

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto De Ciências Biológicas**  
**Departamento De Microbiologia**  
**Curso De Mestrado Profissional em Microbiologia Aplicada**

**JAMIL SILVANO DE OLIVEIRA**

**Extração, purificação de substâncias antagonistas produzidas por *Shigella sonnei*, síntese de peptídios ativos contra *Shigella* spp. e *Escherichia coli* e caracterização das moléculas**

Belo Horizonte

2022

Jamil Silvano de Oliveira

**Extração, purificação de substâncias antagonistas produzidas por *Shigella sonnei*, síntese de peptídios ativos contra *Shigella* spp. e *Escherichia coli* e caracterização das moléculas**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Aplicada.

Linha de Pesquisa: Uso da biotecnologia na pesquisa, desenvolvimento e validação de métodos analíticos, visando o diagnóstico e ao controle de micro-organismos.

Orientador: Prof. Luiz de Macêdo Farias  
Coorientadoras: Prof<sup>a</sup>. Paula Prazeres Magalhães  
Dr<sup>a</sup>. Jaqueline Silvana Moreira

Belo Horizonte  
2022

043

Oliveira, Jamil Silvano de.

Extração, purificação de substâncias antagonistas produzidas por *Shigella sonnei*, síntese de peptídeos ativos contra *Shigella* spp. e *Escherichia coli* e caracterização parcial das moléculas [manuscrito] / Jamil Silvano de Oliveira. – 2022.

122 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Luiz de Macêdo Farias. Coorientadoras: Prof<sup>a</sup>. Paula Prazeres Magalhães Dr<sup>a</sup>. Jaqueline Silvana Moreira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Disenteria Bacilar. 3. *Shigella sonnei*. 4. Peptídeos. 5. Proteínas. 6. Anti-Infeciosos. I. Farias, Luiz de Macêdo. II. Magalhães, Paula Prazeres. III. Moreira, Jaqueline Silvana. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL EM MICROBIOLOGIA APLICADA

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

ALUNO: JAMIL SILVANO DE OLIVEIRA

Nº matrícula: 2019754252

Curso de Pós-graduação em Microbiologia Aplicada- NÍVEL MESTRADO

Data da defesa de dissertação: 08 de julho de 2022.

Título: "Extração, purificação de substâncias antagonistas produzidas por *Shigella sonnei*, síntese de peptídeos ativos contra *Shigella* spp. e *Escherichia coli* e caracterização parcial das moléculas"

A Dissertação foi submetida à apreciação da banca examinadora que emitiu parecer favorável.

Dr. João Fernando Gonçalves Ferreira  
Examinador

Aprovado:

Dra. Simone Gonçalves dos Santos  
Examinadora

Aprovado:

Prof. Luiz de Macêdo Faria  
Orientador

Aprovado:

Erna Geessien Kron  
Coordenadora

Belo Horizonte, 11 de julho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Erna Geessien Kroon, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 12/07/2022, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Goncalves dos Santos, Professora do Magistério Superior**, em 13/07/2022, às 15:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Fernando Gonçalves Ferreira, Usuário Externo**, em 13/07/2022, às 17:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz de Macedo Farias, Professor do Magistério Superior**, em 15/07/2022, às 09:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Prazeres Magalhaes, Professora do Magistério Superior**, em 15/07/2022, às 09:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1588959** e o código CRC **A7066B97**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL EM MICROBIOLOGIA APLICADA

**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE  
JAMIL SILVANO DE OLIVEIRA**

Nº REGISTRO 2019754252

Às 17 horas do dia 08 de julho de 2022, reuniu-se, de forma virtual, na plataforma Microsoft Teams, a Comissão Examinadora composta pelo Dr. João Fernando Gonçalves Ferreira, ICB- UFMG e da profa. Simone Gonçalves dos Santos, ICB/UFMG, e o Orientador, Prof. Luiz de Macêdo Farias, ICB-UFMG, para julgar o trabalho final "Extração, purificação de substâncias antagonistas produzidas por *Shigella sonnei*, síntese de peptídeos ativos contra *Shigella* spp. e *Escherichia coli* e caracterização parcial das moléculas" do candidato, JAMIL SILVANO DE OLIVEIRA, requisito final para obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Erna Geessien Kroon – Coordenadora do Curso, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Em seguida, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato, e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte 08 de julho de 2022.

Dr. João Fernando Gonçalves Ferreira

Dra. Simone Gonçalves dos Santos

Prof. Luiz de Macêdo Faria

Prof. Erna Geessien Kroon

Coordenadora



Documento assinado eletronicamente por **Erna Geessien Kroon, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 12/07/2022, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Gonçalves dos Santos, Professora do Magistério Superior**, em 13/07/2022, às 15:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Fernando Gonçalves Ferreira, Usuário Externo**, em 13/07/2022, às 17:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz de Macedo Farias, Professor do Magistério Superior**, em 15/07/2022, às 09:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Prazeres Magalhaes, Professora do Magistério Superior**, em 15/07/2022, às 09:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1588794** e o código CRC **0E5D3652**.

## **APOIO FINANCEIRO**

CNPq

FAPEMIG

CAPES

PRPq/UFMG

*Dedico este trabalho à minha  
linda e amada esposa, Jaqueline  
S. Moreira, aos meus queridos  
irmãos, Júlio, Luciana e Joelson  
e aos meus queridos, sogro senhor  
Assenso e sogra dona Verza.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Professor Luiz de Macêdo Farias, pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Sou muito grato pela acolhida, pelas orientações, ensinamentos, paciência, boa vontade e por ter me recebido tão bem em seu laboratório desde o primeiro dia em que entrei pela primeira vez.

À minha coorientadora, Professora Paula Prazeres Magalhães, pela colaboração, compreensão, contribuição e ensinamentos.

À minha coorientadora, Dr<sup>a</sup> Jaqueline Silvana Moreira, amada e querida esposa (meu Anjinho) que sempre está ao meu lado, com todo seu carinho, apoio, ajuda, compreensão e pelos momentos no envolvimento científico.

À Adriana Raabe Magalhães, técnica responsável pelo Laboratório Institucional de Pesquisa (LIPq), Centro de Laboratórios Multiusuários (CELAM), Laboratório Multiusuários de Proteômica – LMProt, ICB/ UFMG, pela ajuda nas obtenções das massas e fragmentações.

À Dr<sup>a</sup> Vanessa Gomes Fraga, responsável pela síntese automatizada de peptídeos, do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – LIGP, ICB/UFMG, pela ajuda nas sínteses.

À Dr<sup>a</sup> Dayane Lorena Naves de Souza, pela ajuda nas análises dos sequenciamentos.

À Dr<sup>a</sup> Marcella Melo-Braga, pela ajuda nas análises dos sequenciamentos.

Ao Professor Ricardo Andrez Machado de Ávila, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS, Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, pelas valiosas sugestões e ajuda.

Ao Prof. Marcelo Porto Bemquerer, Pesquisador da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora/MG, por disponibilizar seu tempo para ministrar o Curso de Espectrometria de Massas Aplicada ao Sequenciamento de Peptídios.

Ao Dr. Joaquim Teixeira, pelas ajudas de longas datas.

Ao Dr. Anderson K. Santos, pelas ajudas de sempre e amizade sincera.

Aos membros da banca examinadora, Prof<sup>a</sup>. Simone Gonçalves dos Santos e Dr. João Fernando Gonçalves, pela disponibilidade e contribuições desde o início desse trabalho, em especial, durante a arguição do projeto até a defesa do Mestrado.

A todos os professores do Curso de Microbiologia Aplicada – Mestrado Profissional - ICB/UFMG, na pessoa da Coordenadora Professora Erna Geessien Kroon, pelo vasto e prazeroso aprendizado.

À secretaria do Curso de Microbiologia Aplicada – Mestrado Profissional - ICB/UFMG, na pessoa de Márcia Nepomuceno, pela eficiência e prestatividade.

A toda família ICB, em especial, aos membros do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, recentes e egressos, o meu muito obrigado.

A DEUS, por nós abençoar com seu amor incondicional em nossas vidas, pois com seu fortalecimento conseguimos chegar até aqui.

*"A constância não consiste  
sempre em fazer as mesmas  
coisas, mas aquelas que  
tendem para o mesmo fim."*

*Luis XIV*

## RESUMO

*Shigella*, membro da família *Enterobacteriaceae*, é um gênero bacteriano que inclui quatro espécies, *S. boydii*, *S. dysenteriae* e, de especial importância no Brasil, *S. flexneri* e *S. sonnei*. O enteropatógeno *Shigella* é o agente da shigelose, uma forma grave de doença diarreica associada a níveis elevados de morbidade e mortalidade, que acomete, predominantemente, crianças com idade inferior a cinco anos, que vivem em países menos desenvolvidos. Como diversos grupos bacterianos, *Shigella* é capaz de sintetizar substâncias de natureza proteica com ação antagonista que conferem vantagens competitivas ao micro-organismo produtor. O objetivo geral do trabalho foi extrair e purificar substâncias antagonistas produzidas por *Shigella sonnei* isolada de espécime fecal de criança com shigelose, e, com base nessas moléculas, sintetizar e caracterizar os peptídios ativos contra *Shigella* spp. e *Escherichia coli*. Para o estudo foram utilizadas duas amostras de *S. sonnei*, produtora e reveladora da ação antagonista. Os extratos intracelulares das amostras produtoras de substâncias antagonistas foram obtidos por cultivo, lise e precipitação proteica com sulfato de amônio nas concentrações de 15 e 30% p/v (EI-15 e EI-30). A ação antagonista foi determinada e os extratos foram submetidos à purificação proteica por cromatografias de troca iônica, exclusão molecular e fase reversa, seguido de análise por espectrometria de massas e produção de peptídios sintéticos. Os 31 peptídios sintéticos foram avaliados em relação à ação antagonista, dos quais, 8 foram ativos contra a amostra reveladora. Os peptídios ativos foram confrontados contra um painel bacteriano dividido entre *Shigella* spp. e *E. coli*, amostras sensíveis à amostra produtora. Análise físico-química também foi realizada para a caracterização das substâncias. Com base nos ensaios da ação antagonista, um peptídio sintético, 8/J8, foi denominado peptídio principal. Seguido dos peptídios 5/J5 e 10/J10 que também apresentaram resultados animadores. Esses peptídios despertam interesse biotecnológico, uma vez que a Organização Mundial de Saúde preconiza a descoberta, com urgência, de compostos ativos contra o enteropatógeno.

Palavras-chave: *Shigella sonnei*. Peptídios e proteínas antimicrobianas.  
Purificação proteica. Peptídeo sintético biologicamente ativo.

## ABSTRACT

*Shigella*, a member of the Enterobacteriaceae family, is a bacterial genus that includes four species, *S. boydii*, *S. dysenteriae* and, of special importance in Brazil, *S. flexneri* and *S. sonnei*. The enteropathogen *Shigella* is the agent of shigellosis, a severe form of diarrheal disease associated with high levels of morbidity and mortality, which predominantly affects children under the age of five living in less developed countries. Like several bacterial groups, *Shigella* is capable of synthesizing substances of a protein nature with antagonistic action that confer competitive advantages to the producing microorganism. The general objective of the work was extract and purify antagonist substances produced by *Shigella sonnei* isolated from a fecal specimen of a child with shigellosis, based on these molecules, synthesize and characterize the peptides active against *Shigella* spp. and *Escherichia coli*. For the study, two samples of *S. sonnei*, producer and developer of the antagonist action were used. The intracellular extracts of samples producing antagonist substances were obtained by culture, lysis and protein precipitation with ammonium sulfate at concentrations of 15 and 30% w/v (EI-15 and EI-30). The antagonist action was determined and the extracts were submitted to protein purification by ion exchange, molecular exclusion and reversed phase chromatography, followed by mass spectrometry analysis and production of synthetic peptides. The 31 synthetic peptides were evaluated for antagonistic action, of which 8 were active against the revealing sample. Active peptides were challenged against a bacterial panel divided between *Shigella* spp. and *E.coli*, samples sensitive to the producing sample. Physicochemical analysis was also performed to characterize the substances. Based on assays for antagonistic action, a synthetic peptide, 8/J8, was named the main peptide. Followed by peptides 5/J5 and 10/J10 which also showed encouraging results. The data arouses biotechnological interest, since the World Health Organization advocates the urgent discovery of active compounds against the enteropathogen.

Keywords: *Shigella sonnei*. Antimicrobial peptides and proteins. Protein purification. Biologically active synthetic peptide.

## LISTA DE FIGURAS

|           |                                                                                                                                                  |    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1  | Divisão das bacteriocinas sintetizadas por espécies Gram-negativas.                                                                              | 32 |
| Figura 2  | Atividade antagonista e titulação do extrato intracelular EI-30.                                                                                 | 49 |
| Figura 3  | Perfil cromatográfico em coluna de troca iônica Poros II Q/P (4,6mm/50 mm).                                                                      | 51 |
| Figura 4  | Atividade antagonista das frações recuperadas da cromatografia de troca iônica Poros II Q/P.                                                     | 52 |
| Figura 5  | Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa Microsorb-Mv™ C18                                                                                | 53 |
| Figura 6  | Atividade antagonista das frações recuperadas da cromatografia fase reversa Microsorb-Mv™ C18.                                                   | 54 |
| Figura 7  | Perfil cromatográfico em coluna de troca iônica Resource™-Q (6,4mm Ø x 30mm).                                                                    | 56 |
| Figura 8  | Atividade antagonista das frações 1 a 81 da cromatografia de troca iônica II coluna Resource™ Q, contra a amostra <i>S. sonnei</i> SS12.         | 57 |
| Figura 9  | Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 (5µ ST 4,6/250 mm).                                                        | 59 |
| Figura 10 | Atividade antagonista das frações 32 e 33 da cromatografia de fase reversa II em coluna Sephasil™ Peptide C18, contra a amostra reveladora SS12. | 60 |

|           |                                                                                                                                                                                    |    |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 11 | Atividade antagonista das amostras recuperados do dispositivo Amicon Ultra.                                                                                                        | 61 |
| Figura 12 | Perfil cromatográfico da fração com substâncias de massa molecular de 5 a 10 kDa adquiridas em dispositivo Amicon Ultra, separadas em coluna de fase reversa III Luna 5 $\mu$ C18. | 62 |
| Figura 13 | Atividade antagonista das frações adquiridas em cromatografia de fase reversa III em coluna Luna 5 $\mu$ C18, contra a amostra reveladora SS12.                                    | 63 |
| Figura 14 | Perfil cromatográfico de EI-30 fracionado em coluna de exclusão molecular Superdex™ 30 HR 16/60.                                                                                   | 64 |
| Figura 15 | Atividade antagonista das frações obtidas em cromatografia de exclusão molecular Superdex™ 30, contra a amostra reveladora SS12.                                                   | 65 |
| Figura 16 | Perfil cromatográfico do <i>pool</i> das frações obtidas em coluna de exclusão molecular Superdex™ 75.                                                                             | 66 |
| Figura 17 | Atividade antagonista das frações da cromatografia de exclusão molecular Superdex™ 75, contra a amostra reveladora SS12.                                                           | 67 |
| Figura 18 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a amostra C10 mostrando m/z de 1443.                                                                                          | 69 |
| Figura 19 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a amostra C11 mostrando m/z de 1443.                                                                                          | 70 |
| Figura 20 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a amostra 32, sem tripsinólise, mostrando m/z de 9287 Da.                                                                     | 72 |

|           |                                                                                                                                                          |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 21 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a amostra 32, após tripsinólise, com fragmento de interesse 1333 m/z.                               | 73 |
| Figura 22 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF modo linear para a amostra 32, após fragmentação da m/z 1333, mostrando a sequência obtida.                             | 74 |
| Figura 23 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 55 antes de ser reduzida e alquilada.                                                      | 78 |
| Figura 24 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 55 após ser reduzida, alquilada e fragmentada com presença de m/z de 1220, 1097 e 941.     | 79 |
| Figura 25 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 55 após fragmentação da m/z 1220, mostrando as prováveis sequências que podem ser obtidas. | 80 |
| Figura 26 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 55 após fragmentação da m/z 1097, mostrando as prováveis sequências que podem ser obtidas. | 81 |
| Figura 27 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 55 após fragmentação da m/z 941, mostrando a provável sequência que pode ser obtida.       | 82 |
| Figura 28 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para o peptídeo sintético.                                                                               | 83 |
| Figura 29 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 56 antes de ser reduzida e alquilada                                                       | 86 |

|           |                                                                                                                                                                                   |     |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 30 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 56 após ser reduzida, alquilada e fragmentada com presença de m/z de 1197, 1229, 1235 e 1333.                       | 87  |
| Figura 31 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 56 após fragmentação da m/z 1197, mostrando as prováveis sequências que podem ser obtidas.                          | 88  |
| Figura 32 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 56 após fragmentação da m/z 1229, mostrando as prováveis sequências que podem ser obtidas.                          | 89  |
| Figura 33 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 56 após fragmentação da m/z 1235, mostrando as prováveis sequências que podem ser obtidas.                          | 90  |
| Figura 34 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 56 após fragmentação da m/z 1333, mostrando a provável sequência que pode ser obtida.                               | 91  |
| Figura 35 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 115 após tripsinólise da m/z 12.200 e fragmentação de m/z 1773, mostrando a provável sequência que pode ser obtida. | 94  |
| Figura 36 | Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 115 após tripsinólise da m/z 12.200 e fragmentação de 1012 m/z, mostrando a provável sequência que pode ser obtida. | 95  |
| Figura 37 | Ação antagonista dos peptídios sintéticos contra a amostra reveladora <i>S. sonnei</i> SS12.                                                                                      | 100 |
| Figura 38 | Atividade antagonista dos peptídios sintéticos contra as amostras reveladoras: <i>Shigella</i> spp. e <i>E. coli</i> .                                                            | 104 |

## LISTA DE TABELAS

|          |                                                                                                                                                              |     |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1 | Frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular analisadas em espectrômetro de massas e análise da sequência parcial primária sugerida                | 96  |
| Tabela 2 | Análise em <i>web software</i> BLAST da sequência parcial primária sugerida dos peptídios selecionados para verificação de similaridade com outras proteínas | 97  |
| Tabela 3 | Sequências primária de aminoácidos selecionadas para a produção de possíveis peptídios sintéticos ativos                                                     | 99  |
| Tabela 4 | Espectro de ação antagonista dos peptídios sintéticos contra isolados de <i>Shigella</i> spp. e <i>E. coli</i>                                               | 102 |
| Tabela 5 | Ação antagonista dos peptídios sintéticos contra isolados de <i>Shigella</i> spp. e <i>E. coli</i>                                                           | 103 |
| Tabela 6 | Análise físico-química dos peptídios solúveis realizadas na <i>web software</i> ProtParam                                                                    | 107 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                 |                                                                        |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------|
| A               | Aminoácido alanina                                                     |
| $\alpha$ -ciano | $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico                                      |
| aa              | Aminoácidos                                                            |
| Abs             | Absorbância                                                            |
| Acn             | Acetonitrila                                                           |
| AMP             | Peptídio antimicrobiano                                                |
| ATCC            | <i>American Type Culture Collection</i>                                |
| B               | Aminoácido asparagina                                                  |
| BLAST           | <i>Basic Local Alignment Tool</i>                                      |
| BtuB            | Receptor para vitamina B12                                             |
| C               | Aminoácido cisteína                                                    |
| C-              | Controle negativo                                                      |
| C+              | Controle positivo                                                      |
| COEP            | Comitê de ética em pesquisa da UFMG                                    |
| D               | Aminoácido aspartato                                                   |
| Da              | Dalton                                                                 |
| DHB             | 2,5-dihidroxibenzóico                                                  |
| DMF             | Dimetilformamida                                                       |
| DMSO            | Dimetilsulfóxido                                                       |
| DNA             | Ácido desoxirribonucleico                                              |
| DTT             | Ditiotreitol                                                           |
| E               | Aminoácido glutamato                                                   |
| EI-15           | Extrato proteico intracelular precipitado com 15% de sulfato de amônio |
| EI-30           | Extrato proteico intracelular precipitado com 30% de sulfato de amônio |
| F               | Aminoácido fenilalanina                                                |
| FAO             | Organização de Alimentos e Agricultura                                 |
| FPLC            | <i>Fast protein liquid chromatography</i>                              |
| G               | Aminoácido glicina                                                     |
| g               | Força gravitacional                                                    |

|                      |                                                                                           |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| GRAS                 | <i>Generally Recognized As Safe</i>                                                       |
| H                    | Aminoácido histidina                                                                      |
| HCl                  | Ácido clorídrico                                                                          |
| HPLC                 | <i>High-performance liquid chromatography</i>                                             |
| I                    | Aminoácido isoleucina                                                                     |
| K                    | Aminoácido lisina                                                                         |
| Kgf.cm <sup>-1</sup> | Quilograma-força por centímetro                                                           |
| kb                   | Kilobase                                                                                  |
| kDa                  | Kilodalton                                                                                |
| L                    | Aminoácido leucina                                                                        |
| M                    | Aminoácido metionina                                                                      |
| MALDI                | <i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>                                        |
| Mcc                  | Microcina                                                                                 |
| MRSA                 | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina                                        |
| M W                  | Massa molar                                                                               |
| m/z                  | Massa/carga                                                                               |
| N                    | Aminoácido asparagina                                                                     |
| NaCl                 | Cloreto de sódio                                                                          |
| NT                   | Não testado                                                                               |
| OGM                  | Organismo Geneticamente Modificado                                                        |
| OMS                  | Organização Mundial de Saúde                                                              |
| P                    | Aminoácido prolina                                                                        |
| pH                   | Potencial hidrogeniônico                                                                  |
| pI                   | Ponto isoelétrico                                                                         |
| p/v                  | Peso/volume                                                                               |
| Q                    | Aminoácido glutamina                                                                      |
| R                    | Aminoácido arginina                                                                       |
| RNA                  | Ácido ribonucleico                                                                        |
| S                    | Aminoácido serina                                                                         |
| SisGen               | Sistema Nacional de gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado |
| SPPS                 | Síntese de peptídeos em fase sólida Fmoc                                                  |
| SS9                  | <i>Shigella sonnei</i> produtora de substância antagonista                                |

|      |                                                         |
|------|---------------------------------------------------------|
| SS12 | <i>Shigella sonnei</i> sensível à expressão antagonista |
| T    | Aminoácido treonina                                     |
| TBE  | Tampão Tris/Borato/EDTA                                 |
| TFA  | Ácido trifluoroacético                                  |
| TOF  | <i>Time-of-flight</i>                                   |
| Tris | Tris (hidroximetil) aminometano                         |
| TSA  | <i>Tryptic Soy Agar</i>                                 |
| TSB  | <i>Tryptic Soy Broth</i>                                |
| UA   | Unidade arbitrária de bacteriocina                      |
| V    | Aminoácido valina                                       |
| VRE  | <i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina            |
| W    | Aminoácido triptofano                                   |
| Y    | Aminoácido tirosina                                     |
| Z    | Aminoácido glutamina                                    |

## SUMÁRIO

|          |                                                                            |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                          | <b>23</b> |
| 1.1      | O GÊNERO <i>Shigella</i>                                                   | 23        |
| 1.1.1    | SHIGELOSE                                                                  | 23        |
| 1.2      | BACTERIOCINAS                                                              | 25        |
| 1.2.1    | BACTERIOCINAS SINTETIZADAS POR BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS                    | 27        |
| 1.2.1.1  | Microcinas                                                                 | 27        |
| 1.2.1.2  | Colicinas e bacteriocinas tipo colicinas                                   | 29        |
| 1.2.1.3  | Aplicabilidade das bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram-negativas | 30        |
| 1.2.2    | BACTERIOCINAS SINTETIZADAS POR BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS                    | 33        |
| 1.2.3    | RESISTÊNCIA ÀS BACTERIOCINAS                                               | 33        |
| 1.3      | PEPTÍDIOS ANTIMICROBIANOS                                                  | 34        |
| 1.3.1    | PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS PEPTÍDIOS ANTIMICROBIANOS                   | 35        |
| <b>2</b> | <b>JUSTIFICATIVA</b>                                                       | <b>37</b> |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b>                                                           | <b>38</b> |
| 3.1      | OBJETIVO GERAL                                                             | 38        |
| 3.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                      | 38        |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                  | <b>39</b> |
| 4.1      | AMOSTRAS BACTERIANAS                                                       | 39        |
| 4.2      | OBTENÇÃO DOS EXTRATOS INTRACELULARES EI-15 E EI-30                         | 39        |
| 4.2.1    | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA                                         | 40        |
| 4.2.2    | TITULAÇÃO                                                                  | 40        |
| 4.3      | PURIFICAÇÃO POR PROCESSOS CROMATOGRÁFICOS                                  | 41        |
| 4.3.1    | CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA I                                  | 41        |
| 4.3.2    | CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA I                                  | 41        |
| 4.3.3    | CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA II                                 | 42        |
| 4.3.4    | CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA II                                 | 43        |
| 4.3.5    | CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA III                                | 43        |

|              |                                                                                           |            |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4.3.6</b> | <b>CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE EXCLUSÃO MOLECULAR SUPERDEX™ 30</b>                         | <b>44</b>  |
| <b>4.3.7</b> | <b>CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE EXCLUSÃO MOLECULAR SUPERDEX™ 75</b>                         | <b>44</b>  |
| 4.4          | ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS                                                      | 45         |
| 4.5          | SÍNTESE DE PEPTÍDIOS SOLÚVEIS                                                             | 46         |
| <b>4.5.1</b> | <b>ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DOS PEPTÍDIOS SOLÚVEIS</b>                        | <b>47</b>  |
| 4.6          | ESPECTRO DE AÇÃO DOS PEPTÍDIOS SINTÉTICOS                                                 | 47         |
| 4.7          | ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DOS PEPTÍDIOS SOLÚVEIS                                             | 48         |
| <b>5.</b>    | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                             | <b>49</b>  |
| 5.1          | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA E TITULAÇÃO DOS EXTRATOS INTRACELULARES                | 49         |
| 5.2          | PURIFICAÇÕES POR PROCESSOS CROMATOGRÁFICOS                                                | 50         |
| <b>5.2.1</b> | <b>CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA I</b>                                          | <b>50</b>  |
| <b>5.2.2</b> | <b>CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA I</b>                                          | <b>52</b>  |
| <b>5.2.3</b> | <b>CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA II</b>                                         | <b>54</b>  |
| <b>5.2.4</b> | <b>CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA II</b>                                         | <b>68</b>  |
| <b>5.2.5</b> | <b>CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA III</b>                                        | <b>60</b>  |
| <b>5.2.6</b> | <b>CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE EXCLUSÃO MOLECULAR SUPERDEX™ 30</b>                         | <b>64</b>  |
| <b>5.2.7</b> | <b>CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE EXCLUSÃO MOLECULAR SUPERDEX™ 75</b>                         | <b>66</b>  |
| 5.3          | ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS                                                     | 68         |
| 5.4          | SÍNTESE DE PEPTÍDIOS SOLÚVEIS                                                             | 98         |
| 5.5          | AÇÃO ANTAGONISTA DE PEPTÍDIOS SINTÉTICOS CONTRA O100 ENTEROPATÓGENO <i>S. sonnei</i> SS12 |            |
| 5.6          | ESPECTROS DA AÇÃO ANTAGONISTA DOS PEPTÍDIOS SINTÉTICOS                                    | 101        |
| 5.7          | ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DOS PEPTÍDIOS SOLÚVEIS                                             | 105        |
| <b>6.</b>    | <b>SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES</b>                                                | <b>108</b> |
| <b>7.</b>    | <b>PERSPECTIVAS</b>                                                                       | <b>110</b> |
| <b>8.</b>    | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                         | <b>111</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O GÊNERO *Shigella*

5 O enteropatógeno *Shigella* foi identificado pela primeira vez em 1897, por Kiyoshi Shiga, em um surto de disenteria bacilar aguda, no Japão. O pesquisador isolou a espécie *Shigella dysenteriae*, altamente patogênica e produtora de exotoxinas (Rangan, 2008; Shad & Shad, 2021). Nos anos seguintes outras espécies do gênero foram identificadas *Shigella flexneri* em 1899, por Simon  
10 Flexner, em Manila; *Shigella sonnei*, em 1906, por Carl Olaf Sonne, em Copenhage; e *Shigella boydii* em 1921, por Frederick Boyd, na Índia (Rangan, 2008). Os membros do gênero, incluído na família *Enterobacteriaceae*, caracterizam-se como bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, imóveis, fermentadores de glicose sem produção de gás e H<sub>2</sub>S, negativos para lisina descarboxilase, oxidase,  
15 urease e citrato. Com exceção de *S. dysenteriae* Tipo 1, todas as espécies são catalase-negativas (Nisa *et al.*, 2020).

#### 1.1.1 SHIGELOSE

20 *Shigella* é o agente etiológico da shigelose, também chamada disenteria bacilar. O patógeno é responsável por cerca de 5 a 15% de todos os casos de disenteria no mundo, com cerca de 1,1 milhões de óbitos por ano. Dos indivíduos acometidos  $\frac{2}{3}$  possuem idade inferior a 5 anos (Nisa *et al.*, 2020).

A doença, que apresenta altos índices de morbidade e mortalidade, é mais  
25 prevalente em países menos desenvolvidos, onde não há tratamento de água e saneamento básico adequado, o que favorece a disseminação do micro-organismo (Taneja & Mewara, 2016; Hosangadi, *et al.*, 2017; Nisa *et al.*, 2020, Micoli *et al.*, 2022). Das quatro espécies de *Shigella*, *S. sonnei* é mais frequentemente isolada em países desenvolvidos e *S. flexneri* é mais relatada em países menos desenvolvidos  
30 (Rangan, 2008; Kang *et al.*, 2019). As duas outras espécies, *S. dysenteriae* e *S. boydii* são menos disseminadas, associadas a surtos (Rangan, 2008). Com a melhoria socioeconômica de alguns países, como Brasil, Índia e China, se comparada a períodos anteriores, houve uma inversão na presença da bactéria dominante, tendo *S. sonnei* emergido como um patógeno importante (Watson *et al.*,

2019).

Com dose infecciosa baixa, cerca de 10 a 100 células bacterianas, a doença, que tem como reservatório natural os seres humanos e primatas não humanos, é estabelecida após o período de incubação, habitualmente de três dias, podendo variar entre um a sete dias. A infecção se dá pela ingestão de água ou alimentos contaminados ou por transmissão pessoa-pessoa (González-Torralba *et al.*, 2018; Kotloff *et al.*, 2018; Edward *et al.*, 2020; Shad & Shad, 2021).

Após a infecção, a bactéria passa pelo estômago, onde resiste ao pH ácido, e é encaminhada para as células M das placas de Peyer do cólon. Nesse local, o patógeno atravessa a camada de muco e inicia os processos de adesão e invasão, através da indução da macropinocitose na porção apical das células M. Em seguida, a bactéria é exocitada na porção basal das células M, a resposta inflamatória é induzida e as junções intracelulares são rompidas, o que compromete a integridade do epitélio celular, levando a uma disseminação local do patógeno. *Shigella* também é endocitada na porção basolateral das células epiteliais. No interior celular, ela é liberada no citoplasma e induz a formação de uma cauda de actina em uma de suas extremidades. Esta cauda propulsiona a bactéria, que se dissemina horizontalmente (Jennison & Verma, 2004; Sasakawa, 2010).

Os indivíduos infectados, que desenvolvem a doença, chegam a apresentar episódios de evacuação por dia, o que pode levar à desidratação grave (Nisa *et al.*, 2020). A diarreia é caracterizada por fezes mucossanguinolentas e outras manifestações clínicas, como dor abdominal, cólicas, febre, vômito, tenesmo e anorexia também são observadas. O quadro pode perdurar por cerca de uma ou duas semanas, mesmo período de excreção da bactéria nas fezes (Rangan, 2008; Nisar *et al.* 2014; Shad & Shad, 2021; Micoli *et al.*, 2022). Em regiões endêmicas, os pacientes tornam-se assintomáticos, mas continuam excretando o patógeno (Shad & Shad, 2021).

No ambiente a bactéria apresenta um longo período de sobrevivência, cerca de sete semanas em roupas contaminadas, cinco semanas no solo, cinco dias em água doce, 12 a 30 horas em água salgada (Leonardopoulos *et al.*, 1980; Nisar *et al.*, 2014). A mosca doméstica (*Musca domestica*) apresenta um papel relevante na disseminação, atuando como vetor (Gupta *et al.*, 2012).

Na prática clínica, o diagnóstico da doença diarreica é baseado em dados clínicos e epidemiológicos. Para a detecção do patógeno, emprega-se coprocultura

seguida por provas para identificação bioquímica-fisiológica do agente. Embora seja incomum, o antibiograma pode ser solicitado (Gouveia *et al.*, 2020; Nisa *et al.*; 2020). Geralmente a doença é autolimitada, mas em casos graves, quando não tratada, o paciente pode evoluir para óbito. São recomendados repouso e hidratação para reposição de fluídos e eletrólitos. A antibioticoterapia também pode ser empregada para os casos confirmados, a fim de se evitar complicações, sequelas, doenças recorrentes e transmissão secundária (Rangan, 2008; Gouveia *et al.*, 2020; Shad & Shad, 2021). A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconizou o uso de ciprofloxacina e fluoroquinolonas como drogas de escolha, mas evidências científicas demonstram os crescentes perfis de resistência a múltiplos fármacos antimicrobianos desenvolvidos por *Shigella* spp. (Gouveia *et al.*, 2020; Shad & Shad, 2021). Em 2017, a OMS incluiu *Shigella* na lista dos doze patógenos que requerem, com urgência, o desenvolvimento de novos fármacos (WHO, 2017; Duggan & Mostowy, 2018; Micoli *et al.*, 2022).

Nos últimos 60 anos, pesquisadores vêm desenvolvendo estratégias vacinais para combater a shigelose. São registrados treze candidatos vacinais, metade deles nas fases 1 ou 2 dos testes clínicos e um deles na fase 3. Essas medidas terapêuticas abordam o desenvolvimento de vacinas atenuadas, híbridas (com outros vetores vivos, por exemplo, *Escherichia coli*), glicoconjugadas e vacinas de subunidade (Gouveia *et al.*, 2020).

O uso de probióticos, como as linhagens *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei* DN-114 001 e *Saccharomyces boulardii*, tem demonstrado efeitos promissores na redução da gravidade e no período de duração da diarreia infecciosa aguda em crianças, principalmente naquelas de origem viral. Mas devido ao alto custo e a necessidade de dados mais robustos quanto à eficácia, a OMS não recomenda o uso para esse fim, principalmente em países menos desenvolvidos (Gouveia *et al.*, 2020).

## 1.2 BACTERIOCINAS

A descrição inicial de antagonismo bacteriano data de 1877, quando Pasteur e Joubert observaram que amostras de *Escherichia coli* eram capazes de inibir a multiplicação de *Bacillus anthracis*. Em meados de 1925, André Gratia demonstrou o antagonismo de uma linhagem de *E. coli* contra outras amostras da espécie, sendo

o primeiro pesquisador a relatar a produção de uma substância com atividade antibacteriana. O mesmo autor, em 1932, descreveu a natureza proteica da substância. Em 1946, o termo “colicina” foi proposto por Gratia e Fredericq para denominar proteínas com atividade antibacteriana produzida por membros da família *Enterobacteriaceae*. Com a descoberta de que a produção destas substâncias antagonistas não se restringia às enterobactérias, o emprego da denominação “bacteriocina” passou a ser utilizado (Konisky, 1978; Farias *et al.*, 1992; Daw & Falkiner, 1996; Nascimento *et al.*, 2008).

Bacteriocinas são substâncias complexas cuja fração proteica biologicamente ativa pode estar ou não complexada a lipídios e/ou carboidratos. São produzidas por inúmeras espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, exercem ação bacteriostática ou bactericida, são ativas principalmente contra bactérias filogeneticamente próximas à espécie produtora e podem ser ou não secretadas no meio extracelular. Embora sejam produzidas por diversas bactérias, as bacteriocinas sintetizadas pelas bactérias do ácido láctico, seguidas daquelas produzidas por Enterobactérias, em especial *E. coli* são as mais estudadas. Já aquelas originadas por archaeas, denominadas arqueocinas, são raramente relatadas (Konisky, 1978; Jack *et al.*, 1995; Daw & Falkiner, 1996; Smajs *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 2002; Padilla *et al.*, 2006; Cascales, 2007; Ellen *et al.*, 2011; Simons *et al.*, 2020; Soltani *et al.*, 2021).

Do ponto de vista ecológico, essas moléculas são importantes armas biológicas na conquista por determinado nicho ou também na proteção de determinado habitat. Levando em conta a posição do organismo produtor, a síntese de bacteriocinas pode facilitar a invasão de determinada bactéria em um dado local, em contrapartida, a produção dessas moléculas por membros de uma comunidade bacteriana pode impedir o estabelecimento de espécies invasoras (Riley & Gordon, 1999; Lenski & Riley, 2002; Micenková *et al.*, 2019).

Mas mesmo exercendo ação antagonista contra bactérias, essas moléculas não se enquadram dentro do grupo dos antibióticos clássicos por diferir em algumas características. Elas são produzidas pela maquinaria ribossomal, apresentam espectro de ação geralmente restrito às espécies filogeneticamente relacionadas à bactéria produtora e são ativas em concentrações nanomolares. Em contrapartida, os antibióticos clássicos são sintetizados por enzimas, apresentam um amplo espectro de ação e são ativos em concentrações mais elevadas, em

geral, micromolares (Jamaluddin *et al.*, 2017; Rebuffat, 2011a; Simons *et al.*, 2020; El-Gendy *et al.*; 2021).

### 1.2.1 BACTERIOCINAS SINTETIZADAS POR BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

5

Dentro do grupo de bactérias Gram-negativas as bacteriocinas sintetizadas por membros da família *Enterobacteriaceae* são as mais bem pesquisadas, em especial, aquelas produzidas por *E. coli*. (Rebuffat, 2011a). Essas substâncias são classificadas como microcinas que englobam as moléculas com massa molecular inferior a 10 kDa, colicinas e bacteriocinas tipo colicinas com massas moleculares superiores a 10 kDa (FIG. 1) (Simons *et al.*, 2020).

O termo colicina é empregado por alguns autores para as substâncias antagonistas sintetizadas por membros da família *Enterobacteriaceae* e bacteriocinas tipo colicinas para as moléculas produzidas pelos demais grupos de bactérias Gram-negativas (Cascales *et al.*, 2007; Riley, 2011; Rebuffat, 2011a; Dolejšová *et al.*, 2019). Entretanto, como mencionado, alguns autores utilizam a nomenclatura colicinas apenas para as substâncias produzidas por *E. coli* e bacteriocinas tipo colicinas para as demais espécies Gram-negativas (Hahn-Löbmann *et al.*, 2019; Simons *et al.*, 2020). Nesse trabalho optaremos pelo emprego do termo colicinas para as substâncias produzidas pelas enterobactérias.

20

#### 1.2.1.1 Microcinas

Proposto em 1976, por Asensio e colaboradores, o termo microcina define os peptídios e polipeptídios com ação antagonista contra bactérias filogeneticamente relacionadas à amostra produtora, que possuem massa molecular de até 10 kDa e que são produzidos por bactérias Gram-negativas, especialmente aquelas da família *Enterobacteriaceae* (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat, 2011a; Rebuffat, 2012; Kaur & Kaur, 2015; Kaur *et al.*, 2016).

25

Essas substâncias são divididas em duas classes. As alocadas na classe I sofrem modificações pós-traducionais com formação de tiazol e anéis azólicos e possuem massa molecular de até 5 kDa. Representantes dessa classe são microcinas B17, C7- C51, D93 e J25. As de classe II possuem massa molecular de 5 a 10 kDa e são redivididas em subclasse IIa, as quais são codificadas por

30

plasmídeos, não passam por modificações pós-traducionais, como a microcina 24, e apresentam ligação dissulfeto como as microcinas L e V. Já aquelas incluídas na subclasse IIb são codificadas por genes localizados no cromossomo, possuem a região C-terminal conservada e rica em serina, apresenta partes tipo sideroforos e são lineares. Nesta subclasse estão as microcinas E492, M, H47 e I47 (FIG. 1) (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat, 2011a; Severinov *et al.*, 2011; Vassiliadis *et al.*, 2011; Rebuffat, 2012; Etayash *et al.*, 2016; Kaur *et al.*, 2016; Garcia-Gutierrez *et al.*, 2018; Baquero *et al.*, 2019; Simons *et al.*, 2020; Darbandi *et al.*, 2022).

A biossíntese das microcinas é favorecida em condições de stress celular como carência de nutrientes e baixas concentrações de oxigênio. Características observadas na fase estacionária do crescimento bacteriano, quando são preferencialmente sintetizadas, com exceção das microcinas E492 e 24, que são produzidas na fase exponencial (Lagos *et al.*, 2009; Noriega, 2009; Simons *et al.*, 2020). São caracterizadas por serem resistentes a uma ampla faixa de pH e a algumas proteases, solúveis em solventes orgânicos, possuem caráter hidrofóbico, e não são induzidas pelo sistema SOS (Duquesne *et al.*, 2007; Corsini *et al.*, 2010; Kaur *et al.*, 2016). São ativas em diferentes temperaturas, mesmo as mais elevadas, como a microcina J25, que permanece ativa após ser autoclavada (Duquesne *et al.*, 2007; Severinov *et al.*, 2011).

Habitualmente, quatro genes estão envolvidos na biossíntese das microcinas, os quais estão localizados em plasmídeos ou em cromossomos, são eles: um gene estrutural, responsável pela produção do precursor da microcina; um gene para a produção de compostos de imunidade, que impede a atuação da microcina contra a célula produtora e dois genes que codificam o sistema de transporte, responsável por exportar a microcina para o meio extracelular. Outros genes também podem estar presentes, como no caso das microcinas de classe IIb, que sintetizam enzimas que levam a modificações pós-traducionais nas biomoléculas (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat, 2011b; Vassiliadis *et al.*, 2011).

Como dito, as microcinas apresentam um sistema de transporte para a molécula alcançar o meio extracelular. Não sendo a síntese da substância um evento letal para a célula produtora. O fato assemelha as microcinas a algumas bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas e também as diferem das colicinas. Essa característica permite a produção das microcinas de forma contínua, sem a perda da viabilidade celular (Severinov *et al.*, 2011).

Ao alcançar o meio extracelular as microcinas podem interagir com a célula sensível através das porinas OmpF e OmpC ou pela estratégia cavalo de troia. Para tanto a biomolécula interage com receptores específicos denominados sideroforos (FhuA, FepA, Cir e Fiu) que estão localizados na membrana externa e são  
 5 responsáveis pela aquisição de ferro pela célula (Rebuffat, 2012; Baquero *et al.*, 2019). No meio intracelular as microcinas atuam de forma específica. Como as microcinas de classe I: microcina B17 que inibe a DNA girase, microcina C7-C51 que impede a tradução proteica por bloquear a síntese de Asp-tRNA, e microcina J25 que inibe a RNA polimerase e atua na cadeia respiratória (Rebuffat, 2011a;  
 10 Rebuffat, 2012; Cotter *et al.*, 2013; Baquero *et al.*, 2019, Darbandi *et al.*, 2022).

Microcina de classe IIa, como a microcina V leva a formação de canais na membrana e a interrupção do potencial da membrana. As Microcinas de classe IIb, microcina H47, atua no canal de prótons da ATP sintetase, e a microcina E492 que induz a permeabilidade da membrana citoplasmática (Rebuffat, 2011a; Rebuffat,  
 15 2012; Cotter *et al.*, 2013; Baquero *et al.*, 2019; Darbandi *et al.*, 2022).

#### 1.2.1.2 Colicinas e bacteriocinas tipo colicinas

As colicinas e bacteriocinas tipo colicinas são substâncias com massa  
 20 molecular superior a 10 kDa, com ação bactericida ou bacteriostática e sensível a proteases. Esses dois grupos são muito semelhantes quanto à estrutura, função e tamanho, diferindo a bactéria produtora (FIG. 1) (Cascales *et al.*, 2007; Micenková *et al.*, 2019; Simons *et al.*, 2020).

Essas moléculas são codificadas por genes localizados em plasmídeos  
 25 enquanto poucas são codificadas por genes cromossomais (Yang *et al.*, 2014). O gene responsável pela síntese da colicina é induzido por fatores de stress como danos no DNA, escassez de nutrientes e baixas taxas de oxigênio. Ele está alocado em um óperon colicinogênico, o qual é composto por mais dois genes. Um gene que codifica a proteína de imunidade e protege a bactéria produtora do efeito letal da  
 30 colicina e o outro a proteína de lise que rompe a bactéria produtora liberando a substância antagonista no meio extracelular (Riley, 2009; Rebuffat, 2011a; Simons *et al.*, 2020).

Após a síntese e liberação, a colicina interage com receptores específicos localizados na parede celular da célula alvo. Habitualmente, esses

receptores são utilizados pela célula para a aquisição de nutrientes, tais como os receptores para sideróforo FhuA, FepA, Cir e Fiu, o receptor BtuB para vitamina B12, o receptor para nucleosídeo Tsx e os canais de porinas. Em seguida elas translocam a parede celular através dos sistemas Tol ou Ton que estão presentes na membrana interna e atuam pela promoção da energia necessária para o processo (Rebuffat, 2011a; Zamaroczy & Chauleau 2011; Braun & Patzer, 2013; Yang *et al.*, 2014; Schneider, *et al.*; 2018).

No interior da célula alvo, as colicinas e as bacteriocinas tipo colicinas atuam de forma específica. Assim, as colicinas E2, E7, E8 e E9 e as piocinas S1, S2 e S3 exercem função DNase; as colicinas E5 e D, a klebicina D e a piocina S4 agem como tRNases; as colicinas E3, E4 e E6, a cloacina DF13 e a klebicina C atuam como rRNases; as colicinas A, B, Ia, Ib, K, N, U, S4, E1, 5 e 10, as alveicinas A e B, a marcescina 28b e a piocina S5 levam a formação de poros; e a colicina M bloqueia a biossíntese de mureína (FIG. 1) (Rebuffat, 2011a; Braun & Patzer, 2013; Yang *et al.*, 2014; Kaur & Kaur, 2015; Darbandi *et al.*, 2022).

Essas moléculas antibacterianas são compostas por três domínios funcionais. A porção N-terminal atua na translocação da molécula pela parede celular e membrana citoplasmática, o domínio central reconhece o receptor localizado na superfície da bactéria sensível e a porção C-terminal é responsável por atuar de forma específica no alvo celular (Cascales *et al.*, 2007; Gillor *et al.*, 2009; Rebuffat, 2011b; Kaur & Kaur, 2015; Schneider, *et al.*; 2018).

#### 1.2.1.3 Aplicabilidade das bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram-negativas

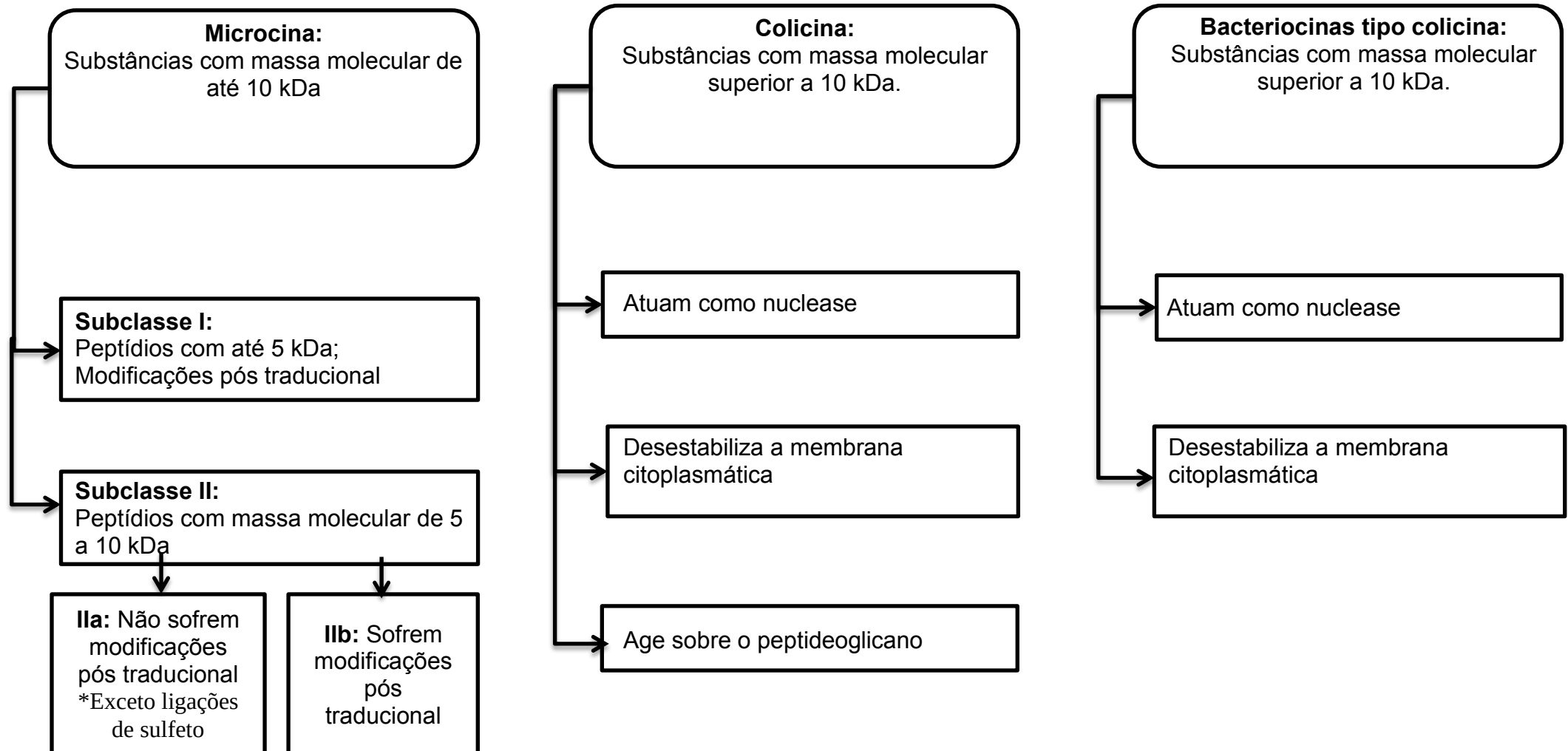
Assim como as bacteriocinas de bactérias Gram-positivas as bacteriocinas produzidas por espécies Gram-negativas despertam interesse pelos seus possíveis usos, embora em menor proporção se comparado ao primeiro grupo (Chikindas *et al.*, 2018). Essas substâncias demonstram potencial na agricultura, na indústria alimentícia e nas medicina humana e animal.

As colicinas produzidas por plantas transgênicas vêm ganhando destaque nesse seguimento. Elas receberam, por duas vezes, o *status* de GRAS (*Generally Recognized As Safe* - GRN 593 e GRN 676) pela FDA (*Food & Drug Administration*) dos Estados Unidos da América (EUA) pelo seu potencial uso como aditivo alimentar na conservação de frutas, verduras e produtos cárneos (Schneider *et al.*; 2018;

Hahn-Löbmann *et al.*, 2019). Isso porque a síntese dessas colicinas por plantas transgênicas são idênticas às sintetizadas pela bactéria produtora. Além disso, essas proteínas heterólogas são purificadas mais facilmente, não são contaminadas por exotoxinas e são expressas em maior quantidade, características favoráveis do ponto de vista industrial (Ghequire & Mot, 2018). Não diferente das colicinas, recentemente a salmocina sintetizada por plantas transgênicas também recebeu da FDA a autorização regulatória GRAS (código GRN 824) para o uso como aditivo alimentar no controle do patógeno *Salmonella enterica* em alimentos como carnes, aves, peixes e ovos. A FDA ressalta ainda que as bacteriocinas sintetizadas por plantas transgênicas sejam seguras para o uso em alimentos o que favorece a produção industrial (FDA, 2019).

A colonização por *S. enterica* Typhimurium em frangos adultos foi reduzida após a administração da colicina 24 (Gillor *et al.*, 2009; Rebuffat, 2011b). As colicinas Ib, E1 e microcina C7, derivadas da cepa de *E. coli* H22, foram ativas contra as bactérias patogênicas e não patogênicas, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia* (Zimina *et al.*, 2020). *E. coli* G3/10, uma das seis linhagens presentes no probiótico Simbioflor 2, produz a microcina S, que é capaz de impedir a aderência de *E.coli* enteropatogênica nas células epiteliais (Cotter *et al.*, 2013). As colicinas A, E1, E3 e a microcina E492 apresentaram ação contra células cancerígenas (Kaur & Kaur, 2015).

Figura 1. Divisão das bacteriocinas sintetizadas por espécies Gram-negativas.

**Bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativas**

### 1.2.2 BACTERIOCINAS SINTETIZADAS POR BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS

5 Produzido pela maioria das espécies, as bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram-positivas são substâncias codificadas por genes localizados preferencialmente em plasmídeos. Elas variam em relação ao tamanho, composição dos resíduos de aminoácidos, estrutura e são agrupadas em quatro classes. A Classe I é composta por lantibióticos, a classe II também é denominada não lantibióticos, a classe III são substâncias sensíveis ao calor e a classe IV são as bacteriocinas que apresentam uma porção lipídica ou com carboidrato associado  
10 (Riley & Wertz, 2002; Balciunas *et al.*, 2013; Prudêncio *et al.*, 2015; Hassan *et al.*, 2020; Simons *et al.*, 2020).

### 1.2.3 RESISTÊNCIA ÀS BACTERIOCINAS

15 As bacteriocinas apresentam potencial biotecnológico favorável para aplicação nas mais diversas áreas. E para que essas moléculas sejam utilizadas é necessária à avaliação dos mais variados parâmetros, como o desenvolvimento da resistência bacteriana com o uso prolongado da substância (Cotter *et al.*, 2013; Bastos *et al.*, 2015; Soltani *et al.*, 2021).

20 Os estudos demostram o surgimento de amostras resistentes às bacteriocinas, que são divididos em dois grupos: resistência adquirida, caracterizada pelo desenvolvimento de resistência em amostras bacterianas que eram anteriormente suscetíveis, e resistência inata, que é designada para a resistência encontrada de forma intrínseca em gêneros ou espécies específicas (Collins *et al.*,  
25 2012). E ambos os grupos são encontrados nas diversas classes de bacteriocinas, tanto para aquelas produzidas por bactérias Gram-positivas quanto as sintetizadas por bactérias Gram-negativas. Como exemplo podemos mencionar alguns mecanismos, quais sejam: ação de bombas de efluxo que podem bombear algumas microcinas para o meio extracelular, impedindo que essas moléculas atuem no alvo  
30 microbiano. O desenvolvimento de uma série de mutações no receptor para sideróforos, FhuA, que é utilizado como porta de entrada pelas bacteriocinas. Essas mutações, localizadas principalmente nas alças externas do receptor podem induzir a resistência contra a microcina J25 e colicina M (Wang *et al.*, 2018; Telhig *et al.*,

2020). O desenvolvimento de mutações nos receptores catecolato de ferro FepA, Fiu e Cir dependentes de TonB que impede a absorção e atuação das microcinas MccE492, MccM e MccH47 nas células alvo (Vassiliadis *et al.*, 2010). A secreção de gelatinase por amostras de *Enterococcus faecalis* que levam a degradação e  
 5 inativação de bacteriocinas semelhantes à pediocina (Sedgley *et al.*, 2009).

### 1.3 PEPTÍDIOS ANTIMICROBIANOS

O perfil de resistência à antibióticos é uma preocupação crescente dos órgãos  
 10 de saúde públicas mundiais. Estima-se que até 2050 a população mundial sofrerá grandes impactos na economia e na saúde, podendo chegar à marca de 10 milhões de óbitos por ano, devido ao amplo surgimento de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos (O'Neill, 2016; Mwangi *et al.*, 2019; Rima *et al.*, 2021; Saggese *et al.*, 2022).

15 Diante dessa perspectiva, diversos pesquisadores no mundo todo buscam alternativas para solucionar essa crise já anunciada. Ferramentas poderosas no estudo e desenvolvimento desses novos fármacos vêm da observação e pesquisa de substâncias ativas produzidas pelos mais diversos organismos e que são utilizadas como mecanismos de defesa contra patógenos, e algumas estão  
 20 envolvidas na ativação das vias do complemento e são capazes de modular a resposta imune (Ramos-Martin *et al.*, 2019; Browne *et al.*, 2020; Saggese *et al.*, 2022).

Na busca por essas descobertas, os peptídios antimicrobianos, probióticos, vacinas e terapias utilizando fagos vêm se mostrando candidatos promissores no  
 25 desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Rima *et al.*, 2021; Saggese *et al.*, 2022).

Em particular, os peptídios antimicrobianos (AMPs) têm ganhado grande atenção devido à sua extraordinária variedade de atividade inibitória, inclusive contra as superbactérias. Essas moléculas já foram isoladas das mais variadas fontes  
 30 biológicas, apresentam características distintas, e, atualmente há mais de 3.000 AMPs depositados em bancos de dados específicos no assunto (Ramos-Martin *et al.*, 2019; Saggese *et al.*, 2022).

Com a vasta quantidade e diversidade de moléculas depositadas, é plausível

supor que os estudos dessas substâncias ativas não são datados recentemente. Um dos primeiros relatos ocorreu em 1925, por Gratia, que analisou a ação inibitória da microcina V (Gillor *et al.*, 2009). O achado de Fleming, 1928, que isolou uma substância antagonista, conhecida como penicilina, de uma amostra de *Penicillium chrysogenum* (Bahar & Ren, 2013; Phoenix *et al.*, 2013). A descoberta, em 1942, de um peptídeo antibacteriano, hoje chamado purotionina, isolado do endosperma de trigo (*Triticum aestivum*) com ação antagonista contra fitopatógenos. Nos anos seguintes, inícios da década de 1960 surgem os primeiros relatos de bactérias multiresistentes, e com a notícia, o declínio da chamada 'Idade de ouro dos antibióticos e surgimento mais acentuado de linhas de pesquisas sobre os AMPs (Phoenix *et al.*, 2013).

### 1.3.1 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS PEPTÍDIOS ANTIMICROBIANOS

Sintetizados pelos mais diversos filós, os peptídeos bioativos podem ser utilizados por vários organismos como linha de defesa contra micro-organismos patogênicos, além de exercerem uma importante função na atividade imunomodulatória, atuando como citocinas nos sítios de infecção e nos receptores de sinalização (Brown & Hancock, 2006).

Essas moléculas são ativas em concentrações nanomolares e amplamente diversificadas em relação ao tamanho, sequência de aminoácidos, estrutura e origem. Habitualmente elas apresentam quatro importantes características funcionais: são substâncias com até 100 aminoácidos, na maioria das vezes catiônicas, com resíduos hidrofóbicos e estrutura global anfifílica (Pasupuleti *et al.*, 2012; Mwangi *et al.*, 2019).

Essa conformação confere aos peptídeos antimicrobianos (AMPs) vantagens na atuação contra a bactéria invasora, por se ligar, na maioria das vezes, de forma eletrostática à superfície celular que apresenta estruturas carregadas de forma negativa, como o grupo fosfato dos lipopolissacarídeos, encontrados nas bactérias Gram-negativas, ou o ácido teicóico presente nas bactérias Gram-positivas. Além de contar com a ação dos resíduos hidrofóbicos que interagem com a bicamada lipídica. Após atravessarem a parede celular eles estão aptos para atuarem contra o alvo bacteriano que podem ser a membrana citoplasmática, a síntese proteica, a

transcrição e replicação do DNA e a inativação de enzimas essenciais para a sobrevivência celular (Brogden, 2005; Jenssen *et al.*; 2006, Bahar & Ren, 2013; Seo *et al.*, 2017; Jeżowska-Bojczuk & Stokowa-Sołtys, 2018; Mwangi *et al.*, 2019; Ramos-Martin *et al.*, 2019).

5           Dado exemplo, os AMPs permeabilizantes de membrana são capazes de formar poros transitórios na membrana, como a defensina, melitina, magaininas e LL-37. Já aqueles que apresentam ação contra os alvos intracelulares essenciais para a sobrevivência da célula são capazes de translocar a membrana sem permeabilizá-la como abuforina II, dermaseptina, HNP-1, pleurocidina, indolicidina,  
10   pirrocidina e mersacidina (Pushpanathan *et al.*, 2013).

## 2 JUSTIFICATIVA

Visto a importância da doença diarreica aguda, de *Shigella* como agente diarreiogênico, do gênero ser considerado pela OMS como um micro-organismo que precisa, com urgência, do desenvolvimento de novos medicamentos, de *Shigella sonnei* ser a principal bactéria do gênero isolada de pacientes em Belo Horizonte, da capacidade do gênero em produzir substâncias antagonistas, do papel que essas moléculas desempenham nas relações ecológicas e, em especial, da aplicabilidade dessas substâncias em diversas áreas, como saúde humana e animal, realizamos esse estudo que visou o cultivo e purificação de substâncias antagonistas produzidas por *S. sonnei* e a síntese de peptídios ativos contra *Shigella* spp. e *Escherichia coli* que podem, no futuro, serem aplicados no desenvolvimento de um novo produto biotecnológico.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- 5            Extrair e purificar substâncias antagonistas produzidas por *Shigella sonnei* isolada de espécime fecal de criança com shigelose, com base nessas moléculas sintetizar e caracterizar os peptídios ativos contra *Shigella* spp. e *Escherichia coli*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

10

- Cultivar e obter os extratos intracelulares (EI-15 e EI-30) da amostra de *S. sonnei* produtora de substâncias antagonistas.

- Avaliar a ação antagonista e titular os extratos EI-15 e EI-30.

15

- Purificar substâncias antagonistas produzidas por *S. sonnei*

- Produzir peptídios sintéticos ativos com base na sequência primária obtida.

20

- Avaliar a ação antagonista dos peptídios sintéticos contra um painel bacteriano composto por *Shigella* spp. e *E. coli*.

- Avaliar parâmetros físico-químicos dos peptídios sintéticos.

25

30

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

Para o estudo, foram selecionadas duas amostras de *Shigella sonnei*. A amostra SS9, produtora de substâncias antagonistas, e SS12, reveladora da atividade antagonista (Souza *et al.*, 2013; Moreira, 2018). Estas amostras estão cadastradas no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) com número A6F4062. Elas foram isoladas durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado “Etiologia da diarreia infecciosa aguda em Belo Horizonte/MG e em Teresina/PI: Estudo clínico e laboratorial”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP com o Parecer número ETIC 047/03.

Para a avaliação do espectro de ação foi empregado um painel com 22 amostras bacterianas pertencentes à microbiota indígena e enteropatógenos. Todas as amostras utilizadas fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG), e são mantidas em Brucella Broth<sup>1</sup> contendo 10% de glicerol e mantidas em freezer -80°C (Moreira, 2014).

### 4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS INTRACELULARES EI-15 e EI-30

Após o terceiro dia de repique sucessivo, a amostra *S. sonnei* SS9 foi inoculada em triplicata, em 20 mL de *Tryptic Soy Broth*<sup>2</sup> (TSB) e incubada em aerobiose, a 37°C, por 24 h. Todo o volume foi vertido, em triplicata, em 580 mL de TSB e incubado nas mesmas condições, por 12 h. O material foi centrifugado a 16.200 x g, por 30 min, a 4°C, o sedimento, por três vezes, foi lavado com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, ressuspendido no mesmo tampão e sonificado a 50 W, por 12 ciclos de 1 min, com intervalos de 30 s, em banho de gelo. A lise celular foi avaliada por microscopia óptica. O material foi centrifugado nas mesmas condições e o volume de 65 mL de sobrenadante obtido foi mantido em banho de

---

<sup>1</sup> BBL, Sparks, MD, EUA

<sup>2</sup> Difco, Sparks, MD, EUA

gelo e tratado com sulfato de amônio<sup>3</sup> na concentração de 15% p/v. O sulfato de amônio foi então adicionado lentamente sobre o sobrenadante em agitação constante e lenta. Em seguida foi colocado em repouso a 4°C por 24 horas. A amostra foi centrifugada a 29.830 x g, por 30 min, a 4°C e o precipitado obtido  
5 ressuspenso em 4 mL do mesmo tampão, este material obtido foi denominado EI-15, e o sobrenadante foi novamente tratado com sulfato de amônio na concentração de 30% p/v seguindo os mesmos procedimentos acima para o EI-15, sendo esse último denominado EI-30 (Farias *et al.*, 1994; Sousa *et al.*, 2013; Moreira, 2018).

#### 10 4.2.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA

A avaliação da atividade antagonista dos extratos EI-15 e EI-30 foram realizadas pelo método de sobrecamada. Para o ensaio, 10 µL das amostras foram gotejados sobre o meio de cultura *Tryptic Soy Broth*<sup>4</sup> (TSA). Os possíveis  
15 contaminantes presentes nas amostras foram eliminados pelo vapor de clorofórmio<sup>5</sup> proporcionado por 500 µL de clorofórmio adicionado no interior da tampa da placa que foi mantida invertida por 30 min. A placa foi mantida entreaberta, por igual período, em ambiente estéril, para a evaporação do vapor de clorofórmio. O meio foi recoberto com 3,5 mL de TSA semissólido (TSB + 0,7% de ágar<sup>6</sup>) acrescido de 10  
20 µL da amostra reveladora *S. sonnei* SS12. A placa foi incubada em aerobiose, 37°C, por 24 h. A leitura do ensaio foi realizada pela observação da presença ou ausência do halo de inibição (Farias *et al.*, 1992; Farias *et al.*, 1994).

#### 4.2.2 TITULAÇÃO

25

Para a titulação foram empregadas diluições seriadas de EI-15 e EI-30 em água ultrapura e 10 µL de cada diluição foram depositadas sobre camada de TSA. Após a secagem das gotas foi realizado o ensaio de sobrecamada (4.2.1). Para a determinação do título é considerado a recíproca da maior diluição que  
30 resulta em um halo límpido de inibição da amostra reveladora. Em seguida, a

---

<sup>3</sup> Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil.

<sup>4</sup> Difco, Sparks, MD, EUA.

<sup>5</sup> Synth, Diadema, SP, Brasil.

<sup>6</sup> Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil.

atividade antibacteriana foi calculada e expressa em unidades arbitrárias (UA). mL<sup>-1</sup>, empregando-se a fórmula “UA = título x 1000 µL/v(µL)”, sendo v o volume do extrato utilizado no ensaio (Farias *et al.*, 1994; Batdorj *et al.*, 2006).

## 5 4.3 PURIFICAÇÕES POR PROCESSOS CROMATOGRÁFICOS

### 4.3.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA I

Um volume de 2 mL do extrato EI-15, filtrado a 0,22 µm<sup>7</sup>, foi cromatografado em coluna de troca iônica, Poros II Q/P (4,6 mm / 50 mm)<sup>8</sup>, trocadora aniônica, tendo como funcionalidade de superfície amina quaternária, acoplada ao sistema *Fast Protein Liquid Chromatography*<sup>9</sup> (FPLC). Para lavagem e equilíbrio da coluna, utilizou-se como perfil de eluição uma fase móvel que foi o tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0 (A) e o mesmo tampão acrescido de NaCl<sup>10</sup> 1 M (B), com fluxo de 60 mL.h<sup>-1</sup>. A amostra foi eluída usando-se um gradiente linear de 0-100% em 60 minutos. A corrida foi monitorada a uma absorbância de 280 nm, em temperatura de aproximadamente, 25°C. Frações de 1,5 mL foram coletadas, seguido de congelamento em nitrogênio líquido e levadas para liofilização que é uma técnica de secagem de materiais sem a necessidade de aquecimento. Sendo o princípio físico da liofilização a sublimação, que é a passagem direta do estado sólido para o gasoso, sem a passagem pelo estado líquido (Everse & Stolzenbach, 1971). As amostras liofilizadas foram solubilizadas em água ultrapura e testadas para avaliação de atividade antagonista, (4.2.1), (Farias *et al.*, 1994; Souza *et al.*, 2013; Moreira, 2018).

### 4.3.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA I

Um *pool* originado das frações ativas 25 a 35, de duas corridas, oriundas da cromatografia (4.3.1), foi dialisado em membrana de 1 kDa<sup>11</sup> e liofilizado. O *pool* foi

<sup>7</sup> Millex, Bedford, MA, EUA

<sup>8</sup> PerSeptive Biosystems, Cambridge, MA, EUA

<sup>9</sup> Pharmacia Biotech, Uppsala, Uppland, Suécia.

<sup>10</sup> Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>11</sup> Viskase, Darien, IL, EUA.

cromatografado em coluna de fase reversa Microsorb-MV<sup>TM</sup> C18 (4,6 mm x 250 mm 5  $\mu$ m)<sup>12</sup> acoplada ao sistema *High Performance Liquid Chromatography*<sup>13</sup> (HPLC). A coluna foi lavada com solução B [acetonitrila<sup>14</sup> 80% v/v acrescida de ácido trifluoracético (TFA)<sup>15</sup> 0,1%] e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água ultrapura). As frações foram eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60 mL.h<sup>-1</sup>, utilizando-se como perfil de eluição um gradiente linear de 0 a 100%, acompanhando o seguinte programa: 0-10 min, 100% da solução A; 10-40 min, 0-100% da solução B e 40-50 min, 100% da solução B. A corrida foi monitorada em absorvância de 220 e 280 nm, com temperatura aproximadamente de 25°C. As frações foram coletadas em volume de 1 mL, em seguida congeladas e liofilizadas, solubilizadas em 20  $\mu$ L de água ultrapura e submetidas ao ensaio de atividade antagonista (4.2.1). As frações ativas foram avaliadas por espectrometria de massas (4.4) (Sousa *et al.*, 2013; Moreira, 2018).

#### 4.3.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA II

Um volume de 6 mL do extrato EI-30, filtrados a 0,22  $\mu$ m, foi cromatografado em coluna de troca iônica, Resource<sup>TM</sup>-Q (6,4mm Ø x 30 mm)<sup>16</sup>, trocadora aniônica, de fase ligada com amônio quaternário, acoplada ao sistema FPLC. Para lavagem e equilíbrio da coluna a fase móvel também usada foi o tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0 (A) e o mesmo tampão acrescido de NaCl 1M (B), com fluxo de 60 mL.h<sup>-1</sup>. A amostra foi eluída usando-se gradiente linear de 0-100% em 120 minutos. Sendo monitorada a uma absorvância de 280 nm, em temperatura de aproximadamente 25°C. Frações de 1,5 mL foram coletadas, congeladas e liofilizadas, em seguida solubilizadas em água ultrapura e testadas para avaliação de atividade antagonista (4.2.1).

<sup>12</sup> Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA.

<sup>13</sup> Shimadzu Corporation, Nakagyo-ku, Kyoto, Japão

<sup>14</sup> Merck, Darmstadt, Alemanha.

<sup>15</sup> Sigma-Aldrich

<sup>16</sup> Merck

#### 4.3.4 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA II

Um *pool* com volume de 270  $\mu\text{L}$ , das frações ativas 1 a 14, provenientes da cromatografia (4.3.3) foi cromatografado em coluna Sephasil<sup>TM</sup> Peptide C18 (5 $\mu$  ST 4,6/250 mm)<sup>17</sup>, acoplada ao sistema HPLC. A coluna foi lavada com solução B (acetonitrila 100% v/v acrescida de TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água ultrapura). As frações foram eluídas com as soluções A e B, mantendo-se um fluxo de 60 mL.h<sup>-1</sup>, utilizando um gradiente linear de 0 a 100%, seguindo o seguinte programa: 0-10 min, 100% da solução A; 10-70 min, 0-100% da solução B e 70-80 min, 100% da solução B. A corrida foi monitorada em absorbância de 220 e 280 nm, com temperatura do forno para a coluna de 42°C e temperatura da sala de 32°C. Foram coletadas frações de 1,0 mL, em seguida congeladas e liofilizadas, solubilizadas em 20  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e submetidas ao ensaio de atividade antagonista (4.2.1). As frações ativas foram avaliadas por espectrometria de massas, item 4.4.

#### 4.3.5 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA III

Outras metodologias também foram aplicadas com o objetivo de aperfeiçoar a purificação da(s) substância(s) antagonista. Para tanto, o extrato EI-30 filtrado a 0,22  $\mu\text{m}$ , foi submetido e separado das moléculas pelo tamanho da massa molecular utilizando dispositivo Amicon Ult<sup>18</sup>. Um volume de 14 mL de EI-30 dispensado em Amicon com membrana regenerada de 10 kDa, foi centrifugado a 3.000 g, 4°C, por 40 min. As substâncias filtradas, com massas moleculares inferiores a 10 kDa, foram depositadas em outro dispositivo Amicon contendo membrana regenerada de 5 kDa e submetidas à centrifugação 3.000 g, 4°C, por 1 h. Uma aliquota de 400  $\mu\text{L}$  das moléculas com massas moleculares entre 5 a 10 kDa foram cromatografadas em coluna Luna 5  $\mu$  C18 (100Å 250 x 10 mm)<sup>19</sup>, ligada em sua extremidade de entrada um filtro Supelco<sup>20</sup>, conectada ao sistema HPLC. As frações foram eluídas perfazendo o seguinte programa: Fluxo de 1,5 mL.min<sup>-1</sup>; 30 min na fase A (TFA

<sup>17</sup> Life Technologies, Foster City, CA, EUA

<sup>18</sup> Millipore, Bilerica, MA, USA.

<sup>19</sup> Phenomenex, Torrance, CA, EUA.

<sup>20</sup> Sigma-Aldrich

0,1%); 120 min de 0 a 100% da fase B (Acn 100% + TFA 0,1%); 10 min na fase B; 1 min para o retorno para a fase A e 10 min da fase A para o reequilíbrio. A leitura foi monitorada em 220 e 280 nm, em temperatura controlada de 39,2°C para o forno, onde se encontrava a coluna, e de 24,7°C para a sala do evento. A pressão inicial da  
5 corrida foi de 42 Kgf/cm<sup>2</sup>. As frações coletadas foram liofilizadas, ressuspendidas em água ultrapura e avaliadas em relação à ação antagonista (item 4.2.1). As frações ativas e com perfil cromatográfico favorável foram analisadas por espectrometria de massas, item 4.4 (Moreira, 2018).

#### 10 4.3.6 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE EXCLUSÃO MOLECULAR SUPERDEX™ 30

Um volume de 4 mL do extrato intracelular EI-30 foi cromatografado em coluna de exclusão molecular HR 16/60 Superdex™ 30<sup>21</sup> acoplada ao sistema FPLC. Para o equilíbrio da coluna e corrida da amostra foi utilizado, como fase  
15 móvel, tampão Tris-HCl 0,02M, pH 8,0, fluxo de 60 mL.h<sup>-1</sup>. A corrida cromatográfica foi monitorada a uma absorbância de 280 nm em temperatura de 25°C. As frações foram coletadas em volume de 2 mL, liofilizadas, solubilizadas em água ultrapura, avaliadas em relação à ação antagonista (4.2.1). Frações ativas e com o perfil cromatográfico favorável foram analisadas por espectrometria de massas (4.4)  
20 (Farias *et al.*, 1994; Sousa *et al.*, 2013; Moreira, 2018).

#### 4.3.7 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE EXCLUSÃO MOLECULAR SUPERDEX™ 75

Um *pool* de 2 mL composto pelos somatórios das frações de número 5 a 14  
25 referentes à cromatografia (4.3.6.), foi cromatografado em coluna de exclusão molecular HR 16/60 Superdex™ 75<sup>22</sup>, acoplada ao sistema FPLC. A resina possui faixa de exclusão de 3 kDa a 70 kDa, ideal para o fracionamento de substâncias com essas massas moleculares. O protocolo para essa corrida cromatográfica foi idêntico ao descrito anteriormente (4.3.6). As frações 15 a 42 e 67 dessa cromatografia foram  
30 encaminhadas para análise por espectrometria de massas (4.4).

---

<sup>21</sup> Sigma-Aldrich

<sup>22</sup> Sigma-Aldrich

#### 4.4 ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Frações ativas obtidas das cromatografias selecionadas foram acrescentadas às matrizes de  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico<sup>23</sup> ( $\alpha$ -ciano), ácido sinapínico<sup>24</sup> e 2,5-dihidroxibenzóico<sup>25</sup> (DHB) na proporção de 1:1. Um volume de 1  $\mu$ L/spot foi depositado em placa de aquisição de dados do MALDI (MTP AnchorChips 400 X 384)<sup>26</sup>, a qual foi mantida à temperatura ambiente até a secagem das amostras. A placa foi analisada por espectrometria de massas em equipamento modelo Autoflex<sup>®</sup> III MALDI- TOF/TOF<sup>27</sup>, o aparelho é equipado com *Laser Smart beam*<sup>®</sup> operado no modo linear positivo e controlado pelo *software Flex Control* como calibrante linear foram empregados *Peptide Calibration Standard mono*, *Protein 1 Calibration Standard* e *Protein Calibration Standard II*<sup>28</sup> e, para a análise dos dados, foi utilizado o programa *Flex Analysis*<sup>29</sup>. O equipamento pertence à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Laboratório Institucional de Pesquisa (LIPq), Centro de Laboratórios Multiusuários (CELAM), Laboratório Multiusuários de Proteômica – LMProt.

As substâncias purificadas e selecionadas foram reduzidas, alquiladas e acetiladas ou tripsinolisadas. Para tanto, até 50  $\mu$ g da substância proteica foi solubilizada em 20  $\mu$ L de uma solução contendo bicarbonato de amônio<sup>30</sup> 0,4 M e uréia<sup>31</sup> 8 M. Após a solubilização foi acrescido à amostra 5  $\mu$ L de ditioneína<sup>32</sup> (DTT) 50 mM, seguido de incubação a 37°C por 3 h, adição de 5  $\mu$ L de iodoacetamida<sup>33</sup> 150 mM, incubação a 25°C, protegido da luz, por 15 min, adição 3  $\mu$ L de ditioneína 50 mM e incubação a 25°C protegido da luz por 15 min. Após esse período foi acrescido ao tubo 127  $\mu$ L de água ultrapura, tripsina<sup>34</sup> na proporção de 1/50 (

---

<sup>23</sup> Sigma-Aldrich

<sup>24</sup> Sigma-Aldrich

<sup>25</sup> Sigma-Aldrich

<sup>26</sup> Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA

<sup>27</sup> Bruker Daltonics

<sup>28</sup> Bruker Daltonics

<sup>29</sup> Bruker Daltonics

<sup>30</sup> Synth, Diadema, SP, Brasil

<sup>31</sup> USB, Cleveland, OH, EUA

<sup>32</sup> Sigma

<sup>33</sup> Sigma

<sup>34</sup> Promega, Madison, WI, EUA

enzima/substrato) e incubação por 1 h, a 50°C. A reação foi interrompida pelo acréscimo de 1,7 µL de ácido trifluoracético 100% e os reagentes foram removidos pelo tratamento em zip-tip (ponteira de pipeta Zip Tip com resina C-18 para desalinização e concentração de peptídios e proteínas), seguido de eluição dos peptídios com 20 µL de TFA 0,1% e acetonitrila 70%. As amostras foram secas em concentrador a vácuo (Villénl & Gygi, 2008; Oliveira, 2013; Moreira, 2014; Moreira, 2018; Chandra, *et al.*, 2020).

Em seguida, elas foram fragmentadas no modo *lift*, sequenciadas no mesmo espectrômetro de massas, e, então, analisadas na web software BLAST, subaplicação Protein BLAST ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)), para verificação da similaridade com outras proteínas. A partir das sequências obtidas foram produzidos peptídios sintéticos solúveis.

#### 4.5 SÍNTESES DE PEPTÍDIOS SOLÚVEIS

De forma simplificada, a síntese química de peptídios pode ser entendida como uma sequência linear promovida por repetições de ligações peptídicas entre a porção amina de um aminoácido e a porção carboxila do aminoácido adjacente (Marchetto, 2006).

Os peptídios solúveis foram produzidos no ResPep SL sintetizador automatizado<sup>35</sup>, segundo o método de síntese em fase sólida através da estratégia F-moc (Hirata *et al.*, 1994), pertencente ao Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos - LIGP, professor responsável Ricardo Toshio Fujiwara, em uma escala de 5 µmol. Para a síntese foi utilizada uma solução 1:1 de Oxyma Pure<sup>36</sup> e dissopropilcarbodiimida<sup>37</sup> o que permitiu a ativação dos aminoácidos. Os aminoácidos ativados foram acoplados às resinas TentaGel<sup>38</sup> ou H-Rink Amide ChemMatrix<sup>39</sup>. Para a síntese completa dos peptídios, foi realizada a desproteção da região Fmoc utilizando uma solução de 4-Methylpiperidine<sup>40</sup> 25% [25% v/v em

<sup>35</sup> Intavis Bioanalytical Instruments AG, Ehrenfeld, Koln, Alemanha

<sup>36</sup> Merck

<sup>37</sup> Sigma-Aldrich, Aldrich, Milwaukee, WI, EUA

<sup>38</sup> Intavis Bioanalytical Instruments AG, Ehrenfeld, Koln, Alemanha

<sup>39</sup> Sigma-Aldrich

<sup>40</sup> Sigma-Aldrich

Dimetilformamida (DMF)<sup>41</sup>]. Os peptídios foram desacoplados da resina pela adição de uma solução de ácido trifluoracético: água: triispropilsilano<sup>42</sup>: β-mercaptoethanol<sup>43</sup> (92,5: 2,5: 2,5: 2,5%), sob agitação por 3 h, seguido de precipitação com solução fria de metil terc butil<sup>44</sup> e então liofilizados. A análise do  
 5 ensaio foi realizada pela verificação da proporção massa/carga de cada peptídio utilizando o equipamento Autoflex<sup>®</sup> III MALDI- TOF/TOF.

#### 4.5.1 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DOS PEPTÍDIOS SOLÚVEIS

10 Os peptídios sintéticos liofilizados foram ressuspensos para análise inicial e confirmação da síntese, um volume de 0,5 µL de cada peptídio foi acrescido de uma matriz saturada de (10 mg / mL α-ciano-4-hidroxicinâmico<sup>45</sup> e 50% de acetonitrila /0,1% de ácido trifluoroacético), para um volume final de 30 µL. As amostras foram depositadas em placa MTP (AnchorChip<sup>™</sup> 600/384)<sup>46</sup>. Após a secagem do material,  
 15 em temperatura de 25°C, a placa foi introduzida no espectrômetro de massas Autoflex<sup>®</sup> III MALDI-TOF/TOF. Os dados brutos foram obtidos utilizando o modo positivo/refletor controlado através do *software Flex Control*<sup>™</sup> 3.3. Cada espectro gerado foi obtido pelo acúmulo de dados através dos disparos consecutivos de laser. Para a calibração do equipamento foi utilizado peptídios padrão de referência<sup>47</sup> (4.4).  
 20 Os peptídios sintéticos solúveis foram analisados pela ação antagonista contra *S. Sonnei* SS12, item 4.2.1.

#### 4.6 ESPECTRO DE AÇÃO DOS PEPTÍDIOS SINTÉTICOS

25 Os peptídios sintéticos que se mostraram ativos com base na ação antagonista contra a amostra reveladora SS12 e na quantidade de peptídios disponíveis para o ensaio, foram selecionados para serem confrontados contra um painel de 22 isolados bacterianos, distribuídos entre *Shigella* spp. e *E. coli*. Essas

---

<sup>41</sup> Sigma-Aldrich

<sup>42</sup> Sigma-Aldrich

<sup>43</sup> Sigma-Aldrich

<sup>44</sup> Sigma-Aldrich

<sup>45</sup> Sigma-Aldrich

<sup>46</sup> Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA

<sup>47</sup> Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA

amostras bacterianas pertencem ao Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios e foram previamente escolhidas por se mostrarem sensíveis à amostra produtora SS9 (Moreira, 2014).

5 As amostras bacterianas foram submetidas a três repiques, em dias consecutivos, empregando-se meio de cultura TSA. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas, em aerobiose. Após o terceiro dia, as amostras foram inoculadas em salina 0,9% e ajustadas em escala de McFarland 0,5. Com auxílio de *swab*, as amostras foram semeadas em meio de cultura TSA e sobre a semeadura foram dispensados 10 µl de cada peptídio sintético. Como controle negativo foi gotejado 10  
10 µl da solução [dimetilsulfóxido (DMSO) 25% / acetonitrila 10%], solvente utilizado para solubilizar os peptídios, e 10 µl do extrato EI-30, como controle positivo. As placas foram incubadas nas mesmas condições descritas acima e o resultado foi avaliado pela observação da presença/ausência de halo de inibição.

#### 15 4.7 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DOS PEPTÍDIOS SOLÚVEIS

Com base na sequência primária dos peptídios solúveis, foi realizada análise físico-química das amostras em *software* ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

20 No estudo foram investigados os seguintes parâmetros: número de resíduos de aminoácidos por peptídio, massa molecular (MM), ponto isoelétrico teórico, número total de resíduos com carga (-) (Asp+Glu), número total de resíduos com carga (+) (Arg+Lys), N-terminal da sequência e média geral de hidrofobicidade (GRAVY).

25

30

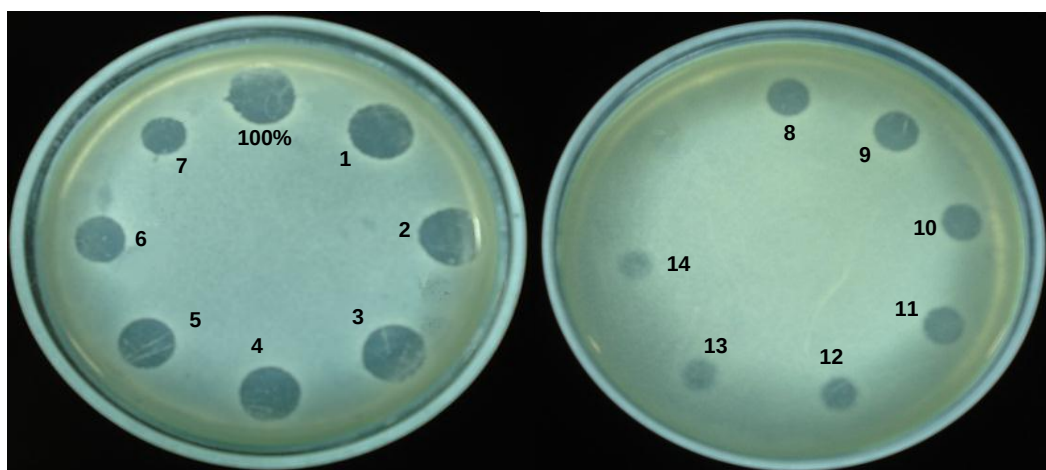
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA E TITULAÇÃO DOS EXTRATOS INTRACELULARES

Os extratos intracelulares EI-15 e EI-30, proveniente da amostra produtora de substância antagonista SS9, são ativos contra a amostra reveladora *S. sonnei* SS12. E-15 e E-30 também foram avaliados em relação à titulação contra SS12. O título antagonista de EI-15 foi de  $5,1 \times 10^4$  UA/mL, já EI-30 foi de  $1,6 \times 10^6$  UA/mL (FIG.2).

Os dados demonstram que os extratos permanecem ativos após diluição. Esses achados são relevantes uma vez que a escolha das frações é pautada no perfil cromatográfico e no poder antagonista. Portanto, mesmo que EI-15 tenha apresentado título antagonista inferior ao EI-30 esses dados são promissores para a obtenção de substâncias purificadas por processos cromatográficos. Os resultados

Figura 2. Atividade antagonista e titulação do extrato intracelular EI-30.



EI 30 - extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 30% de sulfato de amônio. Em 100%, halo de inibição de EI-30 – ensaio de atividade antagonista; em 1 a 14, halos de inibição produzidos no ensaio de titulação da ação antagonista do extrato EI-30, título antagonista de  $1,6 \times 10^6$  UA/mL. *S. sonnei* SS12 foi utilizada como amostra reveladora.

## 5.2 PURIFICAÇÕES POR PROCESSOS CROMATOGRÁFICOS

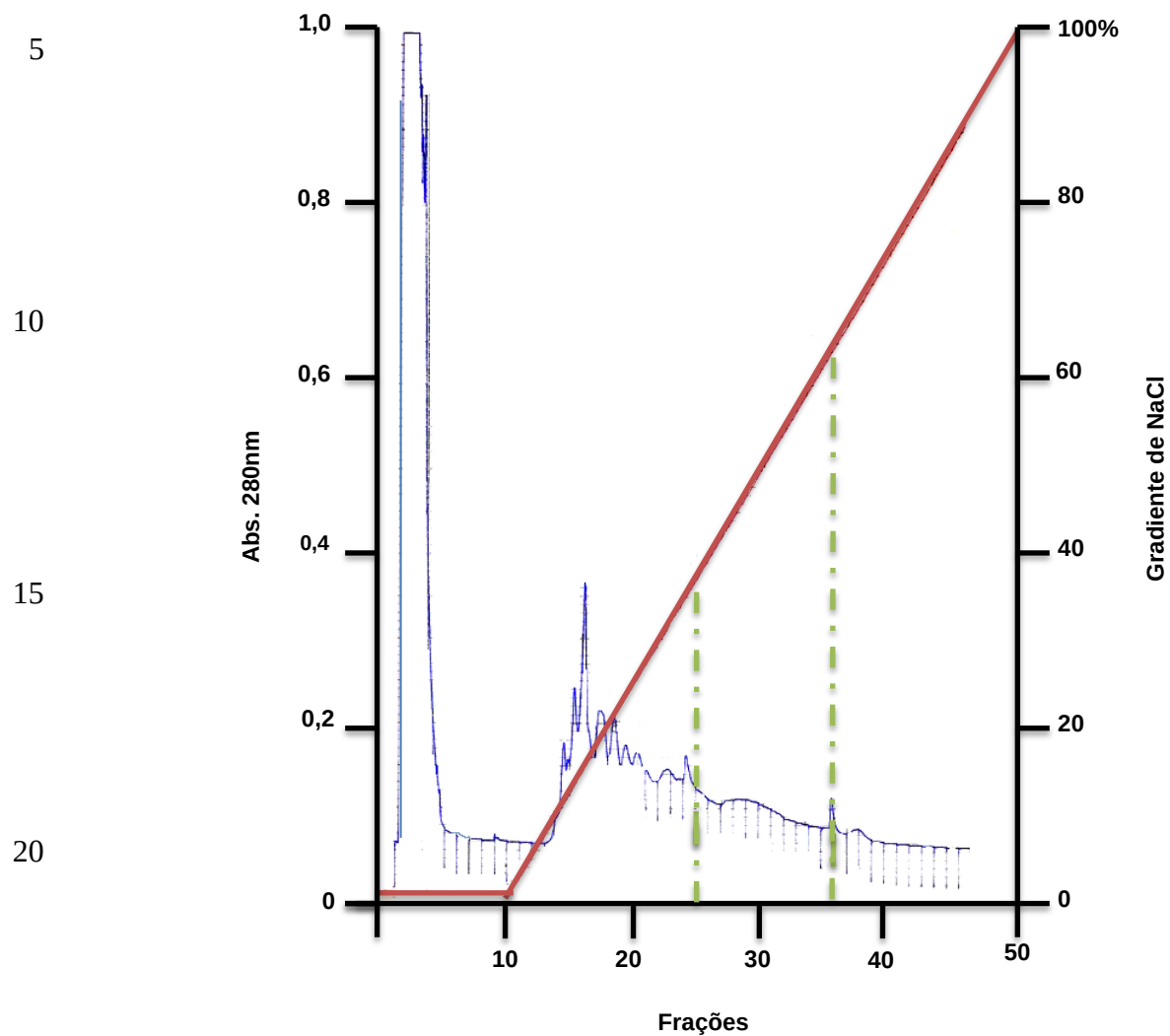
Após a centrifugação do meio intracelular o material é encaminhado para separação da(s) substância(s) por processos cromatográficos, que são selecionados com base nas características das moléculas. Como a cromatografia de troca iônica (catiônicas ou aniônicas) que faz a separação em relação às cargas; cromatografia de fase reversa, que separa as substâncias pelo grau de hidrofobicidade dos resíduos de aminoácidos e cromatografia de filtração molecular que tem como princípio de separação o tamanho da molécula. A substância isolada pode então seguir para outras análises, dependendo do objetivo de trabalho (Farias *et al.*, 1994; Jack *et al.*, 1995; Uteng *et al.*, 2002).

### 5.2.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA I

O extrato intracelular EI-15 foi cromatografado em coluna de troca iônica I Poros II Q/P (4,6 mm / 50 mm), gerando 46 frações de 1,5 mL. As frações foram liofilizadas, ressuspendidas em água ultrapura e avaliadas em relação à ação antagonista. As frações ativas 25 a 36, localizadas entre as linhas pontilhadas de verde, foram eluídas em uma concentração de 38 a 62% de NaCl, linha vermelha, e monitoradas a uma absorbância de 280 nm (FIG. 3 e FIG. 4). As frações ativas selecionadas foram misturadas e cromatografadas em coluna de fase reversa C-18.

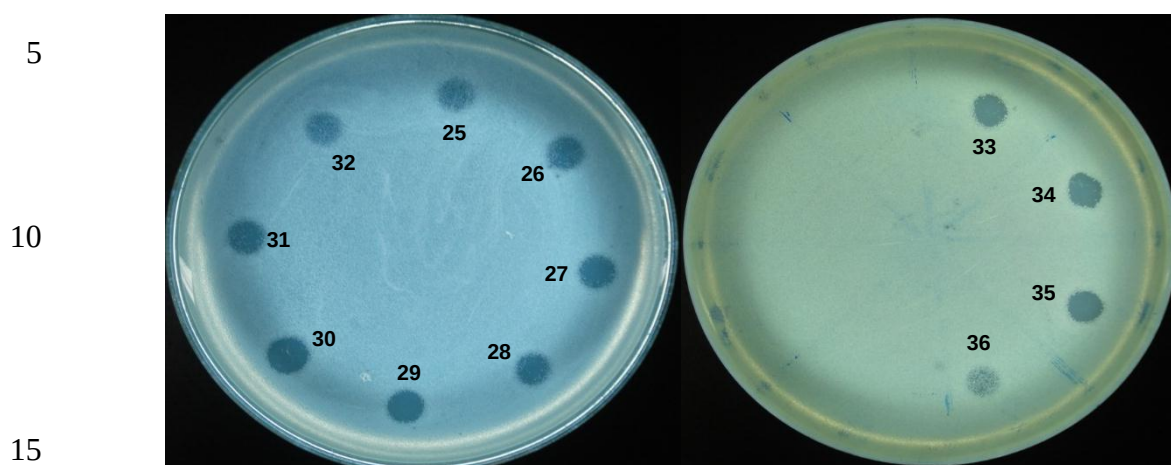
A cromatografia de troca iônica, também conhecida como IEX (*ion exchange chromatography*), é um processo que separa íons e moléculas polares com base em sua afinidade com a resina da coluna trocadora de íons, realizadas com a utilização de gradientes com aumento de sal ou alteração de pH (GE Healthcare, 2007).

Figura 3. Perfil cromatográfico em coluna de troca iônica Poros II Q/P (4,6mm / 50 mm)



Cromatografia em coluna de troca iônica I Poros II Q/P (4,6 mm / 50 mm), equilibrada em tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, eluída em gradiente linear de 0 a 1,0 M de NaCl no mesmo tampão (linha vermelha), usando fluxo de  $60 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ , leitura em  $\lambda$  de 280 nm (linha azul) e temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Frações ativas entre as linhas pontilhadas (verde) provenientes do extrato intracelular precipitado em 15% de sulfato de amônio da amostra produtora *S. sonnei* SS9; amostra reveladora: *S. sonnei* SS12.

Figura 4. Atividade antagonista das frações recuperadas da cromatografia de troca iônica Poros II Q/P



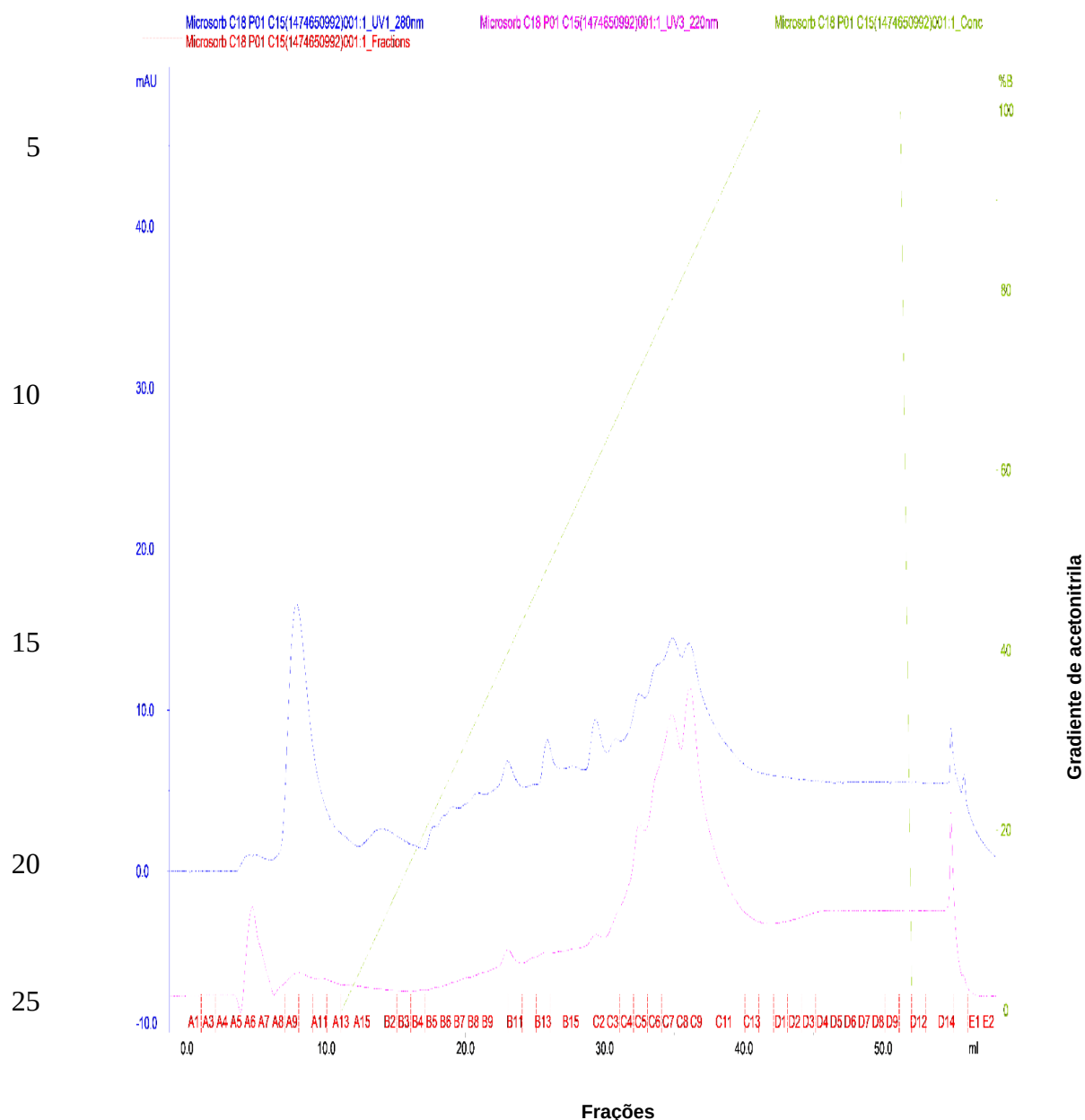
Halos de inibição produzidos pelas frações 25 a 36 da cromatografia de troca iônica I em coluna Poros II Q/P (4,6 mm / 50 mm). Origem: EI-15, extrato intracelular precipitado em 15% de sulfato de amônio da amostra de *S. sonnei* SS9. Amostra reveladora: *S. sonnei* SS12.

### 5.2.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA I

O *pool* das frações 25 a 36 obtidas da cromatografia de troca iônica I em coluna Poros II Q/P foi cromatografada em coluna de fase reversa Microsorb-MV™ C18, gerando 65 frações de 1 mL cada. As frações foram liofilizadas, ressuspensas e a ação atagônica avaliada. As frações ativas C6 a C12 e D15 foram eluídas em concentrações de 75 a 97% de uma solução 80% de Acn e também durante a lavagem da coluna, respectivamente, linha verde (FIG. 5 e FIG. 6). A absorbância foi monitorada em dois comprimentos de onda simultaneamente 220 nm em linha rosa e 280 nm linha azul. Essas amostras foram avaliadas por espectrometria de massas.

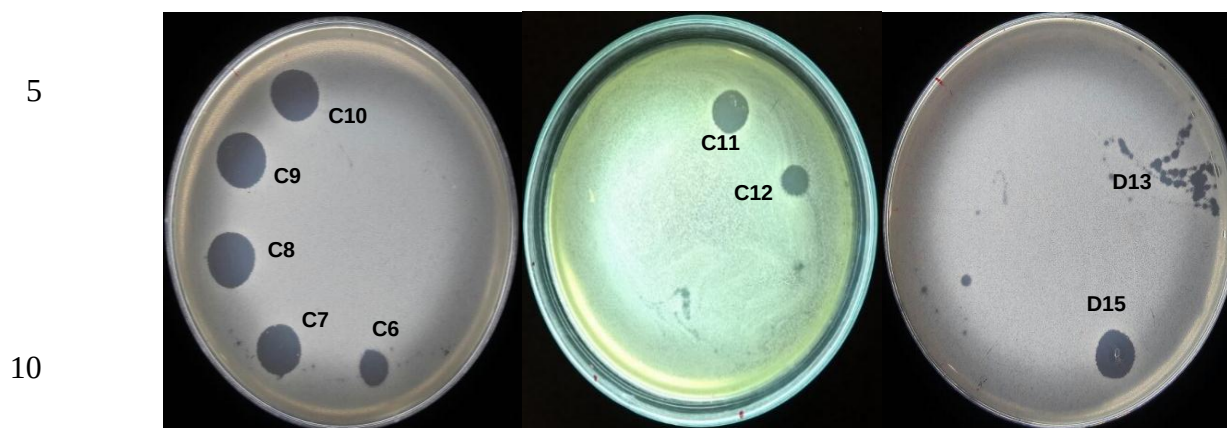
A cromatografia de fase reversa, RPC, (*reversed phase chromatography*) também conhecida por se tratar de uma técnica de cromatografia líquida, tem por finalidade a separação de substâncias de acordo com a hidrofobicidade entre as moléculas do soluto, presentes na fase móvel contra os ligantes fixos na fase estacionária (GE Healthcare, 2006).

Figura 5. Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa I Microsorb-MV™ C18



Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa I Microsorb-MV™ C18 [Origem: *pool* das frações 25 a 36 obtidas da coluna de troca iônica I em coluna Poros II Q/P; EI-15, extrato intracelular precipitado em 15% de sulfato de amônio da amostra de *S. sonnei* SS9]. Coluna Microsorb-MV™ C18, equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água ultrapura) e eluída com solução B (Acn 80% v/v acrescida com TFA 0,1%). Fluxo de 60 mL.h<sup>-1</sup>, sendo 0 a 10 min 100% da solução A, 10 a 40 min 0-100% da solução B e 40 a 50 min 100% da solução B em linha verde, λ de 220 linha rosa e 280 nm linha azul. Frações ativas C6 a C12 e D15 eluídas com 75 a 97% de acetonitrila 80% e durante a lavagem da coluna, respectivamente, linha verde.

Figura 6. Atividade antagonista das frações recuperadas da cromatografia fase reversa I Microsorb-MV™ C18



Atividade antagonista das frações C6 a C12 e D15, da cromatografia em coluna de fase reversa I Microsorb-MV™ C18, presença de halos lípidos de tamanhos variados. [Origem: *pool* das frações 25 a 36 obtidas da coluna de troca iônica I em coluna Poros II Q/P; EI-15, extrato intracelular precipitado em 15% de sulfato de amônio da amostra de *S. sonnei* SS9]. Amostra reveladora: *S. sonnei* SS12

As frações C6 a C12 e D15 foram obtidas após três procedimentos consecutivos, quais sejam: precipitação por sulfato de amônio, cromatografias de troca iônica (coluna trocadora aniônica) e de fase reversa (coluna C-18). Em seguida as amostras foram analisadas no espectrômetro de massas, para a verificação da pureza das frações e a determinação da massa molecular das substâncias. Os dados obtidos corroboram com aqueles relatados por (Farias *et al.*, 1994; Jack *et al.*, 1995; Uteng *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2013; Moreira, 2018).

### 5.2.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA II

O Extrato proteico intracelular precipitado com 30% de sulfato de amônio p/v, EI-30, foi cromatografado em coluna Resource™ Q, sendo coletadas 95 frações de 1,5 mL cada que foram liofilizadas, ressuspendidas e atividade antagonista avaliada. No cromatograma é observado em linha azul Abs.280 nm, em linha vermelha um gradiente linear de NaCl e em linha verde pontilhada as frações ativas 1 a 81 (FIG. 7).

A atividade antagonista distribuiu-se por quase todas as frações do cromatograma (FIG. 7 e FIG. 8), indicando a presença de substâncias ativas. Também é observado tamanho e límpidez variadas nos halos de inibição. Um *pool* das frações 1 a 14 foi montado, a seleção foi baseada no alto valor das leituras de  
5 absorbância, indicativo de elevada concentração de peptídios e proteínas e também no tamanho e limpidez dos halos. As frações selecionadas não interagiram com a coluna de troca iônica, o que sugere que as moléculas possuem carga líquida zero ou carga igual à matriz da coluna. O *pool* das frações foi aplicado em uma coluna de fase reversa C-18.

10 As frações 55 e 56 eluídas com aproximadamente 55% de NaCl, foram dessanilizadas por ponteiros tipo Zip Tip e encaminhadas para análise por espectrometria de massas. A escolha das frações foi baseada pela presença de pico fino e uniforme no cromatograma de troca iônica (FIG. 7)

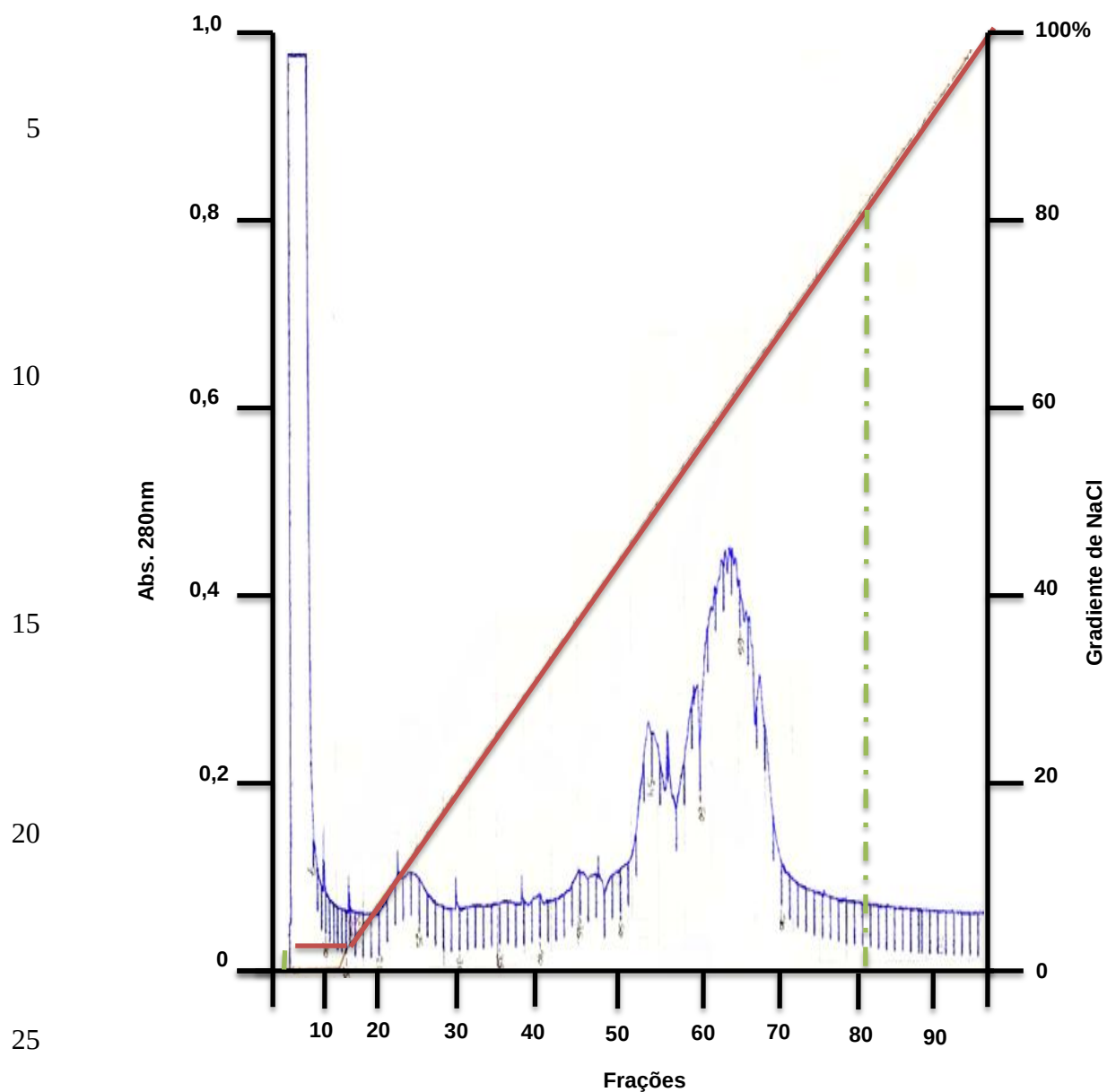
15

20

25

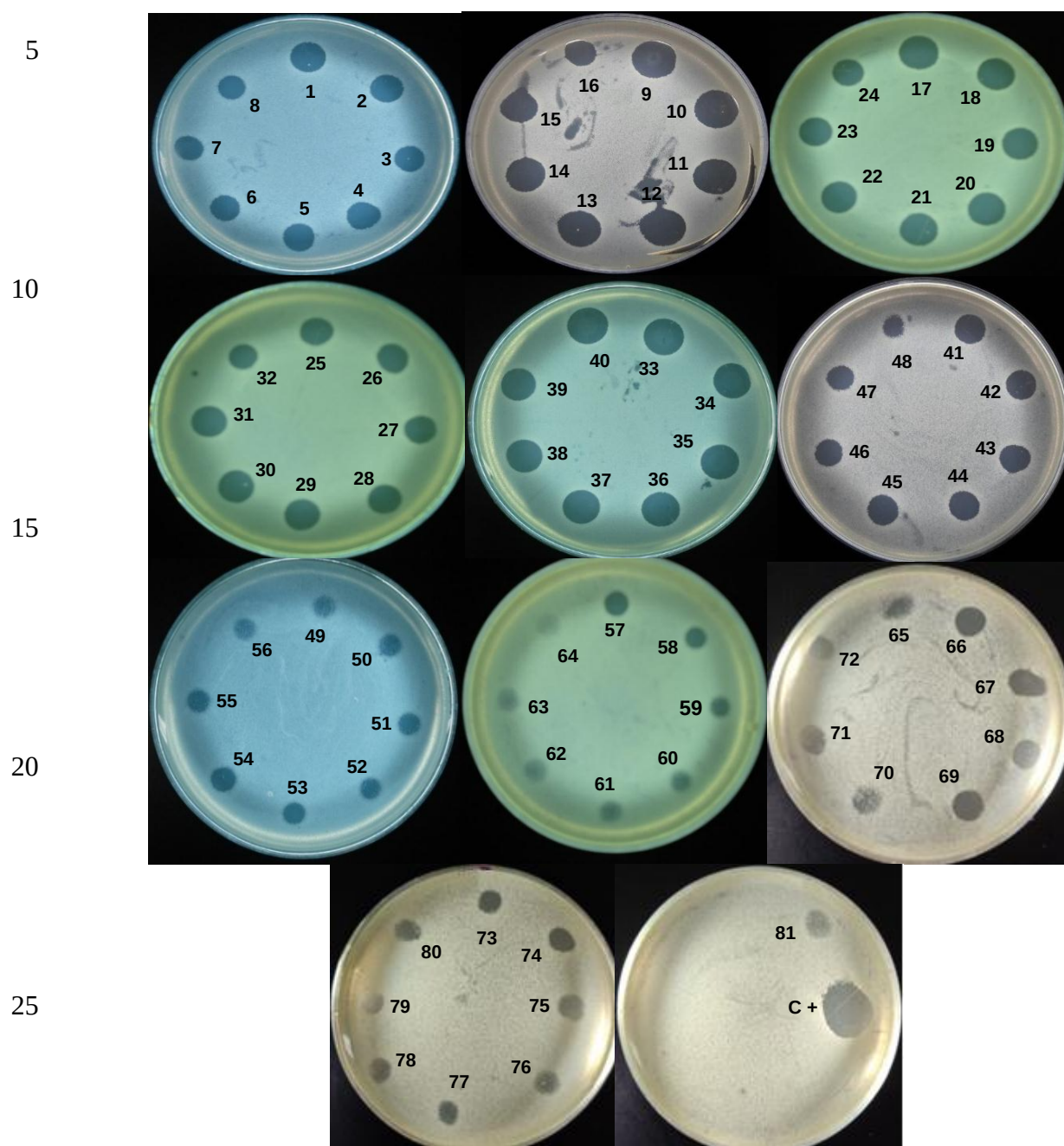
30

Figura 7. Perfil cromatográfico em coluna de troca iônica Resource<sup>TM</sup>-Q (6,4 mm Ø x 30 mm



Cromatografia em coluna de troca iônica II Resource<sup>TM</sup> Q (6,4 mm Ø x 30 mm) do extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% de sulfato de amônio p/v, EI-30. Coluna equilibrada em tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, eluída em gradiente linear de 0 a 1,0 M de NaCl no mesmo tampão (linha vermelha), em 120 min, usando fluxo de 60 mL.h<sup>-1</sup>, leitura em  $\lambda$  de 280 nm (linha azul) e temperatura de 25°C. Linha pontilhada em cor verde indica as frações 1 a 81 ativas contra *S. sonnei* SS12.

Figura 8. Atividade antagonista das frações 1 a 81 da cromatografia de troca iônica II coluna Resource™ Q, contra a amostra *S. sonnei* SS12.

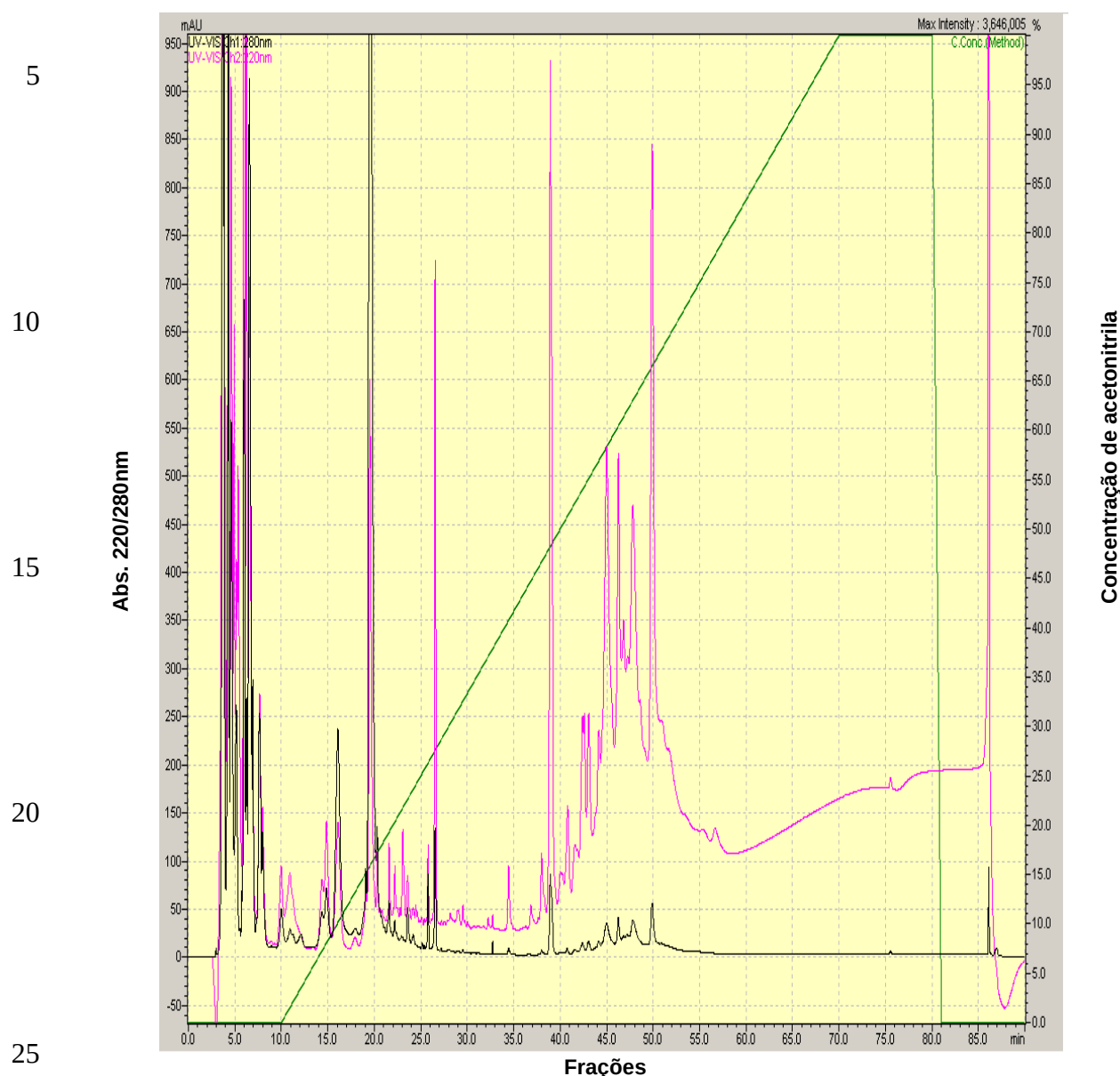


Halos de inibição produzidos pelas substâncias ativas das frações 1 a 81 da cromatografia de troca iônica II, coluna Resource™ Q (6,4 mm Ø x 30 mm). Origem: EI-30, extrato intracelular precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio da amostra de *S. sonnei* SS9. Amostra reveladora: *S. sonnei* SS12. (C<sup>+</sup>), controle positivo: EI-30.

#### 5.2.4 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA II

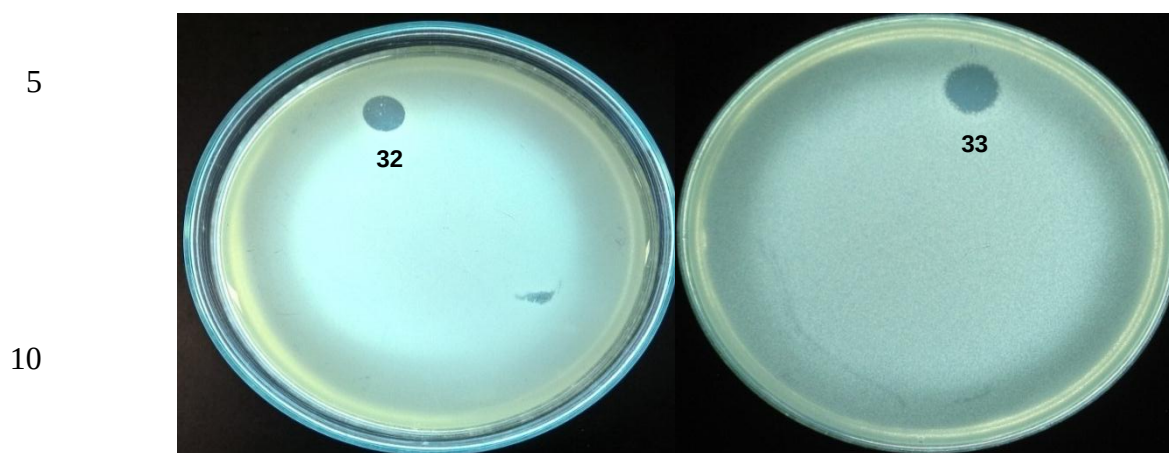
O *pool* das frações 1 a 14, proveniente da coluna de troca iônica Resource™ Q (item 4.3.3), foi cromatografado em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 (5μ ST 4,6 / 250 mm), originando 61 frações de 1 mL cada (FIG. 9). As frações foram liofilizadas e atividade antagonista realizada (FIG. 10). As frações 32 e 33 eluídas em uma concentração de 37% de uma solução 100% de Acn, gradiente linear, linha verde, apresentaram halos médios e límpidos contra a amostra reveladora SS12. A absorbância das amostras foi monitorada em dois comprimentos de onda simultaneamente 220 nm em linha rosa e 280 nm liha azul. Essas amostras foram avaliadas por espectrometria de massas.

Figura 9. Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 (5μ ST 4,6 / 250 mm)



Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa Sephasil™ Peptide C18 (5μ ST 4,6 / 250 mm). [Origem: *pool* das frações 1 a 14 ativas da cromatografia de troca iônica II, coluna Resource™ Q.; EI-30, extrato intracelular precipitado em 30% de sulfato de amônio da amostra de *S. sonnei* SS9]. Coluna Sephasil™ Peptide C18, (5μ ST 4,6 / 250 mm) equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água ultrapura) e eluída em um gradiente com solução B (Acn 100% v/v acrescida com TFA 0,1%). Fluxo de 60 mL.h<sup>-1</sup>, sendo 0 a 10 min 100% da solução A, 10 a 70 min 0-100% da solução B e 70 a 80 min 100% da solução B (linha verde), λ de 220 nm (linha rosa) e 280 nm (linha preta).

Figura 10. Atividade antagonista das frações 32 e 33 da cromatografia de fase reversa II em coluna Sephasil™ Peptide C18, contra a amostra reveladora SS12.



Halos de inibição produzidos pelas frações ativas 32 e 33 da cromatografia em coluna fase reversa II Sephasil™ Peptide C18. [Origem: pool das frações 1 a 14 da cromatografia em coluna de troca iônica, Resource™ Q.; EI-30, extrato intracelular precipitado em 30% de sulfato de amônio da amostra de *S. sonnei* SS9]. Amostra reveladora: *S. sonnei* SS12.

As frações 32 e 33, adquiridas após três passos de purificação, foram analisadas por espectrometria de massas.

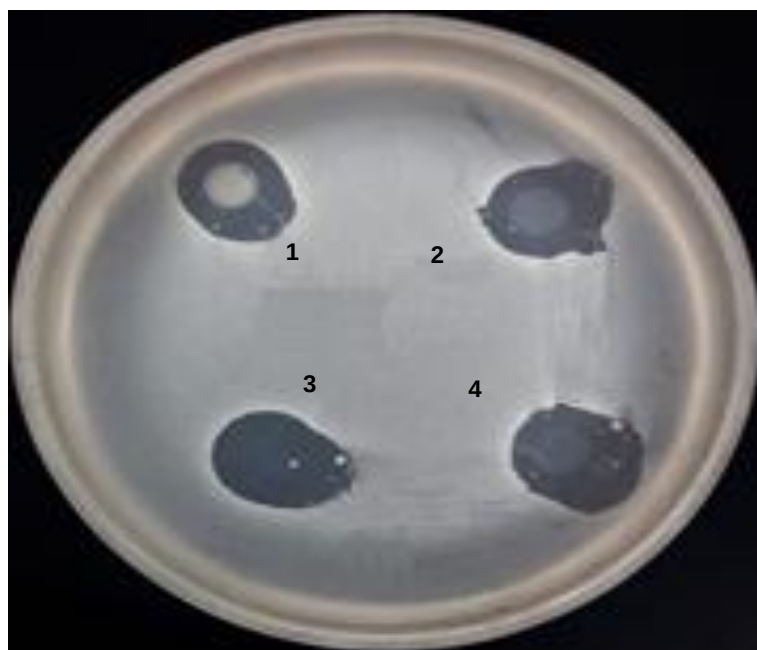
### 5.2.5 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA III

Na tentativa de aperfeiçoar as técnicas de purificação, foi empregado o dispositivo Amicon Ultra, que tem como objetivo separar as substâncias pelo tamanho da massa molecular. Para tanto, foi utilizado dois dispositivos para separar as moléculas presentes no EI-30: O primeiro separa as substâncias com massa molecular superior e inferior a 10 kDa e o segundo as moléculas com massa maior e menor que 5 kDa. O resultado rendeu três materiais em tamanhos diferentes sendo o primeiro < 5 kDa, o segundo > 5 < 10 kDa e o terceiro > 10 kDa. A atividade antagonista dessas amostras é mostrada na figura 11.

O segundo material com massas moleculares entre 5 a 10 kDa foi cromatografado na coluna de fase reversa III Luna 5μ C18 (100Å 250 x 10 mm) que rendeu 190 frações de 1 mL cada. As frações foram liofilizadas, ressuspensas e atividade antagonista avaliada. As frações ativas 100 a 120, 123 a 147, 178, 181 e

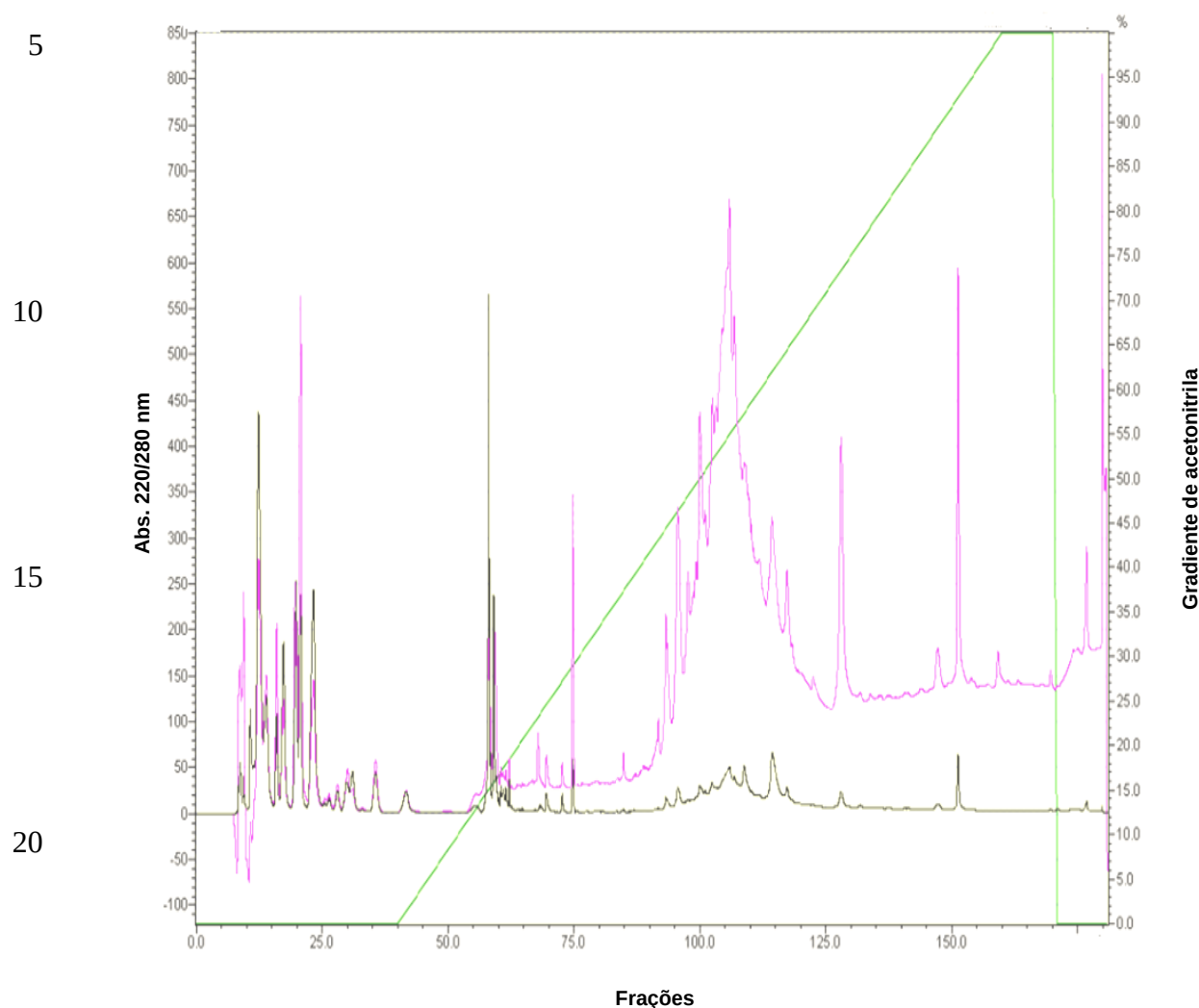
182 apresentaram halos límpidos e nítidos e foram eluídas em uma concentração de 50 a 88% de uma solução 100% de Acn em um gradiente linear (linha verde) (FIG. 12 e FIG. 13). A absorbância foi monitorada em dois comprimentos de onda simultaneamente 220 nm (linha rosa) e 280 (linha preta) (FIG. 12). As frações ativas selecionadas foram analisadas por espectrometria de massas (Moreira, 2018).

Figura 11. Atividade antagonista das amostras recuperados do dispositivo Amicon Ultra



Halos de inibição grandes e límpidos das substâncias contidas em EI-30 (extrato intracelular precipitado em 30% de sulfato de amônio p/v da amostra de *S. sonnei* SS9) que foram agrupadas por tamanho através do dispositivo Amicon Ultra: (1) controle positivo, EI-30; (2) substâncias com massa molecular inferior a 5 kDa; (3) substâncias com massa molecular entre 5 a 10 kDa; (4) substâncias com massa molecular superior a 10 kDa. Amostra reveladora: *S. sonnei* SS12.

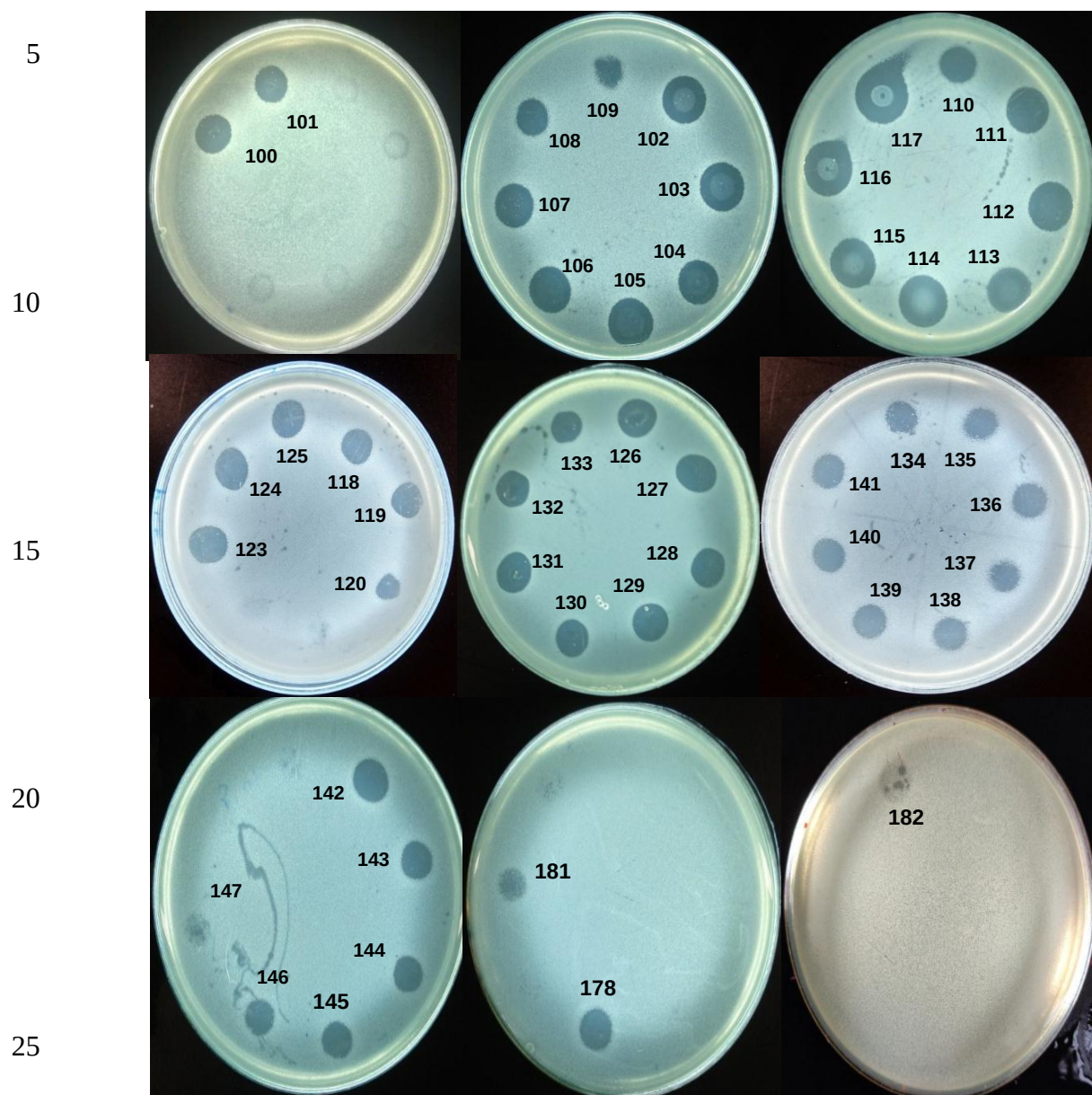
Figura 12. Perfil cromatográfico da fração com substâncias de massa molecular de 5 a 10 kDa adquiridas em dispositivo Amicon Ultra, separadas em coluna de fase reversa III Luna 5µ C18.



Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa III Luna 5µ C18 (100Å 250 x 10 mm) da fração com massa molecular de 5 a 10 kDa, proveniente do fracionamento de EI-30 em dispositivo Amicon Ultra.

A Coluna Luna 5µ C18 (100Å 250 x 10 mm), contém em sua extremidade de entrada um filtro Supelco. A coluna foi equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água ultrapura) e eluída com solução B (Acn 100% v/v acrescida com TFA 0,1%). Fluxo de 60 mL.h<sup>-1</sup>, perfazendo um gradiente linear que consta 0 a 40 min 100% da solução A, 40 a 160 min 0-100% da solução B e 160 a 180 min 100% da solução B em (linha verde), λ de 220 nm em (linha rosa) e 280 nm em (linha preta).

Figura 13. Atividade antagonista das frações adquiridas em cromatografia de fase reversa III em coluna Luna 5 $\mu$  C18, contra a amostra reveladora SS12.



Halos de inibição das frações 100 a 120, 123 a 147, 178, 181 e 182 contra a amostra reveladora *S. sonnei* SS12. As frações ativas foram obtidas pelo fracionamento da amostra com massas moleculares entre 5 a 10 kDa de EI-30 (extrato intracelular de *S. sonnei* SS9, precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio) separadas em dispositivo Amicon Ultra, que foi cromatografada em coluna de fase reversa Luna 5 $\mu$  C18.

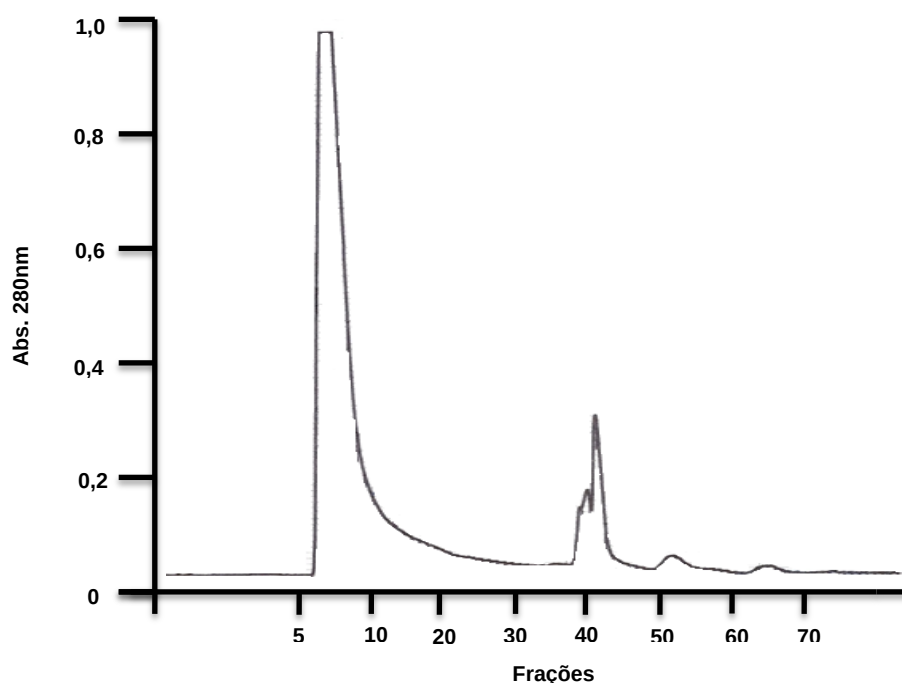
As frações citadas acima foram obtidas em quatro passos, sendo: precipitação, sistema Amicon Ultra de 10 e 5 kDa e cromatografia de fase reversa C-18.

### 5.2.6 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE EXCLUSÃO MOLECULAR SUPERDEX™ 30

O extrato EI-30 foi cromatografado em coluna de exclusão molecular Superdex™ 30 HR 16/60 gerando 80 frações de 1 mL cada (FIG. 14). As frações foram liofilizadas, ressuspensas e avaliadas quanto a sua atividade antagonista. As amostras ativas, com presença de halos nítidos e límpidos foram: 5 a 46, 54 e 55 (FIG.15). Um *pool* das frações 5 a 14 foi montado devido ao alto valor das leituras de absorvância e presença de halos de inibição, para serem recromatografado em coluna Superdex™ 75. Essas frações provavelmente estão fora do limite de separação da coluna, isto é, acima de 10 Kda.

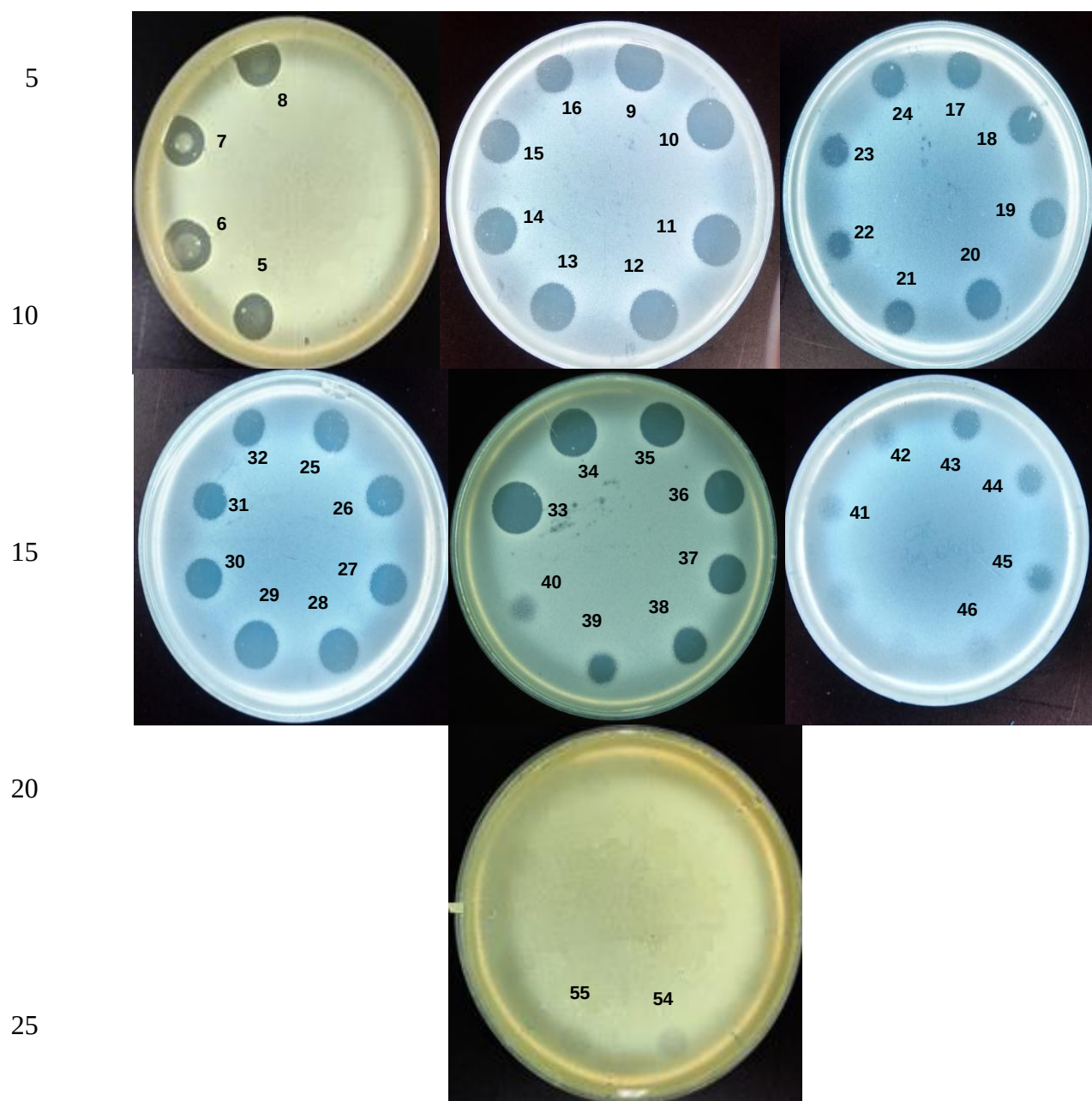
A fase estacionária da coluna é composta por uma resina contendo ligações cruzadas entre dextran e as esferas de agarose. Essa resina dá uma margem de separação de proteínas com peso entre 700 Da a 10 kDa (GE Healthcare, 2010).

Figura 14. Perfil cromatográfico de EI-30 fracionado em coluna de exclusão molecular Superdex™ 30 HR 16/60



Perfil cromatográfico do extrato EI-30 (extrato intracelular de *S. sonnei* SS9, precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio) em coluna de exclusão molecular Superdex™ 30 HR 16/60. Fase móvel tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0 com fluxo de 60 mL.h<sup>-1</sup>,  $\lambda$  de 280 nm, temperatura da sala do evento 25°C. Foram recuperadas 80 frações de 1 mL cada.

Figura 15. Atividade antagonista das frações obtidas em cromatografia de exclusão molecular Superdex™ 30, contra a amostra reveladora SS12.



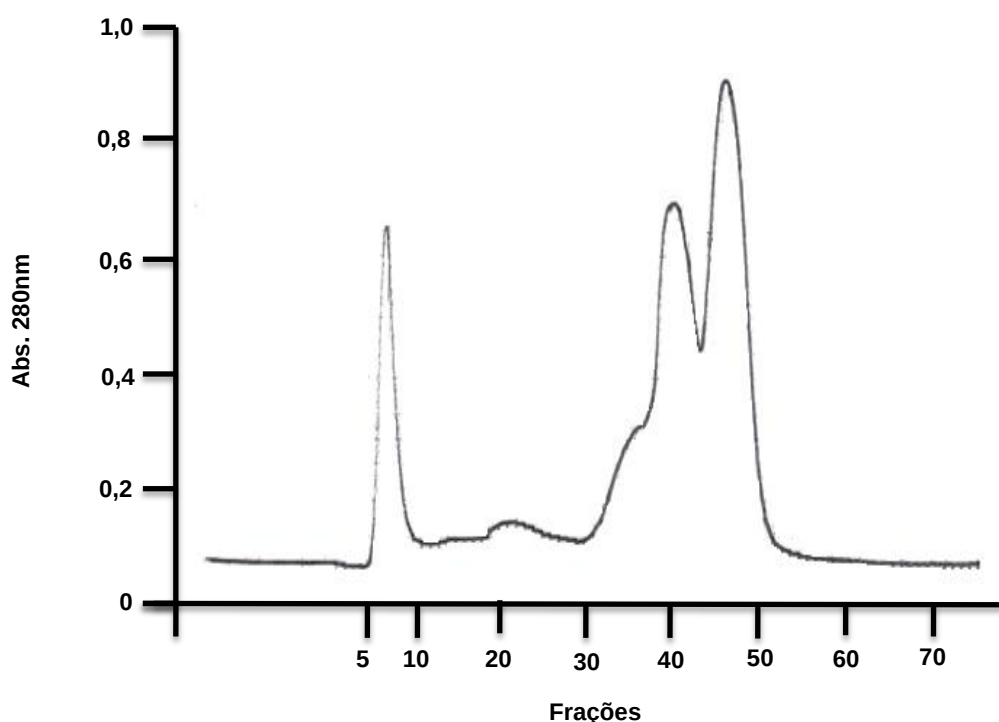
Halos de inibição de tamanhos e limpidez variados das frações 5 a 46, 54 e 55 contra a amostra reveladora *S. sonnei* SS12. As frações ativas foram obtidas pelo fracionamento do extrato EI-30 (extrato intracelular de *S. sonnei* SS9, precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio) em cromatografia de exclusão molecular, coluna Superdex™ 30 HR 16/60.

### 5.2.7 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE EXCLUSÃO MOLECULAR SUPERDEX™ 75

O *pool* das frações 5 a 14 da cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex™ 30 foi cromatografado na coluna Superdex™ 75 originando 72 frações de 1 mL cada, as quais foram liofilizadas, ressuspendidas e avaliadas em relação a ação antagonista (FIG. 16 e FIG 17). As frações 5 a 42 e 67 apresentaram halos límpidos de tamanhos variados contra *S. sonnei* SS12. Com base no perfil cromatográfico e na ação antagonista, frações ativas foram selecionadas para análise por espectrometria de massas.

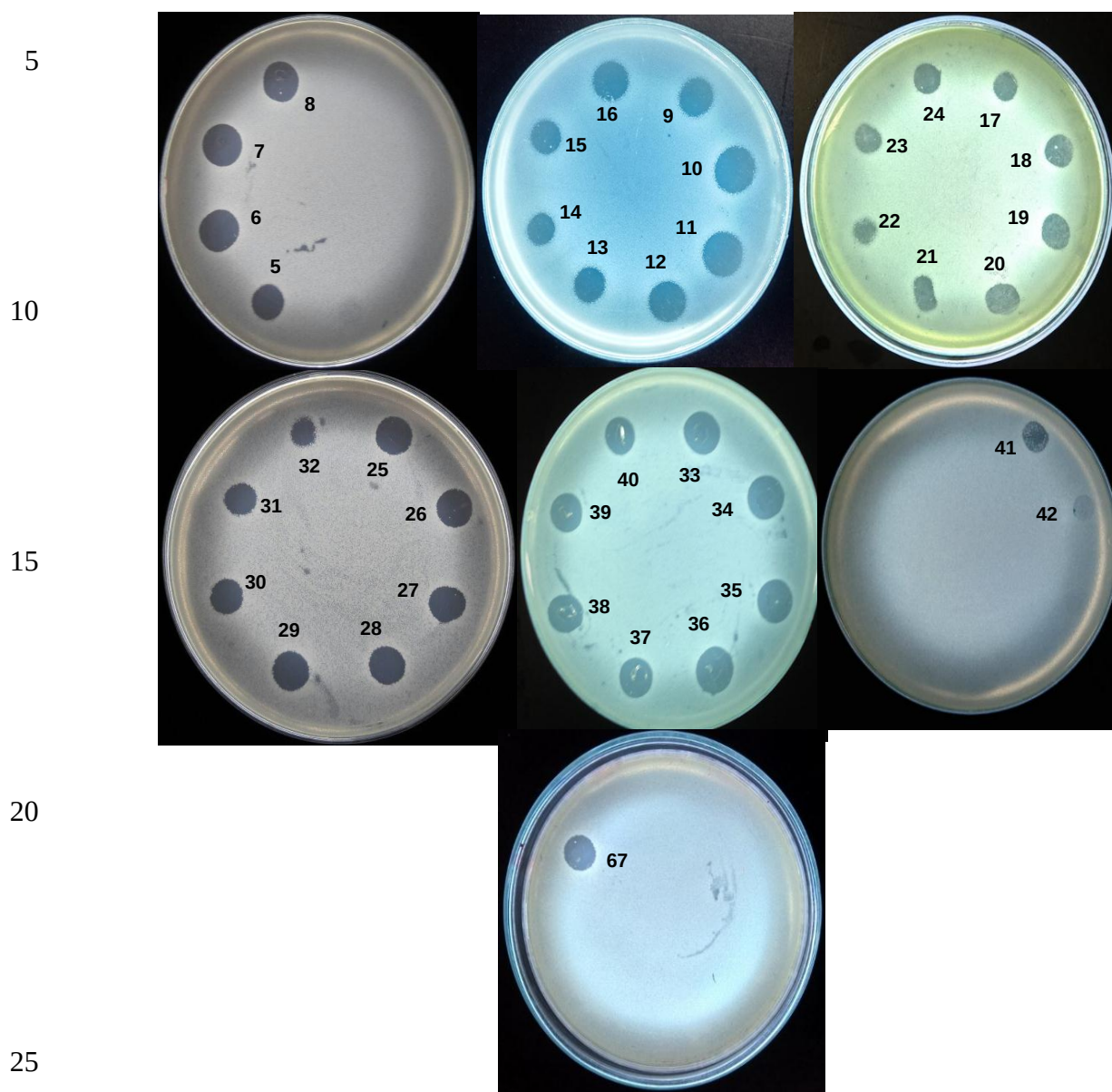
A fase estacionária da coluna é composta por uma resina contendo ligações cruzadas entre dextran e as esferas de agarose. Essa resina possui margem de separação de proteínas com peso entre 3 kDa a 70 kDa (GE Healthcare, 2010).

Figura 16. Perfil cromatográfico do *pool* das frações obtidas em coluna de exclusão molecular Superdex™ 75



Perfil cromatográfico em coluna de exclusão molecular Superdex™ 75 HR 16/60. [Origem: *pool* das frações 5 a 14 da cromatografia em coluna de exclusão molecular Superdex™ 30 HR 16/60; extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9, precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio]. Fase móvel tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0 com fluxo de 60 mL.h<sup>-1</sup>,  $\lambda$  de 280 nm, temperatura da sala do evento 25°C. Foram recuperadas 72 frações de 1 mL cada.

Figura 17. Atividade antagonista das frações da cromatografia de exclusão molecular Superdex™ 75, contra a amostra reveladora SS12.



Halos de inibição de tamanhos e limpidez variados das frações 5 a 42 e 67 contra a amostra reveladora *S. sonnei* SS12. As frações ativas 5 a 42 e 67 provenientes da cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex™ 75 foram obtidas pelo fracionamento do *pool* 5 a 14 da cromatografia de exclusão molecular, coluna Superdex™ 30, adivindos do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9, precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio

As frações acima foram obtidas por três passos, porém usando duas cromatografias de filtração molecular.

### 5.3 ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Para o ensaio, frações ativas e com perfil cromatográfico apropriado foram analisadas por espectrometria de massas para a determinação da massa molecular e o grau de pureza. Para tanto, a massa monoisotópica dos peptídios foram analisadas na faixa 600 a 5000 Da. As frações que apresentaram espectros favoráveis foram fragmentadas pelo método *lift* no próprio equipamento. Outras foram tratadas pelos métodos de redução, alquilação e acetilação ou tratamento completo por tripsinólise, seguido de análise pelo método *lift*. O método *lift* permite a fragmentação da amostra, os resíduos dos analitos obtidos dos fragmentos gerados são analisados para a montagem das sequências primárias, localizando e achando as posições corretas dos resíduos de aminoácidos para a identificação das substâncias proteicas. Como pode ser observado para as amostras em estudo.

(1) EI-15 → Cromatografia de Troca Iônica I → Cromatografia de Fase Reversa I → originou as frações (C6 a C12 e D15). As frações C10 e C11 apresentaram melhor perfil de pureza, com uma  $m/z$  de 1.443 (FIG. 18 e FIG. 19). Essa massa foi fragmentada pelo modo *lift*, obtendo a seguinte sequência:

- 1.443  $m/z$ : (FIG. 18 e FIG. 19).

Sequência → (K-<sup>I</sup><sub>L</sub>-V-F-<sup>I</sup><sub>L</sub>-K-T-<sup>I</sup><sub>L</sub>-T-S-F-F)

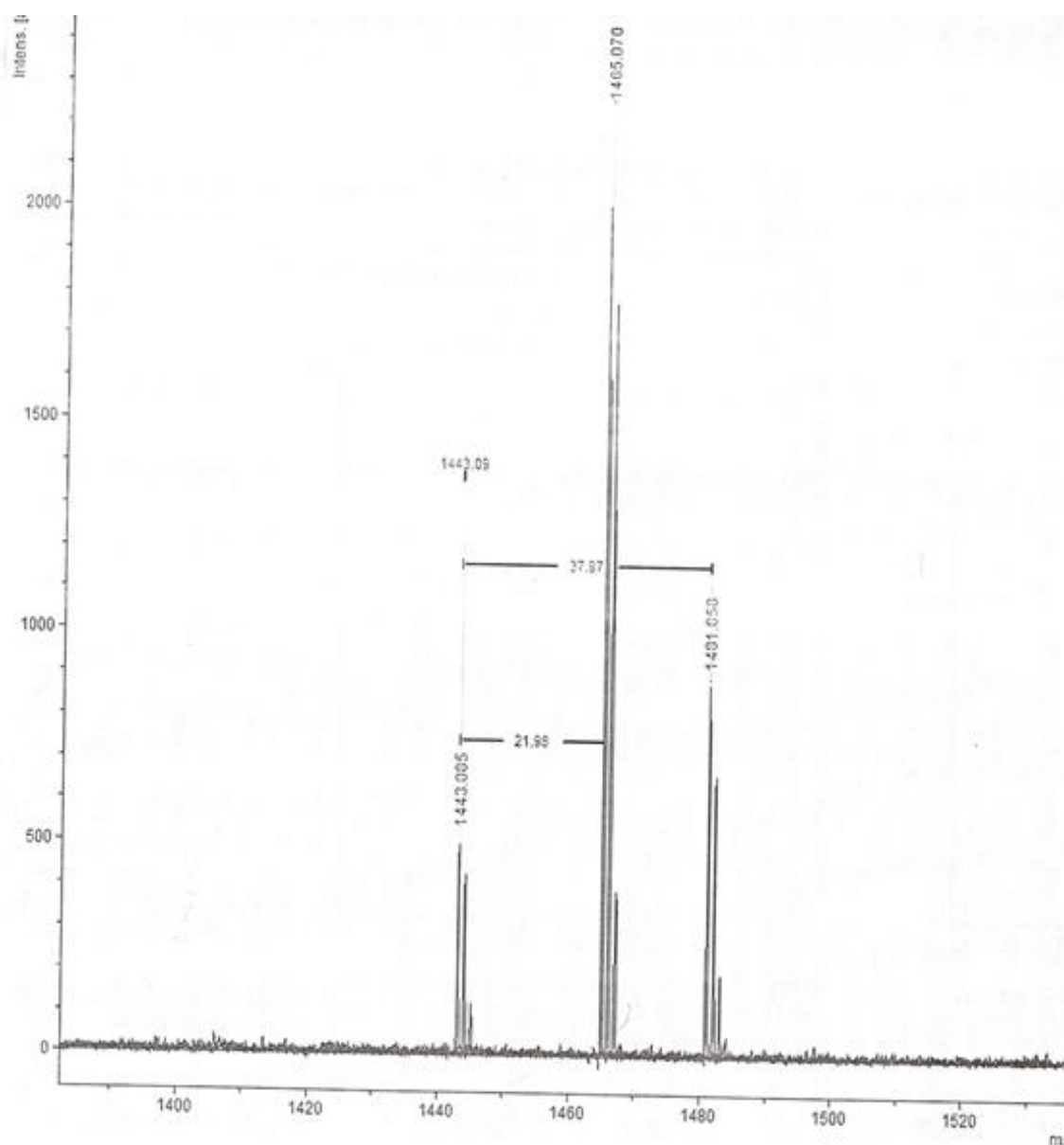
A partir dessa sequência podemos ter 8 variações simultâneas em relação aos aminoácidos Isoleucina (Ile ou I) e Leucina (Leu ou L).

Mas a variação que foi escolhida para ser sintetizada foi:

(K-L-V-F-L-K-T-L-T-S-F-F)

5

Figura 18. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a amostra C10 mostrando m/z de 1.443

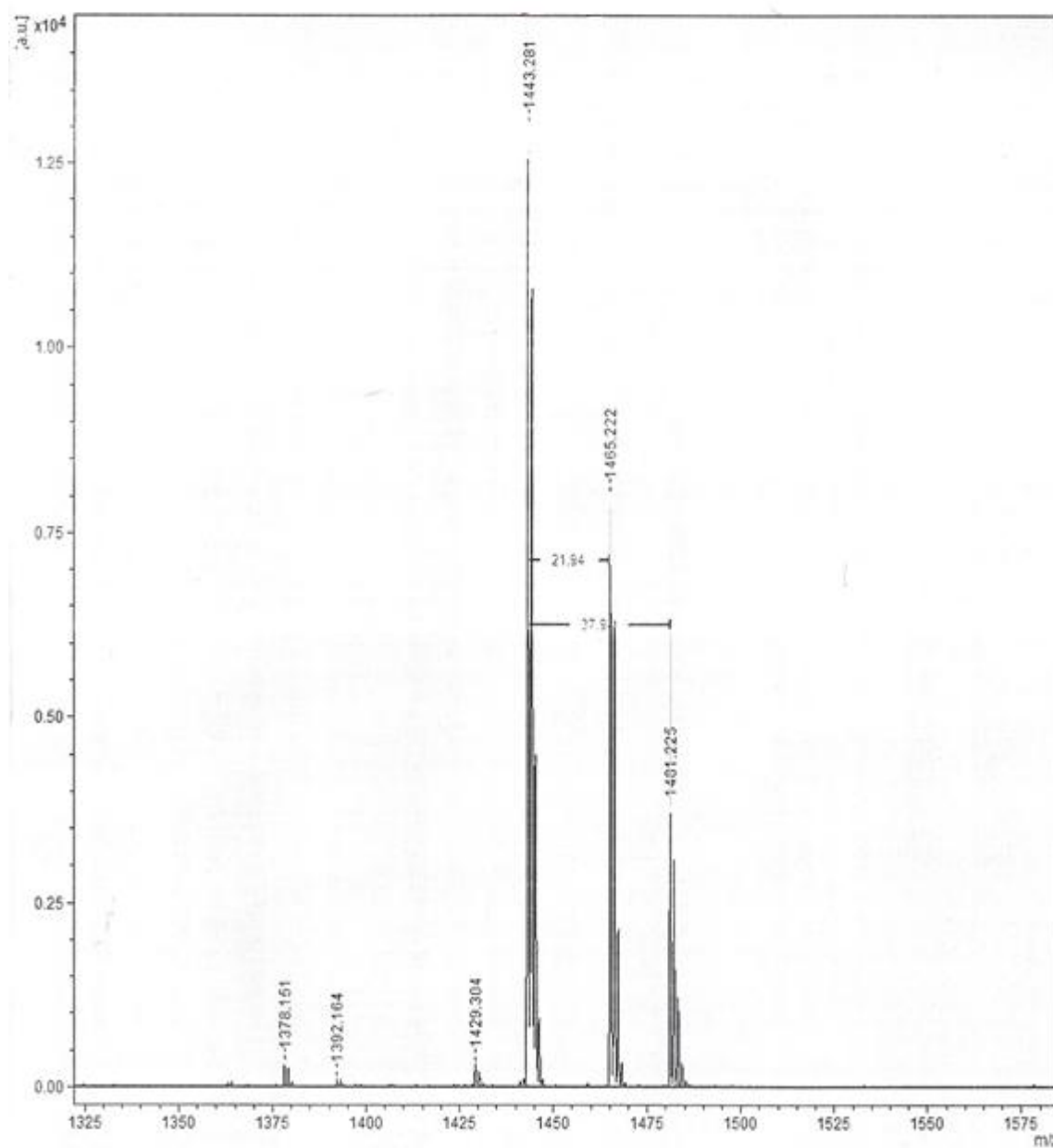


10

Espectro de massas evidenciando uma substância de 1.443 m/z presente na fração C10 da cromatografia de Fase Reversa I [Origem: fração C10 da cromatografia de Fase Reversa I, *pool* 25 a 35 da cromatografia de Troca Iônica I proveniente do extrato EI-15, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 15% p/v de sulfato de amônio].

15

Figura 19. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a amostra C11 mostrando  $m/z$  de 1.443



5

Espectro de massas evidenciando uma substância de 1.443  $m/z$  presente na fração C11 da cromatografia de Fase Reversa I [Origem: fração C11 da cromatografia de Fase Reversa I, *pool* 25 a 35 da cromatografia de Troca Iônica I - proveniente do extrato EI-15, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 15% p/v de sulfato de amônio].

10

(2) EI-30 → Cromatografia de Troca Iônica II → Cromatografia de Fase Reversa II  
 → originou as frações 32 e 33. A fração 32, com massa de 9.287 Da, apresentou melhor sinal e pureza (FIG. 20). Depois de ser tripsinolizada e novamente analisada por espectrometria de massas foi obtido um fragmento de interesse de 1.333 m/z que foi então analisado no modo *lift* para a aquisição da sequência primária de aminoácidos (FIG. 21 e FIG.22).

- 1.333 m/z: (FIG. 21 e FIG. 22).

Sequência → (R-M-L-Q-L-S-A-Q-L-G-A-G-L-K).

A partir dessa sequência podemos ter 16 variações simultâneas em relação aos aminoácidos Isoleucina e Leucina.

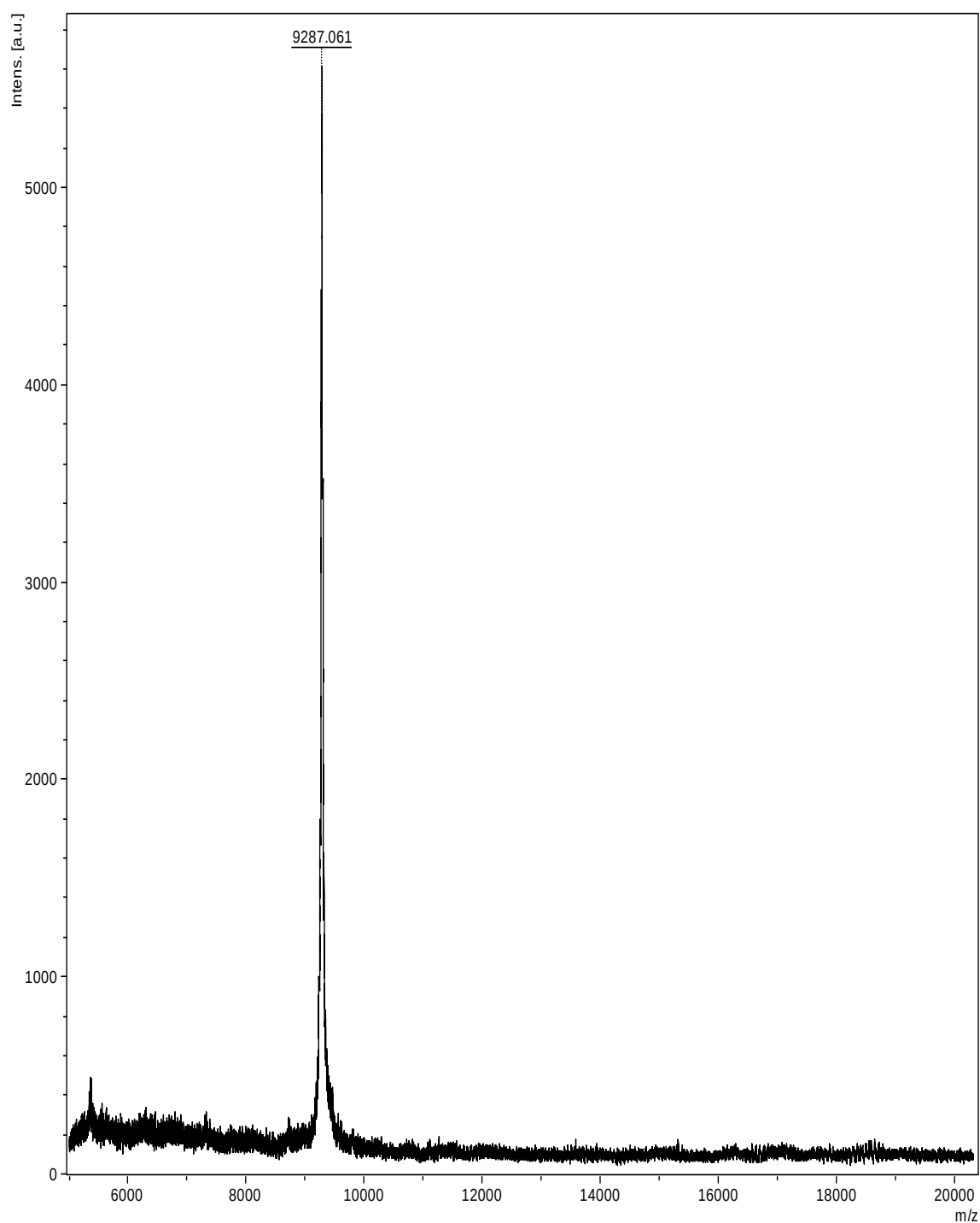
(R-M-L-Q-L-S-A-Q-L-G-A-G-L-K)

(R-M-I-Q-L-S-A-Q-L-G-A-G-L-K)

A substituição foi feita apenas nos aminoácidos em vermelho, pois as outras leucinas alinhavam com outras sequências.

E as variações escolhidas para serem sintetizadas foram as duas.

Figura 20. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a amostra 32, sem tripsinólise, mostrando  $m/z$  de 9.287 Da.

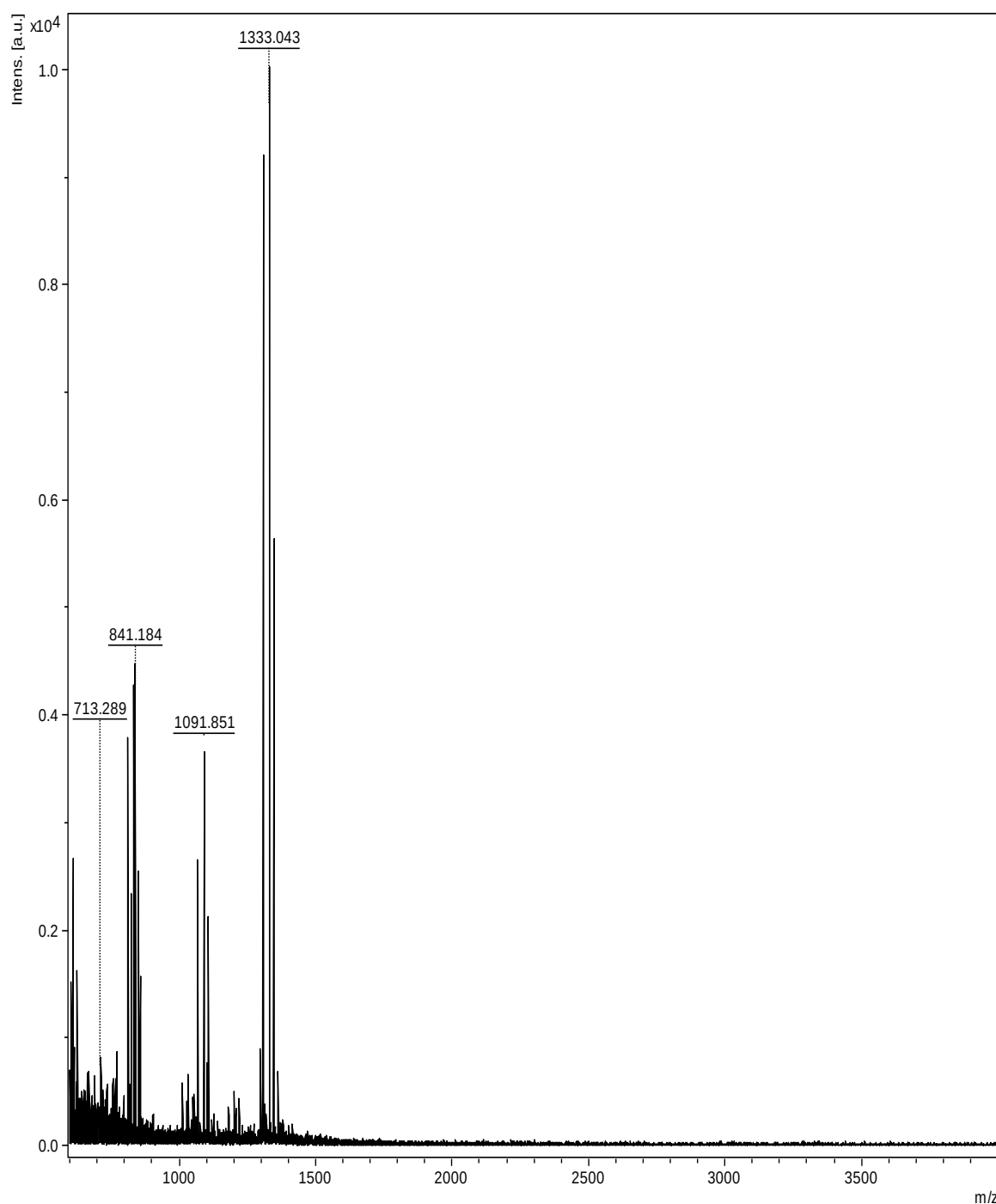


5

Espectro de massas evidenciando uma substância de 9.287  $m/z$ , não tripsinolizada, presente na fração 32 da cromatografia de Fase Reversa II. [Origem: fração 32 da cromatografia de Fase Reversa II, *pool* 1 a 14 da cromatografia de Troca Iônica II - proveniente do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio].

10

Figura 21. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a amostra 32, após tripsinólise, com fragmento de interesse 1.333 m/z.

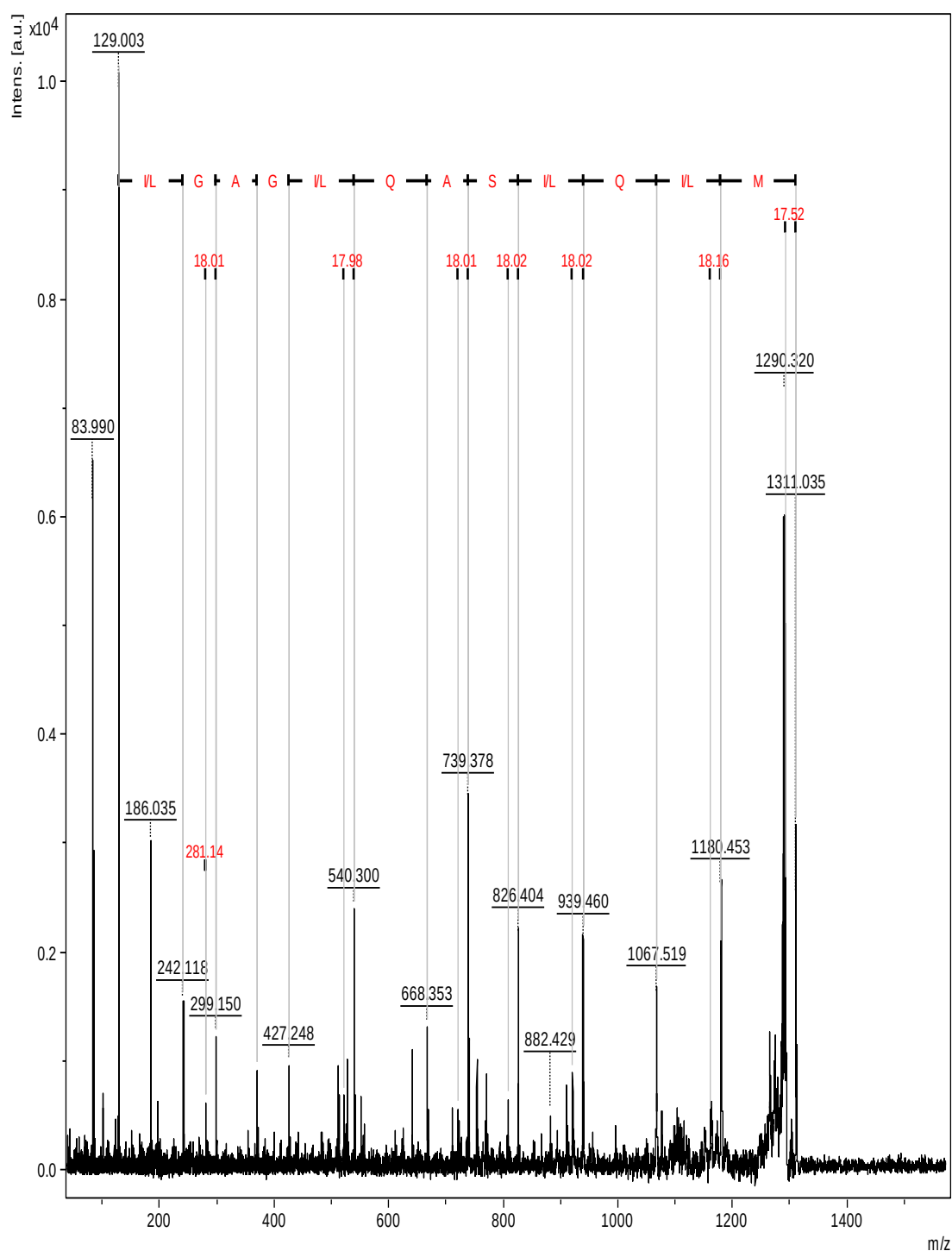


5

Espectro de massas evidenciando uma substância de 1.333 m/z, após tripsinólise, presente na fração 32 da cromatografia de Fase Reversa II. [Origem: fração 32 da cromatografia de Fase Reversa II, pool 1 a 14 da cromatografia de Troca Iônica II - proveniente do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio].

10

Figura 22. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a amostra 32, após fragmentação da  $m/z$  1.333, mostrando a sequência obtida.



5

Espectro de massas evidenciando uma substância de 1.333  $m/z$ , após fragmentação, presente na fração 32 da cromatografia de Fase Reversa II. [Origem: fração 32 da cromatografia de Fase Reversa II, *pool* 1 a 14 da cromatografia de Troca Iônica II - proveniente do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio].

10

(3) EI-30 → Cromatografia de Troca Iônica II → originou a fração 55 que apresentou melhor sinal e pureza mostrando suas m/z antes e após ser reduzida e alquilada, respectivamente (FIG 23 e FIG 24). A aquisição dos fragmentos pelo modo *lift* das m/z de interesse foram as de 1.220, 1.097 e 941, subsequentemente (FIG. 25, FIG. 26 e FIG. 27). A partir dessas fragmentações foram adquiridos sinais para obtenções dos resíduos de aminoácidos para formação das sequências primárias.

- 1.220 m/z: (FIG. 25)

Sequência → (P-S-G-P-<sup>I</sup>-F-S)  
(P-S-G-P-<sup>I</sup>-F-S)

Mas a variação que foi escolhida para ser sintetizada foi:

(P-S-G-P-<sup>L</sup>-F-S)

(G-N-D-E-Y-<sup>L</sup>-T-K-<sup>L</sup>-W)

As variações escolhidas para serem sintetizadas foram:

(G-N-D-E-Y-<sup>L</sup>-T-K-L-W)

(G-N-D-E-Y-<sup>I</sup>-T-K-L-W)

Nos alinhamentos, as sequências aparecem com leucinas.

A partir dessa sequência podemos ter 4 variações simultâneas em relação aos aminoácidos Isoleucina e Leucina.

- 1.097m/z: (FIG. 26)

5 Sequências → (D-<sup>I</sup>-<sup>I</sup>-T-<sup>I</sup>-<sup>I</sup>-M-S-A)

A partir dessa sequência podemos ter 16 variações simultâneas em relação aos aminoácidos Isoleucina e Leucina.

(D-P-E-T-<sup>I</sup>-<sup>I</sup>-M-S-A)

10 E a variação que foi escolhida para ser sintetizada foi:

(D-P-E-T-L-L-M-S-A)

A partir dessa sequência podemos ter 4 variações simultâneas em relação aos aminoácidos Isoleucina e Leucina.

15 (V-P-E-T-<sup>I</sup>-<sup>I</sup>-M-S-A)

E a variação que foi escolhida para ser sintetizada foi:

(V-P-E-T-L-L-M-S-A)

20 A partir dessa sequência podemos ter 4 variações simultâneas em relação aos aminoácidos Isoleucina e Leucina.

(G-T-K-N-N-H-M-S-A-L)

25

- 941 m/z: (FIG. 27)

Sequência → (E-<sup>L</sup>-A-E-Q-A-<sup>L</sup>-G-S-A)

30

A partir dessa sequência podemos ter 4 variações simultâneas em relação aos aminoácidos Isoleucina e Leucina.

(E-**I**-A-E-Q-A-L-G-S-A)

E a variação escolhida para ser sintetizada foi:

5

(E-L-A-E-Q-A-L-G-S-A)

Como base dos resultados que serão demonstrados nos itens 5.5 e 5.6, o peptídeo 8/J8, denominado peptídeo principal, apresentou os melhores resultados antagonista nos parâmetros: ação antagonista contra as amostras testadas, tamanho e limpidez de halos. Ele apresenta a sequência: D-P-E-T-L-L-M-S-A.

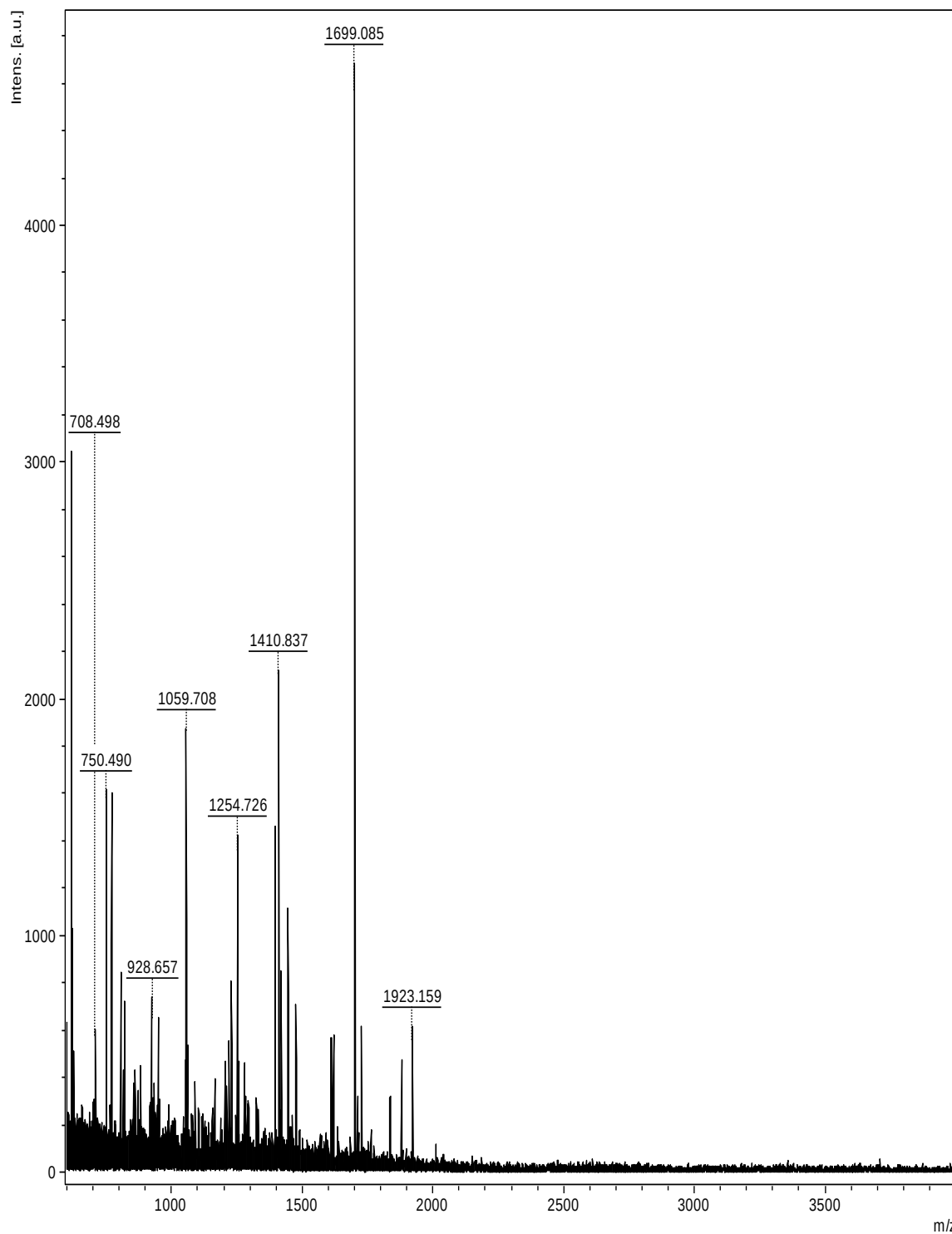
Como demonstrativo da análise do espectro de massa, estudo também realizado para os demais peptídeos, o peptídeo principal 8/J8 é detalhado (FIG. 26 e FIG. 28). No espectro de massa é visualizado uma  $m/z$  de 975 que é referente ao peptídeo puro, uma  $m/z$  de 997 que se refere ao peptídeo mais um íon de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e uma  $m/z$  de 1.013 que é referente ao peptídeo mais um íon de potássio ( $\text{K}^+$ ). Portanto, é chegado ao resultado  $m/z$  teórica de 975,48 e  $m/z$  obtida é 975,41 (FIG. 28).

20

25

30

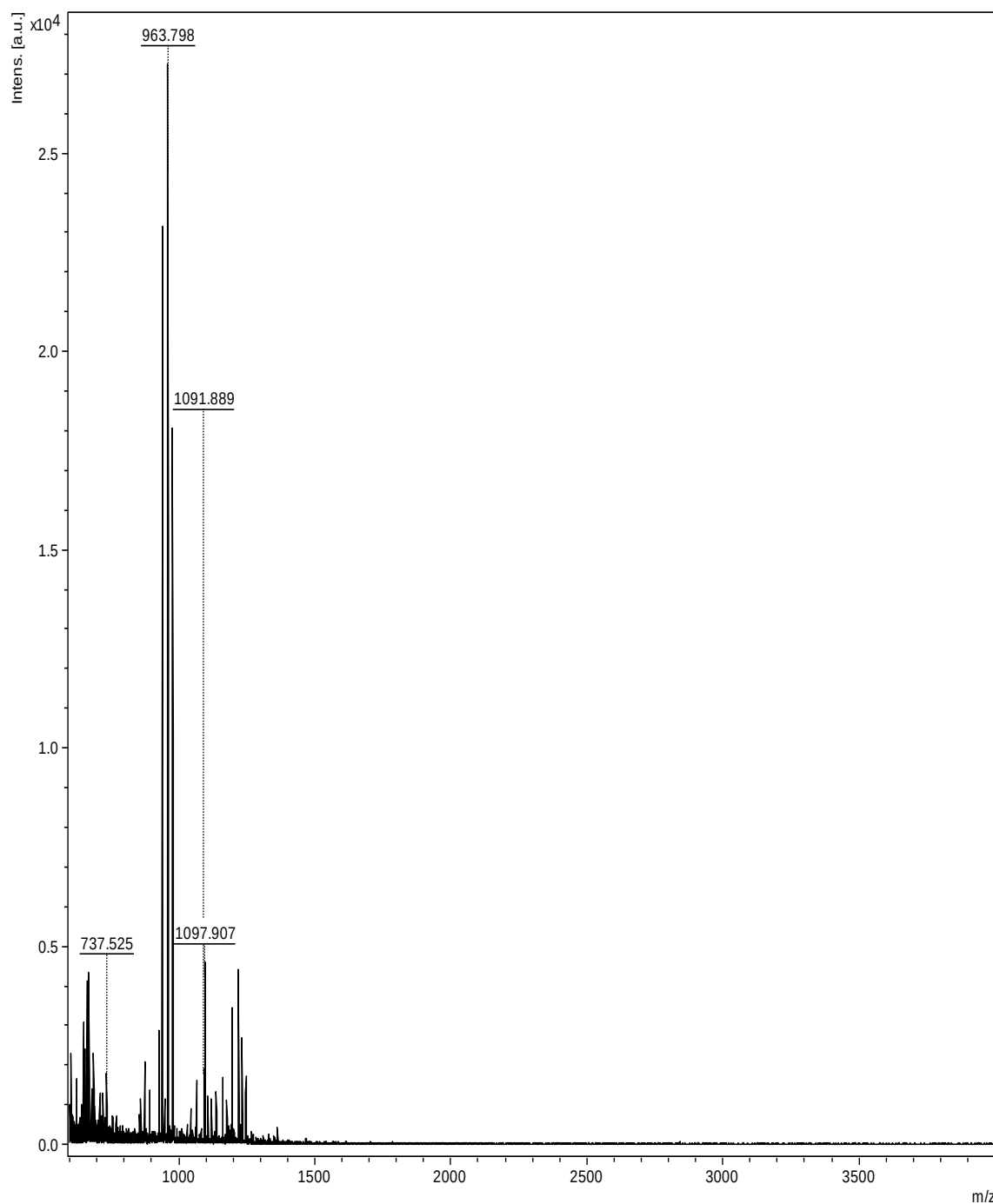
Figura 23. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 55 antes de ser reduzida e alquilada.



5

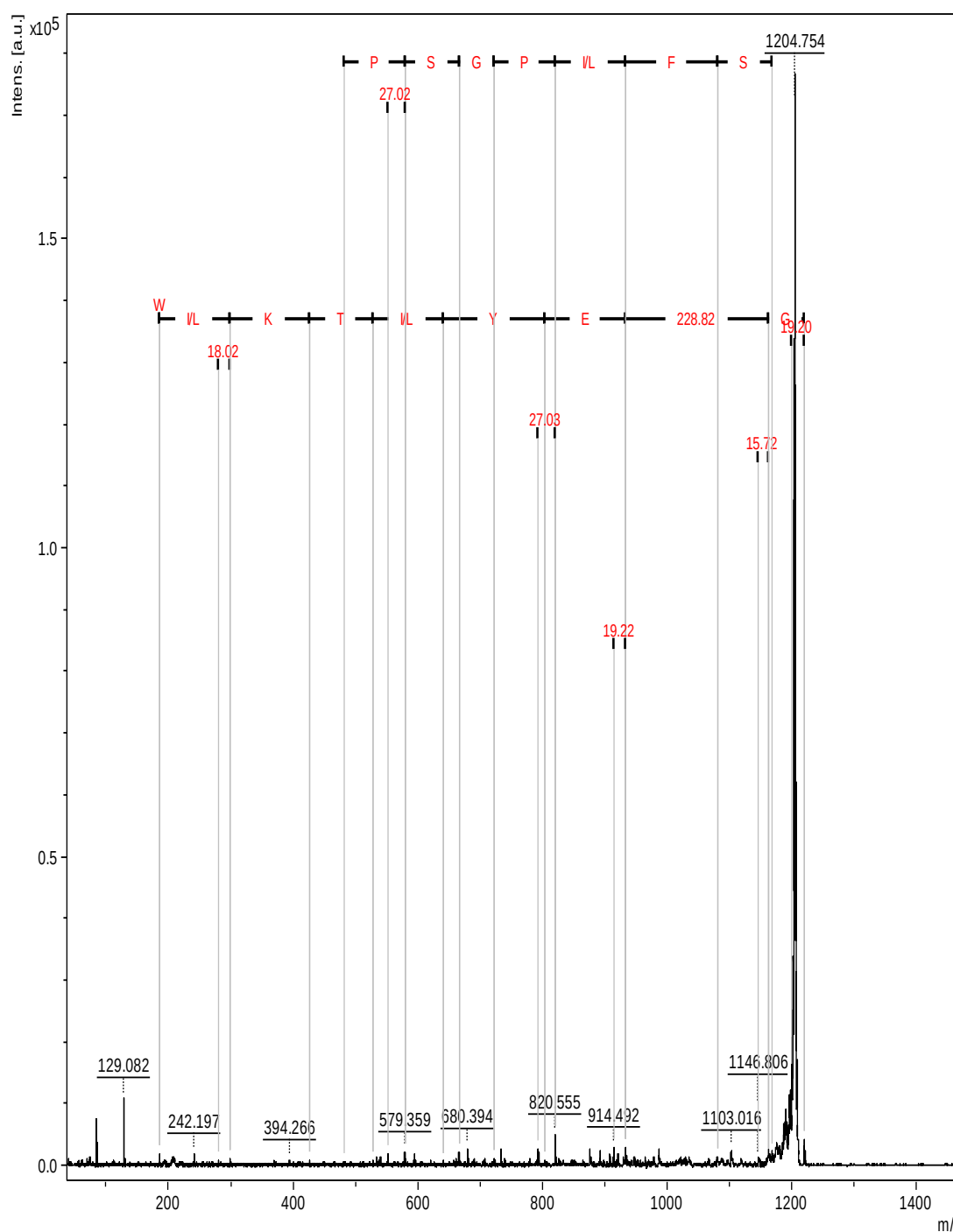
Espectro de massas da fração 55, antes da redução e alquilação. [Origem: fração 55 da cromatografia de Troca Iônica II - proveniente do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio].

Figura 24. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 55 após ser reduzida, alquilada e fragmentada com presença de  $m/z$  de 1.220, 1.097 e 941.



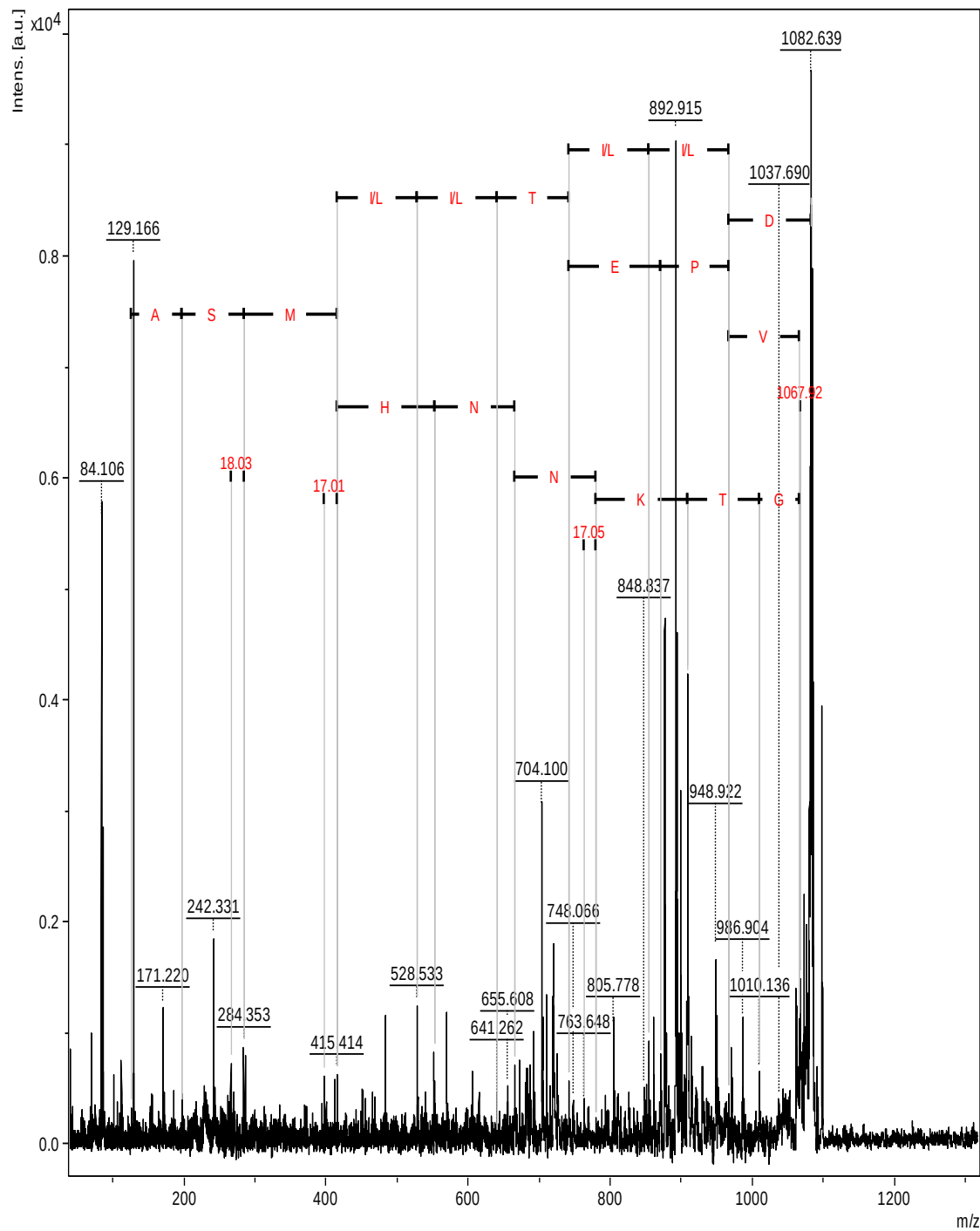
Espectro de massas da fração 55 após ser reduzida, alquilada e fragmentada com  $m/z$  de 1.220, 1.097 e 941. [Origem: fração 55 da cromatografia de Troca Iônica II - proveniente do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio].

Figura 25. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 55 após fragmentação da  $m/z$  1.220, mostrando as prováveis sequências que podem ser obtidas.



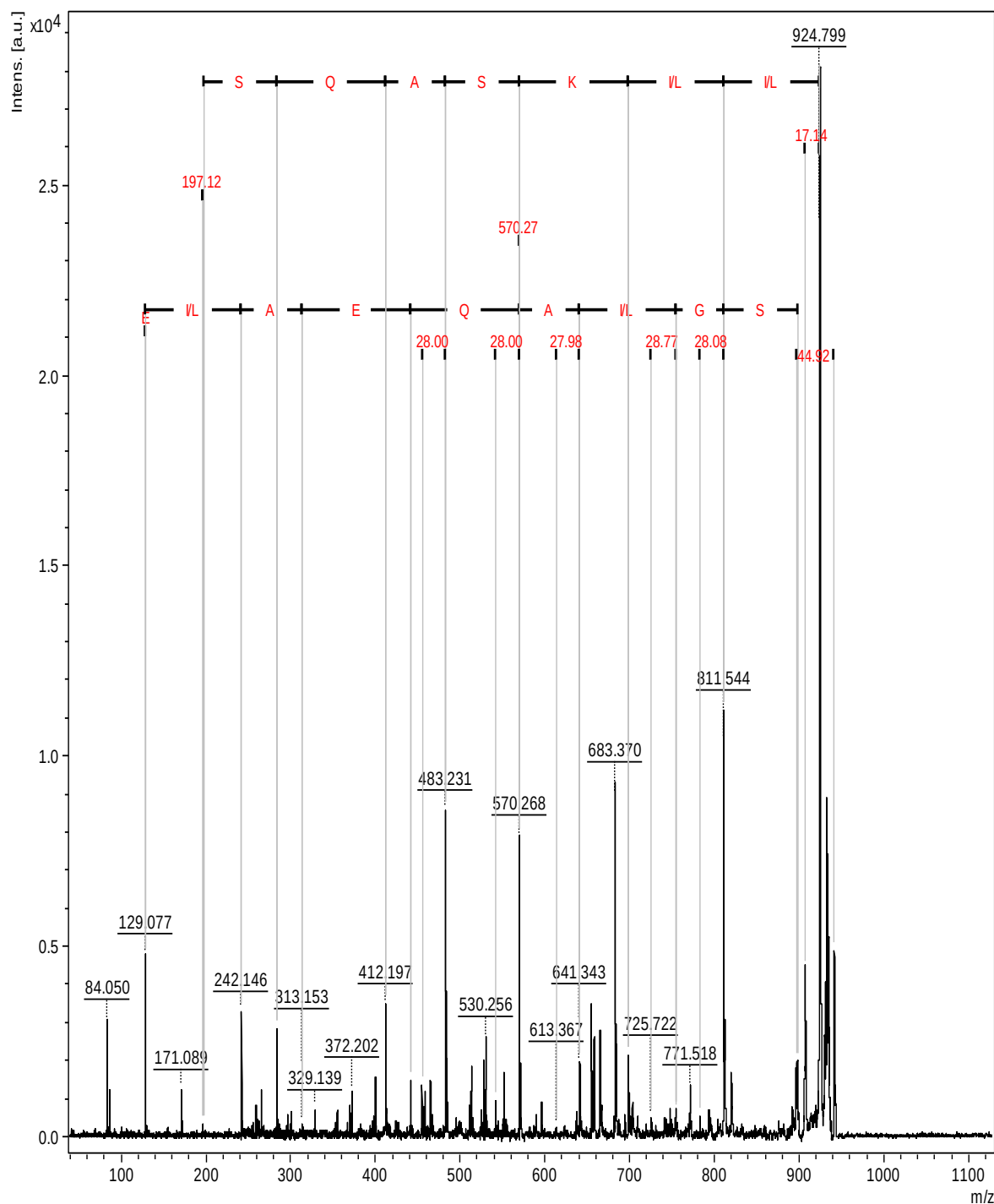
Espectro de massas da fração 55 após fragmentação da substância com  $m/z$  de 1.220, mostrando as prováveis sequências que podem ser obtidas. [Origem: fração 55 da cromatografia de Troca Iônica II - proveniente do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio].

Figura 26. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 55 após fragmentação da  $m/z$  1.097, mostrando as prováveis sequências que podem ser obtidas.



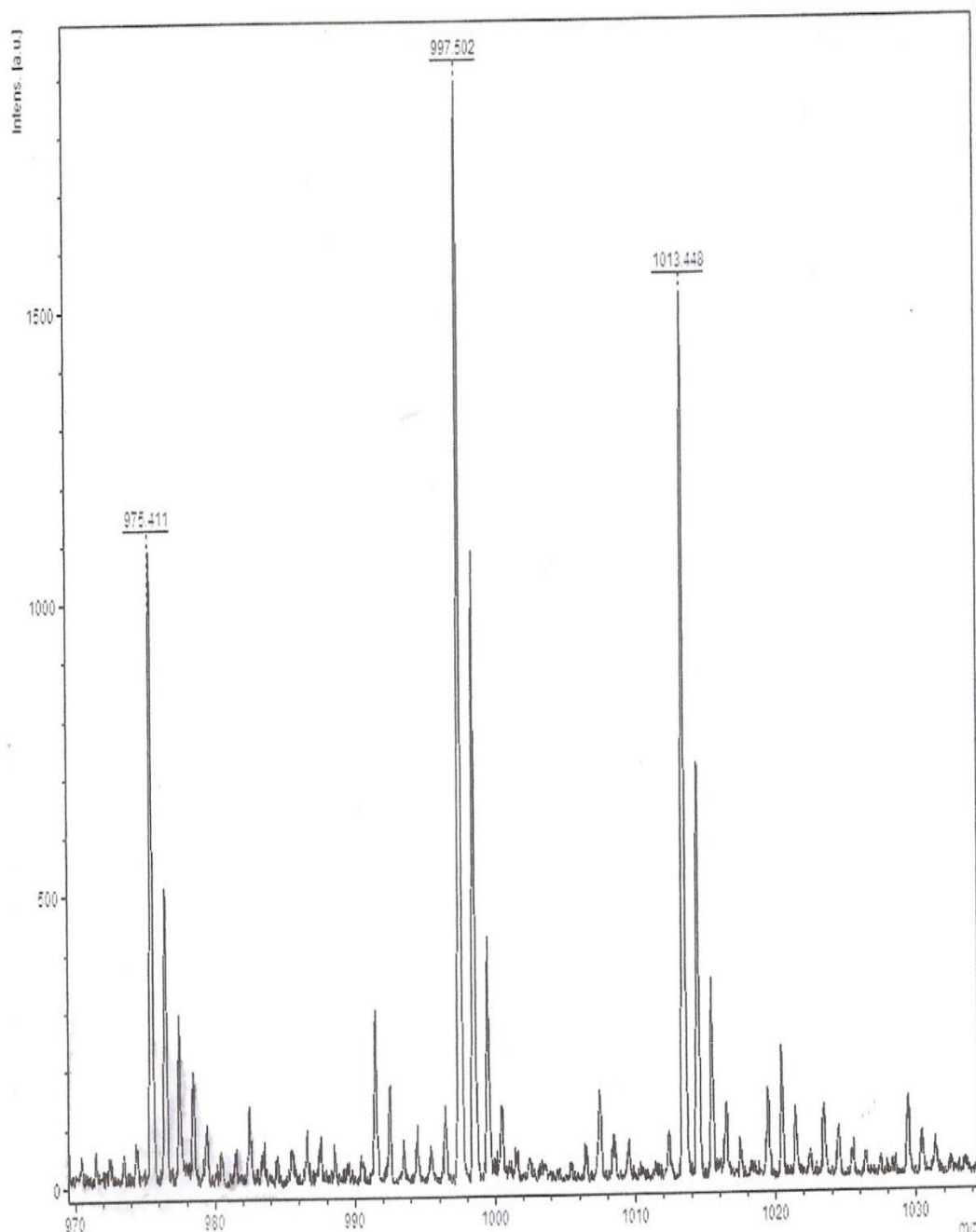
Espectro de massas da fração 55 após fragmentação da substância com  $m/z$  de 1.097, mostrando as prováveis sequências que podem ser obtidas. [Origem: fração 55 da cromatografia de Troca Iônica II - proveniente do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio].

Figura 27. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 55 após fragmentação da  $m/z$  941, mostrando a provável sequência que pode ser obtida.



Espectro de massas da fração 55 após fragmentação da substância com  $m/z$  de 941, mostrando as prováveis sequências que podem ser obtidas. [Origem: fração 55 da cromatografia de Troca Iônica II - proveniente do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio].

Figura 28. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para o peptídio sintético



- 5 Espectro de massas demonstra uma  $m/z$  de 975 que é referente ao peptídio puro, uma  $m/z$  de 997 que se refere ao peptídio mais um íon de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e uma  $m/z$  de 1.013 que é referente ao peptídio mais um íon de potássio ( $\text{K}^+$ ). Portanto, é chegado ao resultado  $m/z$  teórica de 975,48 e  $m/z$  obtida é 975,411. [Origem: fração 55 da cromatografia de Troca Iônica II - proveniente do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio].

(4) EI-30 → Cromatografia de Troca Iônica II → originou a fração 56 que apresentou melhor sinal e pureza mostrando suas m/z antes e após ser reduzida e alquilada, respectivamente (FIG. 29 e FIG. 30). A aquisição das fragmentações pelo modo *lift* das m/z de interesse foram 1.197, 1.229, 1.235 e 1.333, subsequentemente (FIG. 31, FIG. 32, FIG. 33 e FIG. 34). A partir dessas fragmentações foram adquiridos sinais para obtenções dos resíduos de aminoácidos para a formação das sequências primárias

10

- 1.197 m/z: (FIG. 31)

Sequência → (L<sup>I</sup>-K-L<sup>I</sup>-S-A-G-A-G-K-L<sup>I</sup>-E)

15

A partir dessa sequência podemos ter 8 variações simultâneas em relação aos aminoácidos Isoleucina e Leucina.

20

- 1.229 m/z: (FIG. 32)

Sequência → (G-T-L<sup>I</sup>-Q-L<sup>I</sup>-L<sup>I</sup>-S-H-A-L<sup>I</sup>-G-E)

25

A partir dessa sequência podemos ter 16 variações simultâneas em relação aos aminoácidos Isoleucina e Leucina.

Sequência → (L<sup>I</sup>-K-G-T-L<sup>I</sup>-H-K-K-Q-G)

30

A partir dessa sequência podemos ter 4 variações simultâneas em relação aos aminoácidos Isoleucina e Leucina.

- 1.235m/z: (FIG. 33)

Sequência →(E-G-I<sup>L</sup>-A-H-S-I<sup>L</sup>-A-S)

5

A partir dessa sequência podemos ter 4 variações simultâneas em relação aos aminoácidos Isoleucina e Leucina.

10

- 1.333m/z: (FIG. 34)

Sequência →(W-I<sup>L</sup>-A-H-S-N-Q-P-G-E-D-V)

15

(W-**L**-A-H-S-N-Q-P-G-E-D-V)

(W-**I**-A-H-S-N-Q-P-G-E-D-V)

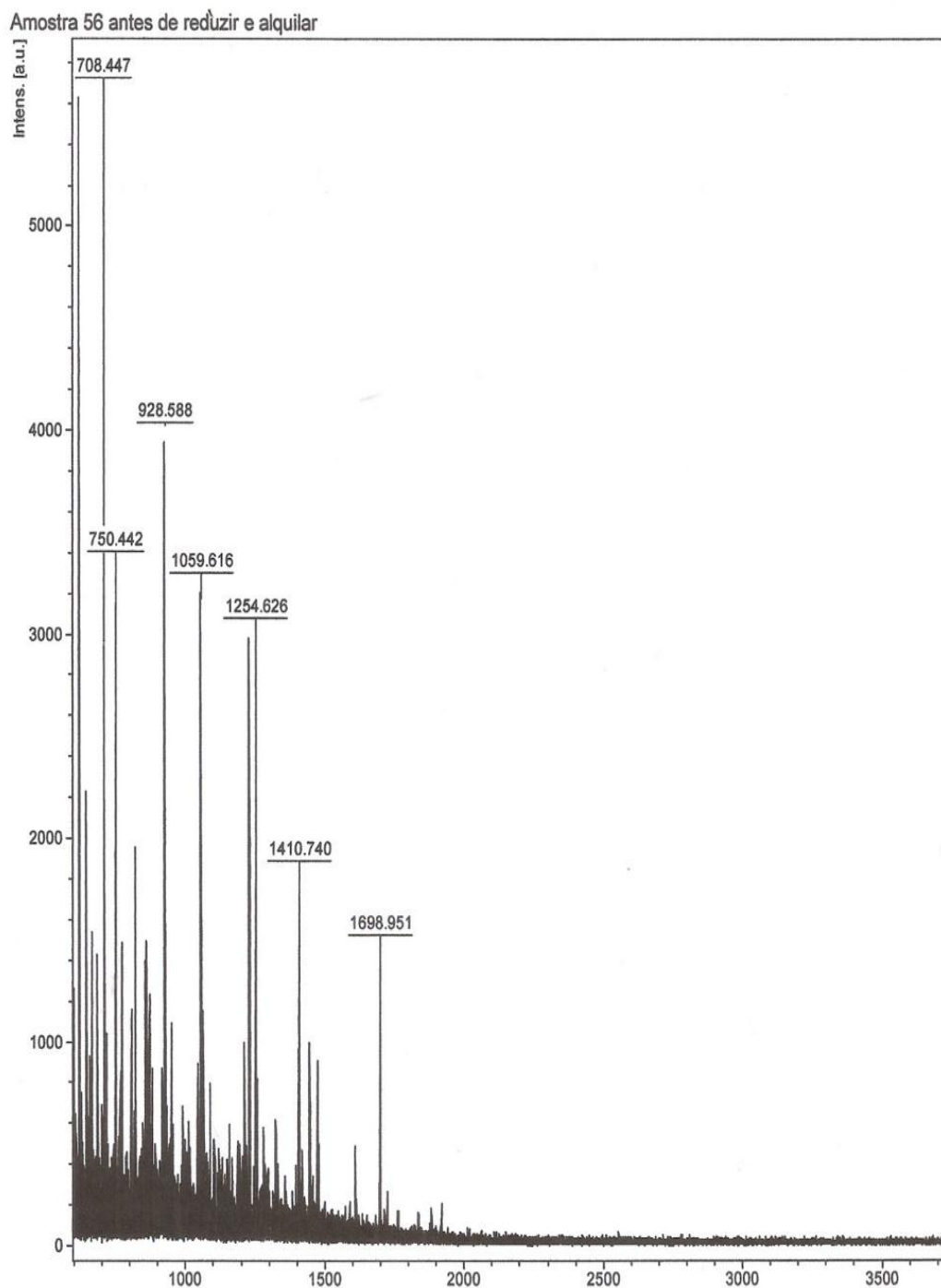
20

A substituição foi feita apenas nos aminoácidos em vermelho, pois as outras leucinas alinhavam com outras sequências.

25

30

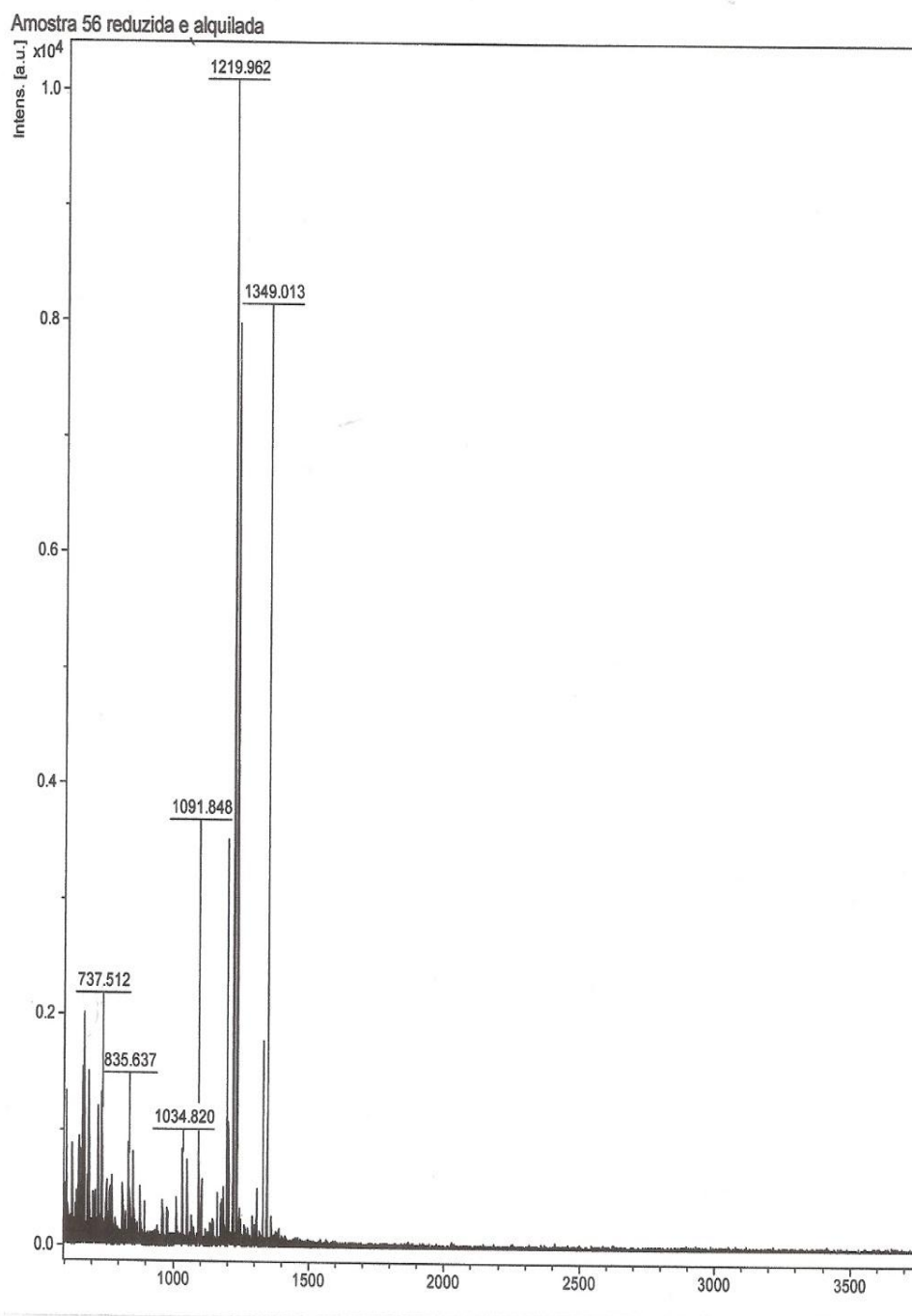
Figura 29. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 56 antes de ser reduzida e alquilada



5

Espectro de massas da fração 56 antes da redução e alquilação. [Origem: fração 56 da cromatografia de Troca Iônica II - proveniente do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio].

Figura 30. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 56 após ser reduzida, alquilada e fragmentada com presença de  $m/z$  de 1.197, 1.229, 1.235 e 1.333.

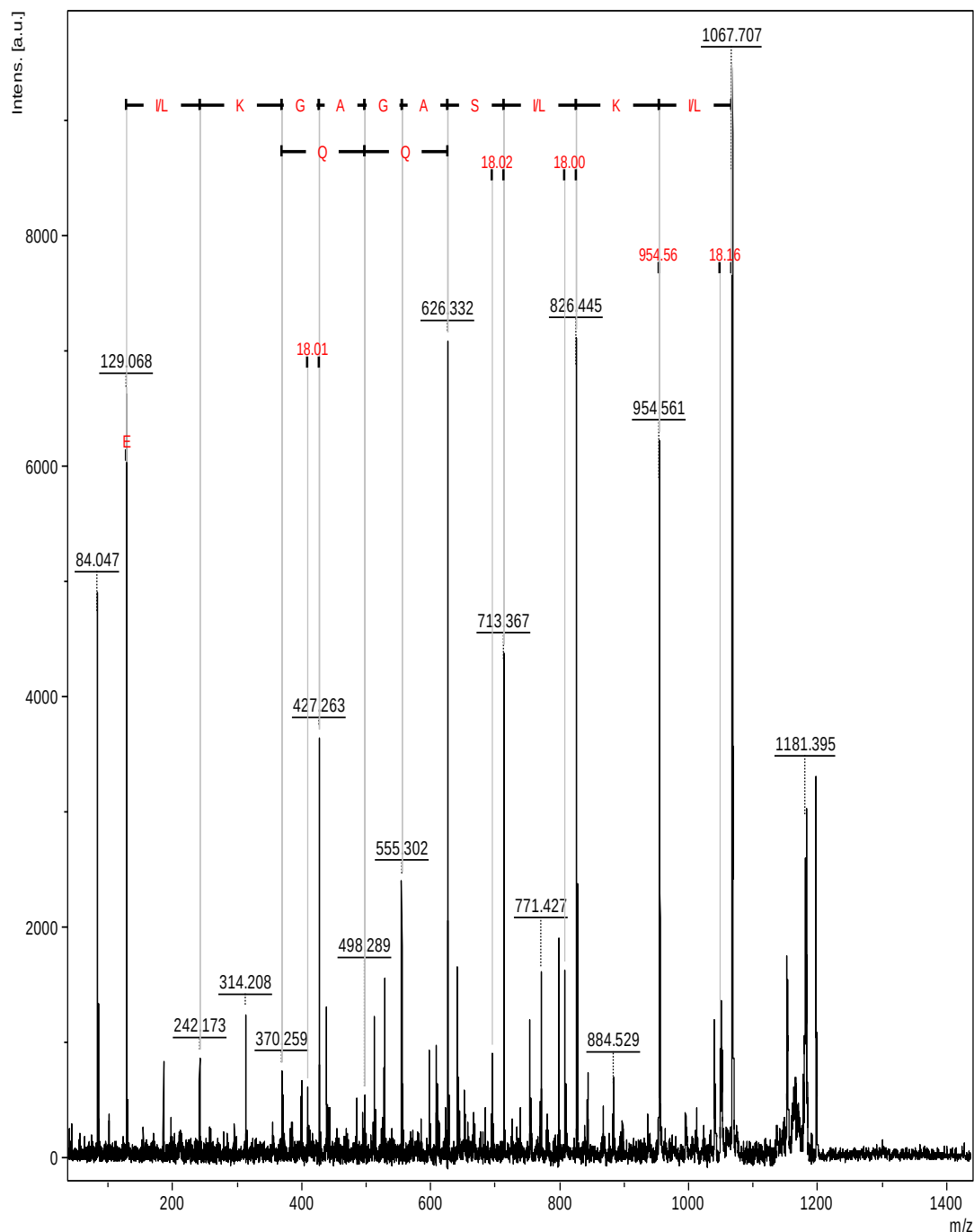


5

Espectro de massas da fração 56 após ser reduzida, alquilada e fragmentada com  $m/z$  de 1.197, 1.229, 1.235 e 1.333. [Origem: fração 56 da cromatografia de Troca Iônica II - proveniente do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio].

10

Figura 31. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 56 após fragmentação da  $m/z$  1.197, mostrando as prováveis sequências que podem ser obtidas.

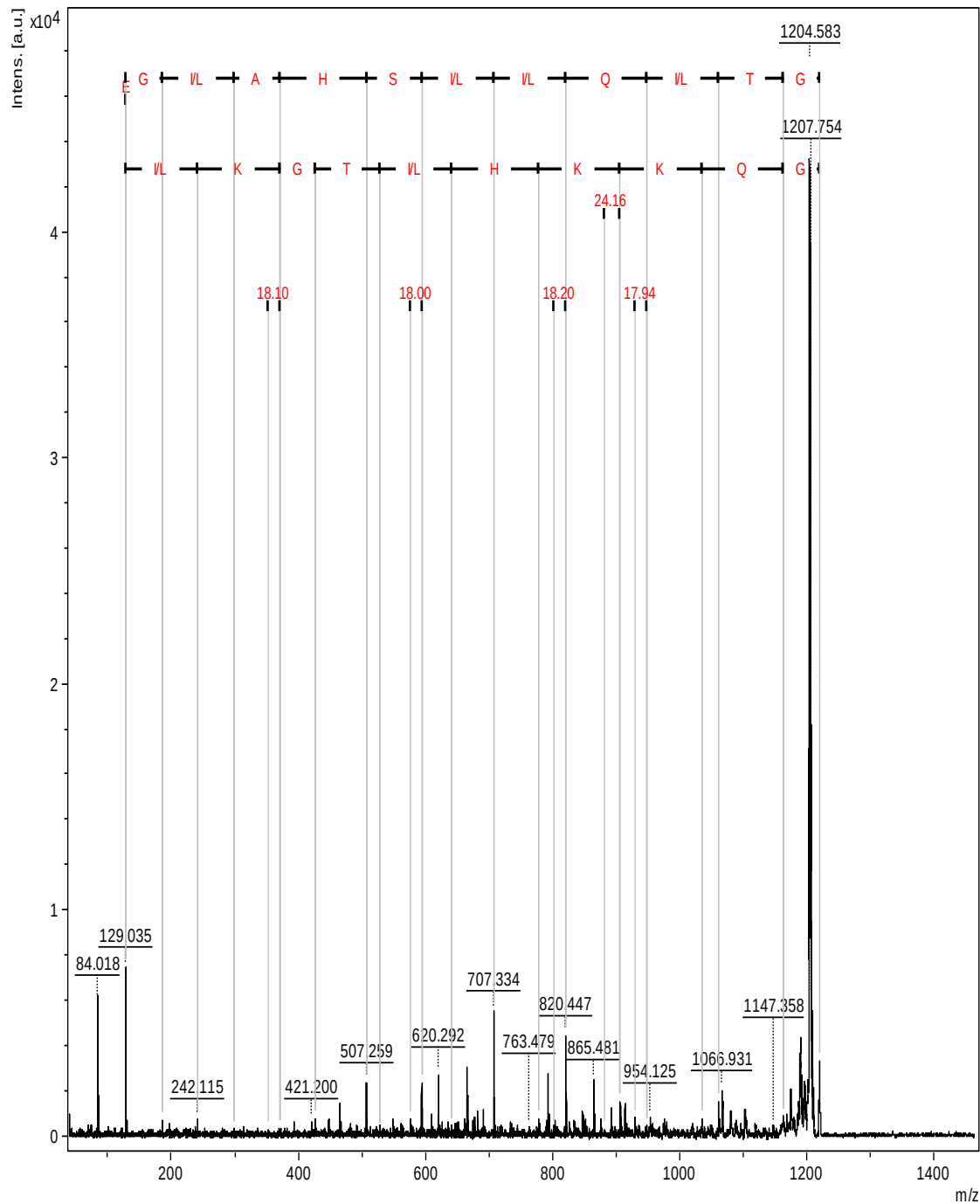


5

Espectro de massas da fração 56 após fragmentação da substância com  $m/z$  de 1.197, mostrando as prováveis sequências que podem ser obtidas. [Origem: fração 56 da cromatografia de Troca Iônica II - proveniente do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio].

10

Figura 32. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 56 após fragmentação da  $m/z$  1.229, mostrando as prováveis sequências que podem ser obtidas.

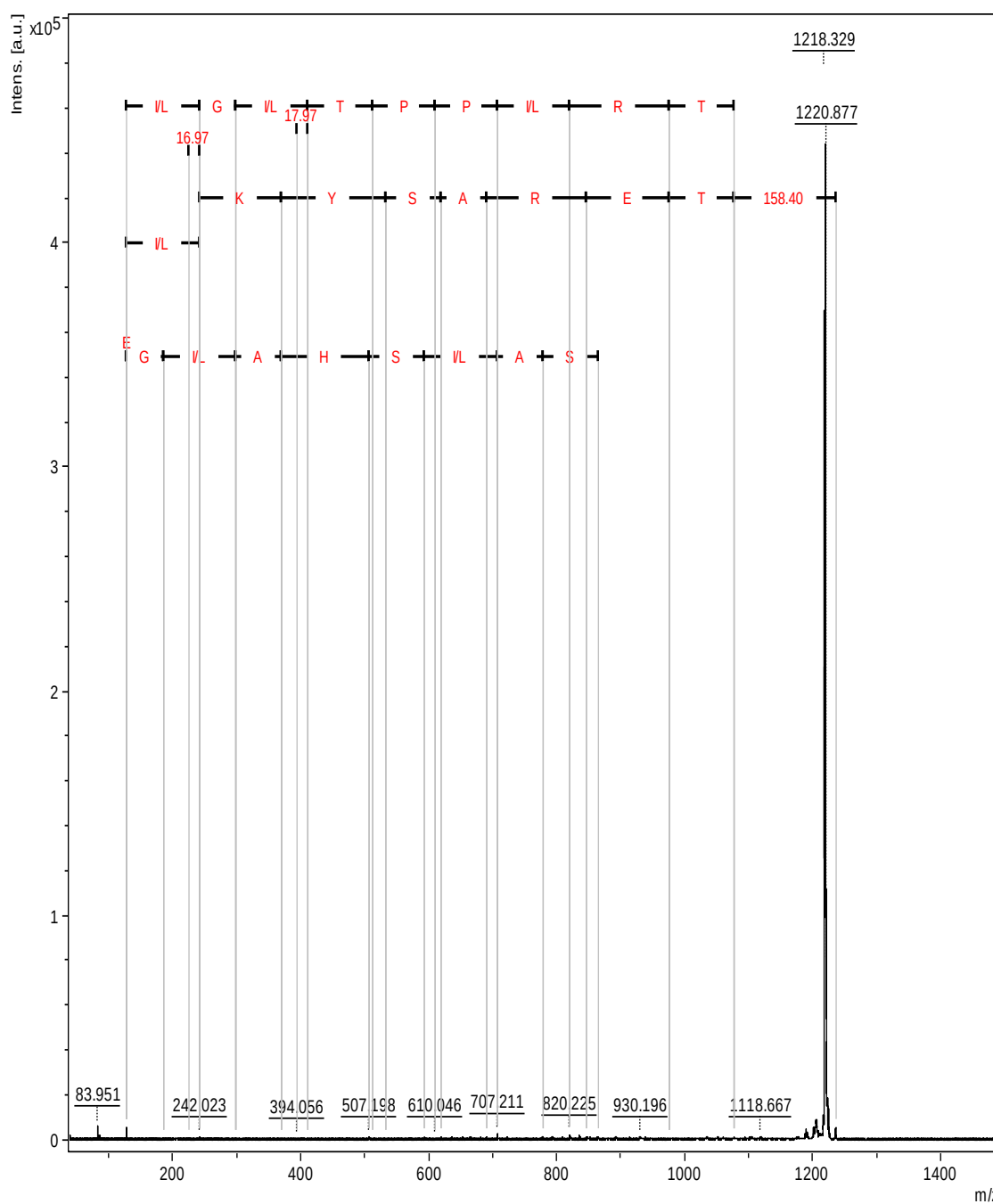


5

Espectro de massas da fração 56 após fragmentação da substância com  $m/z$  de 1.229, mostrando as prováveis sequências que podem ser obtidas. [Origem: fração 56 da cromatografia de Troca Iônica II - proveniente do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio].

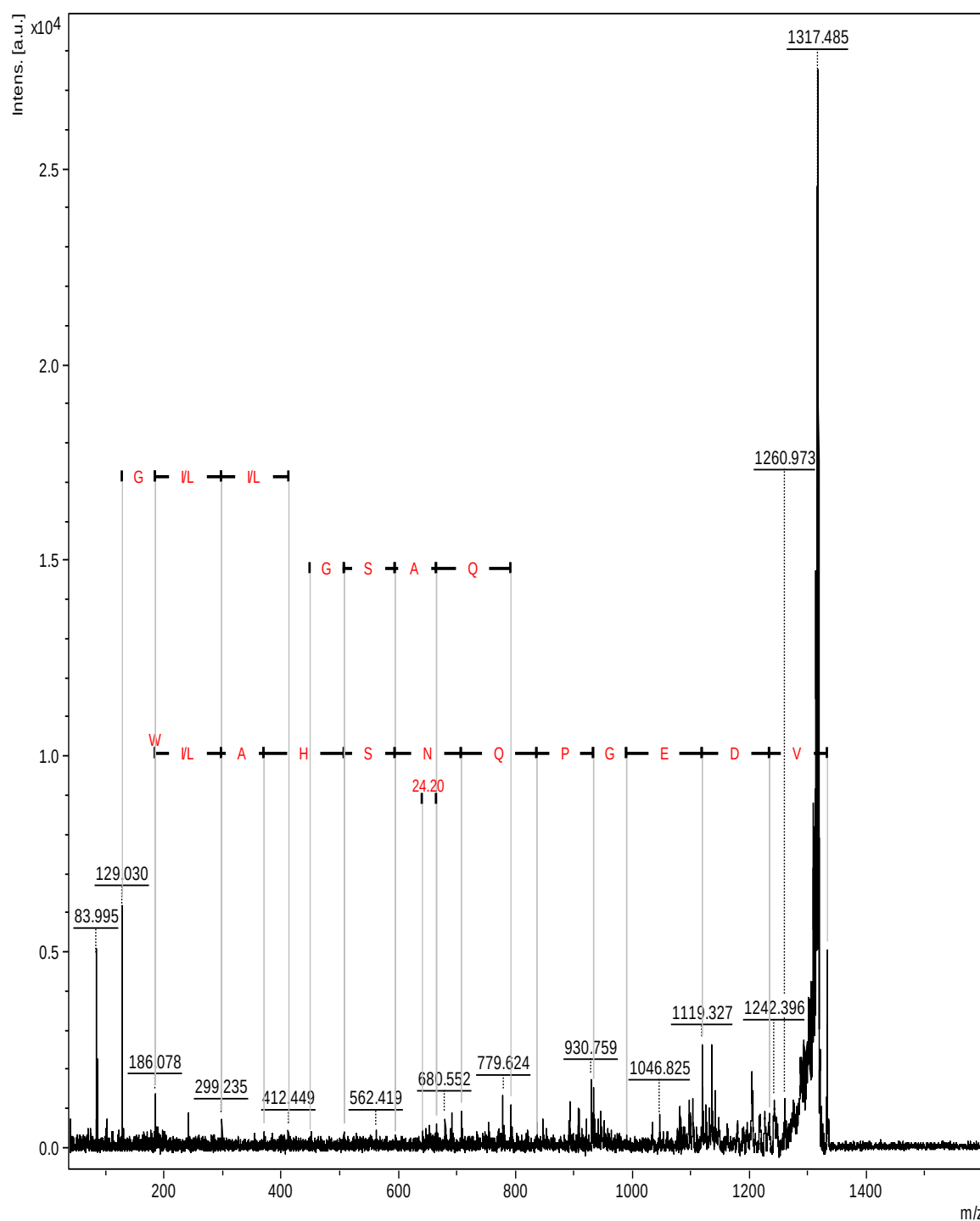
10

Figura 33. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 56 após fragmentação da  $m/z$  1.235, mostrando as prováveis sequências que podem ser obtidas.



Espectro de massas da fração 56 após fragmentação da substância com  $m/z$  de 1.235, mostrando as prováveis sequências que podem ser obtidas. [Origem: fração 56 da cromatografia de Troca Iônica II - proveniente do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio].

Figura 34. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 56 após fragmentação da  $m/z$  1.333, mostrando a provável sequência que pode ser obtida.



5

Espectro de massas da fração 56 após fragmentação da substância com  $m/z$  de 1.333, mostrando as prováveis sequências que podem ser obtidas. [Origem: fração 56 da cromatografia de Troca Iônica II - proveniente do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio].

10

(5) EI-30 → Dispositivo Amicon Ultra 10 kDa → Dispositivo Amicon Ultra 5 kDa → Cromatografia de Fase Reversa III → originou as frações 115, 118, 126 a 131, 178 e 181. A fração 115 apresentou espectro limpo com uma substância de 12.200 m/z. Após tripsinólise e fragmentação pelo modo *lift* foram obtidos os fragmentos

5 1.963, 1.804, [1.773 m/z (FIG.35)], 1.643 e [1.012 m/z (FIG.36)] que foram analisados para a obtenção da sequência primária dos aminoácidos (FIG.35 e FIG.36).

- 10 • Fração 115: 1.963 m/z.

Sequência→ (P-C-E-D-T-E-V-V-N)

15

- Fração 115: 1.804 m/z.

Sequência→ (<sub>L</sub><sup>I</sup>-<sub>L</sub><sup>I</sup>-P-E-N-S-A-E-C-<sub>L</sub><sup>I</sup>-S-D)

20

A partir dessa sequência podemos ter 8 variações simultâneas em relação aos aminoácidos Isoleucina e Leucina.

25

- Fração 115: 1.773 m/z: (FIG. 35)

Sequência→ [(PE)-D-(TS)-E-T-P-F-<sub>L</sub><sup>I</sup>-P]

30

A partir dessa sequência podemos ter 8 variações simultâneas em relação aos aminoácidos Isoleucina, Leucina, Prolina, Ácido Glutâmico, Treonina e Serina.

35

- Fração 115: 1.643 m/z.

Sequência→ [(PA)-C-Y-D-P-<sup>I</sup>-<sup>I</sup>-E-V-V-<sup>I</sup>-P]

5

A partir dessa sequência podemos ter 16 variações simultâneas em relação aos aminoácidos Isoleucina, Leucina, Prolina e Alanina.

10

- Fração 115: 1012 m/z: (FIG. 36)

Sequência→ (K-P-R-H-P-L-Q-H)

15

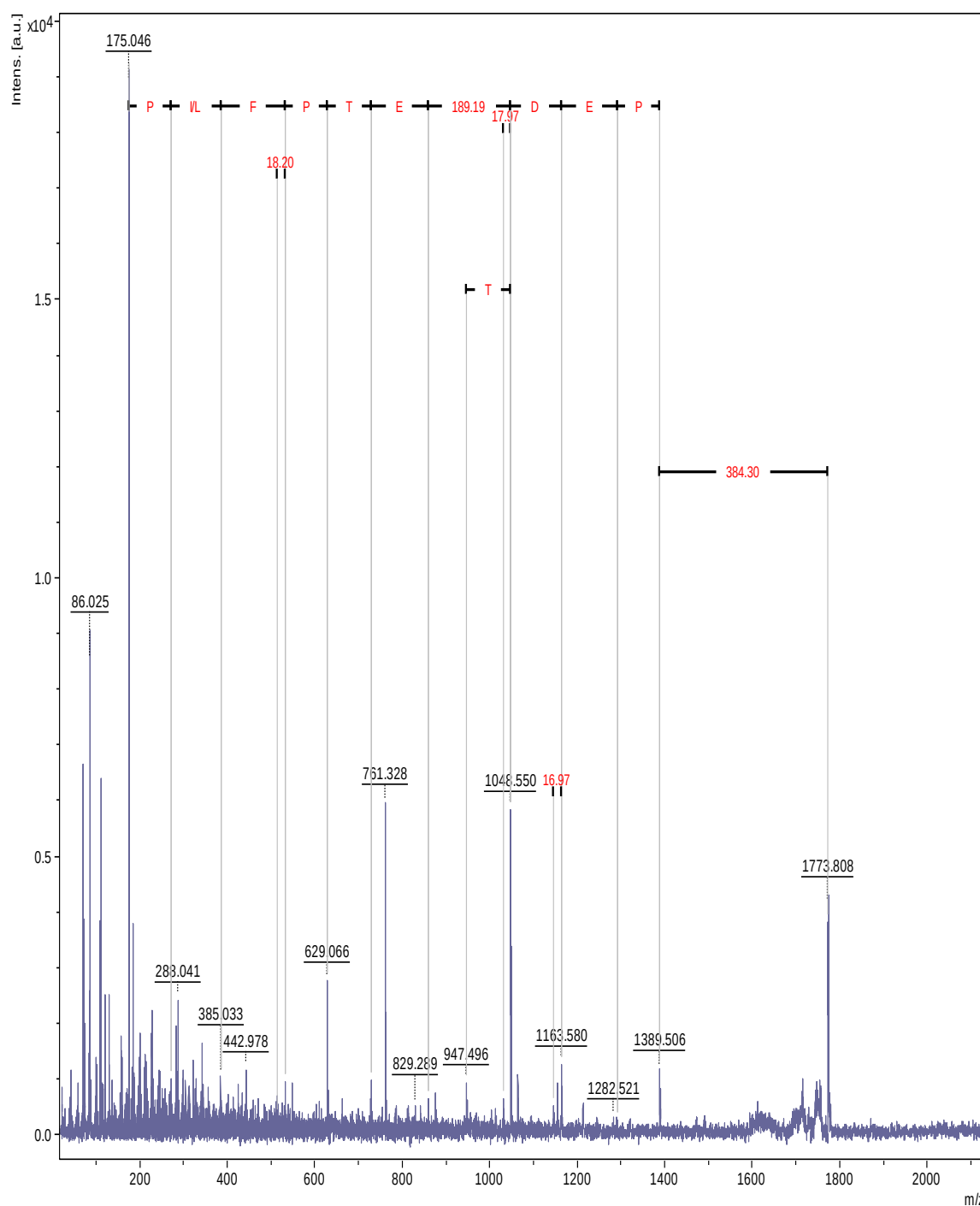
Foi realizada a redução e alquilação para a verificação da presença de cisteína (+57 Da) como também acetilação que altera o N-terminal e a cadeia lateral de lisina (+42 Da), isso facilita a visualização da série b e confirma a presença de lisina em relação à glutamina.

20

25

30

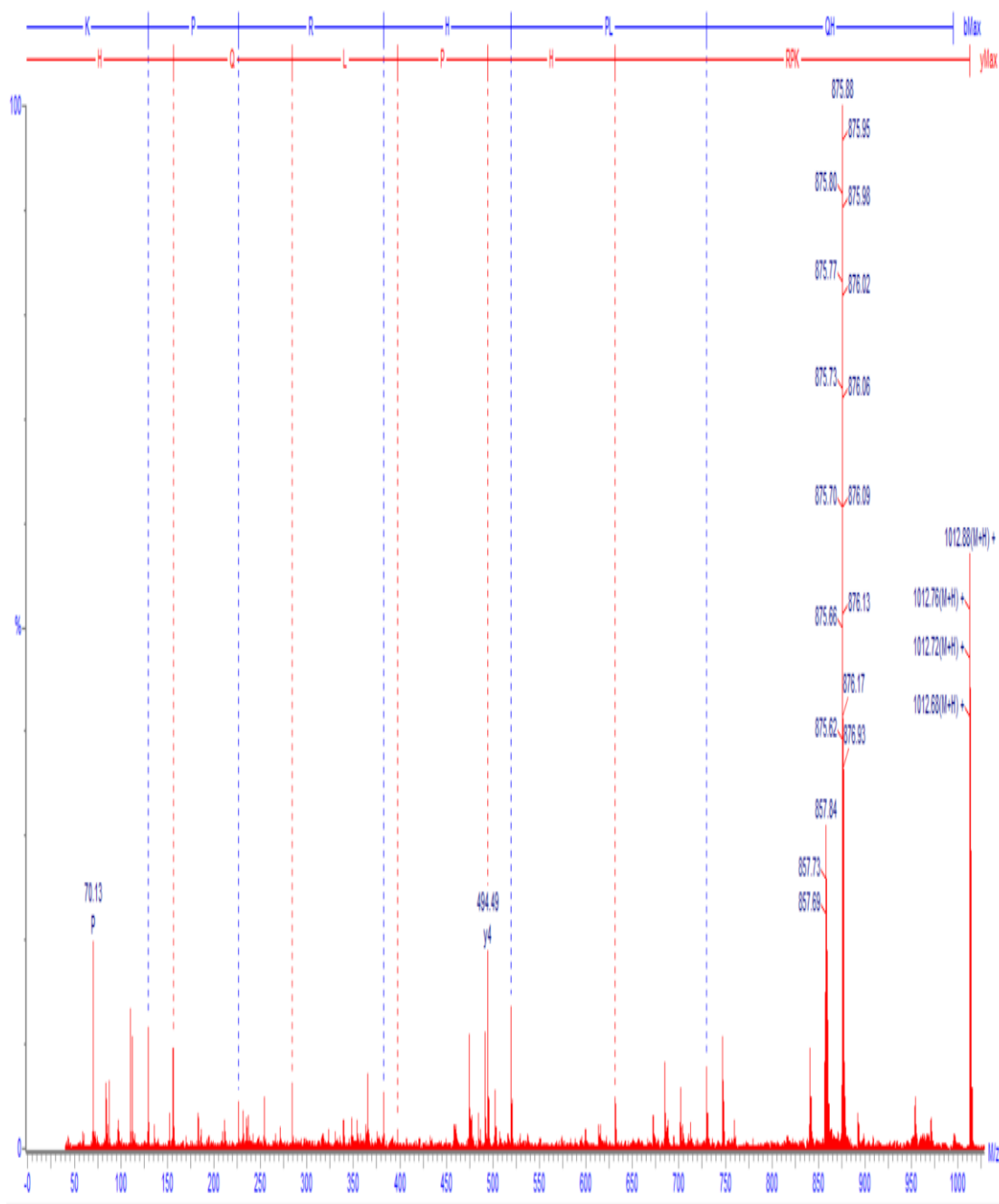
Figura 35. Espectro de massas MALDI TOF/TOF em modo linear para a fração 115 após tripsinólise da  $m/z$  12.200 e fragmentação da  $m/z$  1.773, mostrando a provável sequência que pode ser obtida.



5

Espectro de massas da fração 115 após tripsinólise da substância de  $m/z$  12.200 e fragmentação da substância com  $m/z$  de 1.773. [Origem: fração 115 da cromatografia de Troca Iônica III - obtida do *pool* com massa molecular entre 5 a 10 kDa do dispositivo Amicon Ultra - proveniente do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio].

10



Espectro de massas da fração 115 após tripsinólise da substância de  $m/z$  12.200 e fragmentação da substância com  $m/z$  de 1.012. [Origem: fração 115 da cromatografia de Troca Iônica III - obtida do *pool* com massa molecular entre 5 a 10 kDa do dispositivo Amicon Ultra - proveniente do extrato EI-30, extrato intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado com 30% p/v de sulfato de amônio].

As frações ativas 15 a 55 e fração 67, adquiridas da coluna Superdex 75; foram analisadas por espectrometria de massas. Os espectros de massas que apresentaram sinais limpos de  $m/z$  foram analisados no *web software* Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) (TAB. 1).

5 As sequências dos demais peptídeos foram analisadas no *web software* BLAST, subaplicação Protein BLAST ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)), para verificação de similaridade com outras proteínas. No entanto, será demonstrado aqui apenas as amostras que apresentaram os melhores resultados no ensaio de ação antagonista de peptídeos sintéticos contra o enteropatógeno *S. sonnei* SS12 (item 5.5) (TAB. 2).

15 Tabela 1. Frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular analisadas em espectrômetro de massas e análise da sequência parcial primária sugerida.

| Cromatografia de gel filtração | Amostra | $m/z$ | Sequência de aminoácidos sugerida |
|--------------------------------|---------|-------|-----------------------------------|
| Coluna Superdex 75             | 15      | 711   | QNTAEI                            |
|                                | 18      | 843   | EKEYND                            |
|                                | 21      | 1173  | YKLLIINP                          |
|                                | 30      | 1075  | MKKSEDYSS                         |
|                                | 32      | 944   | QVNFTPGW                          |
|                                | 67      | 1188  | ADRELHRSKA                        |
|                                |         | 1301  | INPELRCGLKD                       |

Tabela 2. Análise em *web software* BLAST da sequência parcial primária sugerida dos peptídeos selecionados para verificação de similaridade com outras proteínas.

| <b>Espectrometria de massas</b> |                                 |                                                                                                   |                   |                       |                |                                |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------|----------------|--------------------------------|
| <b>Peptídios</b>                | <b>Sequência de aminoácidos</b> | <b>Identificação da molécula</b>                                                                  | <b>Identidade</b> | <b>Query Corerage</b> | <b>Valor E</b> | <b>Nº de acesso subject</b>    |
| 3/J3                            | PEDTSETPFLP                     | Proteína hipotética<br><i>Pelagibaculum spongiae</i>                                              | 100%              | 81%                   | 11             | <a href="#">WP_116689198.1</a> |
| 4/J4                            | PEDTSETPFIP                     | Proteína hipotética<br><i>Pelagibaculum spongiae</i>                                              | 100%              | 81%                   | 11             | <a href="#">WP_116689198.1</a> |
| 5/J5                            | KLVFLKTLTSFF                    | Proteína hipotética<br><i>Zhouia amylolytica</i>                                                  | 100%              | 75%                   | 18             | <a href="#">WP_038268127.1</a> |
| 7/J7                            | VPETLLMSA                       | Proteína hipotética<br><i>Desulfobacula</i> sp.                                                   | 100%              | 88                    | 113            | <a href="#">MBT6340473.1</a>   |
| 8/J8                            | DPETLLMSA                       | Proteína contendo domínio EAL<br><i>Duganella aquatilis</i>                                       | 89%               | 100%                  | 80             | <a href="#">WP_154357876.1</a> |
| 10/J10                          | RMLQLSAQLGAGLK                  | Quinolinato sintase NadA<br><i>Sphingobacterium</i> sp.                                           | 100%              | 71%                   | 3.3            | <a href="#">WP_038695003.1</a> |
| 14/J14                          | WLAHSNQPGEDV                    | Proteína de ligação ao ATP do sistema de transporte da família NitT/TauT<br><i>Variovorax</i> sp. | 100%              | 75%                   | 26             | <a href="#">MBB3181633.1</a>   |
| 22/J22                          | INPELRCGLKD                     | Aminoácido permease<br><i>Paraburkholderia mimosarum</i>                                          | 100%              | 81%                   | 11             | <a href="#">WP_238328040.1</a> |

## 5.4 SÍNTESES DE PEPTÍDIOS SOLÚVEIS

Devido à baixa disponibilidade de recursos financeiros para a produção de diversos peptídeos sintéticos em quantidade razoável para a realização dos ensaios, foram selecionadas 31 sequências e suas variáveis, contendo até 20 resíduos de aminoácidos cada, para serem sintetizados (TAB. 3).

Os peptídeos foram produzidos no equipamento ResPep SL sintetizador automatizado utilizando resinas TentaGel ou H-Rink Amide ChemMatrix como suporte, para que no final fossem obtidos peptídeos em forma livre e com um grupamento amida ( $H_2N$ ) na extremidade C-terminal.

Metodologias distintas são empregadas na produção de substâncias bioativas, como aquelas que utilizam técnicas recombinantes ou produção química de peptídeos sintéticos. Assim como diversos procedimentos utilizados nos mais variados estudos, essas técnicas apresentam aspectos positivos e negativos que devem ser analisados com cautela para a escolha mais adequada ao estudo proposto e a viabilidade dos experimentos. Até o final da década de 1990, a maioria dos peptídeos bioativos para uso farmacêutico era produzida por tecnologia recombinante, que apresentavam como desvantagem o alto custo inicial na validação de um produto obtido por OGM. Atualmente a fabricação de drogas peptídicas utilizando a técnica de síntese de peptídeos em fase sólida Fmoc (SPPS) vem ganhando destaque, principalmente pela redução dos custos de produção, observado nas duas últimas décadas, além da síntese de moléculas ativas maiores, com até 200 aminoácidos, permitidas pelo aprimoramento dos equipamentos e metodologias (Mahlapuu *et al.*, 2020).

Embora, para esse trabalho, o custo seja elevado para a fabricação de diversas sequências peptídicas pela técnica SPPS, ainda sim, financeiramente e em curto prazo, parece ser a opção mais adequada para a produção de mais de uma substância proteica com possível ação antagonista.

Tabela 3. Sequências primária de aminoácidos selecionadas para a produção de possíveis peptídios sintéticos ativos

| Peptídios | Sequência de aminoácidos                    |
|-----------|---------------------------------------------|
| 1/J1      | K-P-R-H-P-L-Q-H                             |
| 2/J2      | P-C-E-D-T-E-V-V-N                           |
| 3/J3      | P-E-D-T-S-E-T-P-F-L-P                       |
| 4/J4      | P-E-D-T-S-E-T-P-F-I-P                       |
| 5/J5      | K-L-V-F-L-K-T-L-T-S-F-F                     |
| 6/J6      | L-L-P-E-N-S-A-E-C-L-S-D                     |
| 7/J7      | V-P-E-T-L-L-M-S-A                           |
| 8/J8      | D-P-E-T-L-L-M-S-A                           |
| 9/J9      | R-M-I-Q-L-S-A-Q-L-G-A-G-L-K                 |
| 10/J10    | R-M-L-Q-L-S-A-Q-L-G-A-G-L-K                 |
| 11/J11    | G-N-D-E-Y-L-T-K-L-W                         |
| 12/J12    | G-N-D-E-Y-I-T-K-L-W                         |
| 13/J13    | P-S-G-P-L-F-S.                              |
| 14/J14    | W-L-A-H-S-N-Q-P-G-E-D-V                     |
| 15/J15    | P-A-C-Y-D-P-L-L-E-V-V-L-P                   |
| 16/J16    | E-L-A-E-Q-A-L-G-S-A                         |
| 17/J17    | L-K-L-S-A-G-A-G-K-L-E                       |
| 18/J18    | G-T-L-Q-L-L-S-H-A-L-G-E                     |
| 19/J19    | I-L-K-G-T-L-H-K-K-Q-G                       |
| 20/J20    | E-G-L-A-H-S-L-A-S                           |
| 21/J21    | G-T-K-N-N-H-M-S-A-L.                        |
| 22/J22    | I-N-P-E-L-R-C-G-L-K-D                       |
| 23/J23    | G-T-K-N-N-H-M-S-A-L G-G-G-V-P-E-T-L-L-M-A-S |
| 24/J24    | E-K-E-Y-N-D                                 |
| 25/J25    | Q-N-T-A-E-I                                 |
| 26/J26    | Y-K-L-L-I-I-N-P                             |
| 27/J27    | M-K-K-S-E-D-Y-S-S                           |
| 28/J28    | Q-V-N-F-T-P-G-W                             |
| 29/J29    | A-D-R-E-L-H-R-S-K-A                         |
| 30/J30    | W-I-A-H-S-N-Q-P-G-E-D-V                     |
| 31/J31    | K-T-L-H-A-L-D-V-L-A-G-T-A-E-Q-F-L-L-A       |

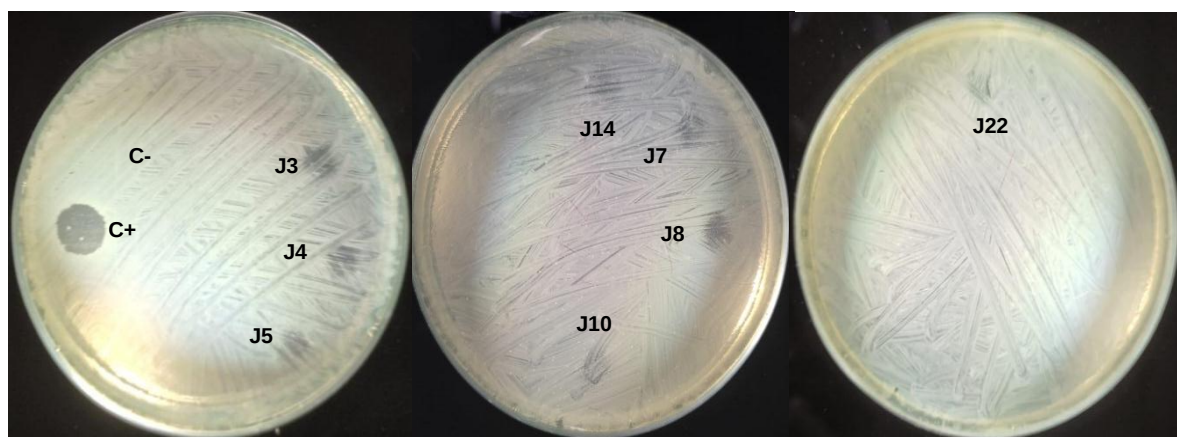
## 5.5 AÇÃO ANTAGONISTA DE PEPTÍDIOS SINTÉTICOS CONTRA O ENTEROPATÓGENO *S. sonnei* SS12

Os 31 peptídeos sintéticos foram analisados pelo ensaio de atividade antagonista contra a amostra reveladora SS12 (TAB. 3). Os halos de inibição contra SS12 foram produzidos pelas amostras 3/J3, 4/J4, 5/J5, 7/J7, 8/J8, 10/J10, 14/J14 e 22/J22 (FIG.37, TAB.3). Como controles positivo e negativo foram utilizados o extrato EI-30 e solução de DMSO 10% + Acn 10%, respectivamente. O dado demonstra que 8/31 substâncias produzidas de forma sintética possuem ação celular contra o enteropatógeno em estudo o que possibilita a ampliação dos ensaios com as substâncias bioativas.

A busca por substâncias capazes de atuar contra *Shigella* é uma medida urgente, apontada pela OMS que publicou, em 2017, uma lista com doze bactérias que requer atenção por ameaçar a saúde humana. A lista foi estruturada para nortear a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos contra esses patógenos, que apresentam, de forma global, perfil de resistência crescente aos antibióticos.

Nessa perspectiva, oito peptídeos sintéticos ativos contra *Shigella sonnei* SS12 é um resultado animador na busca por um composto que apresente indicação terapêutica no tratamento da shigelose grave.

Figura 37. Ação antagonista dos peptídeos sintéticos contra a amostra reveladora *S. sonnei* SS12.



A ação antagonista foi produzida pelas amostras 3/J3, 4/J4, 5/J5, 7/J7, 8/J8, 10/J10, 14/J14 e 22/J22 contra a amostra reveladora *S. sonnei* SS12.

## 5.6 ESPECTROS DA AÇÃO ANTAGONISTA DOS PEPTÍDIOS SINTÉTICOS

Um total de 8 peptídios sintéticos foram confrontados contra um painel de 22 isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Shigella* (12/22) e *E. coli* (10/22) (TAB. 3, TAB. 4, TAB. 5 e FIG. 38). A escolha foi pautada com base na sensibilidade dos isolados frente à amostra produtora *S. sonnei* SS9 e na disponibilidade de amostras pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (Moreira, 2014). Devido ao volume reduzido dos peptídios sintéticos não foi possível a realização do ensaio envolvendo todos os peptídios ativos contra todas as amostras bacterianas mencionadas. Em momento oportuno, novas sínteses serão realizadas e o teste será repetido, priorizando as amostras não confrontadas. Como controle positivo e negativo foram utilizados o extrato EI-30 e solução de DMSO 10% + Acn 10%, respectivamente.

Com base nas amostras testadas, 8/J8 foi a que apresentou o melhor resultado, sendo destacado como peptídio principal, por apresentar halo de inibição maior e mais nítido e ser capaz de atuar contra todos os 12 isolados bacterianos analisados. Em sequência, se considerado os mesmos parâmetros, pode ser alencado 10/J10 e 5/J5 (TAB. 4, TAB. 5 e FIG. 38). Em resumo, os resultados positivos estão compilados na tabela 5.

25

30

Tabela 4. Espectro de ação antagonista dos peptídios sintéticos contra isolados de *Shigella* spp. e *E. coli*

|                                    | 3/J3 | 4/J4 | 5/J5 | 7/J7 | 8/J8 | 10/J10 | 14/J14 | 22/J22 | C+ | C- |
|------------------------------------|------|------|------|------|------|--------|--------|--------|----|----|
| <b>Bactérias</b>                   |      |      |      |      |      |        |        |        |    |    |
| <b><i>Shigella</i> spp. 23.05</b>  | -    | -    | NT   | -    | NT   | NT     | -      | NT     | +  | -  |
| <b><i>Shigella</i> spp. 114.05</b> | -    | -    | NT   | -    | +    | -      | -      | NT     | +  | -  |
| <b><i>Shigella</i> spp. 122.06</b> | -    | -    | NT   | -    | +    | -      | -      | NT     | +  | -  |
| <b><i>Shigella</i> spp. 164.05</b> | -    | -    | NT   | -    | NT   | NT     | -      | NT     | +  | -  |
| <b><i>Shigella</i> spp. 193.05</b> | -    | -    | +    | +    | +    | -      | NT     | NT     | +  | -  |
| <b><i>Shigella</i> spp. 257.05</b> | +    | +    | +    | +    | +    | +      | +      | NT     | +  | -  |
| <b><i>Shigella</i> spp. 271.05</b> | -    | -    | NT   | -    | NT   | NT     | -      | NT     | +  | -  |
| <b><i>Shigella</i> spp. 273.04</b> | -    | -    | NT   | -    | NT   | +      | +      | NT     | +  | -  |
| <b><i>Shigella</i> spp. 348.05</b> | -    | -    | NT   | -    | +    | -      | -      | NT     | +  | -  |
| <b><i>Shigella</i> spp. 394.07</b> | +    | -    | NT   | -    | +    | +      | -      | NT     | +  | -  |
| <b><i>Shigella</i> spp. 590.05</b> | +    | +    | NT   | -    | NT   | NT     | -      | NT     | +  | -  |
| <b><i>Shigella</i> spp. 3496</b>   | +    | +    | +    | +    | +    | +      | -      | +      | +  | -  |
| <b><i>E. coli</i> 12</b>           | -    | -    | NT   | -    | +    | +      | -      | NT     | +  | -  |
| <b><i>E. coli</i> 16</b>           | -    | -    | NT   | -    | +    | +      | -      | NT     | +  | -  |
| <b><i>E. coli</i> 32</b>           | -    | -    | NT   | -    | +    | +      | -      | NT     | +  | -  |
| <b><i>E. coli</i> 37</b>           | -    | -    | NT   | -    | NT   | NT     | -      | NT     | +  | -  |
| <b><i>E. coli</i> 41</b>           | -    | -    | NT   | NT   | NT   | NT     | -      | NT     | +  | -  |
| <b><i>E. coli</i> 44</b>           | -    | -    | NT   | -    | NT   | NT     | -      | NT     | +  | -  |
| <b><i>E. coli</i> 47</b>           | +    | -    | NT   | -    | +    | +      | -      | NT     | +  | -  |
| <b><i>E. coli</i> 48</b>           | -    | -    | NT   | -    | NT   | NT     | -      | NT     | +  | -  |
| <b><i>E. coli</i> P8EC2</b>        | -    | -    | +    | -    | +    | -      | -      | -      | +  | -  |
| <b><i>E. coli</i> P15EC3</b>       | -    | -    | NT   | -    | NT   | NT     | -      | NT     | +  | -  |

NT, Não Testado; C+, controle positivo; C-, controle negativo.

Tabela 5. Ação antagonista dos peptídios sintéticos contra isolados de *Shigella* spp. e *E. coli*

| <b>Amostras bacterianas</b> |                   |                    |                               |                                |                                 |                         |                          |                            |
|-----------------------------|-------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Peptídeos sintéticos        | Amostras testadas | Amostras sensíveis | <i>Shigella</i> spp. testadas | <i>Shigella</i> spp. sensíveis | <i>Shigella</i> spp. resistente | <i>E. coli</i> Testadas | <i>E. coli</i> sensíveis | <i>E. coli</i> resistentes |
| <b>3/J3</b>                 | 22                | 5                  | 12                            | 4                              | 8                               | 10                      | 1                        | 9                          |
| <b>4/J4</b>                 | 22                | 3                  | 12                            | 3                              | 9                               | 10                      | 0                        | 10                         |
| <b>5/J5</b>                 | 4                 | 4                  | 3                             | 3                              | 0                               | 1                       | 1                        | 0                          |
| <b>7/J7</b>                 | 21                | 3                  | 12                            | 3                              | 9                               | 9                       | 0                        | 9                          |
| <b>8/J8</b>                 | 12                | 12                 | 7                             | 7                              | 0                               | 5                       | 5                        | 0                          |
| <b>10/J10</b>               | 13                | 8                  | 8                             | 4                              | 4                               | 5                       | 4                        | 1                          |
| <b>14/J14</b>               | 21                | 2                  | 11                            | 2                              | 9                               | 10                      | 0                        | 10                         |
| <b>22/J22</b>               | 2                 | 1                  | 1                             | 1                              | 0                               | 1                       | 0                        | 1                          |

5

10

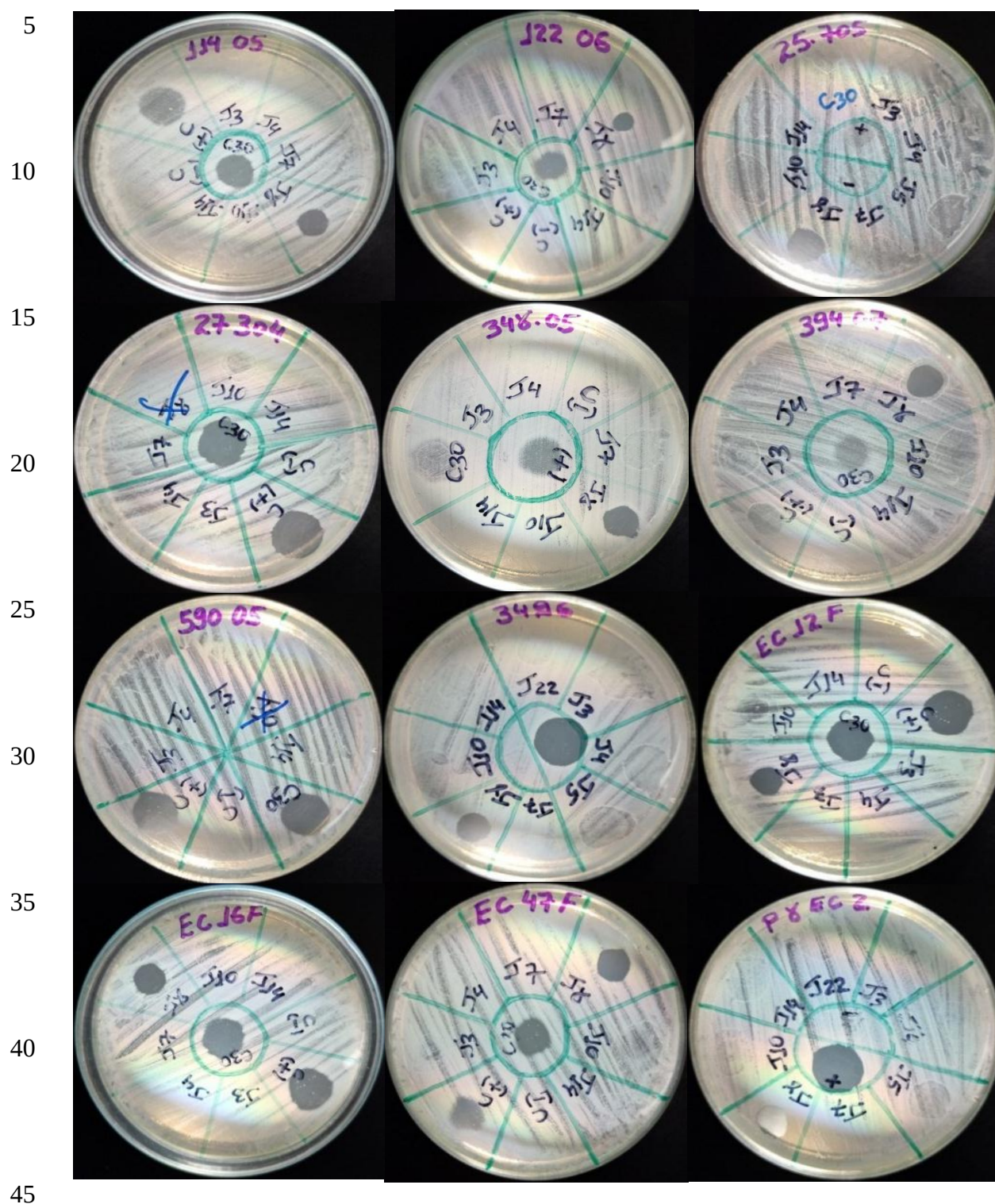
15

20

25

30

Figura 38. Atividade antagonista dos peptídios sintéticos contra as amostras reveladoras: *Shigella* spp. e *E. coli*



Halos de inibição produzidos pelos peptídios sintéticos 3/J3, 4/J4, 5/J5, 7/J7, 8/J8, 10/J10, 14/J14, 22/J22 contra as amostras reveladoras selecionadas: *Shigella* spp. e *E. coli*. Controle positivo, EI-30 e controle negativo, solução de DMSO 10% + Acn 10%.

## 5.7 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DOS PEPTÍDIOS SOLÚVEIS

Embora 8/31 peptídeos sintéticos tenham sido ativos contra SS12, a análise físico-química foi realizada com todas as amostras. A título de facilitar o entendimento dos resultados, serão discutidos aqui apenas os peptídeos bioativos. Os 31 peptídeos sintéticos foram ressuspensos em (DMSO 10% + Acn 10%) e analisados por espectrometria de massas para confirmar a massa molecular e pureza. Alguns peptídeos antimicrobianos apresentam-se com pequenas sequências primárias que tem influência direta em sua estrutura, a carga líquida presente pode trabalhar na atração eletrostática do peptídeo com a membrana bacteriana e a característica hidrofóbica pode estar associada à ação do peptídeo com a membrana (Yeaman e Yount, 2003). Com base na sequência de aminoácidos, análises físico-químicas foram realizadas no *software* ProtParam, quais sejam: o número de resíduos de aminoácidos por peptídeo, massa molecular (MM), ponto isoelétrico teórico, número total de resíduos com carga (-) (Asp+Glu), número total de resíduos com carga (+) (Arg+Lys), N-terminal da sequência e média geral de hidrofobicidade (GRAVY) (TAB.6).

Os 8 peptídeos são moléculas pequenas, com variação m/z entre 960 a 1485 e número de resíduos de aminoácidos entre 09 a 14 (TAB.6). De forma geral, peptídeos antimicrobianos de tamanho reduzido despertam a atenção de indústrias farmacêuticas, por serem moléculas com robustos mecanismos de ação biomiméticos, apresentam custo de produção mais reduzido e síntese relativamente mais simples se comparado aos compostos biológicos (Cardoso *et al.*, 2021).

Dos 8 peptídeos em análise, 2, 5/J5 e 10/J10, são substâncias catiônicas, por apresentarem carga líquida positiva, (+2) para ambos, e pI de 10 e 11, respectivamente (TAB.6). Usualmente, os AMPs são substâncias que possuem carga líquida +2 a +9 e pI 8.9 a 10.7, caracterizando-os como substâncias catiônicas, esse perfil da molécula viabiliza a interação eletrostática entre a porção catiônica do peptídeo e os fosfolípidos aniônicos e grupo fosfato dos lipopolissacarídeos das bactérias Gram-negativas e ácido teicóico das bactérias Gram-positivas. Também é observada uma relação entre a carga catiônica da molécula e atividade antibacteriana mais elevada. Embora a carga catiônica da substância seja importante na atividade antimicrobiana, essa correlação carga

catiônica versus atividade antibacteriana não é linear, pois quando o limite ou platô é alcançado não é observado um aumento progressivo da atividade (Brogden, 2005; Jiang *et al.*, 2008 Jeżowska-Bojczuk & Stokowa-Sołtys, 2018; Zhang *et al.*, 2021).

Os 6 peptídios bioativos restantes são moléculas aniônicas, com carga líquida de -1 (7/J7), -2 (8/J8, 14/J14 e 22/J22) e -3 (3/J3 e 4/J4) e pI de 3.57 (3/J3 e 4/J4), 3.67 (8/J8), 4 (7/J7), 4.35 (14/J14) e 6.06 (22/J22) (TAB.5). AMPs aniônicos, geralmente são menos relatados na literatura do que os AMPs catiônicos. Eles são caracterizados como substâncias de carga líquida -1 a -8, que interagem com a célula bacteriana após a utilização de cofatores íons metálicos, como o zinco, para a formação de pontes salinas catiônicas entre o peptídio e compostos negativos da parede celular bacteriana (Harris *et al.*, 2009; Jeżowska-Bojczuk & Stokowa-Sołtys, 2018; Zhang *et al.*, 2021). Habitualmente esses peptídios são frutos de moléculas maiores, que, após sofrerem fragmentação por proteólise, geram estruturas menores carregadas negativamente (Zhang *et al.*, 2021). A tripsinólise e a fragmentação por *lift*, realizadas nesse trabalho com as frações ativas, promoveram a segmentação de substâncias maiores, a sequência peptídica gerada, utilizada como modelo, serviu para a produção dos peptídios bioativos em estudo.

Característica hidrofóbica também é encontrada na maioria dos AMPs, que utilizam essa porção da molécula para a interação com a célula-alvo, formando estruturas anfifílicas, sendo essa hidrofobicidade definida como a porcentagem de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes na cadeia primária da sequência do peptídio (Lewies *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2021). Essa particularidade também foi encontrada na maioria dos peptídios sintéticos aqui estudados, como pode ser observado o caráter negativo do grau de hidrofobicidade (TAB.6).

Já aqueles peptídios hidrofílicos podem ter acesso ao meio intracelular bacteriano, como acontece para diversos membros da família enterobacteriaceae, através dos canais de porinas, que são preenchidos por água, e permitem o transporte passivo de moléculas pequenas hidrofílicas. Além dos peptídios antimicrobianos, bacteriocinas, como a colicina E9, alcança o meio intracelular das bactérias pelas porinas OmpF e OmpC (Prajapati *et al.*, 2021). Dessa maneira, é plausível supor que os peptídios ativos descritos nesse trabalho, que possuem caráter hidrofílico por apresentar carga positiva no quesito grau de hidrofobicidade, tem como porta de entrada na bactéria alvo esses canais inespecíficos (TAB. 6).

Tabela 6. Análise físico-química dos peptídios solúveis realizadas no *web software* ProtParam

| Peptídio | Nº de aa | M M   | pl teórico | Nº de resíduos com carga (-) | Nº total de resíduos com carga (+) | N-termina I | Grau de hidrofobicidade |
|----------|----------|-------|------------|------------------------------|------------------------------------|-------------|-------------------------|
| 1/J1     | 8        | 1.012 | 11.0       | 0                            | 2                                  | K (Lya)     | -2,12                   |
| 2/J2     | 9        | 1.005 | 3.57       | 3                            | 0                                  | P (Pro)     | -0,600                  |
| 3/J3     | 11       | 1.232 | 3.57       | 3                            | 0                                  | P (Pro)     | -0,991                  |
| 4/J4     | 11       | 1.232 | 3.57       | 3                            | 0                                  | P (Pro)     | -0,927                  |
| 5/J5     | 12       | 1.443 | 10.0       | 0                            | 2                                  | K (Lya)     | -1,167                  |
| 6/J6     | 12       | 1.290 | 3.57       | 3                            | 0                                  | L (Leu)     | -0,125                  |
| 7/J7     | 9        | 960   | 4.00       | 1                            | 0                                  | V (Val)     | 0,989                   |
| 8/J8     | 9        | 976   | 3.67       | 2                            | 0                                  | D (Asp)     | 0,133                   |
| 9/J9     | 14       | 1.485 | 11.0       | 0                            | 2                                  | R (Arg)     | 0,314                   |
| 10/J10   | 14       | 1.485 | 11.0       | 0                            | 2                                  | R (Arg)     | 0,264                   |
| 11/J11   | 10       | 1.238 | 4.37       | 2                            | 1                                  | G (Gly)     | -1,010                  |
| 12/J12   | 10       | 1.238 | 4.37       | 2                            | 1                                  | G (Gly)     | -0,940                  |
| 13/J13   | 7        | 703   | 5.96       | 0                            | 0                                  | P (Pro)     | 0,200                   |
| 14/J14   | 12       | 1.352 | 4.35       | 2                            | 0                                  | W (Trp)     | -0,925                  |
| 15/J15   | 13       | 1.428 | 3.67       | 2                            | 0                                  | P (Pro)     | 0,846                   |
| 16/J16   | 10       | 988   | 3.80       | 2                            | 0                                  | E (Glu)     | 0,130                   |
| 17/J17   | 11       | 1.086 | 8.59       | 1                            | 2                                  | L (Leu)     | 0,191                   |
| 18/J18   | 12       | 1.238 | 5.24       | 1                            | 0                                  | G (Gly)     | 0,375                   |
| 19/J19   | 11       | 1.222 | 10.30      | 0                            | 3                                  | I (Ile)     | -0,709                  |
| 20/J20   | 9        | 883   | 5.24       | 1                            | 0                                  | E (Glu)     | 0,278                   |
| 21/J21   | 10       | 1.072 | 8.76       | 0                            | 1                                  | G (Gly)     | -0,850                  |
| 22/J22   | 11       | 1.257 | 6.06       | 2                            | 2                                  | I (Ile)     | -0,573                  |
| 23/J23   | 22       | 2.185 | 6.75       | 1                            | 1                                  | G (Gly)     | -0,036                  |
| 24/J24   | 6        | 796   | 4.14       | 3                            | 1                                  | E (Glu)     | -3,20                   |
| 25/J25   | 6        | 674   | 4.00       | 1                            | 0                                  | Q (Gln)     | -0,817                  |
| 26/J26   | 8        | 973   | 8.59       | 0                            | 1                                  | Y(Tyr)      | 0,787                   |
| 27/J27   | 9        | 1.074 | 5.82       | 2                            | 2                                  | M (Met)     | -1,844                  |
| 28/J28   | 8        | 948   | 5.52       | 0                            | 0                                  | Q (Gln)     | -0,450                  |
| 29/J29   | 10       | 1.182 | 8.80       | 2                            | 3                                  | A (Ala)     | -1,650                  |
| 30/J30   | 12       | 1.352 | 4.35       | 2                            | 0                                  | W (Trp)     | 0,867                   |
| 31/J31   | 19       | 2.011 | 5.32       | 2                            | 1                                  | K (Lya)     | 0,726                   |

## 6. SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

- *Shigella sonnei* SS9 é capaz de produzir substâncias antagonistas contra isolado da mesma espécie.
- A produção dessas substâncias pode contribuir na conquista de um habitat, quando outros isolados da mesma espécie estão envolvidos.
- As técnicas de purificações por processos cromatográficos são metodologias úteis na obtenção de substâncias antagonistas isoladas.
- Foram selecionadas 31 sequências primárias de fragmentos de substâncias produzidas por *S. sonnei* SS9. As sequências foram utilizadas como modelos para a síntese de peptídios. Dos 31 peptídios sintéticos 8 foram ativos contra *S. sonnei* SS12.
- Os 8 peptídios selecionados foram confrontados em um painel bacteriano contendo 22 isolados divididos entre *Shigella* spp. e *E.coli*. Todos os peptídios sintéticos foram ativos contra pelo menos um isolado bacteriano.
- O peptídio 8/J8, foi denominado peptídio principal. O título foi dado devido à ação antagonista contra todas as amostras bacterianas testadas, a limpidez dos halos e o tamanho. A análise não foi realizada com todas as amostras devido à quantidade reduzida do peptídio sintético. Mas, em momento oportuno, uma nova síntese do peptídio e o ensaio antagonista com as demais bactérias serão realizados.
- O peptídio principal, 8/J8, é um peptídio pequeno, com 9 resíduos de aminoácidos, massa molecular 976Da, aniônico e hidrofílico. A vasta maioria dos peptídios antimicrobianos são moléculas pequenas, catiônica e hidrofóbica. Visto a limpidez dos halos de inibição, ação antagonista em 100% das amostras testadas e o tamanho dos halos, outros ensaios podem ser realizados para maior caracterização da molécula e melhor entendimento dos mecanismos de ação.

- Os demais peptídios sintéticos em estudo são substâncias pequenas aniônicas ou catiônicas, hidrofóbicas ou hidrofílicas. Visto a grande diversidade físico-química das substâncias antagonistas, outros estudos podem ser realizados para o melhor entendimento dos mecanismos de ação.

5

- A OMS em 2017 classificou *Shigella* spp. como um dos 12 micro-organismos que requer atenção e o desenvolvimento de novos medicamentos contra a bactéria. Os resultados desse trabalho demonstram dados favoráveis na busca desses novos fármacos. No entanto, a análise de outros parâmetros deve ser avaliada para verificar a possibilidade dessas moléculas como candidatas a novos produtos biotecnológicos.

10

15

20

25

30

## 7. PERSPECTIVAS

- ❖ Sintetizar um volume maior dos peptídios ativos para o desenvolvimento das seguintes análises:

5

- Avaliar a ação antagonista dos peptídios sintéticos contra os isolados não testados do painel bacteriano;

10

- Realizar análises físico-químicas dos peptídios sintéticos para determinar as melhores condições de pH, solventes orgânicos, temperatura e enzimas proteolíticas;

15

- Determinar os melhores valores de Concentração Inibitoria Mínima, Concentração Bactericida Mínima e Cinética de Ação dos peptídios sintéticos;

- Avaliar as interações e estruturas dos peptídios com a membrana;

20

- Realizar estudos conformacionais através de análises em Dicroísmo Circular para a análise das estruturas secundárias dos peptídios ativos;

- Determinar a estrutura molecular e a composição química dos peptídios ativos através de estudos por Ressonância Magnética Nuclear;

25

- Produzir patente para a proteção das sequências geradas;

- Desenvolver um composto antimicrobiano sintético.

30

35

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. *Pharm.* v.6, p.1543-1575, 2013.
- 5 BALCIUNAS, E. M.; MARTINEZ, F. A. C.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. S. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, v. 32, p. 134-142, 2013.
- 10 BAQUERO, F.; LANZA, V.F.; BAQUERO, M-R.; DEL CAMPO, R.; BRAVO-VÁZQUEZ, D.A. Microcins in *Enterobacteriaceae*: Peptide Antimicrobials in the Eco-Active Intestinal Chemosphere. *Front. Microbiol.* v.10, p.1-25, 2019.
- 15 BASTOS, M. C. F.; COELHO, M. L. V.; SANTOS, O. C. F. Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiol.*, v. 161, p.683-700, 2015.
- 20 BATDORJ, B.; DALGALARRONDO, M.; CHOISSET, Y.; PEDROCHE, J.; MÉTRO, F.; PREVOST, H.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from *Mongolian airag*. *J. Appl. Microbiol.*, v. 101, p. 837-848, 2006.
- BRAUN, V.; PATZER, S. L. Intercellular communication by related bacterial protein toxins: colicins, contact-dependent inhibitors, and proteins exported by the type VI secretion system. *FEMS Microbiol.Lett.*, v. 345, p.13-21, 2013.
- 25 BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat.* v.3, p.238-250, 2005.
- 30 BROWN, K. L.; HANCOCK, R. E. W. Cationic host defense (antimicrobial) peptides *Curr. Opin. Immunol.* v. 18, p.24-30, 2006.
- BROWNE, K.; CHAKRABORTY, S.; CHEN, R.; WILLCOX, M.D.P.; STCLAIR, B.D.; WALSH, W.R.; KUMAR, N. A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides. *Int J Mol Sci.*, v. 21, 2020.
- 35 CARDOSO, P.; GLOSSOP, H. MEIKLE, T.G.; ABURTO-MEDIN, A.; CONN, C. E.; SAROJINI, V.; VALERY, C Molecular engineering of antimicrobial peptides: microbial targets, peptide motifs and translation opportunities. *Biophys Rev.*, v. 13, p.35-69, 2021.
- 40 CASCALES, E.; BUCHANAN, S. K.; DUCHÉ, D.; KLEANTHOUS, C.; LLOUBÈS, R.; POSTLE, K.; RILEY, M.; SLATIN, S.; CAVARD, D. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 71, p. 158-229, 2007.
- 45 CHANDRA, D.; GAYATHRI, P.; VATS, M.; NAGARAJ, R.; RAY, M.K.; JAGANNADHAM, M.;V. Mass spectral analysis of acetylated peptides: Implications in proteomics. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*, v.26, p.36-45, 2020.
- CHIKINDAS, M. L.; WEEKS, R.; DRIDER, D.; CHISTYAKOV, V. A.; DICKS, L. M.

Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotechnol.*, v.49, p.23–28, 2018.

- 5 COLLINS, B.; GUINANE, C. M.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Assessing the contributions of the LiaS histidine kinase to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to nisin, cephalosporins, and disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.78, p.2923–2929, 2012.
- 10 CORSINI, G.; KARAHANIAN, E.; TELLO, M.; FERNANDEZ, K.; RIVERO, D.; SAAVEDRA, J. M.; FERRER, A. Purification and characterization of the antimicrobial peptide Microcin N. *FEMS Microbiol Lett.*, v.312, p.119-125, 2010.
- 15 COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Micro*, v. 11, p.95-105, 2013.
- DARBANDI, A.; ASADI, A.; ARI, M.; OHADI, E.; TALEBI, M.; ZADEH, M. H.; EMAMIE, A. D.; GHANAVATI, R.; KAKANJ, M. Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *J Clin Lab Anal.*, v. 36, p.1-40, 2022.
- 20 DAVIDSON, A. L.; CHEN, J. ATP- Binding Cassete Transports in Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, v.73, p.241-268, 2004.
- 25 DAW, M. A.; FALKINER, F. R. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron*, v. 27, p. 467-479, 1996.
- DOLEJŠOVÁ, T.; SOKOL, A.; BOSÁK, J.; ŠMAJS, D.; KONOPÁSEK, I.; MIKUŠOVÁ, G.; FIŠER, R. Colicin U from *Shigella boydii* Forms Voltage-Dependent Pores. *J Bacteriol.* v.201, p.1-16, 2019.
- 30 DUGGAN, G. M.; MOSTOWY, S. Use of zebrafish to study *Shigella* infection. *Dis Model Mech.*, v.11, p.1-11, 2018.
- 35 DUQUESNE, S.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; PEDUZZI, J.; REBUFFAT, S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod Rep.*, v. 24, p. 708–734, 2007.
- EDWARD, S.; SHABAN, N.; MUREITHI, E. Optimal Control of Shigellosis with Cost-Effective Strategies. *Comput Math Methods Med.* v.2020, p. 1-15, 2020.
- 40 EL-GENDY, A.O.; BREDE, D.A.; ESSAM, T.M.; AMIN, M.A.; AHMED, S. H.; HOLO, H.; NES, I. F.; SHAMIKH Y.I. Purification and characterization of bacteriocins-like inhibitory substances from food isolated *Enterococcus faecalis* OS13 with activity against nosocomial enterococci. *Sci Rep*, v.11, p. 1- 12, 2021.
- 45 ELLEN, A. F.; ROHULYA, O. V.; FUSETTI, F.; WAGNER, M.; ALBERS, S. V.; DRIESSEN, A. J. M. The sulfolobacin genes of *Sulfolobus acidocaldarius* encode novel antimicrobial proteins. *J. Bacteriol*, v. 193, p. 4380–4387, 2011.
- ETAYASH. H.; AZMI, S.; DANGETI, R.; KAUR, K. Peptide Bacteriocins -

structure activity relationships. *Curr Top Med Chem.* v.16, p. 220-241, 2016.

EVERSE, J.; STOLZENBACH, F. E. Lyophilization. In: JAKOBY, W. B. (Ed.) *Methods Enzymol.*, v. 22, p. 33-39, 1971.

5

FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; DAMASCENO, C. A. V.; CISALPINO, E. O.; VIEIRA, E. C. Bacteriocin-like activity of *Bacteroides fragilis* group isolated from marmosets. *Res. Microbiol.*, v. 143, p. 151-159, 1992.

10

FARIAS, L. M.; TOTOLA, A. H.; MIRANDA C. M. S.; CARVALHO, M. A. R.; Extraction, partial purification and characterization of a bacteriocin (fragilicin) produced by a strain of *Bacteroides fragilis* isolated from *Callitrix penicillata*. *Res. Microbiol.*, v.145, p.9-16, 1994

15

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. NOMAD Bioscience Receives Its GRAS Regulatory Clearance In USA For Bacteriocins Salmocins As Processing Aids for Control of Salmonella In Food. (2019).

20

GARCIA-GUTIERREZ, E.; MAYER, M. J.; COTTER, P. D.; NARBAD, A. Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. *Gut Microbes*, v. 27, p.1–21, 2018.

Gel filtration: principles and methods. Uppsala: GE Healthcare, 2010. Disponível em: <https://eds.p.ebscohost.com/eds/detail/detail?vid=7&sid=93b6f3c8-210e-4295-84d2-1104866754c7%40redis&bdata=Jmxhbm9cHQYnImc2l0ZT1lZHMtbGl2ZQ%3d%3d#AN=edslib.10468794&db=edslib>. Acesso em: 15 maio 2022.

25

GHEQUIRE, M. G. K. & DE MOT, R. Turning Over a New Leaf: Bacteriocins Going Green. *Trends Microbiol.*, v. 26. p.1-2, 2018.

30

GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 81, p.591-606, 2009.

GONZÁLEZ-TORRALBA, A., GARCÍA-ESTEBAN, C., ALÓS, J. I. Enteropatógenos y antibióticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* v.36, p.47-54, 2018.

GOUVEIA, M. A. C.; LINS, M. T. C.; SILVA, G.A.P. Acute diarrhea with blood: diagnosis and drug treatment. *J pediatr.* v.96, p.20-28, 2020.

GUPTA, A.K.; NAYDUCH, D.; VERMA, P.; SHAH, B.; GHATE, H.V.; PATOLE, M.S.; SHOUCHE, Y.S. Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.). *FEMS Microbiol Ecol.* v.79, p.581–593, 2012.

HAHN-LÖBMANN. S.; STEPHAN, A.; SCHULZ, S.; SCHNEIDER, T.; SHAVERSKYI, A.; TUSÉ, D.; GIRITCH, A.; GLEBA, Y. Colicins and Salmocins – New Classes of Plant-Made Non-antibiotic Food Antibacterials. *Front. Plant Sci.*, v.10, p.1 16, 2019.

HARRIS, F.; DENNISON, S. R.; PHOENIX, D. A. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr Protein Pept Sci.*, v.10, p.585-606, 2009.

HASSAN, M. U.; NAYAB, H.; REHMAN, T. U.; WILLIAMSON, M. P.; HAQ, K. U.; SHAFI, N.; SHAFIQUE, F. Characterization of Bacteriocins Produced by *Lactobacillus* spp. Isolated from the Traditional Pakistani Yoghurt and Their Antimicrobial Activity against Common Foodborne Pathogens. *BioMed Res. Int.* v.2020, p.1-10, 2020.

Hydrophobic interaction and reversed phase chromatography: principles and methods. Uppsala: GE Healthcare, 2006. Disponível em: <https://eds.p.ebscohost.com/eds/results?vid=3&sid=93b6f3c8-210e-4295-84d2-1104866754c7%40redis&bquery=hydrophobic+interaction+and+reversed&bdata=Jm xhbm9cHQYnImdHlwZT0wJnNIYXJjaE1vZGU9QW5kJnNpdGU9ZWRzLWxpdmU %3d> Acesso em: 15 maio 2022.

HIRATA, I. Y.; CEZARI, M. H. S.; NAKATE, C. R.; BOSCHKOV, P.; ITO, A. S.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L. Internally quenched fluorogenic protease substrates: solid phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-amino benzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. *Lett. Pept. Sci.*, v.1, p.299-308, 1994.

HOSANGADI, D.; SMITH, P.G.; KASLOW, D.C.; GIERING, B.K. WHO consultation on ETEC and *Shigella* burden of disease, Geneva, 6–7th April 2017: Meeting report. *Vaccine*. v.37, p.7381-7390, 2017.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, v. 59, p. 171-200, 1995.

JAMALUDDIN, N.; STUCKEY, D.C.; ARIFF, A. B; FAIZAL, W.F.W. Novel approaches to purifying bacteriocin: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. v.58, p. 2453-2465, 2017.

JENNISON, A. V.; VERMA, N. K. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 28, p. 43-58, 2004.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. *Clin microbiol ver.*, v. 19, p. 491–511, 2006.

JEŻOWSKA-BOJCZUK, M.; STOKOWA-SOŁTYS, K. Peptides having antimicrobial activity and their complexes with transition metal ions. *Eur J Med Chem.*, v.143, p.997-1009, 2018.

JIANG, Z.; VASIL, A.I.; HALE, J.D.; HANCOCK, R.E.; VASIL, M.L.; HODGES, R.S. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptides. *Pept Sci.*, v. 90, p. 369-383, 2008.

KANG, H.; WANG, L.; LI, Y.; LU, Y.; FAN, W.; BI, R.; QIAN, H.; GU, B. Dissemination of Multidrug-Resistant *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* with Class 1, Class 2, and Atypical Class 1 Integrons in China. *Microb Drug Resist.* v.25, p. 1-10, 2019.

KAUR, S.; KAUR, S. Bacteriocins as potential anticancer agents. *Front Pharmacol.*, v. 6, p.1-12, 2015.

KAUR, K.; TARASSOVA, O.; DANGETI, R. V.; AZMI, S.; WISHART, D.; MCMULLEN, L.; STILES, M. Characterization of a highly potent antimicrobial peptide microcin N from uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 363, p.1-6, 2016.

KONISKY, J. The bacteriocins. In: ORNSTON, L. N.; SOKATCH, J. R. (Ed.). *The bacteria*. London: Academic Press, 1978. v. 6, cap. 2, p. 71-136.

KOTLOFF, K. L., RIDDLE, M. S., PLATTS-MILLS, J. A., PAVLINAC, P., & ZAIDI, A. K. M. Shigellosis. *Lancet*. v.391, p.801-812, 2018.

LAGOS, R.; TELLO, M.; MERCADO, G.; GARCÍA, V.; MONASTERIO, O. Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Curr Pharm Biotechnol*, v. 10, p.74-85, 2009.

LENSKI, R. E.; RILEY, M. A. Chemical warfare from an ecological perspective. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, p.556–558, 2002.

LEONARDOPOULOS, J.; PAPAKONSTANTINO, A.; KOURTI H.; PAPAVALASSILIOU, J. Survival of *Shigella* e in soil. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B*. v.171, p.459-65, 1980.

LEWIES, A.; WENTZEL, J.F.; JACOBS, G.; PLESSIS, L.H. The potential use of natural and structural analogues of antimicrobial peptides in the fight against neglected tropical diseases. *Molecules*. v.20, p. 15392–15433, 2015.

LIMA, F. L.; FARIAS, F. F.; CARVALHO, M. A. R.; ALVIANO, C. S.; FARIAS, L. M. Influence of abiotic factors on the bacteriocinogenic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Res. Microbiol.*, v. 153, p. 249-252, 2002.

MAHLAPUU, M.; BJÖRN, C.; EKBLOM, J. Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges. *Crit. Rev. Biotechnol.*, v.40, p.978-992, 2020.

MARCHETTO, R. A química de peptídios e o mecanismo de inibição da atividade da DNA girase. 511 f. Tese (Livre-Docência) Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2006.

MICENKOVÁ, L.; BOSÁK, J.; KUCERA, J.; HRALA, M.; DOLEJŠOVÁ, T.; ŠEDO, O.; LINKE, D.; FIŠER, R.; ŠMAJS, D. Colicin Z, a structurally and functionally novel colicin type that selectively kills enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Sci Rep.*, v. 9, p. 1-12, 2019.

MICOLI, F.; NAKAKANA, U. N.; BERLANDA, S. F. Towards a Four-Component GMMa-Based Vaccine against *Shigella*. *Vaccines* v.10, p. 1-14, 2022.

MOREIRA, J. S. Caracterização da primeira microcina e de outras bacteriocinas sintetizadas por *Shigella sonnei*. 243f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2014.

MOREIRA, J. S. Purificação de substâncias antibacterianas e estudo de plasmídios colicinogênicos de *Shigella sonnei*. 191f. Tese (Doutorado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2018.

MWANGI, J.; HAO, X.; LAI, R.; ZHANG, Z. Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance. *Zool Res.*, v.40, p. 488-505, 2019.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. *Braz. J. Food Technol.*, v. 11, p. 120-127, 2008.

NISA, I.; QASIM, M.; YASIN, N.; ULLAH, R.; ALI, A. *Shigella flexneri*: an emerging pathogen. *Folia Microbiol.*, v.65, p. 275–291, 2020.

NISAR, M.; AHMED, M. D.; HASSAN, M. M.; AKBAR, K. S.; HUSSAIN, A.; ASAD, A. M.; ABBAS, M.; MOHSIN, K. M.; TEHSEEN, K. M. Clinico-epidemiology of shigellosis in children suffering from Diarrhea in District Lahore, Pakistan. *Int J Curr Microbiol App Sci.* v.3, p.950–957, 2014.

NORIEGA, J. M. S. Mecanismos de interacción entre la microcina 24 y su célula bacteriana blanco. 2009. 93f. Tese (Doutorado em Bioquímica) Facultad de Ciencias Químicas y Farmaceuticas, Universidad De Chile, Santiago de Chile. 2009.

OLIVEIRA, P. L. Caracterização de bacteriocina sintetizada por amostras de *Shigella sonnei* isolada de criança com diarreia aguda. 2013. 191f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas gerais, Belo Horizonte, 2013.

O'NEILL, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations; Government of the United Kingdom: London, UK, 2016.

PADILLA, C.; LOBOS, O.; BREVIS, P.; ABACA, P.; HUBERT, E. Plasmid-mediated bacteriocin production by *Shigella flexneri* isolated from dysenteric diarrhoea and their transformation into *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 42, p. 300-303, 2006.

PASUPULETI, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system *Crit. Rev. Biotechnol.* v. 32, p.143-171, 2012.

PHOENIX, D. A.; DENNISON, S. R.; HARRIS, F. Antimicrobial peptides: Their history, evolution, and functional promiscuity. In: Phoenix, D. A., DENNISON, S. R. AND HARRIS, F. *Antimicrobial Peptides*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013, p.1-20 37.

PRAJAPATI, J. D.; KLEINEKATHÖFER, U.; WINTERHALTER, M. How to Enter a Bacterium: Bacterial Porins and the Permeation of Antibiotics. *Chem. Rev.* v.121, p.5158-5192, 2021.

PRUDÊNCIO, C. V.; SANTOS, M. T.; VANETTI, M. C. D. Strategies for the use of bacteriocins in Gram-negative bacteria: relevance in food microbiology. *J Food Sci Technol.* v.52, p. 5408–5417, 2015.

Purifying challenging proteins: principles and methods. Uppsala: GE Healthcare, 2007. Disponível em: <https://eds.p.ebscohost.com/eds/detail/detail?vid=2&sid=93b6f3c8-210e-429584d21104866754c7%40redis&bdata=Jmxhbm9cHQtYnlmc2l0ZT1lZHMt bGl2ZQ %3d%3d#AN=edslib.10625355&db=edslib>. Acesso em: 15 maio 2022.

PUSHPANATHAN, M.; PARAMASAMY, G.; RAJENDHRAN, J. Antimicrobial Peptides: Versatile Biological Properties. *Int. J. Pept.*, v.2013, p. 1-16, 2013.

RAMOS-MARTÍN, F.; ANNAVAL, T.; BUCHOUX, S.; SARAZIN, C.; D'AMELIO, N. ADAPTABLE: A comprehensive web platform of antimicrobial peptides tailored to the user's research. *Life Sci. Alliance*, v.6, p.1-11, 2019.

RANGAN, C. *Shigella* species (Shiga Enterotoxins). In: BARCELOUX, D. G. Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants, and Venomous Animals. *John Wiley & Sons*. 2008, p.150-155.

REBUFFAT, S. Bacteriocin from Gram-negative bacteria: A classification? In: DRIDER D, REBUFFAT S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer, 2011a. p. 55-71.

REBUFFAT, S. Microcins from Enterobacteria: on the edge between Grampositive bacteriocins and colicins. In: DRIDER D, REBUFFAT S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer. 2011b. p. 333 - 349.

REBUFFAT, S. Microcin in action: amazing defence strategies of enterobacteria. *Biochem. Soc. Trans.*, v.40, p. 1457-1462, 2012.

RILEY, M. A.; GORDON, D. M. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.*, v.7, p.129–133, 1999.

RILEY, A. M.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Rev. Microbiol.*, v.56, p.117–137, 2002.

RILEY, A. M. Bacteriocins, Biology, Ecology, and Evolution. *Oxford: Elsevier*. v.5, p. 32-44, 2009.

RILEY, A. M. Bacteriocin-mediated competitive interactions of bacterial populations and communities. In: DRIDER D, REBUFFAT S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: from Genes to Applications*. Springer. 2011. p. 13-26.

RIMA, M.; RIMA, M.; FAJLOUN, Z.; SABATIER, J.; BECHINGER, B.; NAAS, T. Antimicrobial Peptides: A Potent Alternative to Antibiotics. *Antibiot.*, v.10, p.1-15, 2021.

SAGGESE, A.; LUCA, Y.; BACCIGALUPI, L.; RICCA, E. An antimicrobial peptide specifically active against *Listeria monocytogenes* is secreted by *Bacillus pumilus* SF214. *BMC Microbiol.*, v.22, p. 1-11, 2022.

SASAKAWA, C. A new paradigm of bacteria-gut interplay brought through the study of *Shigella*. *Proc. Jpn. Acad.*, v. 86, p.229-243, 2010.

SCHNEIDER, T.; HAHN-LÖBMANN, S.; STEPHAN, A.; SCHULZ, S.; GIRITCH, A.; NAUMANN, M.; KLEINSCHMIDT, M.; TUSÉ, D.; GLEBA, Y. Plant-made *Salmonella* bacteriocins salmocins for control of *Salmonella* pathovars. *Sci Rep.*, v.8, p. 1-10, 2018.

SEDGLEY, C. M.; CLEWELL, D. B.; FLANNAGAN, S. E. Plasmid pAMS1-encoded, bacteriocin-related "Siblicide" in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.*, v.191, p.3183-3188, 2009.

SEO, J.; KIM, D.; OH, R.; PARK, K.; LEE, I.; CHO, S.; LEE, K.; NAM, B. Antimicrobial effect of the 60S ribosomal protein L29 (cgRPL29), purified from the gill of pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.*, v.67, p. 675-683. 2017.

SEVERINOV, K.; SEMENOVA, E.; KAZAKOV, T. Class I microcins: their structures, activities, and mechanisms of resistance In: DRIDER, D.; REBUFFAT, S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer. 2011. p.289-308.

SHAD, A. A.; SHAD, W. A. *Shigella sonnei*: virulence and antibiotic resistance. *Arch. Microbiol.*, v.203, p.1-14, 2021.

SIMONS, A.; ALHANOUT, K.; DUVAL, E. E. Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria. *Microorganisms*. v.8, p.1-31, 2020.

SMAJS, D.; PILSL, H.; BRAUN, V. Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*. *J. Bacteriol.*, v. 179, p. 4919-4928, 1997.

SOLTANI, S.; HAMMAMI, R.; COTTER, P. D.; REBUFFAT, S.; SAID, L. B.; GAUDREAU, H.; BÉDARD, F.; BIRON, E.; DRIDER, D.; FLISS, I. Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations, *FEMS*, v.45, p. 1-24, 2021.

SOUSA, M. A. B.; FARIAS, L. M.; OLIVEIRA, P. L.; MOREIRA, J. S.; APOLÔNIO, A. C. M.; OLIVEIRA, J. S.; SANTORO, M. M.; MENDES, E. N.; MAGALHÃES, P. P. Antagonistic activity expressed by *Shigella sonnei* identification of a putative new bacteriocin. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.108, p.724-729, 2013.

TANEJA, N.; MEWARA, A. Shigellosis: epidemiology in India. *Indian J. Med. Res.*, v.143, p.565–576, 2016.

TELHIG, S.; BEN, S. L.; ZIRAH, S.; FLISS, I.; REBUFFAT, S. Bacteriocins to Thwart Bacterial Resistance in Gram Negative Bacteria. *Front. Microbiol.*, v.11, p.1-25, 2020.

UTENG, M.; HAUGE, H. H.; BRONDZ, I.; NISSEN-MEYER, J.; FIMLAND, G. Rapid two-step procedure for large-scale purification of pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium. *Appl Environ Microbiol.*, v.68, p.952-956, 2002.

VASSILIADIS, G.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; LOMBARD, C.; REBUFFAT, S.; PEDUZZI, J. Isolation and characterization of two members of the siderophore microcin family, microcins M and H47. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.54, p. 288–297, 2010.

VASSILIADIS, G.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; PEDUZZI, J. Class II microcins. In: DRIDER, D.; REBUFFAT, S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer, p. 309-332, 2011.

VILLÉNL, J.; GYGI, S. P. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nat Protoc.*, v. 3, p.1630-1638, 2008.

YANG, S. C.; LIN, C. H.; SUNG, C. T.; FANG, J. Y. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front. Microbiol.*, v.5, p. 1-10, 2014.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev.*, v. 55, p.27-55, 2003.

ZAMAROCZY, M.; CHAULEAU, M. Colicin killing: Foiled cell defense and hijacked cell functions. In: DRIDER, D.; REBUFFAT, S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer. 2011. p.255-287.

ZHANG, Q. Y.; YAN, Z. B.; MENG, Y. M.; HONG, X.; SHAO, G.; MA, J.; CHENG, X.; LIU, J.; KANG, J.; FU, C. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Militar Med Res.*, v. 8, p. 1-25, 2021.

ZIMINA, M.; BABICH, O.; PROSEKOV, A.; SUKHIKH. S.; IVANOVA, S.; SHEVCHENKO, M.; NOSKOVA, S. Overview of Global Trends in Classification, Methods of Preparation and Application of Bacteriocins. *Antibiotics*, v. 9, p.1-21, 2020.

WANG, Y.; CHEN, X.; HU, Y.; ZHU, G.; WHITE, A. P.; KOSTER, W. Evolution and sequence diversity of FhuA in *Salmonella* and *Escherichia*. *Infect. Immun.* v.86, p.573-618, 2018.

WATSON, J. L.; SANCHEZ-GARRIDO, J.; GODDARD, P. J.; TORRACA, V.; MOSTOWY, S.; SHENOY, A. R, Clements A. *Shigella sonnei* O-Antigen Inhibits

Internalization, Vacuole Escape, and Inflammasome Activation. *mBio*, v.10, p. 1-14, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics (2017).