



PAULA ALESSANDRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PEPTÍDEOS CATIÔNICOS
CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *Salmonella***

Campo Grande - Mato Grosso do Sul

2018

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PEPTÍDEOS CATIÔNICOS
CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *Salmonella***

Autora: Paula Alessandra da Silva
Orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco
Co- Orientador: Prof. Dr. Ludovico Migliolo

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde."

Campo Grande - Mato Grosso do Sul

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

S586a Silva, Paula Alessandra da
Avaliação da atividade antibacteriana de peptídeos catiônicos contra
isolados clínicos de *Salmonella*. / Paula Alessandra da Silva; orientador
Octávio Luiz Franco; coorientador Ludovico Migliolo. -- 2018
58 f.

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica
Dom Bosco, Campo Grande , 2018.
Inclui bibliografias.

1. Intestinos – Infecções 2. Biofilme bacteriano 3. Peptídeos antimicrobianos
4. Biotecnologia I. Franco, Octávio Luiz II. Migliolo, Ludovico III. Título.

CDD: 616.340149

**Avaliação da Atividade Antibacteriana de Peptídeos Catiônicos contra
Isolados Clínicos de Salmonella**

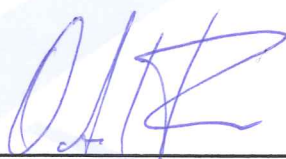
Autora: Paula Alessandra da Silva

Orientador: Prof. Dr. Octavio Luiz Franco

Coorientador: Prof. Dr. Ludovico Migliolo

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

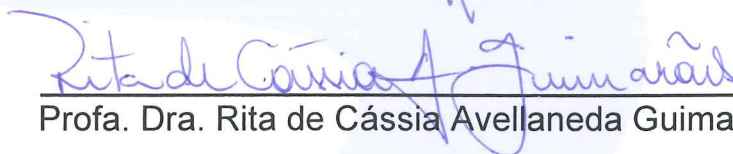
APROVADA em 22 de março de 2018.



Prof. Dr. Octavio Luiz Franco - UCDB



Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espínola Carvalho - UCDB



Profa. Dra. Rita de Cássia Avellaneda Guimarães - UFMS

“A persistência é o menor caminho para o êxito.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado saúde e força para superar tantas dificuldades.

Agradeço à minha família, meus filhos, Luiz Otávio e João Pedro, a meus pais e minhas irmãs, pela compreensão, apoio incondicional em todas as etapas deste trabalho. Inclusive por não criticarem minha ausência que foi frequente principalmente nestes últimos meses e em muitos momentos,

Às minhas amigas Estefânia Fernandes, por todo carinho e apoio. Obrigada por acreditar, apostar e me fazer persistir. E a minha amiga Karla Toledo Cândido que me ajudou tanto principalmente com a elaboração dos gráficos e planilhas me ensinou, deu-me força. Obrigada!

À Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), seu corpo docente, direção e administração, que oportunizaram eu estar aqui vislumbrando um horizonte promissor. Especificamente às minhas coordenadoras Adriana da Silva Flores e Rosemarly Mendes Candil, pelo incentivo excepcional que me deram; assim como as professoras Ana Karina Modolo, Andréia M.G. João e Marcela Grisoste.

Ao coordenador do Mestrado de Biotecnologia, Cristiano Marcelo Espinola Carvalho, que esteve comigo nesses três tumultuados anos que com sua paciência e salesianidade me apoiou, acolhe-me e permitiu que eu travasse uma nova batalha na conquista dessa vitória.

À Silvia da Cruz que me auxiliou em todas as partes burocráticas, sempre com sorriso e disponibilidade.

Ao meu orientador Octávio Luiz Franco. Tenho certeza que faltarão palavras para tanta gratidão, obrigada por ter me acolhido quando muitos teriam cruzado os braços, por sua atenção frequente, sua correção direcionada, por identificar tantos erros e não usá-los para me diminuir e sim me direcionar, corrigir e ainda me incentivar. Obrigada por despertar em mim este desejo de seguir em frente com obstinação e afinco, por me apresentar ao grupo S-Inova Biotec, permitir que eu fizesse parte dele e ganhasse não só aprendizado, mas a proximidade com pessoas maravilhosas que me auxiliaram todo o tempo.

Ao meu co-orientador Ludovico Migliolo que também me acolheu e me incentivou.

Aos meus colegas de mestrado, pela amizade, pelo auxílio, gentileza e disponibilidade, foram tantos que me auxiliaram que temo colocar nomes aqui e deixar sem querer alguns de fora. Mesmo assim agradeço à Soraya Chicrala que

participou de outra fase, mas esteve ao meu lado, e me ajudou quando eu mais precisei sem nem mesmo eu solicitar.

Ao grupo S-Inova biotech, por terem me acolhido, todos participantes colaboraram de uma forma ou outra: Suzana Meira, Karen Oshiro, Nathalia Ataídes, Bruna, Matheus, a técnica Dayane, auxiliaram-me no laboratório que estive comigo me ensinando muitas coisas que eu não sabia. E em especial à Esther Carvalho que se não fosse ela não sei o que seria da minha pesquisa.

À Beatriz Meneguetti, que foi minha aluna de nutrição, tão aplicada, dedicada e generosa e nesse momento inverteu a posição e se tornou minha professora, e durante todo tempo me encheu de orgulho ao ver a evolução intelectual, profissional e humana que ela alcançou, sem deixar de lado a generosidade, humildade e delicadeza que sempre foi sua marca registrada. Obrigada minha filhotinha.

A meus alunos que entenderam que neste ano meu tempo estava limitado; e quiseram dar apoio e muitas orações. Por vocês desejo sempre aprender mais.

Agradeço ainda alguns amigos e parentes que me auxiliaram financeiramente para que eu não desistisse. Obrigada. Muito obrigada!

Quero agradecer a Universidade Católica de Brasília por auxiliar neste trabalho e também a Claudenise Caldas por ter providenciado as Estirpes Bacterianas.

Enfim, a todos que auxiliaram, mesmo que tenha só me dado um sorriso, ou por mim fizeram uma oração.

Tem sido um privilégio tê-los em minha vida!

SUMARIO

	Página
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
1.1 Infecções Intestinais	17
1.2 Salmonelose	21
1.3 Antibióticos	24
1.4 Peptídeos antimicrobianos (PAMs)	27
1.5 Biofilme.....	30
2 JUSTIFICATIVA.....	32
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivo específico.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Síntese de peptídeos	34
4.2 Purificação e determinação do grau de pureza dos peptídeos.....	34
4.3 Padronização das colônias bacterianas.....	35
4.4 Análise da atividade microbiana.....	36
4.5 Formação de biofilme.....	37
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 Análise da Atividade antimicrobiana.....	39
5.2 Análise da formação de biofilme.....	43
6 CONCLUSÕES.....	49
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BHI - Meio de cultura infusão de cérebro e coração (*Brain heart infusion*)

DII - Doenças infecciosas intestinais.

DO - Densidade ótica

EDT- Ácido trifluoroacético

EPS - Exopolissacarídeo

LL-37 - Peptídeo de defesa do hospedeiro catiônico humano

LPS – Lipossacarídeos

MPT- Placa de microtitulação

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAMs – Peptídeos antimicrobianos

POPs - Procedimento Operacional Padrão

SIBO – Crescimento excessivo de bactérias no intestino delgado.

SII --Síndrome do intestino irritável

TIS- Triisopropilsilano

UFC- Unidade formadora de colônia

µg.- -micrograma

LISTA DE TABELA

TABELA 1: Classificação dos peptídeos segundo sua numeração nome e sequencia de aminoácido apresentado	37
TABELA 2: Comparação da inibição das bactérias por peptídeos em relação ao antibiótico.....	42

LISTA DE FIGURA

- FIGURA 1: Microbiota acometida pela infecção intestinal. Imagem demonstrando as células da membrana da mucosa intestinal que mediante ao processo de infecção, formam fissuras entre as células e permitem a entrada de patógenos, que ao adentrarem a corrente sanguínea, acionam os receptores da resposta imune e podem causar danos absortivos, de intolerância alimentar, alergias e inclusive ocasionando a inflamação do organismo como um todo. 18
- FIGURA 2: Alinhamento da bactéria *Salmonella*, ao ser isolada de uma cultura pura sendo visualizada em microscópio de alta resolução, aumentada em 8000 vezes. 18
- FIGURA 3 Representação da placa de contagem de células bacterianas a partir das diluições, dividida em quatro quadrantes, onde cada quadrante representado e identificado recebe três microgotas (10 μ l) de sua diluição correspondente. 27
- FIGURA 4 Avaliação da atividade antibiofilme. As amostras de peptídeos foram testadas na concentração 64 μ g mL⁻¹, contra a estirpe de *Salmonella* I,II e III, as leituras foram realizadas após 24h, utilizando o comprimento de onda de 595nm, com base nos controles positivo (meio+ bactéria), negativos (meio),e o controle do antibiótico (bactéria+ antibiótico ciprofloxacina), para determinar a atividade antibiofilme, expressa em colunas, e as barras anexas representam o desvio padrão de cada peptídeo. 44

RESUMO

As Infecções intestinais causadas por *Salmonellas* têm sido uma preocupação em inúmeras partes do mundo, podendo ocorrer a partir do consumo de alimentos e/ou água contaminados com bactérias patogênicas. Em contrapartida, o uso de antibióticos tem sido preconizado para o tratamento tanto em humanos como em animais, que por muito tempo foi usado de forma irresponsável, possibilitando bactérias se tornar resistentes a múltiplos fármacos. Uma possibilidade eficaz tem sido a busca de peptídeos antimicrobianos para ao tratamento. Estes peptídeos apresentam mecanismo de ação amplo, podendo ser uma alternativa inclusive para prevenir a formação de biofilmes que podem estar associados aos surtos de contaminação alimentar. Desta forma, o objetivo deste trabalho consistiu em analisar oito peptídeos contra três estirpes de *Salmonella enterides*, proveniente de isolados de alimentos, responsáveis por surtos humanos. Os peptídeos usados neste estudo foram elaborados com base em desenho racional de peptídeos antimicrobianos (PAMs), levando em consideração, suas estruturas físico-químicas, hidrofobicidade e estruturação em hélice. Diante disso, o experimento pôde mostrar que os resultados foram de grande valia, visto que os oito peptídeos apresentaram atividade antimicrobiana e também atividade antibiofilme para uma das estirpes de *Salmonella*. Em suma os peptídeos PcDBS1R3F5 e PaDBS1R3F10 podem agir como antibacteriano promissor podendo contribuir no desenvolvimento de produtos bioativos.

Palavras Chave: Bioensaio, Biofilme bacteriano, Infecção intestinal, Peptídeo antimicrobiano.

ABSTRACT

Intestinal infections caused by *Salmonellas* have been a concern in numerous parts of the world and may occur from the consumption of pathogenic bacteria contaminated food and / or water otherwise, the use of antibiotics has been preconized for treatment in both humans and animals, which has been irresponsibly for a long time , allowing bacteria to become resistant to multiple drugs. An effective alternative has been the search for antimicrobial peptides as an alternative to antibiotic treatment. These peptides have a wide mechanism of action and may be an alternative to prevent the biofilms formation that may be associated with food contamination outbreaks. This study aims to analyze eight peptides against three *S. enterides* strains isolated from food isolates responsible for human outbreaks. The peptides used in this study were elaborated based on the rational AMPs design of, taking into account their physico-chemical structures, hydrophobicity and helix structuring. Therefore, the results were relevant, since all peptides presented antimicrobial activity and also antibiofilm activity against at least one of the *Salmonella* strains. In summary the peptides PcDBS1R3F5 and PaDBS1R3F10 could be utilized as a promising antibacterial on development of bioactive products.

Keywords: bioassay, biofilm, Intestinal infection

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Infecções Intestinais

O intestino humano tem sua superfície estimada em aproximadamente 200 m², uma amplitude extensa que pode representar uma superfície muito promissora para a colonização, principalmente devido à disponibilidade de moléculas que podem ser usadas como nutrientes, podendo tornar este local um ambiente propício para bactérias (SEKIROV et al., 2010). Uma comunidade complexa de microrganismos que habita o trato gastrointestinal de mamíferos tem sido denominada microbiota, que apresenta importância substancial na composição do sistema imunológico do hospedeiro (YURIST-DOUTSCH, 2014). Além das bactérias, o trato gastrointestinal pode abrigar leveduras, helmintos, protozoários e vírus, sendo que a maior parte das bactérias presentes no intestino pode ser anaeróbica (PASCHOAL, 2013). Ademais, a microbiota pode ser composta por mais de 200 espécies bacterianas. Pode-se dizer assim que há quase dez vezes mais células bacterianas do que células humanas em um indivíduo. Essa coexistência tem acontecido de forma pacífica na relação direta do hospedeiro com a microbiota (SEKIROV et al., 2010). Este conjunto de microrganismos que reside no ser humano tende a estabelecer uma relação de simbiose (GONÇALVES, 2014).

Além disso, diferentes tipos de microrganismos que integram a microbiota podem exercer funções indispensáveis para a saúde humana, melhorando inclusive os mecanismos de defesa do sistema imunológico contra a patógenos bacterianos (GONÇALVES, 2014). A microbiota saudável tende a proteger o hospedeiro de muitos tipos de patologias. Dentre os vários aspectos da fisiologia, a microbiota intestinal pode influenciar o hospedeiro, abrangendo metabolismo, digestão, imunidade e inclusive o comportamento, podendo exercer função fundamental na resistência de colonização ao hospedeiro e na capacidade de prevenir a entrada de microrganismos patogênicos no intestino humano, protegendo-o contra doenças diarreicas (VOGT, 2017). A colonização das bactérias pertencentes à microbiota intestinal normalmente não se dá de maneira uniforme, e pode apresentar diferentes atividades ao longo do mesmo. Sendo assim, pode ser possível que alterações nas funções ou nas estruturas das cepas presentes no trato gastrointestinal possam levar a disbiose (BOREWICZ, 2015). A disbiose pode ser caracterizada pelo

desequilíbrio na organização do microbioma em seu local próprio (BOREWICZ, 2015), como pode ser visto na Figura 1.

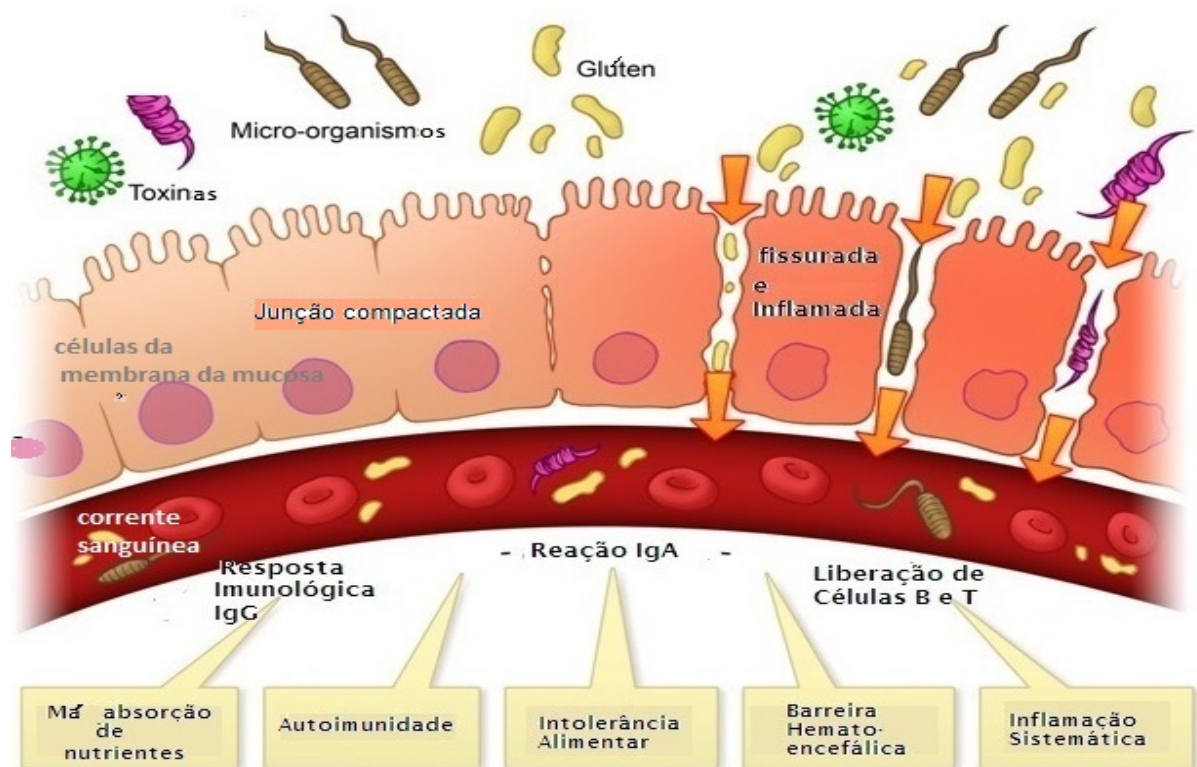


Figura 1. Microbiota acometida pela infecção intestinal. Imagem demonstrando as células da membrana da mucosa intestinal que mediante ao processo de infecção, formam fissuras entre as células e permitem a entrada de patógenos, que ao adentrarem à corrente sanguínea, acionam os receptores da resposta imune e podem causar danos absorptivos, de intolerância alimentar, alergias e inclusive ocasionando a inflamação do organismo como um todo.

Fonte: <https://greteacher.files.wordpress.com/2014/12/figura-4-trad.jpg>

Os microrganismos patogênicos podem penetrar na mucosa intestinal formando colônias no indivíduo e por processos diretos (corrente sanguínea) ou indiretos proporcionar o início de uma infecção gerando danos ao corpo humano (MADIGAN et al., 2010). Existem vários mecanismos de proteção mediados pela microbiota intestinal, tais como, inibição de crescimento virulento, manutenção da mucosa intestinal de modo a impedir a penetração de patógenos e com o estímulo da imunidade inata e adaptativa, incluindo produção de citocina, para aumentar a produção de peptídeos antimicrobianos (PAMs) (VOGT, 2017).

A vida sem estes seres simbióticos que compõem a microbiota poderia ter um impacto nocivo no sistema imunológico do hospedeiro, visto que muitos compostos

deste sistema podem permanecer subdesenvolvidos até que surja uma colonização bacteriana (YURIST-DOUTSCH, 2014).

A estruturação da microbiota gastrointestinal difere muito de um indivíduo para outro, sendo que alguma modificação tem sido associada à doença inflamatória intestinal, obesidade e vulnerabilidade às infecções (YURIST-DOUTSCH, 2014). Contudo, Cameron e colaboradores (2017), relatam que ainda não está totalmente elucidado o amplo papel da microbiota intestinal na manutenção da saúde. As mudanças que ocorrem na microbiota devido os quadros de infecções intestinais podem desencadear no indivíduo um quadro de má digestão, diarreias, aumento da liberação de interleucinas e linfócitos intraepiteliais (GUPTA, 2017). A Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2010 apontou que doenças transmitidas por alimentos contaminados (Doenças Infecciosas Intestinais-DII) podem ter causado mais de um milhão de óbitos no mundo (DE LUSIGNAN et al., 2017). A Infecção intestinal tem sido caracterizada pela diminuição da consistência das fezes e/ou o aumento na frequência das evacuações por mais de três episódios em 24 h, com ou sem febre e vômitos e com duração de 3 a 14 dias (LIMA, 2010). A desidratação e a desnutrição apontam agravos importantes no resultado fisiológico da infecção intestinal, sendo que a sua cronicidade pode afetar o desenvolvimento infantil (BUHLER et al., 2014). Pacientes com síndrome do intestino irritável (SII) podem apresentar um crescimento excessivo de bactérias no intestino delgado (SIBO). Sendo que esse aumento da composição bacteriana patológica induz o agravo da doença (GUPTA, 2017). O maior fardo das infecções intestinais tem sido a alta letalidade em crianças pequenas de países com baixa renda, em áreas empobrecidas e com problemas com saneamento básico, fatores de riscos nutricionais, como o não estímulo à amamentação materna e deficiências de micronutrientes como zinco e vitamina A (WALKER et al., 2012).

Desta forma, tem sido evidente a necessidade da realização de estudos para desenvolvimento de drogas que combatam a infecção causadora, de modo a ocasionar pouco ou nenhum dano na microbiota intestinal, para assim evitar reincidências e debilidade funcional. Estudos apontam que os agentes patogênicos mais relatados na saúde pública para diagnóstico das DII consistem nas *Salmonellas* e *Helicobacter pilory* (DE LUSIGNAN et al., 2017). No Brasil, depois de campanhas feitas na década de 1980, com terapia de reidratação oral e incentivo a imunização, o quadro de diarreia infecciosa no país diminuiu significativamente,

mostrando que um trabalho preventivo pode ser a forma mais eficaz de tratamento da doença (VICTORA, 2009).

A diarreia pode ser muito comum na infância, até o 3º ano de vida onde a média consiste em dois episódios por ano e altera conforme a localização de moradia, sendo mais comum nas áreas subdesenvolvidas, onde ainda não se tem água potável e saneamento básico (LIMA, 2010). As DII estão entre as doenças que causam principais danos, inclusive a morte em crianças menores de cinco anos em todo o mundo, podendo ser esta doença uma das responsáveis pelo ainda alto índice da taxa de mortalidade infantil (LOPES OLIVEIRA et al., 2017). Segundo o estudo de De Lusignan e colaboradores (2017), muitos casos deixam de entrar nas estatísticas devido à amplitude de diagnósticos atribuídos a DII, como gastroenterites, disenterias, enterocolites, diarreias do viajante entre outros, ou por não ter o exame com o agente patogênico específico. Além disso, no Brasil e em outros lugares do mundo, ocorre uma dificuldade em realizar estatísticas assertivas. Fato este ocorrido dado a que o indivíduo prioriza tratamentos caseiros e só se dirige a uma unidade de saúde ou hospital após agravo da doença (LOPES OLIVEIRA et al., 2017).

Em um estudo realizado no Reino Unido, foi possível observar erros de diagnósticos e estatísticos, ainda que o país seja portador de um sistema de dados totalmente informatizado e classificado como “padrão ouro” de diagnóstico, podendo desta forma, prever que em países subdesenvolvidos os resultados possam ser ainda mais alarmantes (DE LUSIGNAN et al., 2017). Tem sido possível identificar que alguns tratamentos com antibióticos possam resolver problemas das DII. Porém esses tratamentos podem afetar as atividades metabólicas da microbiota, alterando a resistência da colonização bacteriana protetora, evidenciando uma suscetibilidade maior a outras infecções que se oportunizam do ambiente debilitado, como a *Salmonella* (VOGT, 2017).

Os tratamentos com antibióticos para a DII podem ser aliados quando o uso se der de forma responsável, porém se assim não ocorrer pode se tornar fator complicante, devido ao surgimento de cepas resistentes a múltiplos fármacos (SALERNO-GONÇALVES, 2017). Algumas diretrizes abordam que o tratamento com antibióticos concomitante ao tratamento com uso de probióticos (microrganismos vivos, como os *Lactobacillos*) para manutenção da microbiota intestinal, podem conferir benefícios à saúde e diminuição dos danos principalmente aos que estão

em remissão (CAMERON et al., 2017). As infecções bacterianas tem influenciado consideravelmente no período de internação hospitalar, e quanto mais estendido o tempo de internação, maiores os custos financeiros haja vista os gastos com isolamentos, exames e uso de antibióticos (CASTRO, 2013).

1.2. Salmonelose

O consumo de alimentos e ou água contaminados com bactérias patogênicas, que são capazes de se desenvolver no interior do trato gastro intestinal, podem ser caracterizadas como infecções alimentares bacterianas, como a salmonelose (ALVES, 2012). A *Salmonella* consiste em uma bactéria Gram-negativa, da família *Enterobacteriaceae*, não produtora de esporos, anaeróbia facultativa, sendo que algumas estirpes são resistentes ao pH ácido e costumam crescer em pH 7,0 conforme demonstrada na figura 2 (MURRAY, 2014).

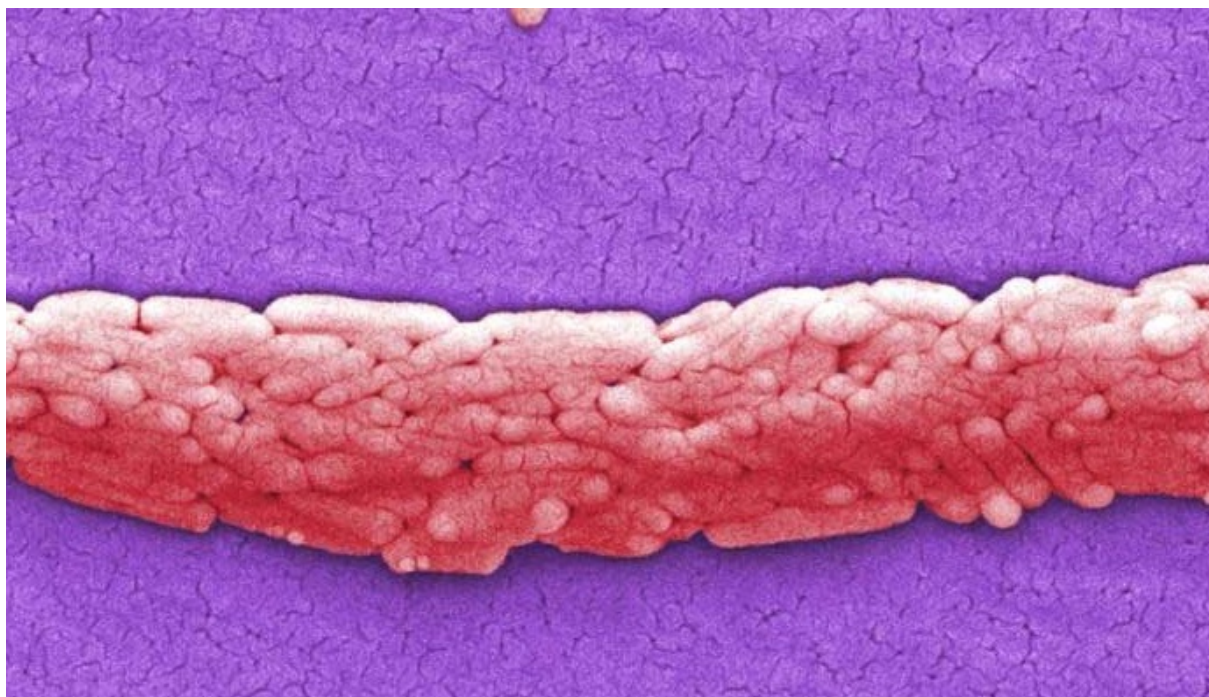


Figura 2: Alinhamento da bactéria *Salmonella*, ao ser isolado de uma cultura pura. Sendo visualizada em microscópio de alta resolução, aumentada em 8000 vezes.
Fonte: <https://www.pritzkerlaw.com/wp-content/uploads/2017/12/salmonella-cdc-10989.jpg>

O quadro clínico da infecção por *Salmonella* pode variar conforme o agente etiológico. Os que mais acometem humanos tem sido *Salmonella typhi* (febre tifóide), *Salmonella paratyphi* (Febre entérica), *Salmonella enteritides* e *Salmonella*

typhimurium (salmonelose) (MURRAY, 2014). Segundo Heithoff e colaboradores (2012), podem existir mais de 2500 sorotipos de *Salmonella*, sendo que alguns tendem a ser patogênicos apenas em hospedeiros humanos, como a *S. typhi* e *S. paratyphi*, que geralmente ocasionam a febre entérica. Existem outros tipos de sorotipos de *Salmonella*, como *S. dublin* e *S. choleraesuis*, esses microrganismos se adaptaram em hospedeiros não humanos. (HEITHOFF et al., 2012).

Entretanto, ainda existem sorotipos de *Salmonella* que não costumam se adaptar em hospedeiros específicos, como *S. enterides*. Estes microrganismos podem causar gastroenterites (HEITHOFF et al., 2012). Adicionalmente alguns sorotipos de *Salmonella* podem ter a capacidade de sobreviver à acidez estomacal e chegar até o intestino (FATICA et al., 2011). A alta adaptabilidade da *Salmonella* tem facilitado sua disseminação no ambiente, como em reservatórios de água, bancadas de preparo de alimentos e muitas outras superfícies (ALVES, 2012). Segundo Alves (2012) a *Salmonella* tem sido uma das zoonoses de destaque em todo o mundo, sendo frequentemente associada ao consumo de alimentos contaminados, principalmente os de origem animal e *in natura*, como leite, ovos, carnes, aves e até frutas e vegetais frescos. A febre entérica, ocasionada pela bactéria *S. paratyphi*, tem sido uma das fontes mais comuns de diarreias originadas por alimentos contaminados (BOREWICZ, 2015). Dados fornecidos pela OMS apontam que as vítimas mais afetadas pela febre tifoide (*S. typhi*) são crianças de até cinco anos, gestantes, idosos e imunodeprimidos, sendo que 90% das mortes ocorridas por esta doença ocorrem na Ásia (SALERNO-GONÇALVES, 2017).

A infecção por *Salmonella* pode eventualmente acarretar a letalidade, dependendo especialmente da população afetada, apresentando maiores riscos, em crianças, idosos e imunodeprimidos (ARNEDO PENA et al., 2017). Uma das complicações mais severas causadas pela salmonelose consiste nas hemorragias gastrointestinais, podendo gerar outros agravantes como pancreatite, hepatite, colecistite e outras co-morbidades extra intestinais (SHU-KEE et al., 2015).

Os animais podem ser reservatórios tão propícios para o desenvolvimento da *Salmonella* quanto os humanos. Tem sido importante ressaltar que muitos destes animais enriquecem o cardápio diário de indivíduos de todo o mundo. A preocupação com o controle e garantia de alimentos seguros pode diminuir as inúmeras doenças que são veiculadas por alimentos (SHINOHARA et al., 2008). Com o diagnóstico ascendente de animais contaminados por *Salmonellas*, tornou-se

comum o uso preventivo de antibióticos em animais, bem como em vegetais destinados a alimentação humana (ALVES, 2012). Diante disso, o uso desenfreado de antibióticos oferecidos a animais destinados à alimentação pode colocar em risco toda população (KONINGSTEIN, 2010).

Segundo Lopes de Oliveira e seus colaboradores (2017), nos últimos 25 anos houve uma diminuição importante na taxa de mortalidade infantil. Entretanto, a diarreia ainda tem sido um dos maiores agravos, que atualmente ocasiona o óbito em crianças. Já para Arnedo Pena e colaboradores (2017), alguns alimentos como ovos e carne suína podem ter sido responsáveis por infecções por *S. typhimurium* terem se tornados comuns na Espanha.

Os casos de infecções intestinais por *Salmonella* que ocasionam o óbito em crianças poderiam ser evitados através de cuidados simples, como o preparo alimentar seguro e a higiene básica (LOPES DE OLIVEIRA et al., 2017). Reforça-se a ideia que o uso de medidas de controle preventivos se farão necessárias, a fim de combater a contaminação, os cuidados com saneamento básico, higiene e imunização podem ser recursos poderosos nesse processo (SALERNO-GONÇALVES, 2017). O uso de vacinas continua sendo uma das fontes mais eficientes no controle de infecções bacterianas, como as ocasionadas por *Salmonella*, atribuindo à vacinação um valor incontestável, que visa melhorar o atendimento da população de risco (MEIRING, 2016).

A busca para que ocorra melhor compreensão da resposta imune do hospedeiro contra o *S. typhi* e também outros tipos de *Salmonellas*, ainda dependerá de muitas pesquisas, pois existem algumas deficiências no processo, tanto que atualmente existem apenas duas vacinas licenciadas nos Estados Unidos da América -EUA (SALERNO-GONÇALVES, 2017). A febre tifoide, ocasionada pela *S. typhi* e as outras doenças causadas pela *Salmonella*, continuam sendo um grande problema de saúde pública (MEIRING, 2016). Diante da realidade, a salmonelose tem contribuído para gastos econômicos altíssimos em países industrializados ou em desenvolvimento, custos estes associados não só a prevenção e vigilância, mas também com o tratamento da doença (SHU-KEE et al., 2015).

O uso da antibioticoterapia para o tratamento das infecções causadas pela *Salmonella* no indivíduo pode esgotar a microbiota saudável do intestino, sendo capaz de trazer outros danos à saúde (BOREWICS, 2015). Pesquisas apontam que

os aumentos das prescrições antibióticas tendem a potencializar a incidência das infecções clínicas por *Salmonellas* resistentes (KONINGSTEIN, 2010). Os indivíduos que fizeram uso de antibióticos nos últimos doze meses, de forma não assistida, indicavam ser mais vulneráveis a desenvolver salmonelose ao consumirem alimentos contaminados. Isto pode ocorrer devido à microbiota intestinal ainda estar danificada no pós-tratamento com antibióticos e necessitar de um tempo mais longo para ser restabelecida (KONINGSTEIN, 2010).

Os antibióticos mais comumente utilizados para a salmonelose tem sido as fluoroquinolonas (ciprofloxacina e ácido nalidixílico), cefalosporinas (ceftazidima e cefotaxamina) e os anfenícois (cloranfenicol). Atualmente uma preocupação pública, tem sido o surgimento de agentes patogênicos de alimentos resistentes aos antibióticos, principalmente da classe das fluoroquinolonas e de uso comum em salmonelose (SHU-KEE et al., 2015). A diminuição do registro de novos antibióticos, com modificados mecanismos de ação, e o aumento das taxas de resistência bacteriana, aumentam a necessidade emergencial de uma busca constante pelos cientistas de novos antimicrobianos (GUIMARÃES et al., 2010).

1.3. Antibióticos

Os antibióticos são substâncias naturais ou sintéticas que atingem bactérias e fungos, podendo ser um bactericida, que causa a morte da bactéria ou um bacteriostático, que causa a inibição do crescimento bacteriano (GUIMARÃES et al., 2010). A invenção dos antibióticos foi um ato revolucionário, sua descoberta há mais de um século, pode ter sido responsável pela diminuição da mortalidade no tratamento das infecções bacterianas (LEONG et al., 2017).

Os antibióticos foram também um marco de fundamental importância na melhora da qualidade de vida (KYANG, 2014). Segundo Rocha e colaboradores (2011), o êxito dos primeiros antibióticos na cura de doenças fatais produziu uma busca frenética por novas drogas. As décadas de 1940 a 1960 ficaram sinalizadas por uma infinidade de antibióticos gerados e introduzidos rapidamente às práticas clínicas. Depois dessa fase áurea dos antibióticos, houve um grande declínio na elaboração de novos compostos, sendo caracterizada por uma fase de pouca inovação e a introdução de novas classes de antibióticos que rapidamente se tornavam arcaica, devido ao surgimento de cepas resistentes (ROCHA et al., 2011).

A classificação dos antibióticos pode variar de acordo com seu mecanismo de ação: os fármacos que interferem na síntese proteica ou ação dos folatos (sulfonamidas), os β -lactâmicos (penicilina, cefamicinas e outros); os que afetam a síntese bacteriana (tetraciclina, clorofenicol entre outros); os que afetam a topoisomerase II (fluoroquinolonas) e os outros fármacos bacterianos diversos (vancomicina, teicoplanina) (RANG et al., 2011).

Desde os anos 1990 a *Salmonella* tem se mostrado resistente a vários antimicrobianos. Dentre estes compostos estão a cefalosporina, que consiste em um agente de primeira linha no tratamento de salmonelose (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE CONTROL, 2012). Um surto de salmonelose, em Washington (EUA) em 2015 alarmou a população e obrigou o Departamento de Saúde a buscar respostas para determinar os fatores de risco e fazer recomendação de prevenção. Identificou-se que a maioria das infecções se deu por consumo de carne suína contaminada. Nesse episódio, dez isolados clínicos de cepas de *Salmonella* foram submetidos ao sistema de monitoramento, inclusive para testes de resistência antimicrobiana e todos os dez apresentaram resistência à ampicilina, estreptomicina, sulfisoxazol e tetraciclina (KAWAKAMI et al., 2015).

No entanto, no Brasil, no estado do Pará ocorreu um surto em 2009, de febre tifoide, salmonelose que contribuiu para uso exagerado e errôneo de antimicrobianos. Fato este levou Souza e colaboradores (2010) a testarem a sensibilidade de 44 amostras de *Salmonella* a 11 tipos de antimicrobianos de classes variadas e geralmente utilizados nos tratamentos da salmonelose, onde 22,7% foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Normalmente quando se detecta que a doença foi causada por uma bactéria, torna-se necessário um estudo associado da resistência antibacteriana. Entretanto no Brasil existem poucos estudos relatando a resistência antibacteriana da *Salmonella* e seus sorotipos, diferente de outros países (SOUZA et al., 2010).

O cloranfenicol, por muitas décadas, foi à única droga realmente eficaz no tratamento da salmonelose; porém, o seu uso atual foi restrito apenas para pacientes em estado grave devido ao seu alto efeito tóxico; O baixo custo deste medicamento propiciou seu uso de forma indiscriminada e irresponsável (SOUZA et al., 2010). Desta maneira torna-se imprescindível a atenção a nova lista da OMS, que define o uso de antimicrobianos em caso de salmonelose, pois drogas como as fluoroquinolonas (ciprofloxacina) e cefalosporinas, de terceira geração (ceftazidima,

cefotaxamina), estas devem ser vetadas a utilização no tratamento animal, destinado a alimentação para que não faça resistência de forma indireta (ÂNGULO et al., 2009). A ciprofloxacina, pode ser classificada como uma fluoroquinolona de amplo espectro de ação, tem sido muito próspera no tratamento de diversas infecções, Essa quinolona de ácido carboxílico derivada do ácido nalidixico, age principalmente em infecções causadas por patógenos Gram-negativo, como a *Salmonella*, e pode ser encontrada na forma oral (com boa absorção pelo trato gastrointestinal) ou intravenosa, motivos estes que a torna uma prescrição frequente contra bactérias Gram-negativo (CARVALHO,2018)

Milhões de vidas são salvas devido ao uso de antibióticos. Os pacientes podem ter seu sofrimento amenizado com seu uso. Porém com o passar dos anos pode ser inevitável que as bactérias desenvolvam resistência aos antibióticos já existentes (CASTRO, 2013). A continuidade da eficácia no tratamento antibacteriano pode depender da criação de novos medicamentos sintéticos ou naturais biotecnicamente formulados baseados em novas concepções.

Drogas como a cefalosporina, comumente indicada para a salmonelose, apresentam um mecanismo de ação essencialmente semelhante aos da benzilpenicilina, cefamicinas e outros β -lactâmicos. Estes antibióticos agem interferindo na formação da parede celular das bactérias e variam em suas gerações (1^a, 2^a e 3^a), mediante seu espectro de atuação com maior ou menor estabilidade (GREKO, 2009). Existe certa preocupação com o uso de cefalosporina, pois os países da União Européia (UE), tem utilizado esse fármaco de modo amplo para tratamento de animais produtores de alimentos, incluindo todas as espécies de mamíferos (bovino, suíno, caprino e outros), ignorando a lista da OMS que afirma ser proibido utilizar o mesmo medicamento para animais., e aumentando o risco da resistência bacteriana a este medicamento (GREKO, 2009).

1.4 Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm sido isolados a partir de vários seres vivos incluindo plantas, invertebrados, anfíbios, peixes, aves e até mesmo de seres humanos. Esses PAMs podem ser uma alternativa estratégica para o tratamentos de infecções bacterianas, uma boa opção aos antibióticos convencionais (SILVA et al., 2011). Os PAMs consistem em serem componentes

importantes inerentes do sistema de defesa de animais, plantas, microrganismos, fungos e bactérias, baseando em pequenas moléculas que podem apresentar atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiparasitária (NGUYEN et al., 2011). Os peptídeos podem ser classificados de acordo com suas propriedades físico-químicas, como anfipáticos, hidrofílicos e catiônicos (LIMA et al., 2013).

Em geral os peptídeos podem apresentar cargas positivas, grande quantidade de resíduos hidrofóbicos e uma estrutura onde esses dois itens se organizam especialmente em pontos contrários (anfipáticos) (SILVA, 2011)

Os peptídeos em geral têm sido componentes muito promissores no desenvolvimento de novos medicamentos e em muitas outras formulações (RIBEIRO et al., 2014). Os PAMs podem ser catiônicos, hidrofóbicos e agem no nível de membrana ou parede celular hidrolisando-a, sua classificação baseia-se na composição de resíduos de aminoácidos, no tamanho (em média de até 50 kDa) e em suas estruturas conformacionais. Atualmente os PAMs têm sido apontados como mecanismo de ação com alto potencial terapêutico de aplicação clínica, onde podem se observar exaustivas pesquisas em relação sua biossíntese e atividade antimicrobiana (NGUYEN et al., 2011).

Segundo Leweu e colaboradores (2010), os PAMs podem ter muitos mecanismos de ação, que podem ocorrer simultaneamente causando a morte do microrganismo alvo. Algumas características dos PAMs podem ser essenciais para que ocorra a atividade antimicrobiana, como as cargas dos peptídeos (catiônicos ou aniônicos), porém existem outras atividades com muita relevância, como o tamanho, a sequência primária, a conformação, a estrutura, hidrofobicidade e anfipaticidade (GUILHELMELLI et al., 2013). Cada grupo de PAMs tem um grande espectro de ação específica mesmo que sua modulação à resposta imune seja conservada estruturalmente (LIMA et al., 2013). Alguns PAMs são atraídos pela carga negativa encontrada na membrana das bactérias Gram-negativas, que contém lipolissacarídeos (LPS) com mecanismos de ação diferenciados, parecendo depender das propriedades moleculares de ambos para ser induzida a atividade antimicrobiana desses peptídeos (GUILHELMELLI et al., 2013). A interação com a célula alvo vai depender muito da superfície celular, e também com a formação de aminoácidos desses peptídeos. No mais, a estrutura secundária pode ser imprescindível para que os compostos carregados negativamente se liguem na membrana alvo (GUILHELMELLI et al., 2013). Algumas irregularidades de

membrana podem ser incitadas pelos PAMs como a formação de poros, separação de fases, promoção de estrutura lipídica não lamelar ou ruptura da bicamada da membrana. Dos modelos que podem explicar a interrupção da membrana por PAMs, os propostos mais utilizados foram: barril, polo toroidal e carpete (GUILHELMELLI et al., 2013).

Segundo Brogden (2005), o modelo barril propõe que os peptídeos, por meio de introdução direta no núcleo lipídico da membrana alvo e os PAMs se liguem na superfície da membrana, permitindo o extravasamento do líquido citoplasmático, tendo como consequência a apoptose celular, onde as estruturas de peptídeos secundárias (α -hélice e β -folha) podem ser fundamentais para a formação dos poros (BROGDEN, 2005). Já no modelo toroidal pode ocorrer a formação de um feixe na membrana pelas moléculas peptídicas, induzindo as camadas lipídicas a se dobrarem continuamente através do poro, intercalando os PAMs com o poro (ex. protegrinas) (BROGDEN, 2005). Diferente dos modelos barril e toroidal, no modelo carpete os PAMs afetam a arquitetura da membrana ao cobrirem a superfície agindo como um detergente, onde o PAMs inicialmente atraem a membrana de forma elétrica, se espalha por toda a superfície da membrana podendo atingir uma concentração limiar pode permear a membrana onde esta se desintegra levando à a quebra celular (GUILHELMELLI et al., 2013).

Um mesmo PAM pode ter várias funções diferentes, atuando em diversos alvos; denomina-se este conceito como “promiscuidade”. Esta promiscuidade pode ocorrer de forma pura, quando diferem de sua estrutura físico-química, relacionada com uma proteína única ou familiar, quando tem a modificação de aminoácidos. Sendo que essas características agregam aos PAMs muitos benefícios fisiológicos vantajosos frente às outras moléculas para aplicação no desenvolvimento de novos fármacos (FRANCO, 2011).

Segundo Kang (2014), há alguns importantes problemas que limitam o estudo mais ostensivo para certificação do alto potencial terapêutico dos PAMs, pois mesmo com seu amplo espectro de ação, mecanismos de ação únicos e variáveis raras resistentes aos antibióticos. Os PAMs ainda podem apresentar altas toxicidades, pouca estabilidade e alto custo de fabricação, sendo estes problemas de difícil resolução (KANG, 2014). Peptídeos sintéticos podem apresentar um biocontrole mais rápido ou mesmo uma capacidade bioestática em relação a vários patógenos bacterianos e fúngicos, diferentes dos naturais, os PAMs sintéticos

podem ser projetados para diminuir a toxicidade para uso em humanos (HAO et al., 2017).

Alguns PAMs têm sido muito estudados e, dentre os testados, alguns apontaram atividades antibacterianas contra a *Salmonella*, como a clavanina e a taquilepsina I. A clavanina, provenientes de células da *Styela clava*, apresentou também atividade contra *Staphylococcus aureus*, bactérias Gram-negativas (*Salmonella*) e até mesmo fungos, mostrando maiores atividades em ambientes com pH mais ácidos (VAN-KAN et al., 2003). A clavanina apresentou um potencial peculiar para o tratamento de infecções e feridas devido ter baixa toxicidade em células humanas (SILVA et al., 2015). Já a taquilepsina I, isolados de um caranguejo de água gelada *Tachypleus tridentatus*, mostrou inibição no crescimento de *Salmonella* apontando como uma alternativa no tratamento de infecções intestinais (LIMA e DIAS, 2016). Alguns PAMs já estão sendo utilizados com fins clínicos e comerciais, dentre eles a ambicina (nisina) e gramicidinas S (PORTO, 2013). Já outros peptídeos podem ser conhecidos como modelo para estruturação de desenhos de PAMs como a batenecina e indolicidina (FJELL et al., 2012). Embora os PAMs perfaçam a primeira linha de defesa contra o patógeno, o seu uso como agente terapêutico tem ainda muitas limitações, a estabilidade limitada (devida à vulnerabilidade a degradação proteolítica), a toxicidade (precisa a investigação quanto a toxicidade hemolítica) e também pela quantidade de aminoácidos que deve ser pequena para que seja mais acessível (PORTO, 2013).

Novas fronteiras entre a pesquisa estão sendo abertas para novos PAMs, tornando os muito mais úteis e com grandes impactos na área da saúde, com novas preparações mais resistentes que múltiplos fármacos, porém com o desafio de lidar com a grande variedade de estrutura e função (RIBEIRO et al., 2014).

Desta forma, compreender as particularidades moleculares que determinam o mecanismo de ação dos PAMs pode ser imprescindível para a elaboração da próxima geração de antibióticos (MARIA-NETO et al., 2012).

1.5. Biofilme

Os Biofilmes têm sido caracterizados por serem comunidades multicelulares formadas por bactérias. Eles são capazes de demonstrarem um aumento de até 100 vezes na resistência ao molde de antibióticos habituais (FUENTE-NUÑEZ et al., 2014). Ainda não se têm encontrado antibióticos com ação direcionada ao combate

do biofilme e alguns peptídeos tem se mostrado bastante hábeis impedindo sua formação e algumas vezes até a erradicação (FUENTE-NUÑEZ et al., 2014). Existem algumas bactérias que se destacam por ativar a resposta rigorosa devido as situações ambientais estressantes (fome), assim provocadas, podem induzir a formação do biofilme (PORTYKUS e CASHEL, 2008).

Esse complexo ecossistema microbiológico que consiste o biofilme pode ser construído a partir de uma ou muitas espécies (KASNOWSKI et al., 2010). Pode ser uma estratégia de sobrevivência das bactérias, que ao se agruparem em biofilmes podem se tornar mais resistente à ação de antimicrobianos (SANTOS, 2017). O biofilme pode ser descrito em etapas, onde primeiramente ocorre a agregação das células bacterianas nas superfícies bióticas (pulmão) ou abióticas (talheres, utensílios e bancadas), em seguida as células vão se agrupando em camadas, onde ocorre a liberação de componentes microbianos de adesão intercelular e de formação da matriz EPS. Após ocorre a maturação do biofilme e seu desenvolvimento, em seguida algumas células são dispersas retomam a forma planctônica e inicia um novo ciclo (ARCIOLA, 2012).

A resistência antibiótica pode ser aumentada devido à mudança da expressão dos genes responsáveis nos biofilmes. Pode ser um fenômeno natural como o mecanismo da evolução da espécie da célula bacteriana a resistência antimicrobiana pelo biofilme (SANTOS, 2017). Várias partículas formam uma espécie de crosta, chamada matriz expopolissacarídea (EPS). Sob ela os microrganismos podem continuar crescendo e podem também aumentar sua proteção (KASNOWSKI et al., 2010). Biofilmes podem aderir fortemente a superfícies bióticas (viva) e abióticas (inertes). Quando uma superfície abiótica (como um utensílio de cozinha) apresenta formação de biofilme, pode contaminar os alimentos expostos, biofilmes bacterianos podem ser mais resistentes a antimicrobianos, podendo persistir mesmo depois de feito a sanitização (OLIVEIRA et al., 2010). Embora os biofilmes possam ser formados por vírus e bactérias, as bactérias tem sido frequentemente mais encontradas na formação do biofilme, devido suas altas taxas de reprodução e a capacidade de adaptação, e a *S. typhimurium* aparece como exemplo de biofilmes patogênicos (KASNOWSKI et al., 2010).

Alguns especialistas apontam que muitos surtos causados por transmissão alimentar podem estar associados ao biofilme (KASNOWSKI et al., 2010). Na

indústria de alimentos existe uma variedade de substratos que podem acumular o biofilme, como aço inoxidável, ferro, polipropileno, formica, entre outros. (KASNOWSKI et al., 2010). Contudo, a geração de fatores negativos por incidência dos surtos e contaminações associados a difícil remoção do problema, coloca a indústria alimentícia em uma posição de fragilidade mediante ao biofilme (BERGAMIN et al., 2015).

Estudos apontam que concentrações mais baixas do que as que matam ou inibem o crescimento bacteriano podem atuar na prevenção da formação de biofilme, como acontece com o LL-37 (peptídeo de defesa do hospedeiro catiônico humano), que além de atuar na modulação da resposta imune, pode ser capaz a formação de biofilme bacteriano *in vitro* (OVERHAGE et al., 2008)

Ao aderir às superfícies as bactérias *Salmonellas entéricas* produzem uma matriz extracelular para a formação do biofilme, que pode conter fatores de virulência associado e expressa patogenicidade. Deste modo é preciso atenção às indústrias alimentícias com o perigo de contaminação alimentar (MILAN et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA:

As doenças infecciosas intestinais (DII) transmitidas por alimentos (Intoxicação e infecções alimentares) como a salmonelose, têm sido apontadas como uma das principais patologias que aumenta o índice de mortalidade em crianças menores que cinco anos em todo o mundo. Esta doença desnutre e desidrata o indivíduo, podendo levá-lo a morte, e ainda contribui para um gasto orçamentário muito maior aos cofres públicos. As bactérias patogênicas como a *Salmonella* podem causar infecção e destruir a microbiota intestinal, causando danos à saúde humana. Os males agravados como a diarreia, diarreia hemorrágica e a infecção intestinal podem danificar a estrutura da microbiota, a ponto de permitirem que patógenos adentrem em outros órgãos (sangue e peritônio). Na atualidade a síntese de novos antibióticos tem se passado por uma decadência. Desta forma, justifica-se a busca por alternativas viáveis de novos fármacos, que possam atuar nessa linha antimicrobiana e com a vantagem de diminuir os danos ao indivíduo. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm respondido positivamente neste âmbito tecnológico, sua carga positiva (catiônicos) e sua hidrofobicidade podem aumentar seu alto potencial terapêutico em, seu mecanismo de ação diferenciado e poderem exercer reações rápidas contra os invasores patógenos. Isto chama a atenção dos pesquisadores podendo ser o marco da medicina moderna. Uma vez que a letalidade pela *Salmonella* se torna tão ameaçadora. Diante desse fato, buscou-se testar oito peptídeos catiônicos que dispúnhamos no banco de reservas biológicas do biolab, que haviam apresentado propriedade antimicrobiana porém nunca haviam sido testados contra *Salmonellas*, usamos estirpes de um ensaio clínico, visando encontrar uma nova proposta de tratamento que pudesse tratar a infecção intestinal, ou o desenvolvimento de um insumo de biopreservação que impedisse que os alimentos, grandes vetores de contaminação, fossem acometidos por *Salmonellas*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana de peptídeos catiônicos contra isolados clínicos de *Salmonella*.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a síntese dos peptídeos PaDBS1R2F3, PaDBS1R3F8, PaDBS1R3F10, PcDBS1R3F5, EcDBS1R4F6, guavanina 12, guavanina 14 e clavanina A.
2. Analisar a atividade antimicrobiana dos peptídeos contra três estirpes de *Salmonella*;
3. Comparar a atividade antibacteriana dos peptídeos em relação à inibição do crescimento obtida pelo antibiótico;
4. Investigar a atividade antibiofilme dos peptídeos testados;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Síntese dos peptídeos

Os peptídeos utilizados foram selecionados no banco de reservas do biolab-UCDB, sendo elencado os oito peptídeos da primeira geração sintetizadas e que já haviam apresentado propriedades antimicrobianas.

Os peptídeos utilizados foram elaborados com base no desenho racional de peptídeos antimicrobianos, levando-se em consideração o tamanho (quantidades de resíduos de aminoácidos), as estruturas físico-químicas, hidrofobicidade e estruturação em hélice. Os peptídeos pertencentes a este trabalho foram elencados de grupos distintos, sendo os peptídeos PaDBS1R2F3, PaDBS1R3F8 e PaDBS1R3F10 selecionados em uma busca de dados não redundantes com auxílio de uma ferramenta (*Script Perl*). Esta ferramenta busca expressões regulares em banco de dados espectral de massa peptídica, onde foi detectado um fragmento derivado de *Pyrobaculum aerophilum*. Este fragmento foi submetido a um algoritmo denominado janela deslizante, que gerou dez sequências análogas com 10 resíduos de aminoácidos. A mesma ferramenta (*Script Perl*) foi utilizada para a elaboração do peptídeo PcDBS1R3F5. Entretanto, o que diferenciou este peptídeo foi o fragmento derivado de *Plasmodium chabaudi*. Ademais, o EcDBS1R4F6 obteve seus fragmentos derivados de *Escherichia coli*. O outro grupo utilizado foram as guavaninas 12 e 14, que foram construídas como uma versão customizada a partir do Fragmento do peptídeo Pg AMP-P1 do originados da goiaba (*Psidium guajava*), tendo a inclusão de novas sequências com um número limitado de aminoácidos. A sequência das guavaninas foram aplicadas a uma equação (função fitness) e obtiveram a inclusão de resíduos de arginina. Por fim, este desenho racional gerou 15 novas sequências, sendo que oito tiveram classificação antimicrobiana e todos mais potentes que o fragmento utilizado (Pg AMP-P1). O último grupo utilizado foi a clavanina A, um peptídeo com atividade antimicrobiana, sendo isolado dos hemócitos de tunicado marinho da *Stelya clava*. Este peptídeo apresenta sequência com vinte e três resíduos de aminoácidos, tendo conformação em α -hélice, bem como características catiônica e anfipática. Quando testada, a clavanina A apresentou atividade contra bactérias Gram- negativas. Todos os PAMs foram sintetizados pela empresa *Peptide 2.0 Incorporated* (USA), com 95% de pureza, pela técnica de fase sólida por meio da estratégia de *Fmoc* (9-fluorenilmetoxycarbonila). A

resina utilizada para a acoplagem dos resíduos de aminoácidos foi ao RINK *amide*. Para a separação da acoplagem de Fmoc foi utilizado uma solução de piperidina em DMF por cerca de 30 min, e a separação final e da clivagem, foi utilizada uma solução de água deionizada, ácido trifluoroacético (EDT) e Triisopropilsilano (TIS). Posteriormente a solução contendo os peptídeos foi liofilizada. Para investigação do grau de pureza, os peptídeos foram solubilizados em água Milli-Q, centrifugados e filtrados. Posteriormente, foram aplicados em *high performance liquid chromatography* (HPLC). Sendo que, a leitura dos peptídeos foi realizada com densidade óptica de 216 nm. Em seguida incluídos em uma solução saturada de matriz constituída por ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (1:3), colocados em placa do tipo MTP 384 *massive* e secos a temperatura ambiente. Com um espectrômetro de massa do tipo MALDI-ToF/ToF *Ultraflex III (Bruker Daltonics)* foi determinada a massa molecular exata dos peptídeos, utilizando o *Peptide calibration standard II (Bruker Daltonics)* para realizar a calibração, como padrões de massa molecular e os valores obtidos foram comparados com valores adquiridos.

4.2 Padronização das colônias

Foram utilizadas três estirpes de *Salmonella entérica enterides* (AL80/02) isoladas de alimentos responsáveis por surtos humanos no estado do Paraná, cedidas pelo Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos de microrganismos da Universidade Estadual de Londrina (UEL). As três estirpes de *Salmonellas* foram plaqueadas em meio Ágar BHI (*Brain heart infusion*) e acondicionadas em estufa a 37° C (Nova ética-411D), por 12-16 h no laboratório de microbiologia da UCDB (biolab). Após a incubação foram selecionadas três colônias de cada isolado de *Salmonella*, sendo essas réplicas biológicas. Para o pré-inóculo foi realizada, em tubos Falcon, a inoculação de cada colônia das réplicas biológicas de cada bactéria, contendo 5 mL de meio líquido BHI, sendo colocadas, posteriormente, no *shaker* (Nova Ética) a 200 rpm a 37° C por 12 h. Foi realizado, primeiramente, a padronização de crescimento utilizando espectrofotômetro (*Thermo Fisher Scientific*) com comprimento de onda de 600 nm, adicionado do inóculo bacteriano 100 µL em microtubo graduado, sendo que as leituras foram realizadas de 30 em 30 min por 8 h, bem como das réplicas técnicas e assim obtendo um

gráfico do crescimento das bactérias utilizadas no experimento, bem como a fase exponencial. Após a repetição da fase de incubação e inoculação *em overnight*, subsequentemente, foram inoculados após atingir a densidade ótica (DO) adequada (0,8) e estacionado o crescimento em ambiente gelado, foi então depositado 100 μL do inóculo padrão em 900 μL de solução salina, sendo realizadas 8 diluições seriadas de cada réplica biológica, conforme demonstrado na figura 3. Todas as réplicas biológicas e suas diluições foram plaqueadas em meio BHI divididas em quatro quadrantes, sendo cada quadrante inoculado com três microgotas de 10 μL , com sua respectiva diluição. Todas as placas foram acondicionadas em estufa a 37° C por 24 h, para que após esse período fosse realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

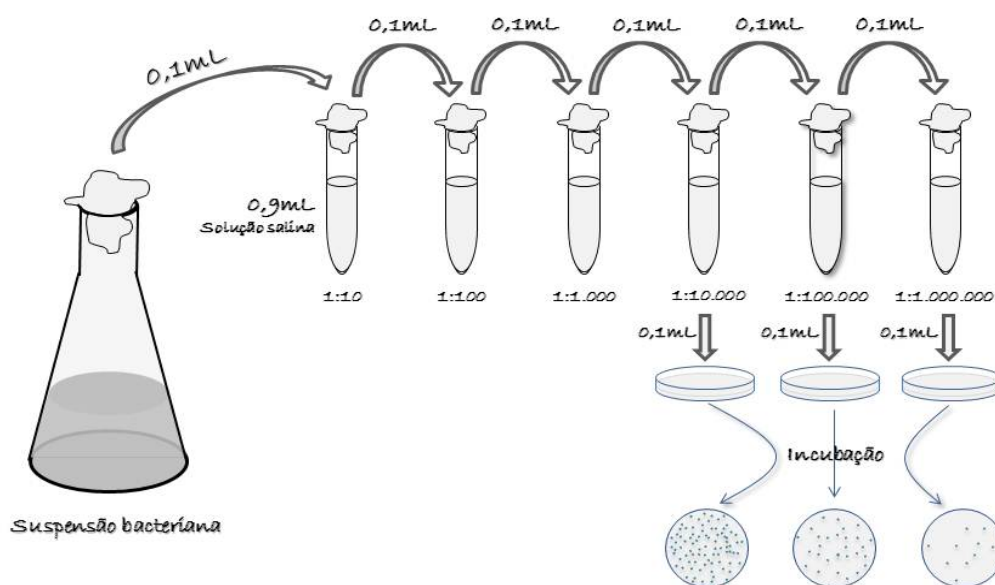


Figura 3: Representação do esquema de diluição para contagem de colônias bacterianas a partir das diluições seriadas. A placa pode ser dividida em quatro quadrantes, onde cada quadrante deve ser identificado e recebe 3 microgotas (10 μL) de sua diluição correspondente.

Fonte: <https://bacilosnasopa.files.wordpress.com/2012/08/tecnica-dilui3a7c3a3o-seriada.jpg>

4.4 Análise da atividade antimicrobiana

As três estirpes de *Salmonella entérica enterides* (AL80/02) isoladas de alimentos cedidas pela Universidade Estadual de Londrina (UEL) foram plaqueadas em meio BHI, a 37° C por 12 h. O pré-inóculo foi realizado de forma a retirar uma colônia isolada e inocular em 5 mL de meio líquido BHI, para posterior incubação no

shaker (Nova Ética) a 200 rpm, 37° C, *overnight*. Para o inóculo padrão foram utilizados 4,9 mL de meio líquido BHI adicionado de 100 µL da cultura bacteriana *overnight*. Este inóculo foi novamente incubado no *shaker* à 200 rpm e 37° C, com leituras de DO realizadas de 30 em 30 min, até o crescimento bacteriano atingir absorbância de 0,8 unidade de absorbância (UA) (10^8 UFC.mL⁻¹). As bactérias foram ajustadas para que no fim do bioensaio a concentração bacteriana estivesse com 10^6 UFC.mL⁻¹. A síntese, purificação e grau de pureza foram feitos conforme descrito anteriormente. Os seus números, nomes e sequências estão detalhados na Tabela 1. Os PAMs selecionados não haviam sido testados contra *Salmonellas*.

Tabela 1: Classificação dos peptídeos segundo sua numeração nome e sequência de aminoácido apresentado.

Número	Nome do peptídeo	Sequência
1	PaDBS1R2F3	AKLLPRIKKK
2	PaDBS1R3F8	LLKKLRLKIA
4	PaDBS1R3F10	KKLRLKIAFK
7	Guavanina14	RSFMKCYEQASRYGNRILRR
8	PcDBS1R3F5	IKLLCRVHKK
9	EcDBS1R4F6	FKLLARIAVK
12	Guavanina12	RKLMELYEQAIRYGKRSYRR
15	Clavanina A	VFQFLGKIIHVGNFVHGFSHVE

Após esse processo, as concentrações de 128 µg.mL⁻¹ das amostras de peptídeos PaDBS1R2F3, PaDBS1R3F8, PaDBS1R3F10, guavanina 14, PcDBS1R3F5, EcDBS1R4F6, guavanina 12 foram plaqueadas juntamente com 50 µL da suspensão bacteriana (10^6 UFC.mL⁻¹). Essa concentração de 128 µg.mL⁻¹ dos peptídeos foi utilizada baseada no volume de 50%, pois quando adicionado o inóculo bacteriano (50 µg.mL⁻¹), a mesma cairá pela metade- 64 µg.mL⁻¹). Para o grupo controle positivo, foram plaqueados 50 µL de inóculo padrão e 50 µL de meio líquido BHI, sendo que para o controle negativo, foram plaqueados 100 µL de meio líquido, já para o controle de antibiótico foram plaqueados 50 µL de ciprofloxacina com a concentração de 128 µg.mL⁻¹ e 50 µL do inóculo bacteriano. As amostras e os controles foram plaqueados em triplicatas, contendo réplicas técnicas e biológicas, completando um volume final de 100 µL em cada poço. Foi então realizada no aparelho *PR2100 Reader* (Sanofi Diagnostics Pasteur) a leitura da microplaca de uma em uma hora, até completar 12 h de experimento. As placas com as amostras foram mantidas sob incubação à 37° C em estufa bacteriológica (Nova ética 411D).

4.5 Formação de biofilme

Os ensaios de biofilme foram realizados no laboratório S-Inova Biotech da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). As três estirpes de *Salmonella entérica enterides* (AL80/02) isoladas de alimentos, foram plaqueadas em meio ágar BHI (*Brain heart infusion*) e acondicionadas em estufa a 37 °C (Nova ética 411D), por 12-16 h. As três estirpes de *Salmonella entérica enterides* (AL80/02) isoladas de alimentos, usado nesse experimento para a formação do biofilme, cada bactéria foi inoculada separadamente em meio de cultura BHI por 24 h. Após a encubação de 24 h, foi efetuado o inóculo padrão, foram utilizados 4,9 mL de meio líquido BHI adicionado de 100 µL da cultura bacteriana (*overnight*). Este inóculo, foi novamente incubado a *shaker* à 200 rpm e 37° C por 12 h. Após esse período, foi realizado um novo inóculo para padronização de colônias em 10⁸ UFC.mL⁻¹. O plaqueamento foi realizado em microplaca com 96 poços de polipropileno de fundo U, estéreis. Primeiramente foi depositado na placa as amostras dos peptídeos PaDBS1R2F3, PaDBS1R3F8, PaDBS1R3F10, guavanina 14, PcDBS1R3F5, EcDBS1R4F6, guavanina 12 e clavanina previamente calculados, juntamente com os controles, sendo o antibiótico escolhido a ciprofloxacina em igual concentração e diluídos em meio BM2 (fosfato de potássio 62 mM, sulfato de amônia 7 mM, sulfato de magnésio 2 mM, sulfato ferroso 10 µM e glicose 0,5%), na quantidade de 50 µL para que fosse obtido a concentração de 128 µg.mL⁻¹ e 50 µL do inóculo bacteriano, incubado por 24h a 37 °C. Após 24 h utilizando leitura a 600 nm no espectrofotômetro (*Thermo Scientific Multiskan GO*), foram realizadas as leituras de quantificação da atividade metabólica para as bactérias consideradas fortes formadoras de biofilme, as células planctônicas, por meio de absorbância, foram realizadas a quantificação de células viáveis pela contagem de UFC. Seguidamente, para avaliação da formação dos biofilmes, realizou-se a lavagem da placa com água destilada estéril, para remoção de células planctônicas, cuidadosamente por duas vezes, após o momento de secagem da microplaca em temperatura ambiente foram adicionados 100 µL de solução de cristais violeta 1% em cada poço, deixado em repouso por 20 min, posteriormente foi realizada nova lavagem da placa, para retirada do cristal violeta, por duas vezes com água destilada. Em seguida após secagem de todo o líquido, foi pipetado com pipeta multicanal, 100 µL de álcool 60% em cada poço para

resuspensão. Posteriormente, foi realizada a leitura das microplacas no espectrofotômetro (*Thermo Scientific Multiskan GO*) com auxílio do programa (*Skinit Software 3.2*) onde foi reajustado para absorbância a 595 nm, para leitura de biofilme.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da Atividade antimicrobiana

Todos os peptídeos testados apresentaram alguma atividade contra as estirpes de *Salmonella*. É possível verificar a comparação da inibição das bactérias por peptídeos em relação ao antibiótico. Na tabela 5 estão demonstrado a avaliação da inibição efetuada pelos peptídeos contra a estirpe de *Salmonella*.

Tabela 5: Comparação da inibição das bactérias por peptídeos em relação ao antibiótico. Onde expressa a avaliação da inibição efetuada pelos peptídeos contra a estirpe de *Salmonella*, utilizando a concentração de 64 µg.mL⁻¹, as leituras foram realizadas e comparadas com a inibição do controle antibiótico no tempo de 8 h e 12 h, utilizando o comprimento de onda de 600 nm, posteriormente calculados com base no valor do crescimento ocorrido e em seguida transformado em porcentagem.

Peptídeos controle	% inibição						Geral/ média
	<i>Salmonella I</i>		<i>Salmonella II</i>		<i>Salmonella III</i>		
	8ª hora	12ª hora	8ª hora	12ª hora	8ª hora	12ª hora	%
PaDBS1R2F3	22,1	0,6	26,5	77,8	26,6	76,8	38,4
PaDBS1R3F8	27,2	40,5	26,7	42,4	26,9	41,0	34,1
PaDBS1R3F10	75,6	28,9	52,0	27,2	52,0	25,4	43,5
Guavanin14	14,5	14,1	17,6	34,0	17,8	28,3	21,0
PcDBS1R3F5	24,8	25,0	43,4	50,5	43,0	50,7	39,6
EcDBS1R4F6	24,8	0,0	22,5	9,5	22,7	7,2	14,4
Guavanin12	15,7	0,0	18,4	31,4	18,5	30,0	19,0
Clavanina A	16,4	0,0	18,8	32,3	19,0	30,6	19,2

As *Salmonellas* podem ser consideradas as principais bactérias causadoras de doenças intestinais, podendo causar letalidade, especialmente se a população afetada apresentar maior risco, como crianças, idosos ou indivíduos acometidos por outras patologias (ARNEDO PENA et al., 2017). Desta forma existe uma necessidade urgente de desenvolver novos fármacos que ajudem a combater essas

infecções bacterianas, pois as bactérias estão se adaptando rapidamente aos já existentes no mercado. O uso dos antibióticos segue um protocolo medicamentoso para tratamento de doenças infecciosas, tem sido aplicado em intervalos de 8h ou 12h, por um período de aproximadamente 5 dias (NOGUEIRA et al., 2015). A ciprofloxacina, por apresentar um amplo espectro de ação e elevada eficiência contra *Salmonella*, foi aqui utilizada como controle de antibiótico (NOGUEIRA et al., 2015). A escolha da ciprofloxacina para controle de antibiótico também se deve a este antibiótico ser muito utilizado em quadros infecciosos, por sua ação bactericida e inibição da topoisomerase, necessária para a replicação da bactéria (ÂNGULO et al., 2009). A crescente preocupação da adaptação bacteriana, diante da disponibilidade de antibacterianos, tem motivado a pesquisa de novos fármacos aptos a exercer algum tipo de atividade contra microrganismos patogênicos (CHU et al., 2017).

O peptídeo EcDBS1R4F6 entre os oito peptídeos analisados foi o que apresentou a menor atividade antibacteriana entre as três estirpes de *Salmonella*, com uma inibição média de 14,4%. Este peptídeo apresentou 24,8% de inibição na oitava hora contra a estirpe de *Salmonella* I, na concentração de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, comparado ao controle do antibiótico na mesma concentração, já para o decimo segundo horário o peptídeo EcDBS1R4F6 não apresentou inibição. Para *Salmonella* II, o peptídeo EcDBS1R4F6 apresentou inibição de 22,5% e 9,5% na oitava e decima segunda hora, respectivamente, comparado ao controle antibiótico na concentração igual de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Na *Salmonella* III as inibições da oitava e décima segunda hora seguidamente foram 14,9 e 14,4%, ambos na mesma concentração dita anteriormente, assim como o controle antibiótico com o qual foram comparados. Os valores de inibição do peptídeo EcDBS1R4F6 não foram muito relevantes, embora ficasse evidente que a atividade antibacteriana fosse mais presente na oitava hora. Porém em estudos anteriores, o peptídeo EcDBS1R4F6 mostrou-se promissor contra *Pseudomonas aeruginosa* com concentração inibitória mínima de 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (PORTO, 2017).

O peptídeo guavanina 12 foi capaz de inibir em 15,7% a atividade bacteriana da *Salmonella* I na oitava hora, comparada com o controle antibiótico, já na décima segunda hora não apresentou inibição contra esta estirpe bacteriana. A guavanina 12 foi capaz de inibir 31,4% na décima segunda hora e 18,4% na oitava hora contra a estirpe de *Salmonella* II, ambos com concentração de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com a mesma

concentração do controle antibiótico. A inibição da atividade bacteriana obtida pela guavanina 12 foi 30% na décima segunda hora, contra a estirpe de *Salmonella* III, comparada com o controle antibiótico. Entre os oito peptídeos analisados, a guavanina 12 teve um percentual médio de inibição bacteriana de 19% em relação ao controle de antibiótico, Embora tenha apresentado uma atividade antibacteriana, os valores foram muito baixos para ser considerado eficiente. Dados esses que não corroboram com a pesquisa de Cardoso et al. (2014), onde peptídeos de mesma origem tiveram uma atuação antimicrobiana muito eficiente com bactérias Gram-negativas.

Na sequência o peptídeo clavanina A apresentou inibição de 16,4% contra a estirpe de *Salmonella* I, comparado ao controle de antibiótico, porém sua atividade foi cessada após esse horário, chegando na décima segunda hora sem apresentar percentual de inibição. Todavia, contra a estirpe de *Salmonella* II, a clavanina A apresentou 32,3% de inibição, em comparação ao controle antibiótico na mesma concentração. Na estirpe de *Salmonella* III o desempenho da clavanina A foi capaz de inibir 30,6% o crescimento bacteriano na décima segunda hora. Em suma, na avaliação entre as três estirpes de *Salmonella*, a clavanina A apresentou uma média de atividade antibacteriana de 19,5%, na concentração de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, comparada ao antibiótico na mesma concentração.

Os dados apresentados acima corroboram com os de Silva e colaboradores (2015), que relatam que a clavanina A foi eficaz contra bactérias Gram-negativas como a *Salmonella*, apresentando um desempenho superior ao controle antibiótico (gentamicina). Já Silva (2011) destaca que em seu estudo a clavanina A não apresentou atividade hemolítica nas concentrações de 1 a 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, resultado que enquadra a concentração utilizada neste trabalho (64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), o que pode garantir um peptídeo sem atividade hemolítica. Os estudos de Silva (2011) relataram que a clavanina A desestabilizou a bicamada lipídica agindo como detergente semelhante ao modelo carpete. Seus resíduos de glicina promoveram a flexibilidade da estrutura, garantindo um amplo espectro de atuação antibacteriana. Nos testes antibacterianos contra KPC a clavanina A foi eficaz, porém a concentração utilizada foi duas vezes maior que a do presente estudo. A clavanina A estimulou a viabilidade da proliferação celular de citocinas, nas primeiras 24h de células RAW 264,7 (SILVA, 2011).

A guavanina 14 apresentou 14,5% e 14,1% de inibição na atividade antimicrobiana, com 8 h e 12 h, respectivamente, contra a estirpe de *Salmonella* I, na concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, padronizada neste estudo e comparada com o controle antibiótico. A guavanina 14 foi capaz de inibir 17,6% na oitava hora e 34% na décima segunda hora, contra atividade microbiana da estirpe de *Salmonella* II, em comparação ao controle antibiótico. A guavanina 14 se manteve constante em seus resultados, apresentando inibição de 17,8% na oitava hora contra a estirpe de *Salmonella* III, comparada ao antibiótico na mesma concentração ($64 \mu\text{g.mL}^{-1}$), na décima segunda hora a inibição foi de 28,3% contra a *Salmonella* III. Na estirpe de *Salmonella* III, a guavanina 14 foi capaz de inibir em 17,8% a atividade bacteriana na oitava hora, com concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, comparado ao controle antibiótico na mesma concentração e na décima segunda hora a guavanina 14 apresentou 28,3% de atividade antibacteriana com a mesma concentração. Na classificação geral da atividade antibacteriana dos oito peptídeos utilizados, a guavanina 14 ficou classificada em quinto lugar. Em estudos anteriores a atividade antimicrobiana da guavanina 14 foi testada contra *Escherichia coli* e apresentou a concentração de inibição mínima (CIM) de $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$, assim como outros análogos (PORTO,2017).

O quarto peptídeo de maior atividade antibacteriana, foi o PaDBSR1R3F8. O peptídeo PaDBSR1R3F8 apresentou 40,5% inibição na décima segunda hora contra a estirpe de *Salmonella* I, com concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, já na oitava hora a inibição foi de 27,2%, contra a estirpe de *Salmonella* I, comparado ao controle antibiótico na mesma concentração. O peptídeo PaDBSR1R3F8 foi capaz de inibir 26,7% e 42,4%, respectivamente, na oitava e décima segunda hora, o crescimento bacteriano da estirpe de *Salmonella* II, em comparação com o controle antibiótico, ambos com concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O peptídeo PaDBSR1R3F8 foi capaz de inibir 41% na décima segunda hora o crescimento bacteriano contra a estirpe de *Salmonella* III, em igual concentração quando comparado ao antibiótico ($64 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

O peptídeo PaDBS1R2F3 foi capaz de inibir em 22,1% a atividade bacteriana na oitava hora da estirpe de *Salmonella* I, comparado a inibição feita pelo controle antibiótico, diferente da décima segunda hora, onde o peptídeo findou sua atividade e apresentou baixa inibição (0,6%) em comparação ao antibiótico. Na estirpe de *Salmonella* II o peptídeo PaDBS1R2F3 foi capaz de inibir 77,8% contra a estirpe bacteriana na décima segunda hora, em comparação ao controle antibiótico nessa mesma concentração e manteve a alta inibição, sendo esta 76,8%, na décima

segunda hora da estirpe de *Salmonella* III, com a concentração de $64 \mu\text{g mL}^{-1}$, em comparação ao controle antibiótico. O peptídeo PaDBS1R2F3 obteve um bom desempenho entre as três estirpes de *Salmonella*, apresentando inibição de 50,4% em comparação ao antibiótico, ficando classificado como terceiro em desempenho antimicrobiano, apresentando maior atividade antibacteriana entre as estirpes de *Salmonella* II e III.

O peptídeo PcDBS1R3F5 apresentou inibição contra o crescimento bacteriano da estirpe de *Salmonella* I, de 24,8 e 25% nos horários de 8 h e 12 h, respectivamente, ambos na concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, em comparação ao controle antibiótico. A atividade antibacteriana do peptídeo PcDBS1R3F5 foi maior nas estirpes de *Salmonella* II (46,9%) e *Salmonella* III (46,8%). O peptídeo PcDBS1R3F5 foi capaz de inibir o crescimento bacteriano em 50,7% e 46,8% nas leituras de 8 h e 12 h respectivamente, na concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, comparado com a mesma concentração do controle antibiótico. Este peptídeo apresentou um desempenho promissor antibacteriano.

Entretanto, o estudo de Ferre e colaboradores (2006) aponta que alguns dos peptídeos catiônicos apresentaram atividade hemolítica na concentração de $64\mu\text{g.mL}^{-1}$, fato que indica a necessidade da realização do teste hemolítico para certificação do uso dos peptídeos. Após vários bionessaos realizados, o peptídeo que apresentou com maior atividade bacteriana, foi o PaDBS1R3F10, que foi capaz de inibir o crescimento da *Salmonella* I em 75,6% na oitava hora contra, na concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Entretanto, na décima segunda hora, a porcentagem de inibição foi reduzida, sendo esta de 28,9%. Ao realizar a comparação com o controle do antibiótico, este peptídeo apresentou uma inibição média na estirpe de *Salmonella* I de 52%, sendo esta a melhor porcentagem de inibição para esta estirpe bacteriana. Na estirpe de *Salmonella* II, o percentual de inibição do peptídeo PaDBS1R3F10, foi de 52% na oitava hora e 27% na décima segunda hora, comparado a inibição do controle antibiótico de igual concentração. O peptídeo PaDBS1R3F10 foi capaz de inibir 25,4% na décima segunda hora contra a estirpe bacteriana de *Salmonella* III e na oitava hora, e apresentou inibição média de 52% contra a estirpe de *Salmonela* III, comparado ao controle do antibiótico em igual concentração. A média da ação antibacteriana do peptídeo PaDBS1R3F10 entre as três estirpes de *Salmonella* foi de 43,4% de inibição, comparado ao crescimento do controle do antibiótico com igual concentração. Diante dos resultados obtidos foi

possível identificar que o tempo de ação deste peptídeo permaneceu até sua oitava hora, para testes posteriores, seria considerável a utilização de um protocolo de tratamento de 8 em 8h.

Nos estudos de Rodriguez–Hernandez (2006), foi analisada a atividade antibacteriana de peptídeos catiônicos contra isolados clínicos de *Salmonella*. Sendo que seus resultados apontam índices de inibição em uma concentração entre 4-64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Esses dados corroboram com o presente estudo, onde foi utilizada concentração de (64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) para os peptídeos e para os isolados de *Salmonellas*.

Embora nos estudos de Moghaddam e colaboradores (2014), a atividade antibacteriana de um peptídeo catiônico, o CM11, contra isolados clínicos de *Salmonella*, foram efetivas na concentração de 1 e 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com resultado diferente deste estudo onde a concentração utilizada foi com 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ou seja quatro vezes maior. No estudo de Li e colaboradores (2017), foi utilizado como controle antibiótico a ciprofloxacina e o crescimento bacteriano foi determinado após a décima hora. Esses dados não corroboram com os apresentados no presente estudo, onde o mesmo antibiótico foi utilizado como controle, porém analisando em dois horários respectivos, a oitava e décima segunda hora para determinação do crescimento bacteriano. Mesmo diante da diferença do tempo, os dados de Li e colaboradores (2017) corroboram com o fato de que as *Salmonellas* mostraram sobrevivência mesmo depois de tratados com a ciprofloxacina, evidenciando uma possível resistência, que torna necessário estudo de novas opções que haja como antibacterianos como os PAMs.

Alguns peptídeos e também antibióticos podem ter dificuldade em eliminar patógenos intracelulares devido sua permeabilidade fraca, porém ao serem acoplados com outros peptídeos acabam por ter eficácia terapêutica (Li et,al., 2017).

Neste estudo em específico, alguns peptídeos como T11N2 e B6N2, conseguiram aumentar a permeabilidade, bem como a atividade bactericida. Deste modo, os peptídeos T11N2 e B6N2, erradicaram efetivamente a *Salmonella typhimurium* (Li et,al., 2017). Goto e colaboradores (2017), relataram que os peptídeos utilizados [(PagP- ugtL(T230) e PMrA(T141)] foram capazes de inibir em 50% o crescimento bacteriano de *Salmonella*. Este dado corrobora com este trabalho, especialmente por ter utilizado o mesmo protocolo, com mesma temperatura de 37 °C e concentração de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nos estudos de Fusco e colaboradores (2017) foram utilizados dois PAMs, sendo eles β -defensinas 2 (hBD-

2) e a β -defensina 3 (hBD-3). Esses peptídeos podem ser produzidos por células epiteliais, que podem ser capazes de atrair células inflamatórias, como neutrófilos, macrófagos e outros, de modo a mediar a resposta inflamatória, remodelando os tecidos. Os peptídeos hBD-2 e hBD-3 atuaram na microbiota intestinal reduzindo o número de colônias de *Salmonellas*, apontando uma atividade microbicida contra o patógeno, além de, na presença do peptídeos hBD-2 e hBD-3 pode diminuir a resposta inflamatória (FUSCO et, al., 2017). As preocupações com surtos de *Salmonellas* acabam por incitar cientistas em busca de novos antimicrobianos, na tentativa de tornar o alimento mais seguro, ou seja, desenvolvendo ações que possam destruir as cepas de *Salmonella* que contaminam os alimentos, como também tratar de modo eficaz, porém não agressivo o indivíduo já contaminado. Assim como nos estudos de Lu e Wu (2010), onde tomates contaminados com *Salmonella enterides* foram tratados com antimicrobianos naturais (óleo de tomilho e tymol) a 2 mg e houve a redução das bactérias com a vantagem de não causarem alterações no sabor, cor, aroma e qualidade visual dos tomates.

5.2 Análise da formação de biofilme

As estirpes de *Salmonella entérica enterides* apresentaram formação de biofilme e podemos verificar essa atividade dos peptídeos contra a estirpe de *Salmonella* I, II e III na Figura 4.

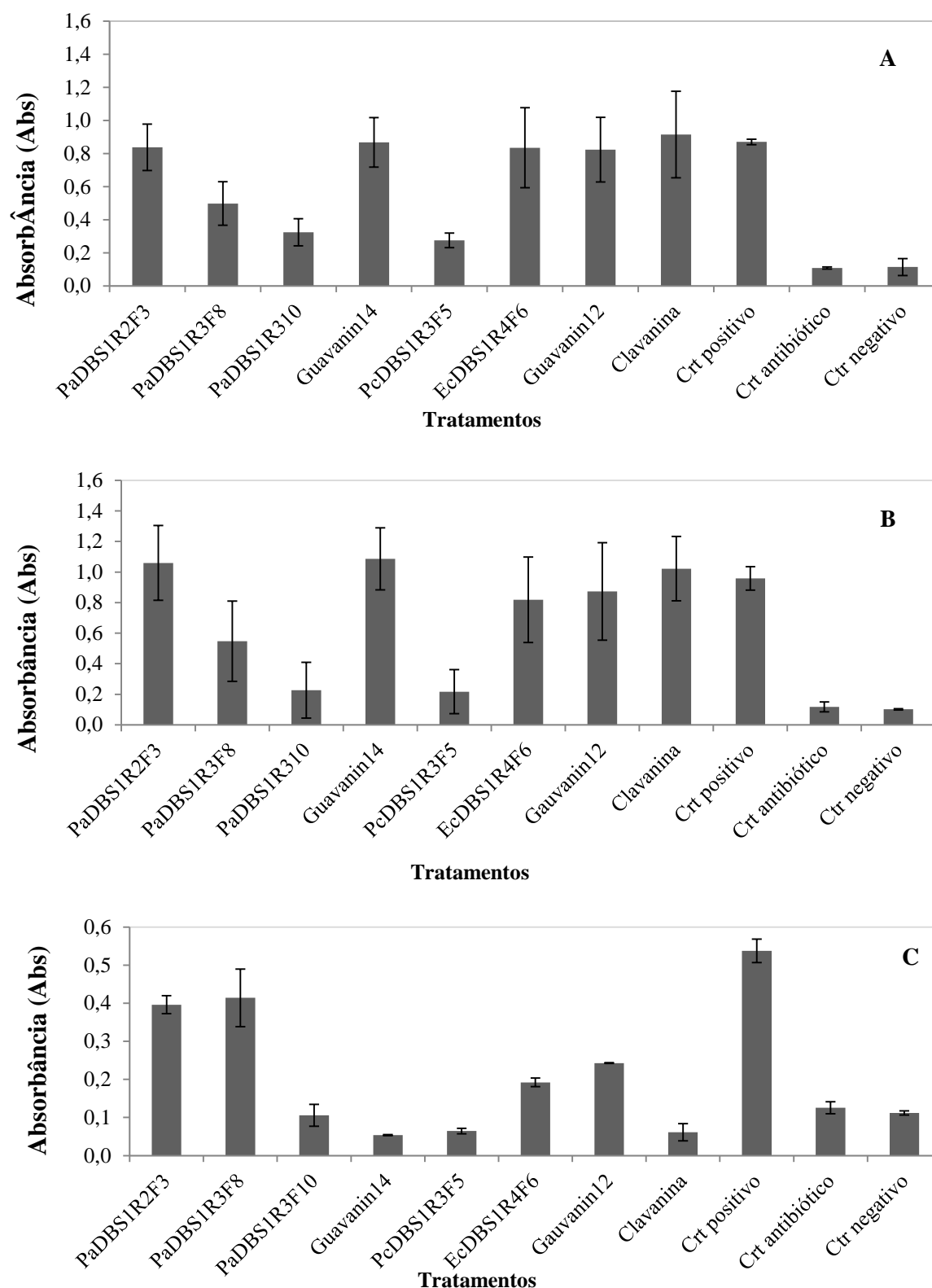


Figura 4: Avaliação da atividade antibiofilme. As amostras de peptídeos foram testadas na concentração $64 \mu\text{g mL}^{-1}$, contra a estirpe de *Salmonella* I (A), II (B) e III (C), as leituras foram realizadas após 24 h, utilizando o comprimento de onda de 595nm, com base nos controles positivo (meio+ bactéria), negativos (meio) e o controle do antibiótico (bactéria + antibiótico ciprofloxacina), para determinar a atividade antibiofilme, expressa em colunas e as barras verticais representam o desvio padrão de cada peptídeo.

Os biofilmes podem ser muito encontrados em indústrias alimentícias, trazendo muitos fatores negativos. Ao atingirem o estágio maduro pode ser de difícil remoção (BERGAMIN et al., 2015).

A clavanina A apresentou a menor porcentagem de inibição para a estirpe da *Salmonella* I (7,7%), usando a concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a mesma concentração foi usada pelo controle positivo. O peptídeo guavanina 14 apresentou 12,3% de inibição a formação de biofilme em comparação 13,2% de inibição a formação de biofilme em comparação ao controle positivo. O peptídeo PaDBS1R2F3 foi capaz de inibir a formação do biofilme em 16,7%, contra a estirpe de *Salmonella* I, na concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, assim como o controle positivo usado para comparação. O peptídeo EcDBS1R4F6 que foi capaz de inibir em 16,9% contra a *Salmonella* I em comparação com o controle positivo, enquanto o peptídeo ao controle positivo. O peptídeo PaDBS1R3F8 foi capaz de inibir a formação de biofilme na estirpe bacteriana da *Salmonella* I em 55,9%, na concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, em comparação ao controle positivo. O antibiótico utilizado neste experimento foi a ciprofloxacina, sendo considerado como controle antibiótico na concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, em todas as três estirpes bacterianas. Destacamos que, contra a estirpe de *Salmonella* I, nenhum peptídeo superou a inibição do antibiótico. O peptídeo PaDBS1R3F10 apresentou 75,83% de inibição a formação de biofilme, na mesma concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que o controle positivo. O peptídeo PcDBS1R4F6 apresentou maior capacidade de inibir o biofilme 81,3%, contra a estirpe de *Salmonella* I, comparado ao controle positivo.

Em relação a atividade antibiofilme dos peptídeos contra a estirpe de *Salmonella* II, pode-se visualizar a partir da Figura 4 (B) a ação antibiofilme dos peptídeos, em ordem crescente, onde os peptídeos PaDBS1R2F3, guavanina 14 e a clavanina não apresentaram inibição contra a estirpe de *Salmonella* II. O peptídeo EcDBS1R4F6 e a guavanina 12 foram capazes de inibir em 25,44 e 19,5% respectivamente, contra a estirpe de *Salmonella* II, em concentrações iguais utilizadas por todo o experimento, de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, comparados com o controle positivo de igual concentração. O peptídeo PaDBS1R3F8, apresentou uma inibição de formação de biofilme de 53% na concentração $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, contra a estirpe de *Salmonella* II, em comparação com o controle positivo de mesma concentração. Os peptídeos. Na sequência o peptídeo PaDBS1R3F10 foi capaz de inibir 86,9% da

formação de biofilme, na concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, contra a *Salmonella* II em comparação ao controle positivo. E o peptídeo que apresentou a maior porcentagem de ação antibiofilme nesta estirpe foi o peptídeo PcDBS1R3F5, que foi capaz de inibir 88% da atividade de formação de biofilme, na concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, contra a estirpe de *Salmonella* II em comparação ao controle positivo.

A atividade antibiofilme dos peptídeos utilizados contra a estirpe de *Salmonella* III pode ser visualizada na Figura 4 (C), onde todos os peptídeos apresentaram atividade antibiofilme. O PaDBS1R3F8 apresentou inibição de 43,8% contra a estirpe de *Salmonella* III, na mesma concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, comparado ao controle positivo. O peptídeo PaDBS1R2F3 ocupou a sétima posição na classificação de inibidores antibiofilme com 47,2% de inibição contra a *Salmonella* III. O peptídeo guavanina 12 apresentou 75,6% de inibição a formação de biofilmes na concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo esta a mesma concentração do controle positivo. O peptídeo EcDBS1R4F6 apresentou 85,1% de inibição contra a estirpe de *Salmonella* III, na concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, em comparação ao controle positivo. Esse dado corrobora com Santos, 2017 que relata que este peptídeo apresentou atividade específica antibiofilme, podendo ser utilizado na prevenção de infecções por biofilme. O peptídeo PaDBS1R3F10 foi capaz de inibir o crescimento de células formadoras de biofilme em porcentagem equivalente ao controle do antibiótico, ambos na concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em comparação ao crescimento positivo. O destaque ficou para os peptídeos guavanina 14, clavanina, PcDBS1R3F5 que apresentaram percentual de inibição superior ao antibiótico ciprofloxacina, caracterizando estes peptídeos como muito promissores para uso em compostos bioativos de função antibiofilme.

Os biofilmes tendem a ter diminuição a ação de antibióticos, que podem ser por resistência (permitindo que as bactérias cresçam e se tornem mais fortes) ou tolerância que impede o crescimento bacteriano diante do antibiótico, sem causar dano ou morte a estas células) (SANTOS, 2017) Estudos como de Nesparteck (2014), apontam que isolados de *Klebsiella pneumoniae carbapemase* (KPC) tiveram um aumento de seis vezes na resistência quando cultivados em biofilme. Vários estudos apontam que o biofilme terá melhor formação em meio de cultura com privação de nutrientes, sendo o estresse, o causador da limitação responsável pelo sucesso de formação do biofilme (CARVALHO, 2018). Nesse estudo usamos o meio BM2 para observação de crescimento de biofilmes e este meio de cultura é

considerado pobre em nutrientes, o que parece ter contribuído com resultados positivo para o crescimento de biofilme de *Salmonella*. No estudo de Santos, 2017 o peptídeo EcDBS1R4F6 catiônico, apresentou atividade seletiva na prevenção do biofilme de bactérias multirresistentes (KPC) este peptídeo bioinspirado apresentou estrutura instável em meio hidrofílico e também não hemolítico à concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o que o aponta como uma alternativa promissora e segura para utilização como antibiótico em casos clínicos.

Segundo Reffuveille e colaboradores (2014), o uso de antibióticos em infecções causadas por biofilme de *Salmonellas*, não obteve sucesso, pois o antibiótico não induziu a morte das células formadoras de biofilme. Já com o uso de um peptídeo catiônico, o peptídeo1018, associado ao antibiótico (em menor dose), não só foi eficaz contra a célula formadora do biofilme, como também destruiu o biofilme maduro. Os dados de Reffuveille e colaboradores (2014), corroboram com este estudo, pois a atuação do controle antibiótico também não foi capaz de impedir a formação do biofilme e ainda pode ser possível a realização de testes posteriores com uso associado de peptídeos com antibióticos que findem na apoptose celular. Segundo Mataraci e colaboradores (2012), o uso de uma combinação de antibióticos e PAMs pode aumentar rapidamente a atividade antibacteriana e ainda pode atrasar a o aparecimento da resistência. No estudo de Li e colaboradores (2018), a atividade antibacteriana de um peptídeo marinho (N2) contra *S. typhimurium* foi melhorada por conjugação de peptídeos penetrantes de célula (BLFcin6 e Tat11). Esse estudo apontou que quando comparado a atividade bactericida do N2 sozinho, o conjugado foi capaz de aumentar a atividade antibacteriana dos peptídeos T11N2 e B6N2, tornando ambos mais eficaz e candidatos para novos agentes antibacterianos no tratamento da *Salmonella*.

Peptídeos antibiofilme podem parecer bioquimicamente semelhantes aos PAMs utilizado em células planctônicas, mas em geral podem ser específicos para o combate ao biofilme, com características particulares na ação diante o biofilme (FUENTE-NUÑEZ, et al, 2015). Dados esses que corroboram com o presente estudo, pois a atuação dos peptídeos catiônicos foram mais eficazes contra biofilmes do que contra as células planctônicas (OVERHAGE, 2008).

Peptídeos podem atuar junto com antibióticos com o intuito de melhorar a eficácia terapêutica contra microrganismos multirresistentes contra formação de biofilmes e neste estudo foi possível ver a atuação do peptídeo pode inibir o biofilme

mais que o antibiótico. Nos estudos de Makovcova e colaboradores (2017) com patógenos de origem alimentar, foram cultivados biofilmes de *Salmonellas* em conjunto com *Staphylococcus aureus* e constatou-se que bactérias Gram-negativas tem propensão moderada a agregação com outras bactérias. Essas duas bactérias (*S. aureus* e *Salmonellas*) tem sido os maiores responsáveis por intoxicação alimentar, o biofilme polimicrobiano pode apresentar uma cooperação metabólica, permitindo que as bactérias se comuniquem e façam interações entre elas, sendo capazes de formar um sistema organizado onde a troca de nutrientes e resíduos pode ser feita em canais de águas.

Com o aumento do tempo de incubação foi possível verificar que as conexões célula a célula, eram estabelecidas e a matriz EPS podia ser visualizada, mesmo assim a competição existente entre os biofilmes polibacterianos continua a ocorrer podendo apresentar biofilmes menos espessos e consistentes que dos biofilmes monobactérias, apontando que no estudo feito pode ser possível identificar que biofilmes de uma só bactéria podem ser mais eficaz (Makovcova et al., 2017).

Outra preocupação citada em diversos estudos, relacionam que a *Salmonella* pode usar plantas como um hospedeiro alternativo, com virulência diversa e de grande importância clínica, associando problemas de segurança alimentar a produtos que comumente não eram associados a surtos de salmonelose. Isolados bacterianos colhidos nessas plantas foram capazes de invadir e replicar com eficácia nas células epiteliais da microbiota humana (VERMA et al., 2018).

O presente estudo experimental pôde mostrar a capacidade que os peptídeos podem reduzir a formação de biofilme causada pela *Salmonella*, bem como melhorar a atividade da microbiota intestinal, de modo a aumentar a resposta benéfica do organismo (FUSCO et al., 2017). Estudos cada vez mais aprofundados sobre as relações, estruturas e funções dos peptídeos, mostram quão atrativo podem ser o desenvolvimento de novos fármacos, fazendo surgir peptídeos mais seguros com tamanhos reduzidos, maior eficácia e com alta afinidade ao seu alvo, conseguindo dessa forma, uma diminuição de efeitos colaterais (CARDOSO et al., 2014).

Segundo Marquez e colaboradores (2018), vinte e uma cepas de *Salmonellas* provenientes de cascas de ovos, foram testadas contra vários antimicrobianos, com o objetivo de correlacionar com o aumento da resistência

bacteriana. Deste modo, foi possível identificar uma correlação positiva a resistência a alguns antibióticos (ciprofloxacina com carvacol e cefotaxamina), assim como em PAMs, entre eles os peptídeos catiônicos polimixina B e combinações de lizosima-EDTA.

Ademais, gerar novos antimicrobianos será imprescindível para combater o aumento da tolerância a antibióticos, de modo a garantir um alimento seguro.

O desenvolvimento de outros produtos como sanitizantes e detergentes, compostos por PAMs em sua formulação, pode ser a evolução no processo de limpeza de locais seguros de produção de alimentos, pois os PAMs poderão interagir com a superfície, deste modo, evitando a agregação do patógeno, bem como a eliminação das bactérias que possam desenvolver o biofilme.

6 CONCLUSÕES

Todos os peptídeos testados apresentaram alguma atividade antibacteriana contra os isolados clínicos de *Salmonella*. Os peptídeos PcDBS1R3F5 e PaDBS1R3F10 apresentaram atividade antibacteriana nas três estirpes de *Salmonella*.

Neste trabalho os peptídeos testados apresentaram um potencial antibiofilme e que atuaram positivamente nas três estirpes de *Salmonella*.

Os peptídeos que obtiveram maior atividade antibiofilme entre as três estirpes de *Salmonella*, foram os peptídeos PcDBS1R3F5 e o PaDBS1R3F10. Desempenho promissor para utilização em produtos bioativos.

7. REFERÊNCIAS

- ALVES, A.R.F. Doenças alimentares de origem bacteriana, (tese mestrado), **Universidade Fernando Pessoa** – Portugal, 2012
- ÂNGULO, F.J.; COLLINGNON,P.; POWERS,J.H.; KANE, T.M.C.A.; ARESTRUP, F.M. World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies for the Use of Antimicrobials in Food Production Animals. **Clinical Infectious Diseases**, v 49, nº.1, 2009.
- ARCIOLA, Carla Renata et al. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 5967-5982, 2012.
- ARNEDO PENA, A.; VIVAS-FORNAS,I.; MESEGUER-FERRER,N., TIRADO-BALAGUER,M.D.; YAGÜE-MUÑOZ,A.; HERRERA-LEÓN,S., SABATER-VIDAL,S., ROMEU-GARCÍA M.A., VIZCAINO BATLLÉS, A., BELLIDO-BLASCO,J.B., MORENO-MUÑOZ,R.; Comparison of sporadic cases of *Salmonella* Typhimurium with other *Salmonella* serotypes in Castellon (Spain): case-case study . **Enfermedades Infecciosas e Microbiologia Clínica-ELSEVIER**, España v.08 nº008, 2017
- BISCOLA, F. T. Pesquisa da formação de biofilme em amostras de *Escherichia coli* produtoras de toxina shiga. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – **Escola Paulista de Medicina**, Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2009.
- BOREWICZ, K.A.; KIM,H.B.; SINGER,R.S.; GEBHART,C.J.; SCREEVATSAN,S.; JOHNSON,T.; ISAACSON,R.; Changes in the Porcine Intestinal Microbiome in Response to Infection with *Salmonella enterica* and *Lawsonia intracellularis*. **Plos One**, v.10, nº10, 2015
- BROGDEN, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 238-250. 2005
- BUHLER, H.F., IGNOTTI,E., NEVES,S.M.A.S., HACON,S.S. Análise espacial de indicadores integrados determinantes da mortalidade por diarreia aguda em crianças menores de 1 ano em regiões geográficas, **Ciência & Saúde Coletiva**, v.19 nº10, pag:4131-4140, 2014.
- CAMERON, D.; HOCK, Q.S.; KANDIM, M.; MOHAN. N.; RYOO, E.; SANDHU, B.; YAMASHIRO, Y.; JIE, C.; HOESKTRA, H.; GUARINO, A. Probiotics for gastrointestinal disorders: Proposed recommendations for children of the Asia-Pacific region. **World Journal Gastroenterology**, v. 23, nº. 45, 2017.
- CARDOSO, Marlon Henrique. Caracterização funcional e estrutural de um peptídeo rico em alanina (*Pa-MAP 1.9*) derivado de *Pleuronectes americanus*. 2014. Monografia apresentada ao Curso de Ciências biológicas, Universidade Católica de Brasília, 2014

CARVALHO, E.V.B. Avaliação da Atividade Antibiofilme do Peptídeo Pa-MAP 1.9 Frente a Cepas de *Klebsiella pneumoniae* Resistentes a Carbapenemases,(Dissertação de mestrado), **UCDB**, 2018

DE LUSIGNAN S, SHINNEMAN S, YONOVA I, VAN J VLYMEN, ELLIOT AJ, BOLTON F, SMITH GE, O'BRIEN S An Ontology to Improve Transparency in Case Definition and Increase Case Finding of Infectious Intestinal Disease: Database Study in English General Practice, **JMIR- Medical Informatics**; v.5 nº3, 2017

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE CONTROL, 2012. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2012.**Journal European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)**, v.10, nº 3, 2012;

FATICA, M.K.,SCHENEIDER,K.R. *Salmonella* and produce: Survival in the plant environment and implications in food safety, **Journal Virulence**, v 02, nº6, 2011

FJELL, C.D., HISS,J.A., HANCOOCK, R.E.W., SCHNEIDER,G., Designing antimicrobial peptides: form follows function, **Nature reviews-drug discovery**, vol 11,nº 2, 2012

FRANCO, O.L. Peptide promiscuity: an evolutionary concept for plant defense. **FEBS Letters**, v. 585, nº 7, p. 995-1000. 2011

FUENTE-NUÑEZ,C.,REFFUVEILLE, F.,HANEY,E.F., STRAUS, S.K., HANCOCK, R.E.W., Broad-Spectrum Anti-biofilm Peptide That Targets a Cellular Stress Response, **Plos Pathogens**, v.10, nº5, 2014

FUSCO.A; SAVIO,V. , CAMMAROTA, M.; ALFANO,A. , SCHIRALDI,C and DONNARUMMA ,C; Beta-Defensin-2 and Beta-Defensin-3 Reduce Intestinal Damage Caused by *Salmonella typhimurium* Modulating the Expression of Cytokines and Enhancing the Probiotic Activity of *Enterococcus faecium*. **Imunology Res**, 2017

GONÇALVES, M.A.P.,Microbiota- implicações na imunidade e no metabolismo, (Dissertação de mestrado), **Universidade Fernando Pessoa/Portugal**, 2014

GREKO,C. Discussion paper on the use of third and fourth generation cephalosporins in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health, **Journal of Pharmacology and Therapeutics**, v. 32, nº6, p.515-536, 2009.

GUILHELMELLI, F.; VILELA, N; Albuquerque,P.; DERENGOWSKI, L.S.;PEREIRA, I.S.;KYAW, C.M. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers Spotlight Award Microbiol.** V. 4, nº 353, 2013.

GIBANI,M.;TheTyphoid Vaccine Acceleration Consortium (TyVAC): Vaccineeffective ness study designs: Accelerating the introduction of typhoid njugate vaccines and

reducing the global burden of enteric fever. Oxford, UK. **Vaccine**. V.12 n°35, p.5081-5088, 2017

GUPTA,K.,GHUMAN,H.S., HANDA,S.V., Review of Rifaximin: Latest Treatment Frontier for Irritable Bowel Syndrome Mechanism of Action and Clinical Profile. **Clinical Medicine Insights: Gastroenterology**, V. 10 n° 6, 2017

HAO,G.,ZHANG,S.,STOVER,E. Transgenic expression of antimicrobial peptide D2A21 confers resistance to diseases incited by *Pseudomonas Syringae* pv. *Tabaci* and *Xanthomonas citri*, but not *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plos One**, v. 12 n°10, 2017.

HEITHOFF, D.M.; SHIMP,W.R.;HOUSE,J.K.; XIE,Y.;WEIMER, B.C.; SINSHEIMER, R.L.; MAHAN,M. J. Intraspecies Variation in the Emergence of Hyperinfectious Bacterial Strains in Nature. **Journal Plos**, v.8, n°4, 2012

HUANG,H.C., VLASLOVA,A.N., KUMAR,A., KANDASAMY,S., FISHER,D.D., DEBLAIS,L., PAIM,F.C., LANGEL,S.N., ALHAMO,M.A., RAUF,A., SHAO,L. SAIF,L.J., RAJASHEKARA,G. Effect of antibiotic, Probiotic, and human rotavirus infection on colonisation dynamics of defined commensal microbiota in a gnotobiotic pig model, **Beneficial Microbes Wageningen Academic Publishers**, v.9, n°1, p. 71-86, 2018

KANG,S.J., PARK,S.J.; MISHIG-OCHIR,T.AND LEE,B.J. Antimicrobial peptides: therapeutic potentials. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. V.12, n°12, p.1477–1486, 2014.

KAWAKAMI,V.M.; BOTTICCHIO,L.; ANGELO,K.; LINTON,N; KISSLER,B; BASLER,C; LLOYD,J.; INOUE,W.; GONZALES,E.; RIETBERG,K.; MELIUS, B.; OLTEAN,H. ; WISE,M.; SINATRA,J.; MARSLAND,P.; LI,Z.; MEEK,R.; KAY,M; DUCHIN,J.; LINDQUIST, Outbreak of Multidrug-Resistant *Salmonella* Infections Linked to Pork — Washington. **Seminal report on morbidity and mortality** , v.65, n°14, p.379-381, 2016

KOTTWITZ,B.M.; OLIVEIRA,L.R.M.; ALCOCER,T.C.; FARAH,I.S.S.; ABRAHÃO,S.M.S.M.; DALIA,W.P.R.; Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, **Brasil Acta Scientiarum. Health Sciences**, vol. 32, n. 1, 2010, pp. 9-15 Universidade Estadual de Maringá, Brasil, 2010.

KONINGSTEIN,M.,SIMONSEN,J., HELMS, M., MØLBAK, K. The interaction between prior antimicrobial drug exposure and resistance in human *Salmonella* infections. **Journal Antimicrobial Chemother.** V.65 n.8 p.1819-25, 2010.

KANG,H.K.; KIM,C; SEO,C.H. AND PARK,Y. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. **Journal of Microbiology**. Vol. 55, No. 1, pp. 1–12, 2017

LEONG,K.S.; DERRAIK, J.G., HOFMAN, P.L. , CUTFIELD, W.S. Antibiotics, gut microbiome, and obesity. **Clinical Endocrinology**. v.88, n.2, 2017

LI, Z.; WANG,X.; TENG,D.; MAO,R.; HAO,Y.; YANG,N.; CHEN,H.; WANG.X. and WANG,J. Improved antibacterial activity of a N2-marine peptide against intracellular *Salmonella typhimurium* by conjugation with penetrant peptides from BLFcin6 / Tat11 cells. **European medical clinic journal**, v.14, n.5, p. 263-272, 2017

LIMA, L.A.Prospecção e purificação de peptídeos com atividade antibiótica partir de corais da costa brasileira. Dissertação de mestrado, **Universidade Católica de Brasília**, 2012

Lopes de Oliveira,R.K., Oliveira,S.B., Bezerra,B.C., Nascimento,J.N.; da Silva, M. J., Sousa,M.F.M., Silva,J.E., Influência de condições socioeconômicas e conhecimentos maternos na autoeficácia para prevenção da diarreia infantil.Escola Anna Nery **Revista de Enfermagem**, v.21, 2017

LU,Y. and WU,C. Reduction of *Salmonella enterica* Contamination on Grape Tomatoes by Washing with Thyme Oil, Thymol, and Carvacrol as Compared with Chlorine Treatment. *Journal of Food Protection*., Vol. 73, No. 12, pp. 2270-2275. December 2010

.

MADIGAN,M.T., MARTINKO,J.M.,DUNLAP,P.V., CLARK, D.P., MADIGAN, Michael T. et al. *Microbiologia de Brock*. Porto Alegre: **Ed.ArtMed**, 2010

MARIA-NETO, S.,CANDIDO, E.S., RODRIGUES,D.R..SOUSA, D.A., SILVA, E.M.,MORAES, L.M.P.,OTERO-GONZALEZ, A.J., MAGALHÃES,B.S., DIAS, S.C. e FRANCO,O.L., Deciphering the magainin resistance process of *Escherichia coli* strains in light of the cytosolic proteome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p.1714-1724, 2012.

MÁRQUEZ, M.L.F.; BURGOS, M.J.G.; PULIDO,R.P., GÁLVEZ, A., LÓPEZ, R.L.. Correlations among Resistances to Different Antimicrobial Compounds in *Salmonella* Strains from Hen Eggshells. **Journal Food Protection**. v;81(2):178-185, 2018

MOREIRA,G.N., REZENDE, C.S.M. , CARVALHO,R.N. , MESQUITA,S.Q.P. , OLIVEIRA, A.N. , ARRUDA,M.L.T. Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.67, n °2, p: 126-130, 2008

MURRAY,P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFAUER,M.A. *Microbiologia médica*. España: **Elsevier**. 2014

NGUYEN,L.T.; HANEY, E.F.;VOGEL,H.J. The expanding scopet of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends Biothechnol**, v.29,n.9, p464-72, 2011

NOGUEIRA, A.M.S.; PEREIRA, F.G.B.; BELCHIOR, L.G.; FREITAS, L.C.S.; BUENO, S.M.; MUSSI, S.F.M.R., Estudo da eficiência de antibióticos contra bactérias patogênicas, **Revista científica das Universidades dos Grandes Lagos (UNILAGO)**, jul, 2015

OVERHAGE, J., CAMPISANO, A., BAINS, M., TORFS, E.C.W., REHM, B.H.A. e HANCOOCK, R.E.W., Human Host Defense Peptide LL-37 Prevents Bacterial Biofilm Formation, **Infection and immunity**, v.76, n.9, 2008

PORTO, W.F., Gramatical e Joker duas novas ferramentas para desenho racional de peptídeos antimicrobianos, Dissertação de mestrado **Universidade Católica de Brasília (UCB)**, 2013

PORTYKUS, K.; CASHEL, M. (p)ppGpp: still magical? **Annu Review Microbiology**; v.62 n.35, 2008

RIBEIRO, A.M.C. e CARRASCO, L.D.M. Novel Formulations for Antimicrobial Peptides, **Internacional Journal of molecular sciences**, v.15, n.10, p:18040-18083, 2014

ROCHA, D.P.; PINTO, G.F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C.A. e GUERRA, W. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, Vol. 34, n.1, p: 111-118, 2011

SALERNO-GONÇALVES, R., TETTELIN, H.; LOU, D.; STEINER, S.; REZWANUL, T.; GUO, Q.W.D.; NENE, V.; SZTEIN, M.B. Use of a novel antigen expressing system to study the Salmonella enterica serovar Typhi protein recognition by T cells. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.5 n.11, 2017

SANTOS, V.P.M. Avaliação da Atividade Antibiofilme do Peptídeo Catiônico PCDAMP-5 Contra *Klebsiella pneumoniae* Multirresistente a Antibiótico, (Dissertação de mestrado) UCDB, 2017

SEKIROV, I.; RUSSELL, S.L.; ANTUNES, L.C.; FINLAY, B.B. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**. V.90, nº3, p:859-904, 2010.

SHU-KEE, E.; PUSPARAJAH, P.; SYAKIMA, N.; MUTALIB, A.B., HOOI-LENG, S., KOK-GAN, C.; LEARN-HAN, L. Salmonella: review on pathogenesis, epidemiology and resistance to antibiotics. **Frontiers in Life Science**. V.8, nº. 3, 2015.

SILVA, O.N. et al. Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1-14. 2011

SILVA, O.N.; FENSTERSEIFER, I.C.M.; RODRIGUES, E.A.; HOLANDA, H.H.S.; NOVAES, N.R.F.; CUNHA, J.P.A.; REZENDE, T.M.B.; MAGALHÃES, K.G.; MORENO, S.E.; JERÔNIMO, M.; BOCCA, A.L. and FRANCO, L.O. Clavanin A Improves Outcome of Complications from Different Bacterial Infections, **Antimicrob Agents Chemother**. V.59, n.3, p: 1620–1626, 2015.

SOUSA, J. C. F.; PEIXE, L. V. Antibióticos Antibacterianos. In: Ferreira, W. F.C.; Sousa, J. C. F e Lima, N. **Microbiologia**, Ed. Lidel, v.1, p. 453-469, 2010.

VAN KAN, E.J.; DEMEL,R.A.; VAN DER BENT, A., DE KRUIJFF,B. The role of the abundant phenylalanines in the mode of action of the antimicrobial peptide clavanin. **Biochim Biophys Acta**. V.2; n.1615, p:84-92, 2003

VERMA, P.;SAHARA,V.V.; NIMESH,S.; SINGH, A.P.; Phenotypic and virulence traits of strains of E. coli and Salmonella isolated from vegetables and fruits from India. *Appl Microbiology*, 2018

VICTORA, C.G. Diarrhea mortality: what can the world learn from Brazil? **Jornal de Pediatria** - Vol. 85, Nº 1, 2009

VOGT, S.L.; FINLAY,B.B. Intestinal microbiota-mediated protection against diarrheal infections. **Journal Travel medical**, v.24, n.1, 2017.

WALKER, C.L.F.; PERIN, J.; ARYEE,M.J.; PINTO,C.B. and BLACK,R.E. Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review, **BMC Public Health**, v.12, n.220, 2012

YURIST-DOUTSCH,S.; ARRIETTA,M.C.; VOGT,S.L.;FINLAY,B.B. Gastrointestinal microbiota-mediated control of enteric pathogens. **Anual Review Genetic**. v.48, n.361, 2014.