

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Sara Salomão Salles**

**PROSPECÇÃO *IN SILICO* DE NOVOS PEPTÍDEOS  
ANTIMICROBIANOS A PARTIR DE FRAGMENTOS PROTEOLÍTICOS  
DE LEITE BOVINO**

Juiz de Fora  
2012

**SARA SALOMÃO SALLES**

**PROSPECÇÃO *IN SILICO* DE NOVOS PEPTÍDEOS  
ANTIMICROBIANOS A PARTIR DE FRAGMENTOS PROTEOLÍTICOS  
DE LEITE BOVINO**

**Dissertação de Mestrado do Curso de  
Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas, para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências Biológicas na área  
de Genética e Biotecnologia.**

**Orientador: Octávio Luiz Franco**

Juiz de Fora  
2012

Salles, Sara Salomão.

Prospecção *in silico* de novos peptídeos antimicrobianos a partir de fragmentos proteolíticos de leite bovino / Sara Salomão Salles. – 2012. 120 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Imunologia e DIP/ Genética e Biotecnologia)— Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. Tecnologias de Alimentos. 2. Alimento Funcional. I. Título.

CDU 663/664

"Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares." - Josué 1:9

## AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos...

a Deus, pela saúde e sabedoria a mim oferecidos para que eu pudesse vencer todas as dificuldades encontradas em minha caminhada.

à minha mãe Julia, meu maior exemplo de perseverança, por sempre acreditar em mim e em meus sonhos. Obrigada por me permitir alçar voos distantes!

ao meu pai Nacimar, que embora não esteja fisicamente conosco, se faz presente em minhas doces lembranças.

à minha filha Stella, por ser a principal razão de todo meu esforço e dedicação em busca de um futuro melhor.

ao meu marido Vinícius, meu grande amigo, companheiro e incentivador, por caminhar ao meu lado e oferecer todo o suporte para que eu me dedicasse à minha carreira.

aos meus sogros (Luzia e Paulo) e cunhado (Vitor), por me tão bem me acolher em sua família e por todo apoio nos momentos mais difíceis.

aos meus familiares e amigos que, de certa forma, contribuíram para a realização deste trabalho através do carinho e alegria transmitidos através de um telefonema, mensagem, email, conversa, abraço ou sorriso.

aos professores, funcionários e alunos do Programa de Mestrado em Genética e Biotecnologia (UFJF), por partilharem comigo conhecimentos e experiências que vão além da sala de aula. Em especial, ao Prof. Raúl, que sempre me ofereceu palavras de incentivo. Ao Prof. Marcelo, por aceitar o convite para integrar à banca examinadora e por seus sábios ensinamentos durante todo o curso. Aos colegas

Mayna, Natália, Luiz, Paula Loures, Paula Nascimento, Joyce, Job e Gabriel que muito ajudaram durante os trabalhos e disciplinas.

aos professores, funcionários e alunos do CAPB (Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas) de Brasília, pela valiosa parceria na realização deste trabalho. Em especial, à Prof. Simoni, por aceitar o convite para integrar à banca examinadora e por suas valiosas sugestões. À Kênia, por suas caronas e seu empenho na resolução de alguns impecilhos. Ao Ludovico, por me ajudar nos primeiros passos da modelagem molecular. Ao Osmar por sua ajuda na realização dos ensaios hemolíticos. À Michelle, por me ensinar (ou tentar ensinar) um pouco sobre práticas laboratoriais e por me acompanhar incansavelmente na realização dos bioensaios. À Betty, Simone, Suzana, Alícia e Michelle, pela calorosa hospedagem e por tornarem menos desgastantes os momentos longe da casa.

ao meu querido orientador, Prof. Octávio, meus mais sinceros agradecimentos por confiar em meu potencial, por sua preciosa orientação e, principalmente, pelo exemplo de profissional e pesquisador.

à CAPES, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A melhoria da qualidade da alimentação pode desempenhar efeitos fisiológicos benéficos e reduzir o risco a certas doenças. O leite contribui para a ingestão recomendada de nutrientes e promove a saúde através de seus componentes biologicamente ativos que a ele agregam inúmeras funcionalidades além da nutrição. A busca por novos antibióticos de amplo espectro de ação tem aumentado nas últimas décadas devido ao número crescente de bactérias resistentes aos antibióticos convencionais. Neste sentido, as proteínas do leite bovino, após fragmentação, podem ser promissoras fontes de peptídeos antimicrobianos (PAMs), que ficam inativos quando internalizados em uma sequência protéica maior e podem ser liberados a partir de enzimas digestivas durante o trânsito gastrointestinal. Neste trabalho, sequências protéicas provenientes do leite foram obtidas em banco de dados e sumariamente clivadas *in silico* por enzimas gastrointestinais (pepsina, tripsina e quimotripsina). Esta clivagem virtual disponibilizou inúmeros peptídeos que foram analisados e selecionados com relação a inúmeras características inerentes à AMPs, tais como tamanho, carga, composição, hidrofobicidade, momento hidrofóbico e estruturação. Cinco peptídeos (lactof01, lactof02, A\_lacto01, serumA01 e serumA02) foram selecionados e tiveram sua estrutura tridimensional construída teoricamente por meio de modelagem molecular por homologia sendo estas validadas através de servidores *web*. Estes peptídeos foram sintetizados manualmente e testados *in vitro* contra microrganismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativos (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*). Os peptídeos exibiram baixa atividade antimicrobiana. Entretanto foi verificado que lactof02 foi o mais ativo contra Gram-negativas e A\_lact01 foi o mais ativo contra Gram-positivas. Os ensaios hemolíticos indicaram que os peptídeos apresentaram atividade hemolítica variável. Através da análise dos testes *in vitro* foi possível verificar que a hidrofobicidade global e intrínseca dos peptídeos pode ter sido determinante na modulação da atividade antimicrobiana e hemolítica.

Palavras-chave: alimentos funcionais, leite, proteínas, peptídeos antimicrobianos.

## ABSTRACT

The nutrition quality improvement may play beneficial physiological effects and also reduce the risk of certain diseases. Milk contributes to the recommended nutrients intake and could promote health through its biologically active components, adding many features to nutrition. Otherwise, the search for a new broad-spectrum antibiotic action has increased in last decades due to the increased number of bacteria resistant to conventional antibiotics. In this view, bovine milk proteins are promising antimicrobial peptides (AMPs) sources, which are inactive when are located inside of a large protein sequence and could be released by digestive enzymes during gastrointestinal transit. Here, those peptide sequences were obtained from free databases and summarily cleaved by gastrointestinal enzymes (pepsin, trypsin and chymotrypsin). This virtual cleavage provided a wide number of peptides that were analyzed and selected according to the inherent AMPs properties, such as size, charge, composition, hydrophobicity, hydrophobic moment and structuring. Five peptides (lactof01, lactof02, A\_lacto01, serumA01 e serumA02) were selected, being their three-dimensional structure constructed by homology modeling and validated through web servers. These peptides were synthesized and *in vitro* tested against Gram-positives (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negatives (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) microorganisms. The peptides exhibited low antimicrobial activity. Nevertheless it was found that lactof02 was the most active against Gram-negatives and A\_lact01 was the most active against Gram-positives. The hemolytic assays indicated that the peptides showed variable hemolytic activity. Through *in vitro* analysis of tests it was possible to verify that global and intrinsic peptides hydrophobicity seems to be crucial for modulation of antimicrobial and hemolytic activities.

Keywords: functional foods, milk, proteins, antimicrobial peptides.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Principais caminhos a nível celular para o transporte intestinal de nutrientes e compostos alimentares	19
Figura 2.	Campanhas de incentivo ao consumo de leite no Brasil realizadas pela Láctea Brasil (A), bebaleite.com.br (B) e EPAMIG - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (C)	23
Figura 3.	Representação esquemática sobre os principais modelos de formação de poros dos PAMs na bicamada lipídica de microrganismos	34
Figura 4.	Alvos intracelulares de PAMs	35
Figura 5.	Principais efeitos fisiológicos de peptídeos bioativos	42
Figura 6.	a) Representação em <i>cartoon</i> do peptídeo lactof01 construído através de modelagem por homologia usando o programa Modeller 9v8. b) Representação do mapa eletrostático de superfície do peptídeo lactf01, obtido através do servidor PDB2PQR, através do qual é visualizada a distribuição de cargas negativas (vermelho) e cargas positivas (azul).	63
Figura 7.	a) Representação em <i>cartoon</i> do peptídeo lactof02 construído através de modelagem por homologia usando o programa Modeller 9v8. b) Representação do mapa eletrostático de superfície do peptídeo lactf02, obtido através do servidor PDB2PQR, através do qual é visualizada a distribuição de cargas negativas (vermelho) e cargas positivas (azul).	64
Figura 8.	a) Representação em <i>cartoon</i> do peptídeo A_lact01 construído através de modelagem por homologia usando o programa Modeller 9v8. b) Representação do mapa eletrostático de superfície do peptídeo A_lact01, obtido através do servidor PDB2PQR, através do qual é visualizada a distribuição de cargas negativas (vermelho) e cargas positivas (azul).	65

Figura 9.	<p>a) Representação em <i>cartoon</i> do peptídeo serumA01 construído através de modelagem por homologia usando o programa Modeller 9v8. b) Representação do mapa eletrostático de superfície do peptídeo serumA01, obtido através do servidor PDB2PQR, através do qual é visualizada a distribuição de cargas negativas (vermelho) e cargas positivas (azul).</p>	66
Figura 10.	<p>a) Representação em <i>cartoon</i> do peptídeo serumA02 construído através de modelagem por homologia usando o programa Modeller 9v8. b) Representação do mapa eletrostático de superfície do peptídeo serumA02, obtido através do servidor PDB2PQR, através do qual é visualizada a distribuição de cargas negativas (vermelho) e cargas positivas (azul).</p>	67
Figura 11.	<p>Mapas de Ramachandran dos peptídeos lactof01 (A), lactof02 (B), A_lact01 (C), serumA01 (D) e serumA02 (E).</p>	69
Figura 12.	<p>Trama de z-scores para avaliação dos peptídeos lactof01 (A), lactof02 (B), A_lact01 (C), serumA01 (D) e serumA02 (E).</p>	71
Figura 13.	<p>Avaliação da atividade antimicrobiana dos peptídeos lactof01, lactof02, A_lact01, serumA01 e serumA02 sobre as bactérias <i>E. coli</i> (ATCC 8739)(A), <i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883) (B) e <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) (C) após 120 minutos de ensaio na concentração de 512 mg.L<sup>-1</sup>.</p>	74
Figura 14.	<p>Análise da taxa hemolítica dos peptídeos lactof01, lactof02, A_lact01, serumA01 e serumA02.</p>	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Produção mundial de leite de diferentes espécies de animais – 1997/2009	21
Tabela 2.	Principais países produtores de leite bovino no mundo – 2009	21
Tabela 3.	Quantificação dos componentes gerais do leite bovino	24
Tabela 4.	Dados sobre as principais WP do leite bovino	27
Tabela 5.	Principais PAMs do leite bovino registrados na literatura	46
Tabela 6.	Especificidade das proteases utilizadas	49
Tabela 7.	Dados de identificação das proteínas do leite bovino	58
Tabela 8.	Quantificação de fragmentos obtidos após fragmentação e selecionados após aplicação de parâmetros seletivos	61
Tabela 9.	Fragmentos selecionados após aplicação de todos os parâmetros seletivos	61
Tabela 10.	Moldes escolhidos após submissão das sequências ao BLASTp	62
Tabela 11.	Valores de RMSD calculados através do 3DSS	68
Tabela 12.	Valores de z-score dos peptídeos modelados	70
Tabela 13.	Análise de massa dos peptídeos através da utilização de um espectrômetro de massa do tipo MALDI-ToF	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácidos
$\alpha$ -LA	<i>Alpha-lactalbumin</i>
AMP	<i>Antimicrobial peptide</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
$\alpha_{s1}$ -CN	<i>Alpha-<sub>s1</sub> casein</i>
$\alpha_{s2}$ -CN	<i>Alpha-<sub>s2</sub> casein</i>
$\beta$ -CN	<i>Beta-casein</i>
$\beta$ -LG	<i>Beta-lactoglobulin</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CMP	Caseinomacropéptido
CN	Caseína
CPP	Caseinofosfopeptídeo
DNA	Ácido desoxiribonucléico
FOSHU	<i>Foods for Specified Health Use</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
g	Gramas
g.L <sup>-1</sup>	Grama/Litro
h	Horas
HIV	Human immunodeficiency virus
K-CN	<i>Kappa-casein</i>
kDa	Kilodaltons
LF	<i>Lactoferrin</i>
LP	Lactoperoxidase
LPS	Lipossacarídeos
LYS	<i>Lysozyme</i>
min	Minutos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAM	Peptídeo antimicrobiano
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	Potencial de hidrogênio iônico
RNA	Ácido ribonucléico
UHT	<i>Ultra-high temperature</i>
WP	<i>Whey Proteins</i>

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1.	Alimentos Funcionais	15
1.1.1.	Peptídeos Bioativos	17
1.2.	Leite Bovino	19
1.2.1.	Composição geral e as proteínas do leite	24
1.2.1.1.	Proteínas do soro (WP)	26
1.3.	Peptídeos Antimicrobianos	31
1.3.1.	Fragmentos com atividade antimicrobiana	36
1.3.2.	Peptídeos antimicrobianos de leite	39
2.	OBJETIVOS	47
2.1.	Objetivos gerais	47
2.2.	Objetivos específicos	47
3.	MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1.	Obtenção e fragmentação das sequências protéicas	48
3.2.	Seleção de fragmentos com características de PAMs	49
3.3.	Modelagem Molecular	51
3.3.1.	Identificação dos moldes	51
3.3.2.	Construção dos modelos	51
3.3.3.	Validação dos modelos	52
3.4.	Síntese dos peptídeos e determinação de sua massa e pureza	54
3.5.	Quantificação	55
3.6.	Testes <i>in vitro</i> para avaliação de atividade antimicrobiana	56
3.7.	Ensaio hemolítico	57
4.	RESULTADOS	58
4.1.	Obtenção e fragmentação das sequências protéicas	58
4.2.	Seleção de fragmentos com características de PAMs	58
4.3.	Modelagem Molecular	62
4.3.1.	Validação dos modelos	68
4.4.	Síntese dos peptídeos e determinação de sua massa e pureza	72

4.5.	Testes <i>in vitro</i> para avaliação da atividade antimicrobiana	72
4.6.	Ensaio hemolítico	75
5.	DISCUSSÃO	76
6.	CONCLUSÃO	87
7.	PERSPECTIVAS	88
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Alimentos Funcionais

A ingestão desequilibrada de nutrientes, maus hábitos alimentares e/ou estilo de vida estão associados ao desenvolvimento de doenças crônicas como: problemas cardiovasculares, diabetes tipo II, alguns tipos de câncer, bem como maior ou menor longevidade. Isso pode refletir os efeitos diretos dos fatores alimentares sobre processos genéticos e moleculares que podem influenciar na resposta imune devido a alterações na expressão gênica e produção de proteínas e metabólitos. A consolidação destes conceitos revolucionou o campo da nutrição, possibilitando o desenvolvimento da "nutrigenética", referindo-se este termo ao impacto da genética nas necessidades individuais de nutrientes e "nutrigenômica" referindo-se à maneira como a alimentação regula a expressão ou função dos genes (RAQIB e CRAVIOT, 2009).

O conceito '*alimentos funcionais*' originou-se no Japão, durante a década de 1980, quando autoridades sanitárias estudavam meios de controlar os custos relacionados a cuidados com saúde da crescente população idosa, apoiando pesquisas que possibilitaram a regulamentação da chamada 'comida para uso específico da saúde' (*Foods for Specified Health Use - FOSHU*). Este termo passou a ser usado a fim de sugerir uma melhoria da qualidade de vida através de alimentos. Estes além de satisfazerem às necessidades nutricionais básicas, também podem desempenhar efeitos fisiológicos benéficos e poderiam reduzir os riscos a certas doenças, bem como, aumentar a expectativa de vida (ARAI, 1996).

Atualmente, inúmeros países possuem regulamentação sobre alimentos funcionais e desenvolvem pesquisas sobre seus benefícios para a promoção e manutenção da saúde. No Brasil, as regras foram instituídas a partir de 1999, pelo Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio das Resoluções nº 17,18 e 19 de 30/04/1999 que estabelecem normas e procedimentos para registro de alimentos e/ou ingredientes funcionais. Para a

obtenção do registro, a empresa interessada deve formular um relatório técnico-científico detalhado, comprovando os benefícios e a segurança do uso do alimento (BRASIL, 1999).

Não existe um termo universalmente aceito sobre alimentos funcionais, o que possibilita a criação de inúmeros nomes para referenciá-los: alimentos medicinais, vitaminas alimentares (*vitafoods*), dietas suplementares e alimentos fortificados (HUNT, 1994). Exemplos de alimentos funcionais incluem aqueles com fibra dietética, açúcares alcoólicos ou açúcares de baixa energia, aminoácidos, peptídeos bioativos, ácidos graxos insaturados, fitoesteróis, vitaminas e minerais, antioxidantes, bactérias ácido-lácticas e outras substâncias excitantes ou tranqüilizantes. Desta forma, alimentos naturais, como frutas e vegetais são a forma mais simples de um alimento funcional (exemplo: brócolis, cenoura ou tomates são ricos em sulforafano,  $\beta$ -caroteno e licopeno, respectivamente) (FAO, 2007).

Os alimentos e ingredientes funcionais podem ser classificados quanto aos benefícios que oferecem, atuando em seis áreas do organismo: no sistema gastrointestinal, no sistema cardiovascular, no metabolismo de substratos, no crescimento, no desenvolvimento e diferenciação celular, no comportamento fisiológico e também pode funcionar como antioxidantes (SOUZA, SOUZA e MAIA, 2003).

Além do interesse estatal (economia em estratégias de políticas públicas e prevenção de doenças) e industrial (lucratividade sobre produção e comércio de alimentos funcionais manipulados), a população tem demonstrado crescente interesse sobre a estreita relação entre alimentação e saúde. Diminuir os gastos médicos, envelhecer com saúde e qualidade de vida, e também, neutralizar os danos causados pelo meio ambiente, são os principais motivos a impulsionar inúmeros estudos voltados aos alimentos funcionais (JONES, 2002; MILNER, 1999).

De acordo com informações da FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (2007), “o mercado mundial de alimentos e bebidas funcionais tem sido altamente dinâmico. O Japão hoje consiste no maior mercado do mundo em US \$ 11,7 bilhões, seguido dos Estados Unidos com venda de US \$ 10,5 bilhões, enquanto o mercado europeu ainda não apresentou grande desenvolvimento, com um valor estimado de US \$ 7,5 bilhões. A demanda por alimentos funcionais, nos países em desenvolvimento, está crescendo e apresentando uma oportunidade lucrativa para desenvolvimento de seu mercado.

No Brasil, o setor é relativamente jovem, mas cresce rapidamente, sendo o valor das vendas estimado em US \$ 1,9 bilhões, em 2009”.

A taxa anual de crescimento deste mercado varia entre 8 % e 14 %, com grande tendência a aumentarem devido às mudanças demográficas, estilo de vida e desenvolvimento de inúmeros problemas de saúde; o que demanda maior consumo de alimentos e produtos relacionados à saúde e bem-estar (FAO, 2007). A notoriedade conquistada neste campo incentiva o estudo dos mais variados compostos funcionais, tendo como destaque os carotenóides (HUSSEIN et al., 2006), as fibras dietéticas solúveis e insolúveis (KLOSTERBUER, ROUGHEAD E SLAVIN, 2011), os ácidos graxos essenciais (DAS, 2011), os flavonóides (PROCHÁZKOVÁ, BOUŠOVÁ E WILHELMOVÁ, 2011), os indóis e isotiocianatos (CAVELL et al., 2011), os fitoestrógenos (VIRK-BAKER, NAGY E BARNES, 2010), os sulfetos alílicos ou alil sulfetos (WANG et al., 2010), os taninos (SERRANO et al., 2009), os probióticos (RIJKERS et al., 2010) e os peptídeos bioativos (IWANIAK E MINKIEWICZ, 2008).

### **1.1.1 Peptídeos Bioativos**

As proteínas que compõem naturalmente os alimentos podem servir como fontes de componentes biologicamente ativos, cuja liberação pode ocorrer através de hidrólise enzimática por meio de proteases gastrointestinais (ex.: pepsina, tripsina e quimotripsina) e/ou fermentação microbiana, como ocorre na maturação de queijos (KORHONEN e PIHLANTO, 2006).

A massa molecular dos peptídeos bioativos pode ser variável. Entretanto, apenas sua sequência de aminoácidos pode ser diretamente responsável por suas propriedades estruturais e fisicoquímicas e sua função relativa; possibilitando, também, que alguns apresentem propriedades multifuncionais (FRANCO, 2011; KORHONEN e PIHLANTO, 2006). Estes peptídeos devem apresentar resistência às condições de degradações subsequentes em meio orgânico, as quais podem levar a perda completa de sua bioatividade; capacidade de adsorção à mucosa intestinal e

capacidade para alcançar os organismos-alvo (MÖLLER et al., 2008; QUIRÓS et al., 2009).

A absorção de peptídeos intactos tem sido considerada um processo fisiológico normal, pois estes podem escapar do processo de digestão sem afetar sua função bioativa. O tamanho, a composição e, conseqüentemente, a hidrofobicidade afetam a via de transporte de tais peptídeos (SHIMIZU e SON, 2007). Acredita-se que peptídeos menores (02-03 aminoácidos) podem ser absorvidos de forma mais fácil e rápida em comparação com peptídeos maiores (ROBERTS et al., 1999). Entretanto, existem registros sobre peptídeos contendo entre 10-51 aminoácidos que foram absorvidos intactos e exibiram suas funções fisiológicas em nível tecidual (ZALOGA e SIDDIQUI, 2004; ROBERTS et al., 1999).

As possíveis rotas de absorção de peptídeos bioativos a nível celular incluem (Figura 1): I) mediado por carreador - envolve a saída de alguns peptídeos do enterócito através de um portal de circulação via transportador, localizado na membrana basolateral intestinal, pequenos peptídeos (di- ou tri-peptídeos) resistentes à hidrólise são mais comuns a adotarem essa rota; II) transcitose - acontece através da ligação dos peptídeos a moléculas celulares e posterior absorção pela célula por meio de vesiculação, essa rota pode ser usual para grandes peptídeos básicos e/ou hidrofóbicos; III) difusão paracelular – ocorre por meio do processo de difusão passiva, independente de energia, cujos principais candidatos são peptídeos solúveis em água; IV) junção estreita – rota rápida localizada nas junções estreitas das células do epitélio intestinal, peptídeos hidrofóbicos podem ser transportados por esta via; V) transporte transcelular – rota que apresenta característica comuns entre a via mediada por carreador e transcitose (PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2000; SAMARDI e ISMAIL, 2010; SHIMIZU e SON, 2007).

Muitos peptídeos de origem animal e vegetal com potencial bioativo relevante foram descobertos e estão sendo cada vez mais estudados. Esses peptídeos podem ser encontrados em: leite, ovos, carnes e peixes, bem como em diferentes fontes de proteínas vegetais, como soja e trigo, além de produtos industrializados (HARTMANN e MEISEL, 2007; MÖLLER et al., 2008).

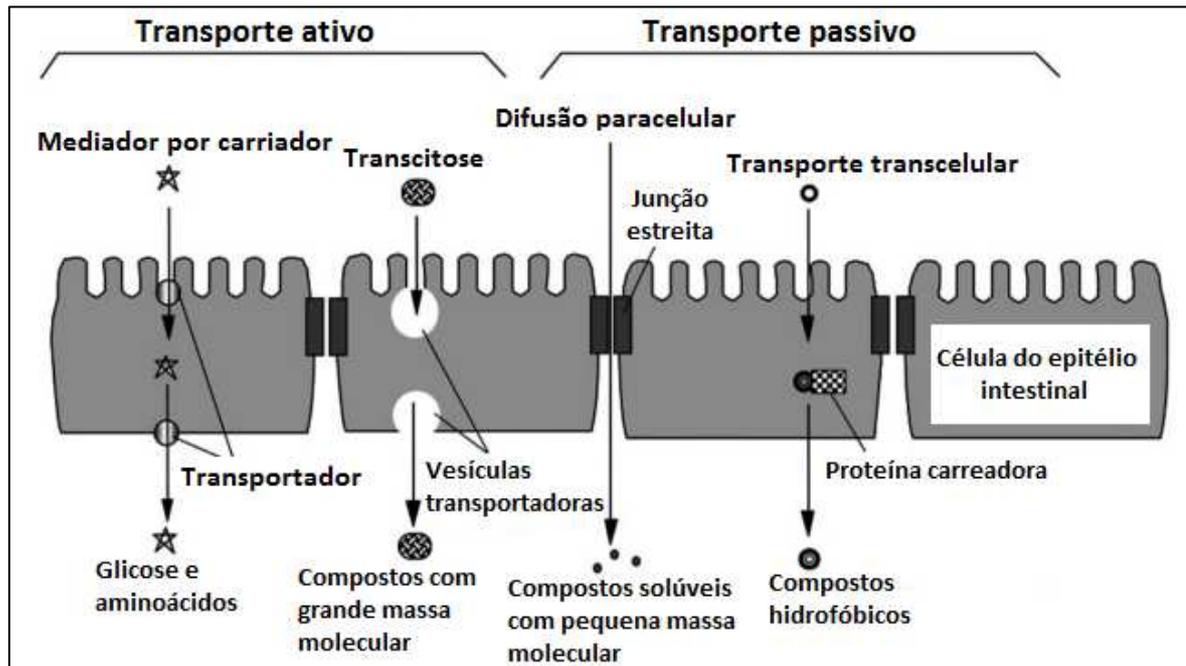


Figura 1 – Principais caminhos a nível celular para o transporte intestinal de nutrientes e compostos alimentares. Adaptado de SHIMIZU e SON, 2007.

Dentre os inúmeros benefícios à saúde relacionados ao consumo destes peptídeos, destacam-se: efeito opióide, anti-hipertensivo, estimulação da absorção de minerais, atividade antimicrobiana, efeito imunomodulatório e citomodulatório, ação antitrombótica e antioxidante e diminuição dos níveis de colesterol (HARTMANN e MEISEL, 2007; IWANIAK e MINKIEWICZ, 2008; KITTS e WEILER, 2003).

## 1.2 Leite Bovino

O leite e seus derivados contribuem para a ingestão recomendada de nutrientes e promovem a saúde por toda a vida, desde a infância até os anos mais avançados. Segundo definições presentes na Instrução Normativa nº 51, de 18/09/2002, do Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento, “entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta,

em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda”.

Quimicamente, o leite consiste em uma dispersão mista de aspecto branco, opaco, levemente adocicado, tendendo à neutralidade, constituído de gorduras em emulsão, proteínas em estado coloidal, carboidratos (lactose), sais mineirais, vitaminas em solução, sendo a água o meio dispersante. Considerado o mais nobre dos alimentos por sua composição, o leite bovino também possui componentes biologicamente ativos que a ele agregam funcionalidades além da nutrição. Sua qualidade é influenciada por muitas variáveis, entre as quais se destacam fatores zootécnicos associados ao manejo e alimentação, além do potencial genético dos rebanhos e fatores relacionados à obtenção e armazenagem do leite (BOUDONCK et al., 2009; EBRINGER, FERENCÍK e KRAJCOVIC, 2008; MANSSON, 2008; FONSECA, 1997; KITCHEN, 1981)

O leite fresco apresenta sabor característico (adocicado, não-ácido e não-amargo) devido a relação entre lactose e outros componentes, embora outros fatores também o influenciem, como: raça, alimentação, condições de saúde do animal e ambiente de ordenha. Sua cor branca resulta da dispersão da luz refletida pelos glóbulos de gordura e pelas partículas coloidais de caseína e fosfato de cálcio; cores anormais podem resultar do desenvolvimento microbiano de diversas origens, com exceção ao tom amarelado, que provém do pigmento caroteno, componente comum do leite. A acidez natural varia entre 0,13 e 0,17 por cento, expressa em ácido láctico, cuja formação deve-se a transformação da lactose por enzimas microbianas; enquanto seu pH varia entre 6,6 e 6,8 (FONSECA, 1997).

De acordo com dados da Embrapa, em 2009, o leite de vaca tem sido produzido mundialmente em maior quantidade quando comparado com o de outras espécies (Tabela 1). Dentre os maiores produtores mundiais, o continente americano ocupa o segundo lugar, representando 28,7 % do montante produzido. Neste panorama, o Brasil é 5º país com maior produção deste alimento, o que equivale a 5 % da produção mundial (Tabela 2). Os estudos estimativos realizados demonstram que a produção de leite de vaca em nosso país apresentou considerável crescimento desde 1990; o que levou a elaboração de leis e normas técnicas para garantir não somente a qualidade do alimento produzido, mas também, assegurar nenhum prejuízo à saúde do consumidor.

Tabela 1 – Produção mundial de leite de diferentes espécies de animais – 1997/2009

Espécies	Produção de Leite (mil toneladas)				Total 2009 (%)
	1997	2002	2007	2009	
Vaca	468,9	507,8	560,5	583,4	83,1
Búfala	59,9	70,9	85,4	92,1	13,1
Cabra	12,1	13,3	14,8	15,5	2,2
Ovelha	8,5	8,6	9,1	9,2	1,3
Camelo	1,4	1,4	1,5	1,8	0,3
<b>TOTAL</b>	<b>550,9</b>	<b>602,0</b>	<b>671,3</b>	<b>702,1</b>	

Fonte: Embrapa Gado de Leite (*website*: <<http://www.cnpql.embrapa.br/>>)  
Acessado e adaptado em 24 de novembro de 2011.

Tabela 2 – Principais países produtores de leite bovino no mundo – 2009

Colocação	País	Produção de leite (mil toneladas)	Total 2009 (%)
1º	Estados Unidos	85,9	14,7
2º	Índia	45,1	7,7
3º	China	35,5	6,1
4º	Rússia	32,3	5,5
5º	Brasil	29,1	5,0
6º	Alemanha	27,9	4,8
7º	França	23,3	4,0
8º	Nova Zelândia	15,4	2,6
9º	Reino Unido	13,2	2,3
10º	Polônia	12,4	2,1

Fonte: Embrapa Gado de Leite (*website*: <<http://www.cnpql.embrapa.br/>>)  
Acessado e adaptado em 24 de novembro de 2011.

O leite pode ser classificado de acordo com seu modo de produção, composição e requisitos físico-químicos e biológicos segundo diretrizes da FAO, com o objetivo de proteger o consumidor e promover padrões mínimos de uniformidade e identidade do leite, a nível nacional e internacional (TIMM e OLIVEIRA, 2002).

Do ponto de vista de controle de qualidade, o leite e os derivados lácteos estão entre os alimentos mais testados e avaliados, principalmente devido à importância que representam na alimentação humana e à sua natureza perecível. O processamento térmico induz a desnaturação e inativação de componentes termolábeis, mas também, gera a formação de “novas” substâncias que não

estavam em atividade antes do processamento. Portanto, as condições de tratamento térmico, devem ser escolhidas de acordo com os resultados desejados (segurança e higiene) enquanto as alterações indesejáveis, como redução do valor nutricional e alteração de propriedades organolépticas, sejam minimizadas (KORHONEN et al., 1998).

A temperatura de desnaturação das proteínas do leite varia entre 60 a 90°C e sua atividade bioativa pode ser reduzida em diferentes tratamentos térmicos. No tratamento padrão de pasteurização, com temperatura em 72 a 75°C por 15 a 20 segundos, as proteínas bioativas do soro conservam sua atividade. Embora a desnaturação seja um processo irreversível na maioria das proteínas, algumas possuem a capacidade de reverter à desnaturação quando a influência térmica é removida (CORREDIG, 1996; FOX e FLYNN, 1992).

Durante o tratamento térmico, resíduos de lisina das proteínas podem reagir reduzindo a porção de carboidratos disponíveis e gerando o escurecimento do alimento. Dependendo da intensidade do tratamento, propriedades sensoriais podem ser afetadas como, aroma, sabor e aparência, além de, provavelmente, reduzir o valor nutricional e prejudicar a biodisponibilidade de alguns aminoácidos (FINOT, 1997).

Por ser fonte de elevado valor nutricional e funcionalidades diversas, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o consumo de leite em 500 ml.dia<sup>-1</sup> para crianças abaixo de 09 anos, 750 ml.dia<sup>-1</sup> para crianças entre 09 e 12 anos, 1 litro.dia<sup>-1</sup> para adolescentes e 500 ml.dia<sup>-1</sup> para adultos. Segundo Jorge Rubez, presidente da Associação Leite Brasil, “embora o Brasil seja um dos maiores produtores mundiais de leite, e este ser parte integrante da dieta durante todo o ciclo de vida, seu consumo por pessoas adultas no país ainda encontra-se abaixo da quantidade recomendada (200 litros por ano) e ocupa o 65º lugar no *ranking* sobre o consumo de bebidas”.

Uma pesquisa realizada pela *Tetra Pak Marketing Service*, mostra que o leite ocupa o 4º lugar no *ranking* das bebidas consumidas pelos brasileiros; estando atrás da cerveja (1º lugar), café (2º lugar) e refrigerantes (3º lugar), conforme dados da Figura 4 (TETRA PAK DAIRY INDEX, 2009). Segundo informações disponibilizadas pela *Scot Consultoria*, a participação do leite no volume de produtos fluidos consumidos no Brasil equivale ao segundo lugar, com 24,80 %, enquanto o refrigerante ainda ocupa o 1º lugar, com 29,77 %.

Este panorama levou a criação de diversas campanhas para incentivar o consumo de leite e bebidas lácteas no país:



Figura 2 – Campanhas de incentivo ao consumo de leite no Brasil realizadas pela Láctea Brasil (A), bebaleite.com.br (B) e EPAMIG - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (C)

O incentivo feito por campanhas aliado ao crescimento da população, o aumento da renda familiar, novos hábitos alimentares, maior oferta de produtos lácteos, sua diversificação e diminuição de preços impulsionaram um considerável avanço de 4,4 %, com relação ao consumo do leite e seus derivados no país, em 2010 (CIPOLLA, NEVES e AMARAL, 2002).

### 1.2.1 Composição geral e as proteínas do leite

O leite consiste em uma combinação de diversos elementos sólidos (13 %) em água. Os elementos sólidos são representados por lipídios (4,2 %), carboidratos (4,6 %), proteínas (3,4 %), sais minerais (0,8 %) e vitaminas (0,1 %) (MANSSON, 2008). A Tabela 3, abaixo, apresenta os principais componentes do leite e sua quantificação com relação a 01 litro de leite bovino.

Tabela 3 – Quantificação dos componentes gerais do leite bovino

Componente	Quantidade
Lactose	53 g.L <sup>-1</sup>
Gordura	33 g.L <sup>-1</sup>
Proteínas	32 g.L <sup>-1</sup>
Ácidos graxos saturados	19 g.L <sup>-1</sup>
Ácido oléico	8 g.L <sup>-1</sup>
Cálcio	1,1 g.L <sup>-1</sup>
Magnésio	100 mg.L <sup>-1</sup>
Zinco	4 mg.L <sup>-1</sup>
Selênio	37 µg.L <sup>-1</sup>
Vitamina A	280 µg.L <sup>-1</sup>
Vitamina E	0,6 mg.L <sup>-1</sup>
Vitamina B12	4,4 µg.L <sup>-1</sup>
Folato	50 µg.L <sup>-1</sup>

Adaptado de HAUG, HOSTMARK e HARSTAD, 2007

Os componentes do leite permanecem em equilíbrio, de modo que a relação entre eles seja estável. O conhecimento dessa estabilidade serve como base para testes que são realizados com o objetivo de apontar a ocorrência de alterações na composição do leite. Por exemplo, uma redução substancial da concentração de lactose ou dos sólidos totais poderia levantar suspeita de adição fraudulenta de água. Nesse caso, ocorrem alterações das propriedades físicas do leite, facilmente detectáveis em laboratório (FELLER et al., 2008).

A gordura do leite bovino pode ser composta na sua maioria por ácidos graxos complexos (aproximadamente 65 % de ácidos graxos saturados, 30 % de monoinsaturados e 5 % de poliinsaturados) e está presente na forma de pequenos glóbulos, suspensos em água, o que representa 33 g.L<sup>-1</sup> (HAUG, HOSTMARK e HARSTAD, 2007; JENSEN, 2002; BAUMAN e GRIINARI, 2001).

O principal carboidrato do leite consiste na lactose, que pode ser produzida pelas células epiteliais da glândula mamária e é responsável pelo volume de leite produzido. A quantidade de leite irá variar de acordo com a quantidade de lactose secretada, que induzirá o equilíbrio osmótico pela transferência de água do sangue para as glândulas mamárias. A concentração de lactose no leite consiste em aproximadamente 5 % (aproximadamente 53 g.L<sup>-1</sup>), sendo um dos elementos menos sujeito a variações (WILT et al., 2010; CAMPBELL, WAUD e MATTHEWS, 2009; HAUG, HOSTMARK e HARSTAD, 2007; ADAM, RUBIO-TEXEIRA e POLAINA, 2004).

O leite também tem sido considerado uma excelente fonte da maioria das vitaminas e sais minerais necessários para um bom funcionamento do organismo. Estes compostos não podem ser produzidos pelo organismo, por isso devem estar presentes diariamente na alimentação. As vitaminas são substâncias necessárias em pequenas quantidades e atuam como coenzimas ou enzimas, em processos metabólicos distintos fundamentais. Geralmente, no leite são encontradas as vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), que terão variações de nível de acordo com o teor de gordura do leite; e também as vitaminas solúveis em água, como aquelas que compõem o complexo B e vitamina C. Os minerais são substâncias que atuam como co-fatores do metabolismo e quando consumidos em quantidade inferiores ao necessário, podem acarretar danos à saúde, mas quando disponíveis em excesso, o organismo os elimina por meio de urina e fezes. Os principais minerais disponíveis no leite são cálcio, magnésio, fósforo, potássio, selênio e zinco; embora seja verificada a presença de cobre, ferro, manganês, potássio e sódio, em menores quantidades em comparação os demais. Mas, o cálcio tem sido sem dúvida, o mineral de maior destaque; não somente por representar 1,1 g.L<sup>-1</sup> de leite mas, também por desempenhar importante papel na manutenção da saúde de ossos e dentes (BONJOUR et al., 2009; HAMRICK e COUNTS, 2008; ABRAMS e ATKINSON, 2003).

As proteínas do leite bovino equivalem a  $32 \text{ g.L}^{-1}$  e são divididas em dois grupos com propriedades físicas e biológicas únicas. Estes dois grupos consistem nas solúveis caseínas e as insolúveis proteínas do soro. O conteúdo total de proteínas e o nível entre frações de proteínas no leite diferem interespecies. Por exemplo, o conteúdo total de proteínas no leite humano pode ser de 1 % mas, no leite bovino pode chegar a 3,3 %. Além disso, o nível de proteínas do soro comparado ao nível de caseínas pode ser de 60:40 em leite humano, 50:50, em leite equino e 20:80 em leite bovino, caprino, de ovelha e búfala (LUHOVYY, AKHAVAN e ANDERSON, 2007). Além do aspecto nutricional, devido à disponibilidade equilibrada de aminoácidos essenciais e nitrogênio orgânico, muito têm sido falado sobre a bioatividade de peptídeos existentes em suas sequências primárias, gerando crescente interesse científico e comercial na última década (FARRELL et al., 2004). Estes peptídeos ficam inativos dentro da sequência protéica e podem ser liberados a partir de enzimas digestivas durante o trânsito gastrointestinal, por fermentação ou durante o processo de produção de derivados. No leite podem ser encontradas, ainda, várias proteínas menores com diferentes atividades biológicas como enzimas, imunoglobulinas e fatores de crescimento (AIMUTIS, 2004; CLARE e SWAISGOOD, 2000).

#### **1.2.1.1 Proteínas do soro**

As proteínas do soro de leite (*whey proteins*) bovino representam 20 % do total protéico ( $6.3 \text{ g.L}^{-1}$  de leite) e podem ser representadas por uma família heterogênea. Seus principais componentes são:  $\alpha$ -lactalbumina (20 %),  $\beta$ -lactoglobulina (50 %), albumina sérica (10 %), lactoferrina (10 %), lactoperoxidase (8 %) e lisozima (1 %), além de outras proteínas menores e/ou com pouca representação (AIMUTIS, 2004 e SHAH, 2000). Na Tabela 4, estão disponíveis as principais informações sobre as WP.

Tabela 4 – Dados sobre as principais proteínas do soro do leite bovino

Nome	Sigla	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	Tamanho (aa)	Massa Molecular (KDa)
α-Lactalbumina	α-LA	1,2000	142	16,2470
β-Lactoglobulina	β-LG	3,2000	178	19,8830
Albumina Sérica Bovina	BSA	0,4000	607	69,2930
Lactoferrina	LF	0,1000	681	75,1820
Lactoperoxidase	LP	0,0300	712	80,6420
Lisozima	LYZ	0,0004	147	16,3730

Adaptado de FARRELL et al., 2004; KORHONEN e PIHLANTO, 2007; SHAH, 2000

Popularmente, o soro do leite consiste no líquido remanescente após o leite ser coalhado para a produção de queijos, e pode ser usado em produtos de consumo popular como ricotas, pães, biscoitos e massas. Além de produtos específicos, como formulárias infantis, alimentos enterais especializados, suplementos clínicos protéicos, produtos nutricionais esportivos e produtos específicos para manutenção do peso. As diferentes proteínas encontradas no soro se diferem principalmente por sua estrutura química, propriedades funcionais (estabilidade ácida, adesão, emulsificação, formação de espuma e gelificação), propriedades organolépticas (solubilidade, viscosidade e capacidade de reter água) e suas funções biológicas. Estas propriedades são importantes para a concepção de alimentos funcionais de várias consistências, texturas e sabores adequados a diferentes grupos de consumidores, desde recém-nascidos a pessoas com necessidades alimentares especiais (KORHONEN e PIHLANTO, 2007; LUHOVYY, AKHAVAN e ANDERSON, 2007; WONG et al., 1996).

Ao contrário das caseínas, essas proteínas possuem um alto nível de estrutura secundária, terciária e quaternária, sendo geralmente globulares hidrofóbicas e sensíveis ao calor. Todas elas contêm uma proporção relativamente alta de aminoácidos de cadeia ramificada, são fontes de todos os aminoácidos essenciais e consideradas proteínas de alta qualidade. Em comparação às caseínas, as proteínas do soro são rapidamente absorvidas durante o processo de digestão, liberando altas concentrações de aminoácidos no plasma do período pós-

prandial, além de atuar favorecendo a sensação de saciedade (LUHOVYY, AKHAVAN e ANDERSON, 2007; SGARBIERI, 2004; WONG et al., 1996).

Frações de proteínas do soro também são diferenciadas qualitativamente entre espécies, por exemplo, em humanos, a  $\alpha$ -lactalbumina representa 25 %, enquanto em vacas, essa porcentagem é 5 % menor; a proteína  $\beta$ -lactoglobulina não é encontrada em leite humano, ratos/camundongos e porcas, mas possui grande representatividade (12 %) no leite bovino (LUHOVYY, AKHAVAN e ANDERSON, 2007).

Além de seu importante papel nutricional, as proteínas do soro de leite bovino se destacam por funções fisiológicas desempenhadas por algumas de suas proteínas maduras e peptídeos derivados delas, incluindo modulação da pressão arterial, processos anti-inflamatórios, antimicrobianos e antivirais, ação anticarcinogênica, estímulo imunológico, controle glicêmico e diminuição do risco de obesidade. No entanto, essas funções não se limitam apenas às proteínas e peptídeos, mas também, devido à sinergia entre as proteínas do soro e outros componentes, como o cálcio. O efeito do cálcio do leite na atenuação de ganho de peso e gordura e redução da pressão arterial pode ser muito maior do que a suplementação nutricional proporcionada pelo leite propriamente dito (LUHOVYY, AKHAVAN e ANDERSON, 2007; PARODI, 2007; SGARBIERI, 2004; LÖNNERDAL, 2003).

Abaixo, estão disponíveis maiores informações sobre as diversas proteínas presentes no soro do leite bovino:

a)  $\alpha$ -Lactalbumina ( $\alpha$ -LA): representa aproximadamente 1,2 a 1,5 g.L<sup>-1</sup>. É uma proteína globular, com 142 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 16,247 kDa. Sua produção, durante o processo de lactação, é realizada exclusivamente nas células epiteliais mamárias e tem um papel essencial na síntese do leite e biossíntese/regulação da lactose. Em seu estado nativo é estabilizada pela presença de 04 pontes dissulfeto e ligação de íons como Ca<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> em sítios específicos. A remoção do cálcio gera uma mudança conformacional, levando a uma forma instável chamada apo- $\alpha$ -LA com exposição do sítio de ligação de ácidos graxos, ocupado preferencialmente por ácido oléico, que estabiliza e preserva a nova conformação. Sua resistência ao processo de pasteurização, devido a sua interação com Ca<sup>+2</sup>, unida ao baixo

potencial alergênico, sua importância nutricional e suas inúmeras propriedades bioativas (atividade anticancerígena, imunomodulação, proteção da mucosa estomacal, propriedades calmantes, etc) garantem-lhe papel de destaque entre as inúmeras proteínas do soro (EBRINGER, FERENCÍK e KRAJCOVIC, 2008; FARRELL et al., 2004; CLARE, CATIGNANI e SWAISGOOD, 2003; PELLEGRINI, 2003).

b)  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -LG): representa a proteína mais abundante do soro de leite bovino, com massa molecular de 19,883 kDa e aproximadamente 178 resíduos de aminoácidos. É considerada uma proteína globular estável, com duas pontes dissulfeto intramoleculares, que em pH normal do leite apresenta um equilíbrio termodinâmico entre a forma de dímero (forma nativa) e monômero, quando exhibe estado intermediário de maior flexibilidade e maior volume de estrutura terciária em que há aumento de grupos hidrofóbicos expostos. Exibe a capacidade de se ligar a inúmeras moléculas hidrofóbicas e/ou anfifílicas, o que favorece a absorção intestinal destes compostos, com destaque ao retinol (vitamina A), que é indispensável para o desenvolvimento corpóreo e manutenção da saúde dos mamíferos em geral (EBRINGER, FERENCÍK e KRAJCOVIC, 2008; FARRELL et al., 2004; PELLEGRINI, 2003).

c) Albumina sérica bovina (BSA): possui conformação nativa globular, solúvel em água, formada por uma cadeia polipeptídica com 607 resíduos de aminoácidos e massa molecular 69,293 kDa, representando 0,4 g.L<sup>-1</sup> de leite. Alterações de pH promovem mudanças em suas propriedades físicas e químicas, como aumento da viscosidade intrínseca, volume molecular e redução acentuada de solubilidade. Apresenta três domínios homólogos, que são divididos em 09 *loops* ligados por 17 pontes dissulfeto, nestes domínios existem sítios específicos para ligação de pequenas moléculas, como íons metálicos e ácidos graxos, e um grupo sulfidrilo livre. Essas características garantem seu importante papel no transporte, metabolismo e distribuição de ligantes, que contribui para o controle da pressão

osmótica do sangue e confere proteção contra radicais livres (FARRELL et al., 2004; QUIMING et al., 2005).

d) Lactoferrina (LF): consiste em uma glicoproteína multifuncional de única cadeia, composta por 708 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 75,182 kDa. Esta proteína representa cerca de  $0,3 \text{ g.L}^{-1}$  de leite, embora haja variações em sua concentração em resposta a inflamações e infecções. Fisiologicamente, atua no aumento da absorção de ferro e outros mineirais devido a sua capacidade de se ligar a 02 íons  $\text{Fe}^{+3}$  por molécula protéica, em sítios específicos existentes em suas regiões C-terminal e N-terminal, mas a tendência de interação com os íons depende de pequena quantidade de bicarbonato (secretado no intestino), que atua na melhoria do processo de ligação. Apresenta resistência relativa a proteases digestivas, tornando-a hábil em passar de forma intacta pelo trato gastrointestinal; além disso, possui estabilidade e resistência com relação a tratamentos térmicos de pasteurização. Além do leite, a LF pode ser encontrada em outros fluídos corporais, como lágrimas, saliva e fluidos seminais sugere que um papel na defesa inespecífica contra patógenos invasores dependentes de ferro. Estudos recentes indicam a existência de atividade antimicrobiana (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos), antiviral (citomegalovírus, herpes, influenza, HIV, rotavírus e hepatite C), antifúngica, antineoplásica, antioxidante, anti-inflamatória e imune moduladora, o que gerou interesse comercial em sua inserção como conservante natural de alimentos e princípio ativo de cosméticos, além de suplementos férricos, leites fermentados e gomas de mascar (EBRINGER, FERENCÍK e KRAJCOVIC, 2008; SÉVERIN e WENSHUI, 2005; FARRELL et al., 2004; AIMUTIS, 2004; CLARE, CATIGNANI e SWAISGOOD, 2003; FLORISA et al., 2003).

### 1.3 Peptídeos Antimicrobianos

Os seres vivos estão constantemente expostos a patógenos potencialmente nocivos através da ingestão, contato ou inalação. A sobrevivência do hospedeiro em um ambiente propício aos microrganismos depende de uma eficaz rede de mecanismos de defesa envolvendo vários componentes (REDDY, YEDERY e ARANHA, 2004).

O sistema imune inato envolve um amplo espectro funcional de medidas de defesa do hospedeiro contra microrganismos patogênicos, cujo estímulo ocorre quase instantaneamente após a invasão. Ele inclui o reconhecimento de patógenos específicos associados a padrões moleculares, estimulação da imunidade adaptativa e a secreção de substâncias e células de defesa (células T e B) (FINLAY e HANCOCK, 2004). Evidências indicam que as respostas inatas são a chave para um maior controle de infecções, além de ser um componente central da resposta anti-inflamatória. Os genes responsáveis por este sistema são codificados na linhagem germinativa e não exige o rearranjo de genes essenciais; sendo considerado um sistema de defesa evolutivamente antigo (HAMILL et al., 2008; BEISSWENGER e BALS, 2005).

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são pequenas moléculas (3-50 resíduos de aminoácidos e < 10 kDa) produzidas em diversos tipos celulares e tecidos de variadas plantas, microrganismos unicelulares, invertebrados, anfíbios, aves, peixes e mamíferos; bem como, podem ser originados a partir da clivagem de proteínas nativas (GODBALLE et al., 2011). Eles podem ser produzidos constitutivamente ou somente após uma infecção ou injúria (CUDIC e OTVOS, 2002). Em organismos multicelulares, PAMs podem ser expressos sistematicamente e/ou localizados em tipos de células e tecidos específicos que são mais susceptíveis a infecções, como epitélio da mucosa e pele (JENSSEN, HAMILL e HANCOCK, 2006). Representam a primeira linha de defesa contra a invasão de diversos microrganismos (ex.: bactérias, fungos, vírus, etc), possuem variadas funções mediadoras e seu principal modo de ação baseia-se na lise bacteriana por meio de interações entre peptídeos e bicamada lipídica, através da qual pode levar à morte ou inibir o crescimento do invasor (GODBALLE et al., 2011; BEISSWENGER e BALS, 2005; COLE e LEHRER, 2003).

PAMs podem ser agrupados de acordo com seu tamanho, composição ou, predominantemente, por seus elementos de estrutura secundária ( $\alpha$ -hélices, folhas- $\beta$ , *loops* e estruturas estendidas) (NGUYEN, HANEY e VOGEL, 2011). No entanto, a grande diversidade das moléculas pode dificultar sua classificação (BEISSWENGER e BALS, 2005).

A maioria destas moléculas tem sido elucidadas como catiônica, ricas em lisina e arginina, possuem regiões hidrofóbicas e regiões hidrofílicas separadas espacialmente, apresentando atividade contra bactérias Gram-negativas e/ou Gram-positivas, fungos, protozoário e, menos comumente, vírus (POWERS e HANCOCK, 2003).

Além disso, a alta hidrofobicidade na maioria deles garante a esses peptídeos a capacidade interagirem com componentes da bicamada lipídica dos microrganismos (lipídeos carregados negativamente). A presença de resíduos hidrofóbicos em oposição a resíduos hidrofílicos ao longo de sua cadeia conferem-lhes anfipaticidade, o que é determinante para sua efetiva ação antimicrobiana ao facilitar sua penetração na fase lipídica da membrana (BROGDEN, 2005).

Independente do organismo ou a classe do peptídeo, o primeiro passo relacionado à sua função envolve o processo de atração à membrana celular, que pode ser determinado pela carga e anfipaticidade do peptídeo. Esta atração pode ser resultante de interações eletrostáticas entre PAMs e moléculas carregadas negativamente na superfície da membrana bacteriana. Estes constituintes aniônicos envolvem lipossacarídeos (LPS), grupos fosfatos e lipídeos aniônicos, no caso de bactérias Gram-negativas; e ácido teicóico no caso de bactérias Gram-positivas (DIAMOND et al., 2009).

Após serem atraídos para a membrana bacteriana, o segundo passo envolve o processo de anexação do peptídeo, onde os PAMs atravessam a capsula polissacarídea externa dos microrganismos e alcançam sua camada lipídica interna. Resíduos de arginina e triptofano desempenham um papel fundamental na estabilização da interação peptídeo-membrana durante a inserção do peptídeo, devido a interações eletrostáticas das cadeias laterais com os grupos de cabeça fosfato e pela atração dos resíduos de triptofano por regiões interfaciais da bicamada lipídica (CHAN et al., 2006). Depois de ligados à membrana, PAMs adotam uma estrutura secundária energeticamente favorável baseado na hidrofobicidade do peptídeo; por exemplo, a maioria dos peptídeos em  $\alpha$ -hélice

possuem níveis relativamente constantes de hidrofobicidade ao longo de seu eixo, o que os obriga a orientar-se em paralelo ou perpendicularmente em relação à membrana e a si mesmo (DIAMOND et al., 2009; JENSSEN, HAMILL e HANCOCK, 2006).

Estes mecanismos envolvem modificações de propriedades biofísicas da membrana após a inserção do peptídeo e baseiam-se na perda do potencial de membrana, alterações de sua curvatura e permeabilidade, liberação de metabólitos e íons e, conseqüente, perda da viabilidade celular (WIMLEY, 2010; BEISSWENGER e BALS, 2005).

O modo de ação dos PAMs não está totalmente claro e algumas questões ainda apresentam controvérsias; entretanto, alguns modelos *in vitro* foram propostos para explicar o processo de interação (Shai-Matsuzaki-Huang ou SMH) e o processo de formação de poros (*barrel-stave model*, *toroidal-pore model*, *disordered toroidal pore model* e *carpet-like model*) (Figura 3) dos peptídeos catiônicos em relação à membrana bacteriana (BALTZER e BROWN, 2011; NGUYEN, HANEY e VOGEL, 2011). O modelo SMH propõe que peptídeos não-estruturados podem adotar uma estrutura tridimensional estável durante a interação com a membrana bacteriana e se curvam como moléculas anfifílicas, fazendo com que os lados carregados positivamente interajam diretamente com grupos lipídicos aniônicos que compõem a membrana e levando ao deslocamento dos lipídeos que compõem a membrana bacteriana (BALTZER e BROWN, 2011). Em relação aos modelos propostos para explicar a formação de poros, acredita-se que os peptídeos deitados na membrana atinjam um limiar de concentração e inserem-se na membrana para formar poros lineares de compostos por PAMs (*barrel-stave model*), solubilizar a membrana em formas micelares (*carpet model*), formar poros lineares de peptídeos ligados a lipídeos (*toroidal model*) ou, ainda, formar poros de forma mais estocástica e com a participação de menos peptídeos (*disordered toroidal model*) (NGUYEN, HANEY e VOGEL, 2011).

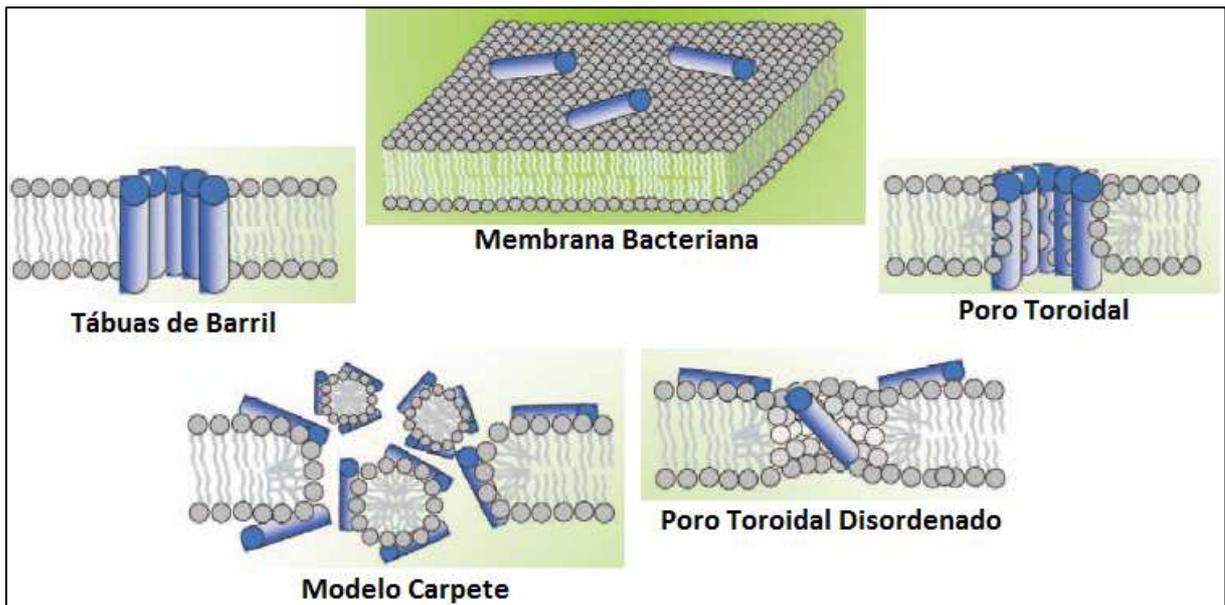


Figura 3 – Representação esquemática sobre os principais modelos de formação de poros dos PAMs na bicamada lipídica de microrganismos. (Adaptado de NGUYEN, HANEY e VOGEL, 2011)

Durante uma infecção, podem ser produzidos PAMs estruturalmente similares e com múltiplas isoformas que irão atuar em conjunto para formar uma estratégia sinérgica que irá aumentar sua eficiência e diminuirá a probabilidade do desenvolvimento de mecanismos de resistência (BALTZER e BROWN, 2011; PESCHEL e SAHL, 2006).

Crescentes evidências estão relacionadas ao fato de que os mecanismos de morte microbiana não se limitam à lise celular, indicando a existência peptídeos antimicrobianos translocados atuando contra alvos intracelulares, como por exemplo: inibição da síntese de parede celular, alterações na membrana citoplasmática, ativação de autolisina, ligação ao DNA, inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas e perda da atividade enzimática (Figura 4) (BROGDEN, 2005; CUDIC e OTVOS, 2002).

Características gerais como tamanho, sequência, grau de estruturação secundária, carga elétrica, hidrofobicidade geral, anfipaticidade e o tamanho das faces hidrofóbicas e hidrofílicas dos peptídeos podem interferir no nível de susceptibilidade de microrganismos com relação ao PAM (BROGDEN, 2005) Além disso, a composição lipídica diferenciada das células eucariontes (devido a um maior percentual de colesterol) associada a diferentes quantidades de cargas negativas da

membrana de microrganismos são igualmente importantes para o nível de susceptibilidade e o processo de seletividade dos peptídeos antimicrobianos (DIAMOND et al., 2009; MATSUZAKI, 2009; POWERS e HANCOCK, 2003; MATSUZAKI et al., 1995).

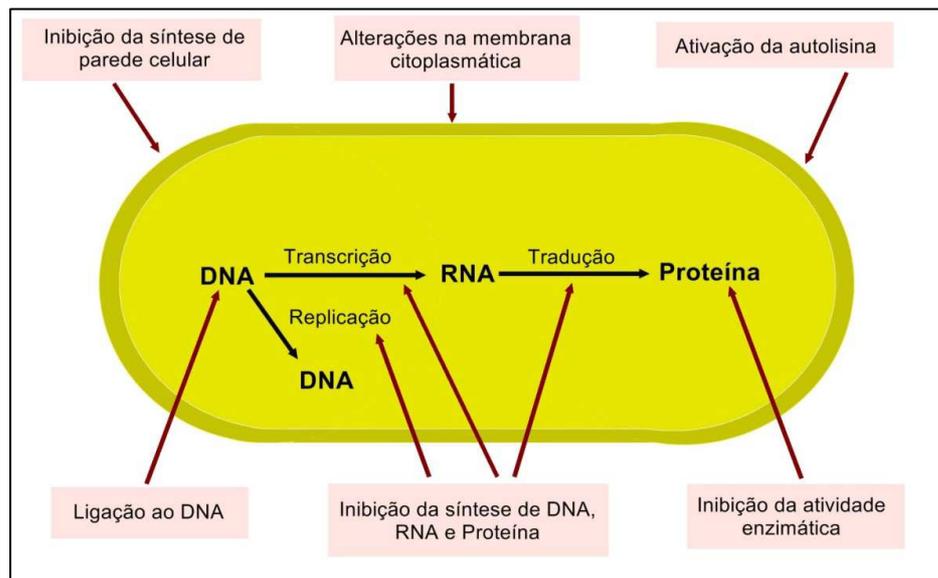


Figura 4 – Alvos intracelulares de PAMs (Adaptado de BROGDEN, 2005)

Existem mecanismos de resistência pelos quais os microrganismos tentam contornar o modo de ação dos PAMS e buscam evitar o processo de fixação e inserção dos peptídeos, interferindo na permeabilidade da membrana (BROGDEN, 2005). Estes mecanismos incluem alterações na carga líquida da superfície membranar, alterações na composição lipídica e proteínas que compõem a membrana, captura externa e efluxo ativo de PAMs, a ativação de enzimas proteolíticas que podem degradar os peptídeos, bem como, a supressão pelo patógeno das vias do hospedeiro para a produção de PAMs (BALTZER e BROWN, 2011; FJELL et al., 2012).

O rápido aumento de bactérias multiresistentes a antibióticos disponíveis comercialmente se deve, em grande parte, ao uso excessivo e inadequado no tratamento e prevenção de infecções bacterianas na saúde humana e animal. Este panorama tem sido considerado um grave problema de saúde global pela Organização Mundial de Saúde e assim, o desenvolvimento de novas classes de

antibióticos com novos mecanismos de ação se tornaram necessários (LOHNER, 2009; LOHNER e BLONDELLE, 2005).

Devido ao amplo espectro de atividade, a baixa incidência de resistência bacteriana em comparação aos antibióticos convencionais e a rápida eficácia contra patógenos resistentes, muitos peptídeos tem sido considerados fontes para promissoras aplicações na produção de medicamentos e indústria alimentícia. PAMs podem ser usados em combinação sinérgica com outras famílias peptídicas, imunoestimuladores, agentes neutralizantes de endotoxinas, antibióticos convencionais ou outros agentes antimicrobianos; alguns deles estão em estado avançado de testes clínicos e um número limitado está em uso para aplicações tópicas ou sistêmicas. (HARRIS, DENNISON e PHOENIX, 2009; ROSSI et al., 2008; LEE, 2002)

Além disso, o potencial desenvolvimento de peptídeos com amplo espectro de atividade tem atraído a atenção pela possibilidade de vários patógenos serem alvos de um único tratamento com ação antibacteriana, antiviral e antifúngica (JENSSEN, HAMILL e HANCOCK, 2006). Mas, como candidatos a fármacos, alguns PAMs apresentam algumas desvantagens relacionadas à redução de atividade na presença de sais e cátions divalentes, a susceptividade a mudanças de pH, proteases e outros componentes do plasma, algumas questões farmacocinéticas e o alto custo de produção (ROTEM e MOR, 2009). Desta forma, um intenso trabalho de pesquisa vem sendo realizado para resolver estes problemas, e também, detectar, purificar e caracterizar PAMs. Atualmente, estima-se que, aproximadamente 1000 peptídeos antimicrobianos estejam disponíveis em base de dados *online*. (BENKERROUM, 2010)

### **1.3.1 Fragmentos com atividade antimicrobiana**

A fragmentação enzimática de algumas proteínas podem liberar peptídeos com atividades e propriedades biológicas que muitas vezes são diferentes das proteínas parentais (MAK et al., 2000). Nos últimos anos, vários fragmentos de proteínas maiores, com propriedades antimicrobianas foram avaliados e mostraram

atividade maior ou similar em comparação com a sequência proteica completa (PAPAREDDY et al., 2010; SIGURDARDOTTIR et al., 2006).

Segundo Lee (2002), existem 03 estratégias principais para o desenvolvimento de pequenos fragmentos ( $\leq 18$  aa) com atividade antimicrobiana: (I) analisar toda a sequência proteica, identificando a região mais propícia a exibir atividade contra microrganismo e, então, sintetizar o fragmento e seus análogos com atividade biológica melhorada; (II) identificar novos peptídeos antimicrobianos ou otimizar a atividade de peptídeos conhecidos usando bibliotecas combinatórias (SCL) e (III) criar e sintetizar artificialmente novos PAMs baseado em informações sobre parâmetros determinantes para a atividade, como estrutura helicoidal, hidrofobicidade, momento hidrofóbico e anfipaticidade.

Estes fragmentos podem ser obtidos naturalmente por proteólise ou a partir da observação de regiões específicas de proteínas, sendo então, sintetizados artificialmente (NGUYEN, HANEY e VOGEL, 2011; TORRENT, NOGUÉS e BOIX, 2009). Inúmeros PAMs estão sendo obtidos a partir de proteínas com variadas origens e funções (NGUYEN, HANEY e VOGEL, 2011). Embora algumas destas apresentem atividade antimicrobiana nativa, elas podem ainda se revelar fontes de peptídeos com diferentes bioatividades, como por exemplo, atividade antiviral, antitumoral (HUO et al., 2011; LIZZI et al., 2009; HUNTER et al., 2005; JENSSEN, 2005; LEE, 2002; REYNOLDS et al., 2010).

Mak et al. (2010) descreveu a geração de peptídeos antimicrobianos com amplo espectro de ação a partir da fragmentação e retirada do heme de apohemoproteínas como hemoglobinas e mioglobinas. As proteínas intactas não apresentaram atividade bactericida em comparação a seus peptídeos, cuja ação também se tornou inviável após uma clivagem mais drástica. Foi sugerido que a atividades destes peptídeos, denominados hemocidinas, está relacionada à sua natureza policatiônica e sua excepcional conformação em  $\alpha$ -hélice em ambiente hidrofóbico, o que possibilita sua ação em membranas de bactérias carregadas negativamente.

O sistema de coagulação humano também possui enzimas cuja proteólise *in vitro* levou à descoberta de uma nova classe de peptídeos de defesa. Localizados na região C-terminal da enzima trombina, estes PAMs possuíam estrutura helicoidal, demonstraram atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, exerceram funções imunomodulatórias por meio de inibição de respostas dos

macrófagos aos lipossacarídeos bacterianos e, além disso, ofereceram um considerável potencial terapêutico contra choques sépticos. Ao serem observados em ferimentos humanos, pesquisadores sugeriram que a trombina, após exercer sua função primária de defesa na formação do coágulo de fibrina, expande suas funcionalidades físicas naturais através de sua proteólise que liberará peptídeos antimicrobianos e antiendotóxicos. Esta classe de PAMs foi responsável por identificar um processo de otimização do sistema imune inato, que atua gerando uma relação direta entre os sistemas de coagulação e defesa do hospedeiro durante uma invasão microbiana ou injúria (PAPAREDDY, 2010).

Estudos indicam que peptídeos gerados a partir de proteínas que compõem a matrix extracelular de inúmeros tecidos podem exibir, *in vitro*, atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos. Uma grande família de glicoproteínas heterotriméricas, chamada laminina, possui moléculas compostas por 03 cadeias unidas por pontes dissulfeto que lhes conferem o formato cruciforme. Esta família apresenta 11 diferentes cadeias capazes de montar 15 diferentes lamininas em mamíferos, as quais são responsáveis pelos processos de adesão, migração, diferenciação e proliferação celular, angiogênese e invasão tumoral. Destacam-se as cadeias denominadas  $\alpha 4$  - presentes em tecido esquelético cardíaco, nervos periféricos, fibras musculares, etc.. E também,  $\alpha 5$  - presente na placenta humana, coração, estômago, pele, pâncreas, etc. - a partir das quais foram obtidos 02 peptídeos capazes de permeabilizar a membrana de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e se ligar ao DNA bacteriano ocasionando a inibição de crescimento. Esses resultados estão relacionados à habilidade das lamininas em se ligarem à heparinas e sugerem a existência de uma autoproteção dos componentes teciduais contra patógenos invasores (SENYÜREK et al., 2010).

A clivagem de peptídeos que naturalmente exibem atividade antimicrobiana pode também relevar a existência de fragmentos, contidos em sua sequência, com grande potencial para uso terapêutico devido a seu amplo espectro de ação, baixa citotoxicidade e menor custo para produção (HUO et al., 2011; LATOUR, 2010). Neste panorama, as catelicidinas foram fontes de pesquisas que identificaram fragmentos contidos em peptídeos expressos em humanos (THENNARASU et al., 2010) e serpentes (LATOUR et al., 2010). O PAM conhecido como LL-37 pertence à família das catelicidinas e foi identificado em humanos. Este peptídeo pode assumir a conformação de uma  $\alpha$ -hélice anfipática em contato com membranas lipídicas,

exibindo multifuncionalidades incluindo atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas mesmo em ambiente fisiológico e/ou com alta concentração salina (DÜRR, SUDHEENDRA e RAMAMOORTHY, 2006; TOMASENSEG e ZANETTI, 2005). Thennarasu et al. (2010) descreveram a existência de um fragmento de LL-37 denominado LL7-27, cuja eficácia contra bactérias Gram-negativas e sua interação altamente lipídeo-específica são as principais diferenças em relação ao peptídeo que o originou. Wong et al. (2011) observaram a ação antifúngica de outro fragmento (LL13-37) obtido de LL-37; LL13-37 mostrou-se eficaz no tratamento contra *Candida albicans*, através da alteração de permeabilidade da membrana e aumento da captação deste peptídeo, que possivelmente também atua em alguns alvos intracelulares. Enquanto Latour et al. (2010) identificaram dois fragmentos compostos por 11 resíduos de aminoácidos contidos no domínio repetido de catelicidinas produzidas em cobras da espécie *Naja atra*. Estes peptídeos antimicrobianos, nomeados ATRA-1 e ATRA-2, apresentaram baixa atividade hemolítica. Entretanto, quando avaliados em relação à sua atividade antimicrobiana, ATRA-1 mostrou-se muito mais efetivo contra bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *A. actinomycetemcomitans*), indicando potencial utilização em aplicações tópicas no tratamento de infecções periodontais. Isto possibilitou aos pesquisadores a observação da influência de alguns resíduos de aminoácidos na determinação da atividade antimicrobiana, visto que, a composição dos peptídeos diferenciava-se apenas em duas posições.

### **1.3.2 Peptídeos antimicrobianos de leite**

Além da importância nutricional devido à disponibilidade de aminoácidos essenciais à manutenção do bom funcionamento orgânico, outro importante papel desempenhado por proteínas alimentares envolve sua capacidade natural de liberar peptídeos bioativos através da digestão proteolítica, durante o trânsito gastrointestinal (PELLEGRINI, 2003; KORHONEN e PIHLANTO, 2003). Inúmeros alimentos ganharam atenção nas últimas décadas e, atualmente, são considerados

valiosos reforços na defesa do organismo contra inúmeras enfermidades bem como, na regulação fisiológica de quem os consome (CENCIC e CHINGWARU, 2010; HARTMANN e MEISEL 2007; MÖLLER et al., 2008). Dentre os alimentos de consumo popular, as proteínas existentes no leite e seus derivados são consideradas as principais fontes de peptídeos bioativos com ação antimicrobiana, entretanto, algumas pesquisas indicam também a existência de potentes PAMs em outros alimentos como ovos e peixes (KITTS e WEILER, 2003; PELLEGRINI, 2003). Estudos envolvendo algumas espécies de peixes conseguiram identificar variados PAMs expressos naturalmente. Entretanto, foram as espécies *Salmon salar*, *Parasilurus asotus*, *Ictalurus punctatus* e *Pardachirus marmoratus* que se destacaram na geração de fragmentos com atividade antimicrobiana a partir da clivagem de proteínas nativas. Nas três primeiras espécies, a clivagem de proteínas histonas H1, H2A e H2B, respectivamente, originaram peptídeos com variadas massas moleculares, composição e estrutura. Enquanto na espécie *Pardachirus marmoratus*, a clivagem de PAMs chamados pardaxinas gerou fragmentos que também possuíam atividade antimicrobiana, baixa ação hemolítica e atuam interferindo no transporte iônico através da membrana plasmática de microrganismos (KITTS e WEILER, 2003). Assim como nos peixes, ovos também possuem proteínas nativas (ovotransferrina, cistatina, avidina e lisozima) que naturalmente exibem atividade antimicrobiana; entretanto, algumas questões sobre a capacidade de manter esta atividade após a fragmentação destas proteínas permanecem sem solução. Alguns pesquisadores analisaram a possível obtenção de PAMs a partir da ovotransferrina, baseado em sua similaridade funcional em relação à lactoferrina; mas, foi observada uma pobre homologia entre elas na região N-terminal responsável pelo domínio bactericida da lactoferrina. Além disso, a clivagem da ovotransferrina por meio de enzimas digestivas não apresentou bons resultados, mas a utilização outra técnica de proteólise resultou em um peptídeo catiônico chamado OTAP-92, que se localiza na borda da fenda de ligação a metais em seu lóbulo N e apresenta grande similaridade com defensinas (agiotoxina I e kaliotoxina 1) de escorpião (PELLEGRINI, 2003).

Os peptídeos antimicrobianos de leite podem ser originados pela clivagem das proteínas nativas durante a digestão pela ação de proteases, durante o processo de fermentação através de microrganismos proteolíticos (ex.: bactérias ácido-láticas), processamento do alimento ou por proteólise *in vitro*. Mas, para

exercer seus efeitos fisiológicos *in vivo* os peptídeos precisam chegar a seus locais de destino no lado luminal do trato intestinal ou em órgão periféricos específicos através da corrente sanguínea após sua absorção (BENKERROUM, 2010; MADUREIRA et al., 2010; KORHONEN e PIHLANTO, 2006).

Peptídeos bioativos de leite influenciam processos fisiológicos específicos (Figura 5), gerando consideráveis benefícios à saúde de quem os consome, com a vantagem de serem obtidos através de fontes inofensivas e baratas. O crescente interesse em alimentos nutritivos, profiláticos e com pouco ou nenhum aditivo químico está influenciando drasticamente o mercado alimentício e farmacêutico; e neste panorama, os peptídeos antimicrobianos disponíveis em proteínas do leite são considerados potenciais elos entre nutrição e imunoterapia (BENKERROUM, 2010; CLARE, CATIGNANI e SWAISGOOD, 2003).

Os primeiros relatos sobre o efeito antimicrobiano no leite baseavam-se na inibição do crescimento da bactéria causadora de mastite em vacas (JONES e HENRY, 1930). Posteriormente, verificou-se a atividade da lactoferrina contra infecções causadas por *E. coli* em crianças (BULLEN, ROGERS e LEIGH, 1972), além de registros sobre a descoberta de glicopeptídeos básicos (caseidina) com atividade contra várias cepas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (LAHOV et. al, 1971). No entanto, estas informações foram ignoradas por muito tempo por serem consideradas pouco atrativas comercialmente devido ao fato de seu desempenho clínico ser pobre em comparação aos antibióticos convencionais e exigirem concentrações significativamente mais elevadas para inibir as bactérias sensíveis (BENKERROUM, 2010; LAHOV et. al, 1971).

O efeito antimicrobiano do leite pode ser resultado da ação individual de imunoglobulinas, proteínas/enzimas não-imunes (lactoferrina, lactoperoxidase e lisozima) e peptídeos originados através da clivagem de proteínas nativas; mas, este efeito pode ser amplificado através da ação sinérgica entre estes componentes (CLARE e SWAISGOOD, 2000).

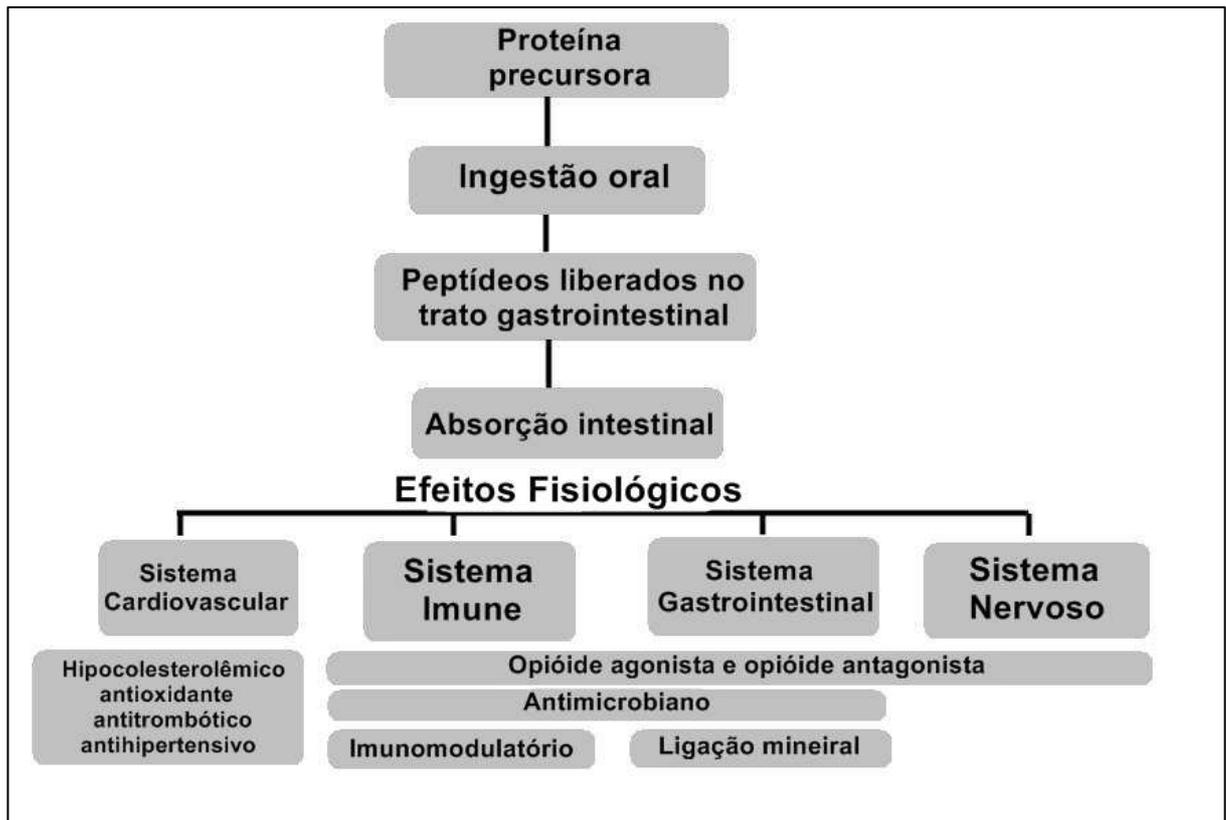


Figura 5 – Principais efeitos fisiológicos de peptídeos bioativos  
(Adaptado de MADUREIRA et al., 2010 e HARTMANN e MEISEL, 2007)

As caseínas do leite bovino são fontes de inúmeros PAMs que apresentam alta diversidade estrutural e atividade antimicrobiana. Alguns destes peptídeos estão listados na Tabela 5. Dente eles, destaca-se isracidina f(1-23) que foi obtida pela clivagem de  $\alpha_{s1}$ -caseína por quimosina e consiste de um fragmento catiônico com 23 resíduos de aminoácidos com atividade *in vitro* contra um amplo espectro de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Ensaio feitos *in vivo* demonstram que isracidina possui forte efeito protetor em camundongos e compete com antibióticos de uso terapêutico contra *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes* e *Listeria monocytogenes* (HILL, LAHOV e GIVOL, 1974). Injeções intramusculares contendo este PAM atuaram de forma eficaz contra mastite em ovelhas e vacas e possibilitaram uma resposta imune de longa duração. Quando aplicadas em ratos, estas injeções tiveram efeitos terapêuticos e profiláticos através de respostas imunológicas humorais e celulares contra infecções por *Candida albicans*. Estas observações indicaram a existência de uma ação indireta imunoestimulatória,

induzindo resistência do hospedeiro contra infecções por microrganismos (KOLB, 2001; LAHOV e REGELSON, 1996). Na indústria alimentícia, evidências demonstram que isracidina pode ser ativa contra patógenos emergentes de grande preocupação para a segurança alimentar, como *E. coli* O157:H7, *Enterobacter sakazakii* e *S. aureus*. Entretanto, a necessidade do uso de procedimentos caros e onerosos para sua purificação e produção em larga escala diminuiu o interesse sobre este peptídeo (HAYES et al., 2006).

Outro importante PAM foi obtido pela clivagem por quimosina da região N-terminal de  $\kappa$ -caseína f(106-169) o que libera caseinomacropéptido (CMP). Este peptídeo possui atividade antibacteriana *in vitro* contra os principais patógenos orais causadores de cáries e placa dentária (ex.: *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces naeslundii* e *E. coli*) (MALKOSKI et al., 2001). CMP é um polipeptídeo heterogêneo (com duas variantes genéticas – A e B) que possui diferentes formas fosforiladas e glicosiladas. Sua única forma ativa possui fosforilações, mas não foram verificadas glicosilações, sendo designada kappacina. Os fragmentos de kappacina originados da variante A da  $\kappa$ -caseína possuem significativamente mais atividade antimicrobiana do que os originados da variante B; alguns indícios apontam que isto se deve a substituição de Asp<sup>148</sup> na variante A por Ala<sup>148</sup> na variante B (DASHPER, LIU e REYNOLDS, 2007; MALKOSKI et al., 2001). kappacina possui carga elétrica negativa (aniônico) e tem sua atividade realçada através de sua ligação com dois íons cálcio ou zinco, em pH neutro. Acredita-se que esta ligação possa potencializar alterações conformacionais que aumentam sua afinidade por membranas celulares. Sua interação com a membrana de microrganismos envolve a organização de hélices anfipáticas que entram em contato com a membrana e, assim, formam poros aniônicos que aumentam a permeabilidade a cátions e interferem em processos fisiológicos fundamentais para os microrganismos (FLORISA et al., 2003). A utilização deste peptídeo como suplemento farmacêutico em terapias orais tem obtido grande sucesso. Além disso, seu uso como bioconservante em alimentos tem demonstrado grande potencial na indústria alimentícia devido a inibição de crescimento bacteriano (Gram-negativo e positivo). A maioria das variedades de queijo possuem grande quantidade de kappacina na forma de CMP devido à coagulação do leite com coalho ou outras enzimas coagulantes, que clivam a  $\kappa$ -caseína em sítios específicos (DASHPER, LIU e REYNOLDS, 2007).

Assim como as caseínas, as proteínas do soro de leite bovino podem ser valiosas fontes de peptídeos com atividade antimicrobiana. Algumas destas proteínas possuem atividade em sua forma nativa (lactoferrina, lactoperoxidase e lisozima), mas também podem liberar fragmentos antimicrobianos através da digestão proteolítica. A lactoferrina é considerada um exemplo de proteína com esta característica. Esta proteína, após a digestão com pepsina, pode liberar lactoferricina B f(17- 41). Este peptídeo consiste em um potente PAM composto por 25 resíduos de aminoácidos cuja sua estrutura primária pode ser estabilizada pela presença de uma ligação dissulfeto intramolecular. Em sua composição não estão presentes resíduos de tirosina e histidina que são fundamentais para a interação com metais, que representa um papel primordial para a função desempenhada pela proteína nativa lactoferrina (CLARE, CATIGNANI e SWAISGOOD, 2003.). Este peptídeo possui atividade contra bactérias Gram-positivas (*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*), leveduras/fungos (*Candida albicans*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *C. curvatus*, *C. albidus*, *Trichosporon cutaneum*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Penicillium pinophilum*, *P. vermiculatum*, *Rhizopus oryzae*), dermatócitos (*Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Nannizzia gypsea*, *N. incurvata*, *N. otae*), parasitas (*Eimeria stiedai*, *Giardia lamblia*, *Toxoplasma gondii*) e vírus (*Adenovirus*, *Feline calicivirus*, *Herpes simplexvirus-1 and -2*, *Human cytomegalovirus*, *Human immunodeficiency virus-1*) (GIFFORD, HUNTER e VOGEL, 2005; FLORISA et al., 2003). Lactoferricina B demonstra maior ação bactericida em relação a sua proteína nativa devido ao seu menor tamanho e alta carga positiva, que facilitam sua interação com a membrana celular de microrganismos. Além disso, pode ter sua atividade antimicrobiana realçada através de ação sinérgica com a enzima lisozima (AIMUTIS, 2004; WAKABAYASHI, TAKASE e TOMITA, 2003; CLARE e SWAISGOOD, 2000). Ensaio realizados em humanos, através de sua administração oral em pacientes fazendo quimioterapia devido à leucemia, demonstraram significativa redução na duração de infecções e ocorrência de febre. Além disso, pode ser usada em aplicações clínicas devido a seus efeitos na prevenção da carcinogênese e como biopreservativos de alimentos (HAQUE e CHAND, 2007). Alguns produtos contendo este peptídeo em sua composição foram

autorizados e comercializados em países como o Japão e Estados Unidos, atuando no fortalecimento da flora intestinal de crianças, em cosméticos para pele e cuidados orais, por meio de pastas de dente, enxaguantes bucais e gomas de mascar (STELWAGEN et al., 2009; KUWATA et al., 1998).

Baseado neste potencial antimicrobiano de fragmentos obtidos a partir das proteínas do leite bovino, a utilização de ferramentas computacionais representa uma alternativa rápida e acessível na busca por novos agentes bactericidas naturais e de grande importância no combate a microrganismos patogênicos multirresistentes (NGUYEN, HANEY e VOGEL, 2011). Esta forma de avaliar a propensão bactericida dos peptídeos baseia-se análise qualitativa de fatores físico-químicos e estabilidade estrutural das sequências protéicas e, se apresenta como uma promissora fonte de prospecção de possíveis PAMs internalizados em proteínas (GIANGASPERO, SANDRI e TOSSI, 2001; TIAN et al., 2009; ZELEZETSKY e TOSSI, 2006).

Tabela 5 – Principais PAMs do leite bovino registrados na literatura

Peptídeo Antimicrobiano	Fonte	Protease utilizada	Atividade	Principal propriedade química	Referência
Caseína	$\alpha$ s1-caseína	quimosina	Bactérias gram-positivas ( <i>Staphylococcus</i> , <i>Sarcina</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Diplococcus pneumoniae</i> e <i>Streptococcus pyogenes</i> )	Glicopeptídeo catiônico	(LAHOV et al., 1971; LAHOV e REGELSON, 1996)
Isracidina f(1-23)	$\alpha$ s1-caseína	quimosina	Bactérias gram-positivas ( <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> ); Bactérias gram-negativas ( <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Enterobacter sakazakii</i> ); Fungos ( <i>Candida albicans</i> )	Catiônico	(HILL et al., 1974; MALIN et al., 2001)
Casocidina-I f(150-188)	$\alpha$ s2-caseína	tripsina	Bactérias gram-positivas ( <i>Staphylococcus carnosus</i> ); Bactérias gram-negativas ( <i>Escherichia coli</i> )	Catiônico	(ZUCHT et al., 1995)
$\beta$ -CN f(15-20)/ f(25-40)/ f(78-83)/ f(92-100)]	$\beta$ -caseína	tripsina	Bactérias gram-positivas ( <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ); Bactérias gram-negativas ( <i>E. coli</i> )	Aniônicos	(HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2008)
Kappacina A f(106-169)	$\kappa$ -caseína	quimosina	Bactérias gram-positivas ( <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> ); Bactérias gram-negativas ( <i>E. coli</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> )	Fosfopeptídeo aniônico	(MALKOSKI et al., 2001)
Lactoferricina B f(17-41)	lactoferrina	pepsina	Bactérias gram-positivas ( <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> ); Bactérias gram-negativas ( <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> ); Leveduras/fungos ( <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus uniguttulatus</i> , <i>C. curvatus</i> , <i>C. albidus</i> , <i>Trichosporon cutaneum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Penicillium pinophilum</i> , <i>P. vermiculatum</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> ); Dermatócitos ( <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>Nannizzia gypseae</i> , <i>N. incurvata</i> , <i>N. otiae</i> ); Parasitas ( <i>Eimeria stiedai</i> , <i>Giardia lamblia</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> ); Vírus ( <i>Adenovirus</i> , <i>Feline calicivirus</i> , <i>Herpes simplexvirus-1 and -2</i> , <i>Human cytomegalovirus</i> , <i>Human immunodeficiency virus-1</i> )	Catiônico	(BELLAMY et al., 1992)
LDT1 e LDT2	$\alpha$ -lactalbumina	tripsina	Bactérias gram-positivas ( <i>S. aureus</i> ); Bactérias gram-negativas ( <i>E. coli</i> , <i>B. bronchiseptica</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. marcescens</i> )	Aniônicos	(PELLEGRINI, 1999)
$\beta$ -LG f(15-20)/ f(25-40)/ f(78-83)/ f(92-100)]	$\beta$ -lactoglobulina	tripsina	Bactérias gram-positivas ( <i>M. luteus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. zooepidemicus</i> ); Bactérias gram-negativas ( <i>Salmonella typhimurium</i> )	Aniônicos	(PELLEGRINI et al., 2001)

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo identificar peptídeos com potencial antimicrobiano inseridos nas sequências primárias de proteínas constitutivas do leite bovino através da utilização de ferramentas computacionais associadas à síntese química e ensaios microbiológicos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial antimicrobiano de peptídeos originados através da fragmentação *in silico* de proteínas do leite bovino, cujas sequências primárias foram obtidas em bancos de dados *web*;
- Modelar tridimensionalmente as estruturas dos peptídeos com maior propensão antimicrobiana e validar suas estruturas;
- Realizar bioensaios para a determinação de sua atividade antimicrobiana, utilizando peptídeos sintéticos adquiridos;
- Realizar ensaios hemolíticos para avaliar sua citotoxicidade;

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Obtenção e fragmentação das sequências protéicas

As sequências primárias das proteínas do leite bovino ( $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína,  $\kappa$ -caseína, lactoferrina,  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina) foram obtidas por meio de buscas no *Protein database*, disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A fragmentação destas proteínas durante o processo digestivo mediante a ação de proteases disponíveis em diferentes órgãos do sistema digestório foram simuladas *in silico* através da utilização da ferramenta *PeptideMass* (GASTEIGER, et al., 2005), disponível no servidor proteômico ExPASy (*Expert Protein Analysis System*). Nesta ferramenta, a sequência de resíduos de aminoácidos informada foi clivada em sítios específicos de acordo com a enzima escolhida, gerando fragmentos cuja massa, localização na proteína nativa e composição são informadas. Foram utilizadas pepsina, tripsina e quimotripsina, que possuem especificidade de acordo com a Tabela 6 e atuam diretamente no processo metabólico de proteínas alimentares durante a digestão. Durante a utilização da ferramenta, a obtenção dos fragmentos baseou-se na ordem cronológica dos peptídeos na proteína nativa informada e sem delimitação de massa molecular mínima e máxima. Os demais parâmetros foram mantidos inalterados. Desta forma, todos os possíveis fragmentos gerados puderam ser observados e selecionados de acordo com seu tamanho ( $\geq 10$  e  $\leq 20$  resíduos de aminoácidos) para as etapas seguintes.

Tabela 6 – Especificidade das proteases utilizadas

Enzima	Especificidade	Localização
Pepsina (KEIL, 1992)	Resíduos na posição carboxi-terminal:  -X-W (triptofano) -X-F (fenilalanina) -X-Y (tirosina) -X-L (leucina)	Estômago
Tripsina (KEIL, 1992)	Resíduos na posição carboxi-terminal:  -X-K (lisina) -X-R (arginina)	Duodeno
Quimotripsina (KEIL, 1992)	Resíduos na posição carboxi-terminal:  -X-W (triptofano) -X-F (fenilalanina) -X-Y (tirosina) -X-L (leucina) -X-M (metionina) -X-H (histidina)	Duodeno

### 3.2 Seleção de fragmentos com características de PAMs

Após selecionar peptídeos por seu tamanho, outros parâmetros foram observados com o objetivo de determinar os reais candidatos a peptídeos antimicrobianos a serem modelados dentre todos os fragmentos gerados. Inicialmente, os peptídeos selecionados na etapa anterior foram submetidos ao banco de dados APD (*Antimicrobial Peptide Database* - <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), no qual foram obtidos valores para carga e porcentagem de hidrofobicidade (BOMAN, 2003; WANG e WANG, 2004). Peptídeos catiônicos com porcentagem de hidrofobicidade entre 30 % a 60 % foram selecionados e, então tiveram sua composição analisada com o objetivo de eliminar aqueles que possuíam resíduos de cisteína e prolina, devido a possíveis

problemas no processo de síntese artificial, bem como, possíveis problemas no processo de dobramento da estrutura, o que interfere no grau de estruturação do peptídeo. Outras importantes características dos PAMs puderam ser observadas através da utilização da ferramenta (Java applet) *HydroMCalc Description* (<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/HydroCalc/HydroMCalc.html>), na qual foram calculados os valores médios de hidrofobicidade e momento hidrofóbico, de acordo com a escala e o ângulo de projeção selecionados (TOSSI, SANDRI e GIANGASPERO, 2002). A hidrofobicidade média (H) foi calculada através da divisão da soma de todos os índices de hidrofobicidade dos resíduos pelo número total de resíduos da sequência; a hidrofobicidade reflete a capacidade intrínseca do peptídeo de se mover da fase aquosa até a fase hidrofóbica da membrana plasmática (DATHE e WIEPRECHT, 1999). O momento hidrofóbico ( $\mu H$ ) consiste na soma vetorial de todos os índices de hidrofobicidade, dividido pelo número de resíduos; este valor mensura quantitativamente a anfipaticidade do peptídeo e sua análise foi aplicada para determinar prováveis regiões anfifílicas em  $\alpha$ -hélice (PHOENIX e HARRIS, 2002; DATHE e WIEPRECHT, 1999). A anfipaticidade representa o grau de segregação entre resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos, sendo esta uma propriedade crítica para a permeabilização de membranas (CHEN et al., 2005; LEE et al., 2011). Após pesquisar inúmeros PAMs disponíveis em banco de dados e analisar seu perfil hidrofóbico, buscou-se selecionar os peptídeos que apresentassem valor de H entre  $-0,15$  e  $0,14$ , enquanto o valor de  $\mu H$  se encontrava entre  $0,03$  e  $0,41$  e porcentagem de hidrofobicidade  $\geq 30\%$  (BHATTACHARJYA e RAMAMOORTHY, 2009). Na utilização da ferramenta *HydroMCalc Description* os valores foram obtidos através da escala de hidrofobicidade *Eisenberg* (EISENBERG et al., 1982) e o ângulo de projeção  $100^\circ$  *alpha helix* (indicada para peptídeos em  $\alpha$ -hélice) (JIN et al., 2005).

## 3.3 Modelagem Molecular

### 3.3.1 Identificação dos moldes

Para realizar a modelagem molecular dos peptídeos obtidos pela clivagem enzimática *in silico*, inicialmente, foi necessário identificar proteínas com alto nível de similaridade local em relação à sequência dos fragmentos disponíveis, as quais foram utilizadas como molde. A identificação dos melhores moldes foi feita através da utilização da ferramenta BLASTp (ALTSCHUL *et al.*, 1997), disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), com o objetivo de encontrar regiões locais de similaridades entre as sequências informadas e as estruturas tridimensionais (pdb) depositadas no *Protein Data Bank* (PDB - <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>). A análise dos resultados gerados baseou-se nos melhores valores de *Max score* e *Query coverage*, calculados através da matrix de substituição de aminoácidos BLOSUM62 (HENIKOFF e HENIKOFF, 1992; STYCZYNSKI *et. al*, 2008); além disso, a inexistência de *gaps* entre as sequências foi considerado um fator determinante para a escolha do molde.

### 3.3.2 Construções dos modelos

Definido o molde, nessa etapa foi realizado o alinhamento múltiplo entre as seqüências dos peptídeos em estudo e a seqüência dos respectivos *moldes*, utilizando o programa *ClustalW* (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994), baseado na matrix de peso BLOSUM (HENIKOFF e HENIKOFF, 1992). A modelagem por homologia foi realizada utilizando o *software* MODELLER 9v.8 (SALI e BLUNDELL, 1993), no qual a construção dos modelos tridimensionais baseou-se no resultado do alinhamento de suas seqüências e a seqüência dos moldes. As restrições espaciais de ângulos e distâncias da estrutura molde foram calculadas e

aplicadas à seqüência alvo através do alinhamento. Os modelos foram então derivados pela minimização das violações das restrições espaciais do molde, e construído pela imposição dessas restrições na seqüência alvo. Foram geradas 200 estruturas para cada modelo, as quais foram classificadas segundo DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*) e GA341 score; que são métodos estatísticos utilizados para classificar as estruturas de acordo com seus níveis de energia. Modelos com os menores valores para DOPE (SHEN e SALI, 2006) e/ou maiores valores para GA341 (MELO, SÁNCHEZ e SALI, 2002) possuem maior minimização energética, portanto são mais estáveis e aptos a serem utilizados nas etapas seguintes. A visualização dos modelos gerados foi feita através de Delano Scientific's PYMOL 0.99rc6 (<http://pymol.sourceforge.net/>). E, seguida, o servidor PDB2PQR (DOLINSKY et al., 2004) (<http://kryptonite.nbcn.net/pdb2pqr/>) foi utilizado para a criação dos mapas eletrostáticos dos modelos gerados; estes mapas foram elaborados a partir da equação de Poisson-Boltzmann, que avalia as interações eletrostáticas entre biomoléculas em soluções iônicas e disponibiliza seu potencial de superfície (diretamente influenciado pela concentração de íons) e pode indicar sua distribuição de cargas negativas e positivas (FOGOLARI, BRIGO e MOLINARI, 2002).

### 3.3.3 Validação dos modelos

A etapa final do processo de modelagem consistiu em avaliar os diferentes níveis de organização estrutural. Nessa etapa, analisaram-se os vários níveis de empacotamento global do peptídeo, os possíveis erros estruturais em regiões localizadas e os parâmetros estequiométricos. Inicialmente, o programa utilizado na avaliação dos parâmetros estereoquímicos foi o PROCHECK ([http://www.jcsg.org/prod/scripts/validation/sv\\_final.cgi](http://www.jcsg.org/prod/scripts/validation/sv_final.cgi)) (MORRIS et al., 1992), o qual avaliou os comprimentos de ligação, a planaridade das ligações peptídicas, os ângulos das torções da cadeia principal e das cadeias laterais, o impedimento estérico entre pares de átomos não ligados e a qualidade do mapa de

Ramachandran (RAMACHANDRAN e SASISEKHARAN, 1968). Existe uma liberdade rotacional nas ligações que conectam o carbono alfa ( $C\alpha$ ) às duas unidades planares adjacentes formando dois ângulos ( $\phi$  e  $\psi$ ) que variam entre  $-180^\circ$  e  $+180^\circ$ , e conferem à cadeia principal da proteína sua liberdade de conformação. Dessa forma pode-se descrever a estrutura da proteína através dos valores dos ângulos  $\phi$  e  $\psi$  e pode-se, assim, descrever a conformação de um resíduo na proteína a partir de um ponto em um mapa com as coordenadas desses ângulos, esse mapa é denominado mapa de Ramachandran (LEHNINGER, 2000). Conhecendo o mapa de Ramachandran, pode ser possível descrever quais as estruturas secundárias de uma proteína a partir do valor de cada par de ângulos  $\phi$  e  $\psi$  associado a cada ligação peptídica da cadeia ( $\alpha$ -hélices,  $\beta$ -folhas e coils) (MORAIS, 2010). No mapa de Ramachandran os valores permitidos para os ângulo diedrais foram os que se encontraram em regiões de pares de ângulo permitidos. Todos os demais que se encontraram fora destas regiões foram considerados ângulos não permitidos ou proibidos. As regiões permitidas do mapa são construídas através da determinação dos pares de ângulos  $\phi$  e  $\psi$  que respeitam as distâncias mínimas permitidas entre átomos de uma cadeia polipeptídica. Para calcular tais distâncias, os átomos são tratados como esferas sólidas de raio igual ao seu raio de Van der Waals. As regiões parcialmente permitidas são obtidas com raio ligeiramente menor e correspondem às conformações de menor estabilidade. Os resíduos quando pertencentes a um determinado tipo de estrutura secundária tendem a ter ângulos diedrais característicos, inerentes às restrições impostas pelo tipo de estrutura espacial. Estes conjuntos de ângulos característicos formam regiões específicas no mapa de Ramachandran para cada tipo de estrutura secundária. Uma estrutura ideal deve ter aproximadamente 90 % de aminoácidos nas regiões mais favorecidas e esse percentual é um dos melhores indicadores da qualidade estrutural de uma proteína (MORAIS, 2010). O programa 3DSS (<http://cluster.physics.iisc.ernet.in/3dss/>) foi usado para o cálculo do RMSD (*root mean square deviation* – distância entre os átomos), que mostrou o quão similar duas estruturas são e foi obtido por meio da sobreposição estrutural do modelo obtido por modelagem molecular e a estrutura utilizada como molde (SUMATHI *et al.*, 2006). Finalmente, a coerência entre os moldes e os modelos gerados foi avaliada através do ProSa-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), que é uma ferramenta computacional usada para avaliar possíveis erros em estruturas tridimensionais de proteínas. Esta avaliação é realizada através da

análise global da qualidade do modelo por meio do cálculo dos valores de z-score (WIEDERSTEIN e MANFRED, 2007). Z-score indica o desvio da energia total da estrutura com relação a distribuição de energia derivada de conformações aleatórias e comparações com todas as cadeia protéicas de tamanhos similares disponíveis no PDB. (SIPPL, 1995 e SIPPL, 1993). Segundo Venclovas et al. (2004), quanto mais negativo o valor de z-score, menor será a energia estimada e, assim será menos provável da estrutura conter erros.

### **3.4 Síntese dos peptídeos e determinação de sua massa e pureza**

Todos os peptídeos candidatos com características antimicrobianas foram adquiridos na empresa ChinaPeptides Co. (Shanghai), onde foram solicitadas 5 mg de cada peptídeo, contendo estes pureza > 95 %. A solução contendo os peptídeos provenientes da clivagem de resina foi liofilizada (MERRIFIELD, 1963). Os peptídeos sintéticos liofilizados foram solubilizados em água Milli-Q, misturados em uma solução saturada de uma matriz constituída por ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (1:3), depositada em uma placa do tipo *MTP 384 massive* e secas a temperatura ambiente. Os compostos tiveram suas massas moleculares exatas determinadas, utilizando um espectrômetro de massa do tipo MALDI-ToF Ultraflex III (Bruker Daltonics). A calibração foi realizada utilizando *Peptide calibration standard II* (Bruker Daltonics) como padrões de massa molecular. O valor teórico obtido pelo serviço online *Protein Prospector* (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.html>) foi comparado com o valor experimental obtido pela análise feita no espectrômetro de massa.

### 3.5 Quantificação

Antes da realização dos testes *in vitro* para a avaliação de atividade antimicrobiana, foi necessário medir a concentração das soluções. Os peptídeos lactof01 e lactof02 foram quantificados segundo o método descrito por Murphy e Kies (1960), no qual a absorvância das soluções em diluições diferentes foi medida nos comprimentos de 205, 215 e 225 nm. A concentração final foi determinada pela seguinte equação, considerando-se os fatores de diluição (*d*):

$$\begin{aligned} X &= (A_{215} - A_{225}) \times 144 \\ Y &= (A_{205}) \times 31 \\ [\text{mg.mL}^{-1}] &= d \times (X + Y) / 2 \end{aligned}$$

Os peptídeos A\_lact01, serumA01 e serumA02 foram quantificados pela absorvância de luz do resíduo de triptofano seguindo a lei de Lambert-Beer:

$$A = a.b.c$$

Onde "A" é a absorvância a 280 nm; "a" é o coeficiente de extinção molar, obtido através da ferramenta ProtParam ([web.expasy.org/protparam](http://web.expasy.org/protparam)) (GASTEIGER et al., 2005); "b" é o caminho óptico (1 cm) e "c" é a concentração desejada (mg.mL<sup>-1</sup>).

### 3.6 Testes *in vitro* para avaliação de atividade antimicrobiana

Nos ensaios de atividade *in vitro* foram utilizadas bactérias patogênicas humanas Gram-negativas (*Escherichia coli* sp. - ATCC 8739 e *Klebsiella pneumoniae* - ATCC 13883) e Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* - ATCC 29213). As células bacterianas foram previamente replicadas em meio Luria Bertani (LB) líquido (50 % Bactotripton: 25 % Extrato de levedura: 35 % NaCl, diluídos em águas destilada), sob agitação durante 2-3 horas a 37° C. A atividade antimicrobiana foi determinada usando o método de microdiluição em caldo de acordo M7-A6 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2006). Previamente, a curva de crescimento da cultura original foi estabelecida por monitoramento do crescimento bacteriano através da observação da densidade ótica a 595 nm, a cada meia hora. Dessa forma, foi possível determinar o tempo ótimo para que o inóculo alcance o meio da fase exponencial. Para determinar a relação entre unidades formadoras de colônias (UFC) e densidade ótica, foi aplicada a técnica de micro gotas para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão, quando uma alíquota foi coletada durante as leituras de meia hora, submetida a diluições de 1:10 e micro gotas das suspensões serão semeadas em meio LB acrescido de Agar (15 g.L<sup>-1</sup>). Os testes contra as bactérias foram realizados em placas multi-poços, a partir da cultura original, sendo preparado um inóculo, o qual foi diluído para aproximadamente 5 x 10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> por poço, com um volume que não ultrapassasse 10 % do volume do poço contendo meio LB líquido, como controle negativo foi utilizado água destilada estéril e como controle positivo cloranfenicol 40 µg.mL<sup>-1</sup>. As placas multi-poços inoculadas foram incubadas com agitação leve a 37 °C durante 6 horas. O crescimento bacteriano foi monitorado a 595 nm em um leitor de microplaca (Bio-Tek PowerWave HT - USA, a cada meia hora, durante a fase exponencial de crescimento bacteriano. A quantidade de crescimento bacteriano nos poços do controle positivo foi comparada com a quantidade de crescimento nos poços do controle negativo para determinar os pontos finais de crescimento. A concentração inibitória mínima (CIM) foi a menor concentração que inibir 100 % do crescimento bacteriano.

### 3.7 Ensaio hemolíticos

A hemólise de glóbulos vermelhos do sangue vem sendo considerada uma forma de mensurar os efeitos de peptídeos em relação à integridade das células de mamíferos, determinando seu grau de citotoxicidade (JIN et al., 2005). O ensaio para determinar a atividade hemolítica foi realizado de acordo com metodologia descrita por Kim et al. (2005), com pequenas modificações. Foram utilizados eritrócitos humanos coletados na presença do anticoagulante heparina, em seguida, foram lavados três vezes e suspensos em solução PBS (pH 7.4). A atividade hemolítica dos peptídeos foi avaliada em concentrações padrões entre 1 e 512  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em associação com alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  de eritrócitos em suspensão. Os eritrócitos foram encubados com os peptídeos por 30 minutos a 37° C e então, centrifugados por 5 minutos a 5000 x g. A porcentagem de hemólise foi mensurada ao se medir a densidade óptica do sobrenadante a 540 nm. O tampão PBS (pH 7.4) foi utilizado como controle negativo e Triton X-100 0,2 % foi usado como controle positivo. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Obtenção e fragmentação das sequências protéicas

As sequências protéicas do leite bovino foram obtidas pelo *Protein database*, do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), através dos seguintes números de acesso:

Tabela 7 – Dados de identificação das proteínas do leite bovino

Nome	Número de Acesso	GenInfo Identificador (gi)	Tamanho (aa)
$\alpha$ -s1-Caseína	NP_851372	30794348	214
$\alpha$ -s2-Caseína	DAA28598	296486485	222
$\beta$ -Caseína	NP_851351	30794310	224
$\kappa$ -Caseína	NP_776719	27881412	190
Lactoferrina	AAA30610	408928	708
$\alpha$ -Lactalbumina	NP_776803	27805979	142
$\beta$ -Lactoglobulina	NP_776354	87196497	178
Albumina sérica	NP_851335	30794280	607

Ao submeter estas sequências à fragmentação pela ferramenta *PeptideMass* utilizando as enzimas pepsina, tripsina e quimotripsina (que atuam diretamente no processo metabólico de proteínas alimentares durante a digestão) foram observados cerca de 1158 peptídeos com grande variação em sua composição, tamanho e massa molecular.

### 4.2 Seleção de fragmentos com características de PAMs

A partir dessa fragmentação, foram selecionados peptídeos que possuíam  $\geq 10$  e  $\leq 25$  resíduos de aminoácidos, o que nos levou a 209 peptídeos (Tabela 8).

Estes que inicialmente foram selecionados através do tamanho foram então submetidos ao servidor APD (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), onde a carga e o percentual de hidrofobicidade puderam ser avaliados e, então possibilitar a seleção daqueles com carga positiva e percentual de hidrofobicidade (entre 30 % a 60 %), resultando em 83 peptídeos (Tabela 8) (GIANGASPERO, SANDRI e TOSSI, 2001). Peptídeos aniônicos (carga negativa) foram eliminados devido à prevalência de peptídeos catiônicos em relação ao montante de PAMs disponibilizados em base de dados especializadas, bem como, pela existência de algumas controvérsias em relação ao seu mecanismo de ação (HARRIS, DENNISON e PHOENIX, 2009). Além disso, a cationicidade exibe um importante papel no processo de interação com a membrana aniônica de microrganismos e, também, na atuação em alvos intracelulares (ácidos nucleicos e proteínas fosforiladas) (NGUYEN, 2011; BHATTACHARJYA e RAMAMOORTHY, 2009).

Os peptídeos selecionados foram analisados com relação à sua composição, com o objetivo de eliminar peptídeos que possuíam resíduos de prolina (Pro) e cisteína (Cys). Isto se deve ao fato de que a existência de resíduos de cisteína pode favorecer a formação de pontes dissulfeto entre dois peptídeos em solução, interferindo na formação de sua estrutura secundária e, conseqüentemente, desfavorecendo sua síntese artificial devido ao aumento de custos, bem como, dificultando sua comercialização. Por outro lado, peptídeos contendo resíduos de prolina dificultam a formação de  $\alpha$ -hélices devido à sua estrutura química coesa e rígida causando claras torções e diminuindo o grau de estruturação e, desta forma, influenciando a interação do peptídeo com a membrana de microrganismos (ZELEZETSKY e TOSSI, 2006; GIANGASPERO, SANDRI e TOSSI, 2001). A partir da seleção baseada na composição de resíduos de aminoácidos, apenas 21 peptídeos dentre os 83 analisados não continham Pro e/ou Cys (Tabela 8), o que equivale a, aproximadamente, 1,8 % do total de peptídeos gerados inicialmente através da fragmentação.

Em seguida, foram analisados os perfis hidrofóbicos obtidos através da ferramenta *HydroMCalc*, por meio de análise da hidrofobicidade média (entre -0,15 e 0.14) e momento hidrofóbico médio (entre 0.03 e 0.41) (Tabela 9). A seleção de peptídeos por meio destes valores constitui uma importante etapa no processo de determinação de candidatos a PAMs, visto que hidrofobicidade e momento hidrofóbico desempenham papéis cruciais na interação com biomembranas e na

determinação de sua anfipaticidade, o que pode interferir no nível de susceptividade de microrganismos com relação ao PAM (LEE et al., 2011; CHEN et al., 2005; DATHE e WIEPRECHT, 1999).

Após a observação de todos os parâmetros seletivos, foi obtida a lista (Tabela 9) de peptídeos selecionados (totalizando 05) para a modelagem molecular.

Tabela 8 - Quantificação de fragmentos obtidos após fragmentação e selecionados após aplicação de parâmetros seletivos (tamanho, carga e composição)

Proteína	Total de fragmentos gerados			Total de peptídeos selecionados por tamanho			Total de peptídeos catiônicos			Total de peptídeos selecionados pela composição		
	Pepsina	Tripsina	Quimotripsina	Pepsina	Tripsina	Quimotripsina	Pepsina	Tripsina	Quimotripsina	Pepsina	Tripsina	Quimotripsina
	$\alpha$ -s1-Caseína	31	21	43	6	8	6	2	1	2	0	1
$\alpha$ -s2-Caseína	25	31	42	3	8	6	2	2	2	1	0	0
$\beta$ -Caseína	37	17	36	7	4	5	4	2	4	1	0	1
$\kappa$ -Caseína	21	14	30	6	3	5	4	3	3	1	1	1
Lactoferrina	102	88	147	25	21	19	15	7	6	2	3	1
$\alpha$ -Lactalbumina	23	14	33	2	4	3	1	2	0	0	2	0
$\beta$ -Lactoglobulina	32	19	42	4	4	3	1	1	1	0	1	1
Albumina Sérica	96	95	119	19	23	15	10	2	6	2	2	0
<b>Total</b>	<b>367</b>	<b>299</b>	<b>492</b>	<b>72</b>	<b>75</b>	<b>62</b>	<b>39</b>	<b>20</b>	<b>24</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>4</b>

Tabela 9 - Fragmentos selecionados após aplicação de todos os parâmetros seletivos

Proteína de origem / Nome do fragmento	Sequência	Localização	Protease utilizada	Tamanho (aa)	Massa (kDa)	Carga	Hidrofobicidade (%)	Hidrofobicidade média	Momento Hidrofóbico Médio
Lactoferrina / lactof01	AVAVVKKANEGL	454-465	pepsina	12	1198.7	1	58	-0.03	0.27
Lactoferrina / lactof02	QVLLHQQALFGK	628-639	tripsina	12	1381.7	2	50	-0.03	0.14
$\alpha$ -Lactalbumina / A_lact01	VGINYWLAHK	118-127	tripsina	10	1200.6	2	50	0.04	0.03
Albumina Sérica / serumA01	YYANKYNGVF	179-188	pepsina	10	1238.5	1	30	-0.07	0.16
Albumina Sérica / serumA02	WVTFISLLLFSSAYS	3-19	tripsina	17	2003.1	1	58	0.13	0.18

### 4.3 Modelagem Molecular

A construção dos modelos tridimensionais dos peptídeos em estudo baseou-se na escolha de moldes (preferencialmente, com homologia em relação ao peptídeo) adequados através da ferramenta BLASTp, conforme a Tabela 10.

O alinhamento entre as sequências dos peptídeos e seus respectivos moldes (Tabela 10) serviu como base para avaliar o grau de similaridade entre elas, bem como, para determinar as restrições espaciais durante a criação dos modelos tridimensionais.

Tabela 10 – Moldes escolhidos após submissão das sequências ao BLASTp

Peptídeos	Molde (PDB ID)	Descrição	Identidade (%)	Referência
lactof01	1BIY	Lactoferrina diférrica de bufalo	100	KARTHIKEYAN <i>et al.</i> , 2000
lactof02	1BIY	Lactoferrina diférrica de bufalo	98,26	KARTHIKEYAN <i>et al.</i> , 2000
A_lact01	1HFX	$\alpha$ -Lactalbumina	96,62	PIKE, BREW e ACHARYA, 1996
serumA01	1N5U	Complexo de albumina sérica humana com heme	92,29	WARDELL <i>et al.</i> , 2002
serumA02	1N5U	Complexo de albumina sérica humana com heme	82,51	WARDELL <i>et al.</i> , 2002

Em seguida, foram criados os 200 modelos tridimensionais para cada peptídeo a partir da aplicação das restrições espaciais dos moldes através do software Modeller 9v8. Os modelos energeticamente mais favoráveis foram selecionados (com base nos valores de DOPE e GA341 *score*) e apresentaram conformações variadas (Figura 6A-10A). A criação dos mapas eletrostáticos através do servidor PDB2PQR possibilitou a análise do potencial eletrostático dos modelos e a verificação da distribuição de cargas positivas (azul) e negativas (vermelho) em sua superfície (Figura 6B-10B).

Em sua maioria, os peptídeos exibiram propensão à formação de estruturas helicoidais e clara distribuição de cargas positivas e negativas. O peptídeo lactof01 foi o único a apresentar uma estrutura tridimensional estendida e, exibiu também, nítidos domínios concentrados de carga positiva e negativa em seu mapa eletrostático, com predomínio de cargas negativas (Figura 6B). Enquanto os peptídeos lactof02 (Figura 7B) e A\_lact01 (Figura 8B) apresentaram estruturas em  $\alpha$ -

hélice e distribuição equilibrada de cargas positivas e negativas; entretanto, A\_lact01 não demonstrou boa definição em seus domínios carregados. Já os peptídeos serumA01 (Figura 9B) e serumA02 (Figura 10B), exibiram estruturas em  $\alpha$ -hélices e um pequeno predomínio de cargas positivas em sua superfície eletrostática.

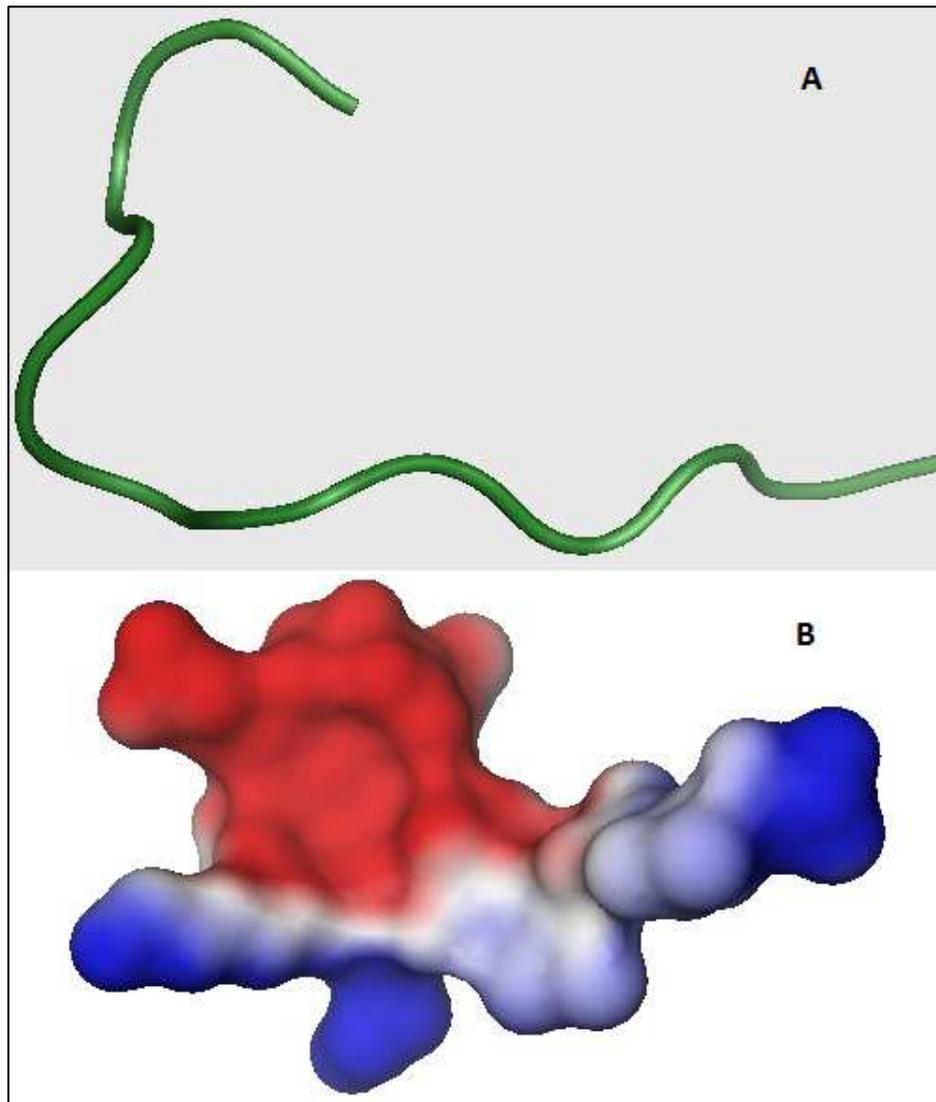


Figura 6 – a) Representação em *cartoon* do peptídeo lactof01 construído através de modelagem por homologia usando o programa Modeller 9v8. b) Representação do mapa eletrostático de superfície do peptídeo lactf01, obtido através do servidor PDB2PQR, através do qual é visualizada a distribuição de cargas negativas (vermelho) e cargas positivas (azul). Para visualização de ambos foi utilizado o programa PyMol 0.99rc6.

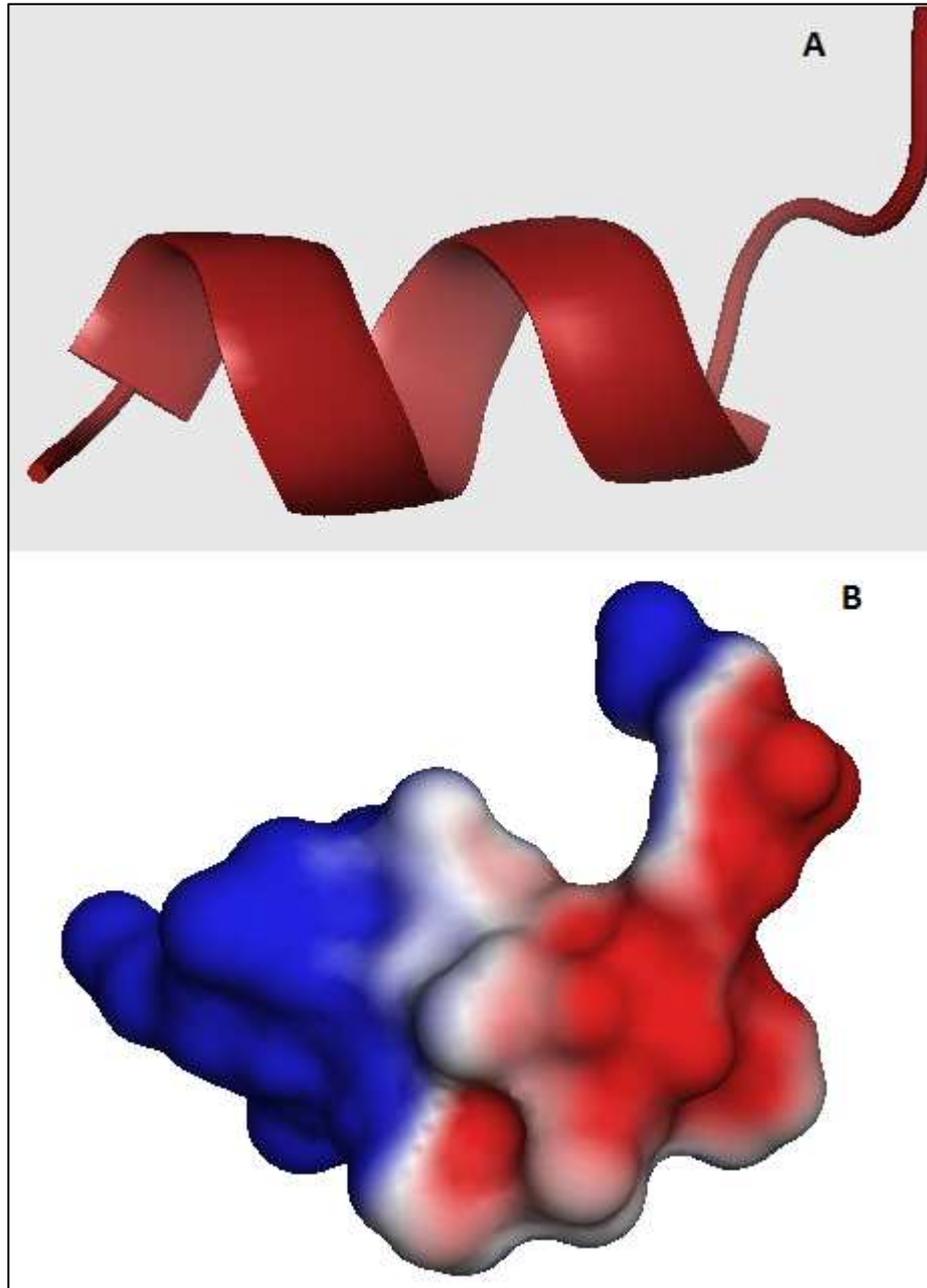


Figura 7 – a) Representação em *cartoon* do peptídeo lactof02 construído através de modelagem por homologia usando o programa Modeller 9v8. b) Representação do mapa eletrostático de superfície do peptídeo lactf02, obtido através do servidor PDB2PQR, através do qual é visualizada a distribuição de cargas negativas (vermelho) e cargas positivas (azul). Para visualização de ambos foi utilizado o programa PyMol 0.99rc6.

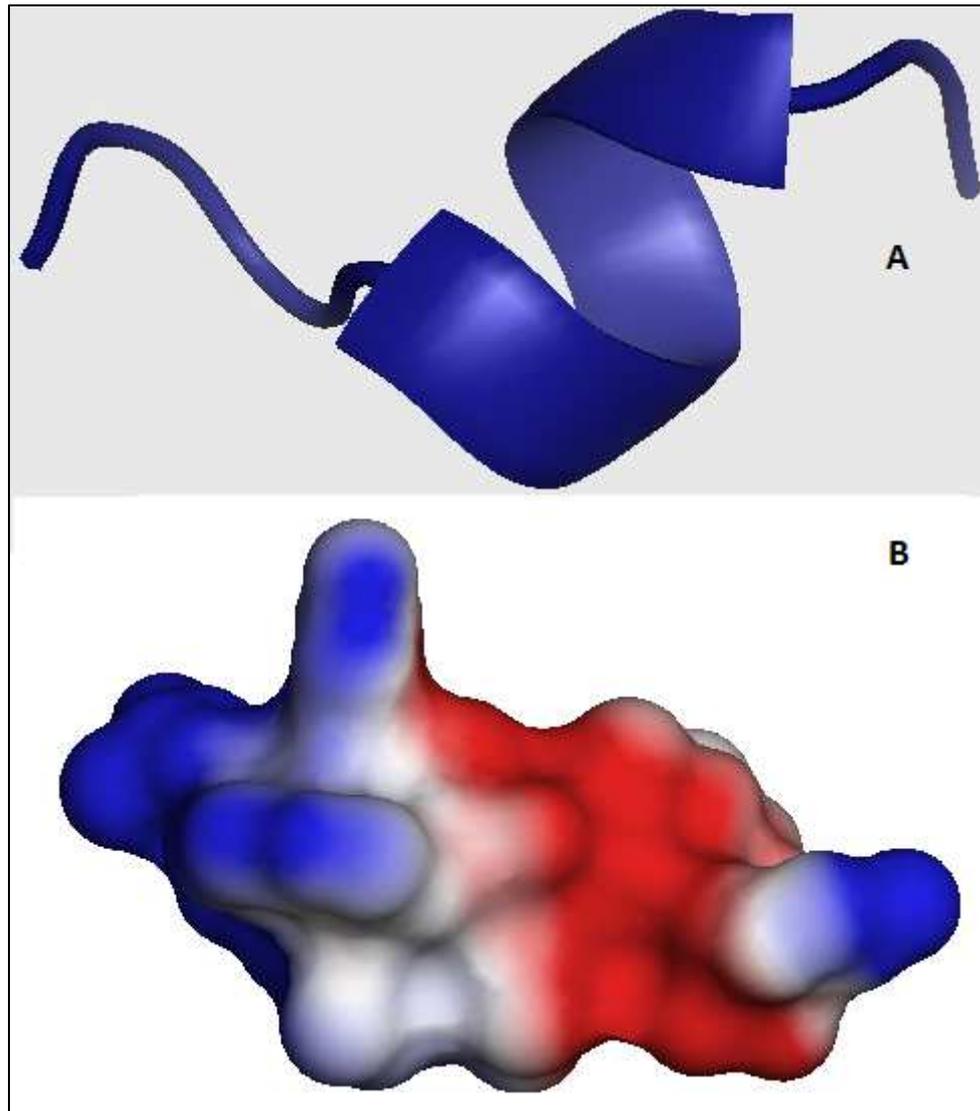


Figura 8 – a) Representação em *cartoon* do peptídeo A\_lact01 construído através de modelagem por homologia usando o programa Modeller 9v8. b) Representação do mapa eletrostático de superfície do peptídeo A\_lact01, obtido através do servidor PDB2PQR, através do qual é visualizada a distribuição de cargas negativas (vermelho) e cargas positivas (azul). Para visualização de ambos foi utilizado o programa PyMol 0.99rc6.

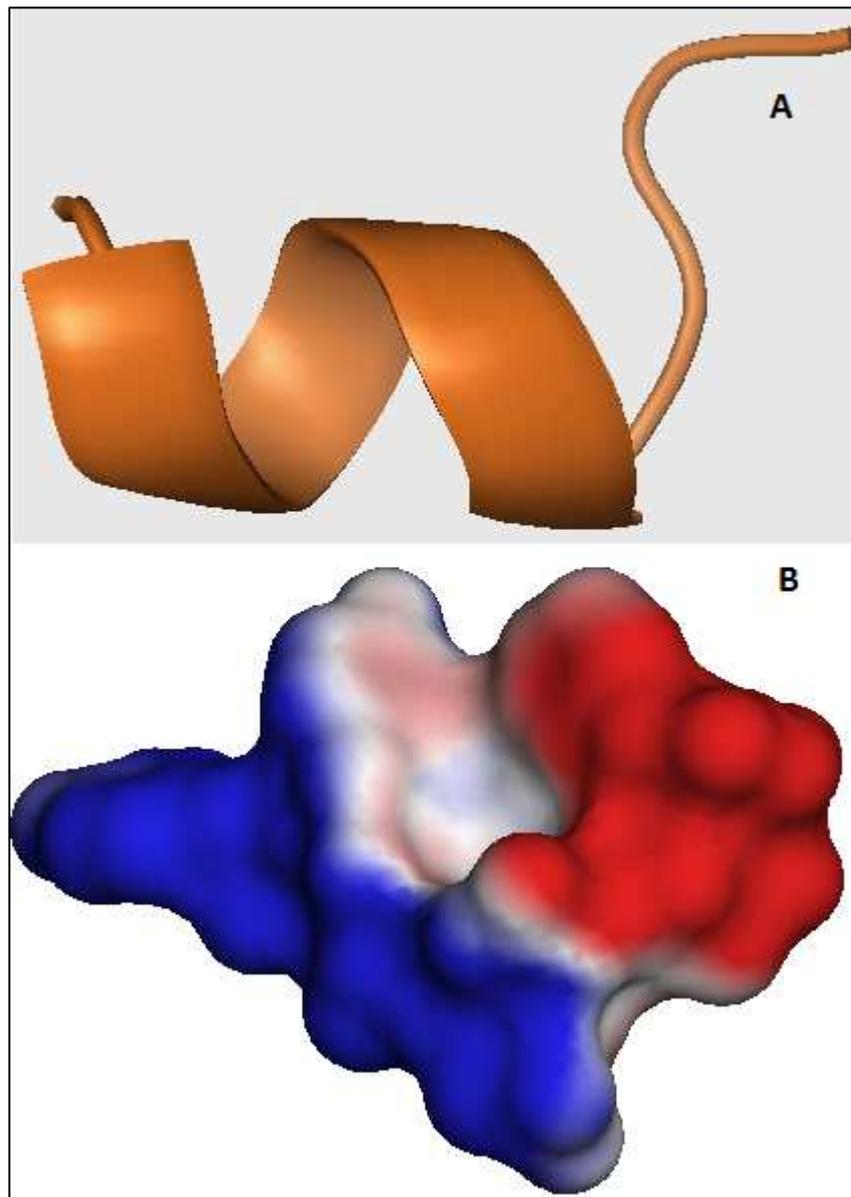


Figura 9 – a) Representação em *cartoon* do peptídeo serumA01 construído através de modelagem por homologia usando o programa Modeller 9v8. b) Representação do mapa eletrostático de superfície do peptídeo serumA01, obtido através do servidor PDB2PQR, através do qual é visualizada a distribuição de cargas negativas (vermelho) e cargas positivas (azul). Para visualização de ambos foi utilizado o programa PyMol 0.99rc6.

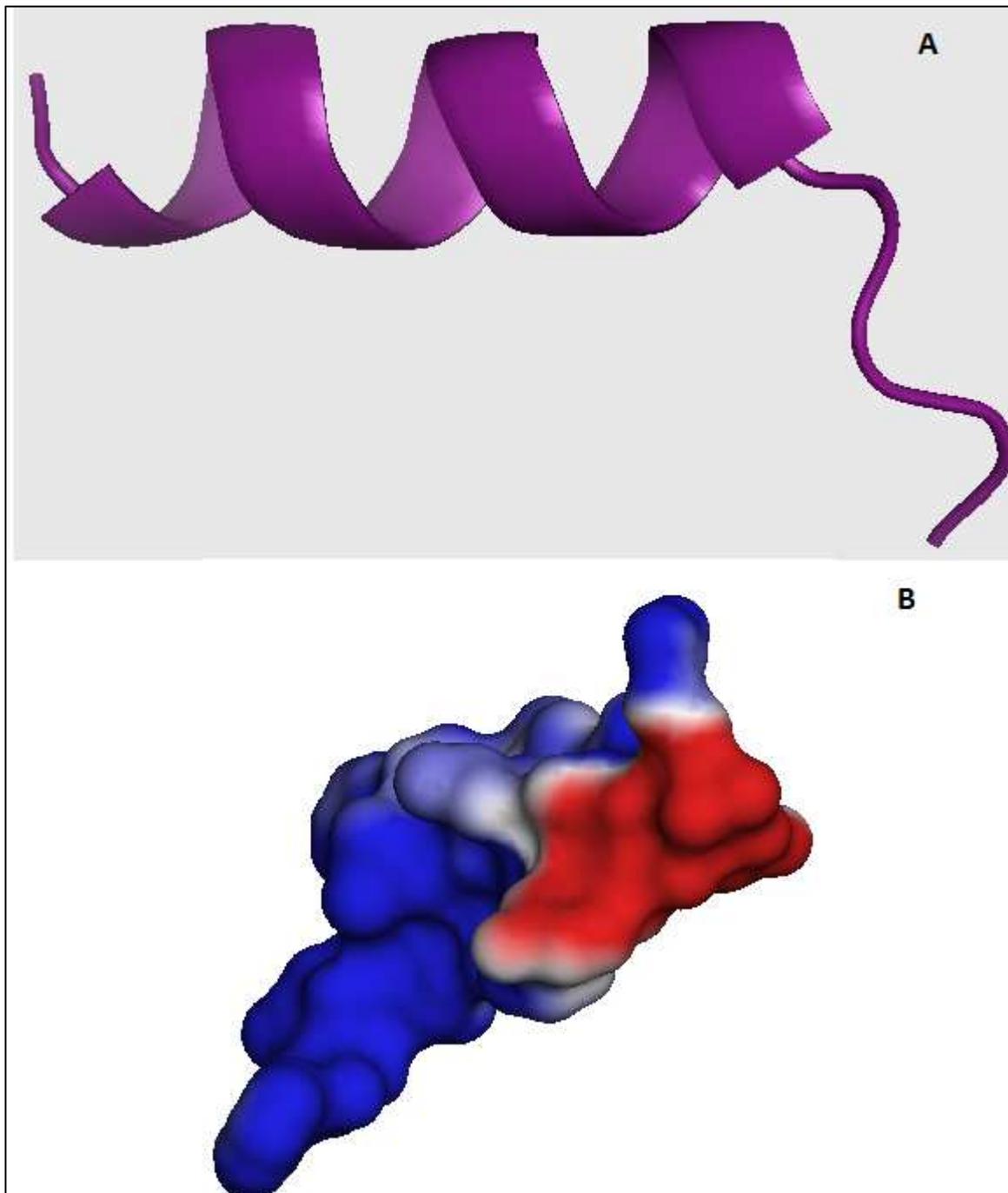


Figura 10 – a) Representação em *cartoon* do peptídeo serumA02 construído através de modelagem por homologia usando o programa Modeller 9v8. b) Representação do mapa eletrostático de superfície do peptídeo serumA02, obtido através do servidor PDB2PQR, através do qual é visualizada a distribuição de cargas negativas (vermelho) e cargas positivas (azul). Para visualização de ambos foi utilizado o programa PyMol 0.99rc6.

### 4.3.1 Validação dos modelos

A validação dos modelos pelo PROCHECK possibilitou a geração dos mapas de Ramachandran, através dos quais se pode avaliar o grau de estabilidade energética dos resíduos de aminoácidos que compõem os peptídeos e a qualidade dos modelos. Nestes mapas, em vermelho são representadas regiões favoráveis, em amarelo são representadas regiões permitidas, em amarelo claro são as regiões generosamente permitidas e em branco são as regiões proibidas.

Nos mapas gerados para os peptídeos lactof01 e lactof02, 88,9 % (equivalente a 08 resíduos de aminoácidos) dos resíduos estavam dispostos em regiões favoráveis, enquanto 11,1 % (equivalente a 01 resíduo de aminoácido) estavam em regiões permitidas. O mapa do peptídeo A\_lact01 apresentou 100 % (equivalente a 07 resíduos de aminoácidos) dos resíduos dispostos em regiões favoráveis e o mapa do peptídeo A\_lact02 apresentou 90,5 % (equivale a 19) dos resíduos em regiões favoráveis, enquanto 9,5 % (equivale a 02) estavam em regiões permitidas. No mapa gerado para o peptídeo serumA01, 71,4 % (equivale a 05) resíduos estavam dispostos em regiões favoráveis e 28,6 % (equivale a 02) resíduos estavam em regiões permitidas; enquanto no mapa de Ramachandran do peptídeo serumA02, 100 % (equivale a 15) resíduos localizaram-se em regiões favoráveis. Estes resultados (Figura 11) demonstraram a existência de estabilidade energética das estruturas construídas.

O cálculo de RMSD através do 3DSS gerou valores considerados satisfatórios ( $\leq 2\text{Å}$ ) com relação à proximidade das coordenadas atômicas entre os modelos e os *moldes* utilizados na modelagem molecular, o que confirma a alta identidade entre eles. RMSD indica a variação estrutural dos modelos com relação aos moldes, demonstrando a distância entre seus átomos durante o processo de sobreposição das estruturas (Tabela 11).

Tabela 11 – Valores de RMSD calculados através do 3DSS

Peptídeos	RMSD (Å)
lactof01	0,872
lactof02	0,916
A_lact01	0,716
A_lact02	1,528
serumA01	2,002
serumA02	1,251

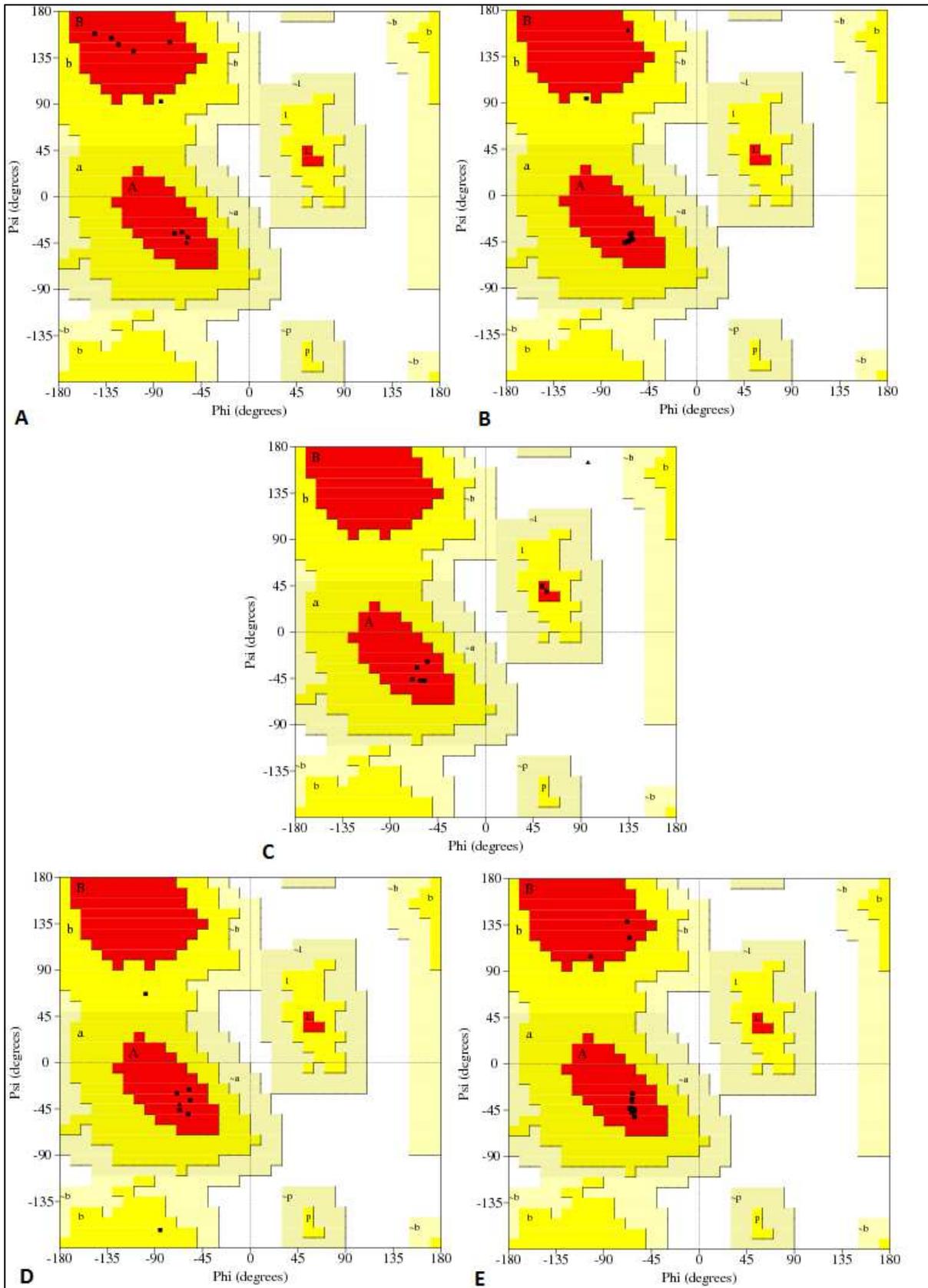


Figura 11 - Mapas de Ramachandran dos peptídeos lactof01 (A), lactof02 (B), A\_lact01 (C), serumA01 (D) e serumA02 (E). Em vermelho são representadas regiões favoráveis, em amarelo são representadas regiões permitidas, em amarelo claro são as regiões generosamente permitidas e em branco são as regiões proibidas.

Os resultados obtidos através do ProSa-web mostraram que todos os valores de *z-score* (Tabela 12) encontravam-se dentro do escopo determinado para estruturas com tamanho similar dispostas no PDB (Figura 12). Entretanto, os peptídeos lactof01 e serumA01 exibiram valores positivos, o que pode indicar problemas na qualidade de seus modelos (VENCLOVAS et al., 2004). Os gráficos gerados pela ferramenta diferenciam por cor os valores relacionados à estruturas originadas por NMR (ressonância nuclear magnética) e estruturas originadas por difração de raio-x disponíveis no PDB, de forma que, as regiões em azul escuro e azul claro englobam todos os valores de *z-score* registrados para estruturas NMR e difração de raio-x com tamanho entre 0 e 1.000 resíduos, respectivamente. A partir da observação da Figura 12, foi possível verificar que estruturas com *z-score* positivo possuem menos propabilidade de permanecer dentro do escopo de estruturas já registradas e, desta forma, podem indicar a presença de erros estruturais.

Tabela 12 – Valores de *z-score* dos peptídeos modelados

<b>Peptídeo</b>	<b>Tamanho (aa)</b>	<b>Z-score</b>
lactof01	12	1,16
lactof02	12	-1,43
A_lact01	10	-0,97
serumA01	10	0,47
serumA02	17	-1,11

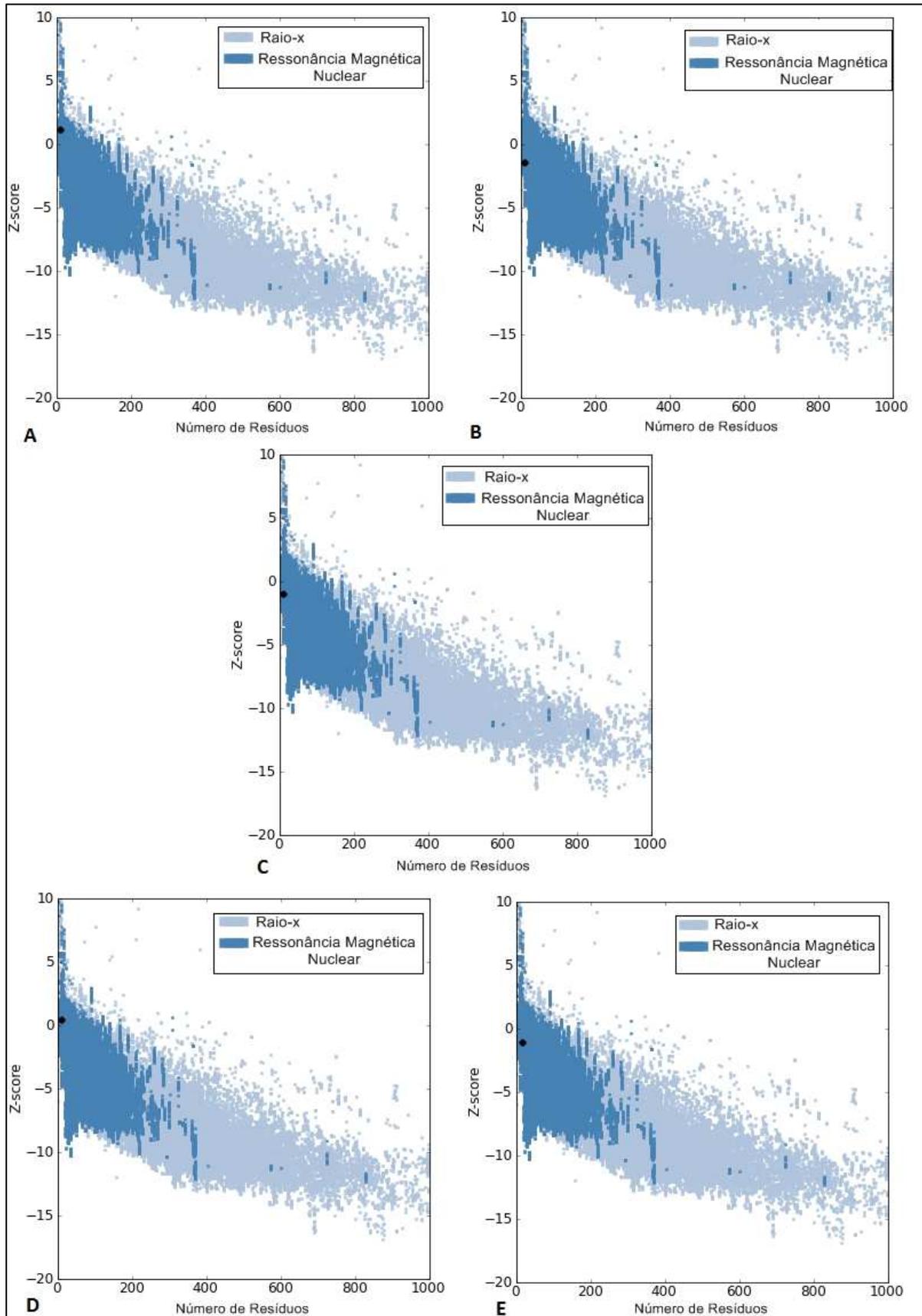


Figura 12 - Trama de z-scores para avaliação dos peptídeos lactof01 (A), lactof02 (B), A\_lact01 (C), serumA01 (D) e serumA02 (E). Regiões em azul escuro representam todos os valores de z-score registrados para estruturas obtidas por NMR e regiões em azul claro representam todos os valores de z-score registrados no PDB para estruturas obtidas por raio-x, com tamanho entre 0 e 1.000 resíduos.

#### 4.4 Síntese dos peptídeos e determinação de sua massa e pureza

Após suspender as amostras liofilizadas em 250 µL, o procedimento de análise da massa molecular dos peptídeos confirmou a disponibilidade de compostos equivalentes aos peptídeos encomendados (Tabela 13).

Tabela 13 – Análise de massa dos peptídeos através da utilização de um espectrômetro de massa do tipo MALDI-ToF

Peptídeo	Massa Molecular (KDa)
lactof01	1198
lactof02	1381,3
A_lact01	1199,9
serumA01	1237,8
serumA02	2002,8

#### 4.5 Testes *in vitro* para avaliação de atividade antimicrobiana

A concentração das amostras foi aferida utilizando os métodos descritos anteriormente e, em seguida, foi padronizada para a realização dos ensaios. A partir do cálculo destas concentrações, foi possível seguir na organização dos testes *in vitro* para a avaliação de atividade antimicrobiana dos peptídeos em estudo. Estes foram testados em bioensaios contra 02 bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *K. pneumoniae*) e 01 Gram-positiva (*S. aureus*) e exibiram, em sua maioria, uma baixa atividade antimicrobiana. Foi verificado que a atividade dos peptídeos tornou-se mais evidente nas maiores concentrações (512 mg.mL<sup>-1</sup>) e após a terceira hora de leitura (Figura 13), a partir da qual a atividade pouco se alterou. O peptídeo lactof01 (512), durante a terceira de ensaio, exibiu inibição de crescimento em, aproximadamente, 23 % em relação a *E.coli*, 25 % em relação a *K. pneumoniae* e 20 % em relação a *S. aureus*. O peptídeo lactof02 (512), após 120 minutos de ensaio, exibiu inibição de crescimento em, aproximadamente, 25 % em relação a *E.coli*, 35 % em relação a *K. pneumoniae* e 21 % em relação a *S. aureus*. O peptídeo A\_lact01

(512), após 120 minutos de ensaio, exibiu inibição de crescimento em, aproximadamente, 16 % em relação a *E.coli*, 21 % em relação a *K. pneumoniae* e 24 % em relação a *S. aureus*. Enquanto o peptídeo serumA01 (512) exibiu semelhante inibição de, aproximadamente, 18 % após 120 minutos de ensaio somente em relação a *K. pneumoniae* e *S. aureus*. Já o peptídeo serumA02, apresentou uma pequena atividade antimicrobiana somente em relação a *S. aureus*, com percentual em aproximadamente 19 %, após 120 minutos de ensaio. Em suma, a atividade exibida pelo peptídeo lactof02 pode ser considerada relativamente superior aos demais peptídeos em relação às bactérias Gram-negativas testadas; sendo este seguido por lactof01, A\_lact01 e serumA01. e serumA02. Mas, em relação à bactéria Gram-positiva testada, o peptídeo A\_lact01 mostrou relativamente mais ativo, sendo seguido por lactof02, lactof01, serumA02 e serumA01.

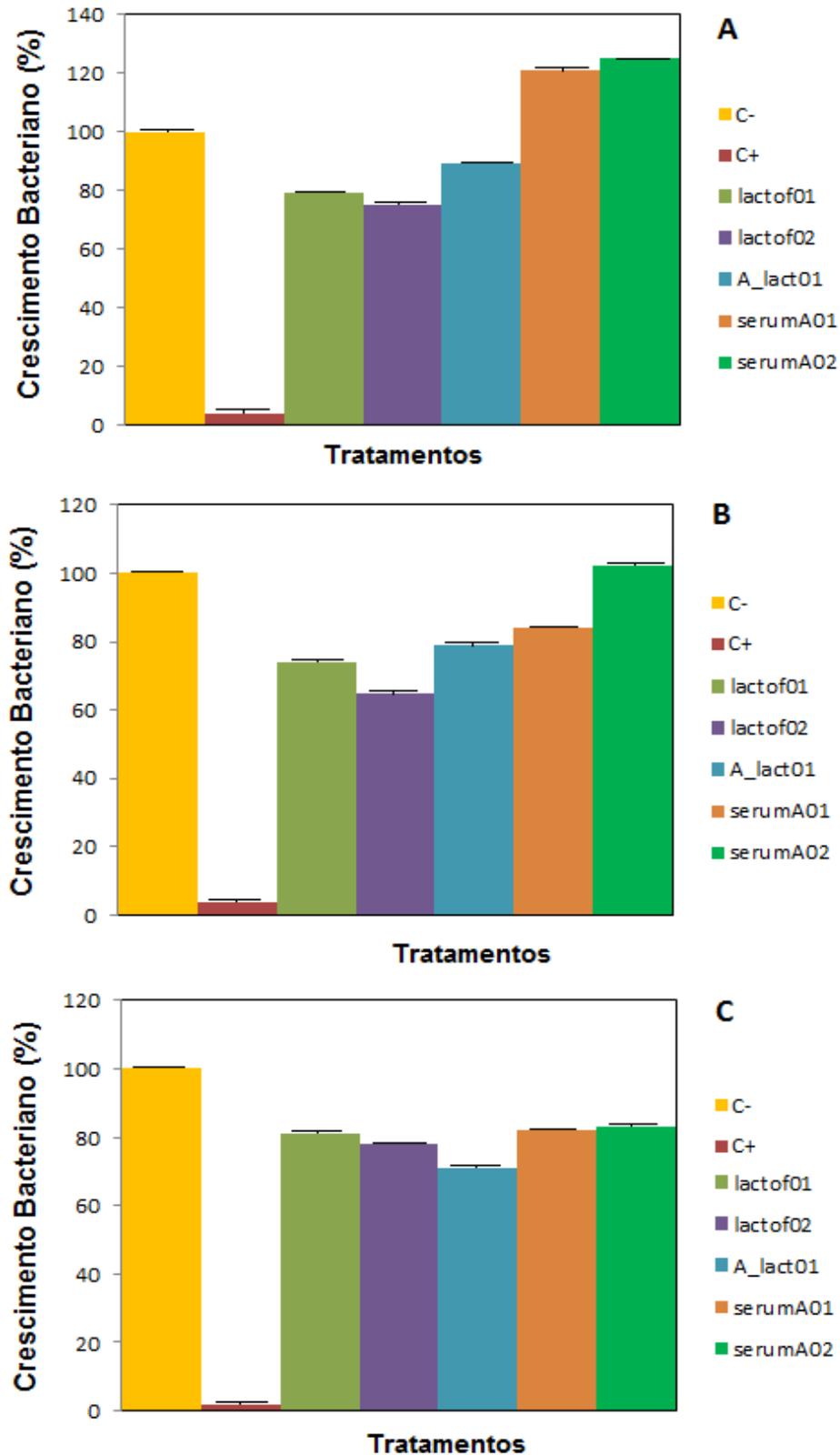


Figura 13 – Avaliação da atividade antimicrobiana dos peptídeos lactof01, lactof02, A\_lact01, serumA01 e serumA02 sobre as bactérias *E. coli* (ATCC 8739)(A), *K. pneumoniae* (ATCC 13883) (B) e *S. aureus* (ATCC 29213) (C) após 120 minutos de ensaio na concentração de 512 mg.L<sup>-1</sup>. Os valores representam as médias de triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. C+ representa o controle positivo (cloranfenicol 40 µg.mL<sup>-1</sup>) e C- representa o controle negativo (água destilada estéril).

## 4.6 Ensaios hemolíticos

Durante a análise da citotoxicidade dos peptídeos através dos ensaios hemolíticos (Figura 14) foi observado que o peptídeo lactof02 possui uma taxa de hemólise de, aproximadamente, 27 % na concentração de  $512 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Esta taxa de hemólise diminui à medida que a concentração do peptídeo foi reduzida, entretanto, a atividade hemolítica não se extinguiu completamente. Os peptídeos lactof01, A\_lact01 e serumA02 exibiram taxa de hemólise de, aproximadamente, 5 %, 10 % e 7 %, respectivamente, na concentração de  $512 \text{ mg.mL}^{-1}$ ; mas, em relação a estes peptídeos, as taxas foram drasticamente reduzidas e eliminadas a medida que a concentração diminuiu. O peptídeo serumA01 não apresentou atividade hemolítica em qualquer das concentrações testadas.

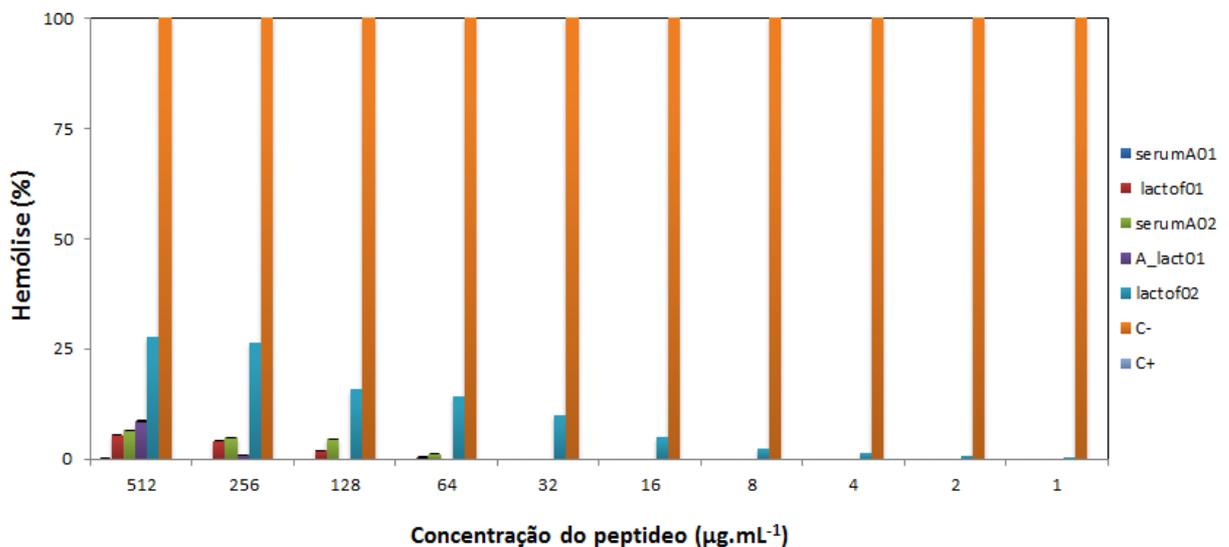


Figura 14 – Análise da taxa hemolítica dos peptídeos lactof01, lactof02, A\_lact01, serumA01 e serumA02. Os valores representam as médias de triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. C+ representa o controle positivo (Triton X-100 0,2 %) e C- (tampão PBS - pH 7.4) representa o controle negativo.

## 5. Discussão

Nas últimas décadas, inúmeros estudos indicaram que a importância das proteínas em uma dieta ultrapassa a disponibilidade de aminoácidos essenciais para a manutenção/promoção das funções orgânicas básicas (SHIMIZU e SON, 2007). Peptídeos bioativos presentes na sequência primária de proteínas alimentares são capazes de exercer variadas funcionalidades benéficas, dentre elas, a atividade antimicrobiana; e podem ser liberados durante o trânsito gastrointestinal mediante a ação de enzimas (KORHONEN e PIHLANTO, 2007). Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são considerados promissores no desenvolvimento de novas classes de antibióticos com novos mecanismos de ação, baixo índice de resistência e amplo espectro de atividade (LOHNER, 2009; LOHNER e BLONDELLE, 2005). O leite bovino tem sido considerado uma importante fonte destes peptídeos e, sendo este um alimento de ampla produção e consumo mundial, a possibilidade de identificar novos peptídeos antimicrobianos contidos em suas proteínas representa um avanço na obtenção de substâncias naturais, acessíveis e potentes no combate a microrganismos patogênicos resistentes a antibióticos comuns (BENKERROUM, 2010; CLARE, CATIGNANI e SWAISGOOD, 2003).

A análise qualitativa de fatores fisicoquímicos e estabilidade estrutural das sequências protéicas baseado no uso de ferramentas computacionais se apresenta como uma alternativa rápida, de baixo custo e eficaz para identificar possíveis PAMs internalizados em proteínas (TIAN et al., 2009; ZELEZETSKY e TOSSI, 2006). Parâmetros fisicoquímicos (carga, hidrofobicidade global, propensão helicoidal, anfipaticidade, etc.) são os principais moduladores efetivos para que ocorra a lise membranar por meio de PAMs e, com base nas propriedades da membrana alvo, a atividade antimicrobiana pode ser melhorada pela otimização destes parâmetros (TIAN et al., 2009). Um bom equilíbrio entre os parâmetros fisicoquímicos pode ser necessário para que exista uma eficiente atividade antimicrobiana. Entretanto isto não é uma garantia de que realmente seja exibida tal atividade (GIANGASPERO et al., 2001).

As sequências primárias das proteínas constitutivas do leite bovino (Tabela 7) foram obtidas em um banco de dados de grande abrangência e confiabilidade,

chamado *Protein Database*, disponibilizado pelo NCBI. Através da utilização da ferramenta *PeptideMass*, foram obtidos 1158 peptídeos com grande variedade de massa, tamanho e composição. Isto refletiu basicamente a boa distribuição dos aminoácidos essenciais que compõem as proteínas do leite bovino, reforçando ainda mais a importância de seu consumo para o bom funcionamento do organismo. Os fragmentos foram analisados individualmente para que apenas aqueles com tamanho entre 10 a 20 resíduos de aminoácidos passassem para as etapas posteriores, considerando-se o fato de que peptídeos menores possuem maior facilidade de serem absorvidos no intestino e exercer funções fisiológicas em nível tecidual (ROBERTS et al., 1999). A observação deste parâmetro equivale ao primário critério seletivo de todo o processo de prospecção, uma vez que, alguns registros na literatura relatam a provável influência do tamanho ( $\leq 20$ ) na seletividade, potência e espectro da atividade antimicrobiana em peptídeos (ZELEZETSKY e TOSSI, 2006). Além do tamanho, a observação de outras características dos fragmentos pode auxiliar na identificação daqueles com maior propensão em ser um PAM. Dentre estas características, destaca-se a carga, hidrofobicidade, grau de estruturação e momento hidrofóbico (KIM, KIM e LEE, 2005). Peptídeos catiônicos com  $\alpha$ -hélices anfipáticas representam uma classe particularmente abundante e bem caracterizada entre PAMs que ocorrem naturalmente (LEE et al., 2011). Por esta razão, ao avaliar os fatores físico-químicos, buscou-se selecionar aqueles com maior probabilidade de apresentar essas características.

O processo de prospecção teve início na utilização do banco de dados APD, que possibilitou a análise dos valores de percentual de hidrofobicidade e cationicidade. A carga positiva pode influenciar diretamente na interação inicial do peptídeo e a superfície aniônica de microrganismos; além disso, alguns pesquisadores observaram que alterações em seu valor podem reduzir a potência da atividade exibida, bem como, influenciar nos valores dos demais parâmetros (ZELEZETSKY e TOSSI, 2006). Ao realizar a seleção dos fragmentos que apresentaram carga positiva, notou-se uma considerável redução na quantidade dos fragmentos selecionados pelo tamanho (total = 209), de forma que apenas 83 seguiram no processo de análise (Tabela 8). Esta redução indica uma ampla disponibilidade de peptídeos aniônicos que, embora ainda envolvam questionamentos e controvérsias, a possibilidade destes exibirem atividade

antimicrobiana não deve ser descartada; entretanto, sua análise deve ser feita de maneira diferenciada (HARRIS, DENNISON e PHOENIX, 2009; KHANDELIA e KAZNESSIS, 2006).

A observação dos parâmetros seguiu com foco no percentual de hidrofobicidade, para o qual foram considerados valores entre 30 % - 60 % (GIANGASPERO, SANDRI e TOSSI, 2001). Esta informação pode refletir a capacidade intrínseca do peptídeo de se mover entre a fase aquosa e a fase hidrofóbica da membrana do microrganismo. Assim como outras forças eletrostáticas, as interações hidrofóbicas desempenham um importante papel na separação dos PAMs dentro da bicamada lipídica, de forma que, seu valor não deve ser muito alto e nem muito baixo, para que o peptídeo possa interagir e perturbar (alta hidrofobicidade) a integridade da membrana e ao mesmo tempo, ser rapidamente transportado (baixa hidrofobicidade) para atuar em alvos intracelulares (DATHE e WIEPRECHT, 1999).

Ao eliminar fragmentos que continham resíduos de prolina e cisteína, buscamos evitar peptídeos que poderiam interferir na formação/estabilização de  $\alpha$ -hélices, uma vez que, a redução da propensão na formação helicoidal, devido a existência de alguns resíduos de aminoácidos podem reduzir, mesmo que moderadamente, a potência e estreitar o espectro de ação de peptídeos antimicrobianos (ZELEZETSKY e TOSSI, 2006; GIANGASPERO, SANDRI e TOSSI, 2001). A exclusão de fragmentos contendo tais resíduos reduziu o montante em 21 peptídeos (Tabela 8), os quais tiveram seu perfil hidrofóbico analisado, uma vez que, a observação do momento hidrofóbico em conjunto com a hidrofobicidade média (H) equivale a um método muito utilizado para classificar estruturas anfipáticas que podem interagir com a membrana de forma superficial ou transmembrantar (PHOENIX e HARRIS, 2003).

Ao analisar todos os fatores físicoquímicos citados anteriormente, foram selecionados 05 peptídeos que se enquadraram dentro de todos parâmetros seletivos (Tabela 9). Todos estes peptídeos tiveram origem a partir de proteínas do soro de leite bovino, o que confirmaria a tendência destas em exibirem maior hidrofobicidade e grau de estruturação em relação ao grupo das caseínas. Dois peptídeos foram obtidos por meio da fragmentação da proteína lactoferrina, sendo essa a fonte de alguns potentes peptídeos antimicrobianos em leite bovino descritos na literatura (GIFFORD, HUNTER e VOGEL, 2005; AIMUTIS, 2004; FLORISA et al.,

2003; WAKABAYASHI, TAKASE e TOMITA, 2003). Entre os 05 peptídeos selecionados para as etapas posteriores, não foram observados fragmentos gerados pela clivagem com quimotripsina. Este fato pode ter ocorrido em razão de pepsina e quimotripsina apresentarem alguns sítios de corte em comum (após a ocorrência dos resíduos de triptofano, fenilalanina, tirosina e leucina), além disso, por possuir maior especificidade, a quimotripsina poderia gerar maior quantidade de peptídeos pequenos a ponto de não estarem dentro do escopo determinado.

Na realização da modelagem molecular, o primeiro passo envolveu a identificação dos melhores moldes por meio da ferramenta BLASTp. A escolha do molde baseou-se na busca por proteínas com alto nível de identidade local (melhores valores de *Max score* e *Query coverage*) e possível homologia estrutural, que são fatores determinantes para que exista também identidade funcional entre as estruturas protéicas. Os moldes escolhidos (PDB ID: 1BIY, 1HFX e 1N5U) para o processo de modelagem molecular propriamente dita são proteínas que foram identificadas e registradas como componentes de leite de espécies diferentes (*Bubalus bubalis*, *Cavia porcellus* e *Homo sapiens*, respectivamente), entretanto, o alto grau de identidade (Tabela 10) verificado pelo alinhamento feito através da ferramenta ClustalW, entre os fragmentos e os moldes, indicam que a diferença entre espécies pode não influenciar nos resultados.

A criação dos modelos foi realizada por meio do *software* Modeller 9v8, no qual foram geradas 200 estruturas para cada modelo e estas foram selecionadas por meio da análise dos valores de DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*) e GA341 *score*, com o objetivo de determinar quais os modelos mais energeticamente estável e favorável (SHEN e SALI, 2006; MELO, SÁNCHEZ e SALI, 2002). Após escolher os modelos de acordo com os parâmetros energéticos, suas estruturas foram visualizadas por meio do *software* PYMOL 0.99rc6, no qual foi verificada a predominância de propensão para a formação de estruturas em  $\alpha$ -hélices, exceto o peptídeo lactof01 (Figura 6) que exibiu uma estrutura estendida. No entanto, essa estrutura estendida não representa indícios que prejudicariam a possível atividade antimicrobiana, visto que existem registros na literatura sobre peptídeos antimicrobianos estendidos que podem interagir com a membrana de forma diferente, em relação aos PAMs em  $\alpha$ -hélices, e atuar em alvos intracelulares (NGUYEN, HANEY e VOGEL, 2011; ZHANG, ROZEK e HANCOCK, 2001). Os demais peptídeos (lactof02, A\_lact01, serumA01 e serumA02) exibiram propensão

para a formação de  $\alpha$ -hélices (Figuras 7-10). Tal estrutura pode influenciar na profundidade de inserção na membrana e, por sua vez, a atividade antimicrobiana (NGUYEN, HANEY e VOGEL, 2011).

Foram observados, também, os mapas de potencial eletrostático gerados dos modelos através do servidor PDB2PQR, onde foi possível verificar a distribuição de cargas positivas e negativas na superfície das estruturas modeladas. A partir destes mapas notou-se que o peptídeo lactof01 possui domínios bem definidos e concentrados de carga positiva e negativa (Figura 6B). Essa segregação de cargas entre aminoácidos dispostos no peptídeo pode estar de acordo com o valor de  $\mu\text{H}$  (0,27) e o percentual de hidrofobicidade (58 %) obtido, uma vez que, lactof01 seria o mais anfipático entre os demais peptídeos estudados e teria maior percentual de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (predomínio da região em vermelho). Os peptídeos lactof02 (Figura 7B) e A\_lact101 (Figura 8B) apresentaram distribuição equilibrada de cargas positivas e negativas; esse equilíbrio semelhante entre resíduos de aminoácidos carregados nos dois peptídeos estaria de acordo com o valor de hidrofobicidade global (50 %) obtido para ambos, enquanto a reduzida definição dos domínios carregados na superfície eletrostática do peptídeo A\_lact01 pode ser um reflexo de sua baixa anfipaticidade ( $\mu\text{H} = 0.03$ ). Além disso, os peptídeos serumA01 (Figura 8B) e serumA02 (Figura 10B) exibiram um pequeno predomínio de cargas positivas em sua superfície eletrostática. Entretanto, este predomínio estaria de acordo somente com os parâmetros observados em relação ao peptídeo serumA01, que exibiu percentual de hidrofobicidade em 30 % e, portanto, deveria exibir predomínio da região em azul. Baseado nesta informação, o procedimento de modelagem molecular e elaboração do mapa eletrostático do peptídeo serumA02 foram refeitos, mas não foram observadas alterações em relação ao resultado obtido e descrito anteriormente.

A validação dos modelos iniciou-se com sua submissão ao servidor PROCHECK, no qual foram obtidos os mapas de Ramachandran (Figura 11). Nestes mapas foi possível avaliar o grau de estabilidade energética dos resíduos de aminoácidos que compõem os peptídeos e a qualidade dos modelos em estudo. Todos os peptídeos indicaram uma possível estabilidade energética baseado na disposição da totalidade de seus resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis e/ou permitidas (LEHNINGER et al., 2000). Além disso, a localização pontual dos resíduos em determinadas regiões esteve de acordo com as estruturas

tridimensionais exibidas; visto que, exceto o peptídeo lactof01, os peptídeos apresentaram propensão em formar estruturas em  $\alpha$ -hélices e em seu mapa foi observada a concentração de maioria dos resíduos em regiões que indicam a tendência na formação de estrutura helicoidal (MORAIS, 2010). O peptídeo lactof01 foi o único a exibir uma estrutura estendida (Figura 6) e, também, exibiu em seu mapa de Ramachandran (Figura 11A) um equilíbrio na distribuição de resíduos com tendência a formar  $\alpha$ -hélices e  $\beta$ -folhas, o que pode confirmar sua propensão em exibir uma estrutura estendida (MORAIS, 2010).

A ferramenta 3DSS foi utilizada para que fosse obtido o cálculo de RMSD, o qual indica a proximidade das coordenadas atômicas entre os modelos e os moldes utilizados na modelagem molecular, indicando o grau de identidade entre eles. Todos os peptídeos (Tabela 11) apresentaram  $\text{RMSD} \leq 2\text{\AA}$ , o que representa alta identidade entre as estruturas e a possível existência de homologia entre moldes e modelos (FILHO e ALENCASTRO, 2003; KRIEGER et al., 2003). Esses valores tendem a confirmar o sucesso da escolha dos moldes no início do processo de modelagem molecular por homologia.

Os valores de *z-score* (Tabela 12) gerados por meio da ferramenta ProSa-web indicaram que os modelos tridimensionais criados para os peptídeos lactof01 e serumA01 poderiam possuir erros em suas coordenadas atômicas (VENCLOVAS et al., 2004). Entretanto, o processo de modelagem molecular foi totalmente refeito para estes peptídeos e não houve alterações em seus *z-scores*. Desta forma, estes peptídeos não foram invalidados pois, ao analisar as tramas de *z-scores* (Figura 12) geradas pelo ProSa-web, notou-se que em relação à estruturas aleatórias de mesmo tamanho depositadas no PDB e obtidas por ressonância magnética nuclear, a qualidade global da estrutura não estaria desapropriada. Outro fator considerado envolve os demais procedimentos de validação, nos quais estes peptídeos obtiveram bons resultados. Os demais peptídeos obtiveram valores negativos (Tabela 14) para *z-score* e estavam dentro do escopo esperado para estruturas de mesmo tamanho depositadas no PDB, o que indica a existência de uma adequada qualidade global da estrutura tridimensional, bem como, um pequeno desvio energético dos resíduos de formam o peptídeo (VENCLOVAS et al., 2004; SIPPL, 1995; SIPPL, 1993).

Os 05 peptídeos que passaram pelos processos descritos anteriormente foram sintetizados artificialmente e preparados de forma adequada para sua

submissão aos testes *in vitro* para averiguação de atividade antimicrobiana e ensaios hemolíticos para observação de sua citotoxicidade. Após a realização dos testes *in vitro* para avaliação da atividade antimicrobiana, foi constatada uma pequena atividade antimicrobiana em relação a todos as bactérias submetidas aos ensaios (Figura 13), o que foi evidenciado após a terceira hora de incubação. Ao analisar a atividade antimicrobiana exibida, acreditamos que a estruturação dos peptídeos pode ter tido pouca influência em comparação com os demais parâmetros, visto que, o peptídeo lactof01 mesmo exibindo propensão em formar uma estrutura estendida demonstrou atividade equivalente a alguns dos peptídeos (lactof02 e A\_lact01) com propensão para estruturação em  $\alpha$ -hélices.

A diferença na organização e composição da membrana bacteriana de Gram-negativas e Gram-positivas pode ter implicações no modo de ação dos PAMs e no grau de susceptibilidade a alguns agentes bactericidas (FLORIS et al., 2003; WIEPRECHT et al., 1997). Além disso, a capacidade de PAMs naturais de atuar de modo diferenciado em relação aos microrganismos comensais que compõem a microbiota do intestino pode favorecer a integridade intestinal através de sua atividade antimicrobiana patogênico- seletiva (LING e SCHRYVERS, 2006; YALÇIN, 2006; STEIJNS, 2001).

A parede celular de bactérias Gram-negativas possui uma estrutura complexa, sendo composto por uma membrana interna e outra externa; a membrana externa contém uma grande quantidade de lipossacarídeos carregados negativamente localizados em sua superfície externa, enquanto a membrana interna pode ser comparável com a membrana de células de mamíferos (DATHE et al., 2002; DATHE et al., 1997; WIEPRECHT et al., 1997). Alguns pesquisadores sugerem que os danos causados por PAMs em bactérias Gram-negativas relacionam-se com diferentes tipos interações entre peptídeo e membranas; indicando que o primeiro passo pode envolver a permeabilização da membrana externa por peptídeos catiônicos concentrados em sua superfície, e em seguida, a permeabilização da membrana interna pode levar à morte celular. Embora a afinidade de PAMs catiônicos possa ser menor em relação à membrana interna, as interações hidrofóbicas tendem a ser determinantes no processo de perfuração nesta membrana, enquanto as interações eletrostáticas teriam mais influência na interação com a camada externa (DATHE et al., 1997). De acordo com Dathe e Wieprecht (1999), “com a redução das interações eletrostáticas devido à diminuição

da carga elétrica, a atividade será potencialmente modulada pela hidrofobicidade, momento hidrofóbico e tamanho do domínio hidrofóbico”. Ao relacionar estas informações com a carga elétrica positiva relativamente baixa e proporcional nos peptídeos em estudo (Tabela 9), acreditamos que a característica hidrofóbica destes pode ser considerada determinante nas interações estabelecidas entre os peptídeos e as bactérias testadas. Isto pode ser evidenciado quando são comparadas as atividades exibidas pelos peptídeos lactof01 e lactof02, com carga +1 e +2, respectivamente; o primeiro apresentou perfil hidrofóbico superior em comparação com o segundo, entretanto, a atividade exibida por eles pouco se divergiu, indicando que a diferença em seu potencial eletrostático pode ser compensada pela diferença no perfil hidrofóbico. Ao comparar peptídeos (lactof02 e A\_lact01) com carga igual (+2), também foi observada a influência dos parâmetros hidrofóbicos na atividade exibida por eles; podemos notar que o superior percentual de hidrofobicidade, H e o menor valor de  $\mu H$  em A\_lact01, pode ter realçado sua atividade contra bactérias Gram-positivas. Dathe et al. (1997) relatou a influência de parâmetros físico-químicos dos peptídeos em sua seletividade; indicando que maiores valores em H e  $\mu H$  podem realçar a atividade contra Gram-positivas e reduzir a especificidade por Gram-negativas; tal como pode ser observado na atividade exibida pelo peptídeo serumA02. Enquanto a atividade exibida pelo peptídeo serumA01 pode ter sido prejudicada devido ao baixo percentual de hidrofobicidade e H.

A emergente resistência multidroga de bactérias tem se tornado um grande desafio no tratamento de infecções nosocomiais (GIAMARELLOU e POULAKOU, 2009). *Escherichia coli* representa o microrganismo bacilar aeróbico mais comum no trato intestinal de mamíferos, exibindo considerável versatilidade fisiológica e metabólica. *E. coli* apresenta variantes comensais e variantes patogênicas, que podem causar inúmeros tipos de infecções intestinais, extraintestinais e septicemia (KÖHLER e DOBRINDT, 2011; YEN et al., 2011). *Klebsiella pneumoniae* compõe a família Enterobacteriaceae e representa um dos principais fatores causadores de pneumonia; embora a incidência de pneumonia atribuída a *K. pneumoniae* tenha diminuído ao longo dos anos, sua relação com infecções do trato urinário, corrente sanguínea e infecções intra-abdominais tornaram-se comuns e contribuem para que esta bactéria seja considerada um importante patógeno em ambiente hospitalar e/ou comum (KEYNAN e RUBINSTEIN, 2007). Dentre os microrganismos testados, somente a bactéria *S. aureus* foi a única que teve uma pequena inibição de

crescimento (em média, 19 %) quando submetido a todos os 05 peptídeos testados. Na população humana, estima-se que, aproximadamente, 20-25 % possui colônias persistentes de *S. aureus*, enquanto 75-80 % apresentam colonização intermitente ou nunca foram expostos; alguns estudos indicam que o transporte nasal desta bactéria pode causar sua disseminação para outras partes do corpo ou serem levadas para o sistema circulatório através de violações epiteliais (ARCHER et al., 2011). Dentre as inúmeras manifestações clínicas de infecções causadas por *S. aureus*, problemas relacionados à pele e tecidos moles, sistema cardiovascular, implantes e próteses, sistema neurológico e alterações gastrointestinais são fontes de grande preocupação entre os profissionais em ambientes hospitalar (FRY e BARIE, 2011). Devido à alta incidência de infecções por *S. aureus* e o grande índice de resistência aos tratamentos convencionais, muitos esforços estão sendo realizados para desenvolver medidas terapêuticas e preventivas eficazes em relação a esta bactéria (ARCHER et al., 2011; FRY e BARIE, 2011). O peptídeo A\_lact01 exibiu o melhor índice de inibição em *S. aureus* quando comparado com os demais; este resultado demonstra concordância com as pesquisas realizadas por Pellegrini et al. (1999), no qual foi descrito maior especificidade em relação à bactérias Gram-positivas (dentre elas, *S. aureus*) em fragmentos gerados por meio da clivagem de  $\alpha$ -lactalbumina utilizando tripsina. Além disso, relatos sobre a influência da alta hidrofobicidade média sobre a maior especificidade por Gram-positivas confirmam o comportamento exibido por A\_lact01 nos testes *in vitro* (MUHLE e TAM, 2001; DATHE et al., 1997).

Os ensaios hemolíticos indicaram possível citotoxicidade de alguns dos peptídeos avaliados (Figura 14). Entre eles, lactof02 exibiu taxa máxima de hemólise de, aproximadamente, 27 % na concentração de 512 mg.mL<sup>-1</sup>; embora este percentual tenha diminuído em relação às menores concentrações do peptídeo, a atividade hemolítica não foi extinta. Além deste, os peptídeos lactof01, A\_lact01 e serumA02, na concentração de 512 mg.mL<sup>-1</sup>, exibiram taxa máxima de hemólise de, aproximadamente, 5 %, 10 % e 7 %, respectivamente; entretanto, estas taxas foram drasticamente reduzidas e eliminadas a medida que a concentração diminuiu. A partir destes ensaios, observamos que apenas o peptídeo serumA01 poderia ser considerado um PAM apto para aplicações em humanos. Alguns pesquisadores relacionam a citotoxicidade de peptídeos com altos valores de carga, helicidade, anfipaticidade e hidrofobicidade (ZELEZETSKY e TOSSI, 2006; CHEN et al., 2005;

JIN et al., 2005; WIEPRECHT et al., 1997)(TIAN et al., 2009; DATHE e WIEPRECHT, 1999). Mas, ao analisar os resultados obtidos, acreditamos que a hidrofobicidade (global e intrínseca) pode representar o fator determinante na atividade hemolítica, visto que, em relação aos demais, o peptídeo serumA01 exibiu os menores e mais discrepantes valores em percentual de hidrofobicidade e H (hidrofobicidade média), sendo também, o único peptídeo não-hemolítico.

Segundo Tian et al. (2009), “a hemólise de eritrócitos é um dos gargalos para a aplicação dos peptídeos antimicrobianos no domínio da injeção intravenosa, mas não é um fator de limitação quando utilizado por administração oral”. Devemos considerar que muitos peptídeos podem ser degradados e/ou inativados e, desta forma, a atividade pode ser anulada ou exibida através da ação de poucos PAMs que sobrevivem ao processo digestivo (MEISEL, 2004). Além disso, a atividade antimicrobiana e/ou atividade hemolítica exibida por peptídeos em testes *in vitro* pode sofrer interferências de outros compostos do próprio alimento ou mesmo de substâncias/condições presentes em meio orgânico, de forma que, sua ação pode ser eliminada, reduzida ou melhorada (MADUREIRA et al., 2010; LING e SCHRYVERS, 2006; SÉVERIN e WENSHUI, 2005).

Substituições pontuais de aminoácidos, que podem alterar os parâmetros físico-químicos, são sugeridas como alternativa para que a atividade antimicrobiana seja realçada em detrimento da atividade hemolítica (ZELEZETSKY e TOSSI, 2006; GIANGASPERO, SANDRI e TOSSI, 2001; DATHE e WIEPRECHT, 1999; WIEPRECHT et al., 1997). Entretanto, qualquer tipo de interferência artificial na composição das proteínas do leite bovino presentes neste trabalho iria contradizer o objetivo de identificação de potenciais PAMs liberados naturalmente durante o trânsito gastrointestinal deste alimento potencialmente funcional. Entretanto, a eliminação de peptídeos contendo resíduos de prolina pode ser revista e desconsiderada de acordo com o posicionamento deste peptídeo na sequência primária do fragmento.

Considerando as discussões realizadas acima, acreditamos que uma maior flexibilização nos critérios de seleção baseados em fatores físico-químicos poderia determinar outros peptídeos com grande propensão em exibir atividade antimicrobiana e reduzida citotoxicidade. Uma vez que, a prospecção baseada em fatores físico-químicos deve buscar um equilíbrio entre todos os parâmetros utilizados e, desta forma, a atividade antimicrobiana pode ser favorecida (GIANGASPERO et

al., 2001). Além disso, um estudo detalhado sobre o perfil físico-químico de PAMs derivados de leite bovino e outros alimentos poderia facilitar na determinação de características importantes a serem utilizadas em prospecções futuras de peptídeos derivados de leite e outros alimentos. Neste aspecto, a utilização de técnicas e ferramentas computacionais tendem a facilitar a busca e análise destas informações, tornando o processo de prospecção mais rápido, eficaz e menos custoso.

Contudo, conclusões obtidas a partir de modelos *in vitro* precisam ser validadas com dados fisiológicos em testes *in vivo*, de modo que o potencial possa ser totalmente demonstrado e analisado. De acordo com Madureira et al. (2010), “para que um peptídeo seja rotulado como bioativo, sua resistência às condições gastrointestinais deve ser averiguada. Os mecanismos pelos quais os peptídeos do soro de leite bovino exercem suas bioatividades ao atingir o intestino necessitam de maiores explicações. Portanto, estudos *in vivo* são essenciais não só para validar os efeitos fisiológicos, mas também, confirmar a existência de proteção contra enzimas gastrointestinais quando administrados via oral.”

## 6. Conclusão

As proteínas do soro de leite bovino demonstraram ser promissoras fontes de peptídeos bioativos liberados durante o trânsito gastrointestinal através da ação das proteases pepsina e quimotripsina.

Os cinco peptídeos estudados exibiram atividade antimicrobiana, sendo o peptídeo lactof02 o mais ativo contra as bactérias Gram-negativas testadas (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) enquanto o peptídeo A\_lact01 demonstrou ser o mais ativo contra a bactéria Gram-positiva testada (*Staphylococcus aureus*). A análise da atividade exibida e dos parâmetros físico-químicos estudados indicou que as interações hidrofóbicas entre peptídeos e bactérias foram determinantes para a modulação da inibição do crescimento, como forma de suprir as reduzidas interações eletrostáticas devido à carga elétrica positiva relativamente baixa e proporcional dos peptídeos.

Os peptídeos lactof02, lactof01, A\_lact01 e serumA02 exibiram atividade hemolítica decrescente de acordo com a redução da concentração; entretanto, a citotoxicidade do peptídeo lactof02 não se extinguiu durante a realização dos ensaios mediante as menores concentrações. O peptídeo serumA01 não apresentou atividade hemolítica em qualquer das concentrações utilizadas. Mediante a observação destes resultados em comparação com os parâmetros físico-químicos estudados, acreditamos que a hidrofobicidade global e intrínseca seria o fator determinante na modulação da atividade hemolítica.

A prospecção *in silico* representa um método promissor para a identificação de candidatos a peptídeos bioativos derivados de proteínas do leite bovino; entretanto, adaptações nos parâmetros seletivos podem favorecer a atividade hemolítica em detrimento da citotoxicidade.

## 7. Perspectivas

A continuidade deste trabalho pode objetivar as seguintes etapas:

- Realização de testes *in vitro* contra outros microrganismos (fungos, vírus, etc) e, também, outros alvos celulares;
- Análise detalhada sobre o perfil físico-químico de peptídeos antimicrobianos derivados de proteínas do leite bovino registrados na literatura para a determinação de características importantes a serem utilizadas no processo de prospecção *in silico*;
- Desenvolvimento de uma ferramenta computacional para automatizar a prospecção de peptídeos bioativos derivados de proteínas nativas de alimentos, utilizando técnicas adequadas para a análise dos parâmetros físico-químicos determinantes para a atividade antimicrobiana, bem como, outras atividades bioativas desempenhadas por peptídeos no organismo;
- Realização de testes *in vivo* de peptídeos com grande propensão em exibir atividades bioativas, de modo que seja avaliada sua resistência às condições fisiológicas e seus mecanismos de ação com o objetivo de validar as hipóteses sugeridas através dos estudos realizados *in silico* e *in vitro*;

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, S. A.; ATKINSON, S. A. 2003. Calcium, Magnesium, Phosphorus and Vitamin D Fortification of Complementary Foods. **The Journal of Nutrition**, 133(9): 2994S-2999S.

ADAM, A.; RUBIO-TEXEIRA, M.; POLAINA, J. 2004. Lactose: The Milk Sugar from a Biotechnological Perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 44(7): 553-557.

AIMUTIS, W. R. 2004. Bioactive Properties of Milk Proteins with Particular Focus on Anticariogenesis. **The Journal of Nutrition**, 14: 989-995.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 25(17): 3389–3402.

ARAI, S. 1996. Studies on Functional Foods in Japan – State of the Art. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 60(1) 9-15.

ARCHER, N. K.; MAZAITIS, M. J.; COSTERTON, J. W.; LEID, J. G.; POWERS, M. E.; SHIRTLIFF, M. E. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilm – Properties, regulation and roles in human disease. **Virulence**, 2(5): 445-459.

BALTZER, S. A.; BROWN, M. H. 2011. Antimicrobial Peptides – Promising alternatives to conventional antibiotics. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 20: 228-235.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, 70(1): 15-29.

BEISSWENGER , C.; BALS, R. 2005. Functions of Antimicrobial Peptides in Host Defense and Immunity. **Current Protein and Peptide Science**, 6: 255-264.

BENKERROUM, N. 2010. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. **International Journal of Dairy Technology**, 63(3): 320-338.

BELLAMY, W. R.; TAKASE, M.; YAMAUCHI, K.; KAWASE, K.; SHIMAMURA, S.; TOMITA, M. 1992. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1121:130–136.

BHATTACHARJYA, S.; RAMAMOORTHY, A. 2009. Multifunctional host defense peptides: functional and mechanistic insights from NMR structures of potent antimicrobial peptides. **The FEBS Journal**, 276: 6465–6473.

BOMAN, H. G. 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **Journal of Internal Medicine**, 254: 197–215.

BONJOUR, J. P.; GUÉGUEN, L.; PALACIOS, C.; SHEARER, M. J.; WEAVER, C. M. 2009. Minerals and vitamins in bone health: the potential value of dietary enhancement. **The British Journal of Nutrition**, 101(11): 1581-1596.

BOUDONCK, K. J.; MITCHELL, M. W.; WULFF, J.; RYALS, J. A. 2009. Characterization of the biochemical variability of bovine milk using metabolomics. **Metabolomics**, 5: 375–386.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1999. Resolução nº 17, de 20/04/1999. **Diário Oficial da União**, Seção 1: 25.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1999. Resolução nº 18, de 20/04/1999. **Diário Oficial da União**, Seção 3: 126.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1999. Resolução nº 19, de 20/04/1999. **Diário Oficial da União**, Seção 3: 138.

BROGDEN, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, 3(3): 238-250.

BULLEN, J. J.; ROGERS, H. J.; LEIGH, L. 1972. Iron binding proteins in milk and resistance to E. coli infections in infants. **British Medical Journal**, 1: 69–75.

CAMPBELL, A. K.; WAUD, J. P.; MATTHEWS, S. B. 2009. The molecular basis of lactose intolerance. **Science Progress**, 88(3): 157-202.

CAVELL, B. E.; ALWI, S. S. S.; DONLEVY, A.; PACKHAM, G. 2011. Anti-angiogenic effects of dietary isothiocyanates: mechanisms of action and implications for human health. **Biochemical pharmacology**, 81(3): 327-336.

CENCIC, A.; CHINGWARU, W. 2010. The role of functional foods, nutraceutical, and food supplements in intestinal health. **Nutrients**, 2: 611-625.

CHAN, D. I.; PRENNER, E. J.; VOGEL, H. J. 2006. Tryptophan and arginine-rich antimicrobial peptides structures and mechanisms of action. **Biochimica and Biophysica Acta**, 1758: 1184-1202.

CHEN, Y.; MANT, C. T.; FARMER, S. W.; HANCOCK, R. E. W.; VASIL, M. L.; HODGES, R. S. 2005. Rational design of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. **The Journal of Biological Chemistry**, 280(13): 12316-12329.

CIPOLLA, L. E.; NEVES, M. F.; AMARAL, T. M. 2002. Mercado Brasileiro de Alimentos Líquidos nos Anos 90 e Perspectivas Futuras. In: **Anais do XL Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural**, Equidade e Eficiência na Agricultura Brasileira - Passo Fundo, 1-15.

CLARE, D. A.; CATIGNANI, G. L.; SWAISGOOD, H. E. 2003. Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. **Current Pharmaceutical Design**, 9(16): 1239-1255.

CLARE, D. A.; SWAISGOOD, H. E. 2000. Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. **Journal of Dairy Science**, 83(6): 1187-1195.

COLE, A. M.; LEHRER, R. I. 2003. Minidefensins: antimicrobial peptides with activity against HIV-1. **Current pharmaceutical design**, 9(18): 1463-1473.

CORREDIG, M. 1996. Effect of temperature and pH on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. **Food Research International**, 29(1): 49-55.

CUDIC, M; OTVOS, L. 2002. Intracellular targets of antibacterial peptides. **Current drug targets**, 3(2): 101-106.

DAS, U. 2011. Essential fatty acids and their metabolites as modulators of stem cell biology with reference to inflammation, cancer, and metastasis. **Cancer Metastasis Reviews**, oct. 18.

DASHPER, S. G.; LIU, S.; W.; REYNOLDS, E. C. 2007. Antibacterial peptides and their potential as oral therapeutic agents. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 13: 505–516.

DATHE, M.; WIEPRECHT, T. 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1462: 71-87.

DATHE, M., WIEPRECHT, T.; NIKOLENKO, H.; HANDEL, L.; MALOY, W. L.; MACDONALD, D. L.; BEYERMANN, M.; BIENERT, M. 1997. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipatic helical peptides. **FEBS letters**, 403: 208-212.

DIAMOND, G.; BECKLOFF, N.; WEINBERG, A.; KISICH, K. O. 2009. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. **Current Pharmaceutical Design**, 15(21): 2377-2392.

DOLINSKY, T. J.; NIELSEN, J. E.; McCAMMON, J. A.; BAKER, N. A. 2004. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Research**, 32: W665-W667.

DÜR, U. H. N.; SUDHEENDRA, U. S.; RAMAMOORTHY, A. 2006. LL-37, the only human member of the cathelicidin Family of antimicrobial peptide. **Biochimica Biophysica Acta**, 1758: 1408-1425.

EBRINGER, L.; FERENCÍK, M.; KRAJCOVIC, J. 2008. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products-review. **Folia Microbiologica**, 53(5): 378–394.

EISENBERG, D.; WEISS, R. M.; TERWILLIGER, C. T.; WILCOX, W. 1982. Hydrophobic moments and protein structure. **Chemical Society Reviews**, 17: 109-120

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2007. Report on Functional Foods. **Food Quality and Standards Service**.

FARRELL, H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G. T.; BROWN, E. M.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; SWAISGOOD, H. E. 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. **Journal of Dairy Science**, 87(6): 1641-1674.

FJELL, C. D.; HISS, J. A.; HANCOCK, R. E. W.; SCHNEIDER, G. 2012. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews Drug Discovery**, 11: 37-51.

FELLER, W.; OLIVEIRA, E. A. S. K.; LEONHARDT, C. A.; RIETH, R. 2008. Tecnologia de Fabricação de Derivados do Leite. **Boletim Técnico da Universidade Estadual do Centro-Oeste**, 1-55.

FILHO, O. A. S.; ALENCASTRO, R. B. 2003. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, 26(2): 253-259.

FINLAY, B. B.; HANCOCK, R. E. W. 2004. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? **Nature Reviews Microbiology**, 2(6): 497-504.

FINOT, P. A. 1997. Effects of Processing and Storage on the Nutritional Value of Food Proteins. In: **Food Proteins and their Applications**, 551-577.

FLORISA, R.; RECIO, I.; BERKHOUT, B.; VISSER, S. 2003. Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. **Current Pharmaceutical Design**, 9(16): 1257-1275.

FOGOLARI, F.; BRIGO, A.; MOLINARI, H. 2002. The Poisson–Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: a tool for structural biology. **Journal of Molecular Recognition**, 15: 377–392.

FONSECA, P. H. 1997. Leite: aspectos de composição e propriedades. **Química Nova na Escola**, 6: 1-5.

FOX, P. F.; FLYNN, A. 1992. Biological Properties of Milk Proteins. In: **Advanced Dairy Chemistry – vol. 1: Proteins** (Fox, P. F. ed.), 255-284.

FRANCO, O. L. 2011. Peptide promiscuity: An evolutionary concept for plant defense. **FEBS Letters**, 585: 995–1000.

FRY, D. E.; BARIE, P. S. 2011. The changing face of *Staphylococcus aureus*: a continuing surgical challenge. **Surgical infections**, 12(3): 191-203.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. 2005. *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. (in) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook. **Humana Press**, 571-607.

GIAMARELLOU, H.; POULAKOU, G. 2009. Multidrug-resistant Gram-negative infections. What are the treatment options? **Drugs**, 69(14): 1879-1901.

GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. 2001. Amphipatic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. A systematic study of effects of structural and physical properties on biological activity. **European Journal Biochemistry**, 268: 5589-5600.

GIFFORD, J. L.; HUNTER, H. N.; VOGEL, H. J. 2005. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 62(22): 2588-2598.

GODBALLE, T.; NILSSON, L. L.; PETERSEN, P. D.; JENSSEN, H. 2011. Antimicrobial  $\beta$ -Peptides and  $\alpha$ -Peptoids. **Chemical Biology & Drug Design**, 77(2): 107-116.

HAMILL, P.; BROWN, K.; JENSSEN, H.; HANCOCK, R. E. W. 2008. Novel anti-infectives: is host defence the answer? **Current Opinion in Biotechnology**, 19(6): 628-636.

HAMRICK I.; COUNTS S. H. 2008. Vitamin and mineral supplements. **Primary care**, 35(4): 729-747.

HAQUE, E.; CHAND, R. 2007. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. **European Food Research and Technology**, 227(1): 7-15.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, 18: 163–169.

HAUG, A.; HØSTMARK, A. T.; HARSTAD, O. M. 2007. Bovine milk in human nutrition – a review. **Lipids in Health and Disease**, 6(25): 1-16.

HARRIS, F.; DENNISON, S. R.; PHOENIX, D. A. 2009. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. **Current Protein & Peptide Science**, 10(6): 585-606.

HAYES, M.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; HILL, C.; STANTON, C. 2006. Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. **Applied and Environmental Microbiology**, 72: 2260–2264.

HENIKOFF, S.; HENIKOFF, J. G. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 89(22): 10915-10919.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; AMIGO, L. 2008. Beta-lactoglobulin as source of bioactive peptides. **Amino acids**, 35(2): 257-265.

HILL, R. D.; LAHOV. E.; GIVOL, D. 1974. A rennin-sensitive bond in alpha-s1 B-casein. **Journal of Dairy Research**, 41: 147–153.

HUNT, J.R. 1994. Nutritional products for specific health benefits—foods, pharmaceuticals, or something in between? **Journal of the American Dietetic Association**, 94(2): 151-153.

HUNTER, H. N.; JING, W.; SCHIBLI, D. J.; TRINH, T.; PARK, I. Y.; KIM, S. C.; VOGEL, H. J. 2005. The interaction of antimicrobial peptides derived from lysozyme with model membrane systems. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1668: 175-189.

HUO, L.; ZHANG, K.; LING, J.; PENG, Z.; HUANG, X.; LIU, H.; GU, L. 2011. Antimicrobial and DNA-binding activities of the peptide fragments of human lactoferrin and histatin 5 against *Streptococcus mutans*. **Archives of oral biology**, 56: 869-876.

HUSSEIN, G.; SANKAWA, U.; GOTO, H.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, H. 2006. Astaxanthin, a Carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition. **Journal of Natural Products**, 69(3): 443-449.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). 1997. **Compendium of Chemical terminology**. Vol. 66: 1169. 2<sup>a</sup> edition.

IWANIAK, A.; MINKIEWICZ, P. 2008. Biologically active peptides derived from proteins – a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, 58(3):289-294.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. 2006. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 19(3): 491-511.

JENSSEN, H. 2005. Anti herpes simplex virus activity of lactoferricin – an example of antiviral activity of antimicrobial protein/peptide. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 62: 3002-3013.

JENSEN, R. G. 2002. Invited Review: The Composition of Bovine Milk Lipids. **Journal of Dairy Science**, 85(2): 295-350.

JONES, P. J. 2002. Clinical nutrition: 7. Functional foods — more than just nutrition. **Canadian Medical Association**, 166(12) 1555-1563.

JONES, F. S.; HENRY, S. S. 1930. The bacterial growth inhibitor (lactenin) of milk. **The journal of Experimental Medicine**, 51(2): 327-339.

KEIL, B. 1992. Specificity of proteolysis. **Springer-Verlag**, 335.

KEYNAN, Y.; RUBINSTEIN, E. 2007. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 30: 385-389.

KHANDELIA, H.; KAZNESSIS, Y. 2006. Molecular dynamics investigation of the influence of anionic and zwitterionic interfaces on antimicrobial peptides structures: implications for peptide toxicity and activity. **Peptides**, 27: 1192-1200.

KIM, S.; KIM, S. S.; LEE, B. J. 2005. Correlation between the activities of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides and hydrophobicities represented as RP HPLC retention times. **Peptides**, 26: 2050-2056.

KIM, J. Y.; PARK, S. C.; KIM, M. H.; LIM, H. T.; PARK, Y.; HAHM, K. S. 2005. Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 330(3): 921-927.

KITCHEN, B. J. 1981. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, 48: 167-188.

KITTS, D. D.; WEILER, K. 2003. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses Used in Isolation and Recovery. **Current Pharmaceutical Design**, 9(16): 1309-1323.

KÖHLER, C.; DOBRINDT, U. 2011. What defines extraintestinal pathogenic *Eschechiria coli*? **International Journal of Medicinal Microbiology**, 301: 642-647.

KLOSTERBUER, A.; ROUGHEAD, Z. F.; SLAVIN, J. 2011. Benefits of Dietary Fiber in Clinical Nutrition. **Nutrition in Clinical Practice**, 26(5): 625-635.

KOLB, A. F. 2001. The prospects of modifying the antimicrobial properties of milk. **Biotechnology Advances**, 19: 299–316.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. 2007. Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. **Current Pharmaceutical Design**, 13(8): 829-843.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, 16(9): 945-960.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. 2003. Food-derived Bioactive Peptides – Opportunities for Designing Future Foods. **Current Pharmaceutical Design**, 9: 1297-1308.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A.; RANTAMÄKI, P.; TUPASELA, T. 1998. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. **Trends in food science & technology**, 9(8): 307-319.

KRIEGER, E.; NABUURS, S. B.; VRIEND, G. 2003. Homology Modeling. In: **Structural Bioinformatics**. Edited by Philip E. Bourne and Helge Weissig. Wiley-Less, Inc. 507-521.

KUWATA, H.; YIP, T. T.; TOMITA, M.; HUTCHENS, T. W. 1998. Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1429(1): 129-141.

LAHOV, E.; REGELSON, W. 1996. Antibacterial and immuno-stimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. **Food and Chemical Toxicology**, 34: 131–145.

LAHOV, E.; EDELSTEN, D.; SODE-MOGENSEN, M. T.; SOFER, E. 1971. Properties of basic glycopeptides from cow milk protein by heat. **Milchwissenschaft**, 26: 489–495.

LATOUR, F. A.; AMER, L. S.; PAPANSTASIOU, E. A.; BISHOP, B.M.; HOEK, M. L. 2010. Antimicrobial activity of the *Naja atra* cathelicidin and related small peptides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 396: 825:830.

LEE, S.; KIM, S.; LEE, Y.; SONG, M.; KIM, I.; WON, H. 2011. *De novo* generation of short antimicrobial peptides with simple amino acid composition. **Regulatory Peptides**, 166: 36-41.

LEE, K. 2002. Development of short antimicrobial peptides derived from host defense peptides or by combinatorial libraries. **Current Pharmaceutical Design**, 8(9): 795-813.

LEHNINGER, A. L.; COX, M. M.; NELSON, D. L. 2000. **Principles of biochemistry**. Worth, New York, 3<sup>o</sup> edition

LING, J. M. L.; SCHRYVERS, A. B. 2006. Perspectives on interactions between lactoferrin and bacteria. **Biochemistry and Cell Biology**, 84: 275-281.

LIZZI, A. R.; CARNICELLI, V.; CLARKSON, M. M.; GIULIO, A. D.; ORATORE, A. 2009. Lactoferrin Derived Peptides: Mechanisms of Action and their Perspectives as Antimicrobial and Antitumoral Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 9: 687-695.

LOHNER, K. 2009. New strategies for novel antibiotics : peptides targeting bacterial cell membranes. **Review Literature and Arts of the America**, 105-116.

LOHNER, K.; BLONDELLE, S. E. 2005. Molecular mechanisms of membrane perturbation by antimicrobial peptides and the use of biophysical studies in the design of novel peptide antibiotics. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, 8(3): 241-256.

LÖNNERDAL, B. O. 2003. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 77(6): 1537S-1543S.

LUHOVYY, B. L.; AKHAVAN, T.; ANDERSON, G. H. 2007. Whey proteins in the regulation of food intake and satiety. **Journal of the American College of Nutrition**, 26(6): 704S-712S.

MADUREIRA, A. R.; TAVARES, T.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. 2010. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. **Journal of Dairy Science**, 93(2): 437-455.

MAK, P.; WÓJCIK, K.; SILBERRING, J.; DUBIN, A. 2000. Antimicrobial peptide derived from heme-containing proteins: Hemocidins. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 77: 197-207.

MALKOSKI, M.; DASHPER, S. G.; SIMPSON, N. M. O. B.; TALBO, G. H.; MACRIS, M.; CROSS, K. J.; REYNOLDS, E. C. 2001. Kappacin, a Novel Antibacterial Peptide from Bovine Milk. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 45(8): 2309-2315.

MALIN, E. L.; ALAIMO, M. H.; BROWN, E. M.; ARAMINI, J. M.; GERMANN, M. W.; FARRELL, H. M. Jr.; McSWEENEY, P. L.; FOX, P. F. 2001. Solution structures of casein peptides: NMR, FTIR, CD, and molecular modeling studies of alphas1-casein, 1-23. **Journal of Protein Chemistry**, 20: 391–404.

MANSSON, H. L. 2008. Fatty acids in bovine milk fat. **Food & Nutrition Research**, 1: 1-3.

MATSUZAKI, K. 2009. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1788(8), 1687-1692.

MATSUZAKI, K.; SUGISHITA, K.; FUJII, N.; MIYAJIMA, K. 1995. Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. **Biochemistry**, 34: 3423–3429.

MELO, F.; SÁNCHEZ, R.; SALI, A. 2002. Statistical potentials for fold assessment. **Protein Science**, 11: 430–448.

MERRIFIELD, R. B. 1963. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, 85(14): 2149.

MILNER, J. A. 1999. Functional Foods and Health Promotion. **The Journal of Nutrition**, 129: 1395S–1397S.

MÖLLER, N. P.; SCHOLZ-AHRENS, K. E.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. 2008. Bioactive peptides, and proteins from foods: indication for health effects. **European Journal Nutrition**, 47: 171-182.

MORAIS, E. C. 2010. RECONHECIMENTO DE PADRÕES E REDES NEURAIS ARTIFICIAIS EMPREDIÇÃO DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DE PROTEÍNAS. **Tese de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Sistemas e Computação**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, pag. 56-57.

MORRIS, A. L.; MACARTHUR, M. W.; HUTCHINSON, E. G.; THORNTON, J. M. 1992. Stereochemical quality of protein structure coordinates. **Proteins**, 12: 345-364.

MUHLE, S. A.; TAM, J. P. 2001. Design of Gram-negative selective antimicrobial peptides. **Biochemistry**, 40: 5777-5785.

MURPHY, J. B.; KIES, M. W. 1960. Note on spectrophometric determination of protein in dilute solution. **Biochimica et Biophysica Acta**, 45: 382.

NCCLS. 2006. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animais: approved standar. Wayne, EUA. **NCCLS document M31-A2**.

NGUYEN, L.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. 2011. The expanding scope of antimicrobial peptides structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, 29(9): 464-472.

PAPAREDDY, P.; RYDENGARD, V.; PASUPULETI, M.; WALSE, B.; MORGELIN, M.; CHALUPKA, A.; MALMSTEN, M.; SCHMIDTCHEN, A. 2010. Proteolyses of human thrombin generates novel host defense peptides. **Plos Pathogens**, 6(4): e1000857.

PARODI, P. W. 2007. A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention. **Current Pharmaceutical Design**, 13(8): 813-828.

PELLEGRINI, A. 2003. Antimicrobial peptides from food proteins. **Current Pharmaceutical Design**, 9(16): 1225-1238.

PELLEGRINI, A.; DETTLING, C.; THOMAS, U.; HUNZIKER, P. 2001. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine beta-lactoglobulin. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1526(2): 131-140.

PELLEGRINI, A. 1999. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine  $\alpha$ -lactalbumin molecule. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1426(3): 439-448.

PESCHEL, A.; SAHL, H. G. 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. **Nature Review of Microbiology**, 4: 529-536.

PHOENIX, D.; HARRIS, F. 2003. Is use the hydrophobic moment a sound basis for predicting the structure-function relationships of membrane interactive  $\alpha$ -helices? **Current Protein & Peptide Science**, 4(5): 357-366.

PHOENIX, D. A.; HARRIS, F. 2002. The hydrophobic moment and its use in the classification of amphiphilic structures. **Molecular Membrane Biology**, 19: 1–10.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. 2000. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory. **Trends in Food Science & Technology**, 11: 347–56.

POWERS, J. P.; HANCOCK, R. E. 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, 24: 1681–1691.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, 82(4): 513-523.

QUIMING, N. S.; VERGEL, B.; NICOLAS, G.; VILLANUEVA, J. A. 2005. Interaction of Bovine Serum Albumin and Metallothionein. **Journal of Health Science**, 51(1): 8–15.

QUIRÓS, A.; CONTRERAS, M. M.; RAMOS, M.; AMIGO, L.; RECIO, I. 2009. Stability to gastrointestinal enzymes and structure activity relationship of  $\beta$ -casein-peptides with antihypertensive properties. **Peptides**, 30: 1848-1853.

RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V. 1968. Conformations of polypeptides and proteins. **Advances in proteins chemistry**, 23: 283-437.

RAQIB, R.; CRAVIOT, A. 2009. Nutrition, immunology, and genetics: future perspectives. **Nutrition Reviews**, 67(Suppl. 2): S227–S236.

REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 24(6): 536-547.

REYNOLDS, N. L.; CECCO, M. D.; TAYLOR, K.; STANTON, C.; KILANOWSKI, F.; KALAPOTHAKIS, J.; SEO, E.; UHRIN, D.; CAMPOPIANO, D.; GOVAN, J.; MACMILLAN, D.; BARRAN, P.; DORIN, J. R. 2010. Peptide fragments of a  $\beta$ -Defensin derived with potent bactericidal activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 54(5): 1922: 1929.

RIJKERS, G. T.; BENGMARK, S.; ENCK, P.; HALLER, D.; HERZ, U.; KALLIOMAKI, M.; KUDO, S. 2010. Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Current Status and Recommendations for Future Research. **The Journal of Nutrition**, 140: 671S–676S.

ROBERTS, P. R.; BURNEY, J. D.; BLACK, K. W.; ZALOGA, G. P. 1999. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. **Digestion**, 60: 332-337.

ROSSI, L. M.; RANGASAMY, P.; ZHANG, J. I. E.; QIU, X.; WU, G.Y. 2008. Research Advances in the Development of Peptide Antibiotics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 97(3): 1060-1070.

ROTEM, S.; MOR, A. 2009. Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1788(8): 1582-1592.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. 1993. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, 234: 779-815.

SAMARDI, B. H.; ISMAIL, A. 2010. Antioxidative peptides from food protein: A review. **Peptides**, 31(10): 1949-1956.

SENYÜREK, I.; KLEIN, G.; KALBACHER, H.; DEEG, M.; SCHITTEK, B. 2010. Peptide derived from the human laminin  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$  chain exhibit antimicrobial activity. **Peptides**, 31: 1468-1472.

SERRANO, J.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; DAUER, A.; AURA, A.; SAURA-CALIXTO, F. 2009. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular nutrition & food research**, 53: S310-S329.

SÉVERIN, S.; WENSHUI, X. 2005. Milk biologically active components as nutraceuticals: review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 45(7): 645-656.

SGARBIERI, V. 2004. Physiological-functional properties of milk whey proteins. **Revista de Nutrição**, 17(4): 397-409.

SHAH, N. P. 2000. Effects of milk-derived bioactives: an overview. **British Journal of Nutrition**, 84: S3-S10.

SHEN, M. Y.; SALI, A. 2006. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, 15: 2507-2524.

SHIMIZU, M.; SON, D. O. 2007. Food-derived peptides and intestinal functions. **Current Pharmaceutical Design**, 13(9): 885-895.

SIGURDARDOTTIR, T.; ANDERSSON, P.; DAVOUDI, M.; MALMNTEN, M.; SCHMIDTCHEN, A.; BODELSSON, M. 2006. In Silico identification and biological evaluation of antimicrobial peptided basedon human Cathelicidin LL-37. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, 50(9): 2983-2989.

SIPPL, M. J. 1995. Knowledge-based potentials for proteins. **Current Opinion Structures Biology**, 5: 229–235.

SIPPL, M. J. 1993. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins**, 17, 355–362.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. 2003. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 37(2) 127-135.

STEIJNS, J. M. 2001. Milk ingredients as nutraceuticals. **International Journal of Dairy Technology**, 54(3): 81-89.

STELWAGEN, K.; CARPENTER, E.; HAIGH, B.; HODGKINSON, A.; WHEELER, T. T. 2009. Immune components of bovine colostrum and milk. **Journal of Animal Science**, 87(13S): 3-9.

STYCZYNSKI, M. P.; JENSEN, K. L.; RIGOUTSOS, I.; STEPHANOPOULOS, G. 2008. BLOSUM62 miscalculations improve search performance. **Nature Biotechnology**, 26(3): 274-275.

SUMATHI, K.; ANANTHALAKSHMI, P.; ROSHAN, M. N. A. M.; SEKAR, K. 2006. 3dss: 3-dimensional structural superposition. **Nucleic Acids Research**, 34: W128–W134.

TETRA PAK DAIRY INDEX. 2009. Tetra Pak estima aumento no consumo de produtos lácteos longa vida nos mercados desenvolvidos. **News Release**, 1-3.

THENNARASU, S.; TAN, A.; PENUMATCHU, R.; SHELBURNE, C. E.; HEYL, D. L.; RAMAMOORTHY, A. 2010. Antimicrobial and membrane disrupting activities of a peptide derived from the human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37. **Biophysical Journal**, 98: 248-257.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 22: 4673-4680.

TIAN, Z.; DONG, T.; TENG, D.; YANG, Y.; WANG, J. 2009. Design and characterization of novel hybrid peptides from LFB15(W4,10), HP(2-20), and cecropin-aided method. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, 82: 1097-1103.

TIMM, C. D.; OLIVEIRA, D. S. 2002. Nova legislação do leite no Brasil. **Ciência & Tecnologia Veterinária**, 1(1): 1-12.

TOMASINSIG, L.; ZANETH, M. 2005. The Cathelicidins – structure, function, and evolution. **Current Protein and Peptide Science**, 6: 23-34.

TORRENT, M.; NOGUÉS, V. M.; BOIX, E. 2009. A theoretical approach to spot active regions in antimicrobial proteins. **BMC Bioinformatics**, 10: 373.

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. 2002. New consensus hydrophobicity scale extended to non-proteinogenic amino acids. In **Peptides 2002: Proceedings of the twenty-seventh European peptide symposium**. Edizioni Ziino, Napoli, Italy: 416-417.

VENCLOVAS, C.; GINALSKI, K.; KANG, C. 2004. Sequence-structure mapping errors in the PDB: OB-fold domains. **Protein Science**, 13:1594–1602

VIRK-BAKER, M. K.; NAGY, T. R.; BARNES, S. 2010. Role of phytoestrogens in cancer therapy. **Planta medica**, 76(11): 1132-1142.

WAKABAYASHI, H.; TAKASE, M.; TOMITA, M. 2003. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. **Current Pharmaceutical Design**, 9(16): 1277-1287.

WANG, H. C.; YANG, J.; HSIEH, S.; SHEEN, L. 2010. Allyl sulfides inhibit cell growth of skin cancer cells through induction of DNA damage mediated G2/M arrest and apoptosis. **Journal of agricultural and food chemistry**, 58(11): 7096-7103.

WANG, Z; WANG, G. 2004. APD: the Antimicrobial Peptide Database. **Nucleic Acids Research**, 32: D590-D592.

WIEDERSTEIN, M.; MANFRED, J. S. 2007. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, 35: W407–W410.

WIPRECHT, T.; DATHE, M.; BEYERMANN, M.; KRAUSE, E.; MALOY, Y.; MACDONALD, D. L.; BIENERT, M. 1997. Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of Megainin 2 amide in interaction with membranes. **Biochemistry**, 36: 6124-6132.

WIESNER, J.; VILCINSKAS, A. 2010. Antimicrobial peptides - The ancient arm of the human immune system. **Virulence**, 1(5): 440-464.

WILT, T. J.; SHAUKAT, A.; SHAMLIYAN, T.; TAYLOR, B. C. 2010. Lactose Intolerance and Health. **U.S. Agency for Healthcare Research and Quality**, 192: 1-24.

WIMLEY, W. C. 2010. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. **ACS Chemical Biology**, 5(10): 905-917.

WONG, J. H.; NG, T. B.; LEGOWSKA, A.; ROLKA, K.; HUI, M.; CHO, C. H. 2011. Antifungal action of human cathelicidin fragment (LL13-37) on *Candida albicans*. **Peptides**, 32: 1996-2002.

WONG, D. W.; CAMIRAND, W. M.; PAVLATH, A. E.; PARRIS, N.; FRIEDMAN, M. 1996. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 36(8): 807 – 844.

YALÇIN, A. S. 2006. Emerging Therapeutic Potential of Whey Proteins and Peptides. **Current Pharmaceutical Design**, 12: 1637-1643.

YEN, C.; SHEN, C.; HSU, W.; CHANG, Y.; LING, H.; CHEN, H.; CHEN, C. 2011. Lactoferrin: an iron-binding antimicrobial protein against *Escherichia coli* infection. **Biometals**, 24: 585-594.

ZALOGA, G. P.; SIDDIQUI, R. A. 2004. Biologically active dietary peptides. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, 4(8): 815-821.

ZELEZETSKY, I.; TOSSI, A. 2006. Alpha-helical antimicrobial peptides – using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1758: 1436–1449.

ZHANG, L.; ROZEK, A.; HANCOCK, R. E. W. 2001. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, 276(38): 35714-35722.

ZUCHT, H. D.; RAIDA, M.; ADERMANN, K.; MAGERT, H. J.; FORSS-MANN, W. G. 1995. Casocidin-I: A casein-alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. **FEBS Letters**, 372: 185–188.