



UnB

Instituto de Química

Programa de Pós – Graduação em Química (PPGQ)

Dissertação de Mestrado

**PROSPECÇÃO, SÍNTESE E APLICAÇÃO DE PEPTÍDEOS INTRAGÊNICOS
ANTIMICROBIANOS NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS.**

Luís Guilherme Gomes de Sá

Orientador: Dr. Guilherme Dotto Brand

Brasília, DF

2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Luís Guilherme Gomes de Sá**, matrícula nº **16/0095964**, intitulada “**Prospecção, síntese e aplicação de peptídeos intragênicos antimicrobianos na conservação de alimentos**”, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 19 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand

Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof. Dr. Angelo Henrique de Lira Machado

Membro Titular (IQ/UnB)

Prof.^a Dra. Sônia Maria de Freitas

Membro Titular (IB/UnB)

Dr. Carlos Bloch Jr.

Membro Suplente (Embrapa)

Em 19 de fevereiro de 2018.

Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende.

João Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos são direcionados à cada um que, a sua maneira, facilitaram o percurso que envolveu o desenvolvimento deste projeto.

Os primeiros agradecimentos são àqueles que me ensinaram o viver de cada dia. A meus pais, que viram seu filho mais velho sair de casa cedo para cursar uma faculdade atípica em uma cidade grande. A eles que apoiaram qualquer ideia maluca que passou pela minha cabeça. Que viveram momentos bons e ruins ao meu lado e nunca titubearam a correr em meu socorro. Que me ensinaram o bom e o ruim, o certo e o errado e todas as nuances que se fazem presente neste meio.

Ao professor Guilherme Dotto Brand, capitão do meu barco, que me aceitou como seu orientando mesmo com o turbilhão de coisas que aconteciam em minha vida antes e durante o desenvolvimento deste trabalho. Ele que me ensinou grande parte das técnicas apresentadas neste trabalho, que me ensinou a ser um pesquisador e aceitou minhas mais malucas teorias. Ao senhor, que instigou em mim um espírito de pesquisador, que me mostrou um novo caminho a perseguir. Foi e continuará sendo uma honra trabalhar ao seu lado. Saiba que ganhou mais que um aluno, um amigo para vida toda.

Aos meus amigos, próximos e distantes que seguraram comigo a barra dos momentos difíceis e comemoraram comigo as conquistas. Fernanda Favero, minha companheira de laboratório e pessoa da minha vida. Raquel Marques, que me fez rir e chorar sempre que foi preciso. Romildo Júnior, que sempre aguentou meu temperamento difícil e sempre fingiu que entendia tudo que eu dizia sobre meu trabalho. Naiara Sadi, quem sempre me ouviu, me acompanhou em loucuras e fez um simples trabalho virar um dos melhores locais a se frequentar. A todos os outros aqui não nomeados, mas que andam comigo sempre, de forma física ou não. Vocês são a luz do meu mundo, donos do meu sorrir.

Aos chefes dos locais em que trabalhei, que me ajudaram a seguir com os estudos, me ajudando das mais diversas formas a perseguir meu sonho.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolver desse trabalho (Marcelo Ramada, José Roberto, José Cardozo, Daniel Sifuentes, Rafael Rocha, colegas de laboratório, colegas da Embrapa), sem vocês, nada disso seria possível.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A todos vocês dou graças e registro aqui meu sincero obrigado.

ÍNDICE	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
TABELA DE AMINOÁCIDOS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1. Introdução teórica	
1.1. Peptídeos antimicrobianos	1
1.2. Desenvolvimento de novos peptídeos antimicrobianos	3
1.3. Prospecção <i>in silico</i> de novos AMPs	5
1.4. Propriedades físico-químicas de AMPs	8
1.5. Mecanismos de ação de AMPs	11
1.6. Interação de peptídeos antimicrobianos com membranas modelo	15
1.7. Conservação de alimentos e <i>active packing</i>	19
1.8. Incorporação de agentes antimicrobianos em sistemas poliméricos	23
2. Objetivos	25
3. Métodos	
3.1. Prospecção de peptídeos no Software Kamal	26
3.2. Análise dos resultados fornecidos pelo Kamal	27
3.3. Síntese de peptídeos em fase sólida	31
3.4. Análise dos IAPs por espectrometria de massa	38
3.5. Purificação dos IAPs por cromatografia líquida de alta eficiência	38
3.6. Quantificação dos IAPs sintetizados	39
3.7. Estudo da estruturação dos IAPs por meio de dicroísmo circular	39
3.8. Teste de interação com membranas fosfolipídicas	41
3.9. Testes de concentração inibitória mínima	41
3.10. Síntese de filmes de PMMA incorporados com peptídeos antimicrobianos	42
3.11. Estudo da liberação do peptídeo presente no filme sintetizado	43
3.12. Testes de atividade antimicrobiana dos filmes sintetizados	43

4. Resultados e Discussão	
4.1. Potenciais peptídeos intragênicos antimicrobianos de <i>Bos taurus</i> e <i>Gallus gallus</i>	45
4.2. Conservação das sequências	48
4.3. Síntese, purificação e avaliação da estrutura primária de IAPs	54
4.4. Quantificação dos peptídeos sintetizados	67
4.5. Estruturação dos peptídeos quando em interação com membranas fosfolipídicas sintéticas	67
4.6. Interação dos peptídeos com modelos de membrana	71
4.7. Potencial antimicrobiano dos peptídeos sintetizados	73
4.8. Estudos preliminares de confecção de filmes de PMMA contendo IAPs	74
4.9. Potencial antimicrobiano dos filmes sintetizados	83
5. Conclusões	87
6. Perspectivas futuras	89
7. Bibliografia	90

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP - Antimicrobial Peptide, em português Peptídeo Antimicrobiano.

AP - Active Packing, em português Embalagem ativa

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool, em português Ferramenta de Pesquisa Básica de Alinhamento Local

CDC - Centers for Disease Control and Prevention, em português Centro de Controle e Prevenção de Doenças

DCM - Diclorometano

DIPEA - *N,N'*-diisopropiletilamina

DMF - Dimetilformamida

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

FDA - Food and Drug Administration

GRAS - Generally Recognize as Safe

HBTU – Hexafluorofosfatato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 – tetrametilurônio

HPLC - High Performance Liquid Chromatography, em português, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IAP - Intragenic Antimicrobial Peptide, em português, Peptídeo Antimicrobiano Intragênico

MALDI-TOF - Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight, em português, Dessorção/ionização a laser assistida por matriz – tempo de voo

MIC - Minimum Inibitory Concentration, em português, concentração inibitória mínima

NCBI - National Center for Biotechnology Information, em português, Centro Nacional de Informação Biotecnológica

PDB - Protein Data Base, em português, Base de Dados de Proteínas

pI - Ponto Isoelétrico

PMMA – Ácido polimetacrilato

QSAR - Quantitative Structure-activity Relationship, em português, Relação Quantitativa estrutura - atividade

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RNA - Ácido Ribonucléico

TFA - Trifluoroacetic Acid, em português, ácido trifluoro acético

DSC – Differential Screening Calorimetry, em português, Calorimetria Diferencial de Varredura

CD – Circular Dichroism, em português, Dicroísmo Circular

TABELA DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Símbolo de uma letra	Símbolo de três letras	Massa monoisotópica
Ácido aspártico	D	Asp	115,026
Ácido glutâmico	E	Glu	129,042
Alanina	A	Ala	71,037
Arginina	R	Arg	156,101
Asparagina	N	Asn	114,042
Cisteína	C	Cys	103,009
Fenilalanina	F	Phe	147,068
Glicina	G	Gly	57,021
Glutamina	Q	Gln	128,058
Histidina	H	His	137,058
Isoleucina	I	Iso	113,084
Leucina	L	Leu	113,084
Lisina	K	Lys	128,094
Metionina	M	Met	131,04
Prolina	P	Pro	97,052
Serina	S	Ser	87,032
Tirosina	Y	Tyr	163,063
Treonina	T	Thr	101,047
Triptofano	W	Trp	186,079
Valina	V	Val	99,068

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) têm despontado como uma alternativa promissora aos antibióticos convencionais. Sua forma de ação, baseada em características inerentes à AMPs, permite que sejam ativos contra os mais diferentes patógenos com poucos relatos sobre resistência.

Dentre as diversas formas de identificar novas moléculas com atividade antimicrobiana, a pesquisa de sequências encriptadas dentro de proteínas complexas mostra-se uma boa fonte de moléculas bioativas.

Considerando as propriedades físico-químicas de AMPs de origem natural como ponto de partida para a síntese de novos peptídeos com atividade antimicrobiana, bem como a possibilidade de encontrar sequências de AMPs encriptadas dentro de proteínas, esta dissertação busca explorar esses fatos como forma de identificar AMPs intragênicos.

Coleções de proteínas de duas espécies, *Bos taurus* e *Gallus gallus*, foram pesquisadas como fonte de novos AMPs. A pesquisa é feita com base nas características físico-químicas de AMPs por meio do software Kamal. Após avaliação da possibilidade de agir como agente antimicrobiano, três peptídeos foram selecionados e sintetizados por meio da técnica de síntese de peptídeos em fase sólida. Os peptídeos Bt01, Bt02 e Gg01 foram testados quanto sua interação com membranas modelo usando as técnicas de Dicroísmo Circular e Calorimetria Diferencial de Varredura, além de ter seu potencial antimicrobiano frente a culturas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Todos os três peptídeos sintetizados apresentaram atividade antimicrobiana em concentrações na faixa de 4 – 8 μ M. Posteriormente, um peptídeo foi selecionado para co-precipitação em sistemas poliméricos, sendo analisadas sua presença e dispersão no meio por meio de MALDI e espectroscopia de absorção UV-Vis. Por fim, a atividade antimicrobiana do filme sintetizado foi preliminarmente investigada frente a meios de cultura líquido de *E. coli*, mostrando inibição de crescimento microbiano para todas as concentrações testadas.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides have emerged as a good alternative to conventional antibiotics. Their form of action, based on characteristics inherent to AMPs, allows them to be active against the varied pathogens with few reports of resistance.

Among the several ways to identify new molecules with antimicrobial activity, the search for encrypted sequences within complex proteins is a good source of bioactive molecules. Based on the assumption that physical-chemical characteristics of naturally occurring AMPs can be used as a starting point for the synthesis of new peptides with antimicrobial activity, as well as the possibility to find AMP sequences encrypted within proteins, this dissertation seeks to explore these facts as ways to identify intragenic AMPs.

The genome of two species, *Bos taurus* and *Gallus gallus*, was investigated as sources for new AMPs. The research is based on the physical-chemical characteristics of AMPs using the software Kamal. After evaluating the possibility of acting as an antimicrobial agent, three peptides were selected and synthesized by solid phase peptide synthesis. Their interaction with models membranes was evaluated using Circular Dichroism and Differential Scanning Calorimetry and their antimicrobial potential was determined against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Peptides Bt01, Bt02 and Gg01 presented antimicrobial activity in concentrations in the range of 4 – 8 μM . Additionally, one of the synthesized peptides was selected for co-precipitation in polymeric systems, and its presence and distribution in the product was evaluated by MALDI MS and UV-Vis spectroscopy. The antimicrobial potential of the synthetic film was evaluated against *E. coli*, showing antimicrobial activity at all the investigated concentrations.

1. Introdução teórica

1.1. Peptídeos Antimicrobianos

O problema enfrentado com o aparecimento de organismos multirresistentes a antibióticos leva ao estudo e aprofundamento acerca de peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês antimicrobial peptides). Muitos destes peptídeos são amplamente utilizados na medicina, como daptomicina (Cubicin[®]), dermicina 1 (Universidade de Eberharda Karola), gramicidina, β -defensina humana 3 (Escola de Medicina de Harvard), lactoferrina (Pet King Brands), lisostafina (Bioynexus), dentre outros¹. Esta classe de moléculas figura então como alternativa viável para o uso de antibióticos tradicionais.

De forma geral, peptídeos antimicrobianos são polipeptídeos sintetizados por ribossomos. Reúnem, comumente, um grupo de características que não só os definem, como também determinam sua forma de ação: são de pequeno tamanho (30 – 60 resíduos de aminoácidos); catiônicos (pI 8.9 – 10.7); estáveis a altas temperaturas (100 °C, 15 min)²; e podem permanecer desestruturados ou assumir estruturas secundárias tanto de α – hélices quanto de folhas β após adsorção em membranas plasmáticas³.

1.1.1. AMPs originados de insetos

A cecropina, primeiro AMP descoberto, é originário da *Hyalophora cecropia*, sendo publicado em 1980 pelo grupo de pesquisa de Boman². Hoje, mais de 200 peptídeos foram identificados em insetos, atuando de forma importante no sistema imune inato.

Durante o processo evolutivo, os insetos desenvolveram um mecanismo rápido e eficiente de resposta a ataques de microrganismos. Desta forma, peptídeos antimicrobianos são sintetizados no *fat body* (equivalente ao fígado presente em mamíferos) e rapidamente secretados na hemolinfa como forma de resposta a ataques de microrganismos².

De acordo com sua sequência de aminoácidos e sua função antimicrobiana, os peptídeos oriundos de insetos são classificados em:

- 1.1.1.1. Cecropinas: peptídeos de tamanho variando entre 35 e 39 aminoácidos, catiônicos, sem a presença de resíduos de cisteína em sua composição, formando duas alfa-hélices conectadas por um laço. De forma geral, constituem a classe cujo mecanismo de ação junto a membranas bacterianas é melhor compreendida². Mostram ação contra parasitas dos reino protozoa e metazoa, além de sua ação contra bactérias e fungos⁴.

- 1.1.1.2. Defensinas: família composta por peptídeos ricos em cisteína sendo estruturados de forma a possuírem três ou quatro ligações dissulfeto². Seu tamanho varia de 34-46 resíduos (com exceção de um tipo de defensina isolado em abelhas constituído de 51 resíduos)⁴. São principalmente efetivos contra bactérias gram-positivas, tendo também potencial contra algumas gram-negativas, fungos e protozoários².
- 1.1.1.3. Peptídeos ricos em glicina: apresentam ação contra fungos e bactérias gram-negativas, bem como contra células cancerígenas, onde atuam destruindo a parede celular.
- 1.1.1.4. Peptídeos ricos em prolina: grupo de peptídeos catiônicos caracterizados pela alta percentagem de resíduos de prolina – muitas vezes associados a resíduos de arginina em estruturas repetitivas. Seu modo de ação, ao contrário daquele observado em outros tipos de AMPs, não se baseia na perturbação da estrutura da membrana plasmática do alvo, mas sim busca células suscetíveis à internalização, atuando então de forma intracelular².

1.1.2. AMPs originários de plantas

AMPs foram encontrados nos mais variados componentes de plantas, como raízes, sementes, flores e folhas, mostrando atividade contra vírus, bactérias, fungos, protozoários, parasitas e células neoplásicas⁵.

Quanto a sua estrutura secundária e terciária, foram demonstradas diferenças significativas entre sequências de aminoácidos em diferentes famílias. De forma geral, as principais características envolvem uma representativa presença de cisteína e/ou glicina, com a presença de ligações dissulfeto (que apresentam papel importante na estabilização da estrutura em situações de estresse)⁵.

São classificados estruturalmente em α/β defensinas, tioninas, proteínas transferidoras de lipídeos, ciclotídeos, snakins ou hevein-like, com tal classificação sendo baseada em sua sequência de aminoácidos. De forma geral, eles estão conservados em diferentes espécies^{6,5}. Peptídeos oriundos de plantas representam cerca de 16% do total de sequências registradas em base de dados de AMPs⁶.

Da mesma forma que animais, plantas atuam na expressão de genes relacionados à peptídeos antimicrobianos em uma estratégia de defesa do tipo gene-por-gene. O estímulo inicial é transmitido por receptores de reconhecimento de padrões específicos. Eles então ativam uma resposta específica contra o organismo ao qual estão relacionados⁷.

1.1.3. AMPs presentes em mamíferos

AMPs também atuam no sistema imune de mamíferos, inclusive de humanos. Eles estão presentes em locais de constante exposição a patógenos (como na pele e na mucosa). Sua produção é frequentemente induzida por processos inflamatórios⁸. O principal AMP presente em mamíferos são as defensinas, com sua estrutura de tripla folha- β , seis resíduos de cisteínas ligados por ligações dissulfeto e uma carga líquida positiva. Ocorre uma subdivisão dentro da classe de defensinas de acordo com o pareamento dos resíduos de cisteína: α -defensinas e β -defensinas. Cita-se também as catelicidinas, caracterizadas pelo domínio *N*-terminal conservado, que deve sofrer proteólise para a geração do peptídeo ativo. Em certos mamíferos, vários tipos de catelicidinas são encontrados: em bovinos, tem-se o BMAP-28 com sua estrutura de α -hélice e ação contra um amplo espectro de bactérias e fungos; além do Bac 5, com sua estrutura rica em prolina e atividade contra bactérias gram-negativas. Interessante citar também a indolicina, catelicidina bovina formada apenas por 13 resíduos, com cinco deles sendo triptofanos⁹.

A diversidade de fontes de AMPs é assunto de revisões disponíveis na literatura e não se busca esgotar o assunto neste trabalho^{2,4,8}. De forma a complementar o apresentado acima, apresenta-se abaixo relação de diversos AMPs e sua fonte:

Tabela 1: AMPs³, suas estruturas primárias e organismos que os produzem

AMP	Estrutura Primária	Origem
Cecropina A	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIKAGPAVAVVGQATQIAKa	Bicho da seda
Magainina 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	Anfíbios
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	Humanos
β -Defensina	NPVSC ₁ VRNKGIC ₂ VPIRC ₃ PGSMKQIGTC ₂ VGRAVKC ₁ C ₃ RKK	Bovinos
Tionina	TTC ₁ C ₂ PSIVARRSNFNVC ₃ RIPGTPEAIC ₃ ATYGC ₂ IIIPGATC ₁ PGDYAN	Plantas

1.2. Desenvolvimento de novos peptídeos antimicrobianos

Centenas de peptídeos antimicrobianos de fontes naturais foram isolados, identificados e classificados. Inúmeras bases de dados estão presentes na internet com informações sobre tais moléculas e as espécies que as produzem, como o Antimicrobial Peptide Database (disponível em <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Além disso, o uso de bioengenharia de forma a criar biorreatores para a expressão recombinante em larga escala de AMPs também se mostra uma técnica de grande valor para a obtenção de peptídeos antimicrobianos em larga

escala (cabe aqui a citação ao uso de *E. coli* como biorreator devido sua rápida taxa de crescimento)².

Um método relativamente novo de identificação de peptídeos com possível atividade antimicrobiana é fundamentado no uso de técnicas de bioinformática para análise de candidatos. Baseando-se em organismos modelo, pode-se estimar que genomas de plantas possuem de 15 a 50 genes codificantes de defensinas. Tal valor pode ainda estar subestimado, uma vez que a *Arabidopsis* mostra 317 seqüências semelhantes a genes codificantes de defensinas quando utilizados modelos de prospecção *in silico*⁶.

O uso da bioinformática para a prospecção novos AMPs tem se mostrado uma ferramenta efetiva. A aplicação de métodos de relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR) como forma de modelar possíveis estruturas é um processo que relaciona características estruturais de uma molécula (definidas por meio de uma série de descritores) a características mensuráveis, como atividade biológica¹⁰. Esta metodologia parte da escolha de um peptídeo cuja atividade antimicrobiana já está comprovada. Ocorre a síntese de centenas de variantes do peptídeo selecionado, buscando assim estruturas com atividade antimicrobiana igual ou superior àquela do peptídeo parental¹⁰.

Dentre as várias formas de selecionar novos peptídeos com possível ação antimicrobiana, a prospecção de genomas buscando possíveis candidatos figura como um campo ainda pouco explorado. Deve-se entender que, mesmo assumindo estruturas diferentes, AMPs agem em membranas microbianas de forma semelhante. Assim, pode-se elencar os parâmetros físico-químicos dos AMPs que embasam essa interação e utilizá-los como forma de prever novos peptídeos com atividade em membranas microbianas.¹¹ O procedimento utilizado neste trabalho para prospecção se apoia em fundamentos dos métodos de relação quantitativa de estrutura-atividade (QSAR, do inglês quantitative structure-activity relationship). O método utiliza o software Kamal para prospectar o genoma de uma espécie tomando como base uma série de parâmetros físico-químicos desejados em um peptídeo antimicrobiano. O Kamal¹¹, software desenvolvido no Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia, realiza a digestão *in silico* das proteínas contidas no genoma de uma espécie selecionada considerando uma pré-definição de parâmetros relacionados com peptídeos antimicrobianos de fonte natural. Uma lista de possíveis candidatos é apresentada considerando os inputs inseridos na ferramenta¹¹.

A possibilidade de existência de moléculas bioativas codificadas dentro de proteínas não é novidade. Reporta-se como exemplo de obtenção de moléculas bioativas por meio de proteínas parentais, a clivagem do cininogênio de alta massa molecular no plasma sanguíneo

como fonte do vasoativo bradicinina; e as hemorfinas, moléculas obtidas pela proteólise da hemoglobina¹¹. O próprio sistema imune inato, notadamente o sistema complemento, baseia-se em um grande número de polipeptídeos antimicrobianos que são gerados por proteólise. Moléculas conhecidas por atuarem no processo inflamatório e que são derivadas de proteínas por meio de proteólise mostram atividade antimicrobiana e fungicida. A proteína C3a, gerada a partir da ativação do fator complementar C3, e a C4a, derivada do fator complementar C4 a partir da ativação da protease C1s, mostra atividade antimicrobiana, apresentando ainda características clássicas de AMPs. A C3a, contendo 77 aminoácidos em sua estrutura, apresenta regiões estruturadas na forma de α -hélice estabilizadas por ligações dissulfeto, carregando uma carga líquida +2. De forma semelhante, a C4a é um peptídeo catiônico de 77 resíduos¹². Hemorfinas, peptídeos de ação opioide, são obtidos a partir da degradação proteolítica da hemoglobina, figurando também como exemplo de intragenia em processos naturais¹¹.

A obtenção de novas moléculas a partir de matrizes protéicas já alcança o uso comercial. A aplicação de proteases, enzimas que atuam na clivagem de proteínas em peptídeos e aminoácidos correspondentes, já está estabelecida na indústria há anos no processo de fermentação de leite. Hoje, diversas proteases são usadas de maneira corriqueira em processos amplamente difundidos¹³. Proteases de origem microbiana também estão amplamente difundidas na indústria, de forma especial na fabricação de detergentes, figurando como aditivos neste tipo de produto desde 1914. Dados mostram que proteases representam cerca de 40% da venda de enzimas em larga escala, atuando em segmentos na indústria de detergentes, alimentos, fármacos, dentre outros¹⁴. Assim, a utilização de moléculas encriptadas em proteínas está amplamente difundido na indústria. Isso demonstra o interesse comercial destas moléculas “escondidas” dentro de uma proteína.

Assim, estes e outros exemplos permitiram que Brand et al partissem da premissa da presença de sequências ativas encriptadas em proteínas como fonte de novos peptídeos antimicrobianos, explorando a fragmentação teórica de proteínas como fonte de AMPs, independente da sua ação no organismo parental. Tais peptídeos recebem o nome de peptídeos antimicrobianos intragênicos (IAPs).¹¹

1.3. Prospecção *in silico* de peptídeos intragênicos antimicrobianos

A forma de identificação de possíveis peptídeos intragênicos antimicrobianos apresentada neste trabalho difere daquelas já bem estabelecidas no meio científico. Os trabalhos pesquisados para embasamento mostram técnicas pouco diretas para seleção de possíveis AMPs⁶ ou métodos de QSAR que dependem de complementos¹⁵. Muitas vezes,

parte-se da prospecção manual de possíveis sequências no genoma de uma espécie⁶ e a síntese extensiva de peptídeos de forma a testar diferentes combinações de aminoácidos buscando novos AMPs¹⁰.

O presente trabalho está fundamentado no fato de que os mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos estão diretamente ligados à suas propriedades físico-químicas¹¹. Diferentes AMPs de origem natural, que assumem as mais diferentes estruturas, agem de forma similar. Assim, elencando as características destes peptídeos naturais e utilizando-os como parâmetro, pode-se prospectar novos AMPs¹¹.

A prospecção é feita por meio do software Kamal. Desenvolvido por Brand et al, a ferramenta busca dentro do genoma de uma espécie selecionada por sequências que preencham um conjunto de características associadas a AMPs.

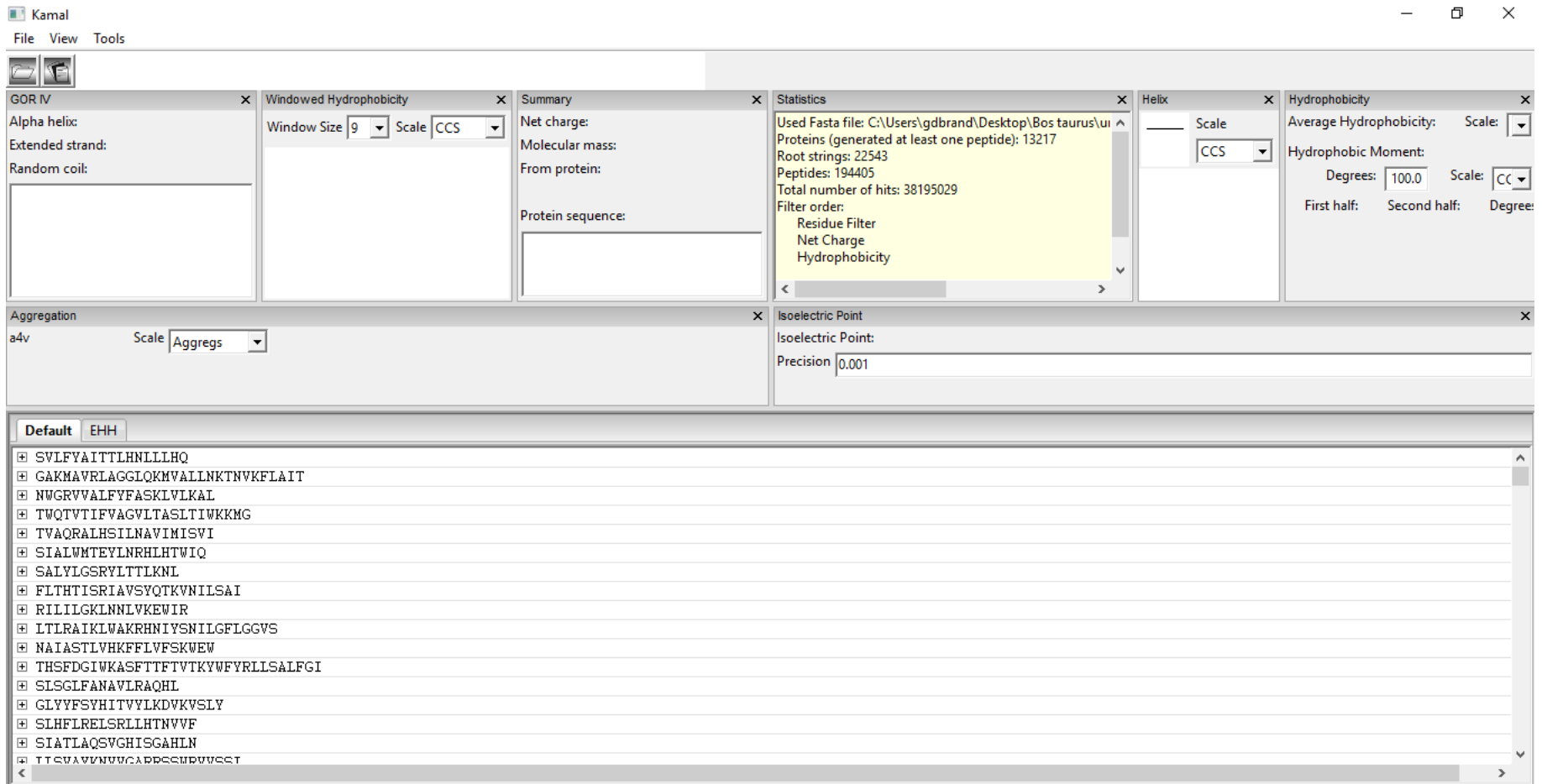


Figura 1: interface da ferramenta Kamal v.1.0 alpha

Ao buscar no genoma dos organismos possíveis sequências de interesse, o software retorna uma série de peptídeos que atendem as restrições apresentadas. Entretanto, cabe ao usuário rever essa lista (os resultados apresentados chegam a milhões de possibilidades) e escolher quais possuem maiores chances de apresentar atividade antimicrobiana. O usuário então repassa toda a lista de possíveis sequências e, pautado pelos mesmos parâmetros que foram inseridos na ferramenta, determina quais possuem maior probabilidade de possuir ação antimicrobiana. Os parâmetros físico-químicos e os procedimentos de análise posterior são apresentados em campo próprio dentro do item Metodologia deste trabalho¹¹. Cabe ressaltar que os parâmetros utilizados neste trabalho estão em constante evolução, de forma a aproximar a previsão cada vez mais do resultado esperado.

Uma vez selecionadas as sequências de maior probabilidade de atuarem de forma antimicrobiana, elas são sintetizadas, têm sua atividade antimicrobiana testada frente a testes com modelos de membrana lipídica e culturas de microorganismos.

1.4. Propriedades físico-químicas de AMPs

A grande vantagem quando se trata de AMPs é sua versatilidade de aplicação. Seu mecanismo de ação não se relaciona com receptores específicos como ocorre com antibióticos convencionais. Seu modo de ação está fundamentado na atração entre membrana e molécula de AMP guiada pela atração eletrostática resultante de interação entre AMPs catiônicos e membrana celular negativamente carregada¹⁶.

Das características inerentes aos AMPs, algumas figuram como condições estruturais importantes: carga líquida positiva, que facilita sua interação com a superfície negativamente carregada de membranas microbianas; a habilidade de assumir estruturas anfifílicas, o que as permite incorporar na estrutura das membranas microbianas¹⁶, e a hidrofobicidade média limítrofe, que permite sua interação com o meio aquoso e com a membrana microbiana¹⁷.

De forma a determinar possíveis sequências dentro do genoma de uma espécie que poderiam ter atividade antimicrobiana, algumas características de AMPs foram determinadas como balizadoras para uma possível sequência com atividade antimicrobiana. Cada uma dessas características é discutida abaixo, juntamente com sua relação com a atividade antimicrobiana.

1.4.1. Carga líquida

De forma geral, os AMPs conhecidos compartilham a característica de carregarem consigo uma carga líquida positiva distribuída por sua cadeia, embora sejam conhecidos alguns

AMPs com cargas negativas, como a dermacidina¹⁸. Seus alvos, membranas celulares de bactérias gram-positivas e negativas, apresentam uma carga negativa superficial¹⁹. Possivelmente o alvo de tais AMPs seja a membrana interna da estrutura bi membrana, que comumente possui todo o aparato de fosforilação oxidativa¹⁹.

A carga líquida observada em AMPs naturais varia de 0 a +16, sendo que a grande maioria cai dentro de uma faixa intermediária que varia em +4 e +6. A carga líquida também figura como tendo estrita relação com a intensidade de ação de peptídeos antimicrobianos. Estudos mostram que o aumento da carga líquida da pardaxina (obtida a partir da transaminação de grupos ácido carboxílico) levam a um aumento da atividade antimicrobiana desta molécula, além de aumentar sua atividade hemolítica.¹⁶

Desta forma, têm-se que a faixa +2 a +6 para carga líquida de um peptídeo com possível atividade microbiana é uma aceitável medida para prospecção de um AMP intragênico¹⁶.

1.4.2. Estrutura secundária

AMPs podem assumir tanto estruturas de folhas β quanto de α -hélice¹⁶. O princípio fundamental que rege a estrutura dos variados tipos de peptídeos antimicrobianos é a habilidade destas moléculas assumirem uma forma anfifílica, de forma que partes hidrofóbicas e hidrofílicas das moléculas ficam espacialmente separadas⁷.

Entretanto, essa “característica” fundamental de forma alguma impõe uma estrutura secundária determinante às moléculas de AMP. Vide a existência de peptídeos lineares como cecropinas e magaininas, que assumem uma estrutura de α -hélice ao adentrarem na membrana, e de peptídeos como bactericinas, que estruturam-se como folhas β rígidas.⁷ Dados obtidos por meio de ressonância magnética nuclear (RMN)²⁰, mostram que peptídeos antimicrobianos variam em relação a sua estrutura secundária, não adotando uma estrutura preferencial uma vez em contato com a membrana microbiana.

O parâmetro utilizado na prospecção de AMPs foi o grau de estruturação do possível AMP (% helicidade conforme o índice GOR)¹⁶. Sabe-se da pluralidade de preditores de estrutura existentes. No trabalho em questão, seguiu-se os parâmetros propostos por Brad *et al*¹¹ para o software Kamal, que utilizaram o GOR IV como preditor de estrutura, Além disso, as inferências posteriores feitas com os peptídeos sintetizados tomam como base dados obtidos usando também o GOR IV como preditor. Estudos mostram a existência de correlação entre dados previstos pelo GOR para helicidade e a estrutura secundária assumida pelo peptídeo quando em contato com a membrana microbiana para determinados grupos de moléculas¹⁸. De forma geral, o mecanismo de ação de peptídeos estruturados como α -hélice é bastante

conhecido e este tipo de estruturação pode ser considerado como parâmetro para análise de possível atividade antimicrobiana de uma sequência.

Peptídeos que se estruturam em α -hélices são encontrados nas mais variadas fontes, desde insetos até em humanos. Tais peptídeos são de longe a classe mais estudada, e seu possível modo de ação posa como uma boa forma de exemplificar o modelo de ação de peptídeos antimicrobianos em membranas microbianas¹⁹. Cabe ressaltar que não se busca determinar que somente AMPs estruturados como α -hélices são efetivos ou têm maior ação contra microorganismos; pelo contrário, conforme dito anteriormente, inúmeros peptídeos estruturados como folhas – β de fontes naturais são conhecidos e classificados¹⁹. Busca-se somente diminuir o escopo de pesquisa, frente ao enorme espaço amostral de possível IAPs.

1.4.3. Hidrofobicidade média e momento hidrofóbico

Dois dos parâmetros primordiais que pautam um peptídeo antimicrobiano são o momento hidrofóbico (μ) e a hidrofobicidade média da cadeia. Esses parâmetros são discutidos abaixo, bem como sua relação com a seleção de novos AMPs.

Considerando a distribuição espacial das cadeias laterais dos resíduos presentes em um peptídeo que assume uma forma anfifílica, temos que, em uma face, projetam-se principalmente cadeias hidrofóbicas, enquanto na outra, a presença predominante é de resíduos hidrofílicos²¹. Tal distribuição é que confere à molécula um caráter anfifílico necessário para que ela tanto interaja com a membrana microbiana quanto com o meio hidrofílico em que se está inserida. A figura 2 abaixo apresenta esta distribuição na forma de uma representação conhecida como helical wheel, que mostra de forma didática a separação de cargas apresentada por peptídeos antimicrobianos.

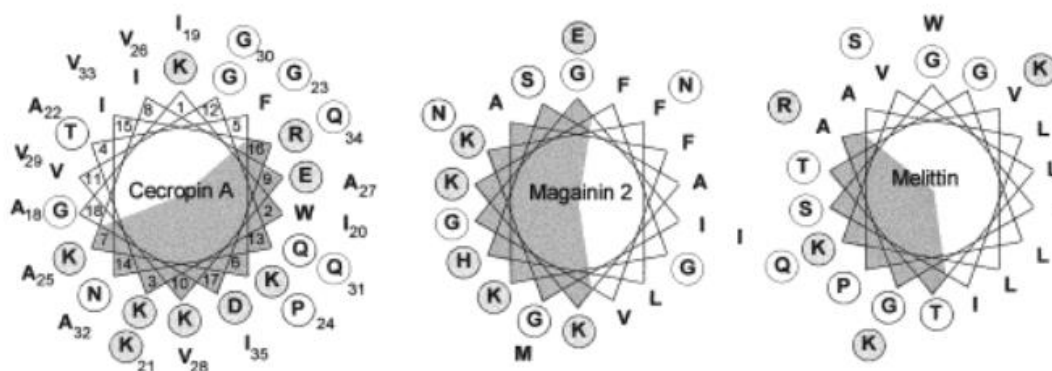


Figura 2: Helical wheel de AMPs de fontes naturais demonstrando a característica separação de cargas associadas a este tipo de peptídeo. Resíduos carregados são representados por círculos escuros, enquanto aqueles neutros polares são círculos claros¹⁶.

A anfifilicidade de uma molécula, especialmente de uma α -hélice, é quantificada então pelo momento hidrofóbico, definido como o vetor médio da soma dos vetores hidrofobicidade H_i das cadeias laterais da hélice composta por N resíduos²¹. A identificação de novos AMPs deve buscar molécula com distribuição de cargas espacialmente separadas quando plotadas na forma de uma helical wheel. É essa separação de cargas, quantificada pelo momento hidrofóbico, que auxiliará em uma efetiva interação com o meio extracelular e com membranas microbianas.

A hidrofobicidade média de uma cadeia é definida pela sua composição de aminoácidos. A hidrofobicidade associada a cada resíduo é definida como a energia livre associada à transferência de um mol da molécula de uma solução aquosa (a uma certa concentração) para um meio etanólico (na mesma concentração), não considerando aqui coeficientes de atividade. É uma característica associada à cadeia lateral de cada resíduo. A denominação desta energia livre com sendo a *hidrofobicidade* é feita por Dunnill em 1965.²²

Mesmo em peptídeos com baixa hidrofobicidade média, a atividade antimicrobiana é observada¹⁷. Entretanto, não se deve buscar por extremos quando se considera hidrofobicidade média em uma molécula. Peptídeos com alta hidrofobicidade média mostram alta probabilidade de transição de estrutura de α – hélices para folhas – β . Esse fenômeno se dá devido ao efeito de neutralização que ocorre com a ligação das moléculas à superfície da membrana, e o ambiente desidratado facilita a formação de agregados de folhas – β . Tais agregados podem diminuir a atividade antimicrobiana ao limitar a concentração de peptídeos na superfície da membrana¹⁷.

De forma mais preocupante, peptídeos com alta hidrofobicidade média têm, aparentemente, capacidade hemolítica contra células de mamíferos, com potencial ação contra eritrócitos humanos. Peptídeos com baixa hidrofobicidade não exibem tal comportamento¹⁷.

Assim, a análise de possíveis peptídeos com atividade microbiana foi pautada por encontrar sequências com valores intermediários de hidrofobicidade média, sem buscar extremos em que, de um lado, podem fornecer moléculas sem ação em membranas (e assim sem atividade antimicrobiana associada), e de outro levam a estruturas com possibilidade de hemólise de células do hospedeiro ou que levam à agregações que diminuam sua capacidade de ação.

1.5. Mecanismos de ação de AMPs

A interação eletrostática dos AMPs com a membrana plasmática de bactérias figura como ponto central da ação antimicrobiana dos peptídeos. A estrutura de membranas de uma

bactéria compreende parede celular (estrutura externa à membrana plasmática) e a membrana plasmática propriamente dita. A ação de peptídeos antimicrobianos é devido majoritariamente à sua interação com a membrana e a possibilidade que estes possuem de interromper a organização coesa desta estrutura, levando à lise e a processos de morte celular.

1.5.1.1. Propostas de mecanismos de ação de AMPs

1.5.1.1.1. Formação de poros transmembrana

Clássica ação transmembrana de formação de poros. Monômeros de peptídeos se agrupam como pacotes de forma que sua face hidrofóbica interaja com a parte lipídica da membrana, mantendo sua porção hidrofílica apontando para fora, introduzindo um poro na estrutura coesa da membrana¹⁹.

O modo de ação envolvido neste mecanismo é dividido em etapas. Primeiro ocorre a ligação dos monômeros de peptídeos à superfície da membrana, com o consequente reconhecimento entre os monômeros ligados de forma a se estruturar para a formação de poros mesmo em baixas concentrações. O rompimento da membrana se inicia com a inserção de ao menos dois monômeros na estrutura para a formação do poro. Uma vez que tal rompimento foi iniciado, ocorre o progressivo recrutamento de mais monômeros para o local de forma a aumentar o tamanho do poro¹⁹.

Uma vez que um único monômero não possui condições energéticas suficientes para romper a estrutura da membrana, a interação inicial entre, no mínimo, dois monômeros, figura como condição para o rompimento da membrana¹⁹.

O poro formado leva à formação de um canal de água, que provoca a morte do microrganismo por motivos de perda de polarização, vazamento de conteúdo intracelular, perturbação da função da membrana devido à redistribuição de lipídeos ou ainda a ativação de hidrolases que atuam na destruição da estrutura de membrana. Os AMPs SK84, Hf-1 e Ctx-Ha possuem um mecanismo de ação baseado neste tipo de formação de poros².

1.5.1.2. Modelo carpet-like

De forma análoga à apresentada no modelo de formação de poros, tal mecanismo se inicia com a atração eletrostática dos peptídeos à membrana microbiana, devido à carga negativa exibida pela membrana. Entretanto, ao contrário do apresentado no modelo explanado anteriormente, aqui os peptídeos se espalham sobre a estrutura da membrana até atingir uma concentração suficiente para a formação de agregados da membrana plasmática, com lipídeos sendo estabilizados pelos peptídeos anfipáticos^{19,2}.

A membrana plasmática é desintegrada, formando algo parecido com micelas da membrana, levando ao colapso de toda a célula. O mecanismo de ação se inicia com a interação

eletroestática entre peptídeo positivamente carregado e membrana negativamente carregada, com posterior espalhamento dos AMPs sobre a membrana. A molécula então rotaciona de forma a reorientar os resíduos hidrofóbicos em direção ao núcleo hidrofóbico da membrana, com conseqüente perturbação da membrana, levando à micelização da mesma²¹⁹.

O mecanismo de ação é similar à ação de detergentes, cobrindo a superfície da célula até que uma concentração mínima para ação seja atingida. A formação de poros transientes é esperada antes dos mecanismos de micelização, com transferência de lipídeos da face externa da membrana para a face interna. É o mecanismo de ação mais comum em peptídeos que adotam uma estrutura de α – hélice².

1.5.1.3. Mecanismo toroidal

Exibe a mesma propriedade da formação de poros transmembrana descritos anteriormente, com diferente forma de produção dos poros. Neste mecanismo, os peptídeos agregados na superfície da membrana forçam os lipídeos a formarem continuamente ligações de forma que eles assumem uma forma curvada, formando assim o poro².

1.5.1.4. Ação intracelular de AMPs

Mesmo que o principal e mais estudado modo de ação de AMPs seja sua capacidade de afetar a estrutura da membrana plasmática, hoje já se sabe que várias moléculas apresentam a capacidade de agir intracelularmente, possuindo como alvos ácidos nucléicos, proteínas e enzimas. Sua ação está associada à mecanismos de translocação na membrana de maneira não-letal²³.

O peptídeo Buforina II mostra-se inativo quando se considera sua afinidade com membranas de espécies gram-negativas. Entretanto, quando testada sua afinidade por pequenas sequencias de DNA dupla – hélice, encontra-se a formação de condensados com alta afinidade. Isso pode indicar a ação de tal peptídeo em mecanismos intracelulares tendo DNA ou RNA como moléculas alvo².

O Bac 71-35, fragmento N-terminal da Bac7, mostra capacidade de internalização em células de *E. coli* em um mecanismo que envolve a proteína de membrana SbmA. Estudos conduzidos utilizando este fragmento mostram a internalização da molécula sem destruição da estrutura da membrana. Tal fragmento tem ação intracelular de interrupção de síntese de proteínas, provavelmente pela ligação aos ribossomos. De forma específica, a Bac71-35 atua inibindo os processos de transdução/translação na síntese de proteínas²³.

Mesmo com notáveis indícios de ações intracelulares de AMPs, tal ramo ainda não foi amplamente estudado, carecendo de informações aprofundadas sobre alvos intracelulares e mecanismos de ação. Daquilo que é apresentado na literatura, mostra-se que a ligação de AMPs

à moléculas de DNA dupla-hélice segue a mesma relação eletrostática que guia a interação AMP – membrana²³.

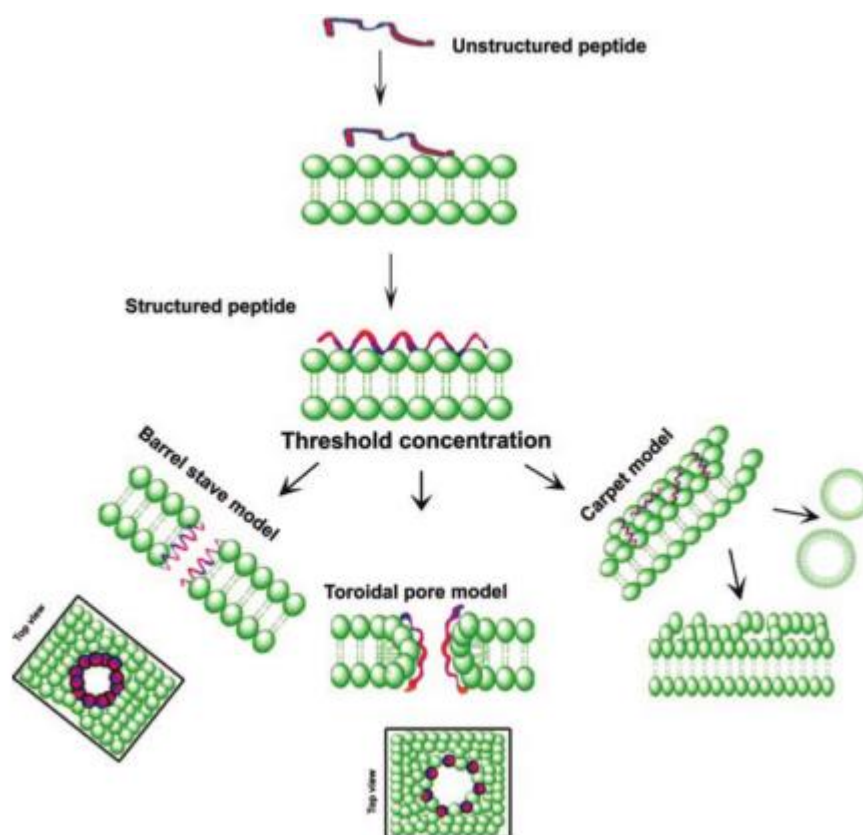


Figura 3: Propostas de mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos. Os mecanismos de formação de poros transmembrana (barrel stave model), capert-like (carpet model) e toroidal (toroidal pore model) são representados acima após a estruturação do peptídeo quando em contato com a membrana microbiana.¹²

1.5.2. Mecanismos de resistência a peptídeos antimicrobianos

Mesmo atuando de forma não específica, a ação de peptídeos antimicrobianos enfrenta mecanismos de resistência frente a patógenos. Um dos modos de resistência reside em alterar a composição da membrana celular²⁴, de forma a mudar sua carga superficial, uma vez que a interação eletrostática entre membrana e peptídeo é a primeira etapa de ação do peptídeo e a forma como ele se direciona à membrana microbiana. Algumas bactérias gram-positivas alteram a composição de sua membrana inserindo resíduos catiônicos de L-Lys, desta forma mudando a carga superficial da membrana e diminuindo a afinidade de AMPs catiônicos pelo patógeno²⁵.

Alterações no peptideoglicano que forma a parede celular das bactérias também figura como um possível mecanismo de resistência a AMPs catiônicos. A N-desacetilação da N-

acetilglicosamina e a O-acetilação do ácido N-acetilmurâmico alteram a composição de cargas na estrutura, conferindo resistência tanto a AMPs catiônicos quanto a lisossomos²⁴.

Ácidos teóicos representam outro importante componente da parede celular de bactérias gram-positivas. D-alanilação dos ácidos teicóicos representa mais um tipo de alteração na carga superficial da membrana de forma a gerar um mecanismo de resistência contra AMPs catiônicos²⁴.

O recrutamento de grupos que recobrem a superfície da membrana é outro modo de diminuir a interação entre patógeno e AMP. A *S. pneumoniae* recobre a superfície da bactéria com moléculas de colina altamente carregadas. Ocorre então a alteração da carga superficial da bactéria, o que diminui sua interação com AMPs carregados, e assim sua suscetibilidade a esses agentes antimicrobianos²⁴.

Além dos apresentados acima, por fim, cita-se a eliminação direta do AMP a partir de proteases secretadas pelo microrganismo. De certa forma, essa forma de resistência não é um mecanismo de ação direcionada exclusivamente contra AMPs, uma vez que também atua ao promover virulência ao inativar anticorpos, citocinas, proteínas complemento e a maquinaria de autofagia. Bactérias gram-positivas secretam ao menos uma protease de ação exclusiva contra AMPs catiônicos: SpeB. Ela consiste em uma protease de cisteínas que atua clivando proteínas tanto extra quanto intracelular. De forma específica, ela é ativa ao hidrolisar os AMPs LL-37 e β -defensinas, ambos AMPs presentes no sistema imune de humanos²⁴.

1.6. Interação de peptídeos antimicrobianos com membranas modelo

Peptídeos antimicrobianos tendem a assumir uma estrutura randômica quando em solução. Sua estruturação depende então da interação com a membrana que tem como alvo. Sua estrutura anfifílica apresenta resíduos positivamente carregados, que, uma vez em contato com a membrana, interagem com os grupos fosfato negativamente carregados. Essa interação permite uma estruturação da molécula sobre membrana (ocorre a promoção da formação de ligações de hidrogênio intramoleculares no peptídeo, levando ele a assumir uma estrutura secundária definida)²⁶.

O estudo da estrutura secundária de peptídeos e proteínas pode ser feita por várias técnicas, notadamente Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (¹H RMN) e Dicroísmo Circular (CD). No presente trabalho, essa análise de estruturação foi realizada por meio da técnica de CD.

Diferentes conformações apresentam sinais característicos em um espectro de CD. α – hélices apresentam uma banda de sinal negativo em 222 nm que está relacionada com o

ambiente rico em ligações de hidrogênio comum a estruturas em α -hélice²⁷. Greenfield e Fasman mostraram que conformações nesta estrutura fornecem um sinal em 208 nm de valor máximo aproximado de $-33000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ ²⁷. Além disso, estas estruturas também apresentam um sinal positivo em aproximadamente 190 nm. Folhas β apresentam bandas negativas em 218 nm e uma banda positiva em 195-200 nm. Já estruturas desordenadas, sem padrão repetitivo, denominado como espiral randômica (random coil), apresentam uma banda negativa de alta magnitude em 200 nm²⁷.

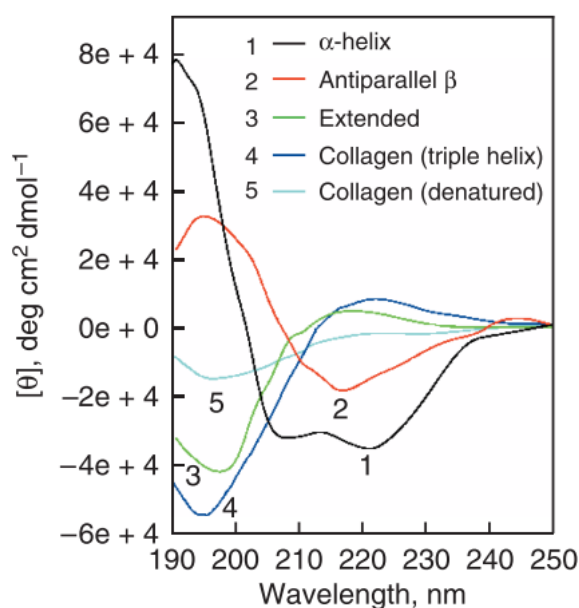


Figura 3: Moléculas com diferentes estruturas secundárias submetidas a um espectropolarímetro apresentam diferentes comportamentos quanto à absorção da radiação polarizada. Na figura acima, os espectros de absorção de diferentes estruturas são apresentadas com cores diferentes²⁸. Com base nesse comportamento, inferências sobre a estrutura secundária de um peptídeo poderão ser realizadas.

A interação de peptídeos e proteínas pode ser estudada por meio de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). De forma geral, fosfolipídeos quando organizados em estruturas coesas – como em uma membrana ou na forma de vesículas – tendem a apresentar um comportamento associado a um fenômeno térmico dito como transição de fase. Esse comportamento envolve a conversão da estrutura da vesícula de uma forma de gel a uma estrutura cristalina. As cadeias de hidrocarbonetos dos lipídeos são convertidas de uma estrutura rígida, estendida, dominada por conformações *trans* para um estado de orientação desordenada caracterizada pela presença de conformações *gauche*²⁹.

A temperatura de transição é dependente da composição do fosfolípídeo a ser estudado, notadamente do tamanho de cadeia e a estrutura química das cadeias de hidrocarbonetos (a porção acil do fosfolípídeo, bem como da natureza das cabeças fosfato presentes da estrutura²⁹.

A técnica de DSC compara o comportamento de um padrão e a amostra de interesse. As duas amostras são submetidas ao mesmo gradiente de temperatura, de 0 a 40 °C. Conforme dito, a vesícula apresentará o comportamento de transição de fase quando do aumento da temperatura. Para manter a temperatura das duas células igual, o aparelho deve fornecer ou retirar energia térmica da célula contendo os fosfolípídeos. Essa diferença de energia fornecida/retirada é o parâmetro medido pelo aparelho²⁹.

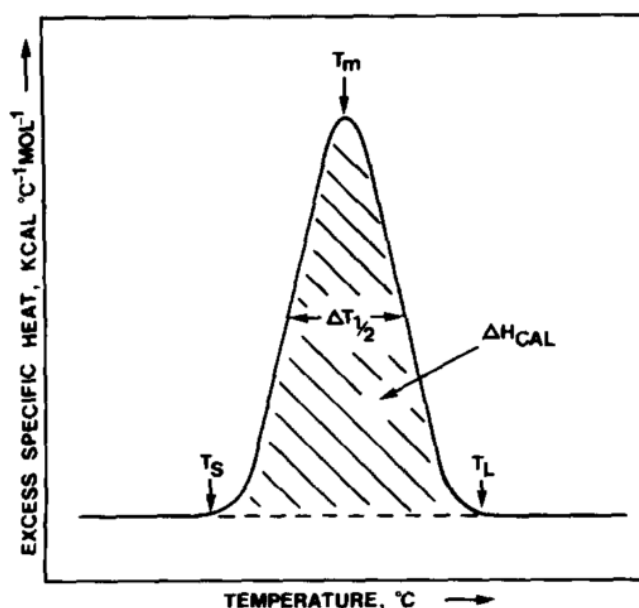


Figura 4: comportamento de fosfolípídeos quando submetidos à rampa de temperatura no DSC²⁹.

Os seguintes parâmetros podem ser inferidos do gráfico acima: T_M = temperatura da transição de fase, que representa a temperatura em que o excesso de calor fornecido pelo aparelho é máximo; ΔH = entalpia associada ao processo de transição de fase; $\Delta T_{1/2}$ = largura da banda meia altura.

Partindo do pressuposto de que a interação dos peptídeos sintetizados com a vesícula de fosfolípídeos tende a desorganizar a estrutura coesa apresentada, é de se esperar que ocorra uma alteração na transição de fase dos fosfolípídeos que compõem a vesícula. O grau de alteração dessa transição de fase caracterizará e apontará a forma de interação dos peptídeos com a membrana sintética³⁰.

McElhaney e colaboradores classificam as interações de peptídeos e proteínas com modelos de membrana em três tipos de acordo com a alteração apresentada na transição de fase:

Tipo 1: não apresentam mudança ou, no máximo, uma pequena alteração nos valores de T_M e $\Delta T_{1/2}$ e um aumento progressivo no ΔH com o aumento da concentração do peptídeo. Não ocorre expansão de monocamadas ou alteração na permeabilidade das vesículas. Comportamento característicos de peptídeos hidrofílicos que interagem com a membrana somente por interações eletroestáticas²⁹.

Tipo 2: ocorre diminuição do T_M , aumento do $\Delta T_{1/2}$ e diminuição considerável e progressiva do ΔH , com expansão da monocamada e aumento da permeabilidade. Acredita-se que as moléculas interajam com a camada fosfolipídica em uma combinação de forças eletroestáticas e hidrofóbicas, com penetração parcial da molécula no core hidrofóbico da membrana²⁹.

Tipo 3: T_M e $\Delta T_{1/2}$ não são fortemente afetados. Entretanto, o ΔH diminui linearmente com a concentração de peptídeo/proteína. Comportamento adotado por moléculas que interagem acentuadamente com o core hidrofóbico da membrana, eliminando interações cooperativas entre os ácidos graxos²⁹.

Brand e colaboradores¹⁸ apresentam uma classificação de peptídeos antimicrobianos baseada na forma como tais moléculas interagem com modelos de membrana em um estudo de DSC. A análise de 52 peptídeos e sua interação com DMPC e 2:1 DMPC:DMPG foi o ponto de partida para a definição desta nova classificação. Os dados brutos foram analisados por meio de uma ferramenta estatística de análise de componentes principais (PCA) e o resultado foi a definição de cinco clusters de peptídeos¹⁸:

Cluster 1: composto por moléculas que não apresentam nenhuma interação com os modelos de membrana testados;

Cluster 2: composto por peptídeos que não apresentam qualquer alteração na transição de fase de vesículas de DMPC, mas alteram a transição de fase de vesículas de 2:1 DMPC:DMPG;

Clusters 3 e 4: composto por IAPs e AMPs que alteram a fase de transição de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG;

Cluster 5: Composto somente por AMPs.

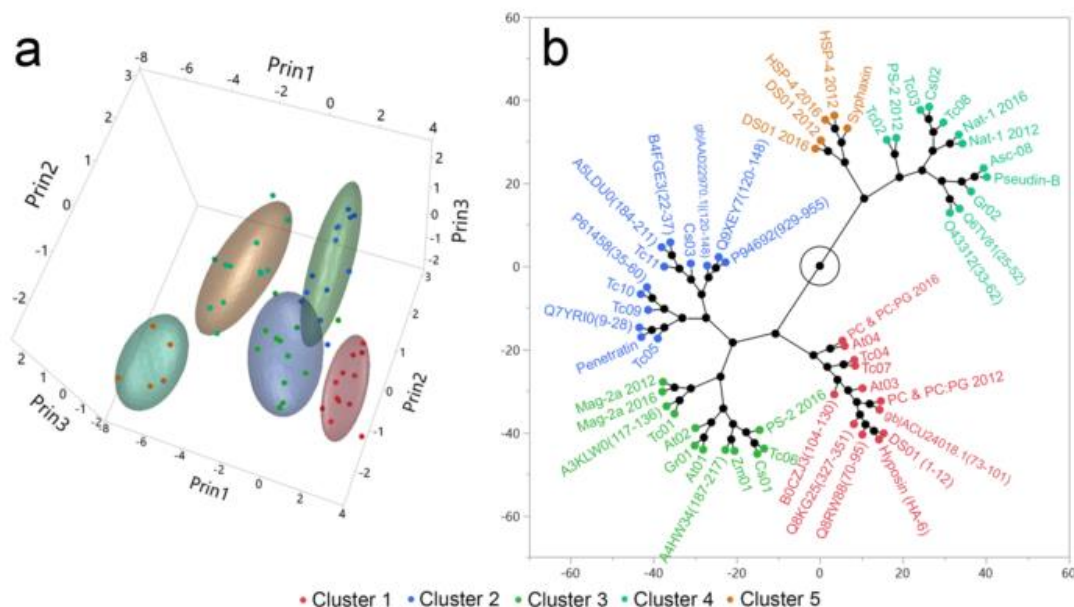


Figura 5: a. Clusters formados após a análise estatística dos dados referentes a estudos de DSC da interação de 52 peptídeos com vesículas de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG. Cada cluster é representado por uma cor diferente, conforme apresentado na figura. b. Categorização dos peptídeos estudados nos diferentes clusters determinados pela análise de PCA¹⁸.

Os dados de perturbação de fase de transição de membrana foram então comparados com o potencial antimicrobiano dos 52 peptídeos. Mostrou-se haver uma correlação entre a interação com vesículas de DMPC e a atividade antimicrobiana dos peptídeos. Isto é: aqueles peptídeos previstos como pertencentes aos clusters 3 e 4 apresentavam atividade antimicrobiana.

Utilizando essas duas técnicas, pode-se estudar tanto a forma como os peptídeos sintetizados se estruturam na superfície de modelos de membrana, como estimar o tipo de interação quando em contato com tais modelos. De forma geral, o comportamento da molécula frente a essas duas técnicas, notadamente quanto aos resultados de DSC, permitem situar o peptídeo em *clusters* de AMPs^{11,31}. A categorização de peptídeos quanto seu comportamento frente à técnica de DSC permite a separação das moléculas em *clusters* relacionados com sua interação e perturbação dos modelos de membrana¹⁸.

1.7. Conservação de alimentos e active packing

O objetivo central deste trabalho, razão pela qual a pesquisa no genoma das espécies selecionadas foi realizada e os peptídeos foram sintetizados, é buscar novas moléculas com ação antimicrobiana para a conservação de alimentos. Esse objetivo não foca somente na

seleção de novas moléculas antimicrobianas, que podem ser determinadas sem o estudo bioinformático que precedeu a etapa da síntese, mas principalmente na necessidade de agentes antimicrobianos de fonte natural e, mais especificamente, moléculas encriptadas no genoma da espécie que dará origem ao alimento a ser conservado. Essa premissa guia todo o projeto ao determinar então a pesquisa nas espécies de *Bos taurus* e *Gallus gallus*, espécies que fornecem cortes de carne para ampla comercialização.

A demanda por produtos minimamente processados tem aumentado consideravelmente com o tempo, o que determina a pesquisa e desenvolvimento de produtos cada vez mais voltados para a saúde e a segurança dos consumidores³². A conservação de alimentos por si só já é um desafio a ser enfrentado. Busca-se cada vez mais métodos que permitam conservar produtos com mínima invasão, de forma a manter os nutrientes e evitar reações que alterem a composição natural do alimento a ser embalado.

1.7.1. **Desafio na conservação de carnes**

A conservação de carne fresca torna-se um desafio ainda maior, uma vez que sua diversa composição nutricional torna-a campo excelente para a propagação de micro-organismos.³³ Deve-se ter em mente que a conservação de carne fresca não envolve somente a inibição do crescimento de micro-organismos: envolve também a conservação de propriedades como cor e odor, parâmetros decisórios na hora da escolha do produto pelo consumidor final.³³.

Mesmo sabendo que a deterioração do alimento também ocorre por processos naturais de proteólise, lipólise e oxidação, a inibição do crescimento de microrganismos deve ser o principal objetivo quando se fala de conservação de alimentos³³. O objetivo central de qualquer processo de embalagem e conservação de alimentos deve ser a manutenção da segurança alimentícia do produto, antes mesmo de se pensar em parâmetros comerciais. Doenças relacionadas com alimentos figuram como um problema de saúde pública global. Uma forma de ilustrar a seriedade da situação advém dos dados divulgados pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC, do inglês Centers for Disease Control and Prevention). Estima-se que, a cada ano, nos Estados Unidos, 31 patógenos causem 37,2 milhões de doenças, sendo que destas, 36,4 milhões são adquiridas dentro de casa. Destas adquiridas dentro de casa, 9,4 milhões são determinadas como doenças causadas por alimentos³⁴.

Abaixo apresenta-se os dados compilados pelo CDC quando aos episódios relacionados com doenças transmitidas por meio de alimentos.

Tabela 02: Dados compilados pelo CDC quanto a doenças causadas por alimentos³⁴.

Agentes de transmissão	Número anual estimado de episódios		Número anual estimado de hospitalizações		Número anual estimado de mortes	
	Quantidade	%	Quantidade	%	Quantidade	%
31 patógenos conhecidos	9,4 milhões	20	55.961	44	1.351	44
Agentes não especificados	38,4 milhões	80	71.878	56	1.686	56
Total	47,8 milhões		127.839		3.037	

Tabela 03: Principais patógenos associados a doenças causadas por comidas

Patógeno	Número estimado de episódios	Porcentagem
Norovírus	5.461.731	58
<i>Samonella</i>	1.027.561	11
<i>Clostridium perfringens</i>	965.958	10
<i>Campylobater spp</i>	845.024	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	241.148	3

Quando se considera que as bactérias encontradas nos alimentos ainda representam uma forma de transmissão de resistência a antibióticos, a situação se agrava. Estudos mostram que bactérias presentes de forma comensal em alimentos podem figurar como “reservatórios” de genes de resistência a antibióticos para patógenos encontrados em humanos^{35,36}.

1.7.2. Métodos convencionais na conservação de alimentos

As diversas formas de inibição de proliferação de microrganismos envolvem processos térmicos (elevação da temperatura a 60 °C por alguns minutos e depois a 100 °C por alguns segundos)³⁷, processos não térmicos, como a aplicação de radiação ionizante³³ (¹³⁷Cs e ⁶⁰Co são espécies aprovadas para uso na inativação de bactérias em carne fresca) e de processo de luz pulsada (aplicação de intensos pulsos de radiação eletromagnética durante curtos períodos de tempo)³⁷.

Métodos químicos de preservação envolvem a aplicação de gases (como dióxido de carbono e ozônio) e o uso de ácidos orgânicos (como o ácido lático) para evitar a proliferação de microrganismos. Entretanto, tais métodos apresentam desvantagens tanto do ponto de vista ambiental (ozônio, mesmo atuando de forma efetiva contra patógenos presentes no ambiente onde o produto está sendo conservado, representa uma grave ameaça ao meio ambiente) quanto

do ponto de vista comercial (com exceção do ácido láctico, ácidos orgânicos foram responsáveis pela produção de odores desagradáveis e descoloração de carne fresca onde atuava como conservante)³³.

Diante do apresentado, o uso de agentes naturais representa alternativa para a conservação de alimentos em detrimento de agentes clássicos. Já são empregados óleos naturais (misturas naturais com uma variedade de constituintes, em sua maioria terpenos e terpenóides)³⁸ e peptídeos antimicrobianos de fontes naturais. A nisina, bacteriocina disponível comercialmente, tem sido utilizado como forma de descontaminar pedaços de carne de porco³³.

Materiais para embalagem de alimentos derivatizados com agentes antimicrobianos tem o objetivo de estender a vida útil destes alimentos, reduzindo, inibindo ou retardando a taxa de crescimento de microrganismos, mantendo a qualidade e a segurança do produto^{32,39}. Se o próprio produto tem a capacidade de se auto esterilizar a partir de seu efeito antimicrobiano, a necessidade de esterilização química é eliminada e o processo de assepsia durante o processo de embalagem é simplificado³².

Estratégias de conservação de alimentos baseadas em organismos vivos ou os produtos antimicrobianos produzidos por estes são denominados como biocontrole, ou ainda bioconservação⁴⁰. Estes métodos têm as vantagens de serem apresentados como métodos de preservação natural, tendo assim um menor impacto nas características nutricionais, bem como nas propriedades sensoriais do produto. São vistos com bons olhos também do ponto de vista econômico, uma vez que aumentam a vida útil dos alimentos (evitando assim o desperdício) além de, uma vez otimizados, não requerem equipamentos tecnologicamente avançados, o que os permite ser explorados por pequenos produtores⁴⁰.

Diversas formas de packing antimicrobiano podem ser utilizadas, como a adição de sachês contendo agentes antimicrobianos voláteis; incorporação de agentes voláteis e não-voláteis diretamente em polímeros; adsorção de agentes antimicrobianos em filmes de polímeros; além do uso de polímeros que são inerentemente antimicrobianos³⁹.

1.7.3. Active packing e a inovação do presente trabalho

Agentes antimicrobianos incorporados em polímeros possuem amplo potencial de utilização no *active packaging* de alimentos. Zeólitas de prata são amplamente utilizadas como aditivos na preservação de alimentos (os átomos de prata são absorvidos pelas células e interrompem atividades enzimáticas específicas). Além disso, a enzima lactoperoxidase e a proteína lactoferrina (estruturas com atividade antimicrobiana) também podem ser imobilizadas em tais sistemas, além de peptídeos antimicrobianos³⁹. A nanobiotecnologia

também se mostra aliada na criação de novos produtos antimicrobianos, como na síntese e aplicação de nanopartículas de óxido de zinco⁴¹.

Tecnologias baseadas no *active packaging* (AP) são capazes de embalar o produto de forma que a embalagem, o produto e o ambiente trabalham em conjunto para prolongar a vida útil do produto ou realçar propriedades sensoriais enquanto mantém sua qualidade³². As principais técnicas de AP consistem em utilizar substâncias que absorvem oxigênio, etileno, umidade, dióxido de carbono, sabores/odores e aqueles que liberam substâncias como dióxido de carbono, agentes antimicrobianos e antioxidantes⁴².

O uso de peptídeos antimicrobianos como conservantes de alimentos tem se restringido a poucas moléculas, com notável destaque para a Nisina (bactericina produzida a partir da fermentação de leite por cepas de bactérias de ácido láctico), único peptídeo aprovado pela FDA para uso em produtos para consumo humano. Entretanto, a nisina possui um restrito espectro de atividade, não sendo efetiva contra bactérias gram-negativas e fungos, além de ter sua ação restrita a meios de baixo pH.⁴³ Além da nisina, também são reportados em ação antimicrobiana para conservação de alimentos a pediocina (produzida por cepas de *Pediococcus acidilactici* e *P. pentoseceus*, sendo também designada como “geralmente reconhecida como segura” – GRAS), e a lactoferrina (glicoproteína presente no leite, já sendo aplicada na conservação de carne bovina nos Estados Unidos).⁴³

É de suma importância então o desenvolvimento de novos conservantes de alimentos, em especial a aplicação de novos agentes naturais, como peptídeos antimicrobianos, sendo este o objetivo central deste trabalho. Conforme já abordado anteriormente, ao contrário de muitos dos peptídeos antimicrobianos naturais utilizados na conservação de alimentos atualmente, AMPs intragênicos tem apresentado amplo espectro de ação contra microrganismos¹¹, além de representarem um modo de conservação usando algo já encriptado no genoma da espécie que deu origem ao produto a ser embalado. A estratégica escolha dos genomas a serem prospectados permite ainda esperar uma menor possibilidade de fenômenos de reações adversas do consumidor ao conservante.

1.8. Incorporação de agentes antimicrobianos em sistemas poliméricos

O uso de aditivos antimicrobianos em tecnologias relacionadas com o embalamento de alimentos ainda tem se mostrado um desafio. Uma gama de agentes antimicrobianos foram incorporados em embalagens de alimentos e diretamente nos produtos a serem conservados,

incluindo ácidos orgânicos e seus sais, bacteriocinas, enzimas, quelantes (como EDTA), lactoferrina e extratos de plantas¹.

Várias formas de produção de sistemas poliméricos contendo AMPs foram bem-sucedidos em gerar um material que mantém a ação antibacteriana destas moléculas. Elas podem ser carregadas em nanopartículas (como polímeros dendríticos, lipossomos ou hidrogel) formando sistemas de liberação seletiva. Em filmes poliméricos, atuam retardando o processo de deteriorização e aumento o tempo de preservação de alimentos (em um filme de polietileno, o AMP nisina inibiu o crescimento de *Brochothrix thermosphacta* na superfície de carne bovina a 4 °C por 21 dias). Poliésteres aromáticos também figuram como carreadores efetivos de citropina⁴⁴.

Diversos sistemas poliméricos têm sido utilizados para a incorporação de agentes antimicrobianos como poliolefinas (polipropileno e polietileno de baixa e alta densidade) e poliésteres como poli(etileno tereftalato) (PET) e poli (caprolactona) (PCL)¹. Entretanto, o grupo mais promissor que tem sido considerado para incorporação de agentes antimicrobianos são os polímeros biodegradáveis. A vantagem destes polímeros é sua capacidade de hidrolisar para produzir um produto não-tóxico metabolizável *in vivo* e no ambiente. Além disso, apresentam uma cinética única de distribuição e liberação de agentes antimicrobianos⁴⁴.

Os testes de conceito feitos neste trabalho utilizaram como polímero o polimetilmetacrilato (PMMA). O trabalho com PMMA para a construção de próteses já é bem estabelecido devido ao seu baixo custo, alta resistência física e mínima resposta inflamatória⁴⁵. A incorporação de peptídeos antimicrobianos, partículas e íons de prata na composição do polímero^{45,46} é algo discutido na literatura como uma boa saída para evitar fenômenos de infecção. A escolha do PMMA como polímero neste trabalho foi feita visando um primeiro modelo de estudo, mesmo que o uso deste tipo de polímero não seja difundido em processos de conservação de alimentos.

Além disso, a produção de PMMA já figura como bem estabelecida pelo Laboratório de Desenvolvimento de Processos Químicos do Instituto de Química da Universidade de Brasília, parceiro no presente projeto e fornecedor da matéria prima para síntese dos sistemas poliméricos.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho tem como objetivo prospectar do genoma de duas espécies – *Gallus gallus* e *Bos taurus* – peptídeos intragênicos com possível ação antimicrobiana, sintetizar tais sequências, testar sua ação antimicrobiana em testes de determinação de concentração inibitória mínima (MIC) e aplicá-las em filmes de polimetilmetacrilato visando a conservação de alimentos.

2.2. Objetivos específicos

1. Prospectar genomas dos organismos *Bos taurus* e *Gallus gallus*;
2. Síntese em fase sólida dos peptídeos selecionados;
3. Purificação e caracterização dos produtos de síntese;
4. Avaliação dos peptídeos por técnicas biofísicas utilizando membranas modelo;
5. Determinação de concentração inibitória mínima (MIC) das moléculas;
6. Elaboração de filmes de PMMA e impregnação dos peptídeos;
7. Testes preliminares da inibição de crescimento microbiano pelo material polimérico sintetizado.

3. Métodos

3.1. Prospecção de potenciais peptídeos antimicrobianos intragênicos pelo software Kamal

As proteínas do genoma das espécies *Bos taurus* e *Gallus gallus* depositadas no banco de dados livre UniProt (www.uniprot.org) foram obtidas no formato .fasta, em busca realizada entre junho e setembro de 2016. Os arquivos foram carregados no software Kamal V1.0 alpha¹¹, programado pela equipe do Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde se deve escolher os parâmetros e limitações a serem consideradas na pesquisa. Tais parâmetros e limitações visam direcionar os resultados a serem encontrados, de forma a facilitar a posterior seleção do analista. Os parâmetros utilizados neste trabalho tem como base aquelas apresentadas no trabalho de Brand et al. ¹¹ e revisadas em Ramada et al³¹.

Apresenta-se abaixo os parâmetros carregados na ferramenta para prospecção:

Tabela 4: parâmetros de prospecção inseridos no Kamal

Parâmetros de prospecção	
Tamanho de peptídeo	Mín. 16 resíduos Máx. 23 resíduos
Agregação	Não houve definição de mínimos/máximos
Hidrofobicidade média	Mín. 0,0 Máx. 0,5 Escala TM
Momento hidrofóbico	Mín. 2,0 Máx. 6,0 Escala CCS
Carga líquida	Mín. + 2,0 Máx. + 6,0
Filtro de resíduos	A filtragem excluiu peptídeos com cisteína e prolina em sua composição

Conforme apresentado acima, a prospecção não envolveu possíveis peptídeos com prolina e cisteína em sua composição. Sabe-se que os aminoácidos prolina e cisteína são destabilizadores de estruturas de α -hélice⁴⁷. Na prolina, o átomo de nitrogênio está envolvido em uma estrutura anelar, o impossibilita a rotação sobre a ligação N-C α . Dessa forma, um resíduo de prolina no peptídeo desestabiliza uma possível estrutura em α -hélice. Outro motivo para a exclusão de prolina da prospecção é que sua estrutura não envolve um átomo de

hidrogênio ligado ao N, o que impede ligações com outros resíduos que poderiam estabilizar a estrutura.⁴⁷

Já a cisteína possui uma baixa tendência de assumir a estrutura de uma α -hélice, com um $\Delta\Delta G^\circ$ de 3 kJ.mol⁻¹ (o $\Delta\Delta G^\circ$ é a diferença de energia livre, tomando como parâmetro a alanina, que possui um $\Delta\Delta G^\circ$ de 0 kJ.mol⁻¹), figurando como o aminoácido com maior tendência de assumir uma estrutura de α -hélice na maioria dos sistemas modelo experimentais. Valores maiores representam uma grande dificuldade para assumir a conformação em hélice

.⁴⁷

3.2. Análise dos resultados fornecidos pelo Kamal

Quando se insere os parâmetros físico-químicos associados aos AMPs no software Kamal, o algoritmo de busca retorna todos os resultados possíveis dentro do genoma prospectado. A próxima etapa consiste em analisar manualmente os resultados oferecidos pelo Kamal buscando aqueles que apresentem maior possibilidade de atuarem como peptídeos antimicrobianos.

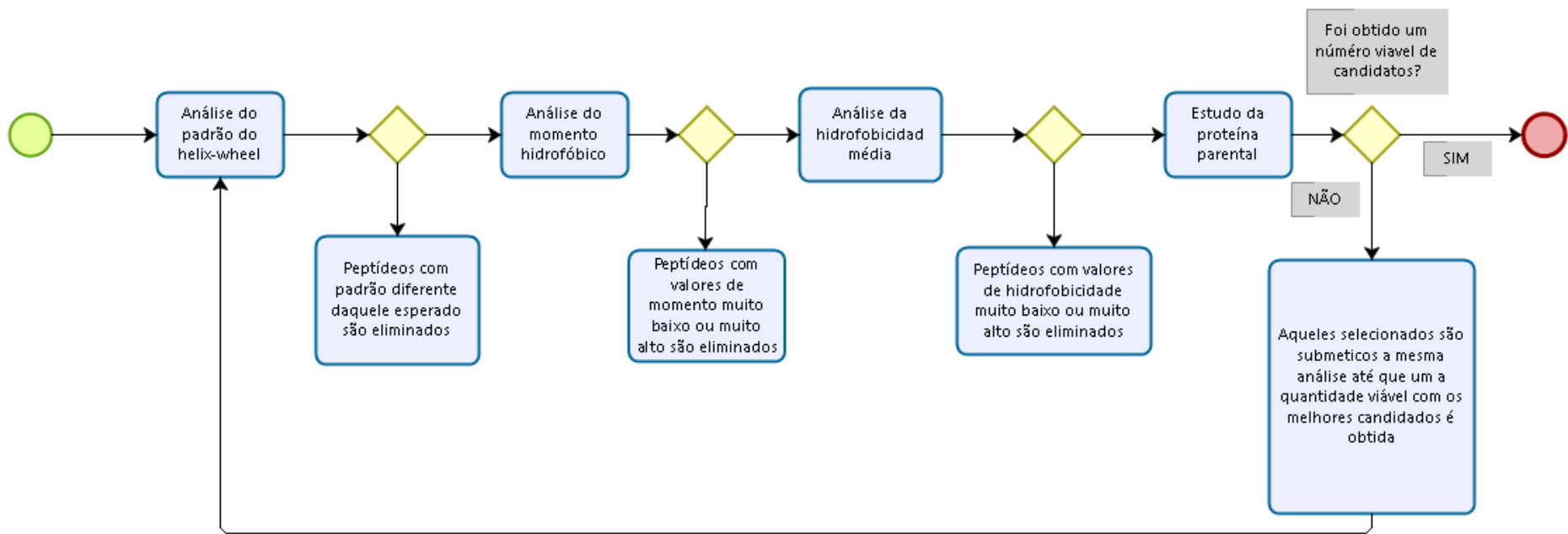
A análise é feita com base nos mesmos parâmetros inseridos no programa, com ênfase em alguns deles. A primeira característica a ser observada é a estrutura do peptídeo quando na forma de α -hélice. O programa apresenta uma representação visual do peptídeo nesta forma, possibilitando a análise direta do candidato. Busca-se uma separação de cargas bem definida, principalmente uma face com resíduos hidrofóbicos que garantam a interação com a parte hidrofóbica da membrana plasmática microbiana.

Aqueles com melhor comportamento ante a forma de uma helix wheel são avaliados então quanto a hidrofobicidade média e momento hidrofóbico (conforme discutido na introdução teórica deste trabalho, estas características estão associadas à ação antimicrobiana). Além disso, a proteína parental da sequência também é considerada. Quanto à análise da proteína parental, busca-se contextualizar o peptídeo dentro do seu ambiente original, bem como a conservação das sequências em diferentes.

Essa análise posterior é necessária devido ao elevado número de resultados sugeridos pelo software Kamal. A análise e eliminação de possíveis candidatos é feita de forma cíclica, buscando a eliminação de IAPs até que aqueles com maior probabilidade sejam escolhidos para síntese e estudo.

Cabe enfatizar que uma das vantagens do programa é exatamente a liberdade que ele confere ao analista para buscar IAPs de acordo com o nicho com o qual está trabalhando. No

caso em questão, buscou-se IAPs com maior probabilidade de estruturação na forma de α -hélice, com face hidrofóbica bem definida em uma helix-wheel e com valores limítrofes de hidrofobicidade média e momento hidrofóbico. O fluxograma abaixo traz de forma simplificada os processos de análise dos peptídeos selecionados pelo Kamal:

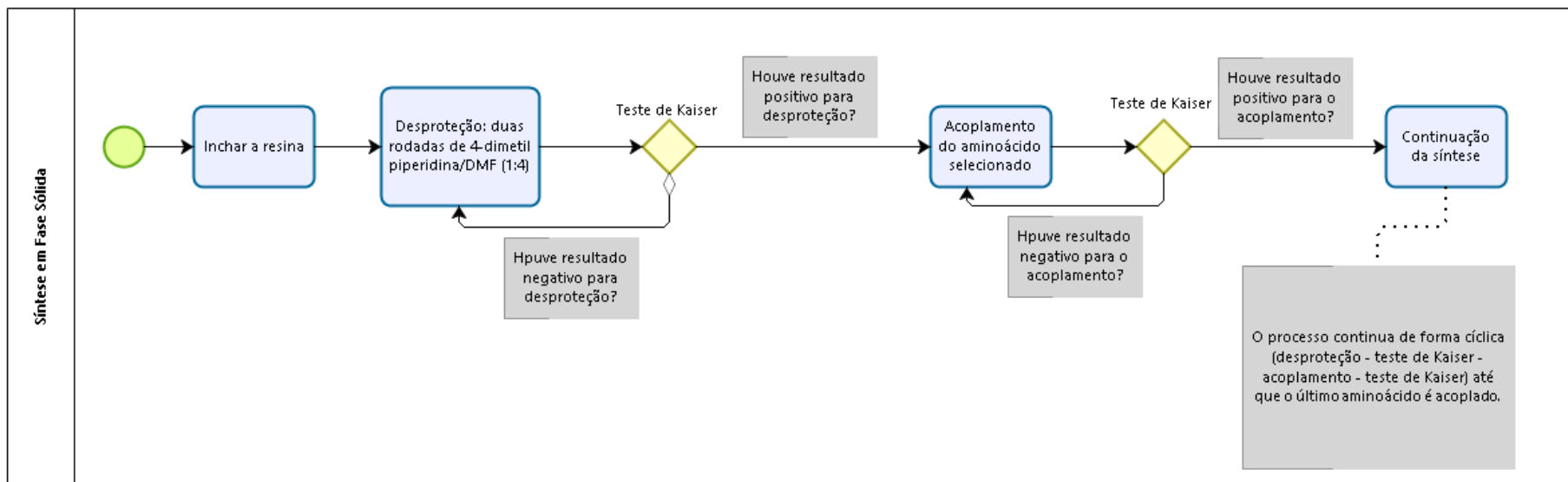


Esquema 1: Análise posterior feita com os resultados apresentados pelo Kamal

3.3. Síntese de peptídeos em fase sólida

Uma vez tendo prospectado e selecionado os peptídeos por meio do software Kamal, foi realizada a síntese destes peptídeos por meio de Síntese em Fase Sólida (SPPS, do inglês Solid Phase Peptide Synthesis).

A síntese foi feita utilizando o método Fmoc/tBu. O fluxograma abaixo apresenta os procedimentos envolvidos na síntese:



Esquema 2: Fluxograma da Síntese em Fase Sólida de Peptídeos. Fluxograma elaborado no aplicativo Bizagi Modeler©.

3.3.1. Início da síntese

A síntese foi realizada em uma escala de concentração de 0,15 mmol.L⁻¹. 319 mg de resina Rink Amide (Novabiochem) são pesados e inchados utilizando diclorometano (DCM). A resina imersa em diclorometano é então submetida a agitação por 30 minutos, conforme protocolo estabelecido por W. C. Chan e P.D. White em sua obra *Fmoc solid phase peptide synthesis – A practical Approach*.

Decorrido o tempo, a resina foi lavada com dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM).

3.3.2. Desproteção

A resina, uma vez inchada, encontra-se com seu *N*-terminal protegido pelo grupo de proteção Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonil). Deve ser realizada sua desproteção utilizando 4-metilpiperidina em DMF numa proporção de 1:4. Dois ciclos de desproteção são realizados, cada uma compreendendo 15 minutos de agitação da resina em 4-metilpiperidina em DMF 1:4.

A reação de desproteção envolve um mecanismo de β -eliminação, em que um hidrogênio lábil pode ser retirado da posição β pela 4-metilpiperidina. O hidrogênio do grupo Fmoc é mais ácido que um hidrogênio benzílico, uma vez que o ânion formado é aromático, o que facilita sua formação. (Figura 6).

O resultado é a resina com um *N*-terminal livre para acoplamento do primeiro resíduo. Completada o segundo ciclo de desproteção, a resina é lavada com DMF e DCM (três ciclos de lavagem com cada solvente).

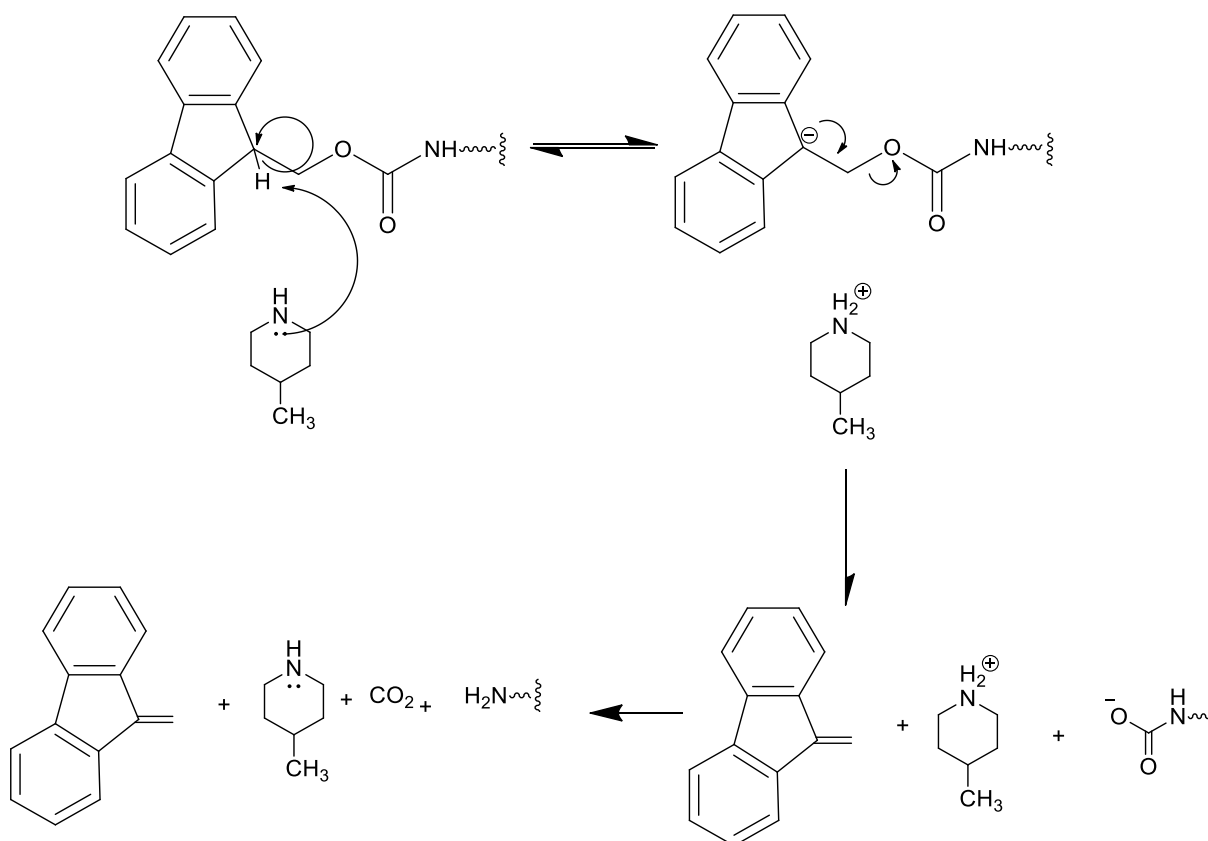


Figura 6: Desproteção do *N*-Terminal⁴⁸.

3.3.3. Teste de Kaiser

A efetividade da etapa de desproteção é feita com a confirmação de que a resina apresenta aminas livres no meio. Ou seja, caso a desproteção tenha sido efetiva, a resina apresenta um *N*-terminal livre. Tal confirmação é feita por meio do Teste de Kaiser.

O Teste de Kaiser é um teste qualitativo que determina a presença de aminas livres no meio. Ocorre a mudança de coloração da resina (que assume uma coloração azul escura) quando da presença de aminas livres. O teste foi procedido conforme Protocolo 13A apresentado em *Fmoc solid phase peptide synthesis – A practical Approach* (páginas 61-62)⁴⁸. Ele envolve três soluções: 5% de ninidrina em etanol (m/v), 80% de fenol em etanol (m/v) e KCN em piridina (2 ml 0,001 m KCN em 98 ml de piridina). Grãos da resina são coletados e imersos em gotas da solução, sendo posteriormente aquecidos. O positivo é dado pela coloração azul dos grãos de resina⁴⁸.

3.3.4. Acoplamento do aminoácido

Com a resina desprotegida, o aminoácido pode ser acoplado. O acoplamento envolve o ataque do grupo amino de um aminoácido ao grupo carboxi de outro aminoácido, estando esse último ativado pela inserção de um grupo retirador de elétrons⁴⁹. A reação realizada utilizando

dois métodos de acoplamento: utilizando carbodiimidas (DIC/Oxyma) e utilizando HBTU/DIPEA.

3.3.4.1. Síntese utilizando carbodiimidas

A reação é processada utilizando o método de ésteres ativados, com o auxílio do reagente Oxyma Pure (acetato de etil 2-ciano-2-(hidroxiimino). Envolve a síntese de um éster de aminoácido de forma a ativá-lo para atuar como um eletrófilo para o ataque nucleofílico da amina. A reação envolve a reação do C-terminal com a Oxyma na presença de carbodiimida⁵⁰.

A síntese foi realizada em uma escala de concentração de 0,15 mmol.L⁻¹. A massa calculada para cada aminoácido é pesada e adicionada no meio reacional. O mesmo se aplica à OxymaPure (m = 85,3 mg). Com os reagentes sólidos adicionados ao meio, 2 mL de DMF são acrescentados para solubilização dos reagentes. O reagente de acoplamento DIC (*N,N'* – diisopropilcarbodiimida) é adicionado ao meio na quantidade de 93μL. O meio é submetido à agitação por 1h e 30 min. A efetividade da reação é conferida pelo Teste de Kaiser.

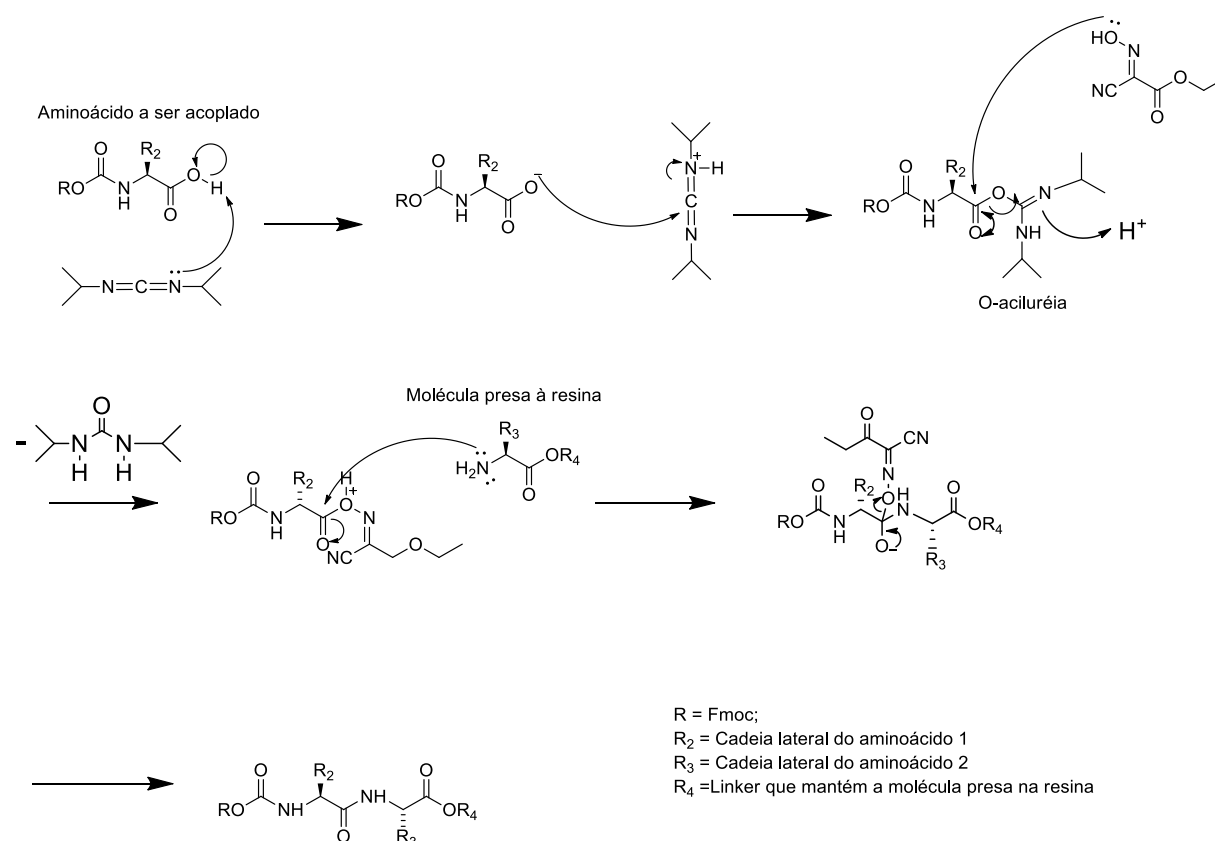


Figura 7: Mecanismo de síntese usando a metodologia DIC/Oxyma⁵⁰

3.3.4.2. Síntese utilizando HBTU/DIPEA

O mecanismo envolve o uso do reagente de acoplamento HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 – tetrametilurôniohexafluorofosfato) para a formação do éster OBt na presença

da base terciária DIPEA (N,N'-diisopropiletilamina) de forma a gerar o intermediário ativado para a reação da formação da ligação peptídica⁴⁸.

Seguindo o mesmo procedimento adotado para o acoplamento com DIC/Oxyma Pure, equivalentes de reagentes são utilizados visando uma concentração de 0,15mmol. A massa calculada para cada aminoácido é pesada e adicionada ao meio reacional. O reagente de acoplamento HBTU é então pesada (229 mg) e adicionada ao meio. 2 mL de DMF são então acrescentados visando a solubilização dos reagentes. A base terciária DIPEA é então introduzida no meio (123 µL) e o meio é submetido a agitação por 1h. A efetividade da reação é verificada por meio do Teste de Kaiser.

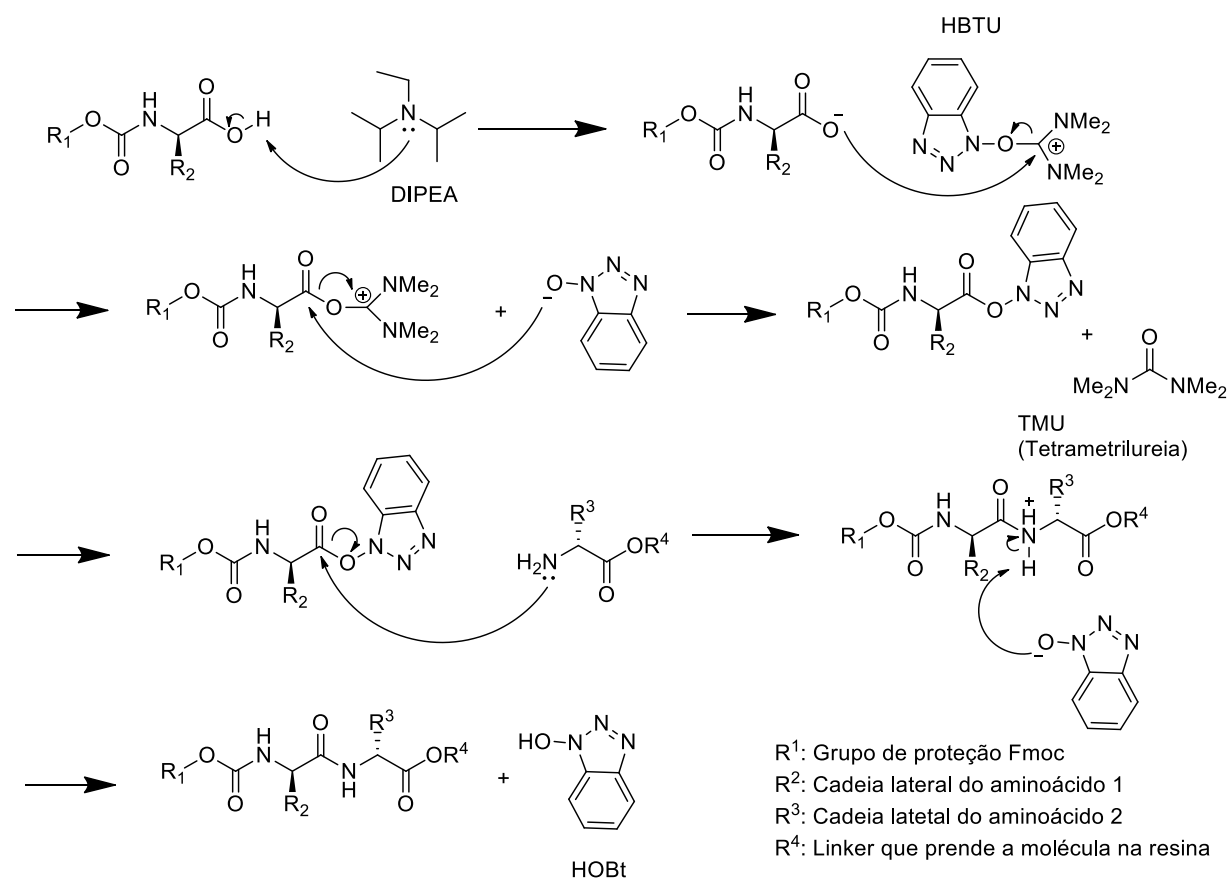


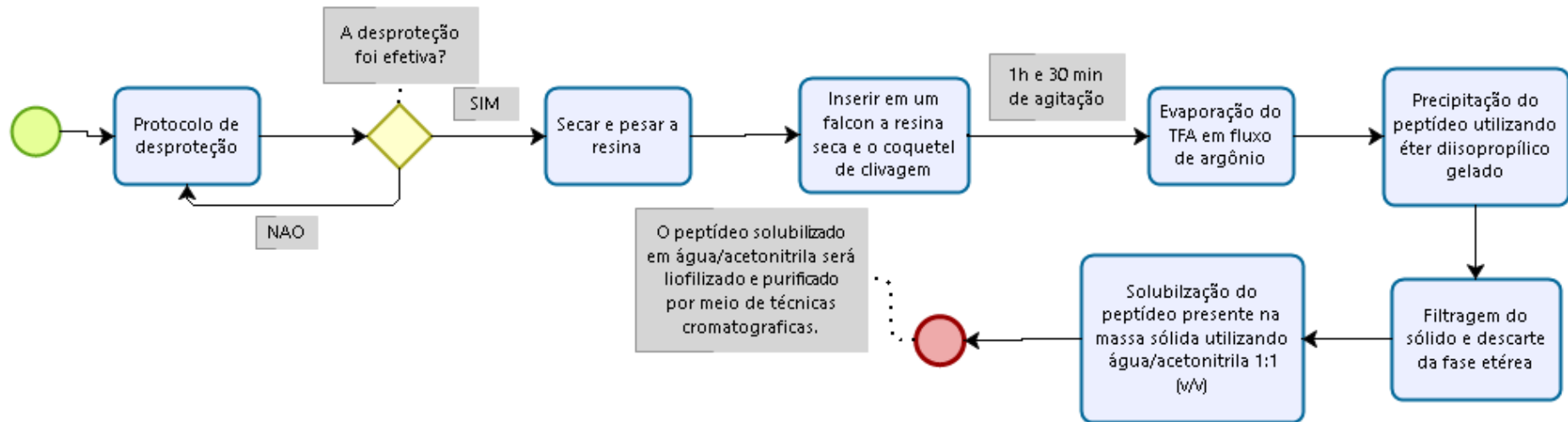
Figura 8: Mecanismo de acoplamento de dois aminoácidos teóricos utilizando os reagentes HBTU/DIPEA. O mecanismo passa pela formação de um éster ativado Benzotriazolil para então ocorrer o ataque pelo aminoácido com N-terminal livre.

3.3.5. Clivagem

A clivagem do peptídeo foi realizada usando ácido trifluoroacético (TFA, do inglês trifluoroacetic acid). A clivagem de peptídeos mediada por TFA ancorados em resinas trialcoxibenzil-amina leva à clivagem do peptídeo da resina com concomitante eliminação dos

grupos protetores dos aminoácidos da cadeia. Assim, o resultado confere o peptídeo livre da resina e dos grupos protetores⁴⁸.

O “coquetel” de clivagem é preparado com os seguintes reagentes: TFA/tioanisol/água/fenol/etanoditiol na proporção 82,5:5:5:2,5 (v/v) conforme apresentado na literatura⁴⁸. A inserção de reagentes como tioanisol, água, fenol e etanoditiol visa evitar a reação secundária dos grupos de proteção clivados dos aminoácidos do peptídeo com outros aminoácidos da mesma molécula. Tais grupos retirados do peptídeo podem reagir com aminoácidos contendo grupos ricos em elétrons, tais como metionina e triptofano.



Esquema 4: Fluxo de etapas envolvidas na clivagem do peptídeo sintetizado. Fluxograma elaborado no aplicativo Bizagi Modeler©.

3.4. Análise dos IAPs por espectrometria de massa

O produto de clivagem foi liofilizado para obtenção do produto bruto em fase sólida. A identidade dos peptídeos sintetizados foi confirmada com base na razão massa/carga esperada utilizando um Espectrômetro de Massa do tipo MALDI-TOF/TOF (UltraFlex Extreme, Bruker Daltonics) disponibilizado pelo Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa Recursos Energéticos e Biotecnologia. Uma mistura de solução de matriz de 10 mg.mL⁻¹ de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico em 50% v/v de acetonitrila e 0,3 (v/v) de TFA com cada um dos peptídeos, em uma proporção 3:1, foi aplicada a placa de MALDI. A mistura então foi seca a atmosfera ambiente. O mesmo procedimento foi realizado com os calibrantes externos. Após a calibração do equipamento, os produtos foram analisados em modo refletor positivo. O íon de massa/carga esperado para cada peptídeo foi então fragmentado, via LIFT⁵¹, para possibilitar o sequenciamento dele visando a confirmação da identidade.

3.5. Purificação dos IAPS por cromatografia líquida de alta eficiência

O perfil analítico dos produtos brutos obtidos foi feito por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC – Shimadzu Co. - Disponibilizado pelo LEM - Embrapa Recursos Energéticos e Biotecnologia), em fase reversa, com monitoramento em dois comprimentos de onda: 216nm e 280nm (o primeiro comprimento de onda está relacionado à absorção da ligação peptídica e o segundo com cadeias laterais com moléculas aromáticas), em uma coluna Vydac 218TP54 c18 analítica em gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA (v/v). 60 mg do produto bruto foram solubilizadas em 6 mL de água ultrapura (água Mill-Q), levando assim a uma concentração de 10 mg/mL, com injeção de 100uL.

A purificação dos peptídeos em escala preparativa foi feita por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC - Shimadzu Co. - Disponibilizado pelo LEM - Embrapa Recursos Energéticos e Biotecnologia), em fase reversa, com monitoramento em dois comprimentos de onda: 216 e 280 nm, em uma coluna Jupiter COG 4055-P0 10µm C18 300Å em gradiente de acetonitrila (0 – 5min: 5% de ACN, 5 – 10 min : 5% a 10% ACN; de 10 – 50 min: 40 a 100% de ACN; 50 – 55 min: 100% ACN) + 0,1% TFA (v/v). 25 mg/ml do produto foram injetados na coluna e frações contendo o produto puro foram coletadas e posteriormente liofilizadas.

3.6. Quantificação dos IAPs sintetizados

Os produtos puros foram suspendidos em água ultrapura para quantificação por meio de espectroscopia de absorção de UV-Vis. A massa disponível de peptídeo foi solubilizada em água e uma alíquota foi retirada e diluída também em água ultrapura. Essa diluição se faz necessária devido à necessidade de que os comprimentos de onda selecionados apresentem valores de absorbância que respeitem os limites impostos pela Lei de Lambert-Beer. Foi considerada a absorbância associada aos comprimentos de onda de 205, 215 e 225 nm e a fórmula abaixo para a quantificação:

$$CP (\mu\text{g.mL}^{-1}) = \frac{(X+Y).FD}{2}$$

CP = concentração do peptídeo

X = $(A_{215} - A_{225}).144$ (Waddel, 1956)

Y = $A_{205}.31$ (Scopes, 1974)

FD = fator de diluição de acordo com a diluição que foi necessária

3.7. Estudo da estruturação dos IAPs por meio de dicroísmo circular

Os estudos de dicroísmo celular foram conduzidos visando determinar a estrutura secundária dos IAPs tanto em tampão quanto em contato com membranas fosfolipídicas modelo. Foi utilizado como modelo membranas de 1,2 – dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina (DMPC).

3.7.1. Síntese de vesículas unilamelares de DMPC

Os fosfolídeos foram dissolvidos em clorofórmio, que foi posteriormente evaporado por meio de rotaevaporação para a formação de um filme multilamelar de vesículas nas paredes do balão. O filme foi submetido a vácuo por duas horas para evaporação do solvente remanescente. Posteriormente esse filme de vesículas foi dissolvido em tampão de 20 mM de fosfato com NaCl a 150 mM (pH 7,4, força iônica de 150 mM, corrigida com NaOH e HCl) e submetido a um mini - extrusor visando a conversão do produto multilamelar em vesículas grandes e unilamelares. Sua quantificação foi realizada utilizando espectroscopia de absorção UV-Vis por meio de um método de complexação com ferrotiocianato¹⁸.

3.7.2. Estudos de dicroísmo circular

Os peptídeos foram dissolvidos em tampão de fosfato (o mesmo utilizado no preparo do modelo de membrana) na concentração inicial de 20 μM . A análise foi feita considerando a adição de concentrações crescentes de DMPC de forma a estudar o limite de saturação de

estruturaco dos peptídeos. A tabela 5 apresenta a concentrao de DMPC utilizada e a concentrao corrigida de peptídeo no meio.

Tabela 5: Concentrao de DMPC e IAPs utilizada em estudos de dicroísmo celular

Concentrao de DMPC	Concentrao corrigida de peptídeo
0 uM	20 uM
40 uM	19,89 uM
80 uM	19,78 uM
160 uM	19,58 uM
320 uM	19,18 uM
640 uM	18,44 uM
1280 uM	17,12 uM

A análise foi feita em um espectropolarímetro Jasco J-850 (Jasco International Co., Japão) no alcance espectral de 195 – 300 nm em quatro varreduras a temperatura ambiente em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm, com um intervalo de 0,2 nm e tempo de resposta de 0,5 s. Os dados relativos aos espectros do tampão e de DMPC foram subtraídos dos espectros de cada peptídeo. Os resultados foram convertidos a elipcidade residual mdia²⁷ com a amplitude espectral sendo reduzida a 195-260 nm.

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times MM}{c \times d \times n}$$

com $[\theta]$ = MRE = mean residue ellipticity (elipcidade residual média), θ = elipticidade relacionada ao comprimento de onda, MM = massa molecular da molécula analisada, c = concentrao do peptídeo em mg.mL⁻¹, n = número de rsduos do peptdeo²⁷.

Uma vez inferida a estrutura adotada pelos peptídeos, foi possível calcular a percentagem de estruturaco deles na conformao determinada. Foram utilizados o MRE de dois comprimentos de onda associados a α -hélices: 208 e 222 nm. O cálculo do percentual de helicidade foi calculado com base nas fórmulas abaixo:

$$\% Hel (208 nm) = \frac{[\theta] - 4000}{-33000 - 4000}$$

$$\% Hel (222 nm) = \frac{[\theta] - 3000}{-36000 - 3000}$$

Com $[\theta] = \text{MRE}$ relacionado com comprimento de onda a ser utilizado ²⁷.

3.8. Testes de interação de IAPs com membranas fosfolipídicas

De forma a entender a possível interação dos peptídeos sintetizados com membranas biológicas, foi primeiramente investigado sua relação com membranas sintéticas. Foi utilizado como modelo de membrana vesículas de DMPC. A interação foi estudada por meio da técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC).

Os termogramas foram obtidos usando um equipamento VP-DSC (MicroCal, GE Healthcare – Disponibilizado pelo LEM - Empresa Recursos Energéticos e Biotecnologia) a temperatura ambiente, usando uma rampa de temperatura de 10 a 40 °C em uma taxa de escaneamento de 0,5 °C/min. A mistura analisada era composta de vesículas de DMPC em tampão fosfato, na concentração de 0,5 mM. Os peptídeos foram então inseridos à concentração de 0,02 mM e levados para análise. A síntese das vesículas fosfolipídicas seguiu os procedimentos apresentados anteriormente neste trabalho.

Os dados obtidos foram então normalizados, tiveram a linha de base subtraída e filtrado para a obtenção de um estado dupla transição (*non two state model with two peaks*), com o tratamento matemático realizado por meio do software MicroCal Origin v7.0.

3.9. Testes de concentração inibitória mínima

O potencial antimicrobiano de IAPs foi avaliado por meio da definição da concentração inibitória mínima dos peptídeos (MIC) frente a organismos selecionados. A metodologia para determinação do MIC de cada peptídeo seguiu os parâmetros determinados pelo CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute⁵². Dois microrganismos foram selecionados para teste: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 8963.

Os organismos foram obtidos a partir da biblioteca de microrganismos da Universidade Católica de Brasília e os testes foram efetuados no Laboratório de Análise de Biomoléculas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da mesma instituição. Alíquotas de peptídeos na faixa de concentração de 256 – 0,5 µM foram incubados com células de bactérias (5×10^5 células.mL⁻¹) no método de microdiluição em caldo, com o crescimento sendo avaliado em meio Mueller-Hinton. O peptídeo DS01 (dermaseptina isolada da espécie *P. oraedes* que tem sido utilizado como controle em outros trabalhos publicados pelo grupo^{18,31,53}) foi utilizado como controle positivo, enquanto o controle negativo figurava como um poço sem a presença de peptídeo e do microrganismo.

O MIC do peptídeo foi determinado por meio de inspeção visual, conforme preconizado pelo Protocolo M07-A9 do CLSI⁵².

3.10. Síntese de filmes de PMMA incorporados com peptídeos antimicrobianos

O método de co-precipitação foi utilizado como forma de síntese dos filmes de PMMA modificados com peptídeos antimicrobianos. O PMMA utilizado foi sintetizado pela técnica de polimerização em suspensão e fornecido pelo Laboratório de Desenvolvimento de Processos Químicos sob a orientação do professor Fabrício Machado Silva do Instituto de Química da Universidade de Brasília. Quantidades específicas de PMMA foram pesadas e dissolvidas em clorofórmio. Volumes de peptídeo foram inseridos no meio visando porcentagens específicas de massa/massa para os filmes construídos e o meio foi posteriormente agitado.

O filme foi feito através do método de camada sobre camada. Volumes de 0,5 ml da solução de PMMA + peptídeo foram pipetadas em uma placa de petri e evaporados a temperatura ambiente em uma capela. Adições e evaporações subsequentes permitem a preparação de várias camadas de filmes de polímero, sendo possível controlar a espessura do produto formado. O peptídeo Bt01 foi utilizado como agente antimicrobiano para os estudos modelo.

A tabela abaixo lista as quantidades de PMMA e peptídeo utilizadas e consequentes percentagem m/m do produto obtido:

Tabela 6: quantidades envolvidas na elaboração dos filmes

Filme	Massa de PMMA	Massa de peptídeo Bt01	Concentração do filme gerado (% m/m)
Filme 01	201,2 mg	2,7 mg	1,34%

A presença de peptídeo na superfície do polímero foi confirmada por meio de espectrometria de massa do tipo MALDI. Um exemplar do filme foi sintetizado na superfície de uma placa de MALDI específica para estudos de imageamento. Neste tipo de estudo, a matriz de ionização é aplicada diretamente sobre uma amostra e espectros de massa são colhidos em pontos na superfície da amostra, formando uma análise bidimensional da distribuição de um ou mais íons selecionados sobre essa superfície¹⁸. Assim, além de confirmar a presença do peptídeo na superfície do filme sintetizado, é possível entender como é a sua distribuição no produto final. As análises foram feitas em uma Espectrômetro de Massa do tipo

MALDI-TOF/TOF (UltraFlex III, Bruker Daltonics - Disponibilizado pelo LEM - Embrapa Recursos Energéticos e Biotecnologia).

3.11. Estudo da liberação do peptídeo presente no filme sintetizado

A liberação do peptídeo imobilizado no filme figura como condição central para uma possível atividade deste produto em processo de conservação de alimentos. Este processo de liberação foi estudado ao submeter um pedaço do filme sintetizado a um meio aquoso, sendo retiradas alíquotas com o decorrer do tempo. 15 mg de filme sintetizado foram submersas em 20 ml de água ultrapura e alíquotas de 100 µl foram retiradas. A presença de peptídeo no meio foi então investigada por meio de espectroscopia de absorção Uv-Vis e por meio de MALDI, Espectrômetro de Massa do tipo MALDI-TOF/TOF (UltraFlex III, Bruker Daltonics - disponibilizado pela Embrapa Recursos Energéticos e Biotecnologia).

A investigação por meio de espectroscopia de absorção UV-Vis foi feita considerando três comprimentos de onda: 205, 215 e 225 nm. 100 µL de alíquota foram retirados e dissolvidos ao volume de 1 mL com água ultrapura. A análise foi feita utilizando uma cubeta de quartzo com diâmetro de 1 cm.

O estudo por meio de espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF foi feita considerando uma alíquota de 100 µL retirada do meio. Desses 100 µL, 3 µL foram pipetados junto com 9 µL de solução de matriz de 10 mg.mL⁻¹ de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico em 50% v/v de acetonitrila e 0,3 (v/v) de TFA e submetidos à análise em modo refletor positivo.

3.12. Testes de atividade antimicrobiana dos filmes sintetizados

A atividade antimicrobiana do filme sintetizado foi investigada frente a culturas de *E. coli* ATCC 8963 fornecidos pela Universidade Católica de Brasília (UCB) pelo Laboratório de Análise de Biomoléculas do Programa de Pós-Graduação e m Ciências Genômicas e Biotecnologia. Diferentes massas de filmes foram pesadas e adicionadas a 100 µL de meios líquidos de células do microrganismo (5x10⁵ células.mL⁻¹), levando assim a uma faixa de concentrações teórica de peptídeo a ser dispersa meio. A tabela abaixo apresenta as massas pesadas e a concentração teórica de peptídeo dispersa no meio:

Tabela 7: Quantidade de massa de filme pesada e a concentração teórica de peptídeo a ser dispersa no meio. A concentração figura como “teórica” devido ao fato de que a dispersão do peptídeo no meio não ser um processo com 100% de eficiência.

Massa média de filme pesada	Concentração teórica de peptídeo a ser dispersa no meio
3,26 mg	212,03 μM
6,26 mg	407,16 μM
9,53 mg	619, 84 μM

Os testes foram feitos em triplicatas, com o controle positivo sendo realizado com meio sem microrganismos e o negativo sendo feito de duas maneiras: um meio contendo microrganismos e outro contendo os microrganismos expostos filme sintetizado sem o peptídeo Bt01.

Após 24 horas, o sobrenadante foi recolhido e analisado por meio de espectroscopia de absorção UV-Vis, além da análise visual de inibição de crescimento. Além disso, testes de halo de inibição foram realizados com o mesmo microrganismo, com dois pedaços do filme de massa 15,1 e 14,0 mg sendo colocados em contato em uma placa com meio Mueller-Hinton e microrganismo na concentração de 5×10^5 células.mL⁻¹. A presença do halo de inibição foi investigada por análise visual após 24 horas de exposição do filme ao meio.

4. Resultados e discussão

4.1. Potenciais peptídeos intragênicos antimicrobianos de *Bos taurus* e *Gallus gallus*.

Novos potenciais IAPs foram prospectados a partir do genoma de duas espécies fornecedoras dos alimentos a serem conservados. O software Kamal busca por peptídeos que possuem características físico-químicas associadas àquelas apresentadas por peptídeos antimicrobianos de origem natural^{11,31}. Após o carregamento das coleções de proteínas de *Bos taurus* e *Gallus gallus* no software Kamal e o estabelecimento dos parâmetros de filtragem, a busca gerou milhares de resultados de potenciais AMPs, conforme descrito na Tabela 5. A tabela abaixo apresenta uma estatística da quantidade de dados apresentados pelo Kamal quando da pesquisa dos genomas:

Tabela 8: Estatística dos dados gerados pelo Kamal

Espécie pesquisada	Quantidade de proteínas inseridas no sistema	Quantidade de proteínas que geram ao menos um AMP	Quantidade de possíveis AMPs gerados	Quantidade selecionada após análise dos resultados	Quantidade de peptídeos sintetizados
<i>Bos taurus</i>	22543	13217	194405	45	2
<i>Gallus gallus</i>	18029	10323	152525	21	1

Devido o número elevado de potenciais IAPs encriptados em proteínas do genoma das espécies pesquisadas, faz-se necessária uma curadoria para escolha daqueles com maior probabilidade de ação antimicrobiana. Os parâmetros de momento hidrofóbico, hidrofobicidade média, possibilidade de estruturação e carga líquida foram norteadores para a escolha dos principais candidatos.

Após extensa análise dos dados gerados para as duas espécies estudadas, foram selecionados três peptídeos com potencial atividade antimicrobiana como prova de conceito:

Tabela 9: Características do peptídeo Bt01

Bt01 - DAA21835.1 (891-907)	
Sequência	LMGLFNRIIRKVVVKLFN
Massa molecular	2060,2444
Ponto isoelétrico	12,4987
Momento hidrofóbico	5,14
GOR IV α - hélice	23,53%
GOR IV folha - β	29,41%
GOR IV random coil	47,06%

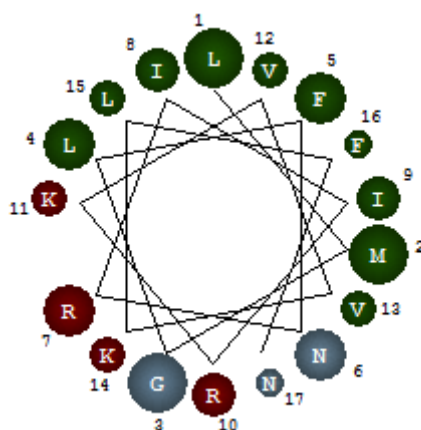


Figura 9: Padrão de hidrofobicidade apresentado pela molécula Bt01. Os resíduos verdes representam aminoácidos com grupos R apolares, isto é, hidrofóbicos. Resíduos com cor azul representam grupos R polares, hidrofílicos. Resíduos em vermelho são aminoácidos carregados positivamente.

Tabela 10: Características do peptídeo Bt02

Bt02 - NP_001069806.1 (144-163)	
Sequência	FMSVAKTILKRLFRVYAHY
Massa molecular	2455,3921 Da
Ponto isoelétrico	10,94
Momento hidrofóbico	4,40
GOR IV α - hélice	0,0%
GOR IV folha - β	70,00%
GOR IV random coil	30,00%

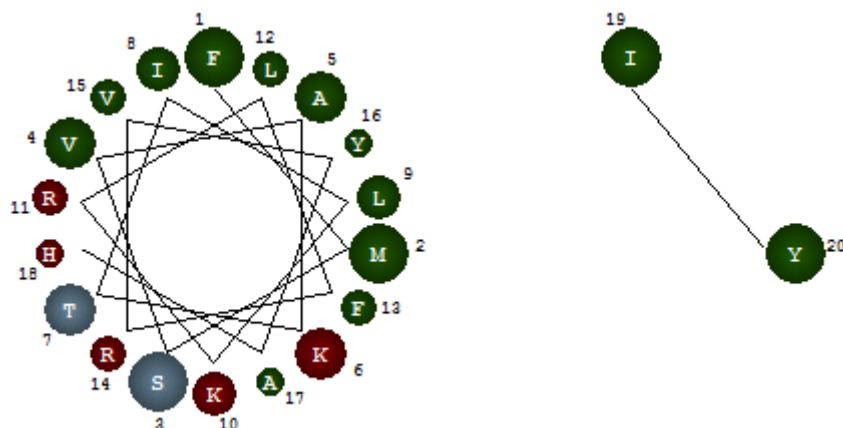


Figura 10: Padrão de hidrofobicidade apresentados pela molécula Bt02. Os resíduos verdes representam aminoácidos com grupos R apolares, isto é, hidrofóbicos. Resíduos com cor azul representam grupos R polares, hidrofílicos. Resíduos em vermelho são aminoácidos carregados positivamente.

Tabela 11: Características do peptídeo Gg01

Gg01 - XP_015131897.1 (242-258)	
Sequência	FMSVAKTILKRLFRVYA
Massa molecular	2042,1862 Da
Ponto isoeletrico	11,59
Momento hidrofóbico	4,05
GOR IV α - hélice	47,06%
GOR IV folha - β	11,76%
GOR IV random coil	41,18%

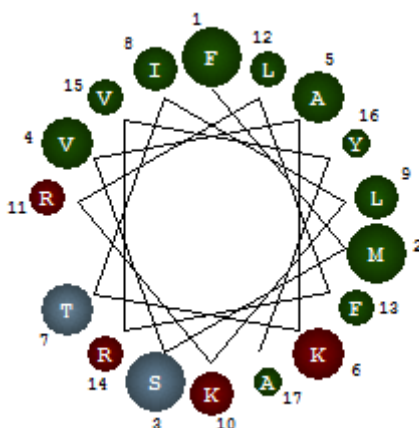


Figura 11: Padrão de hidrofobicidade apresentados pela molécula Gg 01. Os resíduos verdes representam aminoácidos com grupos R apolares, isto é, hidrofóbicos.

Resíduos com cor azul representam grupos R polares, hidrofílicos. Resíduos em vermelho são aminoácidos carregados positivamente.

Os peptídeos selecionados, quando estruturados em α -hélice, possuem um padrão de hidrofobicidade semelhante a AMPs anfifílicos, com resíduos hidrofílicos de um lado da molécula e os hidrofóbicos do outro lado. Foram preferidos peptídeos com separação de cargas bem definida, embora existam AMPs que não obedecem tal distribuição.

4.2. Conservação das sequências

A proteína parental fonte dos IAPs foi também estudada como forma de entender sua possível atividade antibacteriana, além de sua conservação ao longo do processo evolutivo.

4.2.1. IAP Bt01

Em pesquisa utilizando a ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), mostra-se que o IAP Bt01 está conservado em genes homólogos a Acetiltransferase 10 em mamíferos. A *N*-Acetyltransferase representa uma subunidade do complexo *N*-terminal Acetyltransferase, atuante na acetilação de polipeptídeos que emergem de ribossomos após a tradução.⁵⁴ Além disso, figura como um domínio conservado relacionado à ligação a tRNA, presente no C-terminal da tRNA(Met) citidina acetiltransferase.

De forma a exemplificar a conservação deste segmento em diferentes espécies, apresenta-se na Figura 12 o alinhamento das estruturas primárias de proteínas *N*-acetiltransferase 10 e RNA citidina acetiltransferase em diferentes espécies, visando demonstrar a presença, de forma conservada, da sequência referente ao IAP Bt 01. As espécies pesquisadas e o código atribuído a cada uma são apresentados na tabela abaixo:

Tabela 12: Código, proteína e espécie utilizada no alinhamento de sequências primárias.

Código	Proteína	Espécie
DAA21835.1	TPA: N-acetiltransferase 10	<i>Bos taurus</i>
NP 078938.2	RNA citidina acetiltransferase isoforma a	<i>Homo sapiens</i>
NP 694766.1	RNA citidina acetiltransferase	<i>Mus musculus</i>
NP 956938.1	RNA citidina acetiltransferase	<i>Danio rerio</i>
XP 647027	Proteína hipotética DDB_G028868	<i>Dictyostelium discoideum AX4</i>
NP 014267.1	Proteína de síntese de ribossomos KR#33	<i>Saccharomyces cerevisiae S288c</i>

O alinhamento apresentado na página seguinte mostra que o peptídeo Bt01 está 100% conservado nas espécies *Bos taurus*, *Homo sapiens* e *Mus musculus*. O gene homólogo no peixe *Danio rerio* carrega uma cópia do Bt01 que difere daquela apresentada pelo *Bos taurus* em somente dois resíduos de aminoácidos (Figura 12). Isso indica que o IAP Bt01 possui alto grau de conservação entre os cordados e sugere que este segmento específico possui papel estrutural ou funcional relevante na proteína de origem. Além disso, a conservação deste peptídeo indica que IAPs são ubíquos na natureza e deverão ser encontrados e/ou potencialmente explorados quanto o seu potencial biotecnológico em qualquer organismo, em consonância com relatos anteriores¹¹.

<i>Bos taurus</i>	852	NQLGD-LALSAAQSALLLGIGLQHKSV	DQLEKEIELPSGQ	LMGLFNRIIRKVVKLFN	EVQEKAIEEQMVA	VKDVM	926
<i>Homo sapiens</i>	852	NQLGD-LALSAAQSALLLGIGLQHKSV	DQLEKEIELPSGQ	LMGLFNRIIRKVVKLFN	EVQEKAIEEQMVA	AKDVM	926
<i>Mus musculus</i>	852	NQLGD-LSLSAAQSALLLGIGLQHKSV	DQLEKEIELPSGQ	LMGLFNRIIRKVVKLFN	DVQEKAIEEQMVA	VKDVM	926
<i>Danio rerio</i>	854	KQFGD-ISLSVAQSALLLGIGLQHKSV	DELEKEIGLPSSQ	LMGLFNRIIRKVVQFFN	TLQERAVEAEMVA	TKDIGL	928
<i>D. discoideum</i>	866	NKLKI-EDISLIQSAILLALGLQHKTV	DNLIGELNLASNQVLSL	FNQTMRKINTELKQKQEKFIQDSMPK	[17] IKETDM		957
<i>S. cerevisiae</i>	869	DKMGDSVKLSSVQSAILLAIGLQRKNI	DTIAKELNLPSNQTIAMFAKIMRKMSQYFRQLLSQSIEETLPN			IKDDAI	944

Figura 12: Alinhamento de parte da estrutura primária da proteína acetiltransferase e de genes homólogos de diferentes espécies. Os códigos apresentados em azul referem-se aos resíduos variáveis nas sequências, enquanto os em vermelho são aqueles conservados nas diferentes espécies; os números presentes antes e depois da estrutura primária situa a sequência dentro do todo da proteína parental. Grifado em amarelo está a estrutura primária do peptídeo Bt01 evidenciando sua conservação dentre diferentes espécies. Alinhamento feito por meio da ferramenta Constraint-based Multiple Aligmnet Toll (COBALT), disponível no endereço virtual da NCBI.

4.2.2. IAPs Bt02 e Gg01

Estes dois IAPs estão presentes em proteínas homólogas no genoma das duas espécies investigadas. Cabe ressaltar que a pesquisa no genoma das espécies foi feita de forma independente em períodos de tempo diferentes. Como pode-se notar, as sequências diferem somente nos últimos três resíduos da porção C-terminal (o IAP Bt02 possui três resíduos a mais, sendo eles HIY).

Os IAPs Bt02 e Gg01 são encontrados em *Bos taurus* como parte estrutural da proteína Mob Kinase Activator 1a. O gene que codifica a proteína Mob é evolutivamente conservado com homólogos desde protistas até humanos. Duas proteínas do tipo Mob foram descobertas em leveduras, relacionadas com o final do processo mitótico e o processo de separação, bem como tem papel de destaque na modulação da citocinese⁵⁴.

Tabela 13: Código, proteína e espécie utilizada no alinhamento de sequências primárias

Código	Proteína	Espécie
NP_001069806	MOB Kinase activator 1A	<i>Bos taurus</i>
NP_001304039	MOB kinase activator 1A isoform 2	<i>Homo sapiens</i>
NP_956208	MOB kinase activator 1A	<i>Danio rerio</i>
NP_651041.3	Mob as tumor suppressor, isoform A	<i>Drosophila melanogaster</i>
XP_647813.1	Mps1 binder-like protein	<i>Dictyostelium discoideum AX4</i>
NP_199368.1	Mob1/phocein family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>

```

Bos taurus 95 YHWADGTNIKKPIKCSAPKYIDYLMTWVQDQLDDETLFPSKIGVPPKNTMSVAKTILKRLFRVYAHYHQHFDSVMQLQEEAHLNTSFKHFIFVQEFNLI DRRELAPLQELIEKLGSKDR- 216
H. sapiens 94 YHWADGTNIKKPIKCSAPKYIDYLMTWVQDQLDDETLFPSKIGVPPKNTMSVAKTILKRLFRVYAHYHQHFDSVMQLQEEAHLNTSFKHFIFVQEFNLI DRRELAPLQELIEKLGSKDR- 215
D. rerio 95 YHWADGTNIKKPIKCSAPKYIDYLMTWVQDQLDDETLFPSKIGVPPKNTMSVAKTILKRLFRVYAHYHQHFDAVIQLQEEAHLNTSFKHFIFVQEFNLI DRRELAPLQDLIEKLGSKDR- 216
D. melanog 95 YHWADGLTVKKPIKCSAPKYIDYLMTWVQDQLDDETLFPSKIGVPPKNTFHSSAKTILKRLFRVYAHYHQHFTEVVTLGEEAHLNTSFKHFIFVQEFNLI ERRELAPL- 207
D. discoid 83 YHWADGTTVKKAIKVSAPKYVDFLMTWVQSLDDENIFPSKIGVPPKNTFQSIKTIKRLFRVYAHYHSHFQKIVSLGEEAHLNTSLKHFIFYFIQEFNLV DKKELGPLNELIESL-MKNP- 213
A. thaliana YRWADGVQIKKPIEVSAPKYVEYLMDWIETQLDDETLFPQRLGAPFPQNFKDVTIKTIKRLFRVYAHYHSHFQKIVSLKEEAHLNTCFKHFILFTHFGLIDKKELAPLQELIESI--ISPy- 215

```

Figura 13: Alinhamento de parte da estrutura primárias da proteína Mob 1 e de genes homólogos de diferentes espécies. Os códigos apresentados em azul referem-se aos resíduos variáveis nas sequências, enquanto os em vermelho são aqueles conservados nas diferentes espécies; os números presentes antes e depois da estrutura primárias situa a sequência dentro do todo da proteína parental. Grifado em amarelo está a estrutura primária do peptídeo Bt02 evidenciando sua conservação dentre diferentes espécies. Alinhamento feito por meio da ferramenta Constraint-based Multiple Aligment Toll (COBALT), disponível no endereço virtual da NCBI.

A estrutura terciária da proteína mostra também que o peptídeo Bt02 (quando na proteína parental) possui características associadas a peptídeos antimicrobianos, como padrão de α -hélice (Figura 14). Além disso, nota-se que a sequência se apresenta nos limites da proteína (posição 313 – 329 da estrutura primária da proteína), o que permite que essa α -hélice, tenha um pedaço hidrofílico em contato com o meio e outra parte hidrofóbica orientada para a parte interna da proteína.

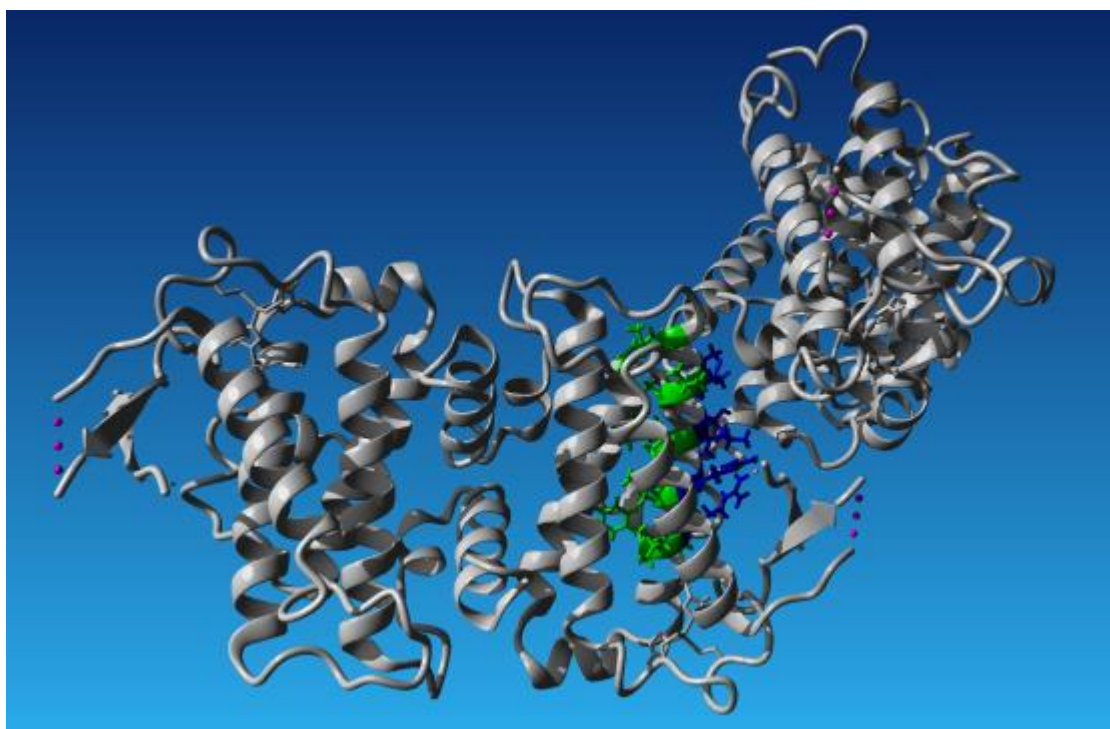


Figura 14: Estrutura terciária da Mob1b (código PDB EDK99077.1) do organismo *Mus Musculus* obtida por meio de difração de raio-X. Depositada no bando de dados do Protein Data Base (PDB) em 24/05/2016. Arquivo de PDB obtido no bando de dados depositado no endereço www.rcsb.org. Estrutura visualizada por meio do software YASARA. A α -hélice apresentada em verde e azul à sequência Bt02. Os resíduos coloridos em verde correspondem à resíduos hidrofóbicos, enquanto aqueles em azul são hidrofílicos.

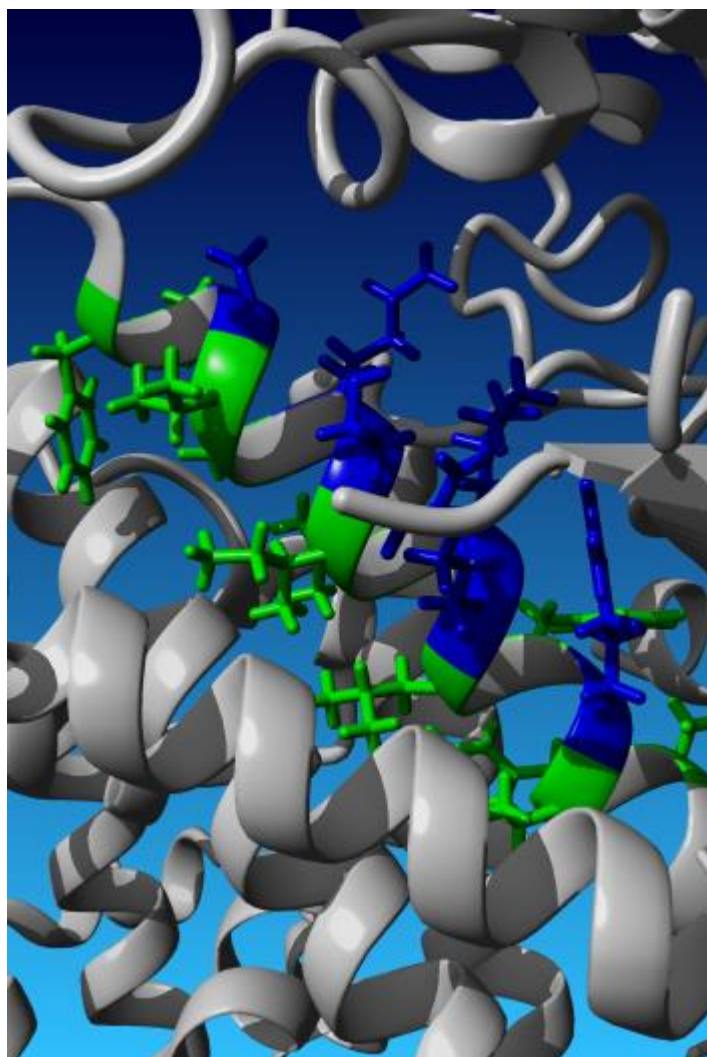


Figura 15: Detalhe da estrutura primária de Bt02 na proteína Mob1b do organismo *Mus Musculus* obtida por meio de difração de raio-X depositada no bando de dados do Protein Data Base (PDB) em 24/05/2016. Arquivo de PDB obtido no bando de dados depositado no endereço www.rcsb.org. Estrutura construída por meio do software YASARA. A α -hélice apresentada em verde e azul à sequência Bt02. Os resíduos coloridos em verde correspondem à resíduos hidrofóbicos, enquanto aqueles em azul são hidrofílicos.

4.3 Síntese, purificação e avaliação da estrutura primária de IAPs

A síntese dos peptídeos Bt01, Bt02 e Gg01 foi feita pela metodologia de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida. Apresenta-se abaixo os métodos de acoplamento utilizados para cada aminoácido dos peptídeos selecionados:

Tabela 14: Relação de reagentes utilizada para a síntese do peptídeo Bt01.

LMGLFNRIIRKVVKLFN (Sequência original)			
NFLKVVKRIIRNFLGML (Ordem de síntese)			
AAS	Massa pesada	Massa de oxyma pure pesada	Massa de HBTU pesada
Asparagina	357,1	85,3	
Fenilalanina	230,1	87,6	
Leucina	214		226,6
Lisina	279,7		227,4
Valina	202,1		227,2
Valina	203,3		223,1
Lisina	282,6		217
Arginina	373,9	93,2	
Isoleucina	212	96,2	
Isoleucina	215,7	85,7	
Arginina	389	87	
Asparagina	353,5	85,8	
Fenilalanina	229,1	86	
Leucina	214		230,2
Glicina	182		234,8
Metionina	230,1	84,5	
Leucina	210,2	86,7	

Tabela 15: Relação de reagentes utilizados na síntese do peptídeo Bt02.

FMSVAKTILKRLFRVYAHYIY (Sequência original)			
YIHAYVRFLRKILTKAVSMF (Ordem de síntese)			
AAS	Massa pesada	Massa de oxyma pure pesada	Massa de HBTU pesada
Tirosina	275,3		226,7
Isoleucina	211,9		227,8
Histidina	360,0		229,9
Alanina	186,6		223,4
Tirosina	274,2		230,5
Valina	201,6	86,8	
Arginina	389,3	88,8	
Fenilalanina	232,1	85,3	
Leucina	216,2	86,4	
Arginina	386,3	90,7	
Lisina	292,6	85,6	
Isoleucina	211,6	86,7	
Leucina	212,4	85,0	
Treonina	239,5	86,0	
Lisina	281,3	85,5	
Alanina	187,8	86,9	
Valina	203,4	86,0	

Serina	232,4	84,2	
Metionina	222,5	86,7	
Fenilalanina	233,6	85,7	

Tabela 16: Relação de reagentes utilizada para a síntese do peptídeo Gg01.

FMSVAKTILKRLFRVYA (Sequência original)		
AYVRFLRKILTKAVSMF (Ordem de síntese)		
AAS	Massa pesada	Massa de oxyma pure pesada
Alanina	187,4	88,4
Tirosina	274,9	85,0
Valina	202,2	86,4
Arginina	386,5	85,0
Fenilalanina	233,8	85,2
Leucina	213,5	85,8
Arginina	390,3	85,2
Lisina	286,3	86,9
Isoleucina	215,0	88,7
Leucina	213,4	87,0
Treonina	238,2	88,6
Lisina	288,4	85,8
Alanina	186,0	87,5
Valina	201,4	87,9
Serina	234,9	84,5
Metionina	225,4	89,4
Fenilalanina	235,0	89,4

Conforme se depreende das tabelas apresentadas acima, somente um dos peptídeos foi sintetizado utilizando exclusivamente um método de acoplamento (Gg01 foi sintetizado somente com carbodiimidas). A síntese com carbodiimidas era recorrida sempre que um acoplamento utilizando HBTU não era satisfatório. Nas tabelas acima, sempre que houve troca de método, significa que o acoplamento utilizando o método em vigor não foi bem sucedido.

Das observações feitas durante a síntese e dos dados apresentados acima, percebe-se que acoplamentos envolvendo aminoácidos com um grupo de proteção muito grande (como o caso da arginina) tendem a não funcionar com HBTU. Tal fato também foi observado quando a estrutura primária do peptídeo começa a ficar grande no decorrer da síntese. Cabe ressaltar que essas observações não são regra, uma vez que a tabela acima apresenta exceções; são observações feitas durante o decorrer da síntese.

Os produtos brutos de cada síntese foram clivados utilizando TFA, extraídos e liofilizados, sendo posteriormente submetidos a purificação por meio de Cromatografia

Líquida de Alta Eficiência. Abaixo apresenta-se as análises cromatográficas em escala analítica utilizando uma coluna Vydac 218TP54 c18 utilizando um gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA (v/v) seguindo os procedimentos apresentados no subitem 3.5 :

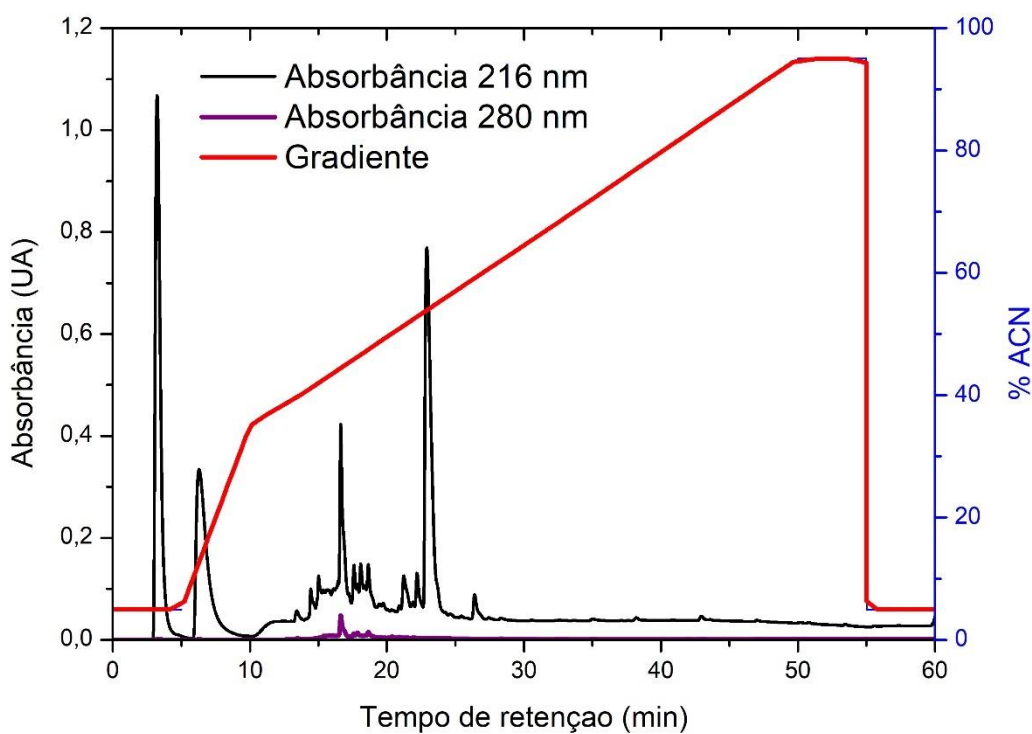


Figura 16: Cromatograma analítico do peptídeo Bt01. Peptídeo eluído em gradiente de acetonitrila + 0,1% (v/v) TFA, em coluna analítica Vydac 218TP54 C18. O pico em aproximadamente 22 minutos corresponde ao peptídeo Bt01, com os outros picos representando subprodutos de síntese.

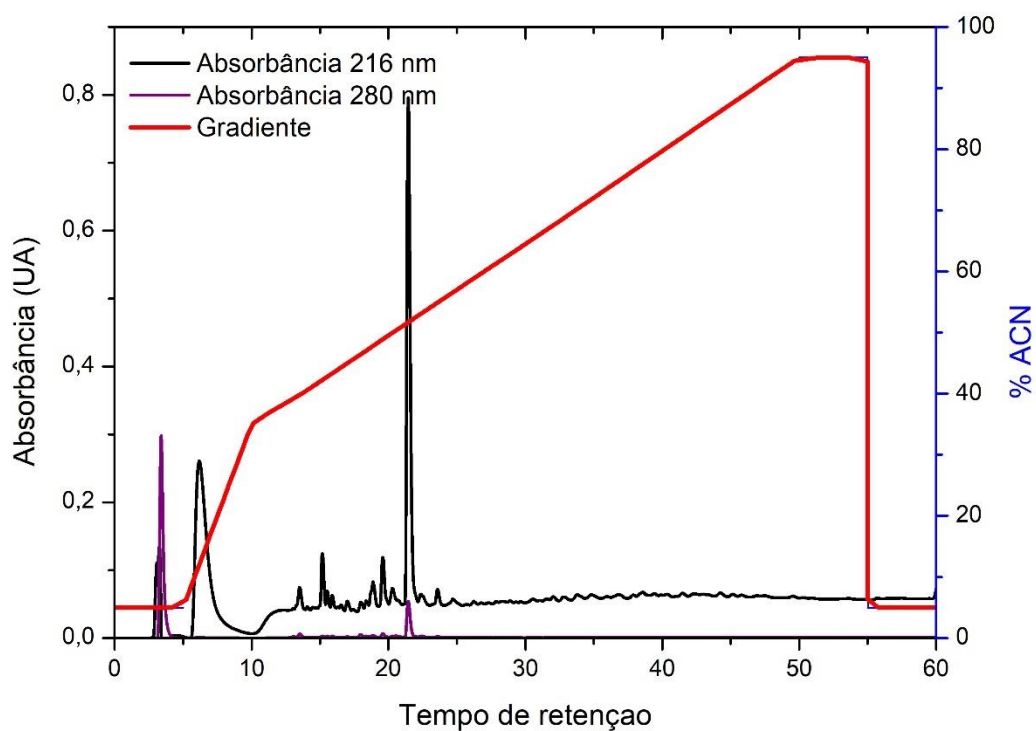


Figura 17: Cromatograma analítico do peptídeo Bt02. Peptídeo eluído em gradiente de acetonitrila + 0,1% (v/v) TFA, em coluna analítica Vydac 218TP54 C18. O pico em aproximadamente 21 minutos corresponde ao peptídeo Bt02, com os outros picos representando subprodutos de síntese.

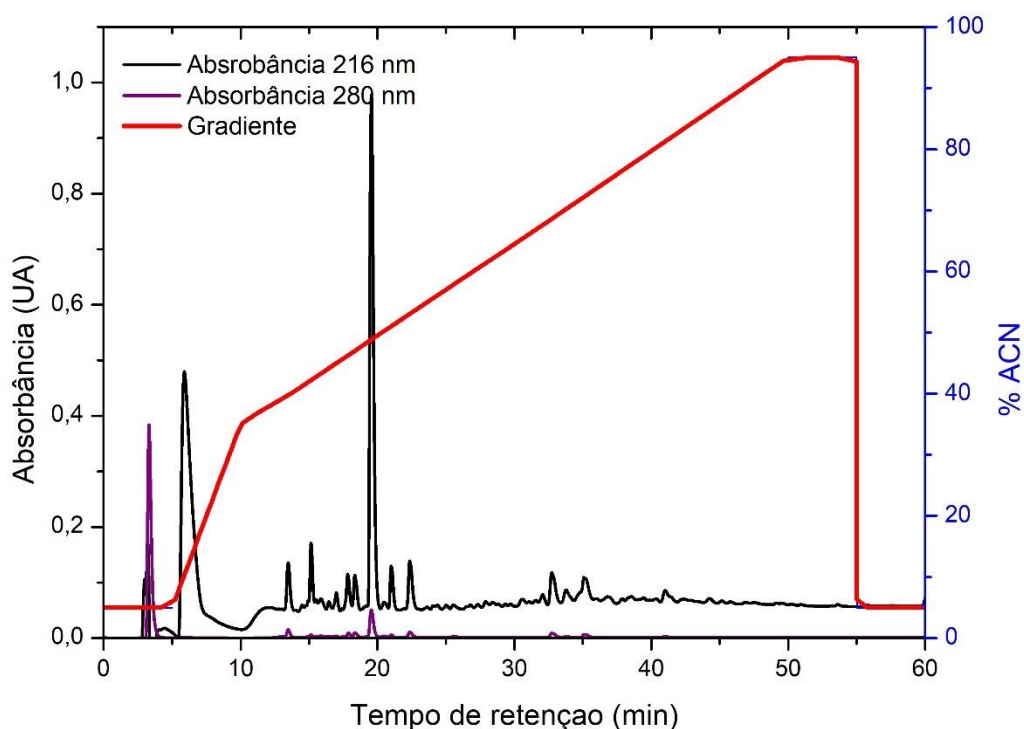


Figura 18: Cromatograma analítico do peptídeo Gg01. Peptídeo eluído em gradiente de acetonitrila + 0,1% (v/v) TFA, em coluna analítica Vydac 218TP54 C18. O pico em aproximadamente 20 minutos corresponde ao peptídeo Gg01, com os outros picos representando subprodutos de síntese.

Conforme pode ser depreendido dos cromatogramas apresentados acima, a síntese realizada pode ser considerada satisfatória, uma vez que o pico mais abundante é aquele que contém o produto de síntese esperado, além de notar-se poucos picos decorrentes de subprodutos de síntese. É possível observar que os peptídeos são eluídos em % de ACN relativamente diferentes: enquanto o Bt01 elui com cerca de 60% de ACN, os peptídeos Bt02 e Gg 01 (que têm composições semelhantes) eluem em cerca de 50% de ACN.

Também foi obtido o espectro de massa dos produtos brutos. Os espectros obtidos das frações de peptídeo bruto corroboram com os dados obtidos por cromatografia. Os picos principais correspondem aos íons $[M+H]^+$ dos peptídeos sintéticos e poucos picos adicionais são observados.

Abaixo, os espectros de massa para cada um dos peptídeos são apresentados, com aproximação na área do íon relacionado com o produto, evidenciando a distribuição isotópica.

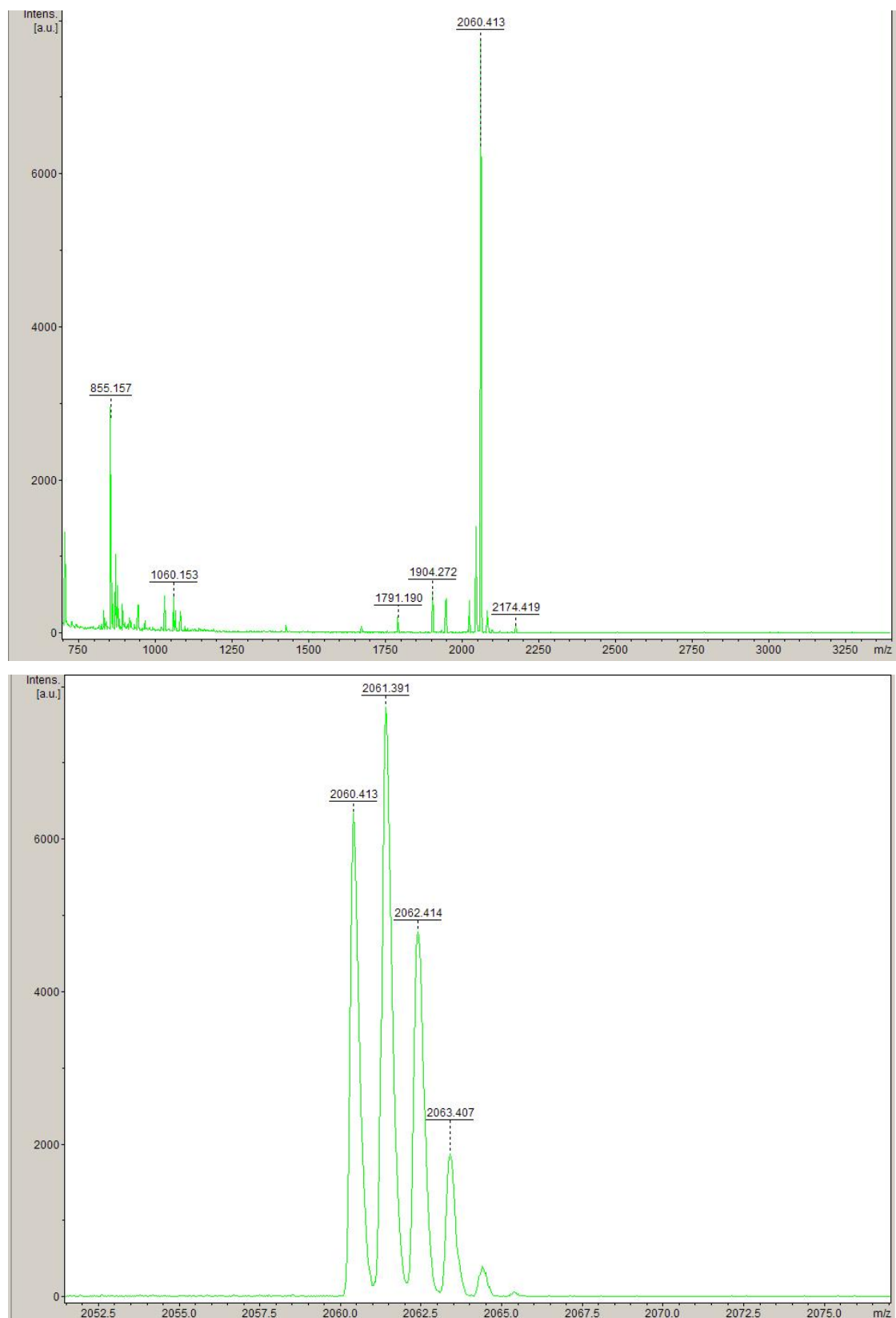


Figura 19: Espectro MS do IAP Bt01 obtido por meio de MALDI-TOF/TOF (UltraFlex Extreme, Bruker Daltonics). A segunda imagem trata-se de zoom na faixa de m/z 2052 a m/z 2075 visando evidenciar a presença do íon de massa carga esperada para o peptídeo em questão

($[M+H]^+ = 2060,413 \text{ Da}$). A diferença entre a massa esperada e aquela apresentada no espectro se dá devido à calibração do equipamento.

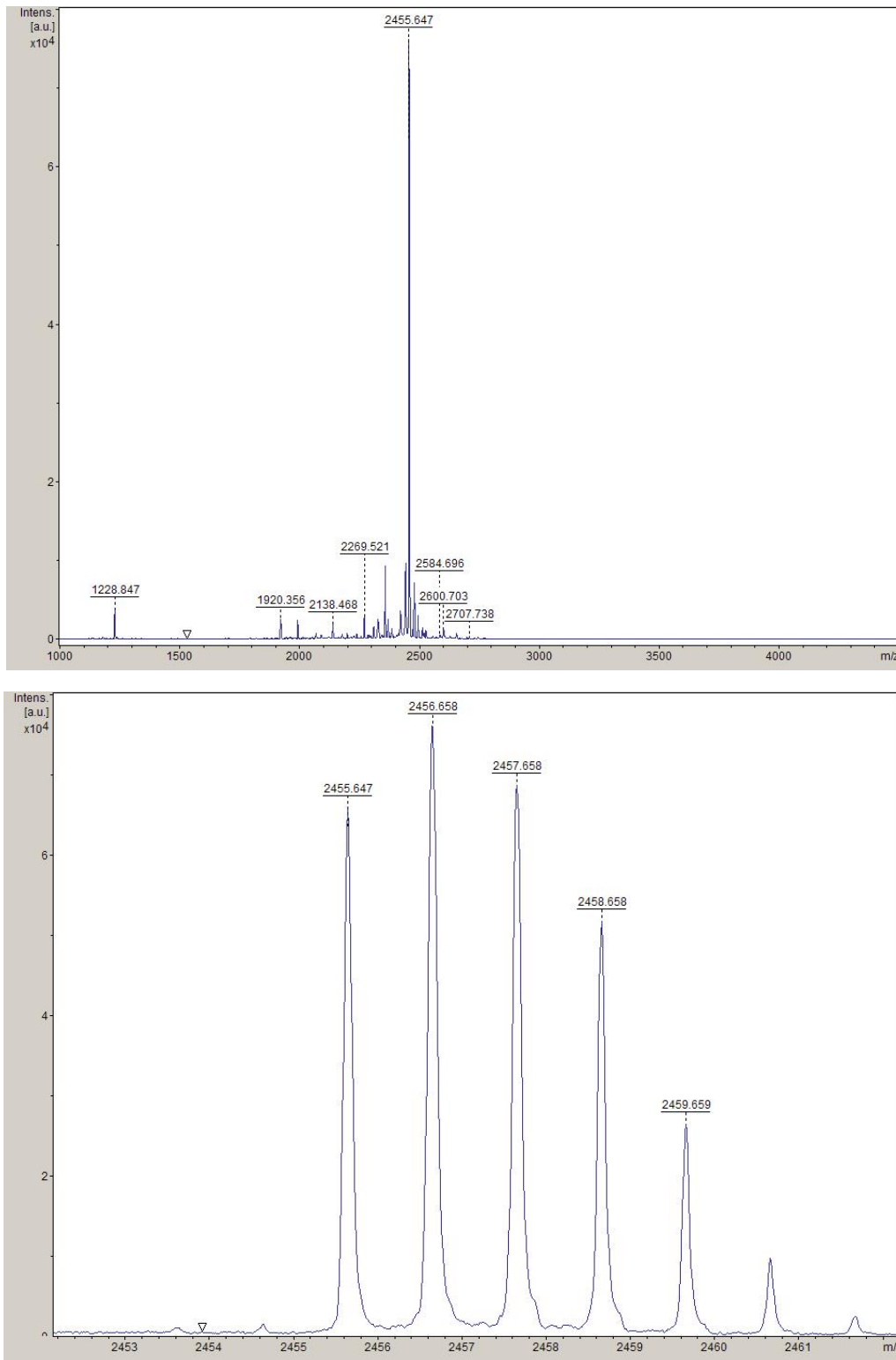


Figura 20: Espectro MS do Peptídeo Bt02 obtido por meio de MALDI-TOF/TOF (UltraFlex Extreme, Bruker Daltonics). A segunda imagem trata-se de zoom na faixa de m/z

2450 a m/z 2463 visando evidenciar a presença do íon de massa carga esperada para o peptídeo em questão ($[M+H]^+ = 2455,65$ Da). A diferença entre a massa esperada e aquela apresentada no espectro se dá devido à calibração do equipamento.

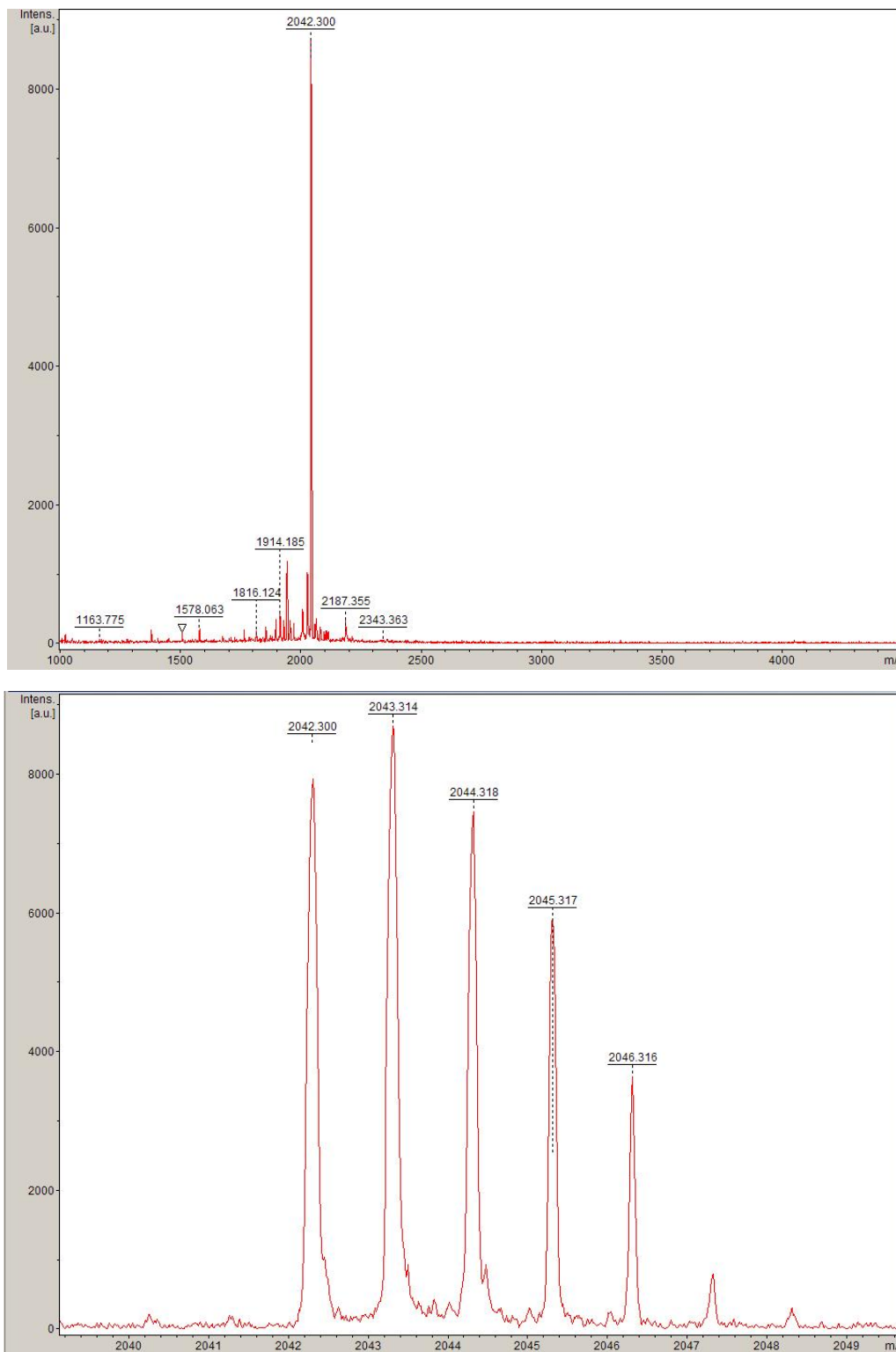


Figura 21: Espectro MS do IAP Gg01 obtido por meio de MALDI-TOF/TOF (UltraFlex Extreme, Bruker Daltonics). A segunda imagem trata-se de zoom na faixa de m/z

2040 a m/z 2049 visando evidenciar a presença do íon de massa carga esperada para o peptídeo em questão ($[M+H]^+ = 2042,30$ Da). A diferença entre a massa esperada e aquela apresentada no espectro se dá devido à calibração do equipamento.

A identidade dos peptídeos sintetizados foi confirmada por meio da fragmentação dos íons precursores de cada peptídeo em um Espectrômetro de Massa MALDI-TOF/TOF (UltraFlex Extreme, Bruker Daltonics). No sequenciamento abaixo, nota-se a presença da correta estrutura primária dos IAPs sintetizados. A sequência dos peptídeos em questão foi confirmada por meio da interpretação da série y (que pode ser lida da direita para a esquerda a partir do íon precursor) e da série b (lida da esquerda para a direita).

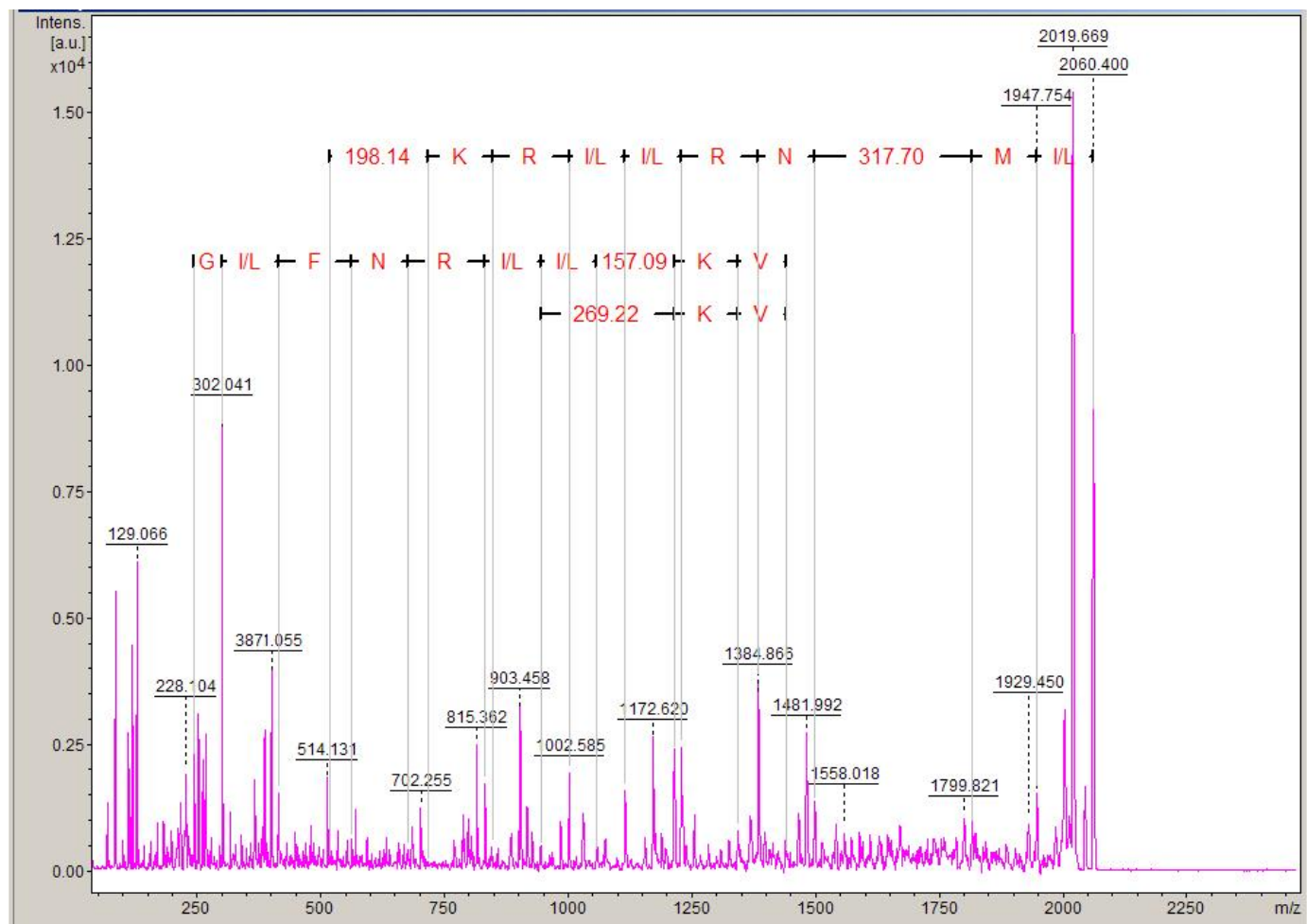


Figura 22: Sequenciamento do Bt01 feito por meio da fragmentação do íon de massa molecular em um MALDI-TOF/TOF (UltraFlex Extreme, Bruker Daltonics). Estrutura primária: LMGLFNRIIRKVVKLFN.

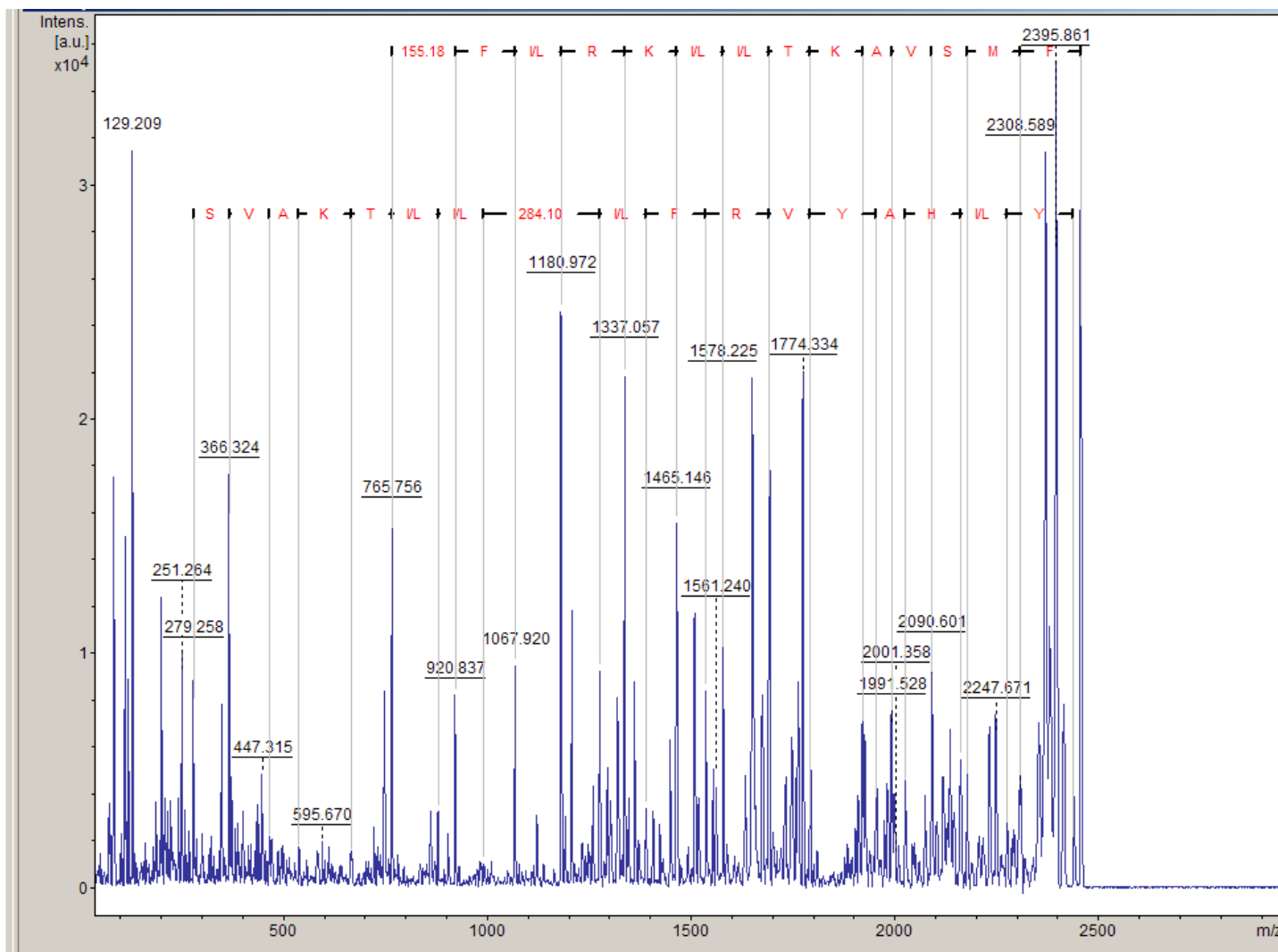


Figura 23: Sequenciamento do Bt02 01 feito por meio da fragmentação do íon de massa molecular em um MALDI-TOF/TOF (UltraFlex Extreme, Bruker Daltonics). Estrutura primária: FMSVAKTILKRLFRVYAHY

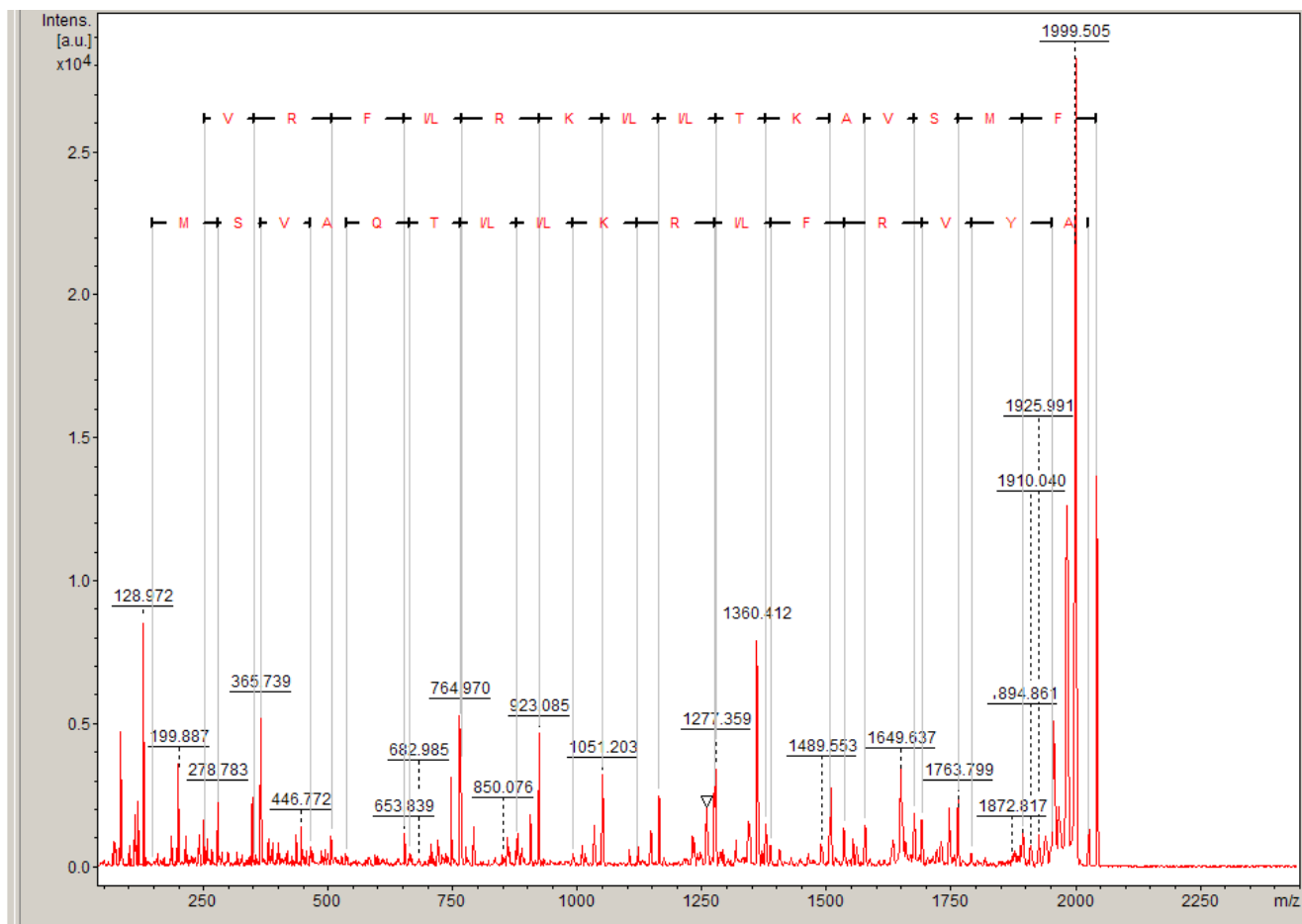


Figura 24: Sequenciamento do Gg 01 01 feito por meio da fragmentação do íon de massa molecular em um MALDI-TOF/TOF (UltraFlex Extreme, Bruker Daltonics). Estrutura primária: FMSVAKTILKRLFRVYA

4.4 Quantificação dos peptídeos sintetizados

Com o peptídeo purificado e liofilizado, alíquotas foram retiradas e solubilizadas em água para quantificação. As seguintes absorvâncias são apresentadas quando as amostras são submetidas à um espectrômetro de absorção UV-Vis:

Tabela 17: Comprimentos de onda selecionados e absorvância associada.

Comprimento de onda	Absorvância Bt01	Absorvância Bt02	Absorvância Gg01
205 nm	0,84501	0,52056	0,53891
215 nm	0,3304	0,25286	0,26281
225 nm	0,0939	0,13918	0,14614

Com as absorvâncias, as concentrações foram calculadas usando a fórmula apresentada na seção Metodologia e são apresentadas na tabela abaixo:

Tabela 18: Concentrações dos peptídeos sintetizados

Peptídeo	Concentração	Concentração
Bt01	7,53 mg/mL	3,65 mM
Bt02	2,03 mg/mL	0,83 mM
Gg01	2,09 mg/mL	1,02 mM

4.5 Estruturação dos peptídeos quando em interação com membranas modelo

A interação dos peptídeos sintetizados com modelos de vesícula fosfolipídica foi estudada utilizando a técnica de Dicroísmo Circular. Os peptídeos estudados assumem uma conformação randômica (sem uma estrutura definida) quando em solução aquosa. O agente de estruturação neste caso são as vesículas de DMPC adicionadas ao meio.

Os dados obtidos através do experimento de dicroísmo celular são apresentados nos termos de elipticidade (θ) ou absorvância diferencial (ΔA). Entretanto, deve o valor apresentado ser normalizado ajustando-o às concentrações molares dos peptídeos. Essa normalização permite que comparações independentes sejam realizadas através de resultados obtidos em diferentes análises, laboratórios ou ainda espectropolarímetros^{55,27}.

Apresenta-se abaixo os resultados das análises de dicroísmo circular dos peptídeos sintetizados:

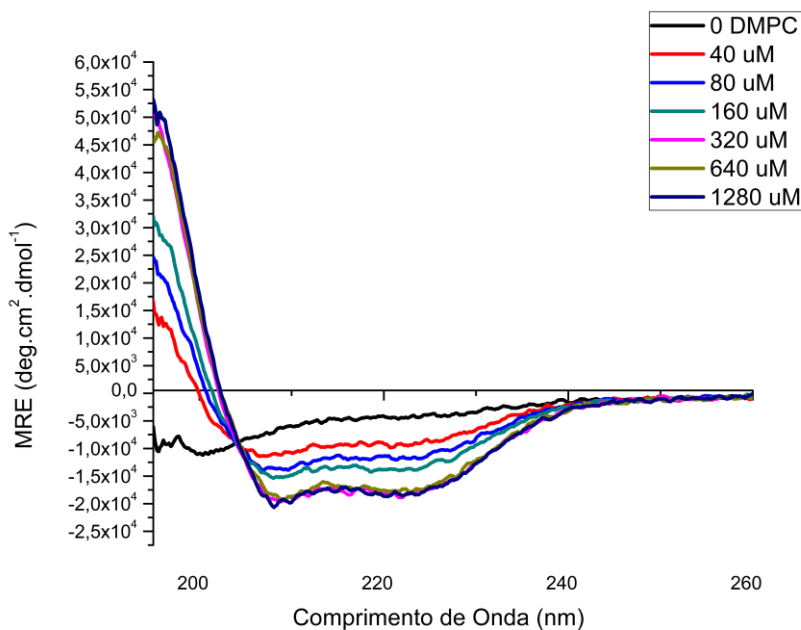


Figura 25: Espectro de CD relativo ao peptídeo Bt01. Diferentes concentrações de DMPC foram aplicadas visando determinar o ponto de saturação para a estruturação do peptídeo. A janela espectroscópica foi reduzida ao intervalo de 260 a 195 nm e os dados de elipicidade são apresentados na forma de elipicidade molar média MRE.

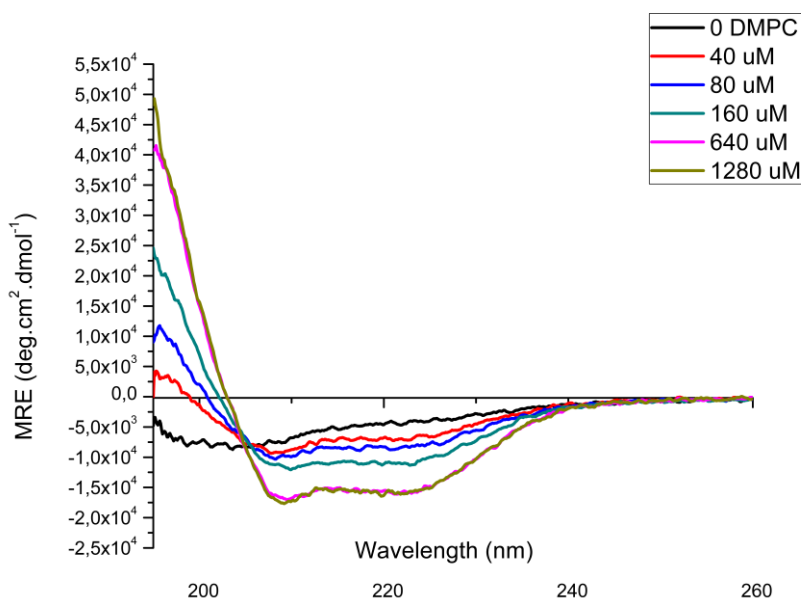


Figura 26: Espectro de CD relativo ao peptídeo Bt02. Diferentes concentrações de DMPC foram aplicadas visando determinar o ponto de saturação para a estruturação do peptídeo. A janela espectroscópica foi reduzida ao intervalo de 260 a 195 nm e os dados de elipicidade são apresentados na forma de elipicidade molar média MRE.

A análise dos espectros de CD permite determinar a estrutura secundária adotada pelo peptídeo. Essa análise estrutural se baseia na teoria de Moffit sobre a dispersão óptica de polímeros na forma de hélice⁵⁶. Tal teoria diz que a momento de dipolo de transição oriundo de transições $\pi - \pi^*$ de cromóforos na hélice são polarizados de maneira perpendicular ou paralela ao eixo da hélice⁵⁷.

Com base nos espectros apresentados acima, pode-se inferir que os peptídeos Bt01 e Bt02, quando em contato com modelos de membrana lipídica, assumem uma estrutura de α -hélice. Os sinais negativos nos comprimentos de onda 208 e 222 nm confirmam essa inferência, bem como a ausência dos sinais atribuídos a outras estruturas.

Apresenta-se a percentagem de estruturação dos peptídeos considerando os dois comprimentos de onda citados:

Tabela 19: Percentual de estruturação do peptídeo Bt01 quando em contato com modelos de membrana fosfolipídica

Concentração de DMPC	0 μ M	40 μ M	80 μ M	160 μ M	320 μ M	640 μ M	1280 μ M
208 nm	30,2%	40,6%	47,5%	52,4%	62,5%	60,6%	66,4%
222 nm	20,5%	33,8%	40,3%	46,5%	60,2%	56,1%	59,4%

Tabela 20: Percentagem de estruturação do peptídeo Bt02 quando em contato com modelos de membrana fosfolipídica

Concentração de DMPC	0 μ M	40 μ M	80 μ M	160 μ M	640 μ M	1280 μ M
208 nm	31,2%	36,0%	38,3%	41,1%	54,8%	55,9%
222 nm	19,6%	25,6%	29,0%	36,1%	48,1%	48,8%

O percentual de estruturação do peptídeo foi plotado em um gráfico % α – hélice vs. relação lipídeo/peptídeo, conforme mostrado abaixo:

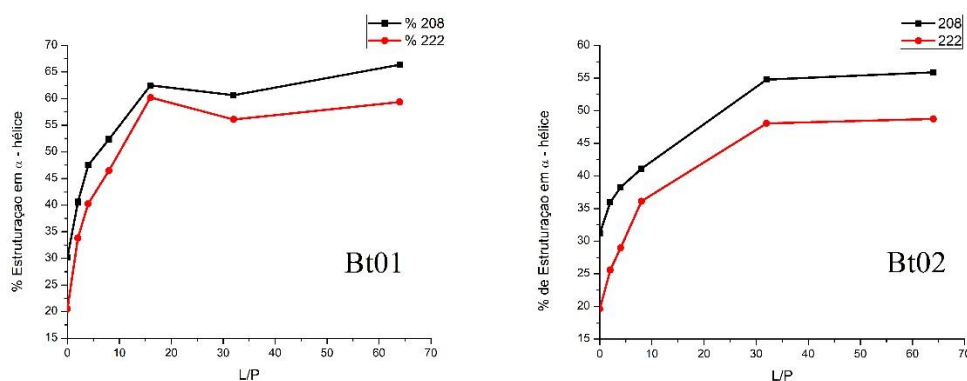


Figura 27: Estruturação dos peptídeos Bt01 e Bt02 frente a diferentes relações lipídeo/peptídeo. As curvas foram construídas considerando os dois comprimentos de onda associados à peptídeos estruturados na forma de α – hélice^{27,55}.

A partir dos gráficos apresentados acima, pode-se inferir que a estruturação do peptídeo sobre a membrana está diretamente ligada à sua concentração sobre a mesma. Entretanto, essa estruturação atinge um valor máximo, onde, mesmo com a adição de novas concentrações de vesícula, não há aumento da estruturação. Para o peptídeo Bt01, essa concentração máxima é representada pelo ponto de 320 μM de DMPC, enquanto para o Bt02, o ponto de saturação é a concentração de 640 μM . O ponto máximo de saturação representa a situação em que todo o peptídeo já se encontra embebido na membrana.

A estruturação dos peptídeos sintetizados quando em contato com a membrana segue o comportamento esperado para peptídeos antimicrobianos, conforme extensamente discutido na literatura^{11,26,31,58}. Corrobora ainda os objetivos da pesquisa feita no genoma das espécies de *Bos taurus* e *Gallus gallus*, na qual foi dado enfoque à peptídeos com maior possibilidade de estruturação em α -hélice. Existe uma relação direta entre a estruturação do peptídeo em uma α -hélice e sua atividade antimicrobiana. Dados publicados por Brand e colaboradores¹⁸ recentemente, mostram uma correlação entre a estruturação de AMPs de várias fontes com a perturbação de modelos de membrana e consequente ação antimicrobiana.

Entretanto, tal correlação deve ser feita com cuidado. A estruturação em α -hélice do peptídeo pode representar um indicativo de ação antimicrobiana, mas não figura como condição para tal potencial. Conforme apresentado na Introdução deste trabalho, AMPs assumem as mais várias conformações. Os dados apresentados posicionam os peptídeos dentre uma das várias classes deste tipo de molécula.

O algoritmo utilizado para predição da estrutura secundária, GOR IV, figura como uma boa forma de prever a estruturação da molécula, mas apresenta taxa de erro associada à predição. Brand e colaboradores¹⁸ mostram que peptídeos com atividade antimicrobiana apresentam os mais diferentes valores de % de estruturação pelo GOR IV. Entretanto, a helicidade destes peptídeos foi confirmada por meio de análises espectroscópicas. Neste trabalho a predição do GOR IV é colocada em questão quando se observa o grau de estruturação predito para o peptídeo Bt02, conforme apresentado na tabela 7. Uma possibilidade de 0,0% de estruturação em α -hélice foi apresentada pelo algoritmo do GOR IV. Entretanto, conforme confirmado por meio do espectro de CD apresentado na figura 25, o peptídeo em questão

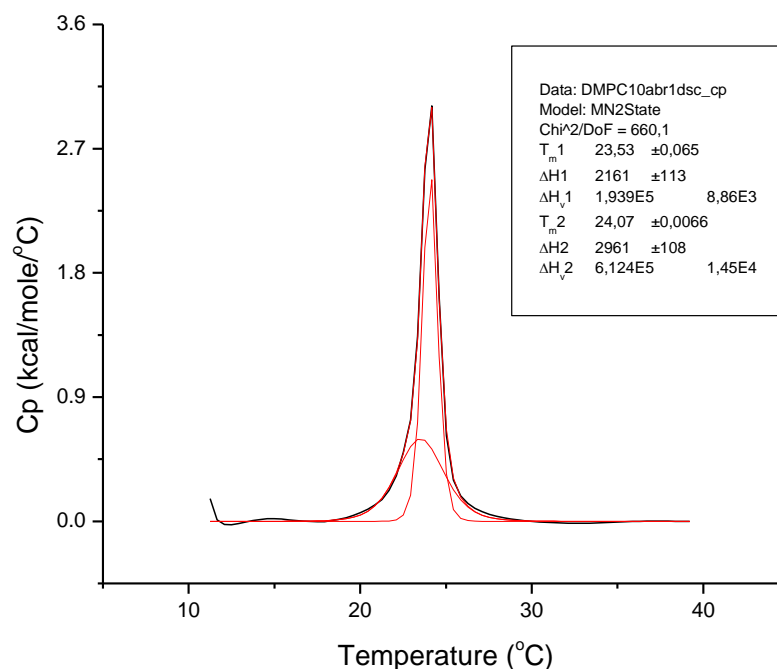
apresentou uma estruturação em α -hélice quando em contato com as vesículas de DMPC. Assim, as informações obtidas por meio do GOR IV devem ser analisadas com cuidado, frente a possibilidade de erro do mesmo quando comparado com o resultado experimental.

Os dados acima consideram apenas as moléculas de Bt01 e Bt02 sintetizadas. Os dados referentes à molécula Gg01 estão em fase de obtenção e serão apresentadas em trabalho posterior.

4.6 Interação dos peptídeos com membranas modelo

A interação do peptídeo Bt01 com vesículas de fosfolípídeos foi estudada por meio da técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura. Nela, o comportamento de uma amostra – que aqui figura como uma célula contendo vesículas unilamelares grandes de DMPC e o peptídeo em análise – frente a um padrão quando uma rampa de temperatura é aplicada ao meio (10 a 40 °C).

A interação do peptídeo com a membrana modelo é indicada pela mudança no comportamento de transição de fase $P'_B \rightarrow L_\alpha$. Abaixo apresenta-se os termogramas associados ao estudo dos peptídeos:



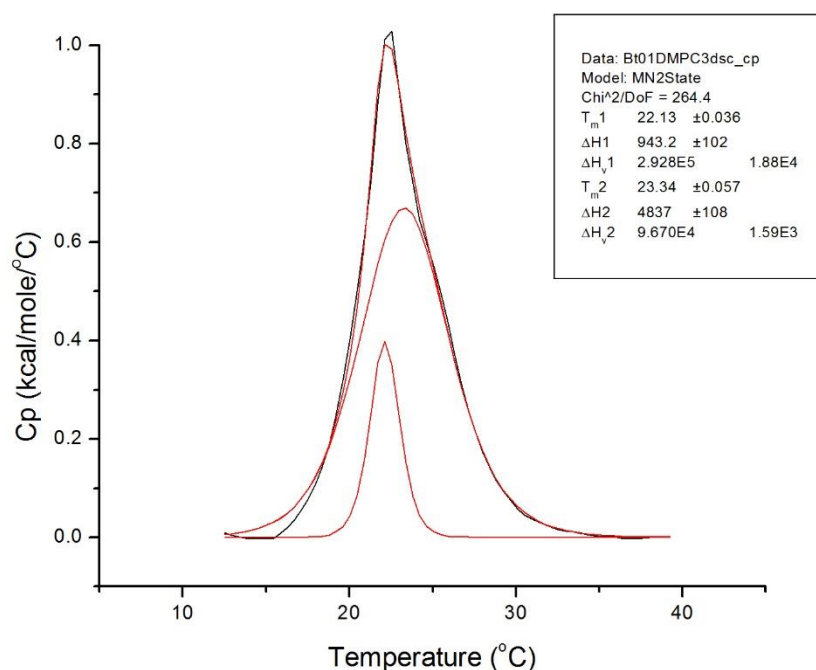


Figura 28: Termogramas do meio contendo somente vesículas de DMPC 0,5 mM (termograma superior) e do meio com DMPC 0,5 mM e 0,02 mM de peptídeo Bt01 (termograma inferior) em uma razão molar de 4mol%, em tampão fosfato pH 7,4. A endoterma foi decomposta em duas outras em um modelo de transição de dois estados, gerando um componente fino e um largo. Os dados associados à cada uma das endotermas são apresentados na figura. A endoterma em preto representa os dados experimentais, enquanto aquelas em vermelho apresentam os dados após o tratamento de modelo de dois estados.

Analisando os termogramas apresentados acima, pode-se inferir a presença de duas endotermas: uma fina, aparecendo em menor temperatura, interpretada como uma endoterma mais cooperativa quanto ao fenômeno de transição de fase; e uma outra mais larga em maior temperatura, classificada como menos cooperativa³¹. Os termos menos e mais cooperativa têm relação quanto à contribuição de cada uma das endotermas para o fenômeno de transição de fase.

Depreende-se da análise do meio contendo somente DMPC as temperaturas de transição de fase (T_m) de 23,53 °C para o componente largo e 24,07 °C para o componente fino e o ΔH_1 de 2161 kcal.mol⁻¹ e o ΔH_2 de 2981 kcal.mol⁻¹ (entalpias relacionadas com cada uma das endotermas). Estes são os valores que servirão como parâmetros de comparação quando da adição ao meio do peptídeo Bt01.

Quando o peptídeo Bt01 é inserido, nota-se a alteração nas endotermas quando comparadas com aquelas quando só havia vesículas de DMPC. Os T_m s das duas endotermas possuem valores menores ($T_{m1} = 22,13$ e $T_{m2} = 23,34$), bem como ocorrendo diminuição do ΔH_1 ($943,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$). Essa mudança no valor de T_m e alteração no valor do ΔH indica que ocorre interação do peptídeo com a vesícula fosfolipídica. E ainda, seguindo a classificação apresentada por McElhaney e colaboradores apresentada na parte metodológica deste trabalho, pode-se inferir que ocorre uma interação com os grupos fosfato e penetração parcial da molécula no core hidrofóbico da bicamada lipídica das vesículas modelo.

Com base na comparação dos dados apresentados no trabalho de Brand e colaboradores¹¹, cuja classificação de peptídeos com possível atividade antimicrobiana se ampara em dados de interação da molécula com modelos de membrana fosfolipídicas frente à técnica de DSC, e os dados coletados da análise do peptídeo Bt01 em sua interação com vesículas de DMPC, pode-se situá-lo preliminarmente como pertencendo aos clusters 3 ou 4 (uma vez que demonstrou perturbação da transição de fase das vesículas estudadas).

Situar o peptídeo Bt01 dentro deste cluster significa prever uma possível atividade antimicrobiana do mesmo. Entretanto, maiores afirmações necessitam do estudo aprofundado da interação deste peptídeo com outros modelos de membrana, o que se dará posteriormente.

A análise dos outros peptídeos sintetizados com modelos de membrana será apresentada em trabalho a parte.

4.7 Potencial antimicrobiano dos peptídeos sintetizados

O potencial antimicrobiano dos peptídeos sintetizados foi determinado com base em estudos da determinação da concentração inibitória mínima em testes de microdiluição em caldo. Para o teste em questão, o protocolo M07-A9 da CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) denomina como MIC a “*menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento de organismos em tubos ou poços de microdiluição detectados por observação sem auxílio*”⁵².

Assim, o MIC dos peptídeos frente a diferentes microrganismos foi determinado como sendo o poço contendo microrganismo e peptídeos onde, visualmente, não se observou crescimento de organismo. A tabela abaixo apresenta o MIC para os organismos testados:

Tabela 21: MICs dos potenciais IAPs sintetizados frente aos microrganismos *E. coli* e *S. aureus*.

Microrganismo	IAP Bt 01	IAP Bt 02	IAP Gg01
<i>Staphylococcus aureus</i>	8 uM	4 uM	4 uM
<i>Escherichia coli</i>	8 uM	4 uM	4 uM

Uma forma de analisar o potencial das moléculas sintetizadas é comparar seu MIC com aquele apresentado por outros agentes antimicrobianos semelhantes que já são bem estudados. A tabela abaixo apresenta o MIC associado à uma série de peptídeos antimicrobianos de fonte natural para os dois microrganismos testados:

Tabela 22: MIC de peptídeos antimicrobianos de fonte natural³¹ contra os microrganismos *E. coli* e *S. aureus*. Os peptídeos apresentados na tabela foram selecionados e sintetizados por Ramada, M.H.S. e colaboradores no estudo de IAPs oriundos de plantas.

Peptídeo	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Asc-8	2,0 \pm 0,0	2,0 \pm 0,0
DS01	1,0 \pm 0,0	8,0 \pm 0,0
Gentamicina	0,52 \pm 0,0	0,26 \pm 0,0
Tc02	10,67 \pm 4,61	8,0 \pm 0,0
Tc03	64,0	N/A
At01	26,67 \pm 9,24	16,0 \pm 0,0
At02	2,0 \pm 0,0	4,0 \pm 0,0
Zm01	13,33 \pm 4,61	16 \pm 0,0

Ao comparar o MIC dos peptídeos selecionados neste trabalho com outros, pode-se perceber que eles apresentam uma taxa de inibição de crescimento maior, ou seja, menor MIC, de que outros peptídeos de origem natural, com destaque para o caso em que os peptídeos Bt02 e Gg01 possuem um MIC menor que aquele apresentado pelo controle DS01 para o microrganismo *S. aureus*.

4.8 Estudos preliminares de confecção de filmes de PMMA contendo IAPs

Um dos peptídeos sintetizados (Bt01) foi escolhido como agente antimicrobiano para os testes de conceito neste trabalho, os quais envolvem a co-precipitação com polímero de

PMMA. O teste de conceito envolve testar se a premissa proposta por este trabalho se mantém: a possibilidade de sintetizar um material polimérico com peptídeo impregnado.

Os filmes de PMMA contendo o IAP Bt01 foram feitos na concentração de 1,34% m/m sem controle de forma. A solução contendo PMMA e polímero foi pipetada em uma placa de petri de forma repetida, formando várias camadas do polímero. A espessura do filme foi controlada através da quantidade de adições.



Figura 29: filmes de PMMA com peptídeo Bt01. Filme feito a partir da técnica de co-precipitação, onde o polímero e o aditivo são dissolvidos em solvente orgânico e posteriormente submetidos à exposição à temperatura ambiente para evaporação do solvente.

A impregnação do peptídeo no filme foi estudada por meio de espectrometria de massa com ionização pela técnica de MALDI. Foi realizada a análise de um pedaço do filme sobre uma placa específica de MALDI com o objetivo de atestar se a co-precipitação foi eficiente no sentido de moléculas de peptídeos estarem presentes no filme. A análise foi feita diretamente

na superfície do filme, não sendo realizado nenhum pré-tratamento para a análise, exceto a aplicação de matriz de ionização sobre a área a ser analisada.



Figura 30: Placa de MALDI utilizada para a análise da superfície do filme de PMMA. A síntese do filme foi realizada diretamente sobre a placa e posteriormente a matriz de ionização foi aplicada sobre a área de ser analisada.

Abaixo apresenta-se o espectro de MALDI obtido a partir da análise descrita acima. Como pode ser percebido, o espectro apresenta o íon em m/z 2065,47 associado ao peptídeo Bt01 presente em sua superfície, confirmando assim a efetividade da síntese do filme no quesito impregnação do peptídeo.

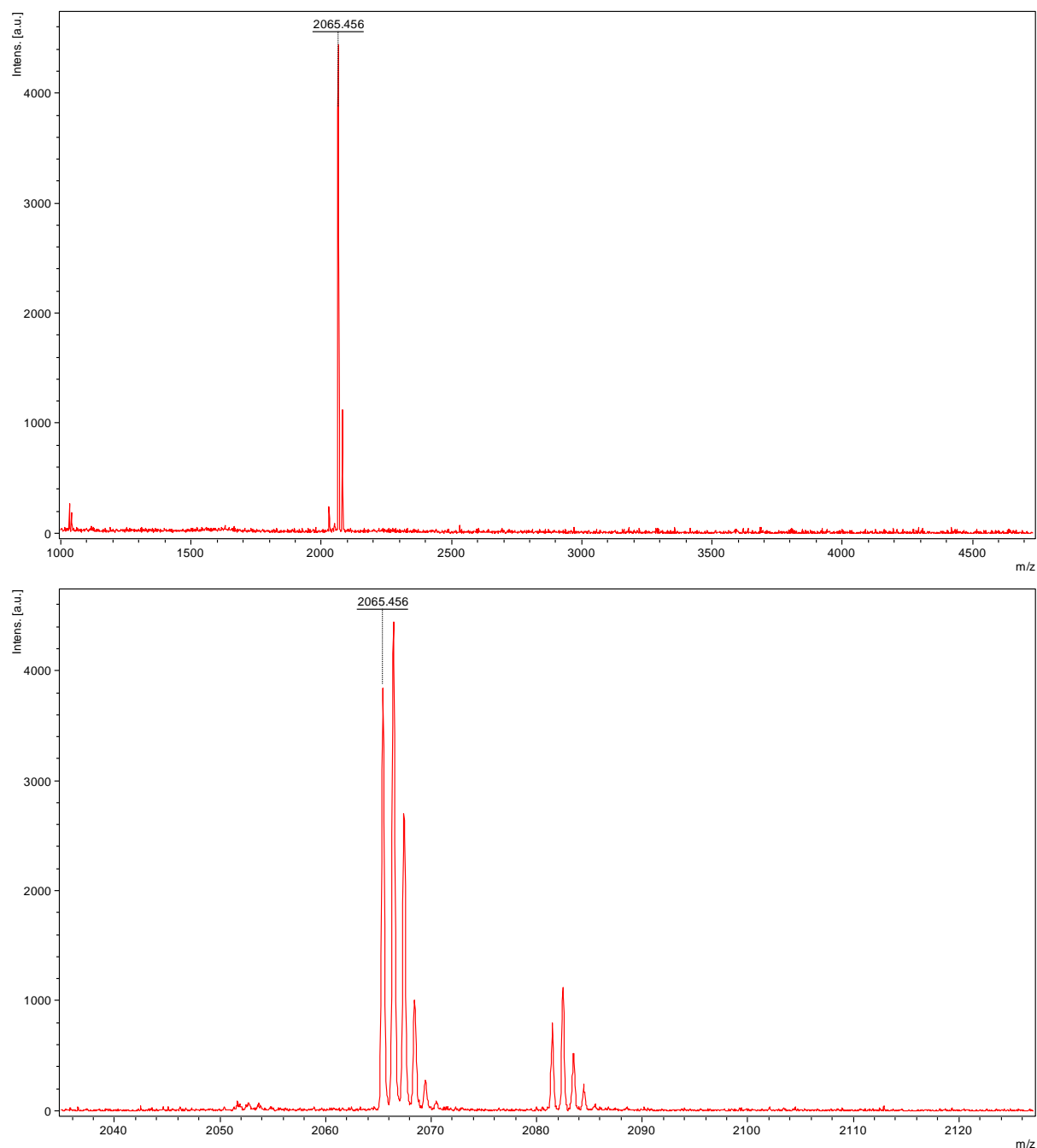


Figura 31: espectro de MALDI obtido a partir da análise da superfície do filme sintetizado. O segundo espectro apresenta a distribuição isotópica do íon em m/z 2065,447. Este íon está associado ao peptídeo sintético Bt01, impregnado no filme por meio da técnica de co-precipitação.

Destaque para a diferença de massa entre o íon citado e a massa esperada para o peptídeo. Isso se dá ao fato de que falta de calibração do aparelho, uma vez que a placa de MALDI utilizada para a análise não compreende poços para aplicação de calibrante. Novas análises serão efetuadas com a adição de calibrantes em porções discretas da placa. Entretanto,

para a análise em tela, não há prejuízo essa diferença de massa, por se tratar de uma análise com foco qualitativo, visando atestar a presença do peptídeo.

A liberação do Bt01 co-precipitado com PMMA no meio foi estudada ao inserir o filme sintetizado em água, com posterior análise da fração aquosa por MALDI e espectroscopia de UV-Vis. O espectro de massa abaixo está relacionado à uma alíquota retirada após 42 horas de exposição do filme ao meio aquoso.

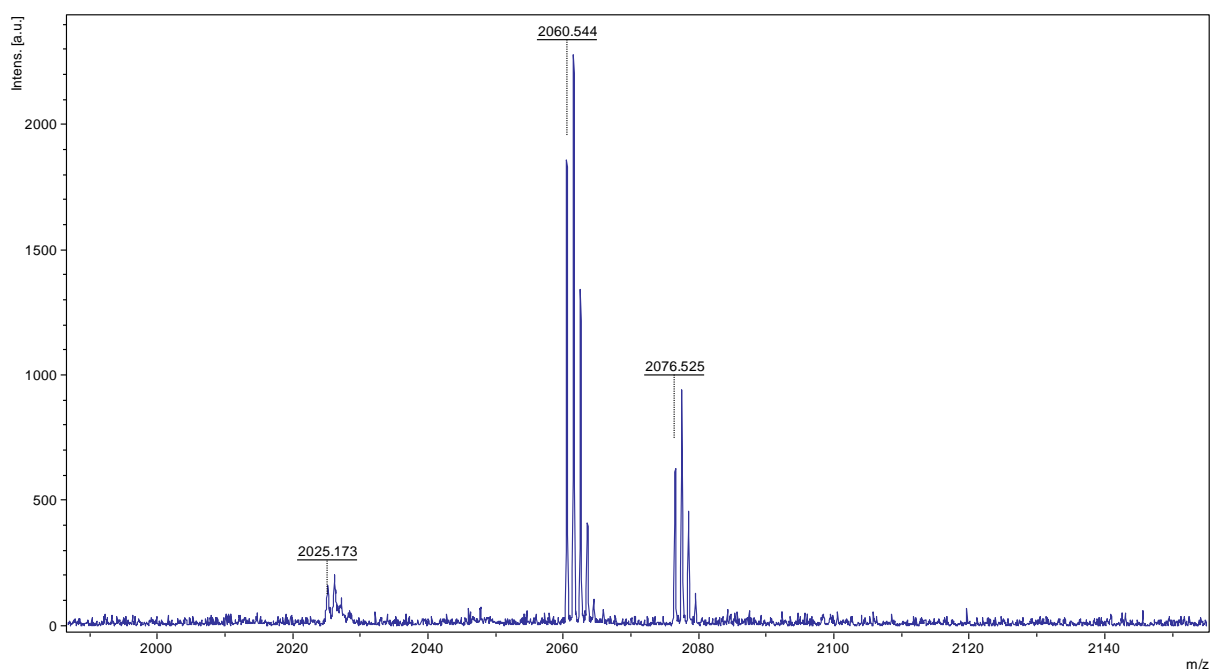
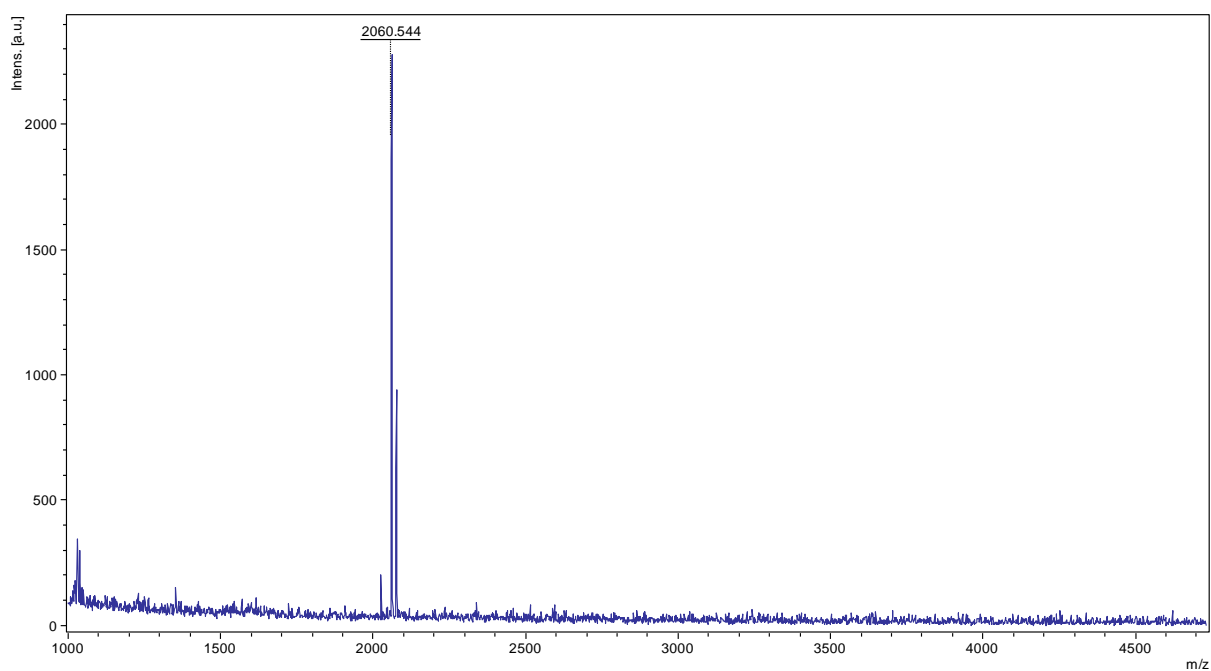


Figura 32: Espectros de massa da alíquota retirada após 42h de exposição do filme ao meio aquoso. O segundo espectro mostra a distribuição isotópica do íon em m/z 2060,544. Este íon nos dois espectros está relacionado ao peptídeo Bt01 liberado ao meio.

A liberação de peptídeo no meio também foi estudada por meio de espectroscopia de absorção UV-Vis, conforme o espectro apresentado abaixo:

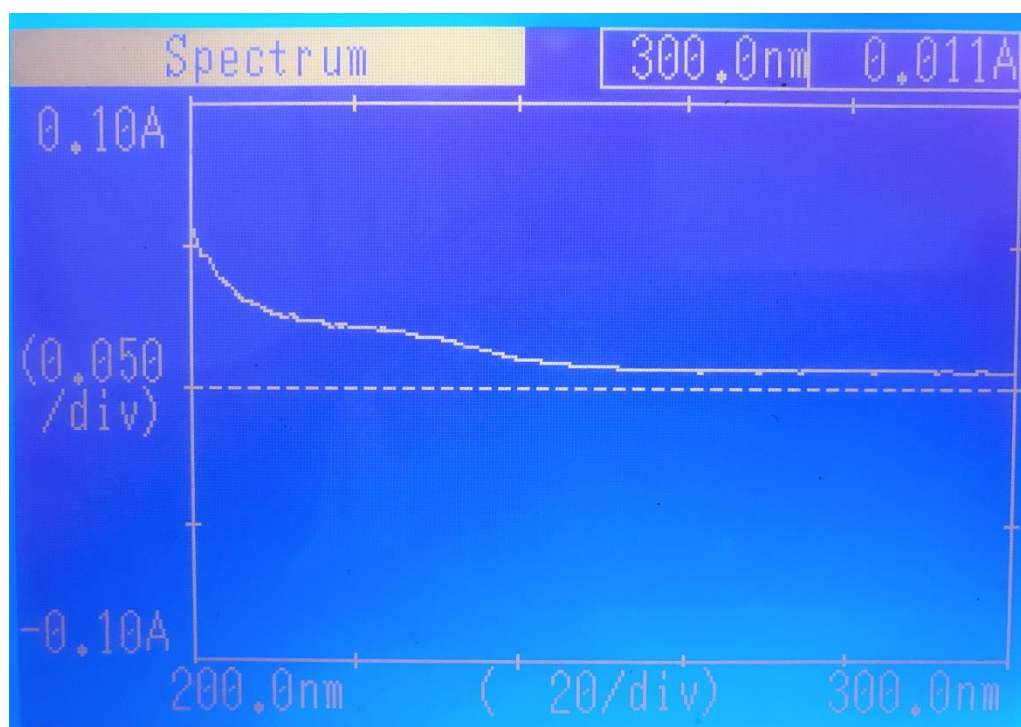


Figura 33: Espectro UV-Vis da alíquota retirada após 42 horas de exposição do filme a um meio aquoso. Dentro da janela espectroscópica estudada, a alíquota exibiu uma absorção em comprimentos de onda associados a peptídeos, o que corrobora a presença da molécula Bt01 no meio aquoso.

A distribuição do peptídeo no filme sintetizado foi investigada por meio do imageamento de uma porção do filme sintetizado sobre a placa de MALDI. A varredura do laser sobre toda a superfície do filme permite que um espectro de massa seja obtido para cada ponto do filme e o total destes espectros apresentará a distribuição de íons presentes no material analisado.

Os dados coletados com o imageamento do filme são apresentados abaixo:

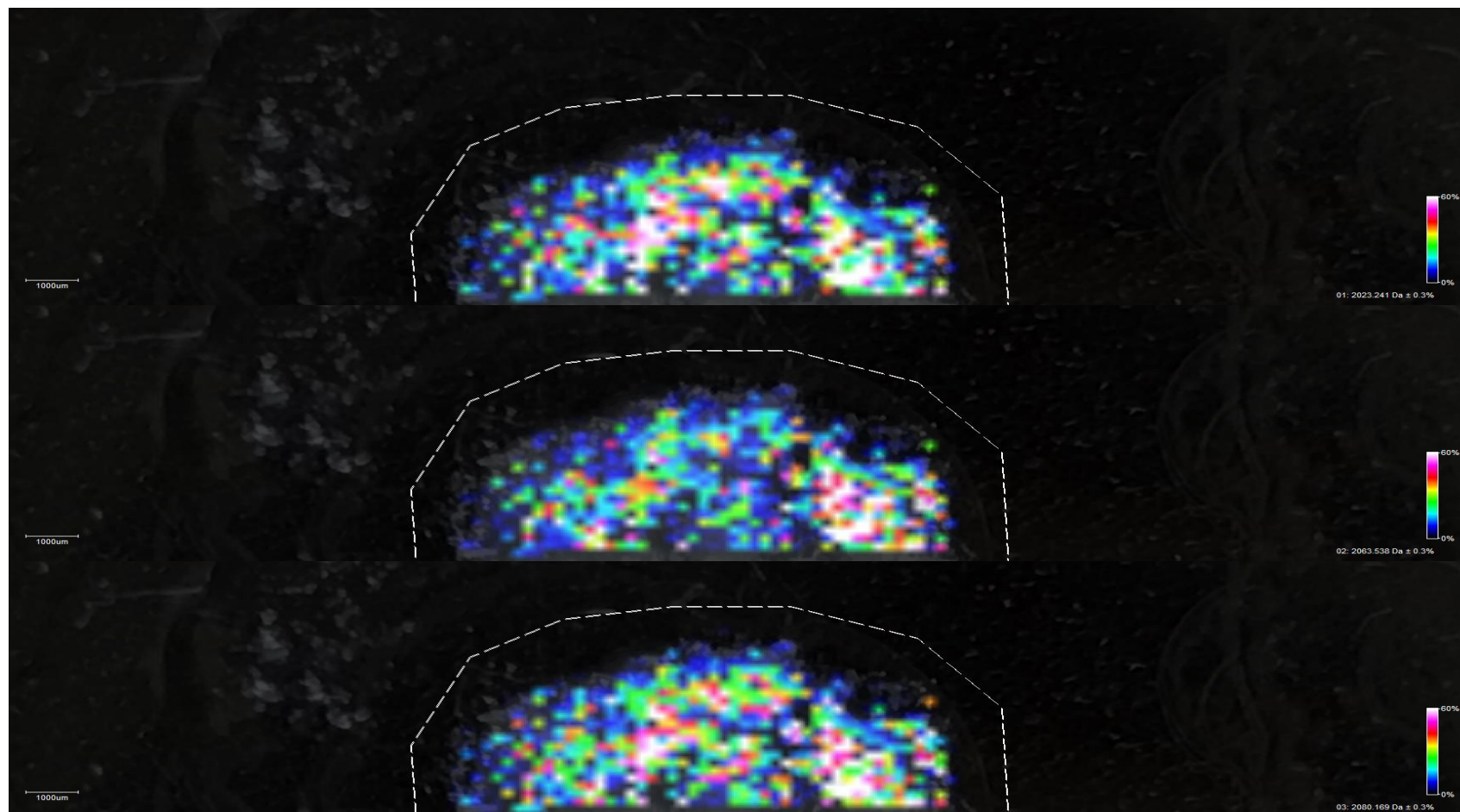


Figura 34: Imageamento do filme sintetizado sobre uma placa de MALDI. Cada um dos espectros apresenta a distribuição de um íon de m/z específica, conforme apresentado no lado direito da figura. Todos os íons estão relacionados com o peptídeo Bt01 em análise, representado apenas fenômenos pós aplicação da matriz de ionização. As análises foram feitas em uma Espectrômetro de Massa do tipo MALDI-TOF/TOF (UltraFlex III, Bruker Daltonics).

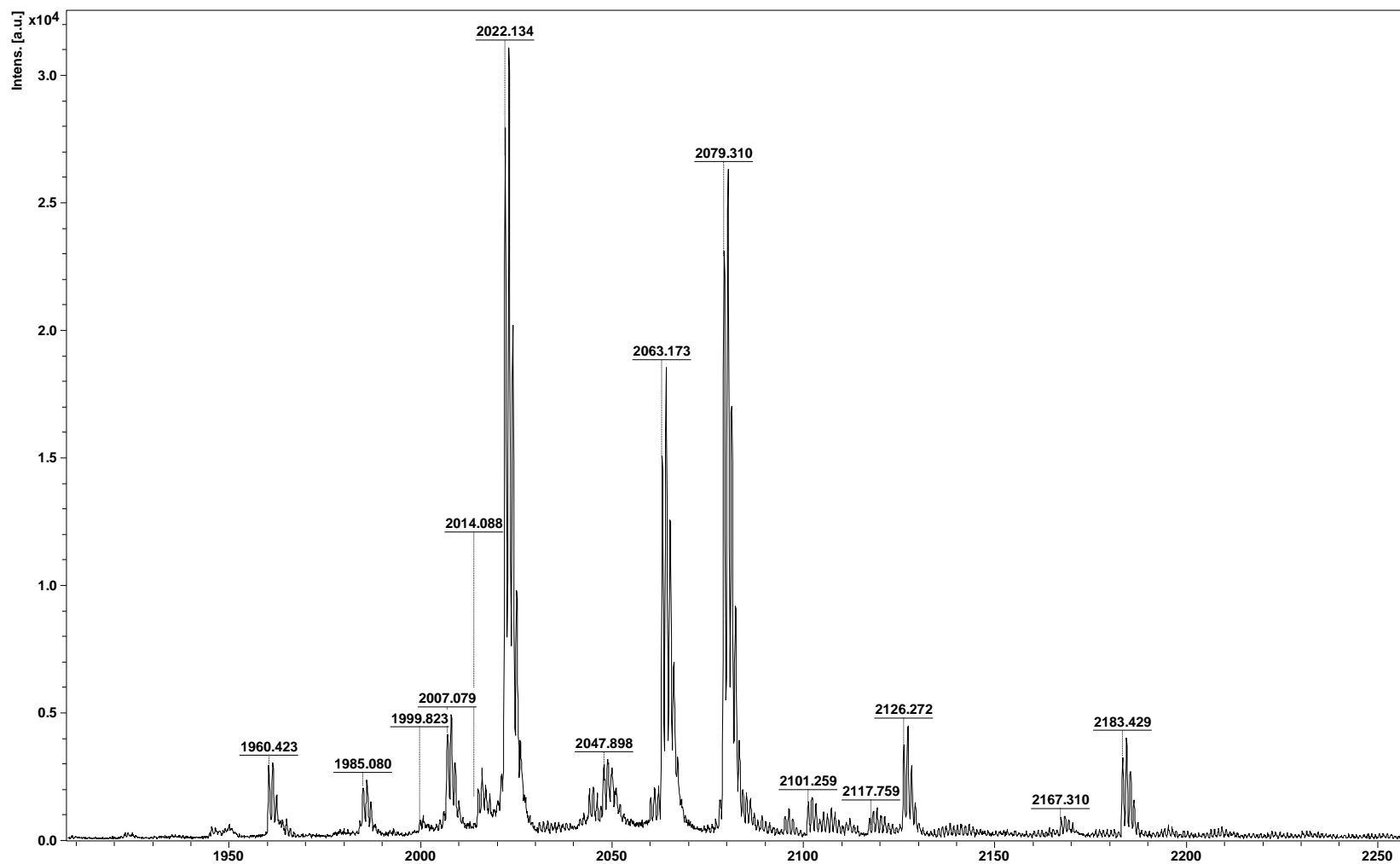


Figura 35: Espectro do ponto de maior intensidade obtido durante o estudo de imageamento. O íon em 2063.173 corresponde ao peptídeo Bt01, enquanto os outros estão associados a fenômenos pós aplicação da matriz de ionização. As análises foram feitas em uma Espectrômetro de Massa do tipo MALDI-TOF/TOF (UltraFlex III, Bruker Daltonics).

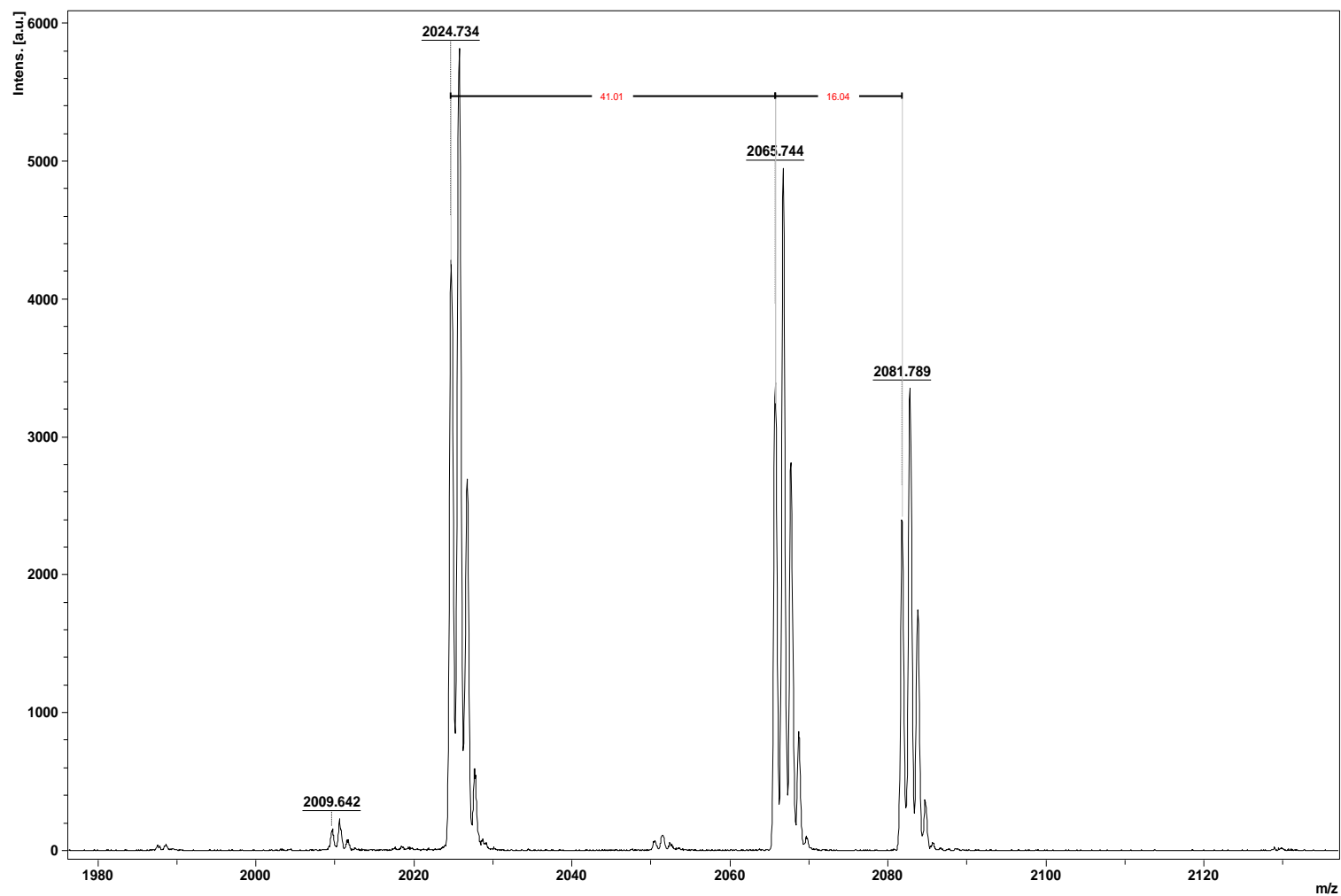


Figura 36: Espectro do ponto de maior resolução obtido durante o estudo de imageamento. O íon em 2063, 173 é devido o peptídeo Bt01, enquanto os outros estão associados a fenômenos pós aplicação da matriz de ionização. As análises foram feitas em uma Espectrômetro de Massa do tipo MALDI-TOF/TOF (UltraFlex III, Bruker Daltonics).

Os espectros apresentados acima em conjunto com aquele presente na Figura 31 corroboram a presença do peptídeo na superfície do filme sintetizado. Quando analisado o espectro da figura 31 é nítida a presença de um único íon dominante, m/z 2065, associado ao peptídeo Bt01. A presença de novos íons quando da aquisição dos espectros oriundos do imageamento podem ser justificados por fenômenos pós aplicação da matriz.

Enquanto o primeiro espectro é obtido em questão de segundos, um processo de imageamento exige mais tempo. Reporta-se presença de íon relacionados com a oxidação da molécula (m/z 2081.789) e um íon que representa a perda de -46 Da (m/z 2024.734), cujo mecanismo não pôde ser elucidado. Entretanto, estes novos íons de forma alguma invalida a afirmação da presença e distribuição do peptídeo no filme sintetizado. Entretanto, afirmações mais aprofundadas sobre a estabilidade do filme exigem maior estudo quanto à ciência deste tipo de material, investigação que será feita posteriormente.

O objeto da análise de imageamento foi, além de confirmar a presença do peptídeo no meio polimérico pós-síntese, investigar sua disposição na superfície do filme. Os íons mostrados nas figuras acima apresentam uma distribuição homogênea do peptídeo no meio. Essa distribuição deve ser esperada para materiais utilizados na conservação de alimentos, de modo que o agente antimicrobiano esteja em contato com toda a superfície onde será aplicado o material para embalo.

Cabe ressaltar o caráter preliminar das análises apresentadas acima. Com elas buscou-se um entendimento prévio da efetividade da síntese do material polimérico e a distribuição do agente antimicrobiano nele. Análises posteriores buscarão melhores condições de síntese, novos polímeros e ainda a possibilidade de combinação de agente antimicrobianos visando resultados de inibição de crescimento microbiano.

4.9 Potencial antimicrobiano dos filmes sintetizados

Confirmada a presença e liberação do peptídeo no filme sintetizado, passou-se a investigação do potencial antimicrobiano dos filmes sintetizados. A análise foi feita de dois modos: primeiro investigou-se a inibição do crescimento microbiano em meio líquido pelo filme sintetizado. Buscou-se analisar se a liberação do peptídeo do filme sintetizado era efetiva para inibição do crescimento de *E. coli* a um inóculo inicial de 5×10^5 células.mL⁻¹ em meio de cultura.

A massa dos filmes foram pesadas buscando uma concentração alta de peptídeo a ser dispersa no meio. O material polimérico continha uma proporção de 1,34% em massa de peptídeo em relação ao PMMA. Não é de se esperar que a liberação do peptídeo seja feita de

maneira 100% eficiente, isto é, com todo o peptídeo presente no filme sendo liberado para o meio. Com isso, uma concentração maior de peptídeo no meio deve ser buscada – valor este bem maior que o MIC apresentado pela molécula em testes de inibição de crescimento microbiano. As seguintes massas foram testadas:

Tabela 23: Quantidade de massa de filme pesada e a concentração teórica de peptídeo a ser dispersa no meio. A concentração figura como “teórica” devido ao fato de que a dispersão do peptídeo no meio não ser um processo com 100% de eficiência.

Massa média de filme pesada	Concentração teórica de peptídeo a ser dispersa no meio
3,26 mg	212,03 μ M
6,26 mg	407,16 μ M
9,53 mg	619,84 μ M

Os testes mostraram inibição do crescimento de *E. coli* a partir das diferentes massas de PMMA contendo Bt0. A figura abaixo mostra a avaliação visual de uma placa de 96 poços contendo o sobrenadante retirado após 24 horas de exposição do filme ao meio.

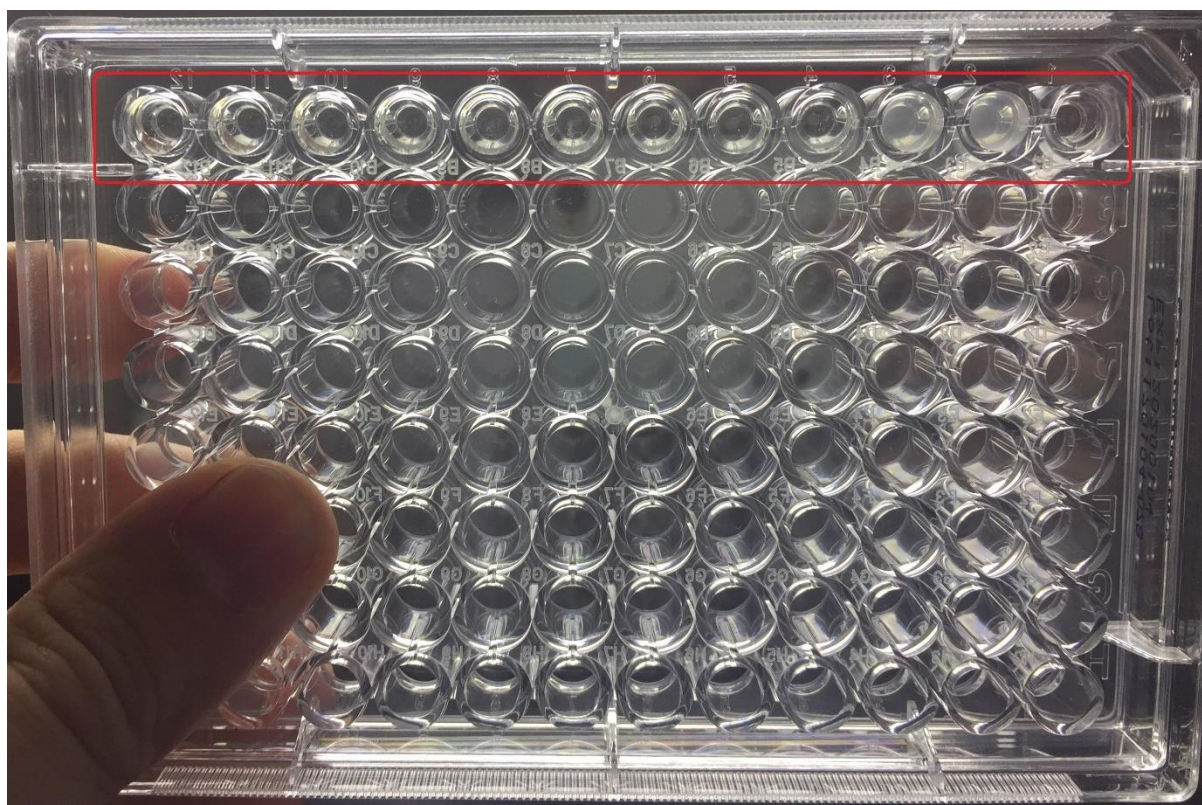


Figura 37: Placa de 96 poços contendo o sobrenadante retirado após 24 horas de exposição do meio de cultura líquido ao filme. O destaque é em vermelho são os poços utilizados para análise. Poços: 1 – Controle com meio sem cultura microbiana; 2 – Controle

com crescimento bacteriano sem filme; 3 – Meio de cultura exposto a um filme sintetizado sem peptídeo; 4 a 12 – meios de cultura expostos a filmes em diferentes concentrações de peptídeos

Tabela 24: Concentrações de filme em cada um dos sobrenadantes da placa de 96 poços. Os poços de 1 a 3 representam controles, conforme apresentado na parte metodológica deste trabalho.

Poços	5,7 e 8	4,10 e 12	6,9 e 11
Massa média	3,26 mg	6,26 mg	9,53 mg
Concentração teórica do peptídeo dispersa no meio	212,03 μ M	407,16 μ M	619, 84 μ M

Por meio de inspeção visual, é possível perceber que não existe turbidez nos poços 1 (que não possui cultura bacteriana) e nos poços de 4 a 12 (onde foram inseridas diferentes massas de filme sintetizado com peptídeo). Assim, pode-se dizer que a liberação de peptídeo no meio foi efetiva o suficiente para inibir o crescimento microbiano, mostrando a efetividade do filme sintetizado.

O segundo teste realizado buscou a determinação de um halo de inibição quando o filme é exposto à uma cultura microbiana em meio MH. As figuras abaixo apresentam os dados obtidos:

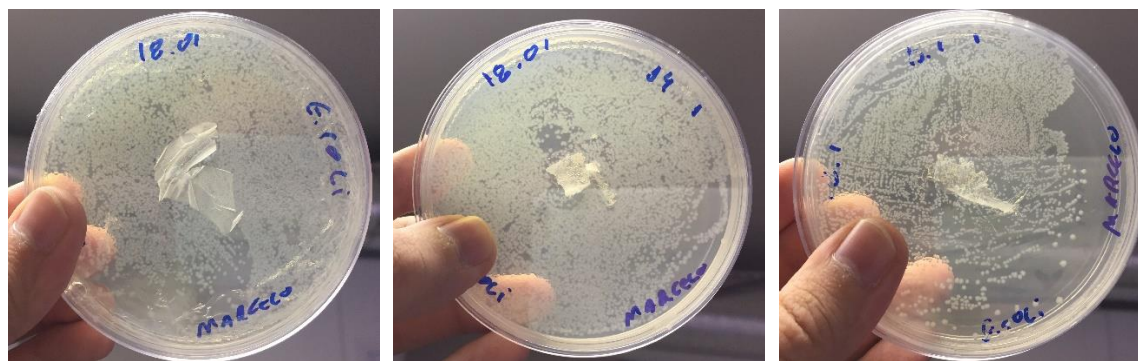


Figura 38: Testes de halo de inibição com a exposição de uma cultura de *E. coli* ao filme de PMMA sintetizado com a presença do peptídeo Bt01. Da esquerda para a direita: 1. Filme sem a presença do peptídeo Bt01; 2 e 3: filmes contendo Bt01 na concentração 1,34% m/m.

Conforme pode ser inferido, não houve formação do halo de inibição para a bactéria *E. coli* em torno do filme. Ao contrário do apresentado em estudos de submersão do filme em meio líquido, em que a inibição de crescimento microbiano foi observada, aparentemente, não houve dispersão suficiente de peptídeo no meio para acarretar na inibição do crescimento e consequente formação do halo.

Os dados apresentados mostram então que existe o potencial antimicrobiano do filme sintetizado quando da imersão do mesmo em meio líquido, não ocorrendo liberação suficiente do peptídeo quando há a exposição superficial em meio de cultura de bactérias contendo ágar. Entendendo que os testes realizados figuram como testes preliminares, é possível determinar a efetividade do filme sintetizado em situações onde o material a ser utilizado fique em contato com o meio e não somente mediante deposição superficial.

5 CONCLUSÕES

Frente ao apresentado acima, é possível determinar o sucesso da proposta de prospecção e síntese de peptídeos antimicrobianos encriptados no genoma das espécies *Bos taurus* e *Gallus gallus* e sua utilização preliminar na síntese de materiais poliméricos para conservação de alimentos.

O método de pesquisa dentro do genoma mostrou-se efetivo, exigindo, entretanto, do analista o estudo aprofundado dos resultados apresentados. Tal método de análise fina mostrou-se efetivo; contudo, exige muito tempo para seleção (muitos possíveis resultados são apresentados). É possível pensar em um processo de retroalimentação do software, de modo a refinar sua pesquisa e diminuir o tempo gasto na análise manual. Entretanto, não se pode negar a efetividade do modo de pesquisa, nem sua inovação quanto a determinação de novas moléculas antimicrobianas. Essa pesquisa posterior é exatamente o que dá a liberdade ao pesquisador de navegar dentro das várias possibilidades associadas a peptídeos antimicrobianos.

O processo de síntese em fase sólida já é um método de síntese muito bem caracterizado no meio acadêmico, porém com alguns percalços envolvendo certas rodadas de acoplamento. Aminoácidos com grandes grupos de proteção exigiram mais de um processo de acoplamento. O mesmo ocorreu quando a cadeia peptídica assumia uma maior extensão. Pode-se buscar o melhoramento do processo de síntese, considerando maiores tempos de reação ou o uso de ultrassom e aquecimento.

As características propostas aos peptídeos selecionados e sintetizados foram confirmadas por meio das técnicas de Dicroísmo Celular (com relação à sua estruturação quando em contato com membranas fosfolipídicas) e por Calorimetria Diferencial de Varredura (quanto à sua interação com membranas fosfolipídicas). A confirmação das características propostas apenas reforça a efetividade do software utilizado para determinação de novos peptídeos antimicrobianos. Mesmo exigindo extensa pesquisa pós-seleção, o software apresentou uma alta taxa de acerto, já que os peptídeos Bt01, Bt02 e Gg01 foram efetivamente antimicrobianos. Características quanto à estruturação secundária foram confirmadas e a interação com modelos de membrana (quesito necessário para atividade antimicrobiana) foram efetivamente confirmados.

Por fim, têm-se que admitir que tais técnicas podem ser muitas mais exploradas em trabalhos futuros. Informações quanto ao grau de interação peptídeo – membrana, constante de associação dentro outros, podem ser obtidos por meio da técnica de dicroísmo circular. A

pesquisa com outros modelos de membrana permitirá melhor entendimento da interação das moléculas sintetizadas com seus alvos, além de permitir situá-las em uma classificação com base neste comportamento frente à técnica de DSC.

A síntese do material polimérico foi efetiva, gerando um filme com dispersão homogênea do peptídeo e com ação antimicrobiana frente culturas de *E. coli*. O modo de preparo do filme, a co-precipitação do PMMA e do peptídeo – é uma maneira simples de gerar um produto viável para objetivo proposto.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Frente aos resultados apresentados neste trabalho, têm-se como perspectivas futuras:

- O estudo aprofundado das características físico-químicas dos peptídeos sintetizados quanto a sua interação com membrana e alvos específicos;
- Testar a efetividade dos filmes sintetizados frente à conservação de alimentos disponíveis comercialmente;
- Buscar o estudo e síntese de filmes utilizando polímeros biodegradáveis, como o polímero de ácido polilático.
- Determinar a concentração inibitória mínima dos peptídeos sintetizados frente a uma maior variedade de microrganismos, incluindo fungos.

7 BIBLIOGRAFIA

- (1) Tawakkal, I. S. M. A.; Cran, M. J.; Miltz, J.; Bigger, S. W. **2014**, 79 (8).
- (2) Li, Y.; Xiang, Q.; Zhang, Q.; Huang, Y.; Su, Z. *Peptides* **2012**, 37 (2), 207–215.
- (3) Htmf, F.; Pushpanathan, M.; Gunasekaran, P.; Rajendhran, J. **2016**, 2013 (2013), 1–23.
- (4) Reddy, K. V. R.; Yedery, R. D.; Aranha, C. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, 24 (6), 536–547.
- (5) Nawrot, R.; Barylski, J.; Nowicki, G.; Broniarczyk, J.; Buchwald, W.; Goździcka-Józefiak, A. *Folia Microbiol. (Praha)*. **2014**, 59 (3), 181–196.
- (6) Pestana-Calsa, M. C.; Ribeiro, I. L. a C.; Calsa, T. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2010**, 11 (3), 199–209.
- (7) Zasloff, M. *Nature* **2002**, 415 (0028–0836 (Print)), 389–395.
- (8) Lehrer, R. I.; Ganz, T. *Curr. Opin Immunol.* **1999**, 11 (1), 23–27.
- (9) Wiesner, J.; Vilcinskas, A. *Virulence* **2010**, 1 (5), 440–464.
- (10) Oman, T. J.; Donk, W. A. Van Der. *ACS Chem. Biol.* **2009**, 4 (xx), 65–74.
- (11) Brand, G. D.; Magalhães, M. T. Q.; Tinoco, M. L. P.; Aragão, F. J. L.; Nicoli, J.; Kelly, S. M.; Cooper, A.; Bloch, C. *PLoS One* **2012**, 7 (9).
- (12) Pasupuleti, M.; Schmidtchen, A.; Malmsten, M. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2012**, 32 (2), 143–171.
- (13) Génie, L. De; Pascal, C. B.; Landais, A. *Food Technol. Biotechnol.* **2006**, 44 (2), 211–220.
- (14) Gupta, R.; Beg, Q.; Lorenz, P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 59 (1), 15–32.
- (15) Pearson, C. S.; Kloos, Z.; Murray, B.; Tabe, E.; Gupta, M.; Kwak, J. H.; Karande, P.; McDonough, K. A.; Belfort, G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, 60 (5), 2757–2764.
- (16) Tossi, A.; Sandri, L.; Giangaspero, A. *Biopolym. (Peptide Sci.* **2000**, 55, 4–30.
- (17) Yin, L. M.; Edwards, M. A.; Li, J.; Yip, C. M.; Deber, C. M. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287 (10), 7738–7745.
- (18) Brand, G. D.; Ramada, M. H. S.; Genaro-Mattos, T. C.; Bloch, C. *Sci. Rep.* **2018**, 8 (1), 1194.
- (19) Oren, Z.; Shai, Y. *Biopolymers* **1998**, 47 (6), 451–463.
- (20) Fjell, C. D.; Hiss, J. A.; Hancock, R. E. W.; Schneider, G. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, 11 (1), 37–51.

- (21) Eisenberg, D.; Weiss, R. .; Terwilliger, C., N. P. *Nature* **1982**, 299 (23), 371–375.
- (22) Bigelow, C. C. *J. Theor. Biol.* **1967**, 16 (2), 187–211.
- (23) Mardirossian, M.; Grzela, R.; Giglione, C.; Meinel, T.; Gennaro, R.; Mergaert, P.; Scocchi, M. *Chem. Biol.* **2014**, 21 (12), 1639–1647.
- (24) LaRock, C. N.; Nizet, V. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2015**, 1848 (11), 3047–3054.
- (25) Ernst, C. M.; Staubitz, P.; Mishra, N. N.; Yang, S. J.; Hornig, G.; Kalbacher, H.; Bayer, A. S.; Kraus, D.; Peschel, A. *PLoS Pathog.* **2009**, 5 (11), 1–9.
- (26) Sherman, P. J.; Jackway, R. J.; Gehman, J. D.; Praporski, S.; McCubbin, G. A.; Mechler, A.; Martin, L. L.; Separovic, F.; Bowie, J. H. *Biochemistry* **2009**, 48 (50), 11892–11901.
- (27) Corrêa, D. H. A.; Ramos, C. H. I. *African J. Biochem. Res.* **2009**, 3 (5), 164–173.
- (28) Greenfield, N. J. **2007**.
- (29) McElhaney, R. N. *Chem. Phys. Lipids* **1982**, 30 (2–3), 229–259.
- (30) Papahadjopoulos, D.; Moscarello, M.; Eylar, E. H.; Isac, T. *BBA - Biomembr.* **1975**, 401 (3), 317–335.
- (31) Ramada, M. H. S.; Brand, G. D.; Abrão, F. Y.; Oliveira, M.; Filho, J. L. C.; Galbieri, R.; Gramacho, K. P.; Prates, M. V.; Bloch, C. *Sci. Rep.* **2017**, 7 (1), 1–14.
- (32) Suppakul, P.; Miltz, J.; Sonneveld, K.; Bigger, S. W. *J. Food Sci.* **2003**, 68 (2), 408–420.
- (33) Zhou, G. H.; Xu, X. L.; Liu, Y. *Meat Sci.* **2010**, 86 (1), 119–128.
- (34) Scallan, E.; Hoekstra, R. M.; Angulo, F. J.; Tauxe, R. V.; Widdowson, M. A.; Roy, S. L.; Jones, J. L.; Griffin, P. M. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, 17 (1), 7–15.
- (35) Mathur, S.; Singh, R. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, 105 (3), 281–295.
- (36) Perreten, V.; Schwarz, F.; Cresta, L.; Boeglin, M.; Dasen, G.; Teuber, M. *Nature* **1997**, 389 (6653), 801–802.
- (37) Oms-Oliu, G.; Martín-Belloso, O.; Soliva-Fortuny, R. *Food Bioprocess Technol.* **2010**, 3 (1), 13–23.
- (38) Ait-Ouazzou, A.; Cherrat, L.; Espina, L.; Lorán, S.; Rota, C.; Pagán, R. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2011**, 12 (3), 320–329.
- (39) Appendini, P.; Hotchkiss, J. H. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2002**, 3 (2), 113–126.
- (40) Gálvez, A.; Abriouel, H.; Benomar, N.; Lucas, R. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, 21 (2), 142–148.

- (41) Espitia, P. J. P.; Soares, N. de F. F.; Coimbra, J. S. dos R.; de Andrade, N. J.; Cruz, R. S.; Medeiros, E. A. A. *Food Bioprocess Technol.* **2012**, *5* (5), 1447–1464.
- (42) Vermeiren, L.; Devlieghere, F.; Van Beest, M.; De Kruijf, N.; Debevere, J. *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, *10* (3), 77–86.
- (43) Tiwari, B. K.; Valdramidis, V. P.; O'Donnell, C. P.; Muthukumarappan, K.; Bourke, P.; Cullen, P. J. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (14), 5987–6000.
- (44) Sobczak, M.; Debek, C.; Oledzka, E.; Kozłowski, R. *Molecules* **2013**, *18* (11), 14122–14137.
- (45) Lyutakov, O.; Goncharova, I.; Rimpelova, S.; Kolarova, K.; Svanda, J.; Svorcik, V. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *49*, 534–540.
- (46) Faber, C.; Stallmann, H. P.; Lyaruu, D. M.; de Blicck, J. M. A.; Bervoets, T. J. M.; van Nieuw Amerongen, A.; Wuisman, P. I. J. M. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51* (6), 1359–1364.
- (47) Nelson, D. L.; M. Cox, M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, 6th ed.; Artmed, 2014.
- (48) Chan, W.; White, P. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*; 2000.
- (49) El-Faham, A. *Chem. Rev.* **2011**, 6557–6602.
- (50) Benoiton, N. L.; Group, F. *Chemistry of Peptide Synthesis*; 2006.
- (51) Suckau, D.; Resemann, A.; Schuerenberg, M.; Hufnagel, P.; Franzen, J.; Holle, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376* (7), 952–965.
- (52) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition*; 2012; Vol. 32.
- (53) Brand, G. D.; Krause, F. C.; Silva, L. P.; Leite, J. R. S. A.; Melo, J. A. T.; Prates, M. V.; Pesquero, J. B.; Santos, E. L.; Nakaie, C. R.; Costa-Neto, C. M.; Bloch, C. *Peptides* **2006**, *27* (9), 2137–2146.
- (54) Hua, K. T.; Tan, C. T.; Johansson, G.; Lee, J. M.; Yang, P. W.; Lu, H. Y.; Chen, C. K.; Su, J. L.; Chen, P. B.; Wu, Y. L.; Chi, C. C.; Kao, H. J.; Shih, H. J.; Chen, M. W.; Chien, M. H.; Chen, P. S.; Lee, W. J.; Cheng, T. Y.; Rosenberger, G.; Chai, C. Y.; Yang, C. J.; Huang, M. S.; Lai, T. C.; Chou, T. Y.; Hsiao, M.; Kuo, M. L. *Cancer Cell* **2011**, *19* (2), 218–231.
- (55) Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1751*, 119–139.
- (56) Moffitt, W. *J. Chem. Phys.* **1956**, *25* (3), 467–478.
- (57) Roth, S.; Wadhvani, P.; Afonin, S.; Kanithasen, N.; Strandberg, E. **2008**, 95 (October), 3872–3881.

- (58) Marcotte, I.; Wegener, K. L.; Lam, Y. H.; Chia, B. C. S.; De Planque, M. R. R.;
Bowie, J. H.; Auger, M.; Separovic, F. *Chem. Phys. Lipids* **2003**, *122* (1–2), 107–120.