

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

JESSICA AUDREY FEIJÓ CORRÊA

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DE
PEPTÍDEOS ANFIPÁTICOS SOBRE MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA
ALIMENTAR**

(Heterologous expression and evaluation of inhibitory potential of amphipathic peptides against foodborne microorganisms)

CURITIBA

2018

JESSICA AUDREY FEIJÓ CORRÊA

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DE
PEPTÍDEOS ANFIPÁTICOS SOBRE MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA
ALIMENTAR**

(Heterologous expression and evaluation of inhibitory potential of amphipathic peptides against foodborne microorganisms)

Dissertação oriunda do programa institucional PIBIC Master *Combined Degree*, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Bittencourt Luciano

CURITIBA

2018

**ATA Nº 0122 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA JESSICA AUDREY FEIJÓ CORRÊA**

Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezoito, às 14 horas e 30 minutos, realizou-se na sala de Pós 06, 2º andar, Bloco Amarelo, Escola de Ciências da Vida, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Campus de Curitiba, Rua Imaculada Conceição, nº 1155, Prado Velho – Curitiba – PR, a sessão pública de defesa da dissertação da mestranda Jessica Audrey Feijó Corrêa, intitulada: **“EXPRESSÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DE PEPTÍDEOS ANFIPÁTICOS SOBRE MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA ALIMENTAR”**. A mestranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor orientador e Presidente da banca, Dr. Fernando Bittencourt Luciano (PUCPR), auxiliado pelos Professores Doutores Vanessa Santos Sotomaior (PUCPR) e Gerson Nakazato (UEL). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que nos termos do Artigo 53 do Regulamento deste Programa de Pós-Graduação, foi considerada aprovada.

Prof. Dr. Fernando Bittencourt Luciano (Presidente)

Assinatura _____

Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior (PUCPR)

Assinatura _____

Prof. Dr. Gerson Nakazato (UEL)

Assinatura _____

Proclamado o resultado, o Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 28 de fevereiro de 2018.

Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Caroline Nocera Bertton
Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
ABREVIACÕES	v
AGRADECIMENTOS	vii
FORMATO DA DISSERTAÇÃO	ix
RESUMO GERAL	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 2	4
Resumo	4
Abstract	5
1. Introdução	5
2. Material e métodos	7
2.1 Reagentes, plasmídeos e microrganismos	7
2.2 Atribuição de competência a <i>E. coli</i> S17-1	9
2.2.1 Verificação de cálcio-competência adquirida	9
2.3 Propagação de plasmídeos em S17-1 competente	10
2.4 Transformação em <i>E. coli</i> Rosetta™(DE3)pLysS	10
2.5 Indução da expressão e verificação	11
3. Resultados e discussão	12
4. Conclusão	16
Referências	17
CAPÍTULO 3	21
Resumo	21

Abstract	22
1. Introdução	22
2. Material e métodos	23
2.1 Peptídeos	23
2.2 Microrganismos e meios de cultura	24
2.3 Determinação das concentrações inibitórias mínimas frente a bactérias	25
2.4 Determinação das concentrações inibitórias mínimas frente a fungos ...	25
3. Resultados e discussão	26
4. Conclusão.....	28
Referências.....	28
 CAPÍTULO 4.....	 31
CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
REFERÊNCIAS.....	32
 ANEXO I.....	 34
Diretrizes para Autores.....	34
Tipos de trabalhos aceitos	34
Preparação dos manuscritos	35
Artigos.....	36
Condições para submissão.....	38
Declaração de Direito Autoral	39
Política de Privacidade	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do plasmídeo pET-30a(+). Indicação dos sítios de clonagem e regiões reguladoras (figura retirada de GenScript) ..	7
Figura 2. Sequência nucleotídica inserida no plasmídeo. Cada letra representa um nucleotídeo (A – adenina; T – timina; G – guanina; C - citosina)	8
Figura 3. Culturas obtidas após procedimento de transformação. a: Placa seletiva (LB-L + canamicina) da cultura de S17-1 competente. b: Placa não-seletiva (ausência de antibióticos) da cultura de S17-1 competente. c: Placa seletiva da cultura de S17-1 não-competente. d: Placa não-seletiva da cultura de S17-1 não-competente	12
Figura 4. Culturas obtidas após procedimento de transformação em células Rosetta. a: Placa seletiva (LB-L + canamicina) da cultura de células Rosetta transformadas com o plasmídeo teste. b: Placa não-seletiva (sem antibióticos) da cultura de células Rosetta transformadas com o plasmídeo teste. c: Placa seletiva (LB-L + canamicina) da cultura de células Rosetta transformadas com o plasmídeo pET-30a(+) contendo o inserto. d: Placa não-seletiva (sem antibióticos) da cultura de células Rosetta transformadas com o plasmídeo pET-30a(+) contendo o inserto.	13
Figura 5. Matrizes de gel obtidos por eletroforese vertical de proteínas. a,d: Marcadores moleculares. Os números ao lado de a indicam a massa em kDa correspondente b,c: Extratos do cultivo de Rosetta transformadas com o plasmídeo pET-30a(+), sendo b induzido com IPTG e c não-induzido. e,f: Extratos do cultivo de Rosetta transformadas com o plasmídeo teste, sendo e induzido com IPTG e f não-induzido. A seta indica a posição do multímero peptídico em tandem.	14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peptídeos derivados de proteínas de soro de leite bovino	24
---	-----------

ABREVIATÖES

RuBisCO: Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase

CIM: Concentraçãõ inibitória mínima

MIC: Minimum inhibitory concentration

PAM: Peptídeo antimicrobiano

His-tag: etiqueta de poli-histidina

Rosetta: *Escherichia coli* Rosetta™(DE3)pLysS

LB-L: Lysogeny Broth Lennox

DO₆₀₀: Densidade  tica medida sob comprimento de onda de 600 nm

IPTG: Isopropil- -D-1-tiogalactopiranosida

PBS: tampão fosfato-salino

IMAC: Immobilized Metal-Affinity Chromatography

LC-MS/MS: cromatografia líquida associada à espectrometria de massa em tandem

P16: peptídeo de sequência HQPHQPLPPTVMFPPQ derivado de soro de leite

P6: peptídeo de sequência KIPAVF derivado de soro de leite

MH: M ueller-Hinton

TSB: Caldo Triptona de Soja

“Muitas hipóteses propostas por cientistas bem como por não-cientistas demonstraram ser erradas, mas a ciência é um empreendimento autocorretivo. Para serem aceitas, todas as ideias novas devem suplantam padrões rigorosos de evidência. [...] A ciência é gerada por e devotada a uma livre inquisição: qualquer hipótese, não importa quão estranha ela seja, merece ser considerada em seu mérito.” [...]

Carl Sagan

Cosmos. 2 ed. Rio de Janeiro: Francisco Alves; 1982. p.91.

AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, por todas as oportunidades oferecidas – isenção na graduação, bolsas de iniciação científica, bolsa de mestrado, mobilidade internacional, etc. O que ouvi na acolhida aos calouros em 2013, de que receberia diplomas de bom profissional e de bom cidadão, fez jus à realidade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Bittencourt Luciano, por todos os ensinamentos, incentivos e, principalmente, pela confiança em mim depositada. Se um dia eu me tornar metade do profissional que o senhor é, estarei certamente realizada.

A todos os professores, mestres e funcionários das instituições pelas quais passei. Que Deus abençoe a profissão de vocês, tão necessária, porém, infelizmente, tão desvalorizada no país nos dias de hoje. Destaco aqui o Prof. André Bittencourt Lorusso que, mesmo a 8 mil quilômetros de distância, prontamente me auxiliou no entendimento de alguns termos e técnicas de Biologia Molecular; o Prof. Giuseppe Meca, pela assistência no projeto; as Profs. Karen Sumire Kubo, Sandra Regina Cabel, e Maria Cristina Vasconcellos, pelo carinho e preocupação; e as laboratoristas Samara Moraes, Thais Ferreira, Carol Bugay, e Anne LeLacheur, por toda a ajuda.

Às minhas melhores amigas Anne Schoch e Gabriela Maia, por aturarem as crises muitas vezes diárias, e principalmente por me ajudarem a rir nos (e dos) momentos difíceis. Amo vocês para a vida.

Ao meu amigo e colega Tiago Nazareth, meu “pai” no laboratório, por me ensinar e inspirar a ser uma pessoa e profissional melhor todos os dias. Que Deus te ilumine (e te “projete”) nesta nova etapa da sua vida e ajude a alcançar tudo que você almeja e certamente merece, futuro doutor.

Aos meus amigos e colegas de pesquisa Alberto Evangelista, Anne Schoch, Bruno Tracz, Danilo Crippa, Jason Bueno, Karla Bocate, Keliani Bordin, Lucas Ferreira, Márcia Wambier e Paloma Orso, por todas as risadas, ajuda no laboratório e companheirismo. Vocês são pessoas e pesquisadores incríveis.

Às amigas que fiz durante a mobilidade internacional, a agora PhD Milaine Fernandes e a senhora-eternamente-jovem Jane MacCallum. Vocês foram como uma

família para mim no Canadá e me apoiaram muito – mesmo sem ter noção do quanto. Saudades que não cabem no peito.

À Dra. Márcia Bandeira, por ter me salvo há anos atrás e por continuar me zelando – não somente física, mas mentalmente. Tenho uma dívida eterna com a senhora.

À minha mãe Fany, por todas as noites mal dormidas se preocupando com minha saúde e bem-estar, por instigar em mim desde cedo o gosto pela leitura e pelos estudos, e por comandar o lar com mãos de ferro e coração de ouro, até nos momentos mais difíceis. Eu te amo ao infinito e minha gratidão nunca caberia em palavras.

Ao meu pai Alcides, por toda a confiança e orgulho em mim e de mim, e pelos sacrifícios, que foram e continuam sendo tantos.

Ao meu irmão Ricardo, pela parceria. Você é um “estorvinho” às vezes – típico de irmão –, mas eu realmente te desejo o melhor e agradeço o carinho.

Aos guias espirituais que me acompanham, pela proteção e principalmente pela paciência. Apesar de nos momentos de fraqueza os pôr em dúvida, sigo tendo motivos para acreditar e inúmeras bênçãos para agradecer.

Em suma, agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente, tornaram essa pesquisa possível. Muito obrigada!

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos. O *Capítulo 1* apresenta uma introdução geral, a contextualização do tema, o estado da arte e os objetivos da pesquisa. O *Capítulo 2* relata os experimentos de uma primeira abordagem deste projeto, que consistiu no estabelecimento de um sistema bacteriano para expressão de peptídeos anfipáticos derivados da enzima RuBisCO de soja. O *Capítulo 3* relata os experimentos da segunda abordagem, que buscou avaliar a atividade antimicrobiana de peptídeos anfipáticos de cadeia curta derivados de proteínas de soro de leite. O *Capítulo 4* completa esta dissertação com conclusões e considerações finais deste trabalho.

RESUMO GERAL

A demanda por alternativas naturais às substâncias antimicrobianas tradicionalmente utilizadas na indústria de alimentos vem aumentando. A aplicação de peptídeos antimicrobianos se mostra como uma abordagem eficiente para este fim, devido, sobretudo ao forte caráter anfipático dessas moléculas, responsável por interações com membranas das células que podem levar a inibição do crescimento e de funções e à morte de microrganismos. A pesquisa de peptídeos pode ser realizada *in silico* em sequências proteicas, sendo o potencial antimicrobiano da substância posteriormente verificado através de ensaios experimentais. Estudos *in silico* com peptídeos de cadeia curta têm obtido resultados promissores quanto à capacidade antimicrobiana. Contudo, os métodos de obtenção desses peptídeos – que se baseiam atualmente em hidrólise química ou enzimática de matrizes proteicas – não são economicamente viáveis em escala industrial. Como matriz de obtenção desses peptídeos, destacam-se o soro de leite e a biomassa vegetal, por seu baixo custo e pela geração de extratos com alta atividade antimicrobiana. O objetivo do presente estudo foi estabelecer um sistema bacteriano de expressão heteróloga de peptídeos derivados da enzima vegetal ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO), visando viabilizar um método viável para aplicação industrial. Paralelamente, a atividade antimicrobiana de peptídeos anfipáticos derivados de proteínas do soro de leite foi avaliada frente a importantes microrganismos patogênicos e toxigênicos de interesse da indústria de alimentos. Para isso, plasmídeos contendo o inserto codificante da sequência peptídica GSIKAFKEATKVDKVVLTALVPR derivada da RuBisCO foram propagados. Esse material foi extraído e transformado em células de alto rendimento *Escherichia coli* Rosetta™(DE3)pLysS, e a produção dos peptídeos foi comprovada, confirmando o estabelecimento de um sistema de expressão viável. Na sequência, os peptídeos HQPHQPLPPTVMFPPQ e KIPAVF, derivados de soro de leite, foram avaliados frente a bactérias patogênicas e fungos micotoxigênicos. Contudo, as concentrações inibitórias mínimas (CIMS) não puderam ser determinadas em doses de até 5000 mg.L⁻¹, divergindo das previsões *in silico* obtidas. Concentrações superiores inviabilizariam a aplicação industrial devido aos custos de obtenção dos compostos. Diferentes peptídeos, contudo, poderão ser testados com a mesma finalidade.

Palavras-chave: alternativas antimicrobianas, sistema de expressão, soro de leite, RuBisCO.

ABSTRACT

The demand for natural alternatives to antimicrobial substances traditionally used in the food industry has been increasing. Application of antimicrobial peptides represents an interesting approach for this purpose, mainly due to the strong amphipathic character of these molecules, which is responsible for interactions with cell membranes that may lead to growth and metabolism inhibition and death of microorganisms. The search for these peptides can be performed *in silico* using protein sequences, and the antimicrobial potential is subsequently verified by experimental analyses. *In silico* studies with short chain peptides have found promising results regarding their antimicrobial capacity. However, production of such peptides – currently based on chemical or enzymatic hydrolysis of protein matrices – are still inapplicable at industrial scale. As matrices for this production, whey and plant biomass show great interest due to their low cost and high antimicrobial activity of the generated extracts. The objective of the present study was to establish a bacterial system for the heterologous expression of peptides derived from the simulated *in silico* proteolysis of the plant enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (RuBisCO), in order to obtain a viable method for industrial application. In parallel, the antimicrobial activity of amphipathic peptides derived from whey proteins was evaluated against pathogenic and toxigenic microorganisms of interest to the food industry. Hereby, plasmids containing the coding insert of the peptidic sequence GSIKAFKEATKVDKVVVLWTALVPR derived from RuBisCO were cloned into a competent strain. The material was extracted and transformed into high-efficiency *Escherichia coli* Rosetta™(DE3)pLysS cells. Peptide production was obtained, confirming the establishment of a viable expression system. Subsequently, whey-derived peptides HQPHQPLPPTVMFPPQ and KIPAVF were evaluated against pathogenic bacteria and mycotoxigenic fungi. However, the minimum inhibitory concentrations (MICs) could not be determined at doses up to 5000 mg.L⁻¹, unlike the *in silico* predictions. Higher concentrations would make industrial application unviable due to compounds obtainment costs. Nevertheless, different peptides can be further tested for the same purpose.

Keywords: antimicrobial substitutes, expression system, whey, RuBisCO.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são pequenos compostos formados por aminoácidos que apresentam atividade biológica, usualmente compondo a primeira linha de defesa de diversos organismos (Brogden, 2005). A atividade antimicrobiana pode ser explorada pelo próprio organismo produtor do peptídeo em suas funções imunes inatas ou, a partir do isolamento dessas moléculas, na aplicação em diferentes ramos da indústria (Keymanesh, Soltani e Sardari, 2009).

Basicamente, essas moléculas se combinam com componentes de membranas e/ou citoplasmáticos dos microrganismos, alterando suas funções celulares, o que pode levar à morte destes ou à alteração de seus metabolismos. Isso é possibilitado por diversas características dessas moléculas, incluindo suas composições em aminoácidos, anfipaticidade, cargas e tamanho reduzido, o que facilita a inserção deles em bicamadas lipídicas e consequente formação de poros e extravasamento celular (Brogden, 2005; Epand e Vogel, 1999). Embora tal mecanismo geral seja altamente difundido, vem sendo proposto que a formação de poros não é o único mecanismo de ação dos PAMs. Um número cada vez maior de observações sustenta que esses peptídeos também podem inibir os processos de síntese de parede celular, de ácidos nucleicos e de proteínas, além de inibir diversas outras funções enzimáticas das células-alvo (Brogden, 2005; Hale e Hancock, 2007).

O estudo de PAMs apresenta crescente relevância no meio científico e importância na indústria, especialmente devido à busca por alternativas antimicrobianas naturais, visando a substituição de substâncias convencionalmente utilizadas (Keymanesh, Soltani e Sardari, 2009). A utilização de peptídeos crípticos de proteínas alimentares tem grande potencial de aplicação com esse fim, já que são considerados como sendo de grau alimentício (Korhonen, 2009). Muitos estudos com peptídeos crípticos vêm sendo desenvolvidos na área da nutraceutica, visto que eles podem ser gerados da proteólise promovida por enzimas específicas durante a digestão alimentar, por fermentação microbiana, ou por tratamentos por protease exógena, originando compostos com atividade anti-hipertensiva, antioxidativa (Sanjukta e Rai, 2016), antitumoral, hipocolesterolêmica (Pal, Vij e Hati, 2014),

neuroprotetiva, hipoglicêmica e/ou anti-inflamatória (Udenigwe e Aluko, 2012). Contudo, estudos aplicados à área de microbiologia são escassos, e ainda não há um entendimento claro dos mecanismos de ação desses peptídeos e dos efeitos obtidos com sua aplicação em alimentos (Udenigwe *et al.*, 2017).

A atividade antimicrobiana de peptídeos pode ser verificada *in silico* através de ferramentas de bioinformática (Udenigwe, 2014) que podem, por exemplo, analisar a sequência de proteínas alimentares em busca de peptídeos crípticos que adquiram esse potencial quando liberados da cadeia que os comporta (Udenigwe e Aluko, 2012). Essa foi a estratégia de Udenigwe, Gong e Wu (2013), que analisaram *in silico* a sequência proteica da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO) de cereais através das ferramentas de bioinformática ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2003), BIOPEP (Minkiewicz *et al.*, 2008) e Bioware (Mooney *et al.*, 2012). Os resultados obtidos mostraram um alto potencial da enzima gerar PAMs por hidrólise, relacionado ao forte caráter anfipático dos fragmentos liberados.

Além da RuBisCO, lisados proteicos de soro de leite apresentam efeitos antimicrobianos promissores (Abdel-Hamid *et al.*, 2016; Demers-Mathieu *et al.*, 2013; Osman *et al.*, 2016; Théolier *et al.*, 2013), sendo que análises preliminares *in silico* (dados não publicados) relacionam essas propriedades também ao caráter anfipático das porções peptídicas liberadas enzimaticamente. Dados como esses exibem a potencialidade de aplicação de peptídeos de cadeia curta, derivados de proteínas alimentares, na indústria de alimentos, a serem aplicados como aditivos, coadjuvantes de tecnologia ou compondo embalagens bioativas (Appendini e Hotchkiss, 2002; Brasil, 1997).

O objetivo do presente estudo foi estabelecer um sistema bacteriano para expressão de repetições em tandem de peptídeos anfipáticos derivados da RuBisCO proveniente de soja, visando futura produção voltada à aplicação industrial. A escolha desta proteína deve-se – além do fato de esta ser considerada a mais abundante do planeta – a resultados promissores obtidos a partir de análises por bioinformática (Udenigwe, Gong e Wu, 2013; Udenigwe *et al.*, 2017). Além disso, foram também avaliados *in vitro* a atividade antimicrobiana de dois peptídeos anfipáticos de cadeia curta (de 6 e 16 aminoácidos) derivados das proteínas beta-lactoglobulina e beta-caseína presentes em soro de leite bovino contra importantes patógenos e contaminantes alimentares de interesse da indústria.

Desta forma, as hipóteses que este estudo propõe são que, primeiro, é possível estabelecer um sistema bacteriano de expressão de peptídeos industrialmente viável, e, segundo, que peptídeos derivados de proteínas do soro de leite possuem atividade antimicrobiana embasando suas aplicações na indústria de alimentos.

CAPÍTULO 2

(Artigo científico a ser submetido para publicação na Revista Acadêmica: Ciência Animal)

Estabelecimento de sistema bacteriano de expressão de peptídeos derivados da enzima vegetal RuBisCO

Bacterial expression system establishment for peptides derived from the vegetal enzyme RuBisCO

Resumo

O objetivo do presente estudo foi de estabelecer um sistema bacteriano de expressão de peptídeos derivados da proteólise simulada *in silico* da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO) proveniente de soja, visando viabilizar um método sustentável de produção dessas moléculas para futura aplicação industrial. Inicialmente foi conferida à cepa *Escherichia coli* S17-1 cálcio-competência para propagação do plasmídeo de expressão pET-30a(+) contendo o inserto codificante da sequência peptídica GSIKAFKEATKVDKVVVLWTALVPR. Após extração de DNA plasmidial, o material foi transformado em células de alto rendimento *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS. As células Rosetta portando o plasmídeo de expressão foram induzidas e a produção dos peptídeos foi verificada através de eletroforese em gel vertical, confirmando o estabelecimento de um sistema de expressão viável para peptídeos heterólogos. Assim, a produção em maior escala de peptídeos derivados de RuBisCO – associando-se futuramente etapas de purificação e ativação – torna-se possível. Além disso, o método aqui estabelecido pode também ser aplicado utilizando diferentes sequências peptídicas com atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Sistema de expressão. Alternativas antimicrobianas. Transformação.

Abstract

The objective of this research was to establish a bacterial expression system for peptides derived from the *in silico* simulated proteolysis of the enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from soy, aiming to make feasible a sustainable method of production of these molecules for future industrial application. Firstly, the *Escherichia coli* S17-1 strain was made calcium-competent for the propagation of the expression plasmid pET-30a(+) carrying the coding insert for the peptide sequence GSIKAFKEATKVDKVVVLWTALVPR. After plasmid DNA extraction, the collected material was transformed into high-efficient cells *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS. Rosetta cells carrying the expression plasmid were then induced and the peptide production was verified through vertical gel electrophoresis, confirming the establishment of a viable expression system for heterologous peptides. Thus, the larger scale production of RuBisCO-derived peptides – along with the future steps of purification and activation – becomes possible. In addition, the method set forth herein may also be applied for different peptidic sequences with antimicrobial activity.

Keywords: Expression system. Antimicrobial alternatives. Transformation.

1. Introdução

A busca por alternativas naturais para substâncias antimicrobianas tem aumentado consideravelmente visto a crescente preocupação com o uso indiscriminado de produtos sintéticos. Além de uma crescente parcela da sociedade manifestar objeção ao consumo de fórmulas contendo essas substâncias (Nielsen Europe, 2015), muitos microrganismos têm se tornado resistentes a compostos tradicionalmente utilizados (Hyldgaard *et al.*, 2012), sendo que essa situação é considerada um dos maiores desafios na saúde pública e na indústria mundial nos dias de hoje (Luepke *et al.*, 2017).

A indústria de alimentos utiliza substâncias antimicrobianas para evitar contaminação dos produtos e prolongar sua vida de prateleira. Diferentes alternativas naturais para aplicação em alimentos vêm sendo estudadas e aplicadas, tais como óleos essenciais (Calo *et al.*, 2015), componentes de óleos essenciais (Lopes *et al.*, 2017), extratos vegetais (Abdollahzadeh *et al.*, 2014), ácidos fenólicos (Meira *et al.*,

2017), bacteriocinas (Johnson *et al.*, 2017), bem como enzimas e peptídeos obtidos de fontes alimentares, tais como a lisozima, obtida do ovo, e lactoferrina, obtida do leite (Pellegrini, 2003; Udenigwe e Aluko, 2012).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) estão amplamente distribuídos na natureza e apresentam relativa estabilidade quando comparados a outras moléculas antimicrobianas, tal como os óleos essenciais voláteis (Calo *et al.*, 2015; Rigotti *et al.*, 2017). Quando comparados entre si, os PAMs de cadeia curta se destacam por apresentarem maior estabilidade (Udenigwe e Aluko, 2012). A atividade antimicrobiana de peptídeos de cadeia curta pode ser pesquisada *in silico* através de ferramentas de bioinformática que avaliam a estrutura primária de uma proteína-origem (Udenigwe, 2014). Mais especificamente, são verificados os potenciais de bioatividade de peptídeos crípticos contidos na sequência da proteína, indicando a possibilidade de passarem a apresentar propriedades diferenciadas após liberados. Essa avaliação pode ser baseada em prováveis reações proteolíticas e/ou interações entre aminoácidos da sequência que o programa simula, ou em comparações com banco de dados, variando de acordo com o *software* utilizado (Udenigwe, 2014; Udenigwe e Aluko, 2012).

Udenigwe *et al.* (2013), utilizando as ferramentas de bioinformática ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2003), BIOPEP (Minkiewicz *et al.*, 2008) e Bioware (Mooney *et al.*, 2012), avaliaram as subunidades da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO) de cereais, visando verificar *in silico* a bioatividade de peptídeos obtidos por digestão proteolítica simulada. Os resultados foram altamente promissores, indicando alta bioatividade (>90%) dos peptídeos derivados das subunidades da enzima, especificamente relacionada ao forte caráter anfipático desses fragmentos. Essa característica confere função antimicrobiana a inúmeros peptídeos já avaliados *in vitro* (Oren e Shai, 1998; Tossi *et al.*, 2000), uma vez que permite à molécula interagir com a membrana da célula alvo, causando desestabilização, extravasamento e conseqüente morte (Pellegrini, 2003).

O presente estudo objetivou estabelecer um sistema bacteriano para expressão de peptídeos com potencial antimicrobiano – verificado previamente *in vitro* – derivados da RuBisCO de soja (*Glycine max* L.), visando futura produção voltada à aplicação industrial.

2. Material e métodos

2.1 Reagentes, plasmídeos e microrganismos

O plasmídeo pET-30a(+) (Figura 1) para expressão foi adquirido da GenScript Inc. (Piscataway, NJ) já contendo 12 repetições em tandem da sequência codificadora do peptídeo críptico da RuBisCO GSIKAFKEATKVDKVVVLWTALVPR (Figura 2, inserto genericamente denominado Soy_IPS_12) – clonadas em BamHI / EcoRI – seguidas da etiqueta de poli-histidina (His-tag).

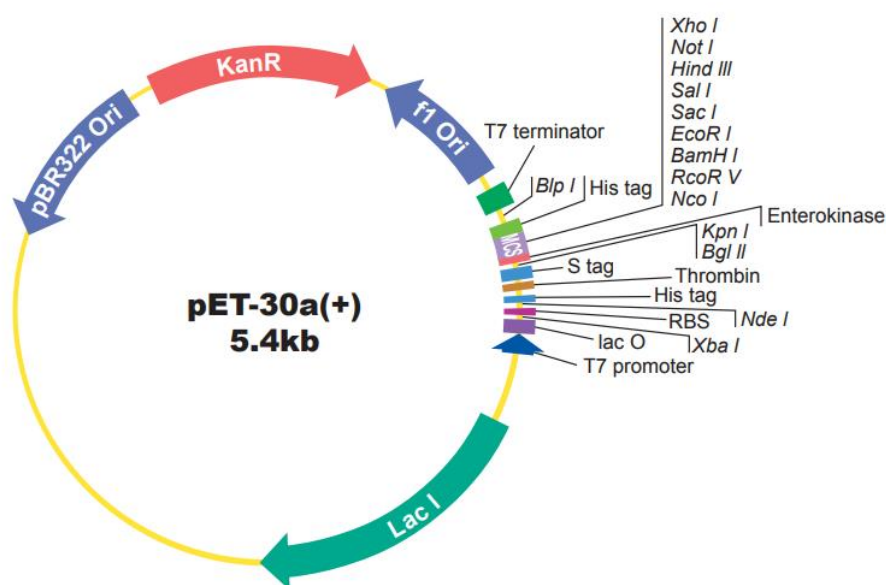


Figura 1. Representação do plasmídeo pET-30a(+). Indicação dos sítios de clonagem e regiões reguladoras (figura retirada de GenScript, s.d.).

Inserto: Soy_IPS_12, Comprimento: 933 pb, Vetor pET-30a(+)

Início: GGATCC,

Sequência:

```
CTGGTTCCGCGTGGTAGCATCAAGGCGTTCAAAGAGGCGACCAAGGTGGATAAAAGTTGTTGTTCTGTGGAC
CGCGCTGGTGCCGCGTGGTAGCATTAAAGCGTTTAAAGAGGCGACCAAAGTTGACAAAAGTGGTGGTTTTAT
GGACTGCGCTGGTTCCGCGTGGCAGCATTAAAGGCGTTTAAAGAAGCGACCAAAGTTGACAAGGTTGTGGTC
TTATGGACCGCGTTAGTGCCGCGTGGTAGCATTAAAGCTTTTAAAGAGGCGACCAAGGTTGACAAAAGTGGT
CGTTTTATGGACCGCTTTAGTGCCGCGTGGCAGCATCAAAGCGTTCAAAGAAGCGACCAAAGTGGACAAAG
TTGTGGTCCTTTGGACCGCGTTAGTCCCGCGTGGTAGCATTAAAGGCTTTTAAAGAGGCGACTAAGGTGGAC
AAAGTGGTGGTTCTTTGGACTGCGCTGGTGCCGCGTGGCAGCATTAAAGCTTTCAAAGAAGCGACCAAGGT
TGACAAGGTTGTGGTATTATGGACCGCGTTAGTACCGCGTGGTAGCATCAAAGCCTTTAAAGAGGCGACAA
AAGTTGACAAAGTGGTAGTTTTATGGACCGCTCTTGTGCCTCGTGGCAGCATCAAGGCTTTCAAAGAAGCG
ACTAAGGTGGATAAAAGTTGTGGTCCTCTGGACCGCGTTAGTTCCTCGTGGTAGCATTAAAGCCTTCAAAGA
GGCGACTAAAGTTGACAAAGTGGTTGTTTTATGGACTGCTTTAGTTCGCGGTGGCAGCATCAAGGCCTTCA
AAGAAGCGACAAAAGTTGATAAAGTTGTGGTCCTATGGACCGCGTTAGTTCCTCGTGGTAGCATTAAAGCG
TTCAAAGAGGCGACCAAAGTTGATAAAGTTGTTGTGCTGTGGACCGCGCTGGTGCCGCGTGGTAGC,
```

Terminação: TGAGAATTC

Figura 2. Sequência nucleotídica inserida no plasmídeo. Cada letra representa um nucleotídeo (A – adenina; T – timina; G – guanina; C - citosina).

A cepa utilizada para propagação dos plasmídeos *Escherichia coli* S17-1, assim como a cepa *Sinorhizobium meliloti* 1021, transformada previamente com plasmídeo pET-30a(+) sem inserto (denominado genericamente aqui de plasmídeo teste), foram cedidas pelo Molecular Microbiology Laboratory da Dalhousie University Agricultural Campus (Truro, Canadá). A cepa escolhida para estabelecer o sistema de expressão foi *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS (Rosetta), fornecida pela Novagen (EMD Biosciences, Darmstadt, Alemanha).

Quando não especificados, os reagentes utilizados nos procedimentos foram de grau analítico e fornecidos pela Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). O meio utilizado para manipulação e manutenção das culturas bacterianas foi o meio complexo Lysogeny Broth Lennox (LB-L), composto por triptona 10 g.L⁻¹ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), extrato de levedura 5 g.L⁻¹ (BD Biosciences), cloreto de sódio 5 g.L⁻¹ (Fisher BioReagents, Fair Lawn, NJ) e, quando sólido, com adição de ágar 15 g.L⁻¹ (Fisher Chemical, Fair Lawn, NJ). O antibiótico para seleção de colônias transformantes com plasmídeos pET-30a(+) foi canamicina 40 µg.mL⁻¹ (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ).

2.2 Atribuição de competência a *E. coli* S17-1

Inicialmente, o plasmídeo contendo o inserto foi propagado, visto que é fornecido em pequenas quantidades. Para isso, optou-se por atribuir competência química para transformação molecular com uso de cloreto de cálcio a células *Escherichia coli* S17-1. Essa cepa apresenta boa eficiência na propagação de plasmídeos (Kristensen *et al.*, 1995). As células foram submetidas ao procedimento de competência química com cloreto de cálcio de acordo com a metodologia adaptada de Krantz [s.d.] (Department of Molecular & Cell Biology, University of California, Berkeley, CA). As células S17-1 foram incubadas por 18 h a 28 °C (Heratherm Incubator IGS180, Thermo Scientific, Waltham, MA) em placas de meio LB-L. Na sequência, uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de LB-L líquido e incubada a 28 °C e 110 rpm (MaxQ HP 480 Digital Shaker, VWR, Radnor, PA). A cultura total foi então inoculada em 1 L de LB-L e incubada sob as mesmas condições anteriores, sendo a densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) verificada periodicamente até atingir 0,35-0,4, quando foi transferida para banho de gelo e resfriada por aproximadamente 30 min. A cultura foi centrifugada a $3000\times g$ por 15 min a 4 °C (Sorvall ST 16R, Thermo Scientific), sendo então o sobrenadante descartado e o precipitado ressuscitado com cerca de 100 mL de $MgCl_2$ 100 mM. Centrifugou-se novamente a suspensão de células a $2000\times g$ por 15 min a 4 °C e descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi novamente ressuscitado com 200 mL de $CaCl_2$ 100 mM, deixando-se reagir em banho de gelo por 25 min. Após esse período, as células foram colhidas ($2000\times g$, 15 min, 4 °C), ressuscitadas em 2 mL de $CaCl_2$ 85 mM em glicerol 15% e aliqüotadas em microtubos estéreis no volume de 50 μ L. Os microtubos foram então congelados com nitrogênio líquido e estocados a -80 °C, até utilização nos procedimentos de propagação. Todas as soluções e frascos foram mantidos e manipulados em banho de gelo.

2.2.1 Verificação de cálcio-competência adquirida

A competência adquirida pelas células *E. coli* S17-1 foi testada a partir da transformação com o plasmídeo teste (pET-30a(+)) sem inserto, seleção por canamicina), previamente extraído com kit QIAprep® Spin Miniprep (QIAGEN, Hilden, Alemanha) da cepa *S. meliloti* portadora. A concentração da solução plasmidial foi determinada previamente utilizando Take3 Micro-Volume Plate (Biotek, Winooski, VT) em leitor de microplacas Hybrid Multi-Mode Synergy H1™ (Biotek).

A transformação com o plasmídeo teste foi realizada de acordo com o protocolo da GenScript Inc., em que um microtubo contendo as células S17-1 submetidas ao procedimento de conferência de cálcio-competência foi descongelado em banho de gelo por 25 min e incubado com cerca de 300 ng do plasmídeo. O microtubo foi então submetido a um choque térmico de curta duração (42 °C, 120 s) em bloco de aquecimento (VWR Heat Block, VWR), retornado ao banho de gelo por 2 min e acrescido de 800 µL de LB-L, sendo então transferido para incubadora tipo *shaker* (28 °C, 110 rpm) por 40 min. Na sequência, o conteúdo do tubo foi semeado em placas LB-L suplementadas com canamicina, sendo essas incubadas em estufa (28 °C, 48 h). A verificação do sucesso do procedimento consistiu na seleção das colônias pelo antibiótico. Além disso, o DNA plasmidial das colônias selecionadas foi também extraído e verificado por eletroforese em gel horizontal comparando com amostras das extrações anteriores da cultura de *S. melitoti*.

Controles negativos da transformação também foram preparados de acordo com esse protocolo para assegurar que a cepa S17-1 não era originalmente competente e/ou não estava contaminada.

2.3 Propagação de plasmídeos em S17-1 competente

Uma vez provada a eficiência na transformação das células S17-1, foi iniciada a propagação do plasmídeo pET-30a(+) contendo o inserto Soy_IPS_12. O protocolo de transformação utilizado foi o mesmo da verificação de competência da S17-1. Após crescimento das colônias selecionadas em meio LB-L contendo antibiótico, foi realizada a extração do DNA plasmidial e o material coletado foi armazenado a -20 °C até utilização.

2.4 Transformação em *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS

A partir da propagação e coleta dos plasmídeos pET-30a(+), foi iniciada a transformação em células competentes Rosetta™(DE3)pLysS, de acordo com o protocolo da GenScript Inc.. Além da transformação com os plasmídeos pET-30a(+) propagados, o procedimento foi também executado com o plasmídeo teste.

As colônias transformadas com o plasmídeo pET-30a(+) contendo Soy_IPS_12 e selecionadas por canamicina foram mantidas continuamente em placas com o antibiótico e estocadas a -80 °C em glicerol 25%.

2.5 Indução da expressão e verificação

A verificação do sucesso da transformação dos plasmídeos em células Rosetta consiste, além de nos procedimentos de verificação por extração de DNA plasmidial e eletroforese, na indução da expressão dos peptídeos em tandem pelas células. Esse procedimento consiste em estimular quimicamente as células Rosetta transformadas visando a produção do multímero codificado pela sequência inserida através do vetor. Para isso, uma colônia selecionada foi inoculada em 1 L de meio LB-L e incubada sob agitação (28 °C, 110 rpm), sendo realizadas medições periódicas de sua DO₆₀₀ até atingir 0,5, quando então foram adicionados 250 µL de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) 400 mM. O frasco foi transferido para banho Dubnoff (VWR Shaking Water Bath, VWR) a 4 °C e 150 rpm por 18 h.

A cultura foi centrifugada (5000×g, 10 min, 4 °C) e o precipitado ressuspendido em 6 mL de tampão fosfato-salino 1000 mM (PBS). Alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos para lise contendo microesferas de vidro de 0,1 mm (Micro-Organism Lysing Mix Nuclease Free, OMNI Inc., Kennesaw, GA) e homogeneizadas por 60 s no Bead Ruptor 4 Homogenizer (OMNI Inc.). Os tubos foram então centrifugados por 30 s para sedimentação das partículas (Eppendorf Centrifuge 5424, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O precipitado foi descartado e o sobrenadante transferido para microtubos para verificação por eletroforese de proteínas utilizando Mini Gel Bolt™ 4-12% Bis-Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA). Antes da aplicação no gel, as amostras foram preparadas com adição de Bolt™ LDS Sample Buffer (Life Technologies, Carlsbad, CA) na proporção 4:1, e transferidas para bloco de aquecimento (70 °C, 10 min) (VWR Heat Block, VWR). Foram aplicados 20 µL por poço, e a corrida eletroforética foi realizada em cuba Bolt™ Mini Gel (165 V, 20 min) (Thermo Scientific). O tampão de corrida utilizado foi Bolt™ MES SDS (Life Technologies). Na sequência, o gel foi fixado e corado com Coomassie Blue G250 0,1% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) e visualizado em Molecular Imager® Gel Doc™ XR (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). O marcador molecular utilizado foi SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard (Life Technologies), com marcações de 3 a 198 kDa.

3. Resultados e discussão

Foi conferida competência às células *E. coli* S17-1, afirmação essa que se baseia em i) presença de crescimento nas placas seletivas (contendo canamicina) após semeadura da cultura resultante do procedimento de transformação utilizando o plasmídeo teste pET-30a(+) extraído de *S. meliloti* (Figura 3a); ii) ausência de crescimento nas placas do controle negativo, que confirmam a não-competência e/ou contaminação da cepa original (Figura 3c); iii) comparação do DNA plasmidial extraído por kit QIAprep® Spin Miniprep das culturas de S17-1 transformada e de *S. meliloti*, mostrando correspondência entre as bandas obtidas.

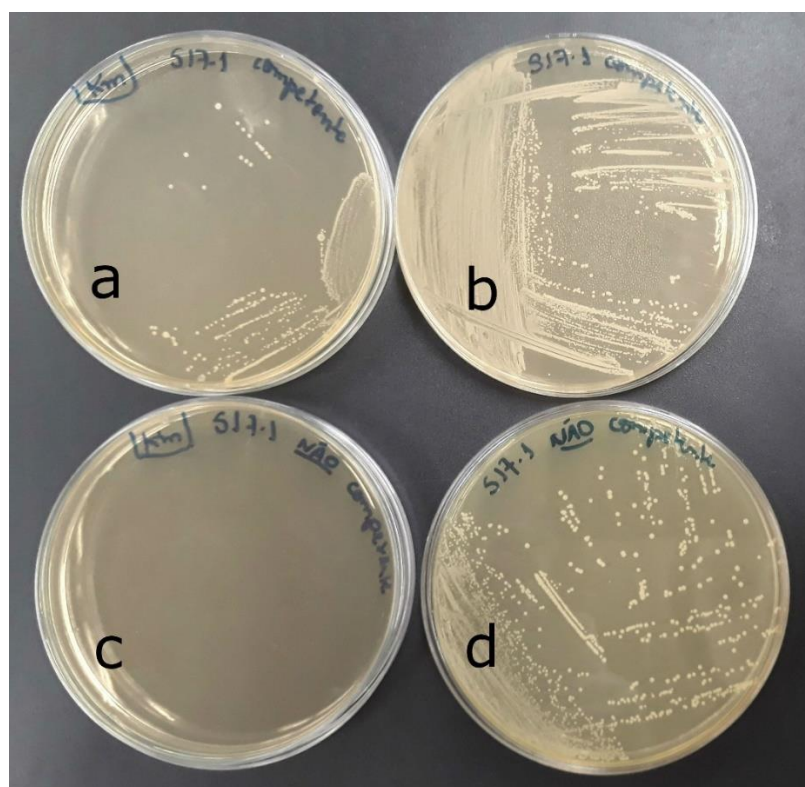


Figura 3. Culturas obtidas após procedimento de transformação. **a:** Placa seletiva (LB-L + canamicina) da cultura de S17-1 competente. **b:** Placa não-seletiva (ausência de antibióticos) da cultura de S17-1 competente. **c:** Placa seletiva da cultura de S17-1 não-competente. **d:** Placa não-seletiva da cultura de S17-1 não-competente.

A propagação do plasmídeo pET-30a(+) foi realizada em *E. coli* S17-1 competente. A seleção das colônias transformantes e a verificação por eletroforese confirmaram a aquisição dos plasmídeos nas células, de maneira análoga ao

explicitada anteriormente na verificação da atribuição de competência. O DNA plasmidial foi extraído e armazenado a -20 °C.

Os plasmídeos teste e pET-30a(+) foram então transformados nas células Rosetta. As placas obtidas a partir desse procedimento podem ser visualizadas na Figura 4.

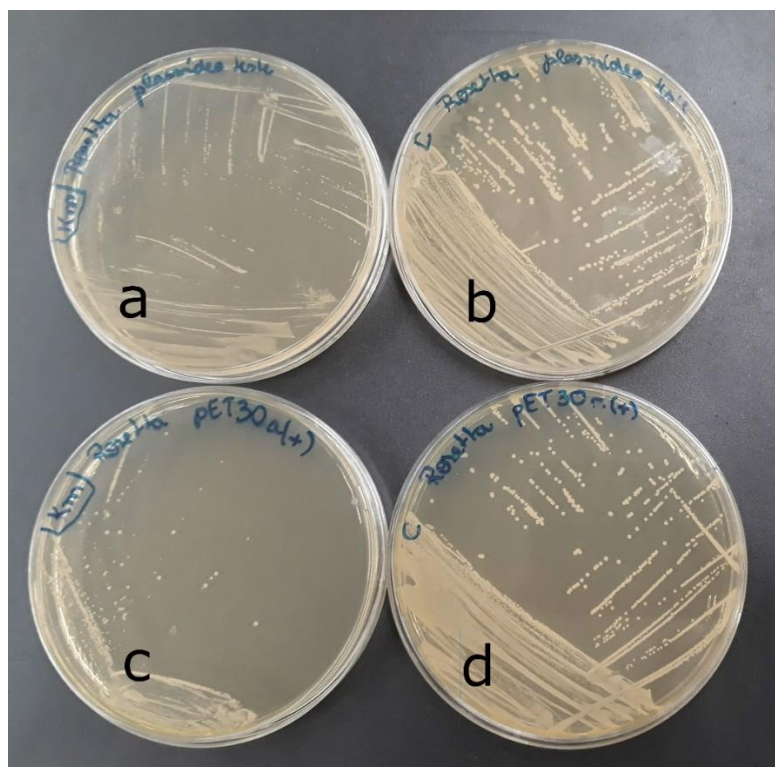


Figura 4. Culturas obtidas após procedimento de transformação em células Rosetta. a: Placa seletiva (LB-L + canamicina) da cultura de células Rosetta transformadas com o plasmídeo teste. **b:** Placa não-seletiva (sem antibióticos) da cultura de células Rosetta transformadas com o plasmídeo teste. **c:** Placa seletiva (LB-L + canamicina) da cultura de células Rosetta transformadas com o plasmídeo pET-30a(+) contendo o inserto. **d:** Placa não-seletiva (sem antibióticos) da cultura de células Rosetta transformadas com o plasmídeo pET-30a(+) contendo o inserto.

A partir da comparação das imagens dos géis proteicos obtidos através da eletroforese em gel vertical dos lisados das células Rosetta transformadas pelos plasmídeos pET-30a(+) (Figura 5bc) e teste (Figura 5ef), pode-se observar a presença de uma banda de alta massa molecular exclusivamente nas culturas de Rosetta transformadas com pET-30a(+). Isso condiz com o fato da sequência inserida nas células através do vetor codificar um multímero de aproximadamente 33 kDa. Além

disso, a adição de IPTG intensifica a cor da banda, embora a expressão já seja bem evidente na cultura não induzida.

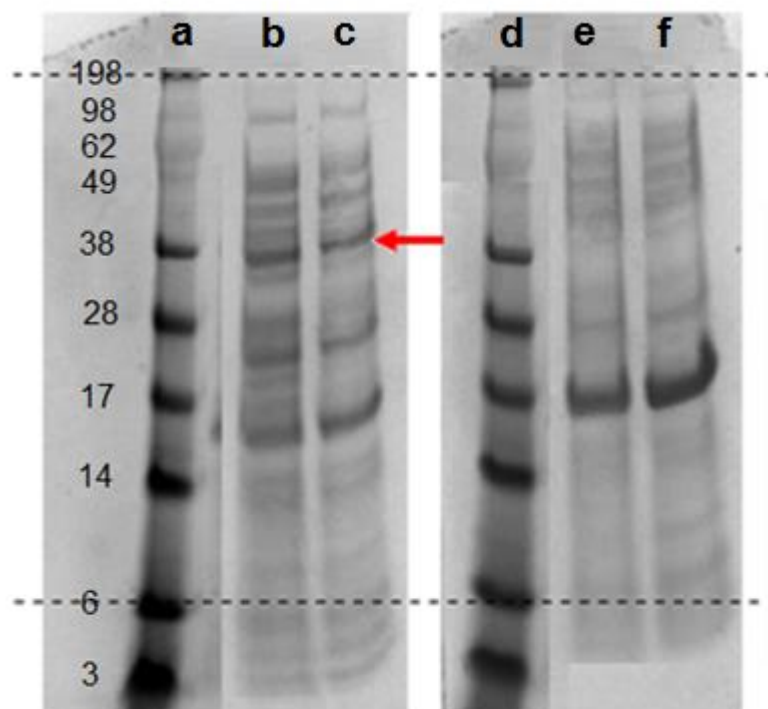


Figura 5. Matrizes de gel obtidos por eletroforese vertical de proteínas. a,d: Marcadores moleculares. Os números ao lado de **a** indicam a massa em kDa correspondente **b,c:** Extratos do cultivo de Rosetta transformadas com o plasmídeo pET-30a(+), sendo **b** induzido com IPTG e **c** não-induzido. **e,f:** Extratos do cultivo de Rosetta transformadas com o plasmídeo teste, sendo **e** induzido com IPTG e **f** não-induzido. A seta indica a posição do multímero peptídico em tandem.

O estabelecimento do sistema de expressão para o plasmídeo pET-30a(+) contendo o inserto Soy_IPS_12 em células Rosetta foi comprovado. Estas células são indicadas pelo fabricante para expressão de proteínas eucarióticas e/ou que possuem potencial de toxicidade à célula hospedeira (Novagen, 2004), ambas características do multímero que será expresso – sequência original proveniente da RuBisCO de soja e com atividade antimicrobiana prevista *in silico*. A cepa Rosetta vem sendo utilizada nos últimos anos no estabelecimento de sistemas de expressão de genes codificantes de proteínas de organismos eucarióticos, apresentando rendimento elevado (Toufiq *et al.*, 2017; Yedahalli *et al.*, 2016).

Em relação ao multímero expresso com o sistema aqui estabelecido, a configuração do inserto Soy_IPS_12 baseou-se nas etapas de processamento posteriores a sua expressão. Primeiramente, tendo em vista que os multímeros deverão ser isolados do restante do cultivo, a presença da His-tag contida no final do multímero desempenha importante papel. Por ela apresentar afinidade por sais de níquel, a purificação dos multímeros expressos pelas células poderá ser realizada por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC – Immobilized Metal-Affinity Chromatography) (Bewley *et al.*, 2017). Além disso, as 12 repetições em tandem – que auxiliam no maior rendimento da produção do peptídeo GSIKAFKEATKVDKVVVLWTALVPR de RuBisCO, sem prejudicar a incorporação do plasmídeo às células – possuem entre si sítios de clivagem específicos para enzimas proteolíticas, visando a liberação dos peptídeos do multímero. Acredita-se que a trombina, proteinase sérica de baixo custo, possa ser usada nesse processamento, por possuir a característica de clivar entre os aminoácidos arginina (R) e glicina (G) adjacentes (Magnusson, 1968), configuração que o multímero apresenta entre as repetições. Após liberação dos peptídeos, as enzimas poderão ser recuperadas para reutilização, e os peptídeos liberados estarão ativos para aplicação na indústria. Ressalta-se que testes antimicrobianos deverão ser conduzidos para averiguar a eficiência destes peptídeos frente a patógenos.

Em relação à aplicabilidade de um sistema bacteriano de expressão de peptídeos derivados de RuBisCO na indústria, é destacável que se trate de um processo sustentável, rápido e relativamente barato, uma vez estabelecido. Kobbi *et al.* (2017) propuseram um método de recuperação e purificação de RuBisCO a partir de suco verde de alfafa, visando aliar um método de hidrólise química da enzima para liberação de frações peptídicas bioativas e dessa forma estabelecer um método de potencial aplicação na indústria. O mesmo grupo também estudou a atividade antibacteriana de frações do hidrolisado de RuBisCO, obtendo resultados bastante promissores contra *Bacillus subtilis*, *Listeria innocua*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* e *Enterococcus faecalis* (Kobbi *et al.*, 2015). A atividade antimicrobiana encontrada foi atribuída à alta concentração de peptídeos bioativos nas frações do hidrolisado, corroborando com o potencial dessa enzima em gerá-los, ressaltada no trabalho de Udenigwe *et al.* (2017).

Outro estudo com hidrolisados proteicos foi conduzido por Beaulieu *et al.* (2015), no qual foi avaliada a atividade antibacteriana do hidrolisado proteico da macroalga *Saccharina longicruris*. Os peptídeos responsáveis por essa atividade são originários de diferentes proteínas da alga, com destaque para RuBisCO.

Comparando os métodos de obtenção de peptídeos de RuBisCO, a produção em biorreatores em sistema bacteriano apresenta vantagens em relação aos métodos de purificação da enzima de fontes vegetais e posterior hidrólise. O baixíssimo rendimento, o elevado custo e a extensão desses métodos inviabilizam a utilização em larga escala, essencial à indústria (Kobbi *et al.*, 2017; Udenigwe e Aluko, 2012). Já a produção a partir do sistema de expressão permite a obtenção de frações peptídicas específicas, sabidamente bioativas, e de configuração determinada visando a facilidade da purificação, demandando menor tempo de processamento com custo reduzido. Além disso, esse sistema pode também ser aplicado em outros ramos da indústria, tal como a nutraceutica, considerando os resultados promissores dos peptídeos e lisados da enzima RuBisCO aplicados na saúde humana e animal (Agirbasli e Cavas, 2017; Mohan *et al.*, 2015; Udenigwe *et al.*, 2017).

4. Conclusão

A partir da indução do sistema de expressão heterólogo estabelecido, será possível a produção do peptídeo codificado pela sequência inserida. Além disso, as metodologias aqui aplicadas poderão ser utilizadas visando a expressão de outras sequências peptídicas. Como neste sistema, os peptídeos poderão obtidos em tandem – ou seja, em sequência – intercalados com sítios de clivagem específicos para proteases, já que o inserto os codifica assim –, além da His-tag no final da cadeia. Essas características são essenciais para as etapas de purificação e ativação, etapas que se baseiam na possibilidade de coletar a cadeia dos peptídeos em tandem a partir de IMAC (pela afinidade à His-tag), e na conseguinte digestão proteolítica por trombina, que cliva os sítios específicos presentes entre os peptídeos, liberando-os da cadeia e, assim, conferindo a característica anfipática aos mesmos. Estudos futuros deverão ser conduzidos visando a verificação de tais etapas e a atividade antimicrobiana *in vitro* da molécula.

Referências

- Abdollahzadeh E, Rezaei M, Hosseini H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: the role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*. 2014;35(1):177–83.
- Agirbasli Z, Cavas L. *In silico* evaluation of bioactive peptides from the green algae *Caulerpa*. *J Appl Phycol*. 2017;29(3):1635–46.
- Beaulieu L, Bondu S, Doiron K, Rioux LE, Turgeon SL. Characterization of antibacterial activity from protein hydrolysates of the macroalga *Saccharina longicuris* and identification of peptides implied in bioactivity. *J Funct Foods*. 2015;17:685–97.
- Bewley MC, Reinhart L, Stake MS, Nadaraia-Hoke S, Parent LJ, Flanagan JM. A non-cleavable hexahistidine affinity tag at the carboxyl-terminus of the HIV-1 Pr55Gag polyprotein alters nucleic acid binding properties. *Protein Expr Purif*. 2017;130:137–45.
- Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. Essential oils as antimicrobials in food systems - a review. *Food Control*. 2015;54:111–9.
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31(13):3784–8.
- Genscript [online]. Express cloning vectors. [s.d.] Disponível em: <<https://www.genscript.com/express-cloning-vector-list.html>>.
- Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol*. 2012;3:1–24.
- Johnson EM, Jung YG, Jin YY, Jayabalan R, Yang SH, Suh JW. Bacteriocins as food preservatives: challenges and emerging horizons. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;1–25.

- Kobbi S, Balti R, Bougatef A, Le Flem G, Firdaous L, Bigan M, et al. Antibacterial activity of novel peptides isolated from protein hydrolysates of RuBisCO purified from green juice alfalfa. *J Funct Foods*. 2015;18:703–13.
- Kobbi S, Bougatef A, Le Flem G, Balti R, Mickael C, Fertin B. Purification and recovery of RuBisCO protein from alfalfa green juice: antioxidative properties of generated protein hydrolysate. *Waste Biomass Valorization*. 2017;8(2):493–504.
- Krantz Laboratory [online]. Department of Molecular & Cell Biology, University of California Berkeley. Making calcium competent cells. Disponível em: <http://mcb.berkeley.edu/labs/krantz/protocols/calcium_comp_cells.pdf>.
- Kristensen CS, Eberl L, Sanchez-Romero JM, Givskov M, Molin S, De Lorenzo V. Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4. *J Bacteriol*. 1995;177(1):52–8.
- Lopes LF, Bordin K, De Lara Gabriel HC, Saladino F, Quiles JM, Meca G. Fumigation of Brazil nuts with allyl isothiocyanate to inhibit the growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. *J Sci Food Agric*. 2017;28(3):303–25.
- Luepke KH, Suda KJ, Boucher H, Russo RL, Bonney MW, Hunt TD, et al. Past, present, and future of antibacterial economics: increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. *Pharmacotherapy*. 2017;37(1):71–84.
- Magnusson S. Homologies between thrombin and other serine proteinases. *Biochem J*. 1968;110(3):25P–26P.
- Meira NVB, Holley RA, Bordin K, Macedo REF, Luciano FB. Combination of essential oil compounds and phenolic acids against *Escherichia coli* O157:H7 in vitro and in dry-fermented sausage production. *Int J Food Microbiol*. 2017;260:59–64.
- Minkiewicz P, Dziuba J, Iwaniak A, Dziuba M, Darewicz M. BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *J AOAC Int*. 2008;91(4):965–80.
- Mohan A, Udechukwu MC, Rajendran SRCK, Udenigwe CC. Modification of peptide functionality during enzymatic hydrolysis of whey proteins. *RSC Adv*. 2015;5(118):97400–7.

Mooney C, Haslam NJ, Pollastri G, Shields DC. Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity. PLoS One. 2012;7(10).

Nielsen Europe [online]. Green generation: millennials say sustainability is a shopping priority. 2015. Disponível em:
<<http://www.nielsen.com/eu/en/insights/news/2015/green-generation-millennials-say-sustainability-is-a-shopping-priority.html>>.

Novagen. Competent cells. User Protocol TB009 Rev. F 0104. 2004;1–23.

Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. Pept Sci. 1998;47(6):451–63.

Pellegrini A. Antimicrobial peptides from food proteins. Curr Pharm Des. 2003;9(16):1225–38.

Rigotti RT, Corrêa JAF, Maia NJL, Cesaro G, Rosa EAR, Macedo REF, *et al.* Combination of natural antimicrobials and sodium dodecyl sulfate for disruption of biofilms formed by contaminant bacteria isolated from sugarcane mills. Innov Food Sci Emerg Technol. 2017;41:26–33.

Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. Biopolymers. 2000;55(1):4–30.

Toufiq N, Tabassum B, Bhatti MU, Khan A, Tariq M, Shahid N, *et al.* Improved antifungal activity of barley derived chitinase I gene that overexpress a 32 kDa recombinant chitinase in *Escherichia coli* host. Brazilian J Microbiol. 2017;49(2):414–211.

Udenigwe CC. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. Trends Food Sci Technol. 2014;36(2):137–43.

Udenigwe CC, Aluko RE. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. J Food Sci. 2012;77(1):R11–24.

Udenigwe CC, Gong M, Wu S. *In silico* analysis of the large and small subunits of cereal RuBisCO as precursors of cryptic bioactive peptides. Process Biochem. 2013;48(11):1794–9.

Udenigwe CC, Okolie CL, Qian H, Ohanenye IC, Agyei D, Aluko RE. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase as a sustainable and promising plant source of bioactive peptides for food applications. *Trends Food Sci Technol.* 2017;69:74–82.

Yedahalli SS, Rehmann L, Bassi A. Expression of exo-inulinase gene from *Aspergillus niger* 12 in *E. coli* strain Rosetta-gami B (DE3) and its characterization. *Biotechnol Prog.* 2016;32(3):629–37.

CAPÍTULO 3

(Artigo científico a ser submetido para publicação na Revista Acadêmica: Ciência Animal)

Avaliação *in vitro* de atividade antimicrobiana de peptídeos anfipáticos derivados de proteínas do soro de leite

In vitro evaluation of antimicrobial activity of amphipathic peptides derived from whey proteins

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de peptídeos anfipáticos derivados de proteínas do soro de leite contra importantes microrganismos patogênicos e toxigênicos. Para isto, foram testados dois peptídeos de 16 e 6 aminoácidos, de sequências HQPHQPLPPTVMFPPQ e KIPAVF respectivamente, frente às bactérias *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, e *Escherichia coli*, e frente aos fungos *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium verticillioides*, e *Fusarium graminearum*. Buscou-se determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos dois peptídeos contra os microrganismos utilizando o método de microdiluição em placas de 96 poços. Foram testadas doses de até 5000 mg.L⁻¹ de cada peptídeo, contudo, não foi possível determinar suas CIMs frente aos patógenos e contaminantes testados. Analisando trabalhos similares com peptídeos e/ou lisados proteicos de soro de leite, percebe-se uma variação muito grande entre os resultados. Isso demonstra a divergência de bioatividade de peptídeos com diferentes sequências, além das possíveis diferentes respostas celulares a estas moléculas, tais como metabolização e alterações não-letais. Assim, conclui-se que os peptídeos aqui testados não são bons candidatos para aplicação na indústria de alimentos. Doses mais elevadas dos peptídeos não foram testadas pois inviabilizaria sua aplicação em alimentos devido ao alto custo de obtenção.

Palavras-chave: Antimicrobianos naturais. Patógenos. Contaminantes.

Abstract

The objective of this research was to evaluate the antimicrobial activity of amphipathic peptides derived from whey protein against important pathogenic and contaminant microorganisms. Two peptides, of 16 and 6 amino acids, composed respectively by the sequences HQPHQPLPPTVMFPPQ and KIPAVF, were tested against the pathogenic bacteria *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*, and against the mycotoxigenic fungi *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium verticillioides*, and *Fusarium graminearum*. The 96-well plate microdilution method was performed in order to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs) of the two peptides against each microorganism. Doses up to 5000 mg.L⁻¹ of the peptides were applied, however it was not possible to determine their MICs against the pathogens and contaminants tested. Analyzing similar work with peptides and/or whey protein lysates in the literature, a severe variation is observed among the results. This denotes a bioactivity divergence of peptides with distinct sequences, in addition to the possible different cellular responses to these molecules, such as metabolism and non-lethal changes. Thus, we conclude that the peptides tested herein are not good candidates for application in the food industry. Higher doses were not tested because their use in food would not be feasible due to high costs of obtainment.

Keywords: Natural antimicrobials. Pathogens. Contaminants.

1. Introdução

A aplicação de peptídeos antimicrobianos na agricultura e na indústria de alimentos tem ganhado força visto que essas moléculas apresentam boa eficiência contra microrganismos sem apresentar os riscos da utilização de substâncias empregadas na clínica humana e animal (Blair *et al.*, 2015; Keymanesh *et al.*, 2009). Esses peptídeos podem ser aplicados diretamente nos alimentos ou como constituintes de embalagens bioativas (Appendini e Hotchkiss, 2002; Neris *et al.*, 2013; Quintavalla e Vicini, 2002).

Peptídeos antimicrobianos podem ser obtidos a partir de diferentes fontes, vegetais, animais e microbianas (Epand e Vogel, 1999). Uma matriz com crescente

interesse é o soro de leite que, por se tratar de um resíduo rico em proteínas (Oliveira *et al.*, 2012), apresenta baixo custo e consequente potencial para geração de subprodutos de alto valor agregado. Lisados proteicos de soro de leite têm apresentado efeitos promissores (Abdel-Hamid *et al.*, 2016; Demers-Mathieu *et al.*, 2013; Osman *et al.*, 2016; Théolier *et al.*, 2013), com frações peptídicas de alta atividade antimicrobiana. Além disso, peptídeos derivados de proteínas do soro de leite têm demonstrado atividade quelante, o que leva à perturbação do metabolismo de metais e de processos dependentes de metais em microrganismos (Udechukwu *et al.*, 2016; Mohan *et al.*, 2015).

A utilização de substâncias para controle microbiológico na indústria é essencial para manutenção da segurança e integridade de alimentos susceptíveis à contaminação. Os microrganismos que mais causam problemas de recall de alimentos, levando a significantes perdas econômicas para as indústrias atualmente são as bactérias e fungos (Greig *et al.*, 2015). Além da deterioração do alimento e da alteração de seu valor nutricional, o crescimento desses microrganismos pode afetar a segurança do produto, quando há proliferação de espécies patogênicas e/ou toxigênicas (Umesha *et al.*, 2017).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de peptídeos anfipáticos de cadeia curta derivados de proteínas do soro de leite, isoladamente, contra importantes microrganismos patogênicos e toxigênicos de interesse da indústria de alimentos.

2. Material e métodos

2.1 Peptídeos

Os peptídeos utilizados neste estudo foram obtidos a partir de processamento enzimático de proteínas isoladas do soro de leite. O isolado proteico foi incubado por 5 h a 60 °C e pH 8,0 com Esperase® (Novozymes Corp., Bagsværd, Dinamarca) na proporção 100:1, respectivamente, e o hidrolisado resultante foi fracionado por ultrafiltração por membrana com peso molecular de corte de 1 kDa. O conteúdo filtrado, contendo peptídeos de massa molecular <1 kDa, foi então fracionado por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC – Immobilized Metal-Affinity Chromatography) com colunas de 1 mL HiTrap IMAC Sepharose™ 6 Fast Flow (GE

Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) carregadas com zinco, visando recuperação de peptídeos quelantes. Após lavagem da coluna com solução-tampão, os peptídeos ligados à coluna foram eluídos com acetato de sódio 0,02 M (pH 4). Na sequência, os peptídeos foram liofilizados e analisados por cromatografia líquida associada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) com analisador Orbitrap (Q-Exactive, ThermoFisher, San Jose, CA) equipado com nanospray e sistema EASY-nano-LC nano-LC (Thermo Fisher), visando identificação dos peptídeos quelantes recuperados. Dentre os peptídeos identificados na fração recuperada, dois foram selecionados para estudo, um de dezesseis aminoácidos derivado de beta-caseína bovina (P16), e o segundo de seis aminoácidos derivado de beta-lactoglobulina bovina (P6). P16 foi selecionado por apresentar fortes ligantes metálicos em sua estrutura, principalmente histidina e fenilalanina, e P6 foi selecionado por apresentar característica anfipática (lisina catiônica seguida de *motif* hidrofóbico). As sequências dos peptídeos estão contidas na Tabela 1. Assim, para avaliar a atividade antimicrobiana dos peptídeos selecionados, P16 e P6 foram quimicamente sintetizados pela GenScript Inc. (Piscataway, NJ). As características técnicas dos peptídeos podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1. Peptídeos derivados de proteínas de soro de leite bovino.

Peptídeo	Proteína original	Sequência de aminoácidos	Número de aminoácidos	Massa molar (g/mol)	Pureza (%)
P16	Beta-caseína bovina 145-160	HQPHQPLPP TVMFPPQ	16	1851,14	98,5
P6	Beta-lactoglobulina bovina 77-82	KIPAVF	6	673,85	98,7

2.2 Microrganismos e meios de cultura

As cepas bacterianas utilizadas neste estudo foram *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Escherichia coli* O157:H7 02-0304, patógenos alimentares de relevância. As cepas fúngicas testadas foram *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, *Fusarium verticillioides* CECT 2983 e *Fusarium graminearum* CECT 2150, importantes cepas micotoxigênicas. Todas as cepas foram obtidas do estoque do Laboratório de Pesquisa e Inovação Agropecuária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Curitiba, Brasil).

Os meios de cultura utilizados nos testes foram caldo e ágar Müeller-Hinton (MH) (Himedia, Paris, França) e Caldo Triptona de Soja (TSB) (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil).

2.3 Determinação das concentrações inibitórias mínimas frente a bactérias

Buscou-se inicialmente determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos dois peptídeos contra as bactérias utilizando o método de microdiluição em placas de microtitulação de 96 poços (CLSI, 2017).

Diluições em série (2^x) dos antimicrobianos foram feitas em MH, sendo então realizada a inoculação dos microrganismos alvo. As doses testadas foram de 1 a 5000 mg.L⁻¹ de cada peptídeo, sendo cada dose testada em triplicata. Cada poço recebeu 100 µL de caldo MH com tratamento e 100 µL de inóculo bacteriano – equilibrado em espectrofotômetro na absorvância 0,35-0,4 (densidade ótica lida a 600 nm), que corresponde à concentração de aproximadamente 3×10^8 células.mL⁻¹ –, com exceção dos controles positivos, que não receberam tratamento, e negativos, que não receberam inóculo. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C, sendo então avaliada a turbidez dos poços e as CIMs determinadas como sendo as menores doses sem crescimento bacteriano aparente.

2.4 Determinação das concentrações inibitórias mínimas frente a fungos

Os fungos micotoxigênicos *A. parasiticus*, *F. verticillioides* e *F. graminearum* foram testados frente a P16 e P6, isoladamente. A técnica utilizada também foi a de microdiluição em microplacas (CLSI, 2017). As doses testadas foram de 1 a 5000 mg.L⁻¹ de cada peptídeo, sendo cada dose testada em triplicata (n = 3).

Cada poço recebeu 50 µL de caldo TSB com tratamento e 50 µL de inóculo concentrado, contendo aproximadamente 2×10^4 esporos.mL⁻¹. Os controles positivo e negativo não receberam tratamento e inóculo, respectivamente. As placas foram incubadas por 48 h a 25 °C, sendo então avaliado o crescimento fúngico dos poços, sendo as CIMs determinadas como as menores doses com redução visual de 50% dos micélios, em comparação ao controle positivo.

3. Resultados e discussão

Apesar de ambos os peptídeos avaliados terem demonstrado alto potencial antimicrobiano a partir de avaliações *in silico* de suas sequências (dados não publicados), os testes *in vitro* aqui desenvolvidos não geraram resultados que comprovassem atividade inibitória contra as cepas bacterianas Gram-positivas e -negativas testadas e/ou contra os fungos micotoxigênicos. Concentrações superiores a 5000 mg.L⁻¹ – maior dose testada no estudo, já bastante elevada – deixariam de ser industrialmente viáveis devido ao elevado custo de obtenção destes peptídeos, considerando suas aplicações em formas purificadas.

Osman *et al.* (2016) trabalharam com hidrolisados proteicos de soro de leite de cabra e encontraram resultados de inibição bacteriana para *E. coli* ATCC 8739, *Bacillus cereus* ATCC 33018 e *S. aureus* ATCC 25923 em concentrações de 90, 30 e 20 mg.L⁻¹. Esses resultados provavelmente são provenientes de possíveis interações sinérgicas entre diferentes peptídeos contidos no lisado e/ou presença de peptídeos com bioatividade superior aos aqui testados. Contudo, no estudo de Abdel-Hamid *et al.* (2016), utilizando hidrolisado proteico de soro de leite de camelo, foram determinados valores de CIMs até 20 vezes superiores aos de Osman e colaboradores contra as mesmas espécies bacterianas. Isso indica a variação de bioatividade entre peptídeos de diferentes origens proteicas e sequências.

Estudo conduzido por Demers-Mathieu *et al.* (2013) comparou os efeitos antimicrobianos de hidrolisados proteicos de soro de leite bovino e de peptídeos derivados de beta-lactoglobulina bovina purificados nas concentrações 20.000 e 10.000 mg.L⁻¹, encontrando diferenças significativas, sendo os peptídeos purificados aqueles com maior poder antimicrobiano. Contudo, essas concentrações não proporcionaram inibição completa de *Listeria innocua* RBL29, *L. ivanovii* HPB28, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* MC4100, e *E. coli* O157:H7 ATCC 35150. Por outro lado, Théolier *et al.* (2013) encontraram CIMs de 20-40 mg.L⁻¹ de peptídeos isolados derivados de soro de leite frente a *Listeria ivanovii* HPB28 e *E. coli* MC4100. Novamente, esses dados divergentes acentuam as diferentes características e consequentes bioatividades dos peptídeos contidos em proteínas de soro de leite.

Um exemplo de peptídeo antimicrobiano (PAM) utilizado na indústria de alimentos atualmente é a nisina, com efeitos inibitórios satisfatórios sob baixas concentrações (Punyauppa-path e Phumkhachorn, 2015). A principal diferença da

nisina quando comparada aos peptídeos derivados de soro de leite reside em a primeira, por possuir uma maior complexidade devido a sua sequência mais longa, apresentar seu mecanismo de ação mediado por receptores na membrana de bactérias, e, por conseguinte, maior especificidade. Esse é também o caso de peptídeos com ação contra fungos, já que neste tipo celular a presença de receptores específicos na membrana é essencial para atuação dessas moléculas, que atuam de maneira não lítica (Brogden, 2005).

Cabe ressaltar também que PAMs podem sofrer alterações pós-traducionais, em especial aqueles produzidos por organismos eucariotos. No caso de utilizar as sequências gênicas codificantes para sintetizar essas moléculas em sistemas bacterianos de expressão, essas modificações provavelmente não ocorrerão devido à diferença entre os maquinários proteicos envolvidos, o que certamente afetará a bioatividade da sequência (Grabsztunowicz *et al.*, 2017; Rosano e Ceccarelli, 2014). No caso de purificar os peptídeos a partir de suas fontes naturais, além do menor rendimento e maior custo (Kobbi *et al.*, 2017), os processos utilizados podem acarretar em alterações indesejadas nos peptídeos diminuindo ou inibindo completamente suas atividades (Kobbi *et al.*, 2015). Em ambas as situações, quanto maior a cadeia do PAM, mais susceptível ele será a esses efeitos (Rosano e Ceccarelli, 2014).

A maioria dos PAMs de cadeia curta atua através de mecanismos não-mediados por receptor, com menor especificidade, e demanda assim maiores concentrações para produzir o efeito antimicrobiano desejado (Shai, 2002). Outra característica de PAMs já caracterizados é a carga líquida positiva que possibilita a ligação da molécula à membrana dos microrganismos, passo inicial de sua ação. Contudo, é importante que a molécula não interaja muito fortemente com a cabeça polar dos fosfolípidos de membrana, o que poderia impedir interações subsequentes necessárias à atividade antimicrobiana (Yeaman e Yount, 2003). Assim, experimentos avaliando a carga dos peptídeos podem elucidar as diferenças de capacidade antimicrobiana existentes.

Em relação aos microrganismos testados, a não-susceptibilidade frente aos peptídeos de cadeia curta P16 e P6 pode ser explicada por diferentes mecanismos de resistência constitutiva e induzida. A ativação de bombas de efluxo, a alteração de cargas na membrana, a metabolização e degradação dos peptídeos podem, de maneira conjunta ou interdependente, evitar a ação dessas moléculas (Yeaman e

Yount, 2003). Contudo, não deve ser descartada a possibilidade de os peptídeos terem provocado alterações moleculares nos microrganismos, embora sem resultar na inibição do crescimento (Brogden, 2005).

É sabido que muitos microrganismos podem permanecer viáveis mesmo após extensivos danos em suas membranas, sendo que PAMs conhecidamente efetivos se utilizam de outros mecanismos além da lise de membranas para desempenhar seus efeitos (Brogden, 2005), que podem não estar presentes nos peptídeos testados neste estudo.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, é possível afirmar apenas que P16 e P6 não apresentam potencial de aplicação na indústria de alimentos devido a não apresentarem efeito inibitório contra patógenos e contaminantes importantes em concentrações de até 5000 mg.L⁻¹. Cabe ressaltar também que métodos de predição *in silico* não são totalmente precisos (Udenigwe, 2014) e, justamente por isso, não descartam a necessidade de experimentações posteriores, tais como as desenvolvidas neste estudo, para verificação de hipóteses.

4. Conclusão

Nas condições estudadas, não foi possível observar atividade antimicrobiana *in vitro* de peptídeos anfipáticos de cadeia curta derivados de proteínas do soro de leite de sequências HQPHQPLPPTVMFPPQ e KIPAVF contra bactérias e fungos de interesse da indústria de alimentos. Acredita-se que as moléculas foram metabolizadas pelos microrganismos, não desempenhando a atividade antimicrobiana correlacionada às suas conformações previamente observada *in silico*. Contudo, visto que outros peptídeos derivados de proteínas de soro de leite de diferentes sequências podem desempenhar função antimicrobiana, o estudo de sequências peptídicas desta fonte mantém seu potencial na elucidação de PAMs.

Referências

- Abdel-Hamid M, Goda HA, De Gobba C, Jenssen H, Osman A. Antibacterial activity of papain hydrolyzed camel whey and its fractions. *Int Dairy J.* 2016;61:91–8.
- Appendini P, Hotchkiss JH. Review of antimicrobial food packaging. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2002;(2):113–26.

Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(1):42–51.

Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(3):238–50.

Clinical and Laboratory Standards Institution. In: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017;M100:224.

Demers-Mathieu V, Gauthier SF, Britten M, Fliss I, Robitaille G, Jean J. Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolysate of whey protein by nanofiltration. *Int Dairy J*. 2013;28(2):94–101.

Epand RM, Vogel HJ. Discovery of antimicrobial peptides and their mechanism of action. *Biochim Biophys Acta*. 1999;11–28.

Grabsztunowicz M, Koskela MM, Mulo P. Post-translational modifications in regulation of chloroplast function: recent advances. *Front Plant Sci*. 2017;8:1–12.

Greig J, Rajić A, Young I, Mascarenhas M, Waddell L, Lejeune J. A scoping review of the role of wildlife in the transmission of bacterial pathogens and antimicrobial resistance to the food chain. *Zoonoses Public Health*. 2015;62(4):269–84.

Keymanesh K, Soltani S, Sardari S. Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry. *World J Microbiol Biotechnol*. 2009;25(6)933–44.

Kobbi S, Balti R, Bougatef A, Le Flem G, Firdaous L, Bigan M, *et al*. Antibacterial activity of novel peptides isolated from protein hydrolysates of RuBisCO purified from green juice alfalfa. *J Funct Foods*. 2015;18:703–13.

Kobbi S, Bougatef A, Le Flem G, Balti R, Mickael C, Fertin B, *et al*. Purification and recovery of RuBisCO protein from alfalfa green juice: antioxidative properties of generated protein hydrolysate. *Waste Biomass Valorization*. 2017;8(2):493–504.

Mohan A, Udechukwu MC, Rajendran SRCK, Udenigwe CC. Modification of peptide functionality during enzymatic hydrolysis of whey proteins. *RSC Adv*. 2015;5(118):97400–7.

Neris DJG, Bordignon-Júnior SE, Baratto CM, Gelinski JMLN. Nisin in the biopreservation of Bordô (Ives) and Niágara table wines from Santa Catarina, Brazil. *J Biotechnol Biodivers*. 2013;4:176–83.

Oliveira DF, Bravo CEC, Tonial IB. Soro de leite: um subproduto valioso. *Rev Inst Latic “Cândido Tostes”*. 2012;67(385):64–71.

Osman A, Goda HA, Abdel-Hamid M, Badran SM, Otte J. Antibacterial peptides generated by alcalase hydrolysis of goat whey. *LWT - Food Sci Technol*. 2016;65:480–6.

- Punyauppa-path S, Phumkhachorn P. Nisin: production and mechanism of antimicrobial action. *Int J Curr Res Rev*. 2015;7(2):47–53.
- Quintavalla S, Vicini L. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Sci*. 2002;62(3):373–80.
- Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*. 2014;5:1–17.
- Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2002;66(4):236–48.
- Théolier J, Hammami R, Labelle P, Fliss I, Jean J. Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *J Funct Foods*. 2013;5(2):706–14.
- Udechukwu MC, Collins SA, Udenigwe CC. Prospects of enhancing dietary zinc bioavailability with food-derived zinc-chelating peptides. *Food Funct*. 2016;7:4137-44.
- Udenigwe CC. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends Food Sci Technol*. 2014;36(2):137–43.
- Umesha S, Manukumar HM, Chandrasekhar B, Shivakumara P, Shiva Kumar J, Sri Raghava, *et al*. Aflatoxins and food pathogens: impact of biologically active aflatoxins and their control strategies. *J Sci Food Agric*. 2017;97(6):1698–707.
- Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev*. 2003;55(1):27–55.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo abordou de duas maneiras diferentes o tema de peptídeos antimicrobianos. Primeiramente, foi estabelecido um sistema bacteriano para expressão em tandem de peptídeos com potencial antimicrobiano, com foco em sua viabilidade em ser aplicável sustentavelmente em larga escala. Na sequência, peptídeos anfipáticos de cadeia curta derivados de proteínas do soro de leite foram testados *in vitro* frente a importantes patógenos e contaminantes da indústria de alimentos. Embora estes peptídeos tenham demonstrado potencial antimicrobiano *in silico*, os ensaios experimentais não comprovaram este efeito predito a partir de concentrações viáveis para aplicação. De qualquer forma, peptídeos de diferentes sequências derivados de proteínas de soro de leite permanecem como fortes candidatos como substitutos antimicrobianos naturais, visto que há muita divergência entre as atividades desempenhadas por estes peptídeos.

Para estudos futuros, sugere-se a utilização de hidrolisados proteicos contra patógenos alimentares e fungos micotoxigênicos, por se tratar de uma abordagem mais barata e que requer menos recursos tecnológicos que a produção de peptídeos isolados por sistemas de expressão, além de já haverem trabalhos demonstrando resultados promissores. Com os peptídeos isolados, poderão ser testadas doses mais altas ou combinadas, visando averiguar efeitos sinérgicos das moléculas frente aos microrganismos de grande interesse na indústria de alimentos. Em relação ao estabelecimento do sistema de expressão, os peptídeos derivados da enzima RuBisCO deverão ser testados frente a patógenos e contaminantes, de maneira análoga a apresentada no *Capítulo 3*. Independentemente do resultado a ser obtido, as técnicas e métodos aqui descritos (*Capítulo 2*) poderão ser utilizados para inserção de sequências codificantes de outros peptídeos.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Hamid M, Goda HA, De Gobba C, Jenssen H, Osman A. Antibacterial activity of papain hydrolysed camel whey and its fractions. *Int Dairy J.* 2016;61:91–8.
- Appendini P, Hotchkiss JH. Review of antimicrobial food packaging. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2002;(2):113–26.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria no. 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. *Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 out., 1997.*
- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(3):238–50.
- Demers-Mathieu V, Gauthier SF, Britten M, Fliss I, Robitaille G, Jean J. Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration. *Int Dairy J.* 2013;28(2):94–101.
- Epand RM, Vogel HJ. Discovery of antimicrobial peptides and their mechanism of action. *Biochim Biophys Acta.* 1999;11–28.
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(13):3784–8.
- Hale JD, Hancock RE. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007;5(6):951–9.
- Keymanesh K, Soltani S, Sardari S. Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry. *World J Microbiol Biotechnol.* 2009;25(6):933–44.
- Korhonen H. Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. *J Funct Foods.* 2009;1(2):177–87.
- Minkiewicz P, Dziuba J, Iwaniak A, Dziuba M, Darewicz M. BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *J AOAC Int.* 2008;91(4):965–80.
- Mooney C, Haslam NJ, Pollastri G, Shields DC. Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity. *PLoS One.* 2012;7(10).

Osman A, Goda HA, Abdel-Hamid M, Badran SM, Otte J. Antibacterial peptides generated by alcalase hydrolysis of goat whey. *LWT - Food Sci Technol*. 2016;65:480–6.

Pal B, Vij S, Hati S. Peptides functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*. 2014;54:171–9.

Sanjukta S, Rai AK. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. *Trends Food Sci Technol*. 2016;50:1–10.

Théolier J, Hammami R, Labelle P, Fliss I, Jean J. Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *J Funct Foods*. 2013;5(2):706–14.

Udenigwe CC. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends Food Sci Technol*. 2014;36(2):137–43.

Udenigwe CC, Aluko RE. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *J Food Sci*. 2012;77(1):R11-24.

Udenigwe CC, Gong M, Wu S. *In silico* analysis of the large and small subunits of cereal RuBisCO as precursors of cryptic bioactive peptides. *Process Biochem*. 2013;48(11):1794–9.

Udenigwe CC, Okolie CL, Qian H, Ohanenye IC, Agyei D, Aluko RE. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase as a sustainable and promising plant source of bioactive peptides for food applications. *Trends Food Sci Technol*. 2017;69:74–82.

ANEXO I



Diretrizes para Autores

Os manuscritos podem ser submetidos em português ou inglês. Todos os artigos devem ser inéditos e não podem ter sido encaminhados para apreciação simultânea por outros periódicos.

A **Revista Acadêmica: Ciência Animal** adota o sistema de revisão por pares (*peer review*). Os trabalhos recebidos são, inicialmente, apreciados pelos editores e, em conformidade com as normas para publicação e considerados como potencialmente publicáveis, são encaminhados para os coeditores de área, responsáveis por escolherem dois ou mais avaliadores após análise mais detalhada do trabalho. Após o recebimento das avaliações, os autores são notificados sobre a decisão dos editores e, caso aprovados, são informados sobre a provável data de publicação.

O tempo estimado de avaliação é de 4 a 6 meses e o de publicação é de 3 a 10 dias.

Uma vez aprovado para publicação, o manuscrito deverá estar obrigatoriamente acompanhado de declaração de tradução do *abstract* ou do texto todo no caso de artigos submetidos em inglês. Os custos da revisão são de responsabilidade dos autores e a declaração deve ser indexada no momento da submissão ou enviada ao e-mail: revistaacademica@pucpr.br após aprovação.

Sugestão de tradutores:

American Journal Experts

Editage

Elsevier

Tipos de trabalhos aceitos

Artigo: oriundo de resultado de pesquisa contendo novas descobertas significativas, o material apresentado deve ser original e conter: Título (pt/en); Resumo/Abstract; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Referências.

Artigo de revisão: deve abranger assuntos que estejam dentro do escopo da revista e que sejam de interesse atual. A estrutura deverá conter: Título (pt/en); Resumo/Abstract com palavras-chave/keywords; Introdução; Desenvolvimento do assunto (em tópicos ou não); Conclusão; Referências. Até 10.000 palavras, excluindo-se título, resumo/abstract e referências.

Carta ao editor: canal direto entre a revista e o leitor, o qual pode atuar como analista e contribuinte, abordando, analisando, questionando e até mesmo corrigindo dados de artigos já publicados. Texto livre.

Comunicação curta: relatos contendo dados inéditos e relevantes como resultados preliminares de uma pesquisa original. A estrutura deverá conter Título (pt/en); Resumo/Abstract com palavras-chave/keywords; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Referências. O texto deve ser elaborado entre 5 e 7 páginas e conter até três ilustrações.

Nota técnica: informação sobre determinado procedimento de importância, técnica ou método desenvolvido. A estrutura deverá conter Título (pt/en); Resumo/Abstract com palavras-chave/keywords; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Referências. O texto não deve exceder 8 páginas e pode conter até três ilustrações.

Relato de caso: diagnósticos raros, tratamento pioneiro ou resultado inusitado. A estrutura deverá conter Título (pt/en); Resumo/ Abstract com palavras-chave/keywords; Introdução; Relato do caso, incluindo resultados, discussão e conclusão; Referências. O texto deve ser elaborado entre 5 e 7 páginas e conter até três ilustrações.

Resenha de livro: análise crítica de produções literárias/científicas que estejam dentro do escopo da revista. Texto livre.

Revisão curta: estimula-se a submissão de revisões breves, objetivas e de temática pouco abordada. A estrutura deverá conter Título (pt/en); Resumo/Abstract com palavras-chave/keywords; Introdução; Desenvolvimento do assunto (em tópicos ou não); Conclusão; Referências. Até 6.000 palavras, excluindo-se título, resumo/abstract e referências.

Preparação dos manuscritos

- Os trabalhos devem ser submetidos somente online, na área de submissão, em português ou inglês.

- Devem ser digitados no Microsoft Word, formato A4, fonte Arial, tamanho 12 pt, margens 2,5 cm, justificado, espaçamento entre linhas 1,5, com numeração de páginas e linhas, incluindo as referências.
- Título em português (inicial maiúscula, negrito, Arial, 14pt, centralizado) e logo abaixo em inglês (inicial maiúscula, itálico, Arial, 12 pt, centralizado). Não esquecer de mencionar a espécie animal trabalhada e evitar construções como "Efeito de", "Contribuição ao", "Influência de".
- Nome, e-mail e vínculo institucional de cada autor devem ser registrados no momento da submissão e não constarem no arquivo Word. Sugerimos que todos os autores estejam registrados no ORCID e que o ID de cada um seja informado na hora da submissão.

Artigos

Corpo do texto

a) Resumo e *abstract*: entre 150 e 350 palavras, deverão incluir, sequencialmente e em parágrafo único, objetivos, material e método, resultados, conclusão e palavras-chave/keywords. O número de descritores (palavras-chave/keywords) é de no mínimo três e no máximo cinco, separados por ponto.

b) Introdução: descrição concisa do estado da arte em relação ao tema pesquisado, abordando-se a revisão bibliográfica pertinente. Ao final da Introdução, inserir os objetivos do estudo.

c) Materiais e Métodos: devem ser incluídas, de forma resumida e objetiva, informações que possibilitem outros pesquisadores repetirem o estudo. Referenciar as técnicas padronizadas, os procedimentos metodológicos e materiais utilizados. Ao final de “Material e Método”, inserir o item “Análise estatística” isolado, com o intento de vislumbrar a metodologia estatística empregada para se chegar aos resultados.

d) Resultados: devem oferecer uma descrição sintética das novas descobertas. Neste item serão inseridas as tabelas, gráficos e similares, sem interpretações e comparações.

e) Discussão: interpretar e comparar os resultados, relacionando-os aos conhecimentos existentes (uso de publicação de outros pesquisadores) e salientando, principalmente, achados inéditos da pesquisa e a causa/consequência de tal descoberta. O item Discussão pode ser apresentado junto com Resultados.

f) Conclusão: é a síntese conclusiva, embasada nos resultados e na discussão, na qual expressa-se a relação intrínseca entre o título e os objetivos. Não há citação bibliográfica.

g) Referências: no corpo do texto devem ser citadas conforme exemplos abaixo.

Um autor

a) De acordo com Jordan (1985), a ciclagem do...

b) A ciclagem do... (Jordan, 1985).

Dois autores

a) Segundo Magalhães e Blum (1999)...

b) Qualquer que seja o motivo que tenha provocado as diferenças... (Magalhães e Blum, 1999).

Três ou mais autores

a) Conforme Floss et al. (1999), os estudos...

b) Os estudos sobre... (Floss et al., 1999).

Na seção **REFERÊNCIAS**, inserir somente as utilizadas no texto, organizadas em ordem alfabética (considerando o sobrenome dos autores) e não numeradas. Evitar referências de internet, livros, teses e dissertações.

Artigos de periódicos (até 6 autores)

Bala AN, Garba AE, Yazah AJ. Bacterial and parasitic zoonoses encountered at slaughter in Maiduguri abattoir, north-eastern Nigeria. Vet World. 2011;4(10):437-43.

Artigos de periódicos (mais de 6 autores)

Peachey LE, Pinchbeck GL, Matthews JB, Burden FA, Lespine A, von Samson-Himmelstjerna G, et al. P-glycoproteins play a role in ivermectin resistance in cyathostomins. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2017;7(3):388-98.

Obs.: Sugerimos o [PubMed](#) para verificação do título abreviado dos periódicos e da forma correta de referenciar um artigo.

Livro (um autor)

Jordan CF. Nutrient cycling in tropical forest ecosystems. New York: John Wiley; 1985. 190 p.

Livro (mais que 6 autores)

Iverson C, Flanagan A, Fontanarosa PB, Glass RM, Glitman P, Lantz JC, et al. American Medical Association manual of style. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. p.85-9.

Capítulos de livros com autoria

Rose AH. Yeast, a microorganism for all species: a theoretical look at its mode of action. In: Lyons TP (Ed). Biotechnology in the feed industry. Nicholasville: Alltech Technical Publications; 1997. p. 113-8.

Dissertações ou teses

Socher LG. Dinâmica e biomassa aérea de um trecho de Floresta Ombrófila Mista Aluvial no município de Araucária, Paraná [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2004. 87 p.

Trabalho apresentado em Congressos, Simpósios e similares

Duarte KF. Differentiation of Solid Renal Tumors with Multiparametric MR Imaging. 5th Germ Cell Tumour Conference; 2001 Sep 13-15; Leeds, UK. New York: Springer; 2008.

Moreira CA, Duarte IFG, Baum AP. Atividades antioxidantes das bactérias do ácido láctico para melhorar a qualidade da salsicha fermentada. In: Silva JA, Ribeiro E, editores. Genetic programming. 6º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes; 2002 Apr 3-5; São Pedro, SP. Rio de Janeiro: Objetiva; 2002. p. 150-81.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. O manuscrito é inédito e não foi encaminhado para apreciação simultânea por outros periódicos.
2. Os trabalhos podem ser submetidos em português ou em inglês. Devem ser digitados no Microsoft Word, formato A4, fonte Arial tamanho 12 pt (em todo o manuscrito), margens 2,5 cm, justificado, espaçamento entre linhas 1,5, com numeração de páginas e linhas, incluindo as referências.

3. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, e URLs para as referências foram informadas quando possível.
4. A criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território brasileiro, obedece aos critérios estabelecidos na Lei nº. 11.794, de 8 de outubro de 2008. Caso a pesquisa remeta à utilização de animais, será necessário mencionar o número do protocolo com a aprovação concedida pelo Comitê de Ética da Instituição em questão na seção "Material e método" e anexar, no momento da submissão, documento comprobatório na seção "documentos suplementares".

Declaração de Direito Autoral

O(s) autor(es) transfere(m), por meio de cessão, à EDITORA UNIVERSITÁRIA CHAMPAGNAT, pessoa jurídica de direito privado, inscrita no CNPJ/MF sob o n.º 76.659.820/0009-09, estabelecida na Rua Imaculada Conceição, n.º 1155, Prado Velho, CEP 80.215-901, na cidade de Curitiba/PR, os direitos abaixo especificados e se compromete a cumprir o que segue:

- Os autores afirmam que a obra/material é de sua autoria e assumem integral responsabilidade diante de terceiros, quer de natureza moral ou patrimonial, em razão de seu conteúdo, declarando, desde já, que a obra/material a ser entregue é original e não infringe quaisquer direitos de propriedade intelectual de terceiros.
- Os autores concordam em ceder de forma plena, total e definitiva os direitos patrimoniais da obra/material à EDITORA UNIVERSITÁRIA CHAMPAGNAT, a título gratuito e em caráter de exclusividade.
- A CESSIONÁRIA empregará a obra/material da forma como melhor lhe convier, de forma impressa e/ou on line, inclusive no site do periódico da EDITORA UNIVERSITÁRIA CHAMPAGNAT, podendo utilizar, fruir e dispor do mesmo, no todo ou em parte, para:
 - Autorizar sua utilização por terceiros, como parte integrante de outras obras.
 - Editar, gravar e imprimir, quantas vezes forem necessárias.
 - Reproduzir em quantidades que julgar necessária, de forma tangível e intangível.
 - Adaptar, modificar, condensar, resumir, reduzir, compilar, ampliar, alterar, mixar com outros conteúdos, incluir imagens, gráficos, objetos digitais, infográficos e hyperlinks, ilustrar, diagramar, fracionar, atualizar e realizar quaisquer outras transformações, sendo necessária a participação ou autorização expressa dos autores.
 - Traduzir para qualquer idioma.

- Incluir em fonograma ou produção audiovisual.
 - Distribuir.
 - Distribuir mediante cabo, fibra ótica, satélite, ondas ou qualquer outro sistema que permite ao usuário realizar a seleção da obra ou produção para recebê-la em tempo e lugar previamente determinados por quem formula a demanda e nos casos em que o acesso às obras ou produções se faça por qualquer sistema que importe em pagamento pelo usuário.
 - Incluir e armazenar em banco de dados, físico, digital ou virtual, inclusive nuvem.
 - Comunicar direta e/ou indiretamente ao público.
 - Incluir em base de dados, arquivar em formato impresso, armazenar em computador, inclusive em sistema de nuvem, microfilmar e as demais formas de arquivamento do gênero.
 - Comercializar, divulgar, veicular, publicar etc.
 - Quaisquer outras modalidades de utilização existentes ou que venham a ser inventadas.
1. Os autores concordam em conceder a cessão dos direitos da primeira publicação (ineditismo) à revista, licenciada sob a CREATIVE COMMONS ATTRIBUTION LICENSE, que permite o compartilhamento do trabalho com reconhecimento da autoria.
 2. Os autores autorizam a reprodução e a citação de seu trabalho em repositórios institucionais, página pessoal, trabalhos científicos, dentre outros, desde que a fonte seja citada.
 3. A presente cessão é válida para todo o território nacional e para o exterior.
 4. Este termo entra em vigor na data de sua assinatura e é firmado pelas partes em caráter irrevogável e irretratável, obrigando definitivamente as partes e seus sucessores a qualquer título.
 5. O não aceite do artigo, pela EDITORA UNIVERSITÁRIA CHAMPAGNAT, tornará automaticamente sem efeito a presente declaração.

Obs: Não é preciso enviar a Declaração de Direito Autoral em arquivo separado, uma vez que, durante o processo de submissão, será solicitado ao autor que concorde com os termos acima citados antes do envio do manuscrito.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

ISSN: 1981-4178