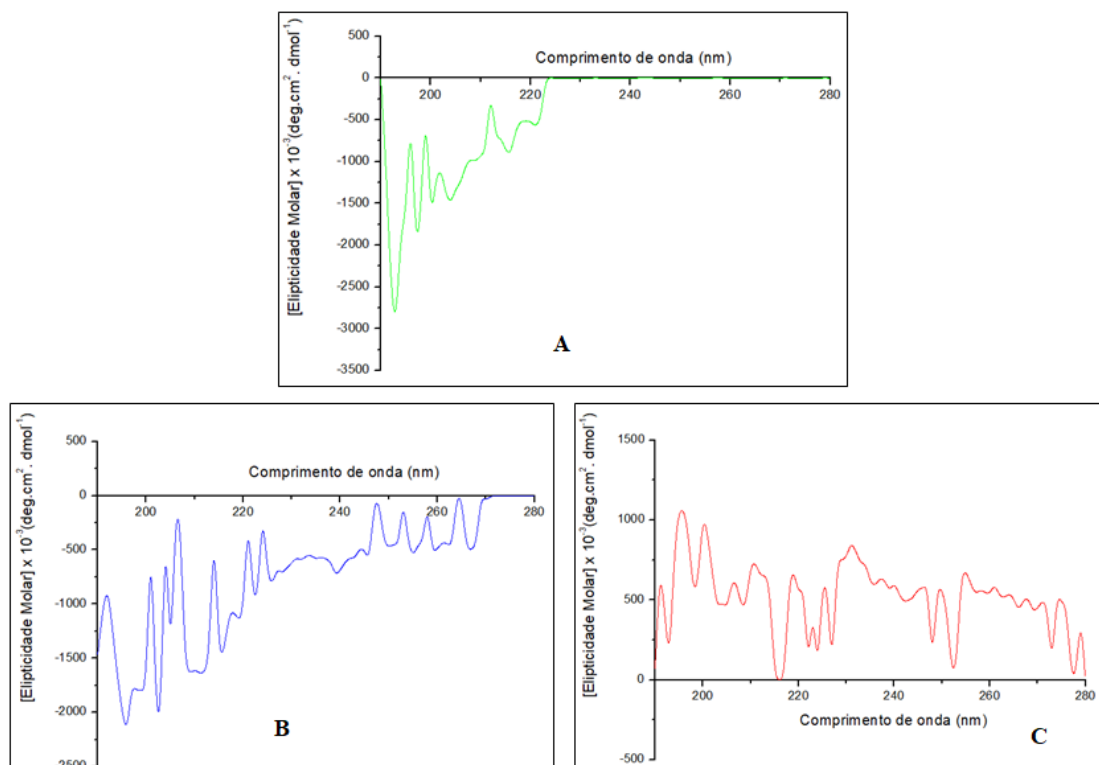


Fonte: Adaptado de VERLI , 2014.

Os resultados referentes aos peptídeos LeuC-Nt, LeuC-0Cys, LeuC-Ala9 e LeuC-Cys9,14 podem ser observados nas figuras 16, 17, 18 e 19, respectivamente. Foi possível observar que todos os peptídeos, independente dos meios testados, apresentam-se em conformação randômica (irregular), já que os gráficos não demonstraram curvas definidas semelhantes aos padrões estruturais característicos de α -hélice e nem de folha β .

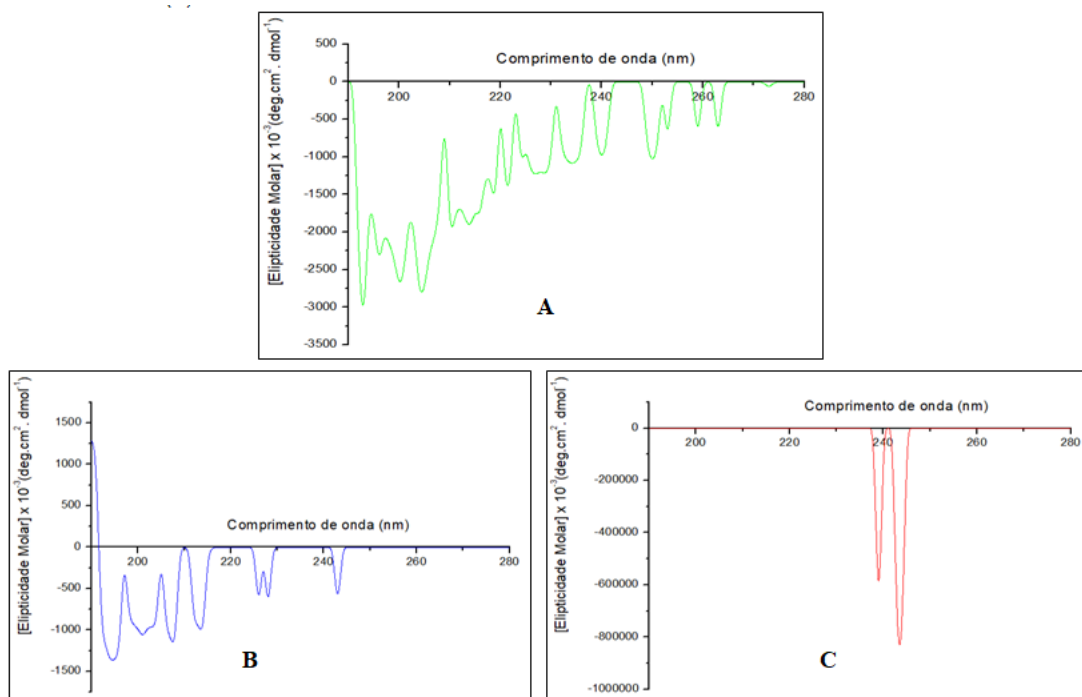
Nos gráficos marcados com a letra B, que representa o ensaio em meio SDS (micela), apenas o peptídeo LeuC-Cys9,14 apresentou traços de uma possível estruturação, já que a curva de CD nestas condições apresentou um perfil com melhor definição, comparativamente com os demais meios testados. No entanto, mesmo assim não é possível definir um padrão secundário para este peptídeo no meio SDS. É importante ressaltar que a avaliação estrutural dos peptídeos em diferentes meios, nos possibilitaria buscar informações quanto a relação estrutura/função desses peptídeos, o que poderia ser uma informação importante para o desenho de novos PAMs baseados na estrutura primária de Leucocinas.

Figura 12 - Gráficos referentes aos espectros por dicroísmo circular do comportamento estrutural do peptídeo LeuC-Nt nos meios tampão fosfato (A), SDS (B) e TFE 60% (C).



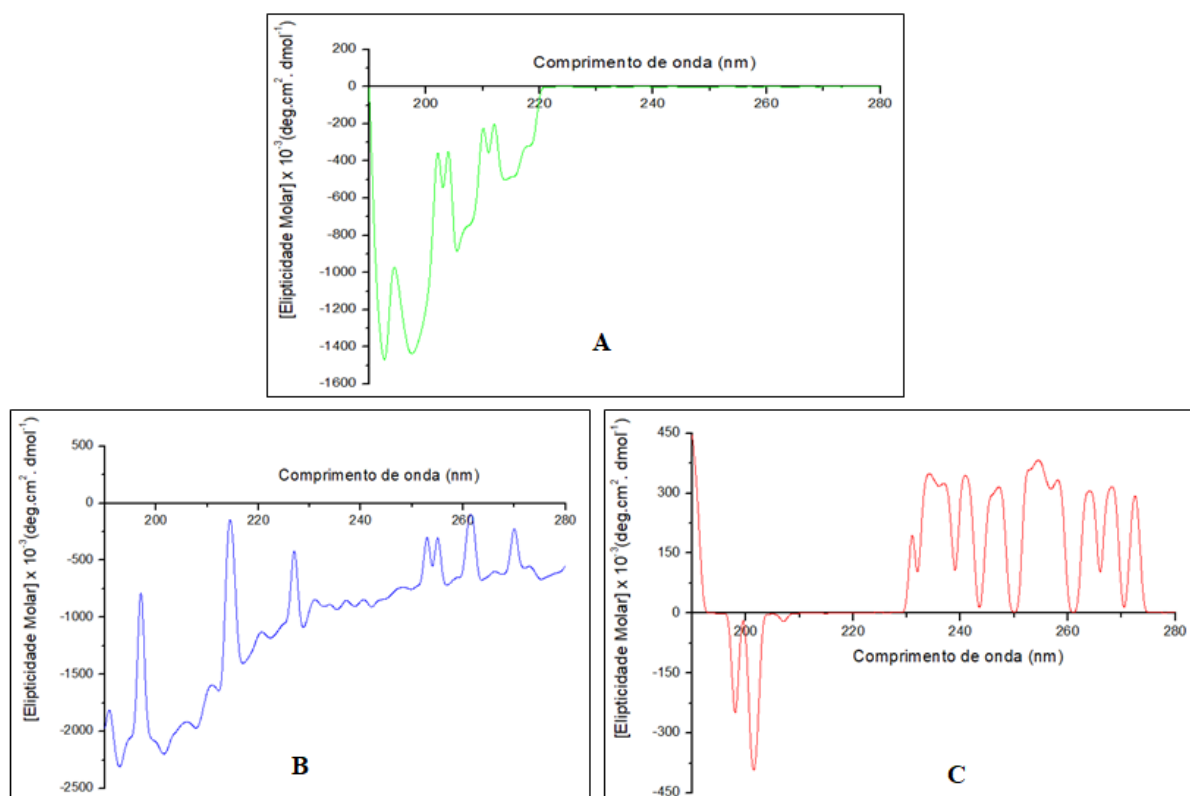
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Figura 13 - Gráficos referentes aos espectros por dicroísmo circular do comportamento estrutural do peptídeo LeuC-OCys nos meios tampão fosfato (A), SDS (B) e TFE 60% (C).



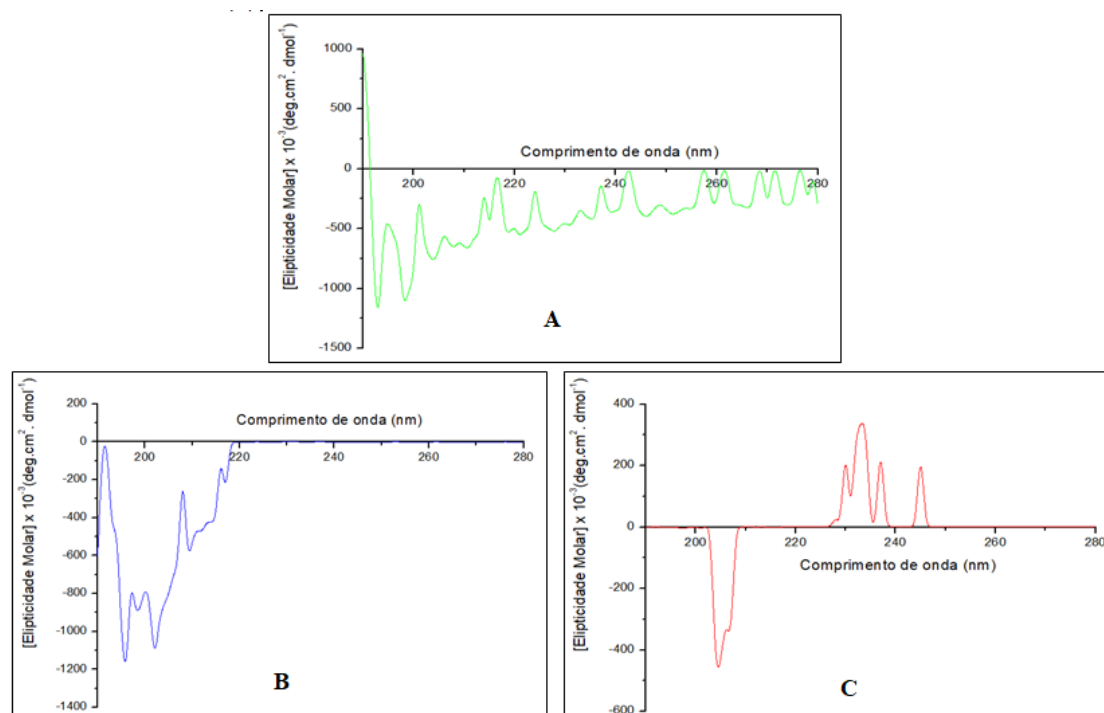
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Figura 14 - Gráficos referentes aos espectros por dicroísmo circular do comportamento estrutural do peptídeo LeuC-Ala9 nos meios tampão fosfato (A), SDS (B) e TFE 60% (C).



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Figura 15 - Gráficos referentes aos espectros por dicroísmo circular do comportamento estrutural do peptídeo LeuC-Cys9,14 nos meios tampão fosfato (A), SDS (B) e TFE 60% (C).



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Geralmente, os resultados observados nos perfis de espectros de CD de PAMs que possuem 20 a 30 resíduos de aminoácidos são relativos a estruturas desordenadas. No entanto, na presença de meios que induzem a estruturação, como no caso de TFE e SDS, alguns peptídeos podem revelar um espectro que se assemelha a uma α -hélice ou folha β . No entanto, para os peptídeos desenvolvidos neste trabalho, não foi possível observar nenhum tipo de tendência à estruturação nos meios testados, o que não nos permitiu utilizar esta técnica para obter informações que pudessem ser importantes para uma correlação entre os aspectos da estruturação dos mesmos e a atividade antimicrobiana apresentadas nas diferentes espécies bacterianas utilizadas neste estudo.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram estar relativamente em consonância com os resultados obtidos por meio da espectroscopia de dicroísmo circular utilizada por Silva (2017) e Santos-Vaz (2018) em seus trabalhos, onde boa parte de seus derivados de Leucocinas A, B e C possuíram em sua maioria a conformação randômica e, apenas em alguns casos, foi observado uma tendência de conformação em α -hélice em meio de TFE 60% ou SDS.

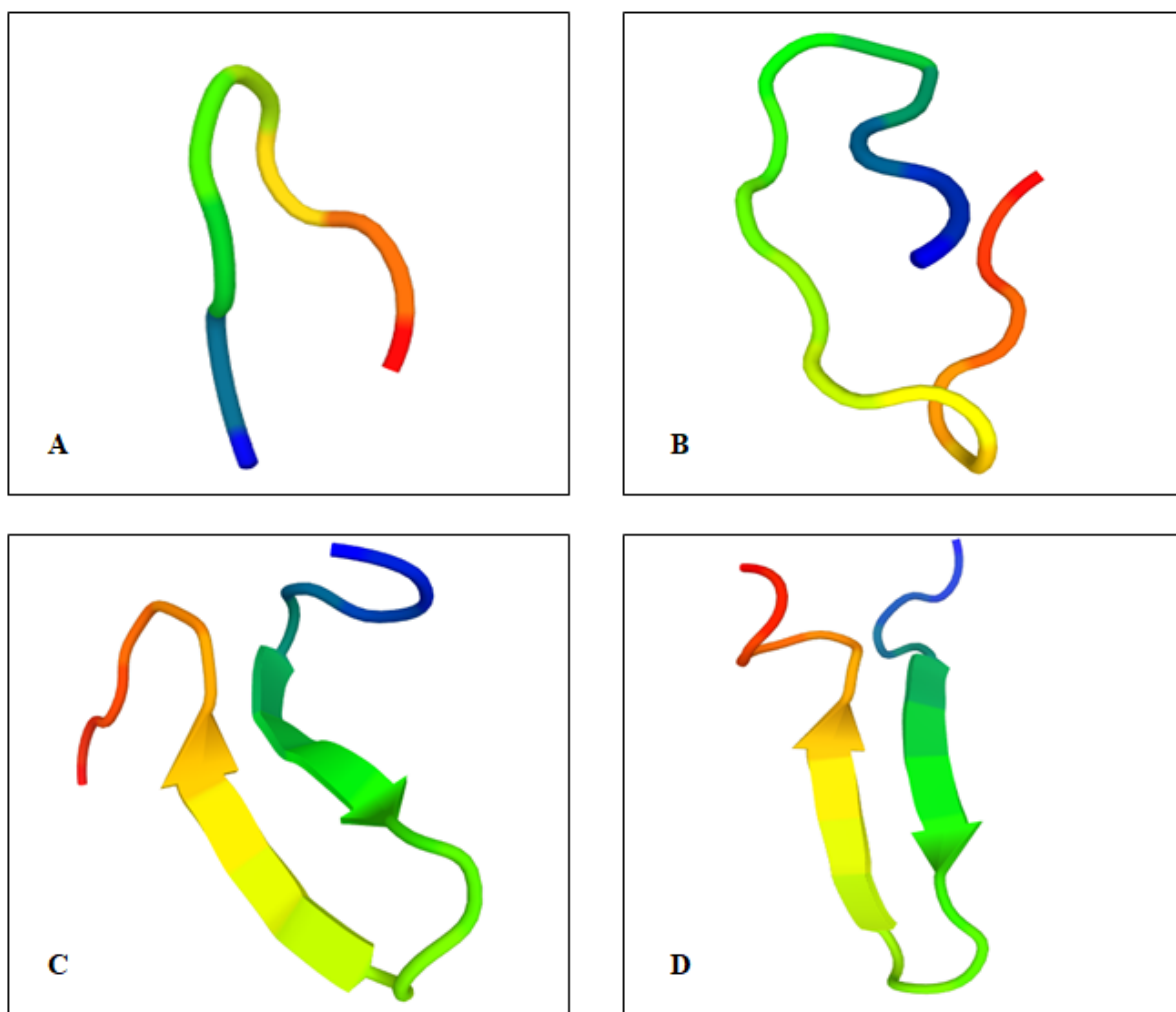
Por outro lado, uma informação adicional pode ser observada no trabalho de Papathanasopoulos *et al.* (1998) onde mostram que as Leucocinas A, B e C TA33a possuem conformação majoritária do tipo folha β e não α -hélice em meio SDS. Este fato pode indicar que análogos peptídicos menores de Leucocinas nativas já conhecidas, podem se estruturar de forma independente e, muitas vezes podem apresentar características bastante diferentes da molécula original.

Para podermos buscar alguma informação estrutural, optamos por partir para a utilização de ferramentas computacionais que simulam e predizem a provável estrutura tridimensional de moléculas peptídicas.

4.5 Modelagem Molecular e Análise Físico-Química

A utilização das ferramentas presentes no site “*Pepfold3*” (LAMIABLE *et al.*, 2016) teve como objetivo a geração de estruturas tridimensionais de peptídeos que possuem resíduos na faixa entre 5 e 50 unidades, utilizando-se algoritmos para realização de clusters e predições estruturais que se adequem a sequência de aminoácidos fornecidas na entrada dos dados (sequência em arquivo FASTA), enquanto que as ferramentas do segundo site “*Peptide Calculator*” (INNOVAGEN, 2015) permitiram, além de calcular a massa do peptídeo avaliado, gerar outras informações físico-químicas importantes (ponto isoelétrico, carga total do peptídeo e hidrofobicidade). Os dados obtidos podem ser observados nas figuras 20 e 21 e na tabela 8.

Figura 16 - Modelagem molecular dos peptídeos LeuC-Nt (A), LeuC-OCys (B), LeuC-Ala9 (C) e LeuC-Cys9,14 (D).



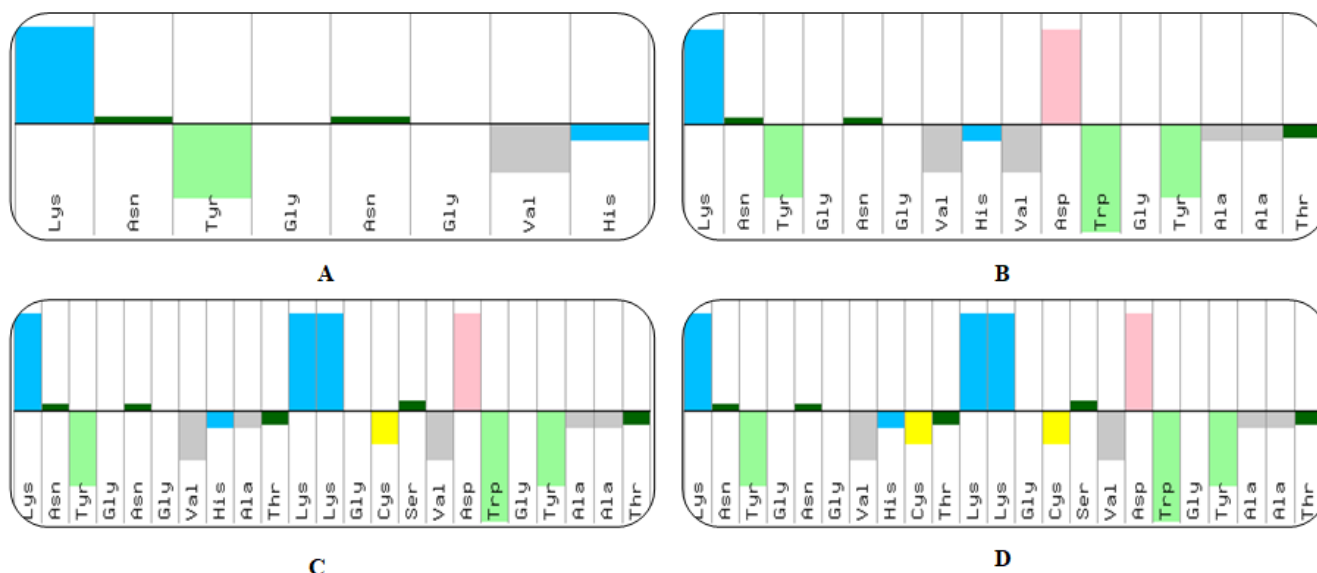
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Tabela 8 - Características físico-químicas dos peptídeos análogos sintetizados.

Características Físico-Químicas				
Peptídeo	Número de resíduos	Peso Molecular	Ponto Isoelétrico	Carga em pH 7,0
LeuC-Nt	8	887,94 g/mol	pH 9,55	1,1
LeuC-0Cys	16	1751,85 g/mol	pH 7,55	0,1
LeuC-Ala9	23	2427,65 g/mol	pH 9,36	2
LeuC-Cys9,14	23	2459,72 g/mol	pH 8,75	2

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Figura 17 - Escala hidrofílica e hidrofóbica de cada resíduo constituintes dos peptídeos LeuC-Nt (A), LeuC-0Cys (B), LeuC-Ala9 (C) e LeuC-Cys9,14 (D). A intensidade positiva e negativa de cada barra correspondem aos graus hidrofílico e hidrofóbico de cada resíduo, respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Os dados obtidos demonstram que o primeiro peptídeo sintetizado (LeuC-Nt) possui, segundo a modelagem e caracterização, uma conformação randômica com carga global positiva (+1,1) em pH neutro e uma boa solubilidade em solventes polares, principalmente devido a presença do resíduo de lisina (figura 21 A). Tal conformação obtida por modelagem está de acordo com o observado nos dados gerados por CD, onde em meio aquoso tal análogo possui estruturação em estado randômico. É interessante notar que na modelagem há uma presença de uma espécie de “volta β ”, correspondendo

aos resíduos de tirosina na posição 3, glicina na posição 4 e asparagina na posição 5, dando um aspecto em forma de “grampo” para esse peptídeo (figura 20 A). Tal estrutura de volta β também se mantém presente nos outros peptídeos sintetizados.

Os dados obtidos do peptídeo LeuC-OCys demonstram que tal análogo, em pH neutro, possui conformação também randômica em toda a sua estrutura, porém sua carga em pH 7,0 se estabelece quase neutra, característica que o difere dos demais análogos. Assim como o peptídeo anterior, quando se compara os dados obtidos pela modelagem molecular com os obtidos por CD, observa-se uma consonância no fato de que a conformação prevalente em meio aquoso é a estruturação randômica, mostrando que a predição por modelagem correspondeu aos observado experimentalmente. Vale destacar que além da volta β presente no peptídeo LeuC-Nt, o análogo LeuC-OCys também possui outra volta β correspondendo aos resíduos de triptofano na posição 11, glicina na posição 12 e tirosina na posição 13.

Já os dados referentes a modelagem e caracterização do peptídeo LeuC-Ala9 (figura 20 e 21 C e tabela 8) mostram que tal peptídeo possui uma carga global mais positiva (catiônico, carga +2) em pH neutro, além de uma estruturação em folha β , o que conflita com as informações derivadas das análises por CD que mostram que em meio aquoso tal análogo tem estruturação randômica.

Essas possíveis regiões em folha β correspondem as regiões da valina na posição 7 até a alanina na posição 9 e da cisteína na posição 14 até o aspartato na posição 17, sendo interessante notar que outro peptídeo além desse (LeuC-Cys9,14) possui comportamento estruturante semelhante ao verificado, possuindo região em folha β correspondente aos resíduos já citados, dando indicativo que possivelmente essas regiões possam realmente formar estruturações em folha β , como é observado no trabalho de Papathanasopoulos *et al.* (1998) em que Leucocinas sintetizadas baseadas na sequência completa das naturais se estruturam nessa conformação.

Por fim, os dados referentes ao peptídeo LeuC-Cys9,14 (figuras 20, 21 D e tabela 8) mostram que tal análogo possui parâmetros e estruturação semelhante ao observado para o peptídeo LeuC-Ala9, possuindo um ponto isoelétrico inferior, porém com a mesma carga global positiva (+2) em pH

neutro. Assim como já mencionado, na modelagem molecular desse peptídeo, existem regiões, que em meio aquoso, se estruturam em folha β , porém os dados obtidos por CD não permitiam verificar este comportamento. No entanto, a possível tendência à estruturação observada para este peptídeo em meio SDS que é indutor de estrutura (figura 19 B), pode ser um indicativo daquilo que foi gerado no modelo molecular (figura 20 D).

Em termos gerais, a modelagem molecular juntamente com a caracterização físico-química mostrou que a maior parte dos peptídeos possuem carga positiva, voltas β em sua constituição e uma possível tendência de possuir estruturas de folha β em alguns casos. À exceção do peptídeo LeuC-Nt, todos os outros possuem menor solubilidade em ambiente aquoso, contendo um caráter hidrofílico/hidrofóbico variante durante a extensão de cada peptídeo (figura 21), mostrando que algumas regiões podem interagir com moléculas hidrofóbicas e com compostos hidrofílicos, dependendo de onde esses análogos estiverem interagindo, o que pode estar relacionado com uma possível interação com membranas como provável modo de ação.

4.6 Comparação entre os peptídeos análogos sem cisteína no quesito estrutura/atividade antimicrobiana.

Os peptídeos sintetizados sem cisteína em sua constituição foram os análogos LeuC-Nt e LeuC-0Cys (figura 4). No que diz respeito à sua estruturação, os testes por CD e modelagem molecular mostraram que tais peptídeos possuem conformação randômica em meio aquoso à um pH neutro. Enquanto o peptídeo LeuC-Nt possui uma região com volta β , que lhe garante um aspecto em forma de “grampo” (figura 21A), o peptídeo LeuC-0Cys possui duas voltas β que lhe dão um aspecto irregular (figura 20B), facilmente perceptível em estruturas randômicas. É importante destacar que enquanto o primeiro peptídeo possui uma carga positiva (+1), o segundo é praticamente neutro em pH 7,0 (carga +0,1). Vale destacar também que enquanto o peptídeo LeuC-Nt possui uma boa solubilidade em meio aquoso, o análogo LeuC-0Cys possui solubilidade menor em comparação ao primeiro (figura 21, A e B), devido a presença de uma região a mais em sua sequência que possui um significativo caráter hidrofóbico (valina 9 – treonina 16).

No quesito atividade antimicrobiana, fica evidente que quando os dois peptídeos são comparados, o análogo LeuC-0Cys possui um melhor desempenho do que o análogo LeuC-Nt, mesmo quando verificado a inibição em *Staphylococcus aureus* onde tais percentuais de inibição são bastante próximos. Apesar disso, diante dessa espécie bacteriana, LeuC-0Cys ainda exibe inibição em concentrações de 50 e 25 μM (tabela 5), o que não é observado para LeuC-Nt, onde somente a concentração de 100 μM demonstrou alguma inibição (tabela 6).

Os dois peptídeos foram construídos com o intuito de se avaliar a influência de regiões conservadas e sua relação com atividade antimicrobiana das conhecidas bacteriocinas de classe IIa. Utilizando como base a Leucocina C-TA33a, estipulou-se a síntese da região conservada de sua estrutura correspondente à extremidade N-terminal (LeuC-Nt) e região conservada na extremidade N-terminal juntamente com uma região intermediária conservada sem a presença dos resíduos do aminoácido cisteína (LeuC-0Cys).

Ennahar *et al.* (2000), Bodapati *et al.* (2013) e Balay *et al.* (2017) sugerem que a extremidade N-terminal esteja relacionada com o reconhecimento da bacteriocina com a célula-alvo bacteriana, ou seja, a região N-terminal está relacionada com a interação inicial do peptídeo com a membrana bacteriana. Já Ennahar *et al.* (2000) sugerem que a região intermediária conservada está relacionada com a inserção do peptídeo na membrana da bactéria e, conseqüentemente, com a formação de poros e atividade antimicrobiana.

Os dados na literatura também mostram que a extremidade N-terminal possui uma conformação em folha β (BALAY *et al.* 2017; BODAPATI *et al.*, 2013), o que não foi o caso observado experimentalmente nesse trabalho, principalmente com os resultados obtidos pela modelagem molecular. Ennahar *et al.* (2000) sugerem que essa mesma região tenha uma estrutura de folha β que forma uma espécie de “grampo”, o que já seria mais próximo do observado pela modelagem molecular, onde uma região em volta β mantém essa mesma estrutura em formato de grampo para o peptídeo LeuC-Nt. Já a região intermediária conservada é sugerida por Ennahar *et al.*, 2000 como uma região estruturada em α -hélice, fato esse não observado experimentalmente nesse trabalho.

Talvez o fator que mais influencie na atividade antimicrobiana dessas regiões seja o caráter anfipático das mesmas e não a estrutura secundária. O provável caráter hidrofílico da região N-terminal (e dessa forma, do peptídeo LeuC-Nt) garante a interação desse peptídeo com os grupos polares negativos da membrana plasmática bacteriana. O mesmo acontece com o peptídeo LeuC-0Cys que também contém essa região, porém a região intermediária conservada presente no mesmo possui um provável caráter hidrofóbico, garantindo além da interação com a membrana plasmática efetuada pela região N-terminal, a inserção do peptídeo na membrana da bactéria, já que o interior da membrana é constituída de grupos hidrofóbicos. Por esse motivo, é provável que o desempenho do peptídeo LeuC-0Cys tenha sido melhor que o do peptídeo LeuC-Nt apenas pela presença adicional dessa região que confere ao primeiro análogo um caráter anfipático, diferente do segundo que apenas possui característica hidrofílica maior.

4.7 Comparação entre os peptídeos análogos com cisteína no quesito estrutura/atividade antimicrobiana.

Os peptídeos com cisteínas sintetizados no trabalho foram os análogos LeuC-Ala9 e LeuC-Cys9,14. Primeiramente, é importante destacar que a única diferença entre esses dois peptídeos é a presença pontual na posição 9 de uma alanina no peptídeo LeuC-Ala9, enquanto nessa mesma posição existe uma cisteína no peptídeo LeuC-Cys9,14. Estruturalmente, de um modo geral, esses dois peptídeos demonstraram possuir a mesma conformação secundária (randômica, ou desordenada) em todos os meios testados nos ensaios de CD, sendo que o análogo LeuC-Cys9,14 demonstrou uma pequena tendência de estruturação em folha β em meio indutor de estrutura (SDS), o que estaria de acordo com o resultado obtido nos estudos de modelagem molecular. Ainda pelos dados fornecidos pela modelagem molecular, percebe-se a presença de uma conformação estrutural bastante semelhante entre esses dois peptídeos que possuem cisteína em sua estrutura.

Outro fato a ser destacado é que em termos de carga global dos peptídeos, os análogos LeuC-Ala9 e LeuC-Cys9,14 são idênticos, possuindo carga igual +2 em pH neutro, diferenciando apenas no ponto isoelétrico de

cada um (tabela 8). A cisteína a mais presente na posição 9 no peptídeo LeuC-Cys9,14 contribui para que tal análogo seja um pouco mais hidrofóbico do que o peptídeo LeuC-Ala9 (vide figura 21).

Mais importante ainda é quando há a comparação entre os dados referentes aos testes de inibição bacteriana desses dois peptídeos: apenas a mudança pontual de um aminoácido garantiu diferentes comportamentos de inibição entre as bactérias testadas. Contra *Salmonella* sorotipo Typhimurium e *Escherichia coli* (bactérias Gram-negativas) o peptídeo LeuC-Cys9,14 foi mais efetivo do que LeuC-Ala9 (comparação entre as tabelas 3 e 4), mesmo comportamento observado contra *Listeria monocytogenes* (bactéria Gram-positiva) onde na maior concentração aplicada, o análogo LeuC-Cys9,14 teve mais do que o dobro de percentual de inibição (em termos de valores absolutos) quando comparada a mesma concentração aplicada de LeuC-Ala9. Já contra *Staphylococcus aureus* o comportamento foi diferente: apenas o análogo LeuC-Ala9 foi efetivo contra essa bactéria, aplicando-se a concentração de 100 μ M.

O resíduo adicional de cisteína no peptídeo LeuC-Cys9,14 permitiu um pequeno aumento na hidrofobicidade de tal análogo. Talvez tal característica possa ter possibilitado uma vantagem em termos de inibição para esse peptídeo quando comparado com a atividade observada do peptídeo LeuC-Ala9. O que pode ser elucidado aqui é que como o mecanismo de ação das bacteriocinas de classe IIa é explicado por meio da ação de formação de poros, o pequeno aumento de hidrofobicidade em uma região pode ter favorecido a inserção desse peptídeo na membrana plasmática, conferindo assim uma melhor ação antimicrobiana desse peptídeo.

4.8 Comparação entre todos os peptídeos análogos no quesito estrutura/atividade antimicrobiana

Os peptídeos análogos LeuC-Nt, LeuC-OCys, LeuC-Ala9 e LeuC-Cys9,14 no geral apresentaram características estruturais randômica, com leve tendência de formação de folha β do peptídeo LeuC-Cys9,14, carga positiva em pH 7,0 (à exceção de LeuC-OCys com carga praticamente neutra), inibição

de crescimento bacteriano em alguma das concentrações testadas e baixa citotoxicidade.

No quesito inibição (seção 4.2.), em relação à ação contra bactérias da espécie *Salmonella* sorotipo Typhimurium, o melhor peptídeo avaliado foi o análogo LeuC-0Cys, atingindo uma média de 50% de inibição nas concentrações aplicadas (não havendo diferença significativa entre elas). O mesmo comportamento foi observado contra as bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*, onde tal peptídeo se destacou entre os demais. Já em relação às bactérias *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* o melhor peptídeo avaliado foi o análogo LeuC-Cys9,14, atingindo quase 40% (*Escherichia coli*) e 70% de inibição (*Listeria monocytogenes*) na concentração aplicada de 100 μ M contra esses micro-organismos.

É interessante notar que esses dois peptídeos com melhores desempenhos de inibição foram capazes de inibir tanto espécies de bactérias Gram-positivas quanto espécies de bactérias Gram-negativas, o que de fato é bastante interessante, devido à diferença morfológica da membrana entre essas bactérias. Esta capacidade de inibição de micro-organismos que possuem características morfológicas distintas, nos leva a pensar que o mecanismo de ação desses peptídeos, o qual se baseia em uma interação não específica na membrana (interação eletrostática) possa favorecer a ação do peptídeo tanto em bactérias Gram-positivas quanto em bactérias Gram-negativas.

Neste sentido, o que pode ser evidenciado é que a característica anfipática desses peptídeos seja de extrema importância para sua atividade, pois se de um lado é necessário a interação eletrostática inespecífica entre grupos polares positivos nos peptídeos com as cabeças polares negativas nas membranas plasmáticas bacterianas (exercida pela extremidade N-terminal), de outro lado é necessário uma característica hidrofóbica em outra região para a inserção do peptídeo na membrana, e com isso, a formação de poros proposta pela sua ação. Tanto o peptídeo LeuC-0Cys quanto o peptídeo LeuC-Cys9,14 satisfazem, aparentemente, essas condições.

Como pode ser observado na seção 4.2., quase todos os análogos testados não tiveram bom desempenho contra as bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*. Esse baixo desempenho de inibição também foi

observado nos trabalhos de Silva (2017) e Santos-Vaz (2018), onde foram testados outros análogos baseados na estrutura das três leucocinas de *Leuconostoc mesenteroides* TA33a (Leucocinas A, B e C). A hipótese mais plausível é de que, diferentemente das outras bactérias testadas que possuem sua morfologia de bastonetes (*Salmonella* sorotipo Typhimurium, *Escherichia coli* e *Listeria Monocytogenes*), a espécie *Staphylococcus aureus* se apresenta em forma de cocos, agrupando-se em colônia em forma de cachos que dificulta a ação dos peptídeos antimicrobianos pela diminuição da superfície de contato.

Como já mencionado, a presença de um resíduo de cisteína a mais no peptídeo LeuC-Cys9,14 permitiu uma melhor ação desse peptídeo contra *Listeria monocytogenes* do que o peptídeo LeuC-Ala9, sugerindo que as duas cisteínas nativas nessa posição são de extrema importância juntas contra essa espécie bacteriana.

Com os dados disponíveis no trabalho não é possível elucidar o porquê desse aumento de atividade. Uma hipótese provável é o aumento da hidrofobicidade gerada pelo resíduo de cisteína na posição 9, contribuindo para a inserção do peptídeo na membrana, necessitando de trabalho futuros para a comprovação desse fato. Seria interessante a realização de dimerizações desses peptídeos e a comparação com os dados obtidos nesse estudo para um melhor entendimento da contribuição de cada resíduo de cisteína na atividade antimicrobiana desses peptídeos.

Bodapati *et al.* (2013) desenvolveram em seu trabalho cerca de três análogos baseados na estrutura da Leucocina A de *Leuconostoc gelidum*, onde se substituiu as duas cisteínas presentes no peptídeo de origem por fragmentos sem cisteínas que se estruturam em forma de volta β , os avaliando contra bactérias do gênero *Carnobacterium divergens* e *Listeria monocytogenes*. O que foi observado é que os análogos obtidos sem os resíduos de cisteína apresentaram atividades bastante inferiores comparativamente aos análogos contendo as duas cisteínas, mesmo fato observado nesse trabalho contra a bactéria *Listeria monocytogenes*.

Também é plausível destacar que o peptídeo LeuC-0Cys compartilha as mesmas regiões N-terminal e intermediária conservada nos peptídeos LeuC-Ala9 e LeuC-Cys9,14. Porém, tal análogo obteve uma melhor atividade contra *Salmonella* sorotipo Typhimurium e *Staphylococcus aureus*, logo, seu tamanho

reduzido comparado com os outros dois análogos tenha o favorecido quanto à sua atividade, favorecendo sua inserção tanto nas colônias formadas pelo *Staphylococcus aureus* quanto sua passagem pela membrana externa de *Salmonella* sorotipo Typhimurium e ação na formação de poros.

5 CONCLUSÕES

De uma maneira geral, os peptídeos análogos obtidos demonstraram possuir atividade de inibição bacteriana e não toxicidade contra células eucarióticas, o que mostra que tais estudos possam contribuir no desenvolvimento de conservantes para a indústria alimentícia. Tais dados demonstraram ser bastante interessantes e promissores, abrindo caminho para sua utilização em futuros trabalhos que venham estudar o comportamento desses peptídeos frente a outras bactérias e sua sinergia entre os mesmos e entre tais análogos e outros compostos antimicrobianos.

Os estudos estruturais por dicroísmo circular não possibilitaram a observação de um padrão estrutural secundário para os peptídeos estudados tendo em vista que todos apresentaram uma conformação randômica, podendo apenas ser notado uma tendência de estruturação em folha β para o análogo LeuC-Cys9,14 em meio indutor de estrutura SDS. Por outro lado, os estudos de modelagem molecular puderam elucidar um pouco mais a respeito da provável estruturação secundária desses peptídeos em um ambiente fisiológico e permitiram elucidar, juntamente com as características físico-químicas de cada um deles, o possível modo de ação bem como das vantagens e desvantagens de cada uma dessas características na atividade antimicrobiana.

Com os dados disponíveis é possível afirmar que uma boa atividade antimicrobiana tenha sido obtida pela presença em conjunto de uma extremidade N-terminal que favoreça a interação com os grupos polares negativos disponíveis na membrana plasmática e uma região hidrofóbica que permita a inserção do peptídeo sintetizado para a formação de poro, havendo a necessidade, em alguns casos, da presença das duas cisteínas para uma melhor atividade ou o tamanho reduzido do peptídeo para uma melhor inibição, variando nesses quesitos no que diz respeito à espécie bacteriana a ser combatida.

Diante dessas informações, o trabalho pode direcionar a um melhor desenvolvimento de futuros bioconservantes e assim contribuir para o desenvolvimento de barreiras no combate de micro-organismos patogênicos que trazem risco a vida do consumidor, estimulando um consumo seguro, natural e que traga benefícios tanto economicamente quanto de saúde pública.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Espera-se que outros trabalhos possam ser desenvolvidos utilizando esses mesmos peptídeos análogos para a promoção de possíveis dimerizações, estudos de atividade contra outros patógenos e estudos estruturais para um melhor entendimento do mecanismo de ação de tais miméticos. A possibilidade de ação contra micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos demonstra ser interessante em termos de conservação e uma possível sinergia desses análogos com outros compostos antimicrobianos (e entre os mesmos) pode permitir uma atividade de inibição ainda mais relevante, permitindo a formulação de produtos cada vez mais capazes de combater patógenos bacterianos e possibilitando uma alimentação nutritiva e segura para a população.

REFERÊNCIAS

- AHLBERG, S. H.; JOUTSJOKI, V.; KORHONEN, H. J. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 207, p. 87–102, 2015.
- AHMAD, V. *et al.* Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 1, p. 1–11, 2017.
- ALMEIDA, F. *et al.* Phylogenetic and antimicrobial resistance gene analysis of Salmonella Typhimurium strains isolated in Brazil by whole genome sequencing. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, p. 1DUMMY, 2018.
- BALAY, D. R. *et al.* Purification of leucocin A for use on wieners to inhibit *Listeria monocytogenes* in the presence of spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 255, p. 25–31, May 2017.
- BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Revisão e Ensaio Pediatria**, v. 23, n. 4, p. 320–328, 2001.
- BODAPATI, K. C. *et al.* Design, synthesis and evaluation of antimicrobial activity of N-terminal modified Leucocin A analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 13, p. 3715–3722, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil – Brasília : **Editora do Ministério da Saúde**, 2019.
- BUCHANAN, R. L. *et al.* A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, v. 75, p. 1–13, 2017.
- CARPENTIER, B.; CERF, O. Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 1–8, 2011.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Estimates of Foodborne Illness in the United States**. USA: CDC, [2011]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>. Acesso em: 8 maio 2019.
- CHALÓN, M. C. *et al.* Membrane-active bacteriocins to control Salmonella in foods. Are they the definite hurdle? **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 735–744, 2012.
- CHIKINDAS, M. L. *et al.* Functions and emerging applications of bacteriocins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 23–28, 2018.

- COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins : developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology** v. 3, p. 777–788, 2005.
- COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 95–105, 2013.
- ENNAHAR, S. *et al.* Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 85–106, 2000.
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p. 1315 – 1320, 2004.
- FIELD, D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. **Current Opinion in Food Science**, v. 20, p. 1–6, 2018.
- GÄNZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 106–117, 2015.
- GARCÍA, P. *et al.* Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 8, p. 373–382, 2010.
- GARRIDO, S. S. **Novos inibidores peptídicos de topoisomerasas bacterianas estruturalmente derivados da proteína CcdB**. 2007. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- GHANBARI, M.; JAMI, M. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: a promising approach to seafood biopreservation. **R & D for Food, Health and Livestock Purposes**, 2013. DOI: 10.5772/50705. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/lactic-acid-bacteria-and-their-bacteriocins-a-promising-approach-to-seafood-biopreservation>. Acesso em 8 maio 2019.
- GUDIÑA, E. J. *et al.* Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419–424, 2010.
- HEMME, D.; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 6, p. 467–494, 2004.
- HOLZAPFEL, W. H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 343–362, 1995.

INNOVAGEN. **Peptide property calculator**. [S. l.: Innovagen, 2015].
Disponível em: <https://pepcalc.com>. Acesso em: 31 maio 2019.

JUNG, J. Y. *et al.* Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 378–387, 2012.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial production of bacteriocins: latest research development and applications. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 8, p. 2187–2200, 2018.

LAMIABLE A, T. P. *et al.* PEP-FOLD 3.5. **RBPS Web portal**. [S. l.: s. n., 2016].
Disponível em: <http://mobyle.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD3>. Acesso em 31 de Maio de 2019.

LEISTNER, L.; GORRIS, L. G. M. Food preservation by hurdle technology. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 41–46, 1995.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 2, p. 67–78, 2004.

LIU, S. *et al.* Cell-mediated killing of *Listeria monocytogenes* by leucocin C producing *Escherichia coli*. **Microbiological Research**, v. 168, n. 5, p. 300–304, 2013.

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

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, 1963.

MOTLAGH, A. M.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 11, p. 873–878, 2016.

NASCIMENTO, M.; MORENO, I. Bacteriocinas em alimentos : uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 120–127, 2008.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically**; Approved Standard - Sixth Edition v. 23. West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NELSON, L. D.; M. COX, M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, [2014].

NOVAIS, S. F. *et al.* Influência das novas tecnologias de conservação sobre os alimentos de origem animal. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 19, p. 1–12, out. 2012.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Review: general aspects of bacteriocins. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 267–276, 2015.

OLIVEIRA, A. B. A. *et al.* Artigo de revisão doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, v. 30, p. 279-285, 2010.

OLIVEIRA, A. P. *et al.* *Salmonella enterica*: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, N.16; p. 1947 – 1972, 2013

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

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

PAPATHANASOPOULOS, M. A. *et al.* Sequence and structural relationships of leucocins A-, B- and C-TA33a from *Leuconostoc mesenteroides* TA33a. **Microbiology**, v. 144, n. 5, p. 1343–1348, 1998.

PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. S3, 2014. Suppl. 1.

PINTO, A F. M. A.. Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos. **Millenium**, v. 4, p. 91-100,1996.

PUJATO, S. A. *et al.* *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* bacteriophages: Genomics and cross-species host ranges. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 128–137, Mar. 2017.

ROSA, C. M.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **ConScientiae Saúde**, p. 1677–1028, 2002.

RUIZ, P. *et al.* *Leuconostoc mesenteroides* in the brewing process: a controversial role. **Food Control**, v. 90, p. 415–421, 2018.

SANTANA, E. H. W *et al.* Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, p. 545–554, 2010.

SANTOS-VAZ, A. B. **Síntese, caracterização, atividade biológica e sinérgica de peptídeos antimicrobianos análogos às bacteriocinas de**

- Leuconostoc mesenteroides* TA33A**. 2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara 2018.
- SAUER, M. *et al.* The efficient clade: lactic acid bacteria for industrial chemical production. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 8, p. 756–769, 2017.
- SCHULZ, D.; PEREIRA, M. A.; BONELLI, R. R. Bacteriocinas : mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 229–235, 2003.
- SHINOHARA, N. K. S. *et al.* Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675–1683, 2008.
- SILVA, J. C. M. **Síntese, caracterização e estudos da atividade biológica de peptídeos antimicrobianos derivados de Leucocinas TA33a**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.
- SOOMRO. A. H.; MASUD T.; ANWAAR K. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health – a review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 20–24, 2009.
- SOUSA, C. P. *et al.* Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**, v.9, n.1, p. 83-88, 2006.
- TEUSINK, B.; MOLENAAR, D. Systems biology of lactic acid bacteria: for food and thought. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 6, p. 7–13, 2017.
- TODD R., K. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1/3, p. 39–85, 1993.
- VAN AMSON, G.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos às ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1139–1145, 2007.
- VÁSQUEZ, M. *et al.* Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. **Revista Chilena de Nutrición**, vol. 36, n. 1, p. 64-71, 2009.
- VERLI, H. Bioinformática da biologia à flexibilidade molecular.. 1. ed.p. 1- 282 - São Paulo : **Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)**, 2014.
- 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, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Infographics:** estimates of the global burden of foodborne diseases. [S. l.: WHO, 2015]. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg_infographics/en/. Acesso em: 8 maio 2019.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 50–56, 2012.

ZOU, J. *et al.* Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 781–789, 2018.