



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO



RELATÓRIO DE ACOMPANHAMENTO TÉCNICO DE PROJETOS

Contrato / Convênio, Nº:

0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Instituição: MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO - UCDB

Período de execução deste relatório (mm/aa a mm/aa):

0	4	/	2	2	a	0	3	/	2	6
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---



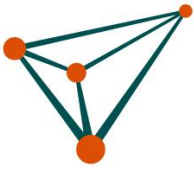
Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)												Referência FINEP (1234/56)							
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Conveniente												Período (mm/aa até mm/aa)							
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO												03/22 ATÉ 03/26							
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Sumário

1. Informações gerais	3
1.1. Beneficiário (a) / Conveniente	3
1.2. Projeto	3
1.3. Coordenação	3
2. Informações opcionais	4
2.1. Co-executor (caso exista).....	4
2.2. Pessoa de contato (caso exista).....	4
2.3. Interveniente (caso exista)	5
2.4. Pessoa de contato (caso exista).....	5
3. Tabela resumo da execução do cronograma físico do projeto	6
4. Execução do cronograma físico do projeto.....	9
4.1. Metas físicas.....	9
5. Avaliação da gestão do projeto	26
6. Impactos internos e externos do projeto.....	27
7. Produção tecnológica	28
8. Parceria institucional.....	28
9. Comentário final	29
10. Resumo	29
11. Equipe atual responsável pela execução técnica do projeto	30
12. Orçamento	31
13. ANEXO A – Culturas Saudáveis de <i>P. patens</i> crescidas em fermentadores.....	33
14. ANEXO B – Protoplastos positivos para a produção do peptídeo recombinante.....	34
15. ANEXO C – Extração qualitativa e quantitativamente eficaz de PaMAP 1.9.....	38

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89) 0 1 . 2 2 . 0 1 0 4 . 0 0	Referência FINEP (1234/56) 0 3 4 5 / 1 9
Beneficiário (a) / Convenente MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO	Período (mm/aa até mm/aa) 03/22 ATÉ 03/26
Título do projeto PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.	

Pág. 3 / 49

1. Informações gerais

1.1. Beneficiário (a) / Convenente

Razão social MSMT – UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO	CNPJ (0123456789/0001-22) 0 3 2 2 6 1 4 9 / 0 0 1 5 - 8 7		
Endereço (logradouro; nº; complemento) Avenida Tamandaré, 6.000	Bairro Jardim seminário II		
Município Campo Grande	UF M S	CEP (12345-678) 7 9 1 1 7 - 9 0 0	
Telefone (cód. de área – nº) 67 33123000	Fax (cód. de área – nº)	E-mail gabinetereitoria@ucdb.br	
Idade da instituição (anos) 50	Último faturamento (R\$) 7.428.951,12	Nº de funcionários 571	Participação salarial no faturamento (%) 62

1.2. Projeto

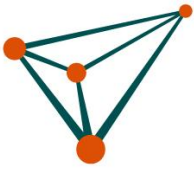
Título PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.			
Objetivo geral Produzir um peptídeo antimicrobiano em sistema in planta, utilizando o musgo <i>Physcomitrella patens</i> para o tratamento de mastite bovina.			
Assin. cont./conv. (dd/mm/aa) 2 2 / 0 3 / 2 2	Duração prevista (meses) 36	Valor total – FINEP (R\$) 431.200,00	Valor desembolsado – FINEP (R\$) 431.200,00

1.3. Coordenação

Coordenador (nome completo sem abreviações) Octavio Luiz Franco	CPF (0123456789-01) 7 5 5 2 3 4 0 0 3 - 7 8	
Endereço (logradouro; nº; complemento) Sgan 916 Modulo B – AV. WS Norte	Bairro Asa Norte	
Município Brasília	UF D F	CEP (12345-678) 7 0 7 9 0 - 1 6 0
Telefone (cód. de área – nº) 67 33123615	Fax (cód. de área – nº)	E-mail ocfranco@gmail.com

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Pág. 4 / 49

2. Informações opcionais

2.1. Co-executor (caso exista)

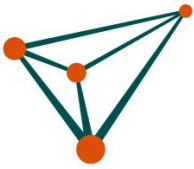
Razão social			CNPJ (0123456789/0001-22)		
Endereço (logradouro; nº; complemento)			Bairro		
Município			UF	CEP (12345-678)	
Telefone (cód. de área – nº)	Fax (cód. de área – nº)	E-mail			
Idade da instituição (anos)	Último faturamento (R\$)	Nº de funcionários	Participação salarial no faturamento (%)		

2.2. Pessoa de contato (caso exista)

Coordenador (nome completo sem abreviações)			CPF (0123456789-01)		
Endereço (logradouro; nº; complemento)			Bairro		
Município			UF	CEP (12345-678)	
Telefone (cód. de área – nº)	Fax (cód. de área – nº)	E-mail			

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Pág. 5 / 49

2.3. Interveniante (caso exista)

Razão social			CNPJ (0123456789/0001-22)		
Endereço (logradouro; nº; complemento)			Bairro		
Município			UF	CEP (12345-678)	
Telefone (cód. de área – nº)	Fax (cód. de área – nº)	E-mail			
Idade da instituição (anos)	Último faturamento (R\$)	Nº de funcionários	Participação salarial no faturamento (%)		

2.4. Pessoa de contato (caso exista)

Coordenador (nome completo sem abreviações)			CPF (0123456789-01)		
Endereço (logradouro; nº; complemento)			Bairro		
Município			UF	CEP (12345-678)	
Telefone (cód. de área – nº)	Fax (cód. de área – nº)	E-mail			

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente										Execução (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 02/25									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Pág. 6 / 49

3. Tabela resumo da execução do cronograma físico do projeto¹

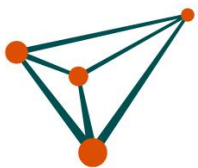
Duração prevista para o projeto		Duração efetiva do projeto		Percentual do projeto executado no período		Percentual acumulado do projeto	
Mês/Ano início	Mês/Ano fim	Mês/Ano início	Mês/Ano fim	Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
03/2022	03/2025	03/2022	03/2026	100	100	100	100

Item Meta	Metas	Atividades	Indicador Físico	Duração prevista		Duração efetiva		Executado no período		Acumulado da meta / atividade	
				Mês/Ano início	Mês/Ano fim	Mês/Ano início	Mês/Ano fim	Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
[1]	Manter culturas saudáveis de <i>P. patens</i> em fermentadores			03/2022	03/2025	05/2022	03/2025	36m/36m 100	48m/48m 100	36m/36m 100	48m/48m 100
[1.1]		Manutenção de culturas de <i>P. patens</i>	Culturas saudáveis de <i>P. patens</i> crescidas em fermentadores	03/2022	03/2025	05/2022	03/2025	36m/36m 100	48m/48m 100	36m/36m 100	48m/48m 100
[2]	Construir vetor de expressão de PaMAP 1.9 para transformação em sistema vegetal (células de <i>P. patens</i>)			06/2022	09/2022	12/2022	03/2023	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100
[2.1]		Construção dos vetores e clonagem do gene de expressão de PaMAP 1.9	Clonagem do peptídeo PaMAP 1.9 e vetores viáveis para a transformação em células de <i>P. patens</i>	06/2022	09/2022	12/2022	03/2023	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100
[3]	Transformar protoplastos de <i>P. patens</i> com gene de expressão de PaMAP 1.9			09/2022	12/2022	04/2023	07/2023	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100
[3.1]		Transformação de células de <i>P. patens</i> com o gene de expressão de PaMAP 1.9	Células de <i>P. patens</i> positivas para a transformação com PaMAP 1.9 produzindo o peptídeo desejado.	09/2022	12/2022	04/2023	07/2023	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100

¹ Veja instruções de preenchimento no final do relatório.

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026



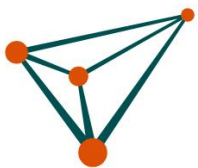
Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9

Beneficiário (a) / Conveniente										Período (mm/aa até mm/aa)				
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26				

Título do projeto														
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.														

Pág. 7 / 49

[4]	Cultivar protoplastos de <i>P. patens</i> produtoras do peptídeo PaMAP 1.9 recombinante			12/2022	03/2023	08/2023	01/2024	3m/3m 100	5m/5m 100	5m/5m 100	5m/5m 100
[4.1]		Realizar o cultivo de protoplastos de <i>P. patens</i> que sejam positivos para a produção do peptídeo recombinante	Protoplastos positivos para a produção do peptídeo recombinante	12/2022	03/2023	08/2023	02/2024	3m/3m 100	6m/6m 100	6m/6m 100	6m/6m 100
[5]	Extraírem eficientemente o peptídeo PaMAP 1.9 recombinante de protoplastos de <i>P. patens</i>			04/2023	06/2023	03/2024	02/2025	3m/3m 100	11m/11m 100	11m/11m 100	11m/11m 100
[5.1]		Extração do peptídeo recombinante	Extração qualitativa e quantitativa eficaz de PaMAP 1.9	04/2023	06/2023	03/2024	02/2025	3m/3m 100	11m/11m 100	11m/11m 100	11m/11m 100
[6]	Avaliar estruturalmente por meio de dicroísmo circular se o peptídeo recombinante manteve sua estrutura helicoidal original, observada em PaMAP 1.9			06/2023	09/2023	04/2024	06/2024	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100
[6.1]		Verificação da integridade estrutural de PaMAP 1.9	Presença do peptídeo em sua conformação nativa e funcional.					3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100
[7]	Avaliar a atividade bactericida de PaMAP 1.9 recombinante frente a cepas patogênicas de isolados bovinos			09/2023	11/2023	05/2024	08/2024	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100
[7.1]		Determinação de CIM/CBM	Avaliação do efeito antibacteriano/bactericida do peptídeo recombinante					2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100
[8]	Avaliar a atividade anti-biofilme de PaMAP 1.9 recombinante frente a cepas patogênicas formadoras de biofilme de isolados bovinos			02/2024	05/2024	06/2024	08/2024	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100
[8.1]		Determinação de CIMB	Avaliação do efeito antibiofilme do peptídeo recombinante	02/2024	05/2024	07/2024	09/2024	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100



Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026

Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9

Beneficiário (a) / Conveniente	Período (mm/aa até mm/aa)
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO	03/22 ATÉ 03/26

Título do projeto
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROIBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.

Pág. 8 / 49

[9]	Verificar o efeito hemolítico de PaMAP 1.9 recombinante frente a eritrócitos murinos e bovinos			06/2024	08/2024	09/2024	11/2024	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100
[9.1]		Avaliação do potencial hemolítico de PaMAP 1.9 recombinante	Avaliação do efeito do peptídeo recombinante sobre células de mamíferos evidenciando sua não toxicidade			12/2024	02/2025	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100
[10]	Verificar o efeito citotóxico de PaMAP 1.9 frente a macrófagos bovinos e murinos			09/2024	11/2024	02/2025	04/2025	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100
[10.1]		Avaliação da citotoxicidade de PaMAP 1.9 recombinante	Avaliação do efeito do peptídeo recombinante sobre células de mamíferos, evidenciando sua não toxicidade			04/2025	06/2025	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100
[11]	Avaliar o potencial bactericida de PaMAP 1.9 em modelo in vivo de infecção (murino)			12/2024	03/2025	06/2025	09/2025	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100
[11.1]		Avaliação do peptídeo recombinante em modelo murino de infecção - mastite	Determinação do efeito antimicrobiano do peptídeo recombinante in vivo, assegurando sua efetividade			09/2025	12/2025	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

4. Execução do cronograma físico do projeto²

4.1. Metas físicas³

Meta física 1	Executado no período		Acumulado da meta durante o projeto	
	Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Manter culturas saudáveis de <i>P. patens</i> em sistema de crescimento de fermentadores	36m/36m 100	48m/48m 100	36m/36m 100	48m/48m 100

Atividade 1.1	Indicador físico de execução	Executado no período		Acumulado da atividade durante o projeto	
		Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Manutenção de culturas de <i>P. patens</i>	Culturas saudáveis de <i>P. patens</i> crescidas em	36m/36m 100	48m/48m 100	36m/36m 100	48m/48m 100

Descreva o desenvolvimento da atividade
<p>Foi desenvolvida uma cultura de tecidos de musgo em placas de Petri, seguindo as condições previamente estabelecidas por SCHAEFER et al. (1991), contendo o meio de cultura PpNH₄ (MgSO₄.7H₂O 1,03 mM, Ca(NO₃)₂.4H₂O 3,39 mM, FeSO₄.7H₂O 45 µM, KH₂PO₄ 1,51 mM, tartarato de amônio [(NH₄)₂C₄H₄O₆] 2,72 mM, H₃BO₃ 9,93 µM, CuSO₄.5H₂O 0,22 µM, MnCl₂.4H₂O 1,97 µM, CoCl₂.6H₂O 0,23 µM, ZnSO₄.7H₂O 0,19 µM, KI 0,17 µM, Na₂MoO₄. 2H₂O 0.10 µM e ágar 0,8%) e a deposição de celofane na superfície do meio. As plantas do musgo <i>Physcomitrella patens</i> foram maceradas usando homogenizador e espalhadas sobre o disco de celofane (método denominado de <i>passing line</i>), onde foram mantidas de uma a três semanas, com 16 horas de fotoperíodo a 25 °C em estante climatizada. Algumas plantas foram propagadas e incubadas em luz contínua por cinco a sete dias como estabelecido por COVE et al. (2009). Esses procedimentos foram realizados semanalmente durante o período de desenvolvimento da pesquisa, a fim de propagar material vegetal para ser utilizado nas análises <i>in planta</i> e na transformação genética do musgo.</p>
Comente sobre o (s) resultado (s) (em caso de tarefa concluída, o indicador físico deverá constar como anexo ao relatório)
<p>Ao final do procedimento de transformação, os protoplastos foram plaqueados em meio PRMB (PpNH₄ + 6% manitol) (Figura em anexo 1A) e mantidos a 25°C e com 16 horas de fotoperíodo durante 14 dias, para que pudessem regenerar. Durante este período, a parede celular é sintetizada e inicia-se o processo de divisão celular, que origina o primeiro estágio de desenvolvimento denominado de protonema. Essa estrutura é formada por dois diferentes tipos celulares, o cloronema e o caulonema, que se diferenciam morfológicamente pelo número de cloroplastos presentes em cada. No final do período de regeneração, os protonemas já estão plenamente estabelecidos (Figura 1B-C).</p>

² Veja instruções de preenchimento no final do relatório.

³ Todas as metas e atividades associadas que constam do cronograma físico, aprovado pela FINEP para o projeto, devem ser mencionadas no relatório de acompanhamento técnico.

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Conveniente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Pág. 10 / 49

Justifique o eventual atraso ou adiantamento da execução da tarefa, em relação à previsão inicial

A atividade teve dois meses de atraso no seu início devido ao período de aquisição de reagentes e materiais para sua realização.

Meta física 2	Executado no período		Acumulado da meta durante o projeto	
	Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Construir vetor de expressão de PaMAP 1.9 para transformação em sistema vegetal (células de <i>P. patens</i>)	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100

Atividade 2.1	Indicador físico de execução	Executado no período		Acumulado da atividade durante o projeto	
		Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Construção dos vetores e clonagem do gene de expressão de PaMAP 1.9	Clonagem do peptídeo PaMAP 1.9 e vetores viáveis para a transformação em células de <i>P. patens</i>	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100

Descreva o desenvolvimento da atividade

Para fins de manipulação dos níveis de expressão, inicialmente foi realizada a seleção do peptídeo sinal de musgo, de caráter secretório mais eficiente, como descrito por SCHAAF et al. (2005) por análises bioinformáticas. Nesse estudo, foram comparados diversos peptídeos de trânsito de musgo e animais, para a secreção da proteína heteróloga, e foi verificada a maior eficiência para produção e secreção da mesma quando precedida pelo peptídeo de trânsito (TP) da xiloglucano endotransglicosilase-hidrolase 1 (PpXTH1). Dessa forma, um peptídeo híbrido contendo a sequência codificadora do TP da PpXTH1 fusionado à sequência codificadora da parigidina-br1 desprovida de seu TP original foi desenhado. Para tal, a sequência do cDNA codificante da parigidina-br1 previamente isolado (ALMEIDA, 2013), teve o seu *codon usage* otimizado para expressão em *P. patens* utilizando-se o *software* disponível em <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/> com os dados de frequência de códons obtidos no banco de dados *Codon Usage DB (Japan)* <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3218>. Após tradução *in silico* da sequência obtida, a mesma foi submetida ao SignalP 4.0 (PETERSEN et al., 2011) e, após identificação do sítio putativo de clivagem, foi removido da sequência o peptídeo de trânsito original (*ER signal*) e adicionado o peptídeo de trânsito da PpXTH1 contendo 3 resíduos de aminoácidos além do sítio de clivagem, conforme estudo realizado por Schaaf e colaboradores (2005). Essa sequência foi submetida à síntese e inserida no vetor *pBluescript II SK(-)* pela empresa *Epoch Life Science Inc* (Texas, EUA). A sequência então foi amplificada via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com a utilização da enzima *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* e dos *primers* gene-específicos CACC-PpXTH-Forward (5'-CACCATGGGGTTCAATAGAGGGTTGC-3') e Prigida-Reverse (5'-TTAGATCTTCTCAGGGTTC-3') e posteriormente subclonada no vetor *pENTR™/D-TOPO®*, seguindo orientações do fabricante Invitrogen™. Em seguida o vetor produzido foi recombinado com o vetor de expressão

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Pág. 11 / 49

específico de musgo *pTHUbi-Gateway* (VIDALI et al., 2007) (gentilmente cedido por M. Bezanilla, *University of Massachusetts at Amherst, EUA*), contendo o promotor constitutivo de ubiquitina de milho (BEZANILLA et al., 2005), através de uma reação de recombinação LR, gerando o vetor final, *pTHUbiPrigCyc* (Figura 2). A produção do vetor foi confirmada via PCR, utilizando os *primers* supracitados e visualizada pela técnica de eletroforese em gel de agarose 1%. Além disso, o resultado também foi confirmado por meio de sequenciamento convencional com os primers gene específicos e também com *primers* tNOS5' *Reverse* (5'-CCTCGAGGTCGACGGTATCG-3') e UbiP3' *Forward* (5'-GGTGGCGGCCGCTCTAGAAC-3') desenhados para alinhar no terminador da nopalina sintase e do promotor da ubiquitina do milho, presentes no vetor de expressão. A análise dos dados obtidos foi realizada por meio do *software* *Sequence Scanner 2.0*.

Como prova de conceito, o presente estudo também demonstrou avanços relevantes na construção, implementação e avaliação de sistemas heterólogos para a produção de outros peptídeos ricos em cisteína recombinantes, incluindo o peptídeo linear *crotAMP14* e a β -defensina *AdBD-1*, derivada de *Anomalopteryx didiformis*. Os microrganismos *Escherichia coli* e *Pichia pastoris* foram avaliados como plataformas de expressão para a biossíntese desses peptídeos. Esses vetores foram sintetizados pela Epoch Life Sciences. O vetor pET21a(+)-ELP-inteína-*crotAMP14* se inicia sentido 5' com um sítio de BamHI, seguido por elastin like protein (ELP) contendo 60 repetições do pentapeptídeo VPGXG, onde X representa Val:Ala:Gly, em uma proporção de 5:3:2, seguido da inteína Mxe GyrA, modificada (C1A) para possibilitar a clivagem do C-terminal mantendo o N-terminal intacto, finalizando com o peptídeo e o sítio XhoI (Anexo B – Figura 4). Na construção do vetor pPICZ α A, foram adicionadas as seguintes sequências: um fator alfa de secreção, uma sequência de 6xHis para facilitar a purificação, seguido de um Fator Xa e, por fim, a sequência dos peptídeos de interesse, gerando as seguintes construções: pPICZ α A-His-tag-FLAG-*crotAMP14* (Anexo B – Figura 6) e pPICZ α A-His-tag-FLAG-*AdBD-1* (Anexo B – Figura 8).

Comente sobre o (s) resultado (s) (em caso de tarefa concluída, o indicador físico deverá constar como anexo ao relatório)

Os vetores foram efetivamente construídos, contudo, foi modificado o peptídeo alvo. Previamente, foi proposto o trabalho com o peptídeo PaMAP 1.9; ele foi substituído pelo peptídeo circular Parigidina-br1, *crotAMP14* e *AdBD1* como prova de conceito.

Justifique o eventual atraso ou adiantamento da execução da tarefa, em relação à previsão inicial
A atividade teve atraso devido ao atraso da meta física 1, o que causou um atraso sequencial no projeto.

Meta física 3	Executado no período		Acumulado da meta durante o projeto	
	Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Transformar protoplastos de <i>P. patens</i> com gene de expressão de PaMAP 1.9	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100

Atividade 3.1	Indicador físico de execução	Executado no período		Acumulado da atividade durante o projeto	
		Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente											Período (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Pág. 12 / 49

Transformação de células de <i>P. patens</i> com o gene de expressão de PaMAP 1.9	Células de <i>P. patens</i> positivas para a transformação com PaMAP 1.9 produzindo o peptídeo desejado	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100
---	---	--------------	--------------	--------------	--------------

Descreva o desenvolvimento da atividade

Para a transformação de protoplastos, foi necessário gerá-los a partir de placas com tecidos de musgo ainda no estágio de protonema, sete dias após a sua propagação, sob luz constante e temperatura de 25 °C. O material vegetal foi coletado e tratado com driselase 2% (Sigma D9515-25G) por 1h30, sob leve agitação, com o objetivo de degradar a parede celular e individualizar cada protoplasto. Para evitar danos aos protoplastos gerados durante a limpeza, a osmolaridade foi mantida com a utilização de uma solução de manitol a 8,5% e os protoplastos foram centrifugados a 250 g. Posteriormente, os protoplastos foram contados através da utilização de um hemocítmetro (câmara de Neubauer) e sua concentração foi ajustada para 2×10^6 células.mL⁻¹ com a solução 3M (manitol 0.4 M, MgCl 15 mM e MES 24 mM [pH 5.7]) e foram incubados por 20 min, a fim de dar prosseguimento à transformação, que foi mediada por polietilenoglicol (PEG) e por choque osmótico (LIU; VIDALI, 2011). Após o ajuste da concentração e a adição de 700 µl solução PEG/Ca²⁺ (PEG8000 4 g, manitol 0,3 M, CaCl₂ 0,154 M), foram utilizados 30 µg de DNA para cada 12×10^5 protoplastos gerados (cerca de 600 µl de suspensão de protoplastos), que foram incubados por 30 min à temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados aos protoplastos gerados, 3 mL de solução salina W5 (NaCl 54 mM, CaCl₂ 125 mM, KCl 5 mM, MES 2 mM [pH 5.7]) e misturados vagarosamente. Posteriormente, os protoplastos foram sedimentados por meio de centrifugação a 250 g e ressuspendidos em 2 mL de meio Top layer Agar (PRMT) pré-aquecido a 42 °C, sendo plaqueados em meio de regeneração PRMB (PpNH₄ + manitol 6%), no qual permaneceram por uma semana. A transformação do vetor pET21a (+) em *E. coli* BL21 (DE3), foi realizada pelo método de eletroporação, a uma voltagem de 1,8 kV. Após aplicação da voltagem foi adicionada as células competentes em 1 mL de meio Luria Bertani (LB) e transferido para um microtubo, incubado em estufa a 37 °C por uma hora, para crescimento das células transformadas. Após a incubação, 150 µL da cultura foram plaqueados em meio LB sólido enriquecido com o antibiótico ampicilina (100 µg.mL⁻¹). As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h para o crescimento das colônias transformadas (SAMBROOK, J. AND RUSSELL, 2000). No caso do vetor pPICZαA, a foram inoculados 5 mL das células *Pichia pastoris* em 50 mL de meio YPD (meio extrato de levedura 2%, peptona 1%, dextrose 2%) adicionado de zeocina como marcador de seleção, com o crescimento overnight a 30 °C. Essas células então foram reinoculadas em 500 mL de meio para crescerem novamente em overnight até uma D.O. = 1,3–1,5. Em seguida, essas células foram centrifugadas 1500 x g por 5 min por 3 vezes e ressuspendidas em água gelada e 1M sorbitol. Então, foram adicionados a uma cubeta de eletroporação: 80 µL do meio com células e 10 µg do vetor linearizado pPICZαA em 10 µL de água estéril. Após isso, a cubeta foi submetida à eletroporação e, logo após a transformação, as células eletroporadas foram incubadas a 30 °C por 2 h. Em seguida, as células foram plaqueadas em meio YPD com 100 µg.mL⁻¹ de zeocina. Para a análise da transformação, foi feita uma reação de PCR com primers que se anelam ao promotor e terminador do gene AOX1 presentes no vetor pPICZαA. A análise da PCR foi realizada em gel de agarose a 1%.

Comente sobre o (s) resultado (s) (em caso de tarefa concluída, o indicador físico deverá constar como anexo ao relatório)

Já a seleção de transformantes foi realizada em dois ciclos em meio PpNH₄ suplementado com antibiótico higromicina 15 µg.ml⁻¹ durante 14 dias, alternando com duas fases de *release*, em meio PpNH₄ desprovido do agente seletivo, por outros 14 dias. Nesta fase, muitos protonemas que não possuíam o cassete de interesse, não resistiram à esta fase. Esta situação na qual as setas pretas indicam protonemas que não sobreviveram a esta condição. Em contrapartida, a seta amarela indica protonemas que possuíam o cassete de interesse, resistiram e se desenvolveram em gametófitos.

Justifique o eventual atraso ou adiantamento da execução da tarefa, em relação à previsão inicial

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Pág. 13 / 49

A atividade teve atraso devido ao atraso da meta física 1, o que causou um atraso sequencial no projeto.

Meta física 4	Executado no período		Acumulado da meta durante o projeto	
	Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Cultivar protoplastos de <i>P. patens</i> produtoras do peptídeo PaMAP 1.9 recombinante	3m/3m 100	5m/5m 100	5m/5m 100	5m/5m 100

Atividade 4.1	Indicador físico de execução	Executado no período		Acumulado da atividade durante o projeto	
		Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Realizar o cultivo de protoplastos de <i>P. patens</i> que sejam positivos para a produção do peptídeo	Protoplastos positivos para a produção do peptídeo recombinante	3m/3m 100	5m/5m 100	5m/5m 100	5m/5m 100

Descreva o desenvolvimento da atividade

Os passos de seleção de transformantes foram realizados de acordo com SCHWEEN; FLEIG; RESKI (2002), em que foram realizados dois ciclos de 14 dias em meio PpNH4 com a presença do antibiótico higromicina a 15 µg.ml⁻¹ e outros 14 dias em meio PpNH4 sem a adição de agente seletivo. Ao final deste período, o DNA genômico das plantas foi extraído através de um método utilizando detergente SDS (dodecil sulfato de sódio) e LiCl, estabelecido por Bezanilla (2008). Posteriormente, as amostras de DNA foram submetidas a uma PCR com dois pares de primers distintos. No primeiro caso, foram utilizados os primers UbiPro3' Forward (5'-GGTGGCGGCCGCTCTAGAAC) e tNOS5' Reverse (5'- CCTCGAGGTCGACGGTATCG), visando a amplificação de uma parte do vetor de expressão na qual se incluem o promotor da ubiquitina, a parigidina-br1 e o terminador da nopalina sintase (444pb). No segundo caso, foram utilizados os primers PpG3PDH-Forward (5'GGACCCTGCTGAAATCCCATGGG) e PpG3PDH-Reverse (5'CAGTGGTGGCATGCACAGTGGTC), que alinham no maior éxon localizado na região central do gene que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfatogliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, como controle de eficiência de extração de DNA. Posteriormente, para análise dos transformantes, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% (Anexo B – Figura 3, 5, 7 e 9).

Comente sobre o (s) resultado (s) (em caso de tarefa concluída, o indicador físico deverá constar como anexo ao relatório)

Após a segunda fase de seleção, 30 plantas que resistiram e apresentaram maior crescimento depois desse período, foram selecionadas e submetidas à extração de DNA, com a finalidade de verificar a integração da sequência codante da parigidina-br1 no genoma do musgo. Para esta análise, foi realizada uma PCR com o uso de dois pares de primers, cada um separadamente. No primeiro caso foram empregados os primers UbiPro3' For (5'-GGTGGCGGCCGCTCTAGAAC) e tNOS5'Rev (5'- CCTCGAGGTCGACGGTATCG), visando a amplificação de uma parte do vetor de expressão na qual incluem o promotor da ubiquitina, a parigidina-br1 e o terminador da nopalina sintase (444pb), respectivamente (ANEXO B). No segundo, foram utilizados os primers PpG3PDH-Forward e PpG3PDH-Reverse, que alinham no maior éxon localizado na região central do gene que codifica a enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (308 pb), como controle da eficiência da extração de DNA. Além disso, também foram utilizadas como controle duas plantas de *P. patens wild-type* (selvagens) caso



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente											Período (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

alguma falha ocorresse no processo de extração ou ainda por algum erro de pipetagem durante a montagem da reação de PCR e ainda o próprio vetor de expressão *pTHUbiPrigCyc* como controle positivo. Ademais, o produto das reações de PCR foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (ANEXO B – Figura 3). A análise do gel de agarose com as reações de PCR denota que as plantas WT1 e WT2, 1 a 6 tiveram o seu DNA eficientemente extraído pela presença de uma porção do gene controle da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que são mostradas na parte inferior da figura 14. Já na parte superior, é indicado que as plantas de 1 a 6 contêm o fragmento da construção de transformação, na qual está presente a sequência codante da parigina-br1. Neste caso, como não houve amplificação nas plantas WT e nem no controle de água (H₂O), pode-se considerar que as primeiras seis plantas analisadas estão transformadas, ou seja, possuem integração do DNA transformante. O mesmo processo foi repetido para analisar as outras 24 plantas, que também foram confirmadas como transformadas pelo mesmo tipo de análise. A utilização do par de *primers* da construção, em vez dos *primers* gene-específicos CACC-PpXTH-Forward e Prigida-Reverse, apresentados no segmento de material e métodos e utilizados para confirmar a produção do vetor final de transformação, deu-se devido à natureza do material analisado e à região de anelamento dos *primers*. Os *primers* UbiP3'Forward e tNOS5'Reverse, como já citado, anelam no promotor da ubiquitina e no terminador da nopalina sintase. Já os *primers* gene-específicos CACC-PpXTH-Forward e Prigida-Reverse, anelam no peptídeo sinal xiloglucano endotransglicosilase-hidrolase 1 (PpXTH1) e na porção final da sequência codante da parigidina-br1, respectivamente. Por se tratar de um peptídeo de trânsito natural de musgo, a utilização do *primer* CACC-PpXTH-Forward para a análise de plantas de *P. patens*, levaria a amplificação de produtos inespecíficos, tanto em plantas *wild type* e em possíveis plantas transformadas, devido ao anelamento de alta especificidade desde *primer*, acompanhadas de um anelamento inespecífico do *primer* Prigida-Reverse. Por este motivo, optou-se pela utilização dos *primers* envolvidos na amplificação de uma parte da construção, uma vez que as regiões amplificadas estão localizadas apenas no vetor de transformação. Embora existam diferentes métodos, como a biobalística e o processo mediado por *A. tumefaciens*, a transformação de protoplastos pela ação de PEG é um dos procedimentos mais empregados, principalmente devido a sua facilidade e eficiência, apresentando uma taxa de sobrevivência de protoplastos entre 10 a 30% (SCHAEFFER, 2002). Portanto, essa foi a técnica selecionada para a realização desse estudo. A integração de DNA exógeno neste organismo, ocorre preferencialmente por meio de recombinação homóloga em qualquer região do genoma da planta, desde que, na construção do fragmento de interesse, haja a presença de sequências homólogas (5' e 3') a algum ponto de seu genoma (KAMISUGI et al., 2006). Neste trabalho, o local de recombinação do cassete de transformação denomina-se *locus* 108, compreendendo uma região não codificante, portanto, neste caso, a integração do gene de interesse não inviabiliza o desenvolvimento da planta por não haver interrupção de nenhuma região codificante essencial (SCHAEFFER; ZYRD, 1997). KAMISUGI et al. (2005) descrevem a existência de formas alternativas de integração em *P. patens*, embora haja registros de que a recombinação homóloga possa atingir valores próximos a 100%. Entre elas, existe a possibilidade de a recombinação homóloga acontecer em apenas um dos sítios, seja na região 5' ou 3', seguida de uma união terminal não homóloga na outra extremidade. Além disso, a inserção ectópica também pode ocorrer neste organismo. Em linhas gerais, o método de transformação via PEG pode gerar três classes distintas de transformantes. Dentre elas estão os transformantes estáveis, ou seja, plantas nas quais há integração e expressão do transgene, e ainda os temporários ou transientes, que consistem em plantas que expressam o gene de interesse durante um curto período de tempo, mas perdem tal característica após alguns dias, devido à não retenção do transgene, e morrem após a exposição ao agente seletivo. Igualmente, dentre as sobreviventes, estão presentes também os transformantes instáveis (COVE, 2005). ASHTON et al. (2000), descrevem que transformantes instáveis contêm concatêmeros extracromossomais que podem ocorrer, na grande maioria dos eventos, devido à conformação circular do vetor de transformação, embora HOHE et al. (2004) reportem que este evento também possa ocorrer quando o DNA exógeno se encontra linearizado. Estes transformantes podem permanecer resistentes por um longo período em meio de cultura seletivo, mas, quando são introduzidos em meio de cultura sem agente seletivo, perdem essa resistência devido à supressão do DNA transgênico (HOHE et al., 2004). Por isso, é necessário submeter as plantas a mais de um período de seleção com a presença de antibiótico, seguido de um período de *release*, conforme descrito na metodologia. Em seu trabalho, SCHWEEN; FLEIG; RESKI (2002), propõe a realização de um terceiro período de seleção em plantas que resistiram às duas fases de seleção e que se apresentavam ou não PCR positivas. Nessa condição, 91,1% do total analisado, correspondia a plantas resistentes onde houve detecção via PCR. Já o restante, 8,9%, eram plantas que resistiram, mas não houve detecção prévia da presença do gene de interesse, provavelmente devido a uma extração de DNA ineficiente. Após a terceira fase



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

de seleção, cerca de 2% das plantas confirmadas por PCR não resistiram ao novo estímulo e foram consideradas instáveis. Enquanto isso, 2,2% das plantas em que não houve detecção prévia não resistiram a nova rodada de seleção e também foram consideradas instáveis. Já o restante das plantas mostrou-se resistente e foi classificado como estável.

Tendo em vista o estudo publicado por SCHWEEN et al. (2002) e para conferir maior confiabilidade aos resultados obtidos, explantes de cada uma das quarenta colônias selecionadas foram submetidos a uma nova rodada de seleção com higromicina e reavaliados a fim de verificar a presença do cassete de transformação. Dessa forma, apenas duas plantas não resistiram ao novo ciclo de seleção, e as outras 28 foram reconfirmadas e mantiveram-se PCR-positivas. Tal resultado confirma a presença de plantas estáveis, ou seja, em que houve integração do DNA exógeno no genoma do musgo *P. patens*. Sendo assim, estas plantas estão sendo mantidas e propagadas em cultura de tecidos para a obtenção de material vegetal suficiente para a realização de estudos posteriores de expressão do ciclótideo parigidina-br1. Para além do ciclótideo, as provas de conceito de diferentes sistemas de expressão heteróloga foram confirmadas por PCR de colônia dos transformantes com os vetores pET21a(+)-ELP-inteína-crotAMP14 (Figura 5), pPICZαA-His-tag-FLAG-crotAMP14 (Figura 7) e pPICZαA-His-tag-FLAG-AdBD-1 (Figura 9).

Justifique o eventual atraso ou adiantamento da execução da tarefa, em relação à previsão inicial

A atividade teve atraso devido à meta física 1, o que provocou um atraso sequencial no projeto. Além disso, a atividade estava prevista para ser executada em 3 meses, e estendeu-se por dois meses além do previsto.

Meta física 5	Executado no período		Acumulado da meta durante o projeto	
	Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Extraírem-se efetivamente o peptídeo PaMAP 1.9 recombinante de protoplastos de <i>P. patens</i>	3m/3m 100	11m/11m 100	11m/11m 100	11m/11m 100

Atividade 5.1	Indicador físico de execução	Executado no período		Acumulado da atividade durante o projeto	
		Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Extração do peptídeo recombinante	Extração qualitativa e quantitativa eficaz de PaMAP 1.9	3m/3m 100	11m/11m 100	11m/11m 100	11m/11m 100

Descreva o desenvolvimento da atividade

As proteínas foram extraídas de 10 transformantes estáveis de musgo, provenientes da cultura sólida, além de uma planta *wild type*, atuando como controle negativo, e de uma amostra de folhas de *P. rigida*, como controle positivo, uma vez que a parigidina-br1 é originária desta espécie vegetal. Para minimizar algumas variáveis, tanto as plantas de musgo, quanto as folhas de *P. rigida* foram pesadas igualmente com cerca de 1 g cada. Inicialmente, as amostras foram maceradas com N₂ líquido e tiveram suas proteínas extraídas por meio de um método que utilizava 25 mL de diclorometano/metanol (1:1, v/v), sob leve agitação, durante 12 h em ambiente



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

refrigerado, seguidas por filtração em algodão. Os extratos então foram depositados individualmente em um funil de separação, adicionada água destilada e colocados sob vigorosa agitação, seguidos de repouso para a separação das fases orgânica e aquosa, sendo que esta última foi coletada em um tubo Falcon®, congelada em freezer -80°C e liofilizada. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em 500 µl de água destilada e submetidas a uma microcromatografia em ZipTip C18 (Milipore, Billerica, MA, USA), liofilizadas e ressuspensas novamente com 10 µl água MilliQ.

Na cultura líquida em pequena escala (125 mL) em meio PpNH₄, por sua vez, as frações do meio de cultura de duas plantas de musgo transformadas foram centrifugadas e filtradas por meio de um sistema de filtração de 0,22 µm, a fim de separar o meio de cultura do musgo em suspensão. As frações de meio coletadas, foram congeladas, liofilizadas e ressuspensas em 500 µl de água destilada e também submetidas a uma microcromatografia em ZipTip C18 (Milipore, Billerica, MA, USA), para dessalinização. Assim como no extrato proteico, as amostras de meio também foram liofilizadas, ressuspensas em 10 µl de água MilliQ e também submetidas a análise via espectrometria de massa em MALDI-ToF.

A expressão heteróloga em *E. coli* BL21 (DE3) iniciou-se a partir de um inóculo em 5 mL de meio LB suplementado com 100 µg mL⁻¹ de ampicilina e foi incubada a 37 °C por 16 horas. Em seguida, 2 mL inóculo foram transferidos para 198 mL de meio TB (*Terrific Broth*) suplementado com glicerol (4 mL.L⁻¹) e ampicilina (100 µg.mL⁻¹, posteriormente incubado a 37 °C em um agitador orbital a uma velocidade de 220 rpm. O crescimento bacteriano foi acompanhado por meio da densidade ótica (600 nm) até atingir valores entre 0,5 e 0,6 para iniciar o processo de indução. Após atingir a OD esperada, foi adicionado 1 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG); em seguida, foram coletadas alíquotas de 1 mL a cada hora até completar 4 horas de indução. Essas alíquotas foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 2 mL e centrifugadas em microcentrífuga de mesa, a velocidade máxima, por 3 minutos, à temperatura ambiente. Os sobrenadantes e os pellets de células resultantes foram armazenados a -80 °C. A análise dos diferentes tempos de indução e do produto final da expressão foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE), seguindo o protocolo descrito por Laemmli (1970). Esse procedimento permitiu avaliar os níveis de expressão do peptídeo em diferentes momentos após a indução e verificar a eficácia do processo de expressão heteróloga. Após a expressão heteróloga em *E. coli* BL21 (DE3), o volume de cultura foi resfriado no gelo por 20 min. As células foram centrifugadas à 4.000g por 10 min à 4°C e o precipitado foi ressuscitado em 1/20 da cultura original de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5, EDTA 2 mM e lisozima 0,1 mg.mL⁻¹), deixado em repouso no gelo por 45 minutos e em seguida congeladas por 16 horas. Em seguida, as células foram submetidas à lise completa por meio de ultrassom (18 pulsos de 10 s, com 80% de amplitude) e centrifugadas a 16.000 g a 4 °C por 1 h. O sobrenadante contendo o lisado de células clarificado foi transferido para tubos de 50 mL, adicionadas de 3 M de NaCl. Logo após, o tubo foi incubado por 10 min a 37 °C para permitir a agregação dos ELPs e então centrifugado a 37 °C por 10 minutos a 16.000 g. Em seguida, foram adicionados 2 volumes de água ultrapura e submetidos à agitação a uma temperatura de 4 °C para total solubilização do precipitado. Após a solubilização, realizou-se centrifugação a 4 °C por 45 minutos. Encerrando um ciclo de precipitação que se repetiu duas vezes. O precipitado final corresponde, então, à fração rica em ELPs ligados ao peptídeo crotAMP14 pela inteína Mxe GyrA (Fong et al., 2009).

A clivagem da inteína Mxe GyrA, introduzida no sistema de expressão de *E. coli* BL21 (DE3), foi avaliada em diferentes soluções de clivagem (20 mM BisTris pH 6.0 e 20 mM Tris-HCl pH 6.0 500 mM NaCl 2mM EDTA, 1 mM DTT e 5% glicerol). Para isso, o precipitado rico em ELPs foi ressuscitado em uma das soluções de clivagem geladas e incubados em diferentes temperaturas a 4 °C e 25 °C e ficaram sob agitação por 72 horas. As amostras foram coletadas a cada 24 h. As amostras coletadas foram centrifugadas a 16.000 xg por 20 min em temperatura ambiente.

Comente sobre o (s) resultado (s) (em caso de tarefa concluída, o indicador físico deverá constar como anexo ao relatório)

A análise da expressão da parigidina-br1 no musgo *P. patens* foi realizada por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF e ESI-MS, após extração proteica pelo método DCM:MeOH. Este método de extração é o mais empregado para a extração de ciclotídeos, sendo amplamente utilizado em diversos estudos de prospecção dessas biomoléculas cíclicas (JENNINGS, C. et al., 2001; SIMONSEN et al., 2005). O princípio deste método de separação baseia-se nas diferentes solubilidades em dois líquidos não miscíveis, nos quais se objetiva a extração de compostos de naturezas distintas. Os ciclotídeos, por se tratar de polipeptídeos não são solúveis



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

em diclorometano. Entretanto, os lipídeos, a clorofila e outros compostos orgânicos de baixo peso molecular, como terpenóides e fenilpropanóides, são removidos nessa fração (CLAESON et al., 1998). Por sua vez, na fração metanólica é possível encontrar os ciclotídeos solubilizados, juntamente com alguns polifenóis como os taninos, flavonóides, catequinas entre outros (CLAESON et al., 1998). Ademais, para a retirada do metanol e dos sais, todas as amostras foram congeladas, liofilizadas e submetidas à microcromatografia em ZipTip C18 (Milipore, Billerica, MA, USA), para que os espectros pudessem ser analisados por MALDI-TOF. Dessa forma, os espectros analisados também permitiram investigar a presença de ciclotídeos endógenos no musgo *P. patens*.

Nos espectros, foram avaliadas massas entre 3279.79 Da e 3303.86 Da, representando, respectivamente, a massa do ciclotídeo com a conformação cíclica completa, com a presença das três pontes dissulfeto e a ligação entre o N- e o C-terminais, e, ainda, a massa do ciclotídeo de forma linear. As massas intermediárias a essas também foram verificadas, uma vez que podem indicar a não realização das modificações pós-traducionais do peptídeo, ou seja, a ausência das três pontes dissulfeto e/ou da ligação peptídica entre as extremidades terminais (ANEXO C). As diferentes estratégias de expressão heteróloga foram testadas em escala reduzida (200 mL de meio em erlenmeyer de 1L). O sistema pET21a(+)-ELP-inteína-crotAMP14 foi induzido com 1 mM de IPTG e as alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo (0 h, 1 h, 2 h, 3 h e 4 h) após a indução para posterior análise em SDS-PAGE. A partir de 1 hora após a indução, observamos a presença de uma banda correspondente ao tamanho esperado do peptídeo CrotAMP14, seguida da ELP e da inteína, com um peso molecular aproximado de 50 kDa, conforme ilustrado no Anexo C - Figura 10.

Observou-se expressão heteróloga bem-sucedida do crotAMP14 em *E. coli* BL21(DE3), confirmando a funcionalidade do sistema de produção bacteriano. Contudo, a etapa de clivagem da inteína não foi eficiente nas condições experimentais avaliadas (Anexo C - Figura 11), o que indica a necessidade de otimizar os parâmetros de processamento pós-expressão. Já o sistema pPICZαA-His-tag-FLAG-crotAMP14, no qual a *Pichia pastoris* X-33 foi escolhida como sistema hospedeiro para a expressão do peptídeo recombinante, foi induzido com metanol por 72 h e, posteriormente, avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Observou-se uma banda compatível com o peso molecular esperado do peptídeo recombinante (~3.783 kDa; Anexo C - Figura 12).

O sistema pPICZαA-His-tag-FLAG-AdBD-1 foi analisado, observando-se a presença de uma banda na faixa esperada com cerca de 6 kDa. Esse resultado indicou, de forma preliminar, a possível expressão do peptídeo AdBD-1 (Anexo C - Figura 13).

Justifique o eventual atraso ou adiantamento da execução da tarefa, em relação à previsão inicial

A atividade teve atraso devido ao atraso da meta física 1, o que causou um atraso sequencial no projeto. A quantidade de proteína extraída dos protoplastos se mostrou muito abaixo do necessário para dar prosseguimento às etapas subsequentes de caracterização e análise de funcionalidade do peptídeo.

Meta física 6	Executado no período		Acumulado da meta durante o projeto	
	Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Avaliar estruturalmente por meio de dicróismo circular se o peptídeo recombinante manteve sua estrutura helicoidal original, observada em PaMAP 1.9	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Pág. 18 / 49

Atividade 6.1	Indicador físico de execução	Executado no período		Acumulado da atividade durante o projeto	
		Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Verificação da integridade estrutural de PaMAP 1.9	Presença do peptídeo em sua conformação nativa e funcional.	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100

Descreva o desenvolvimento da atividade

A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC). Antes de passar na coluna, a amostra será filtrada por um filtro de 0,45 µm. A coluna será lavada com água destilada (cerca de 10x o volume de resina) e, em seguida, adicionada à resina de níquel do ProBond™ Purification System. Posteriormente, a coluna e amostra serão equilibradas com tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,0). Desta forma, a resina de níquel será adicionada ao sobrenadante resultante da extração. Em um tubo de Falcon, com todos os componentes citados, as amostras ficarão overnight em misturador a 4 °C. Na sequência, será realizada a lavagem da resina com a passagem de Tris-HCl pela coluna, e o líquido coletado. Por conseguinte, o imidazol (300 mM) será adicionado à coluna, eluindo a amostra purificada.

Além disso, foi realizada a elucidação estrutural do peptídeo antimicrobiano crotAMP14 por meio de ressonância magnética nuclear (RMN). Os experimentos de RMN para análise estrutural do crotAMP14 ([¹H-¹H]-TOCSY, [¹H-¹H]-NOESY e [¹H-¹³C]-HSQC) foram realizados em micelas de SDS-d25. O processo de atribuição foi conduzido por meio da identificação dos sistemas de spin no mapa de contorno do TOCSY e da atribuição sequencial da sequência, utilizando a região amídica do mapa de contorno do NOESY. O sistema de spin de cada resíduo foi confirmado por meio dos deslocamentos químicos hidrogênio-carbono observados no experimento HSQC. As correlações dos sistemas de spin foram identificadas no espectro de NOESY, e os ângulos diedrais foram obtidos a partir das correlações de H_α, H_β, C_α e C_β. Interessantemente, o sistema de spin do primeiro resíduo, 1LYS, não foi observado, conforme descrito na Tabela S6, porém, sua correlação com 2ARG esteve presente (Figuras 24 e 25). O mapa de correlação de NOE apresenta conexões intra-resíduo e sequenciais de intensidade média e fraca entre todos os resíduos, por meio de conectividades HN-H_α e HN-HN. Conectividades fracas e médias (HN-H_β) foram observadas entre os três últimos resíduos – 12LYS-13ILE-14PHE. Também foram observadas conectividades de curta distância (HN-HN, i,i+2; HN-H_α, i,i+2), de média distância (HN-H_α, i,i+3) e de longa distância (HN-H_α, i,i+4). Nas condições experimentais, os carbonos alfa e beta de 1LYS, 3LEU, 6ILE, 7PHE, 11ILE, 13ILE e 14PHE não foram identificados; contudo, isso não comprometeu a determinação dos deslocamentos químicos dos demais carbonos e dos resíduos não mencionados. As estruturas tridimensionais foram calculadas com base em restrições de distância derivadas das intensidades de NOE e dos ângulos diedrais calculados pelo software DANGLE (Figuras 24a e 25).

Comente sobre o (s) resultado (s) (em caso de tarefa concluída, o indicador físico deverá constar como anexo ao relatório)

Após a expressão heteróloga do sistema pPICZαA-His-tag-FLAG-crotAMP14, procedeu-se à purificação da amostra por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (Anexo D - Figura 14), seguida de análise por HPLC (Anexo D - Figura 15). Os picos compatíveis com o peptídeo de interesse foram submetidos à espectrometria de massas por MALDI-TOF (Anexo D - Figura 16), que identificou fragmentos com massas inferiores às esperadas. Para melhor caracterização, realizou-se a digestão com tripsina e a análise subsequente por MALDI-MS/MS. A clivagem com tripsina permite gerar fragmentos previsíveis *in silico*, o que favorece a identificação do peptídeo. A análise confirmou a presença da cauda de histidina (His-tag), do sítio de clivagem da FLAG e de parte da sequência do peptídeo de interesse (Anexo D - Figuras 17 e 18). Esses achados indicam que o sistema de expressão está funcional, mas apontam para uma possível degradação do peptídeo, que pode ter ocorrido



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente											Período (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

durante a expressão. Diante desses resultados, temos como perspectiva otimizar o protocolo de expressão e de purificação antes de prosseguir com novas análises.

Foi obtido o peptídeo AdBD1 a partir do sistema pPICZ α A-His-tag-FLAG-AdBD-1 e realizada uma cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC). As amostras coletadas durante o experimento foram analisadas em SDS-PAGE (Anexo D - Figura 19), revelando uma banda do tamanho esperado de aproximadamente 6 kDa, na amostra do eluído 1. Em seguida, essa amostra foi purificada no HPLC (Anexo D - Figura 20).

Na análise com o MALDI-TOF da amostra de β -defensina do Moa, Fator Xa e HisTag purificados no HPLC foi possível confirmar a presença de um íon com tamanho de 6536.56 (Anexo D - Figura 21), o tamanho esperado do peptídeo é de 6195.88 Da, sem modificações. Porém, com as modificações nas cisteínas da molécula, após os processos de redução e alquilação, ela passa a ter 6534,94 Da. Na análise de espectrometria de massa (MS) da tripsinização, foi detectado o íon 1528.59 (Anexo D - Figura 22), que foi posteriormente utilizado como íon parental na análise de espectrometria de massa (MS/MS). Na análise do espectro de massa MS/MS, foi possível fazer o sequenciamento de parte do peptídeo, foi identificada a sequência F, D, Q, I/L, S, confirmando a expressão da defensina (Anexo D - Figura 23).

Na análise com o MALDI-ToF da amostra de β -defensina do Moa, Fator Xa e HisTag purificados no HPLC foi possível confirmar a presença de um íon com tamanho de 6536.56, o tamanho esperado do peptídeo é de 6195.88 Da, sem modificações. Porém, com as modificações nas cisteínas da molécula, após os processos de redução e alquilação, ela passa a ter 6534,94 Da. Na análise de espectrometria de massa (MS) da tripsinização, foi detectado o íon 1528.59, que foi posteriormente utilizado como íon parental na análise de MS/MS. Na análise do espectro de massa MS/MS foi possível fazer o sequenciamento de parte do peptídeo, e foi identificada a sequência F, D, Q, I/L, S, confirmando a expressão da defensina.

As estruturas do crotAMP14 são predominantemente compostas por α -hélices, com os primeiros e os últimos resíduos em conformação de *coil*. Conforme apresentado na Fig. 25, os resíduos organizam-se em uma estrutura anfipática, com exceção do 11ILE, que se encontra na região hidrofílica. O resíduo 14PHE está enterrado e aparenta interagir com o 10MET, conforme previamente observado no mapa de correlação de NOE. Notavelmente, o RMSD das estruturas secundárias sobrepostas do backbone peptídico apresenta baixa variação ($0,14 \pm 4,903223E-02$), indicando a estabilidade estrutural do crotAMP14 nas condições estudadas. A análise do gráfico de Ramachandran (Figura 26) demonstra que a maioria dos resíduos (93,6%) encontra-se na região mais favorecida, enquanto 6,44% se situam na região adicionalmente permitida.

A atividade biológica dos peptídeos antimicrobianos (AMPs) depende amplamente de determinantes físico-químicos cruciais, incluindo carga, grau de helicidade, hidrofobicidade, comprimento da sequência, anfipaticidade e solubilidade. Assim, compreender a relação entre a estrutura e a função dessas biomoléculas é essencial para o desenvolvimento de novos fármacos. Neste estudo, os resultados de RMN demonstraram que o crotAMP14, ao entrar em contato com SDS, adota uma conformação em α -hélice, corroborando dados de simulações de dinâmica molecular previamente publicados por nosso grupo.

Os peptídeos catiônicos em α -hélice com atividade anticâncer (ACPs) constituem uma classe relevante de peptídeos antitumorais, geralmente atuando sobre células neoplásicas por meio de interações eletrostáticas com a membrana celular, levando à lise celular. Estudos recentes indicam que a atividade anticâncer pode estar relacionada ao conteúdo helicoidal e à hidrofobicidade desses peptídeos. O crotAMP14 enquadra-se nessa classe de peptídeos sintéticos curtos, catiônicos (+8) e em α -hélice, o que pode explicar seu potencial antitumoral, uma vez que Oliveira e colaboradores (2020) demonstraram que o crotAMP14 interage com a membrana plasmática de células bacterianas. Conforme evidenciado pelos dados espectroscópicos apresentados a seguir, o crotAMP14 também interage com a membrana plasmática de células de câncer de mama triplo-negativo.

Justifique o eventual atraso ou adiantamento da execução da tarefa, em relação à previsão inicial

A atividade teve atraso devido à meta física 1, o que provocou um atraso sequencial no projeto. A quantidade de proteína extraída dos protoplastos foi muito abaixo do necessário para dar prosseguimento às etapas subsequentes de caracterização e análise da funcionalidade do peptídeo. Como estratégia de mitigação, outros peptídeos foram utilizados em substituição à parigidina-br1 para a expressão heteróloga e a posterior caracterização.

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Pág. 20 / 49

Meta física 7	Executado no período		Acumulado da meta durante o projeto	
	Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Avaliar a atividade bactericida de PaMAP 1.9 recombinante frente a cepas patogênicas de isolados bovinos	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100

Atividade 7.1	Indicador físico de execução	Executado no período		Acumulado da atividade durante o projeto	
		Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Determinação de CIM/CBM	Avaliação do efeito antibacteriano/bactericida do peptídeo recombinante	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100

Descreva o desenvolvimento da atividade

Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas em diferentes condições de temperatura, salinidade e pH para as bactérias da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC): *E. coli* 25922 e *S. aureus* 25923. Primeiramente, as bactérias cresceram por 12h em caldo *Mueller-Hinton* a 37°C. Foram realizadas as medições da CIM utilizando 5×10^5 UFC/mL⁻¹, com diluições seriadas do peptídeo CrotAMP14, a partir de uma concentração inicial de 32 µM, em volume final de 100 µL. A CIM foi determinada após 24 horas de incubação a 37 °C, seguindo os protocolos estabelecidos pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), definindo-se como a menor concentração do peptídeo capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano. A avaliação foi realizada por meio de leituras de absorbância em placas de 96 poços de poliestireno, utilizando um leitor de microplacas ajustado para 595 nm (*Bio-Tek PowerWave* HT, EUA). Para o controle negativo, foram utilizadas bactérias cultivadas em caldo MH, enquanto o controle positivo foi composto por bactérias cultivadas em caldo MH suplementado com o antibiótico cloranfenicol a 160 µg/mL. Foram realizadas três réplicas técnicas e as medições da CIM seguiram os padrões estabelecidos pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). Além disso, a estabilidade do peptídeo CrotAMP14 foi avaliada por meio de incubações de 30 min a 37 °C, 50 °C e 95 °C, para determinar a resistência à temperatura. Para as condições de pH e salinidade, o peptídeo foi incubado a 37 °C por 1 h em tampões de 100 mM, incluindo tampão de glicina-HCl (pH 2.0), tampão de acetato de sódio (pH 4.0), tampão de fosfato de sódio (pH 6.0) e tampão de Tris-HCl (pH 8.0). Quanto à salinidade, foram utilizadas soluções de NaCl nas concentrações de 50 mM, 100 mM, 150 mM e 200 mM. Após cada um desses tratamentos, a atividade antimicrobiana do peptídeo CrotAMP14 contra as bactérias foi avaliada por meio de ensaios de CIM, conforme descrito (Zhang, *et al.*, 2024).

Comente sobre o (s) resultado (s) (em caso de tarefa concluída, o indicador físico deverá constar como anexo ao relatório)

Os resultados demonstraram que o peptídeo CrotAMP14 apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 4 µM contra *Escherichia coli*. Esse valor permaneceu inalterado mesmo após a exposição do peptídeo a diferentes temperaturas (37 °C, 50 °C e 95 °C), evidenciando elevada estabilidade térmica. A manutenção da atividade antimicrobiana após aquecimento a 95 °C indica que o CrotAMP14 preserva sua integridade estrutural e funcional sob condições de estresse térmico. Em relação a *Staphylococcus aureus*, a CIM foi de 32 µM em todas as temperaturas avaliadas, reforçando a estabilidade térmica do peptídeo também frente a bactérias Gram-positivas. Nos ensaios conduzidos sob diferentes condições de pH (2, 4, 6 e 8), a CIM contra *E. coli* manteve-



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

se em 4 μM , enquanto, para *S. aureus*, foi superior a 32 μM . Destaca-se que o peptídeo manteve atividade antimicrobiana em condições altamente ácidas (pH 2) e levemente alcalinas (pH 8), sugerindo robustez estrutural e potencial aplicação em ambientes fisiológicos e patológicos distintos, como o ambiente gástrico (pH ~2,0) e feridas crônicas (pH 7,4–8,9). Adicionalmente, o CrotAMP14 demonstrou estabilidade em diferentes concentrações de NaCl. Em avaliações contra *E. coli*, a CIM obtida foi de 2 μM nas concentrações de 0, 50, 100 e 200 mM de NaCl, apresentando um discreto aumento para 4 μM em 150 mM. A concentração bactericida mínima (CBM) foi de 16 μM nas concentrações de 0, 50, 100 e 150 mM, e de 8 μM em 200 mM. Para *S. aureus*, a CIM foi de 32 μM em 50 mM de NaCl, enquanto a CBM manteve-se em 32 μM nessa condição e foi superior a 32 μM nas concentrações de 100, 150 e 200 mM.

Justifique o eventual atraso ou adiantamento da execução da tarefa, em relação à previsão inicial

A atividade teve atraso devido à meta física 1, o que provocou um atraso sequencial no projeto. A quantidade de proteína extraída dos protoplastos foi muito abaixo do necessário para dar prosseguimento às etapas subsequentes de caracterização e análise da funcionalidade do peptídeo. Como estratégia de mitigação, outros peptídeos foram utilizados em substituição à parigidina-br1 para expressão heteróloga e posterior caracterização.

Meta física 8	Executado no período		Acumulado da meta durante o projeto	
	Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Avaliar a atividade antibiofilme de PaMAP 1.9 recombinante frente a cepas patogênicas formadoras de biofilme de isolados	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100

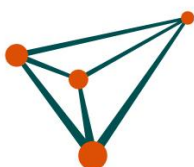
Atividade 8.1	Indicador físico de execução	Executado no período		Acumulado da atividade durante o projeto	
		Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Determinação de CIMB	Avaliação do efeito antibiofilme do peptídeo recombinante	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100

Descreva o desenvolvimento da atividade

Devido ao fato de o peptídeo crotAMP14 ter sido escolhido para futuros testes, substituímos os testes em bactérias por testes em células tumorais, uma vez que o peptídeo parental, a partir do qual o crotAMP14 foi desenvolvido, já apresentava atividade antitumoral. Desse modo, células de câncer de mama triplo-negativo (MD-MB-231), de MFC-7 e de PMC-42 foram utilizadas para avaliar a eficácia desse peptídeo. A escolha destas linhagens se dá pela diferença de agressividade, entendida como potencial metastático, bem como pela presença ou ausência de receptores na membrana plasmática, o que pode dificultar o tratamento. As linhagens celulares de adenocarcinoma humano (MDA-MB-231, MCF-7 e PMC-42), bem como a cultura primária de fibroblastos isolados de tecido abdominal do doador, foram utilizadas no presente estudo para determinar a atividade dos peptídeos contra células neoplásicas e a citotoxicidade dessas moléculas sobre células saudáveis. Todas as linhagens de adenocarcinoma humano foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS).

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Pág. 22 / 49

Comente sobre o (s) resultado (s) (em caso de tarefa concluída, o indicador físico deverá constar como anexo ao relatório)

O crotAMP14 foi eficaz contra a linhagem de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231 nas concentrações de 64, 32 e 16 μM (Figuras 27 e 28). Entre todas as neoplasias mamárias, o câncer de mama triplo-negativo (TNBC) é um dos subtipos mais frequentes, representando entre 10% e 20% dos casos. Devido à sua complexidade, o tratamento do câncer de mama é multidisciplinar, sendo recomendada a cirurgia convencional, associada à radioterapia, ou a mastectomia em mulheres com câncer de mama em estágio inicial. Assim, o sucesso da terapia curativa pode estar relacionado à sua administração durante um período definido. Entretanto, pacientes diagnosticadas com TNBC apresentam prognóstico desfavorável devido à ausência de terapias-alvo. Dessa forma, o crotAMP14 pode ser explorado como alternativa para o desenvolvimento de terapias não convencionais, isoladamente ou como adjuvante. Comparado ao ctn (34 aa), o peptídeo parental, o crotAMP14, é significativamente menor (14 aa), reduzindo o custo de produção por meio de síntese química. Nesse contexto, estratégias como o desenho racional de peptídeos, que reduzem o comprimento mantendo a atividade parental, podem ser exploradas para a síntese de novos peptídeos antitumorais. Neste estudo, testamos o peptídeo crotAMP14 a partir do redesenho de ctn[15–34], utilizando uma estratégia de design guiada por propriedades físico-químicas, na qual resíduos desfavoráveis à superfície eletrostática (K1, P11, V13, G15, V16, T17 e P19) foram excluídos, mantendo a alternância entre resíduos positivamente carregados e hidrofóbicos. Essa estratégia aumentou a atividade do crotAMP14 sem elevar a citotoxicidade contra células mamíferas saudáveis. Quando testado na linhagem MCF-7, o crotAMP14 promoveu morte de apenas 30% das células na maior concentração (64 μM). Contudo, 80% das células da linhagem triplo-negativa MDA-MB-231 morreram quando expostas a 32 μM de crotAMP14. Na concentração de 16 μM , embora tenha havido redução na taxa de morte celular, o percentual de inibição foi de 65% (resultado semelhante ao observado em PMC-42 nas concentrações de 32 e 16 μM). Devido a essa taxa de sobrevivência, a concentração de 16 μM foi selecionada para testes subsequentes. Ensaio de viabilidade celular foram então realizados para determinar o intervalo mínimo necessário para que o crotAMP14 induzisse morte celular (Figura 1b). Os testes foram conduzidos em diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 e 24 h), com exposição das células a 16 μM do peptídeo. Os dados demonstraram que, após 1 h de exposição, foi possível observar taxas de morte celular de 90,1% (16 μM), 77,1% (8 μM) e 67,4% (4 μM) (Fig. 1b). Esses resultados indicam que o crotAMP14 pode induzir morte celular nos primeiros 60 minutos de exposição nas concentrações de 16 e 8 μM . Ao longo do tempo (2 a 24 h), esse efeito foi mantido, indicando que a atividade do peptídeo se inicia 1 h após o contato com as células e permanece capaz de eliminar parte delas por pelo menos 24 h nas maiores concentrações testadas. Adicionalmente, buscou-se determinar com maior precisão o tempo necessário para que o crotAMP14 induzisse morte celular. Para isso, realizou-se um novo ensaio de viabilidade nos intervalos de 0, 15, 30, 45 e 60 min. Os resultados sugerem que as células começam a morrer após 15 min de exposição ao peptídeo na concentração de 16 μM (Figura 27). Com o passar do tempo, a morte celular também foi observada em 8 μM nos intervalos de 30 e 45 minutos. Entretanto, somente a 16 μM os percentuais de morte celular atingiram 63,5% (15 min), 69,9% (30 min), 84,2% (45 min) e 79,7% (60 min) (Fig. 27c).

Justifique o eventual atraso ou adiantamento da execução da tarefa, em relação à previsão inicial

A atividade teve atraso devido à meta física 1, o que provocou um atraso sequencial no projeto. A quantidade de proteína extraída dos protoplastos foi muito abaixo do necessário para dar prosseguimento às etapas subsequentes de caracterização e análise da funcionalidade do peptídeo. Como estratégia de mitigação, outros peptídeos foram utilizados em substituição à parigidina-br1 para a expressão heteróloga e a posterior caracterização.

Meta física 9	Executado no período		Acumulado da meta durante o projeto	
	Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Pág. 23 / 49

Verificar o efeito hemolítico de PaMAP 1.9 recombinante frente a eritrócitos murinos e bovinos	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100
--	--------------	--------------	--------------	--------------

Atividade 9.1	Indicador físico de execução	Executado no período		Acumulado da atividade durante o projeto	
		Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Avaliação do potencial hemolítico de PaMAP 1.9 sobre células de mamíferos	Avaliação do efeito do peptídeo recombinante sobre células de mamíferos evidenciando sua não toxicidade	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100

<p>Descreva o desenvolvimento da atividade</p> <p>As células de fibroblastos humanos foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). As células foram incubadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂ e umidade entre 85% e 95%.</p> <p>Comente sobre o (s) resultado (s) (em caso de tarefa concluída, o indicador físico deverá constar como anexo ao relatório)</p> <p>A etapa final da triagem do crotAMP14 consistiu na realização de um ensaio de citotoxicidade em cultura primária de fibroblastos humanos (hFib) (Figura 27c). As células foram expostas a 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 1 µM do peptídeo por 24 h. Os resultados demonstraram que o crotAMP14 não foi tóxico para fibroblastos humanos nas concentrações entre 16 e 1 µM, apresentando toxicidade apenas nas mais elevadas (32 e 64 µM). Assim, a concentração selecionada para análise de modulação da expressão gênica em adenocarcinoma mamário triplo-negativo não é prejudicial à cultura primária de hFib e, ainda assim, é capaz de induzir morte celular tumoral, podendo ser explorada em estratégias terapêuticas voltadas ao controle da proliferação de células tumorais.</p> <p>Justifique o eventual atraso ou adiantamento da execução da tarefa, em relação à previsão inicial</p> <p>A atividade teve atraso devido à meta física 1, o que provocou um atraso sequencial no projeto. A quantidade de proteína extraída dos protoplastos foi muito abaixo do necessário para dar prosseguimento às etapas subsequentes de caracterização e análise da funcionalidade do peptídeo. Como estratégia de mitigação, outros peptídeos foram utilizados em substituição à parigidina-br1 para a expressão heteróloga e a posterior caracterização.</p>

Meta física 10	Executado no período		Acumulado da meta durante o projeto	
	Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Verificar o efeito citotóxico de PaMAP 1.9 frente a macrófagos bovinos e murinos	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Pág. 24 / 49

Atividade 10.1	Indicador físico de execução	Executado no período		Acumulado da atividade durante o projeto	
		Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Avaliação da citotoxicidade de PaMAP 1.9 recombinante	Avaliação do efeito do peptídeo recombinante sobre células de mamíferos, evidenciando sua não toxicidade	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100	2m/2m 100

Descreva o desenvolvimento da atividade
 Os testes de citotoxicidade do peptídeo crotAMP14 foram realizados com células de fibroblastos primários. A utilização dessas células mostra-se mais eficiente para avaliar a citotoxicidade de peptídeos antimicrobianos com atividade antitumoral. As células de fibroblastos humanos foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). As células foram incubadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂ e umidade entre 85% e 95%.

Comente sobre o (s) resultado (s) (em caso de tarefa concluída, o indicador físico deverá constar como anexo ao relatório)
 A etapa final da triagem do crotAMP14 consistiu na realização de ensaio de citotoxicidade em cultura primária de fibroblastos humanos (hFib) (Figura 27c). As células foram expostas a 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 1 µM do peptídeo por 24 h. Os resultados demonstraram que o crotAMP14 não foi tóxico para fibroblastos humanos nas concentrações entre 16 e 1 µM, apresentando toxicidade apenas nas mais elevadas (32 e 64 µM). Assim, a concentração selecionada para análise de modulação da expressão gênica em adenocarcinoma mamário triplo-negativo não é prejudicial à cultura primária de hFib e, ainda assim, é capaz de induzir morte celular tumoral, podendo ser explorada em estratégias terapêuticas voltadas ao controle da proliferação de células tumorais.

Justifique o eventual atraso ou adiantamento da execução da tarefa, em relação à previsão inicial
 A atividade teve atraso devido ao atraso da meta física 1, o que causou um atraso sequencial no projeto. A quantidade de proteína extraída dos protoplastos se mostrou muito abaixo do necessário para dar prosseguimento às etapas subsequentes de caracterização e análise de funcionalidade do peptídeo. Como estratégia de mitigação, outros peptídeos foram utilizados em substituição à parigidina-br1 para expressão heteróloga e posterior caracterização.

Meta física 11	Executado no período		Acumulado da meta durante o projeto	
	Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Avaliar o potencial bactericida de PaMAP 1.9 em modelo in vivo de infecção (murino)	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100

Atividade 11.1	Indicador físico de execução	Executado no período	Acumulado da atividade durante o projeto
----------------	------------------------------	----------------------	--

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Pág. 25 / 49

		Previsto (%)	Realizado (%)	Previsto (%)	Realizado (%)
Avaliação do peptídeo recombinante em modelo murino de infecção - mastite	Determinação do efeito antimicrobiano do peptídeo recombinante in vivo, assegurando sua efetividade	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100	3m/3m 100

Descreva o desenvolvimento da atividade

O potencial antibacteriano *in vivo* do peptídeo CrotAMP14 foi avaliado em modelo murino de ferida cutânea infectada por *Acinetobacter baumannii* multirresistente. Camundongos Swiss (8 semanas) foram anestesiados com cetamina (150 mg/kg) e xilazina (7,5 mg/kg), submetidos à tricotomia dorsal e à escarificação superficial padronizada, seguidos da inoculação local de 1×10^8 UFC em 20 μ L de PBS, 5 minutos após a lesão. Os animais foram distribuídos em três grupos: controle salina, controle infecção (sem tratamento) e grupo tratado com CrotAMP14. O peptídeo foi aplicado topicamente na concentração final de 16 μ M aos 2, 12, 24 e 36 h pós-infecção, definida com base na ausência de citotoxicidade e de hemólise observadas previamente *in vitro*. Um animal do grupo controle foi eutanasiado 3 h após a inoculação para confirmação da carga bacteriana inicial, enquanto os demais foram eutanasiados em 24 e 48 h para análise terapêutica. Após a eutanásia, o tecido cutâneo lesionado foi excisado, homogeneizado em PBS, seriamente diluído e plaqueado em ágar Mueller-Hinton para quantificação bacteriana expressa em log₁₀ UFC/g de tecido. A distribuição dos dados foi avaliada por Shapiro-Wilk e por curtose, e as comparações entre grupos foram realizadas por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$), conforme aprovado pelo CEUA/UCDB (protocolo nº 024/2018).

Comente sobre o (s) resultado (s) (em caso de tarefa concluída, o indicador físico deverá constar como anexo ao relatório)

O peptídeo CrotAMP14, administrado topicamente na concentração de 16 μ M, apresentou um perfil de ação temporal no modelo in vivo de infecção cutânea, com redução estatisticamente significativa da carga bacteriana em 48 h pós-infecção, enquanto, em 24 h, não se observaram diferenças significativas em relação ao grupo controle bacteriano. A análise da recuperação bacteriana (log₁₀ UFC/g de tecido) indicou diminuição progressiva da colonização no tecido tratado ao longo do período experimental. Adicionalmente, o tratamento com meropenem (48 μ M) concentração três vezes superior à do peptídeo não resultou em diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos tempos avaliados, quando comparado ao controle de infecção, conforme descrito no estudo.

Justifique o eventual atraso ou adiantamento da execução da tarefa, em relação à previsão inicial

A atividade teve atraso devido à meta física 1, o que provocou um atraso sequencial no projeto. A quantidade de proteína extraída dos protoplastos foi muito abaixo do necessário para dar prosseguimento às etapas subsequentes de caracterização e análise da funcionalidade do peptídeo. Como estratégia de mitigação, outros peptídeos foram utilizados em substituição à parigidina-br1 para a expressão heteróloga e a posterior caracterização.



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente											Período (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

5. Avaliação da gestão do projeto

Apresente a (s) alteração (ões) na equipe executora (*em caso de inclusão ou substituição de algum membro na equipe, deverão ser enviados os comprovantes da formação/titulação, e informados salário e número de horas dedicadas ao projeto*)⁴

Não houve alterações na equipe executora do projeto.

Relacione e associe às atividades do projeto eventual (is) capacitação (ões) adicional (is) adquirida (s) ou gerada (s) pela equipe executora, em função do desenvolvimento do projeto.

Os envolvidos no projeto foram capacitados para operar fermentadores, o que possibilitou o crescimento dos protoplastos.

Mencione eventual (is) melhoria (s) nas instalações físicas proporcionadas pelo projeto

As aquisições realizadas no âmbito do projeto resultaram em melhorias substanciais nas instalações físicas dos laboratórios, ampliando a capacidade técnico-operacional e modernizando setores essenciais às atividades de pesquisa. A atualização do parque computacional, por meio da aquisição de notebooks, computadores e tablets, proporcionou melhores condições para o processamento de dados, o controle experimental e o registro de informações, elevando a eficiência das rotinas laboratoriais. No eixo de equipamentos experimentais, a incorporação de aparelhos como centrífuga refrigerada, minicêntrifugas, incubadora Shaker, incubadora BOD com fotoperíodo, bomba peristáltica, agitadores magnéticos e mecânicos, viscosímetro digital, densímetro digital e medidores multiparâmetro e de pH representou um avanço expressivo na precisão, segurança e reprodutibilidade das análises. Esses equipamentos substituem versões obsoletas e atendem às demandas crescentes dos grupos de pesquisa vinculados ao projeto, assegurando maior confiabilidade aos ensaios conduzidos. Além disso, a instalação da envasadora semiautomática contribuiu para a otimização dos processos de manipulação e preparo de amostras, reduzindo o tempo de execução e minimizando riscos operacionais. Em conjunto, essas melhorias fortalecem a infraestrutura instalada, qualificam o ambiente de pesquisa e ampliam a capacidade institucional para a formação de recursos humanos, o desenvolvimento científico e o atendimento às atividades acadêmicas associadas ao projeto.

Relacione eventual (is) dificuldade (s) não-técnicas do projeto (*administrativas, financeiras, etc*)⁵

Nada a declarar

⁴ Toda alteração na equipe executora, pretendida pela proponente, deve ser autorizada previamente pela FINEP. Portanto, não basta apresentá-la no relatório, sem que tenha sido analisada e previamente autorizada.

⁵ Este campo não se destina às solicitações de remanejamento financeiro, as quais deverão ser analisadas e autorizadas previamente pela FINEP.



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)												Referência FINEP (1234/56)							
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente												Período (mm/aa até mm/aa)							
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO												03/22 ATÉ 03/26							
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

6. Impactos internos e externos do projeto

Mencione as perspectivas de desdobramentos que o projeto proporcionou às atividades internas da instituição executora e/ou parceiros, incluindo mudanças organizacionais, de patamar de faturamento, etc.

O projeto gerou impactos estratégicos na instituição executora, na qual as mudanças organizacionais envolveram a adoção de novas metodologias de pesquisa e a otimização da gestão da inovação, promovendo maior integração entre equipes e maior eficiência nos processos. Além disso, a pesquisa abriu oportunidades para novos projetos e patentes, impulsionando o desenvolvimento de formulações antimicrobianas e fortalecendo a atuação da instituição na inovação agropecuária e veterinária.

Descreva eventual (is) mudança (s) do posicionamento da empresa perante o mercado, proporcionada (s) pelo projeto

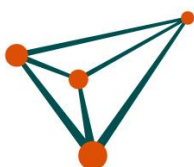
O projeto fortaleceu a competitividade da instituição no mercado de biotecnologia, criando oportunidades para novas pesquisas e para a captação de investimentos. Além disso, posicionou a universidade como referência no desenvolvimento de soluções sustentáveis para a pecuária, por meio da biotecnologia aplicada à saúde animal.

Apresente os benefícios sociais trazidos pelo projeto

O projeto proporciona benefícios sociais significativos ao reduzir o uso de antibióticos convencionais, o que contribui para a diminuição da resistência antimicrobiana e promove práticas mais seguras na pecuária. Ao tratar eficazmente a mastite bovina, contribui para o aumento da produtividade leiteira, fortalecendo a segurança alimentar e gerando impactos econômicos positivos para os produtores. Além disso, ao adotar soluções biotecnológicas sustentáveis, o projeto incentiva práticas ecológicas e contribui para a preservação ambiental.

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente											Período (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Pág. 28 / 49

7. Produção tecnológica

Apresente o (s) produto (s), protótipo (s), patente (s), processo (s), metodologia (s) que surgiram em meio ao projeto e mostraram inovação e relevância, mas que não haviam sido previstos (as) como indicadores físicos.⁶

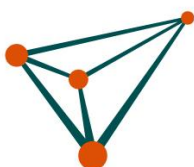
O processo de produção *in planta* do peptídeo está em vias de melhoramento e não foi publicado. Entretanto os peptídeos produzidos durante esta proposta geraram inúmeros artigos a serem observado no CV lattes do coordenador Octavio Luiz Franco.

8. Parceria institucional

Descreva a (s) atividade (s) de articulação institucional mantida (s) durante a execução do projeto, relacionando os resultados efetivamente transferidos para instituições de P&D, empresas, órgãos públicos, instituições não governamentais, assim como a contribuição específica de cada instituição partícipe do contrato/convênio.

A parceria com a Universidade Católica de Brasília fortaleceu o projeto por meio de estudos técnicos e de pesquisa aplicada, utilizando os laboratórios de Biologia Molecular e de Fermentação.

⁶ Caso algum (ns) destes itens demonstre (m) importância destacada para o projeto, ele (s) deverá (ão) constar como anexo (s) do relatório.



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente											Período (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

9. Comentário final

Acrescente observações relevantes, que não se aplicariam aos outros campos do relatório

O peptídeo proposto inicial foi alterado, passando de PaMAP 1.9 para parigidina-br1, crotAMP14 e a β -defensina do Moa. Como perspectiva estratégica de continuidade, a consolidação das plataformas de expressão heteróloga para o crotAMP14 e a β -defensina de Moa constitui um eixo de excelência, diretamente conectado ao avanço na produção e engenharia de peptídeos cíclicos. Embora crotAMP14 seja um peptídeo linear e a β -defensina de Moa apresente organização estabilizada por pontes dissulfeto, ambos funcionam como modelos estruturais e funcionais fundamentais para compreender a estabilidade conformacional, a interação com membranas e os requisitos de dobramento adequado, aspectos centrais também para ciclotídeos. A validação estrutural do crotAMP14 por RMN multidimensional, aliada à padronização de sistemas de expressão em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*, estabelece um pipeline tecnológico robusto que pode ser diretamente adaptado para a biossíntese, a maturação e a caracterização de peptídeos cíclicos, incluindo aqueles dependentes de processamento pós-traducional específico. Dessa forma, o aprofundamento nesses modelos não apenas fortalece a capacidade técnica do projeto, mas também cria uma base integrada para engenharia racional, otimização de rendimento e futura escalabilidade de ciclotídeos bioativos, posicionando o projeto em um patamar de inovação consistente na área de peptídeos antimicrobianos e bioinseticidas. O presente projeto avançou demonstrando que o musgo *P. patens* possui as enzimas necessárias para o processamento pós-traducional de peptídeos (asparaginil endopeptidase (AEP) e proteína dissulfeto isomerase (PDI)). Entretanto, de acordo com os dados apresentados, ainda não foi possível caracterizar o peptídeo expresso na cultura de *P. patens*, devido à pouca quantidade de biomassa obtida, tanto na cultura sólida, como na cultura líquida. Sendo assim, para realizarmos análises mais precisas, são necessárias maiores quantidades de biomassa de musgo. Assim, a continuidade do estudo é de grande importância para a implementação de alternativas de produção de proteínas recombinantes destinadas a biomoléculas de interesse biotecnológico, como os peptídeos antimicrobianos. O musgo *P. patens* apresenta pontos altamente favoráveis, como o baixo custo, a facilidade de manipulação, o estágio de desenvolvimento dominante haploide e a alta taxa de recombinação homóloga, o que facilita a integração do DNA de interesse em uma região específica do genoma e simplifica o procedimento de transformação genética. E ainda, diferente da maioria dos sistemas de expressão vegetal, o tempo de produção é considerado baixo quando comparado a estas condições.

10. Resumo⁷

Redija um resumo do projeto com até 200 palavras, destacando até seis palavras-chave que melhor caracterizem os resultados, que poderá ser utilizado para divulgação externa.

Foi estabelecido um sistema de expressão utilizando o musgo *Physcomitrella patens*, visando a produção do ciclotídeo bioinseticida parigidina-br1, a fim de proporcionar alternativas de produção de peptídeos cíclicos, além da síntese química e da expressão em sistema bacteriano. A sequência codante desse gene foi clonada no vetor específico de musgo pTHUbi-Gateway, gerando o vetor final pTHUbiPrigCyc, utilizado para a transformação de protoplastos por choque osmótico e por ação de polietilenoglicol. Plantas foram obtidas e selecionadas por crescimento em meio de cultura seletivo com higromicina a $15 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ e os transformantes confirmados por PCR usando os *primers* visando a amplificação de uma parte do vetor de expressão na qual incluem o promotor da ubiquitina do milho, a parigidina-br1 e o terminador da nopalina sintase. Os extratos proteicos de *P. patens* obtidos por meio de DCM:MeOH, a partir de 1 g de plantas de *P. patens* transformadas e de 1 g dos controles de *P. rigida* e do musgo *wild type*. O presente projeto também contemplou a expressão heteróloga e a caracterização inicial do peptídeo antimicrobiano crotAMP14 e da defensina do Moa, como prova

⁷ O preenchimento do resumo é obrigatório, caso se trate de relatório final de projeto.



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente											Período (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

de conceito para a produção de peptídeos em diferentes plataformas biotecnológicas. Foram construídos vetores recombinantes específicos para expressão em *Escherichia coli* e em *Pichia pastoris*. No sistema bacteriano, o crotAMP14 foi fusionado à elastin-like protein (ELP) e à inteína Mxe GyrA na construção pET21a(+)-ELP-inteína-crotAMP14. Em levedura, o gene foi inserido no vetor pPICZαA contendo sinal de secreção do fator α, cauda 6×His e sítio de clivagem por fator Xa (pPICZαA-His-tag-FLAG-crotAMP14 e pPICZαA-His-tag-FLAG-Moa). Adicionalmente, a elucidação estrutural do crotAMP14 foi realizada por meio de ressonância magnética nuclear multidimensional (TOCSY, NOESY e HSQC) em micelas de SDS-d25. A análise dos sistemas de spin, das correlações de NOE e dos deslocamentos químicos permitiu a atribuição sequencial dos resíduos e o cálculo de estruturas tridimensionais baseadas em restrições experimentais, confirmando a organização estrutural do peptídeo em um ambiente mimético de membrana. As conectividades de curta, média e longa distância observadas são compatíveis com a conformação esperada para peptídeos antimicrobianos lineares catiônicos, reforçando a integridade estrutural do crotAMP14 produzido. Em conjunto, os resultados demonstram a viabilidade dos sistemas bacteriano e de levedura para a biossíntese do crotAMP14 e validam sua identidade estrutural, estabelecendo bases para futuras etapas de purificação em escala e de avaliação funcional antimicrobiana no contexto do projeto. Adicionalmente, os dados obtidos constituem uma prova de conceito robusta, que poderá ser aplicada diretamente à expressão e à caracterização de outros peptídeos antimicrobianos de interesse biotecnológico no âmbito do projeto.

11. Equipe atual responsável pela execução técnica do projeto⁸

Nome completo	CPF	Período de contratação	Fonte dos recursos para pagamento do profissional	Origem do componente
Octávio Luiz Franco	755.234.003-78	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Elizabete de Souza Cândido	726.373.071-53	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Danieli Fernanda Buccini	928.366.071-49	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Susana Elisa Moreno	120.302.458-44	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Angela Mehta dos Reis	015.699.249-37	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor

⁸ O preenchimento desta lista não exige o contratante / convenente de solicitar formal e previamente, através de carta protocolada na FINEP, qualquer alteração da equipe executora inicialmente aprovada para o projeto.

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)												Referência FINEP (1234/56)							
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente												Período (mm/aa até mm/aa)							
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO												03/22 ATÉ 03/26							
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Pág. 31 / 49

Gisele Braziliano de Andrade	740.296.227-04	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Cristiano Marcelo Espinola Carvalho	615.043.191-68	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
João Santana da Silva	833.907.668-04	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Cirano José Ulhoa	322.443.806-10	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Antonia Railda Roel	848.286.688-53	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Marlon Henrique e Silva Cardoso	036.691.661-06	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Nuno Fernando Duarte Cordeiro Correia dos Santos	706.567.641-20	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Marco Hiroshi Naka	690.346.801-34	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Ludovico Migliolo	043.121.724-63	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Hemerson Pistori	502.003.641-20	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Denilson de Oliveira Guilherme	038.156.616-17	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Carina Elisei de Oliveira	183.956.618-35	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Reginaldo Brito da Costa	102.643.451-34	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Márcio de Castro Silva Filho	467.482.886-49	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Alinne Pereira de Castro	005.648.131-41	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor
Michel Angelo Constantino de Oliveira	767.002.911-00	17/03/2022 até 17/02/2026	Contrapartida	Proponente / Executor

12. Orçamento^{9 10}

⁹ Planilha de preenchimento obrigatório.

¹⁰ O preenchimento desta planilha não substitui os outros formulários de prestação de contas.

Relatório de acompanhamento técnico de projetos

18/03/2026




Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)												Referência FINEP (1234/56)							
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente												Período (mm/aa até mm/aa)							
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO												03/22 ATÉ 03/26							
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Pág. 32 / 49

12.1.4	Material de Consumo	197.760,00	197.709,35	50,65	0,03
12.1.5	Passagens e Despesas c/ Locomoção			0,00	0,00
12.1.6	Serviços de Consultoria			0,00	0,00
12.1.7	Outros Serviços de Terceiros P. Física			0,00	0,00
12.1.8	Outros Serviços de Terceiros P. Jurídica	42.700,00	42.500,00	200,00	0,47
12.1.8.1	Despesas Acessórias c/ Importação			0,00	0,00
12.1.8.2	Outras Despesas			0,00	0,00
12.2	DESPESAS DE CAPITAL	294.940,00	274.715,85	20.224,15	6,86
12.2.1	Obras e Instalações	0,00	0,00	0,00	0,00
12.2.1.1	Obras			0,00	0,00
12.2.1.2	Instalações			0,00	0,00
12.2.2	Equipamentos e Material Permanente	294.940,00	274.715,85	20.224,15	6,86
12.2.2.1	Equipamento Nacional	294.940,00	274.715,85	20.224,15	6,86
12.2.2.2	Equipamento Importado			0,00	0,00
12.2.2.3	Material Permanente Nacional			0,00	0,00
12.2.2.4	Material Permanente Importado			0,00	0,00
12.3	TOTAIS	535.400,00	514.925,20	20.474,80	3,82
12.4	APLICAÇÕES FINANCEIRAS			106.788,35	19,95

Campo Grande, 17 de março de 2026

Documento assinado digitalmente
 OCTAVIO LUIZ FRANCO
 Data: 18/03/2026 09:47:41-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

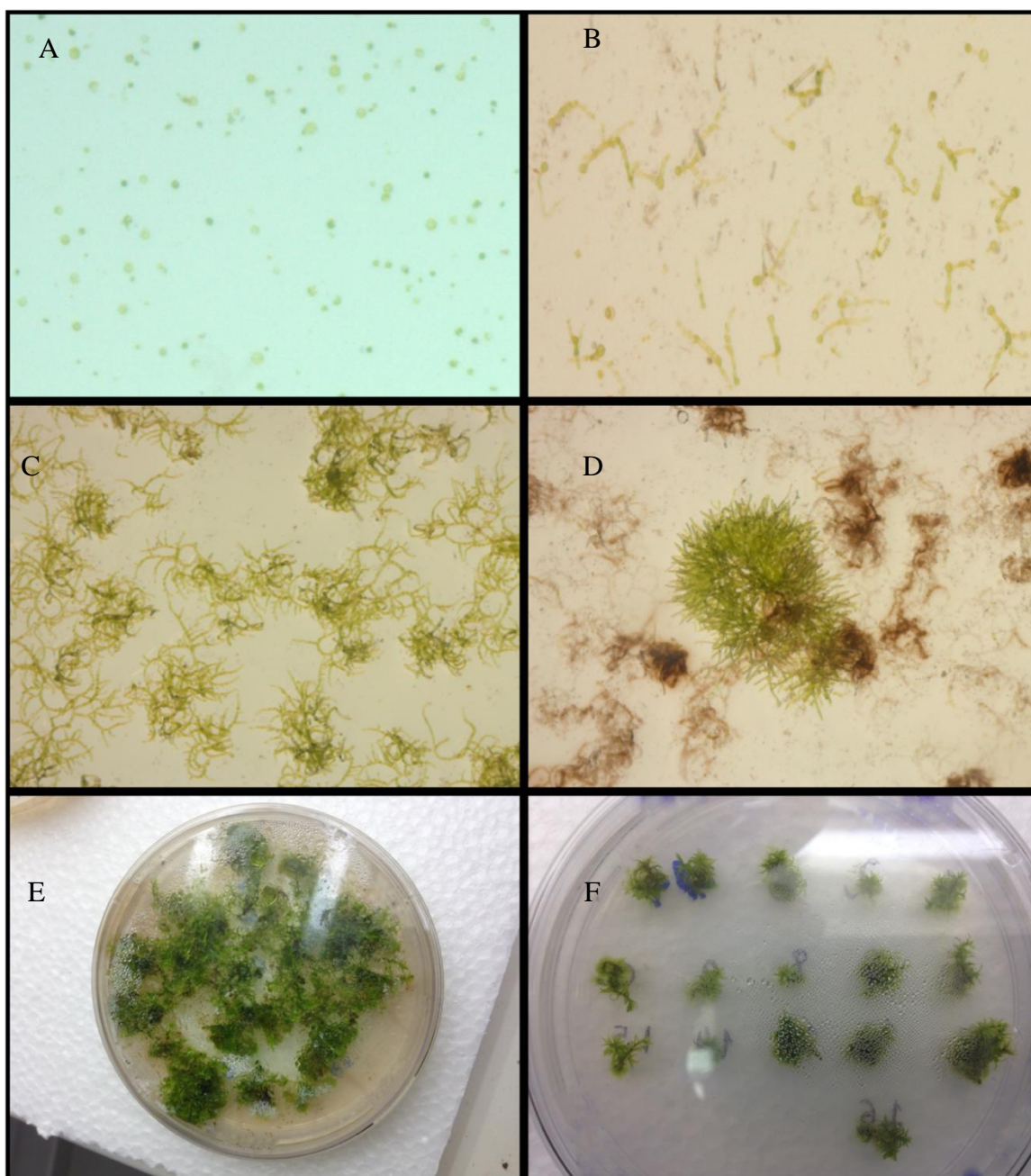
Octavio Luiz Franco
 Coordenador/ Professor/Pesquisador

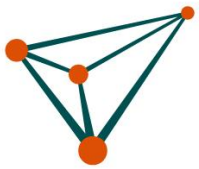


Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente											Período (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

13. ANEXO A – Culturas Saudáveis de *P. patens* crescidas em fermentadores

Figura 1: **A** e **B** correspondem a protoplastos regenerando em meio PRMB, no dia 1 e 7 após o procedimento de transformação, respectivamente. **C** corresponde à formação de protonemas ao final do período de regeneração (14 dias) e **D** representa os protonemas ao final da primeira semana em meio seletivo com higromicina (15 µg.ml⁻¹). As setas pretas indicam protonemas não resistentes a primeira fase de seleção, enquanto a seta amarela indica um protonema resistente à esta fase. **E** apresenta protonemas em uma placa de petri, após o final da segunda fase de seleção, enquanto **F** corresponde ao explante de algumas das plantas resistentes aos dois períodos de seleção e que também foram avaliadas como PCR-positivas.





Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente											Período (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

14. ANEXO B – Protoplastos positivos para a produção do peptídeo recombinante

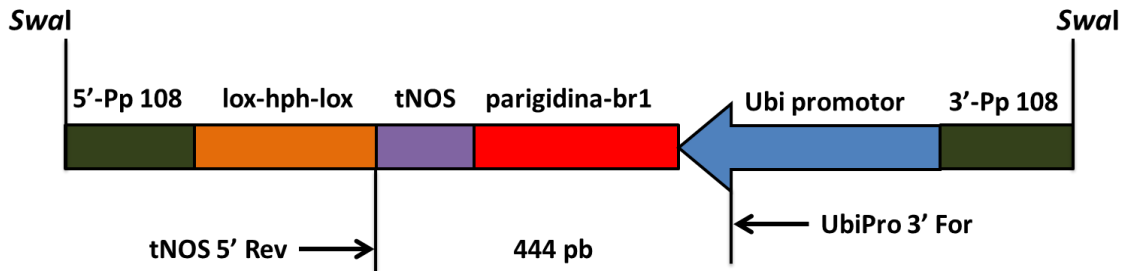


Figura 2. Esquema da sequência linearizada do fragmento de transformação e região de anelamento de *primers*. A detecção da presença deste fragmento nas plantas analisadas foi realizada via PCR, utilizando os *primers* UbiPro3' For e tNOS5' Rev, que anelam na porção final do promotor da ubiquitina e no terminador da nopalina sintase (tNOS), respectivamente. O fragmento, além da presença das regiões já citadas, possui também o gene da parigidina-br1, amplificando uma banda com cerca de 444pb.

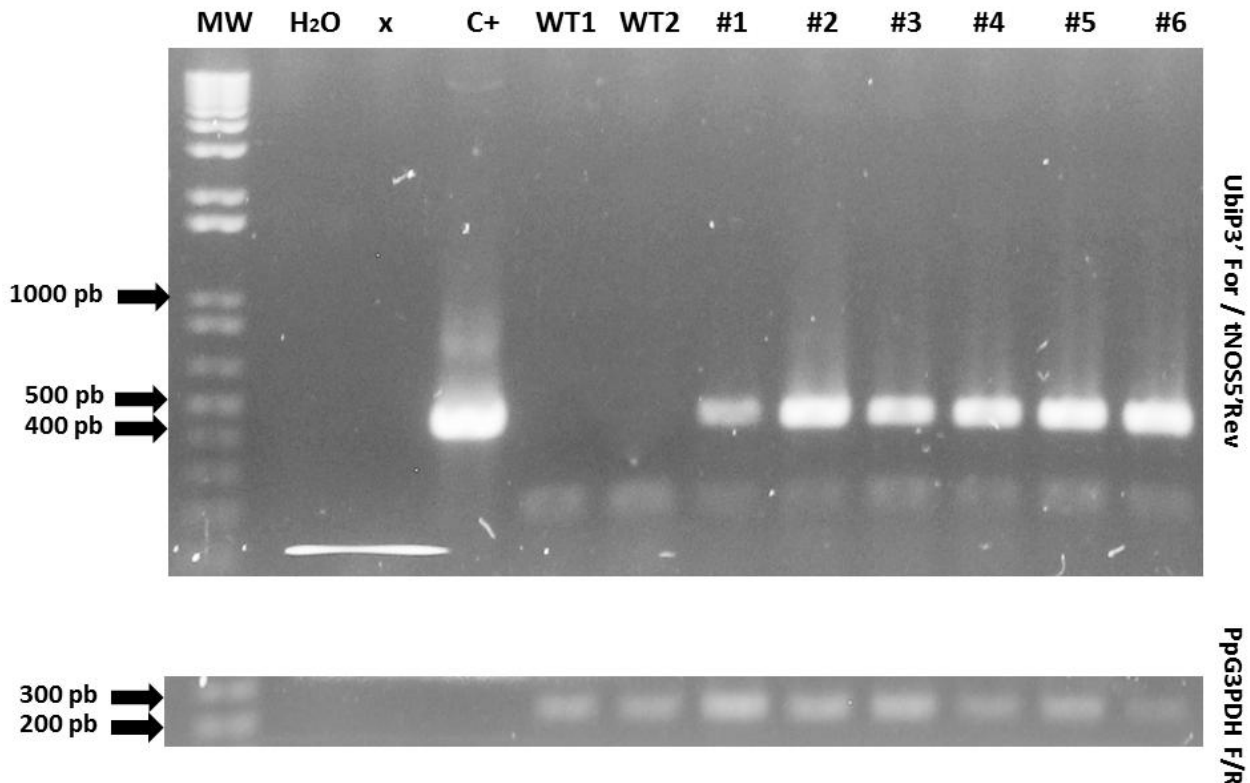
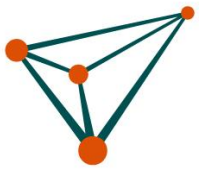


Figura 3: Gel de agarose 1% de uma PCR com dois pares de *primers* distintos para a análise de 6 plantas resistentes aos períodos de seleção. As amostras estão organizadas na mesma forma em ambos os tratamentos. **MW** corresponde ao marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA ladder* da Invitrogen™, **X** corresponde há um poço sem amostras, **H₂O** corresponde ao controle negativo, **C+** corresponde ao vetor de transformação *pTHUbiPrigCyc*, **WT1** e **WT2** são plantas selvagens (*wild type*) e as plantas transformadas de **#1** a **#6**. A parte superior mostra que as 6 plantas analisadas possuem o amplicon do vetor de expressão (444pb). Já a parte inferior mostra que o DNA foi eficientemente extraído de todas as plantas, devido a amplificação de uma região do gene Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, com tamanho de 308pb.



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente											Período (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			



Figura 4. Vetor pET21a(+)-ELP-inteína-crotAMP14.

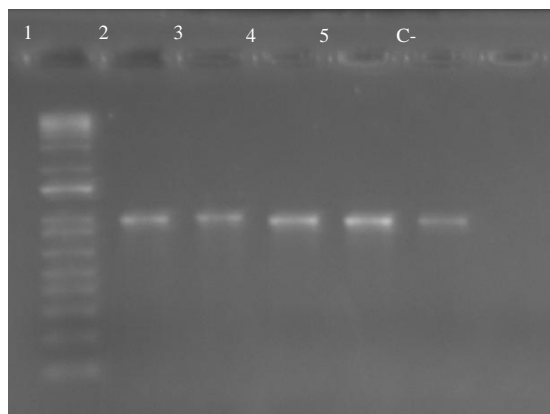
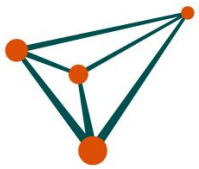


Figura 5. Gel de agarose 1% para visualização dos produtos de PCR de confirmação de transformação do vetor CroTAMP14 em *E. coli* BL21 (DE3). M: marcador molecular (invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder). 1-5: 5 colônias selecionadas para confirmação por PCR. C-: controle negativo (reação de PCR sem DNA).



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente											Período (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

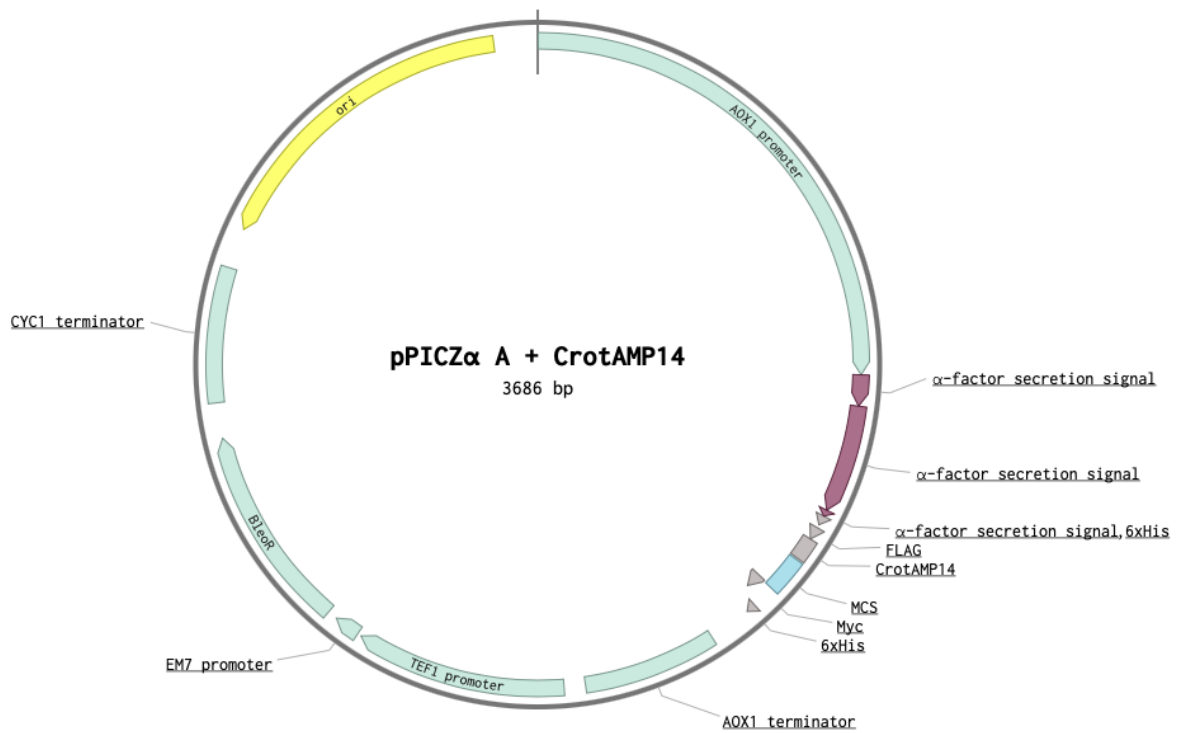


Figura 6. Vetor pPICZαA-His-tag-FLAG-crotAMP14.

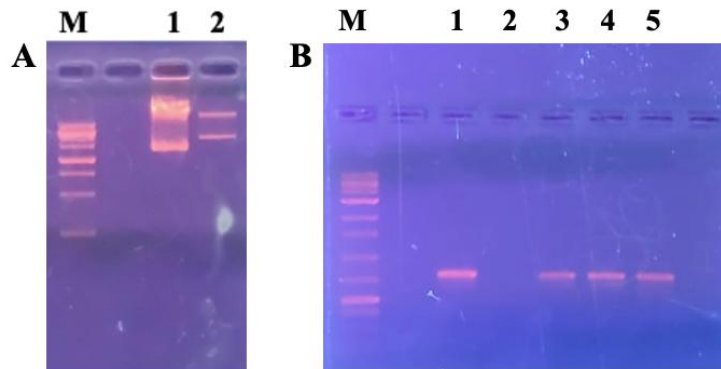
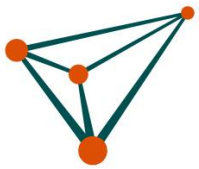


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1% para análise **A)** da clivagem do vetor com a enzima PmeI. **M:** marcador molecular (invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder), **1:** DNA plasmidial, vetor pPICZαA-His-tag-FLAG-crotAMP14 sem PmeI, **2:** DNA plasmidial, pPICZαA-His-tag-FLAG-crotAMP14 com PmeI. **B)** PCR de colônia para verificar a transformação *Pichia pastoris* X-33 com o vetor. 1-4: diferentes colônias.



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente											Período (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

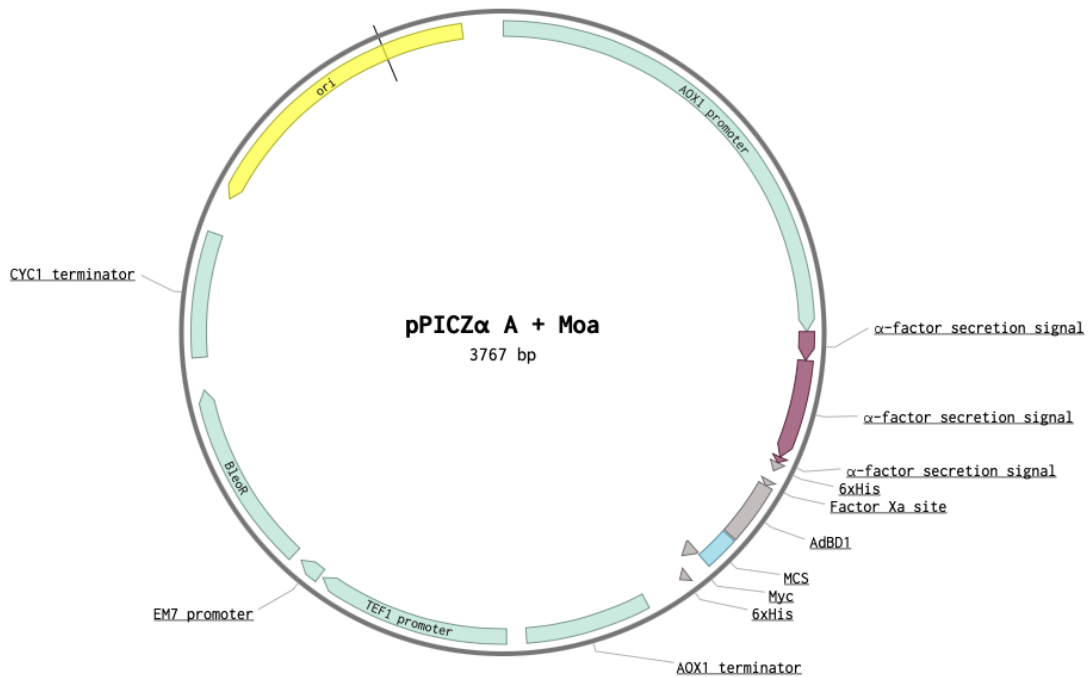


Figura 8. Vetor pPICZαA-His-tag-FLAG-AdBD-1 (Moa).

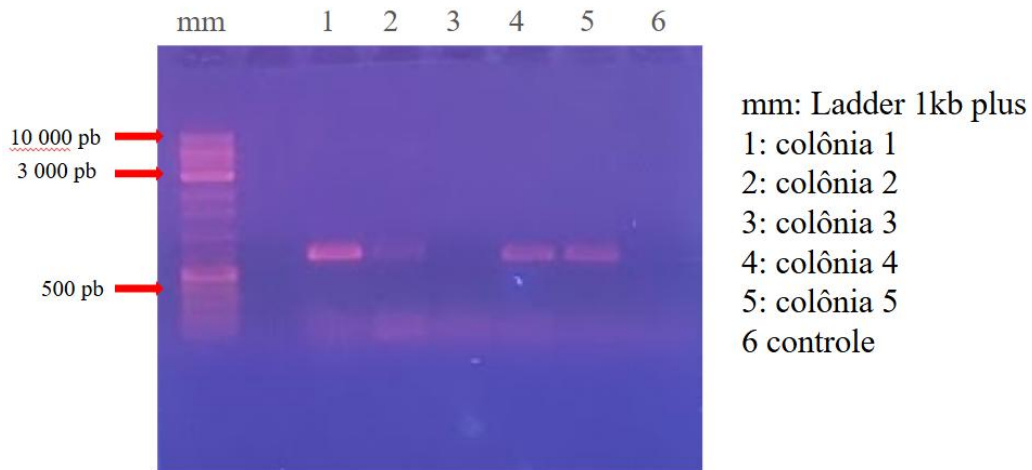


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% para análise de PCR de colônia para verificar a transformação *Pichia pastoris* X-33 com o vetor.



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente											Período (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

15. ANEXO C – Extração qualitativa e quantitativa eficaz de PaMAP 1.9

Tabela 1: Possíveis massas (em daltons) analisadas do ciclótideo parigidina-br1 e suas condições de processamento.

Massas (Da)	Condição (processamento pós traducional)
3303.86	linear
3279.80	processado corretamente
3297.81	3 pontes dissulfeto
3285.84	ligação peptídica N e C-terminal
3302.85	1 ponte dissulfeto
3284.84	1 ponte dissulfeto e ligação peptídica
3301.84	2 pontes dissulfeto
3283.83	2 pontes dissulfeto e ligação peptídica

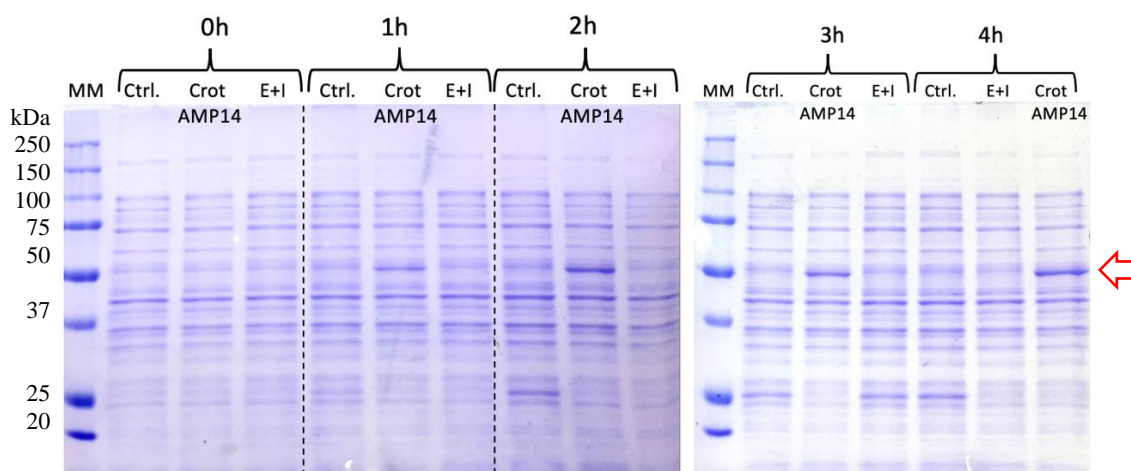
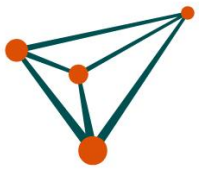


Figura 10. Gel SDS-Page para visualização da produção do peptídeo antimicrobiano CrotAMP14 em *E. coli* BL21 (DE3) após a indução com 1mM de IPTG. MM: marcador molecular. Amostras coletadas após 0h, 1h, 2h, 3h e 4h após indução com 1mM de IPTG, adicionadas na seguinte sequência: i. **Ctrl.:** controle negativo (cepa *E. coli* BL21 (DE3) não transformada com vetor CrotAMP14); ii. **CrotAMP14:** cepa *E. coli* BL21 (DE3) transformada com vetor CrotAMP14; iii. **E+:** cepa *E. coli* BL21 (DE3) transformada com vetor contendo apenas ELP e inteína (sem o peptídeo). Seta vermelha: mostra a banda com tamanho correspondente ao peptídeo CrotAMP14 com ELP e inteína.



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente											Período (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

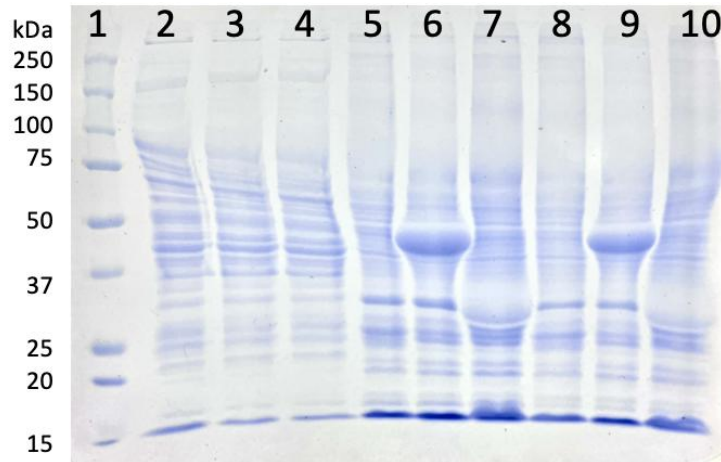


Figura 11. Gel SDS-Page para visualização da clivagem da inteína. 1: Marcador Molecular. 2: Sobrenadante do controle negativo (cepa *E. coli* BL21 (DE3) não transformada com vetor CrotAMP14). 3: Sobrenadante cepa *E. coli* BL21 (DE3) transformada com vetor CrotAMP14. 4: Sobrenadante da cepa *E. coli* BL21 (DE3) transformada com vetor contendo apenas ELP e inteína (sem o peptídeo). 5: Pellet controle negativo: 1.28 mg/mL. 6: Pellet da cepa *E. coli* BL21 (DE3) transformada com vetor CrotAMP14 (2.27 mg/mL). 7: cepa *E. coli* BL21 (DE3) transformada com vetor contendo apenas ELP e inteína (sem o peptídeo) (2.43 mg/mL). 8: Clivagem inteína do controle negativo (1.64 mg/mL). 9: Clivagem inteína cepa transformada com vetor crotAMP14 (2.06 mg/mL). 20: Clivagem inteína da cepa transformada com vetor contendo apenas ELP e inteína (sem o peptídeo) (2.23 mg/mL).

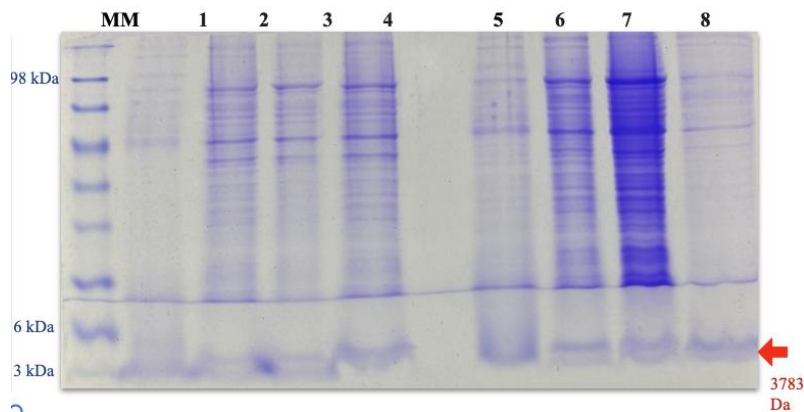


Figura 12. Gel SDS 15% Para análise dos sobrenadantes coletados em diferentes tempos durante a expressão heteróloga em pequena escala (100 mL em Erlenmeyer) após a retransformação com vetor linearizado sem a presença de múltímeros. 1 ml dos respectivos tempos precipitados com TCA. MM: SeeBlue Plus2 Pre-Stained. Replicata biológica 1: 0h (1), 24h(2), 48h(3) e 72h(4). Replicata biológica 2: 0h(5), 24h(6), 48h(7) e 72h(8).



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente											Período (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

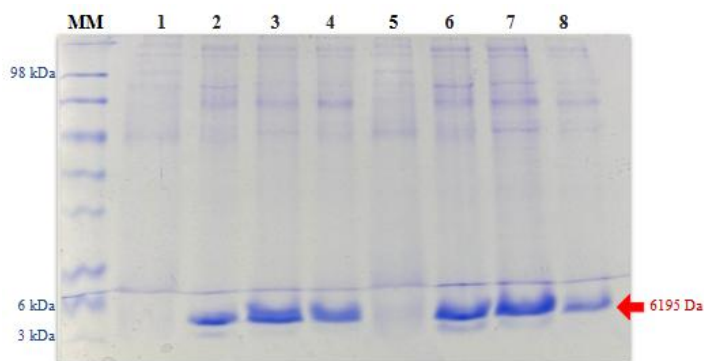


Figura 13. Gel SDS 15% Para análise dos pontos coletados durante expressão com BMMY/BMGY. 1 ml de cada amostra foi precipitado para padronizar o gel. MM: marcador molecular SeeBlue. Amostras de 1-4: Replicata biológica 1. 1: 6h após 1a indução com metanol, 2: 30h após 1a indução com metanol, 3: 54h após 1a indução com metanol, 4: 78h após 1a indução com metanol. Amostras de 5-6: Replicata biológica 1.5: 6h após 1a indução com metanol, 6: 30h após 1a indução com metanol, 7: 54h após 1a indução com metanol, 8: 78h após 1a indução com metanol.

16. ANEXO D – Presença do peptídeo em sua conformação nativa e funcional.

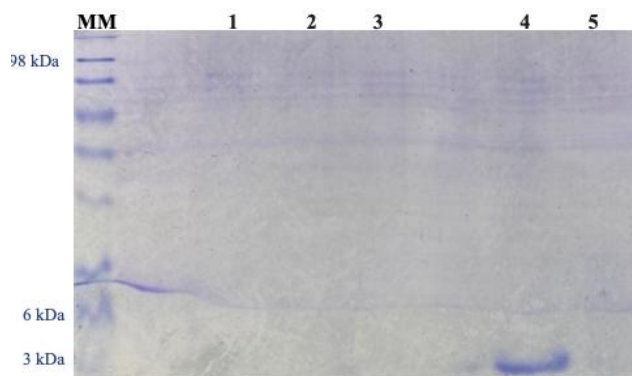
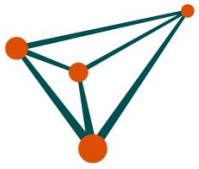


Figura 14. Gel de SDS-PAGE a 15% utilizado para análise das amostras coletadas durante o processo de purificação por coluna de níquel. MM: Marcador de peso molecular SeeBlue Plus2 Pre-Stained (Invitrogen). Lane 1: Amostra coletada ao final da indução (meios BMMY/BGMY) Lane 2: Fração de fluxo (*flow-through*) após aplicação da amostra na coluna de níquel. Lane 3: Fração de lavagem com tampão fosfato. Lanes 4 e 5: Eluídos 1 e 2 com tampão contendo imidazol.



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

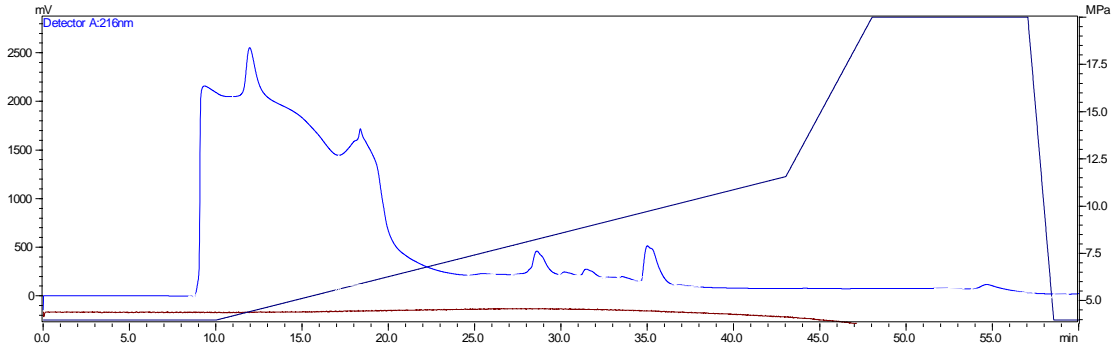


Figura 15. Cromatograma da amostra CrotAMP14, purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC) e eluída com imidazol (fração 1). O pico principal foi retido em 34,79 minutos. Análise realizada em coluna C4 utilizando método semipreparativo.

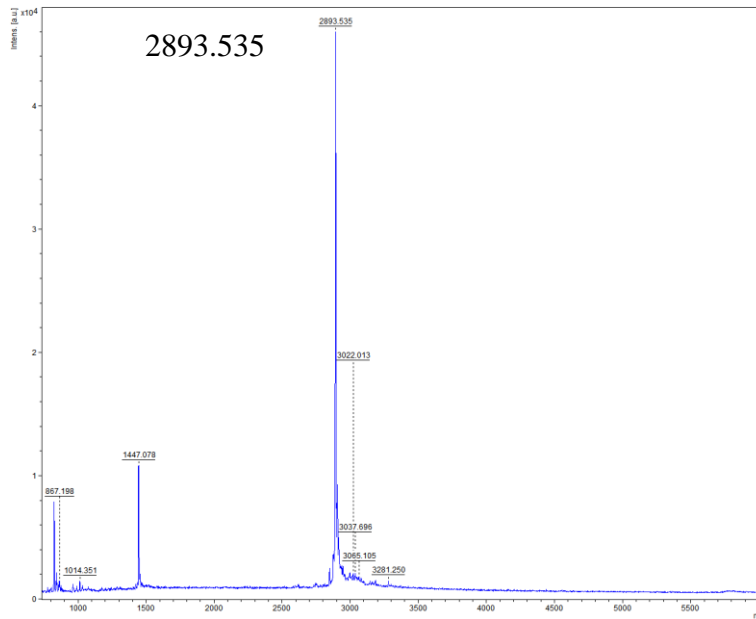


Figura 16. Espectro de massas (MS1) da amostra CrotAMP14 após purificação por HPLC. O perfil corresponde à análise da massa molecular do peptídeo purificado, evidenciando os íons característicos do analito de interesse.



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Conveniente											Período (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

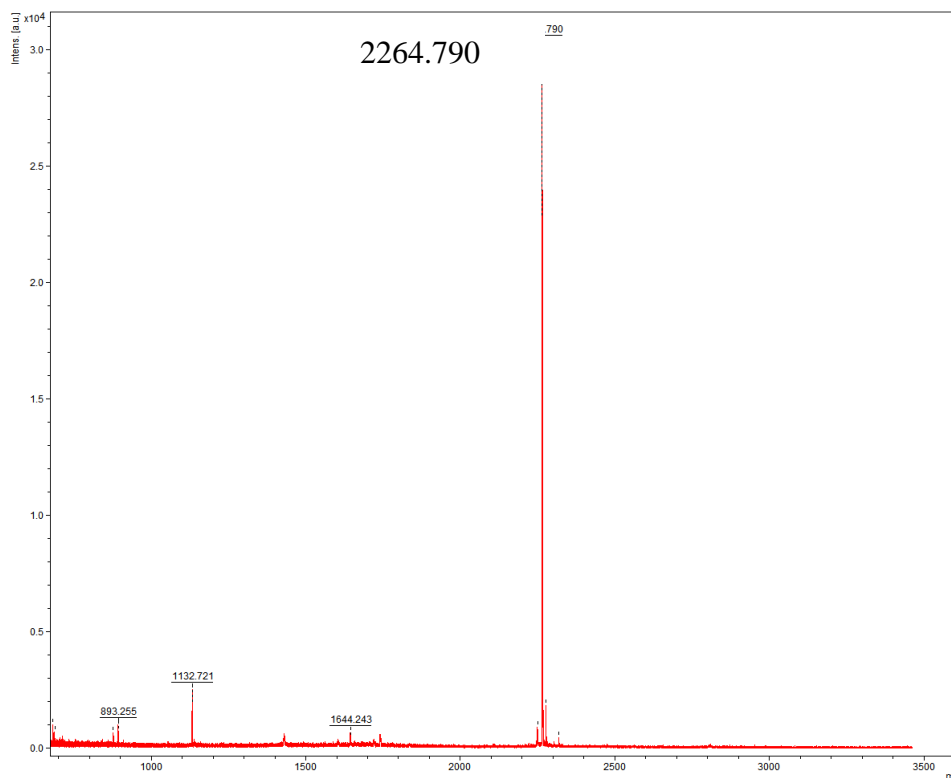
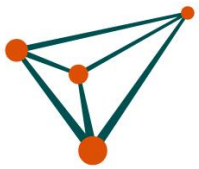


Figura 17. Espectro de massas (MS1) da amostra CrotAMP14 após purificação por HPLC e digestão enzimática com tripsina. O perfil obtido mostra os peptídeos resultantes da clivagem, utilizados para confirmação da identidade da sequência por espectrometria de massas.



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente											Período (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

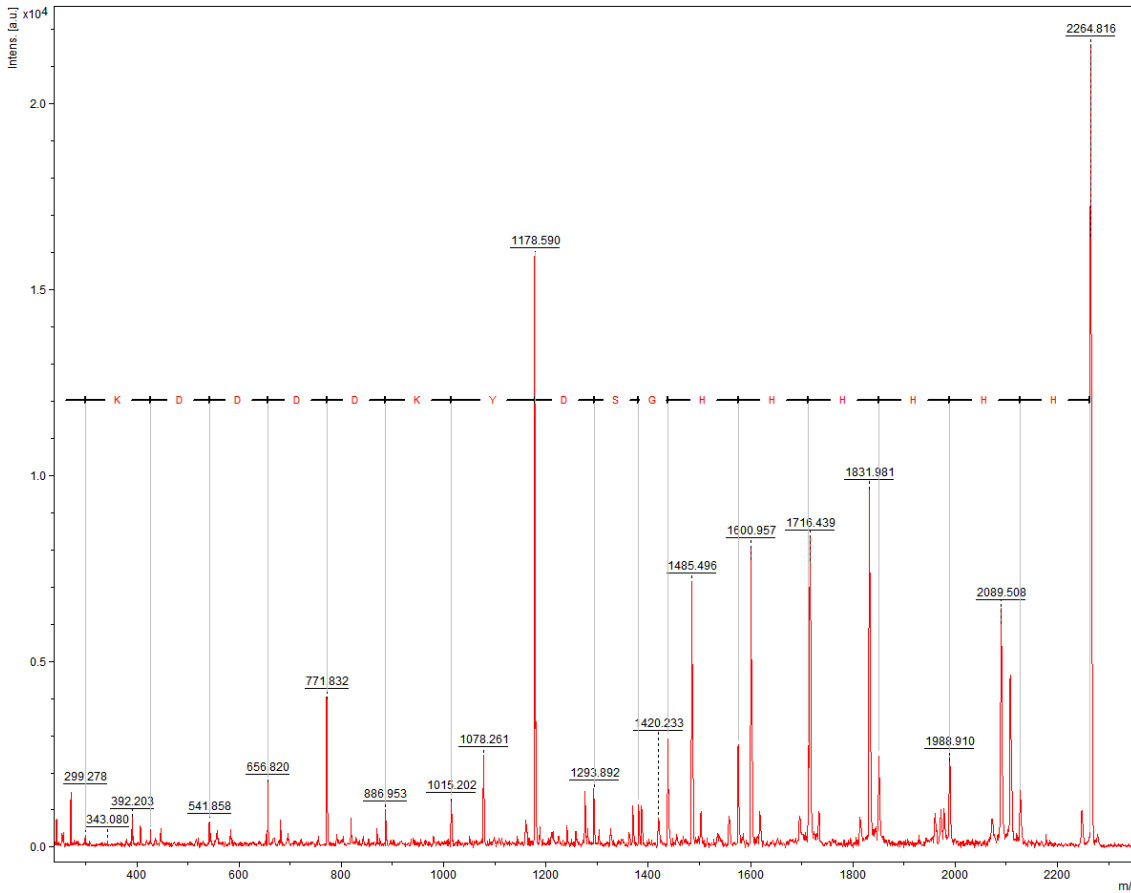


Figura 18. Análise do perfil do MS2 CrotAMP14 após purificação por HPLC e tratamento com tripsina.

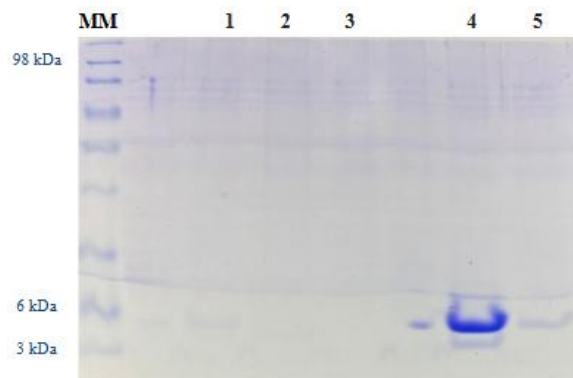
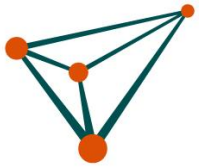


Figura 19. Gel SDS 15% para análise das amostras coletadas durante purificação com coluna de níquel. MM: marcador molecular SeeBlue. 1: Sobrenadante antes da purificação, 2: Flow, 3: Lavado, 4: Eluído 1, 5: Eluído 2.



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Conveniente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

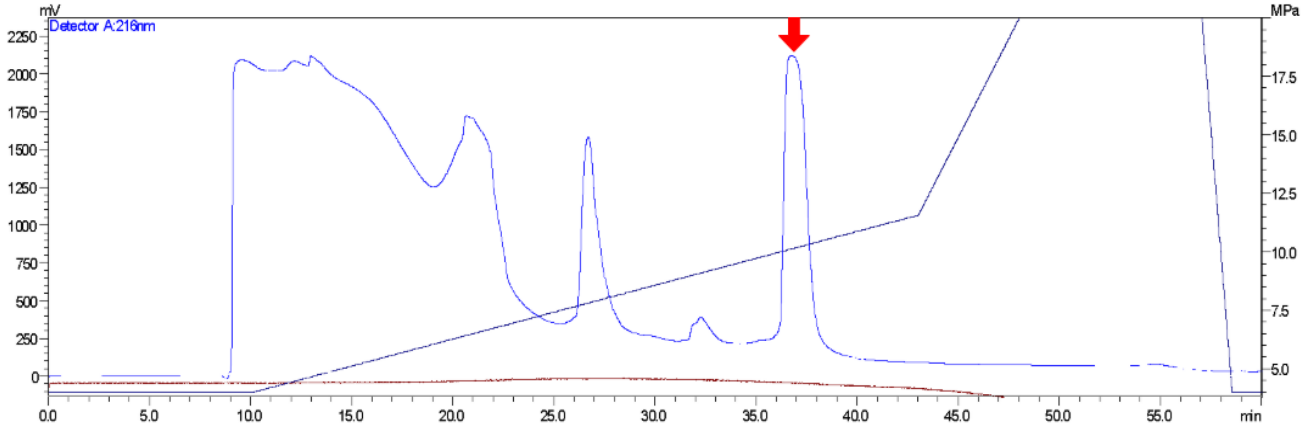


Figura 20. Perfil cromatográfico da amostra eluída com imidazol purificada com IMAC. A amostra apresentou um tempo de retenção de cerca de 36,23 min.

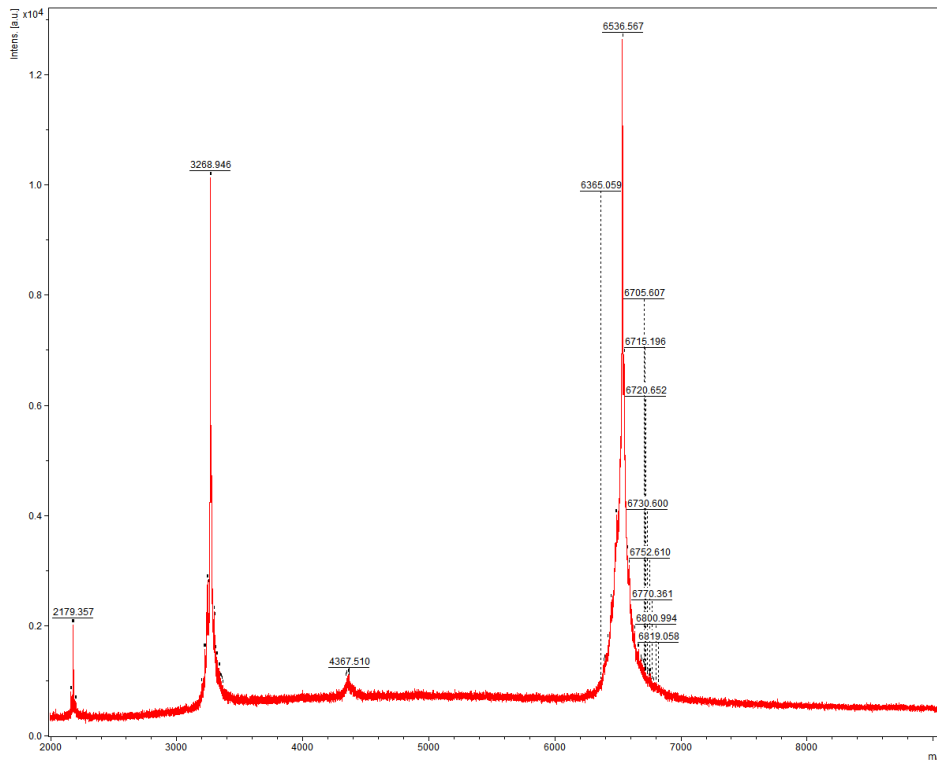
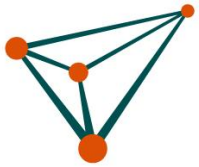


Figura 21. Espectro de massa MS da β -defensina do Moa com o sítio de clivagem do Fator Xa e a His Tag após purificação com IMAC, HPLC e tratamento com DTT e IAA.



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9

Beneficiário (a) / Conveniente	Período (mm/aa até mm/aa)
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO	03/22 ATÉ 03/26

Título do projeto
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.

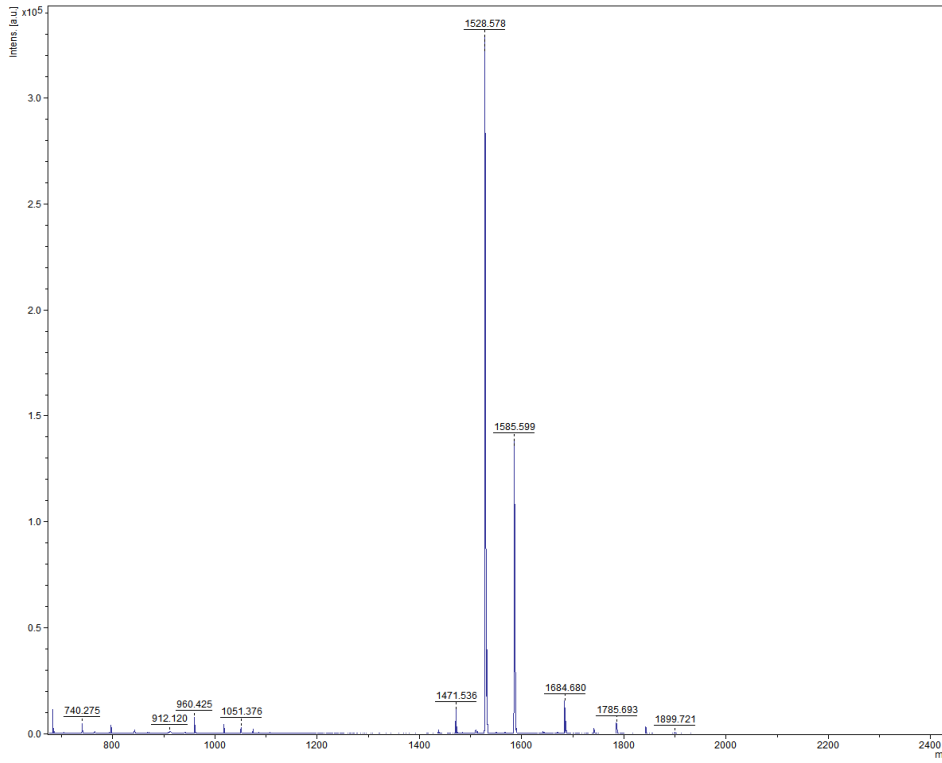
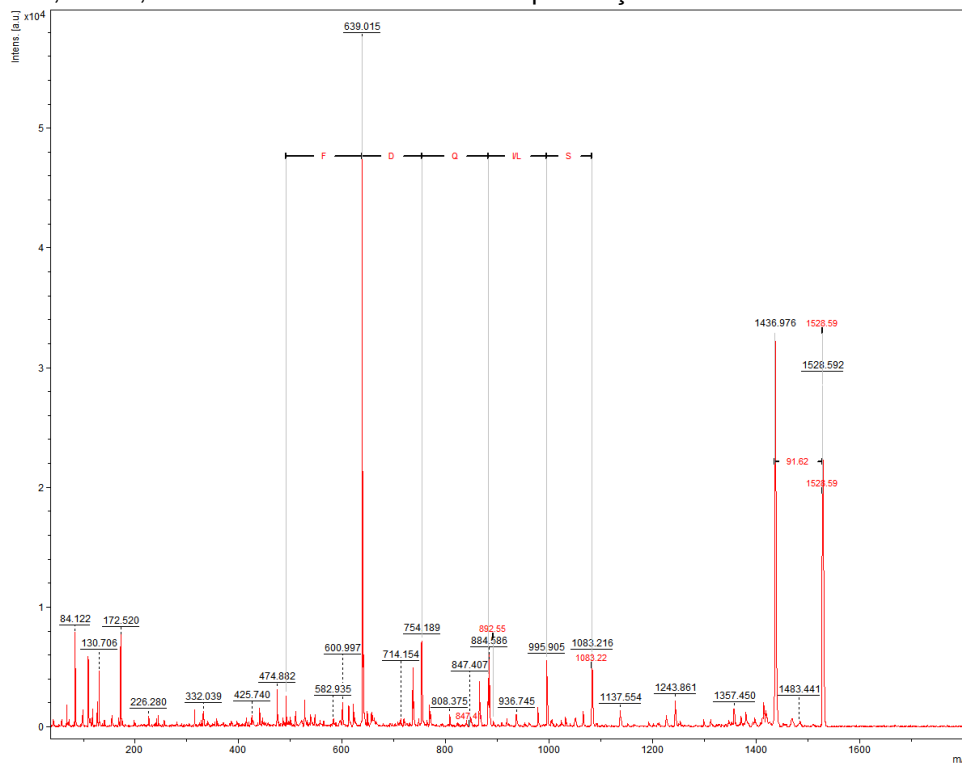


Figura 22. Espectro de massa MS da β -defensina do Moa com o sítio de clivagem do Fator Xa e a His Tag após purificação com IMAC, HPLC, tratamento com DTT e IAA e Tripsinização.





Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)												Referência FINEP (1234/56)							
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Convenente												Período (mm/aa até mm/aa)							
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO												03/22 ATÉ 03/26							
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

Figura 23. Espectro de massa MS/MS da β -defensina do Moa com o sítio de clivagem do Fator Xa e a His Tag após purificação com IMAC, HPLC, tratamento com DTT e IAA e Tripsinização. O íon 1528.59 foi utilizado como parental da fragmentação. Sequência F, D, Q, I/L, S identificada

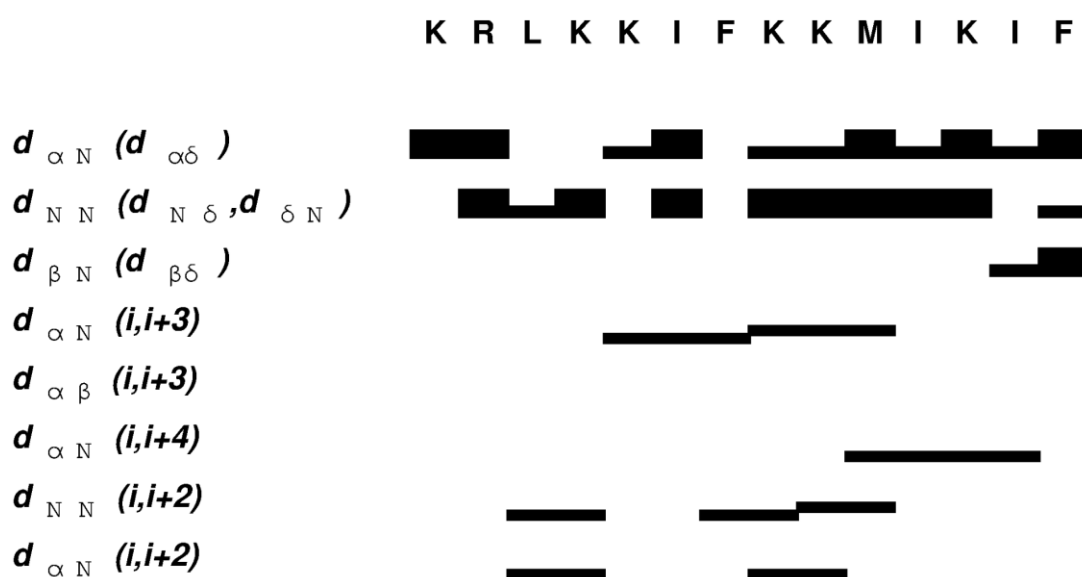
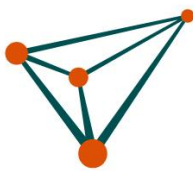


Figura 24. Resumo das conectividades sequenciais e de média distância de NOE para o CrotAMP-14 em micelas de SDS-d25. A sequência do peptídeo está descrita na parte superior utilizando o código de uma letra. O esquema apresenta as conectividades de NOE, os deslocamentos químicos secundários e a estrutura tridimensional predita.



do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)							
1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Conveniente											Período (mm/aa até mm/aa)							
ISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 03/26							
Título do projeto																		
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																		

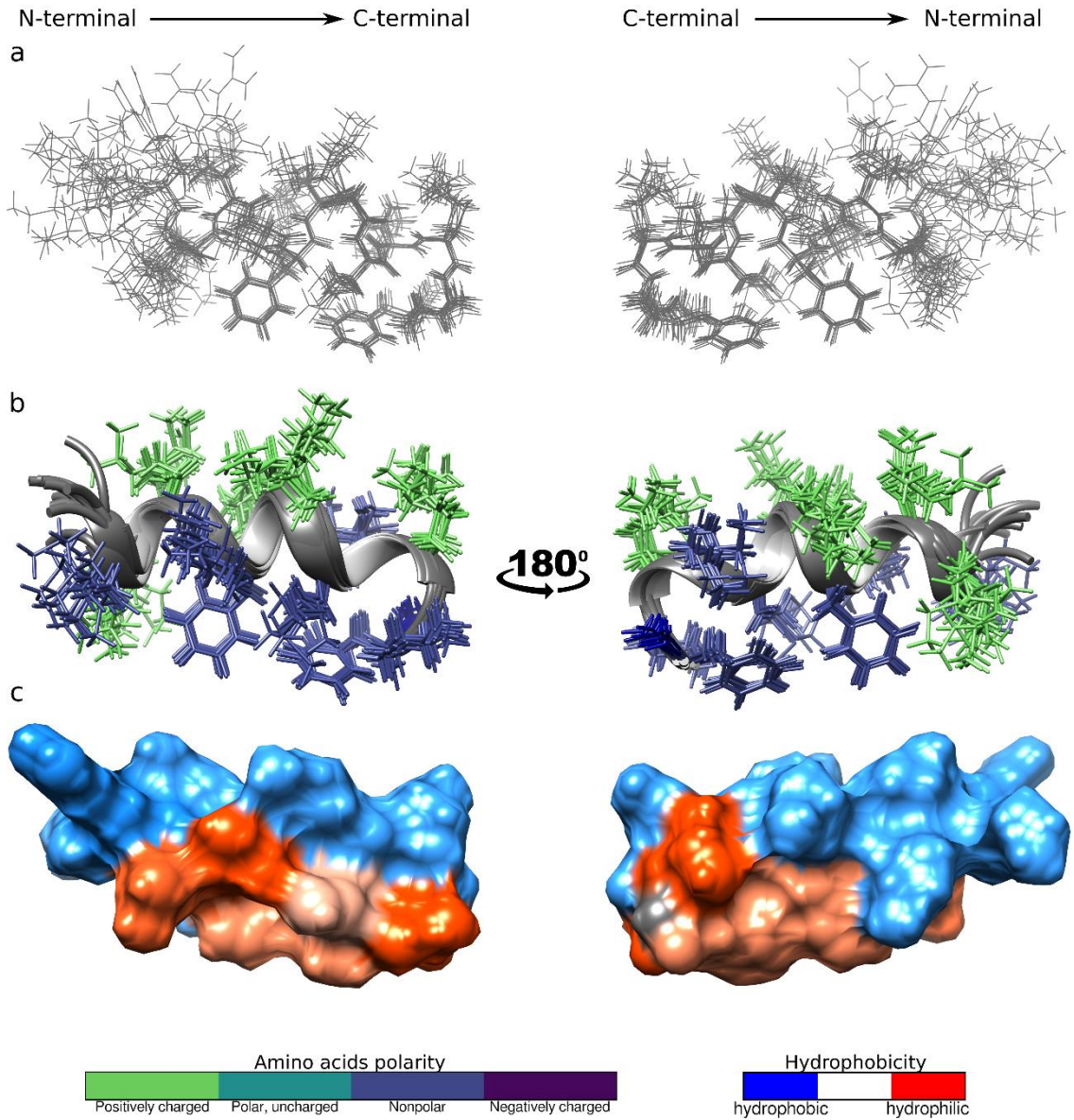
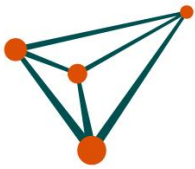


Figure 25. Estruturas de RMN do peptídeo CrotAMP14. Sobreposição das 10 estruturas de menor energia do peptídeo na presença de micelas de SDS-d25 representadas em modelo de bastão (A) e cartoon (B). Representação de superfície da estrutura de menor energia (C). As cadeias laterais na estrutura em cartoon estão coloridas de acordo com a polaridade (escala de cores *viridis*). A representação de superfície está colorida segundo a escala de hidrofobicidade de Kyte-Doolittle, variando de hidrofóbico (azul) a hidrofílico (laranja).



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)											Referência FINEP (1234/56)								
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Conveniente											Execução (mm/aa até mm/aa)								
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO											03/22 ATÉ 02/25								
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

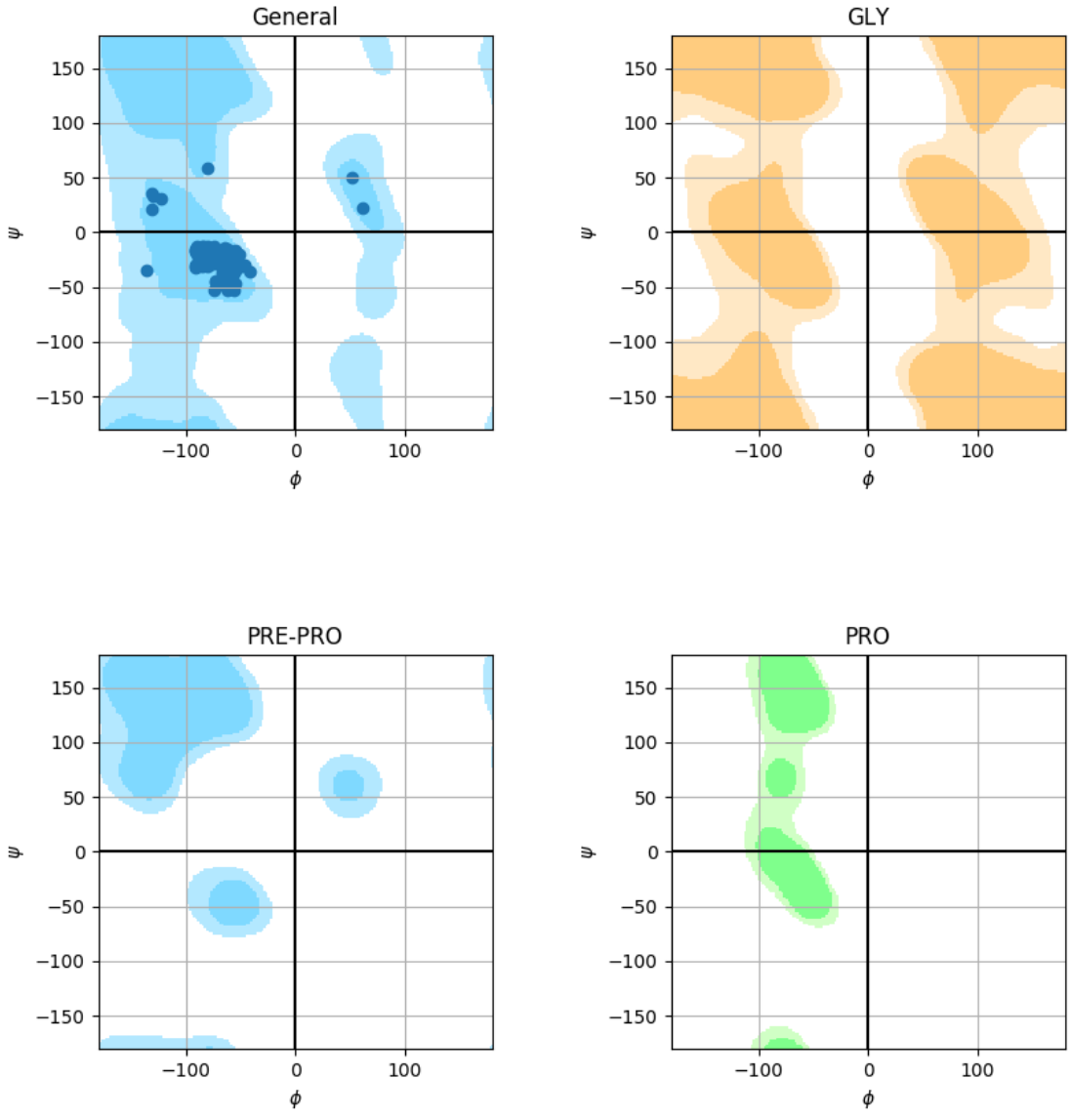


Figura 26. Gráfico de Ramachandran das 10 estruturas de menor energia determinadas por RMN em solução do CroAMP-14 em 75 mM de SDS- d_{25} .



Nº do Contrato / Convênio (01.23.4567.89)										Referência FINEP (1234/56)									
0	1	.	2	2	.	0	1	0	4	.	0	0	0	3	4	5	/	1	9
Beneficiário (a) / Conveniente										Período (mm/aa até mm/aa)									
MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO										03/22 ATÉ 03/26									
Título do projeto																			
PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO POLIALANINA ANTIMICROBIANO EM SISTEMA IN PLANTA PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA.																			

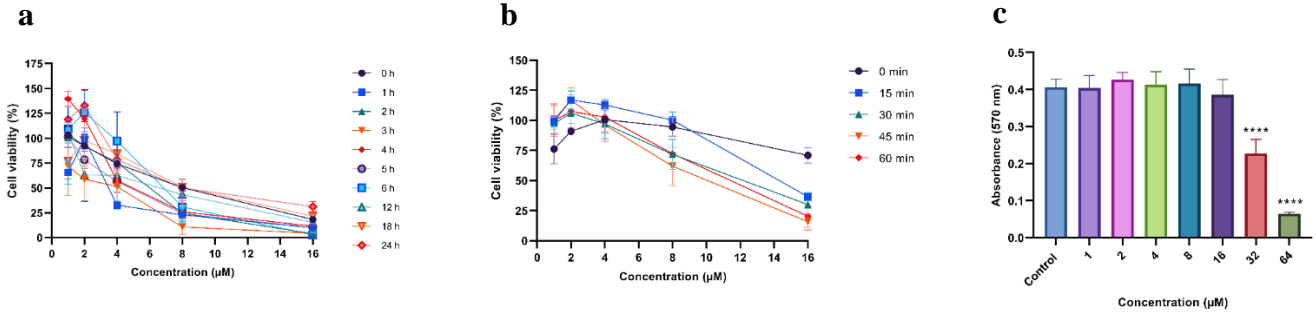


Figure 27. Triagem de peptídeos com atividade antitumoral. a) As células MDA-MB-231 foram expostas ao crotAMP14 durante diferentes períodos de tratamento (ao longo de um intervalo de 24 horas). A placa foi então lida em comprimento de onda de 570 nm. Os gráficos representam a média e o erro padrão da absorbância de três réplicas biológicas realizadas em triplicata. b) As células MDA-MB-231 foram expostas ao crotAMP14 durante diferentes períodos de tratamento (ao longo de 60 minutos). A leitura da placa foi realizada em 570 nm. Os gráficos representam a média e o erro padrão da absorbância de três réplicas biológicas realizadas em triplicata. c) Células de fibroblastos humanos em cultura primária foram expostas ao crotAMP14 durante 24 horas de tratamento. A leitura da placa foi realizada em 570 nm. Os gráficos representam a média e o erro padrão da absorbância de três réplicas biológicas realizadas em triplicata. As diferenças estatísticas foram verificadas por meio do teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni. **** $p < 0,0001$.

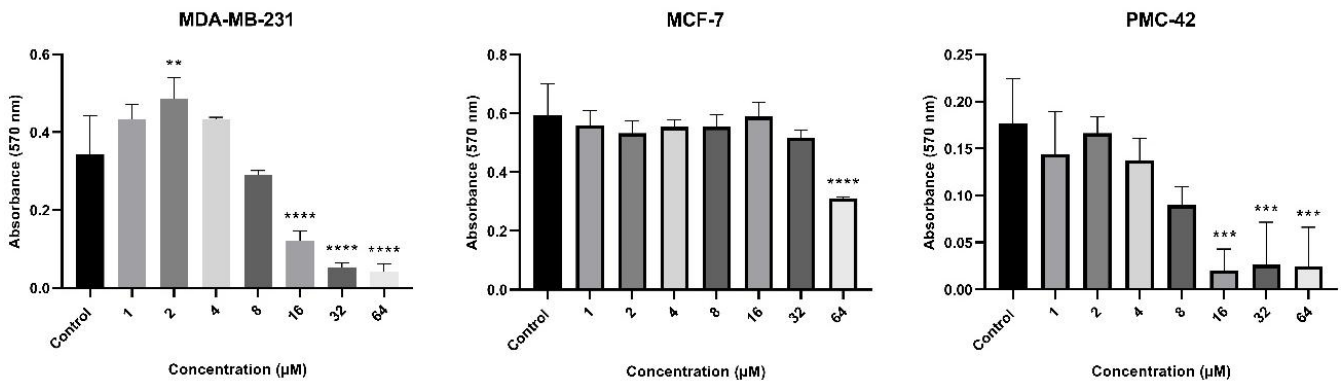


Figura 28. Ensaios de viabilidade celular *in vitro* utilizando o crotAMP14. As linhagens (MDA-MB-231, MCF-7 e PMC-42) foram expostas ao peptídeo durante um período de tratamento de 24 horas. A placa foi então lida em comprimento de onda de 570 nm. Os gráficos representam a média e o erro padrão da absorbância de três réplicas biológicas realizadas em triplicata. As diferenças estatísticas foram verificadas por meio do teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.