



---

## SÍNTESE DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS PARA A INCORPORAÇÃO EM EMBALAGENS DE ALIMENTOS

---

Marcelo P. Bemquerer\*; Mariana T. Quezado de Magalhães; Maura V. Prates e Carlos Bloch Júnior\*

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

\*cbloch@cenargen.embrapa.br

\*mpbemque@cenargen.embrapa.br

**Projeto Componente:** PC3    **Plano de Ação:** 01.05.1.01.03.03

---

### Resumo

O interesse pelos peptídeos antimicrobianos tem crescido significativamente na medida em que diversas bactérias têm-se tornado resistentes a antibióticos clássicos. A aplicabilidade desses peptídeos também tem despertado interesse em áreas variadas, tais como a produção de plantas transgênicas para expressá-los e a aplicação em indústria de alimentos como conservantes ou como aditivos de embalagens. A maior parte dos peptídeos antimicrobianos causa um tipo de perturbação na membrana bacteriana, que leva à lise e à morte celular. Como os peptídeos antimicrobianos possuem uma cadeia relativamente curta, eles podem ser obtidos por síntese química. Em uma etapa inicial da obtenção de nanoestruturas de peptídeos antimicrobianos, os peptídeos H-GILEAIKAIKAAG-NH<sub>2</sub>, H-FFFDTLKNLAGKVIGALT-NH<sub>2</sub> e H-FFSMIPKIATGIASLVKNL-NH<sub>2</sub> foram sintetizados pelo método da fase sólida, purificados por cromatografia de fase reversa e caracterizados por espectrometria de massa.

**Palavras-chave:** Síntese de peptídeos, Peptídeos antimicrobianos, Bionanotecnologia.

---

### Introdução

Peptídeos antimicrobianos são uma ferramenta importante da defesa de animais, plantas e outras bactérias contra microorganismos e patógenos<sup>1, 2</sup>. Uma importante fonte de peptídeos antimicrobianos é a secreção da pele de anfíbios<sup>3</sup>. Uma grande diversidade estrutural e funcional de peptídeos antimicrobianos é secretada em pele de anfíbios<sup>4</sup>. É importante ainda destacar que aplicações terapêuticas de peptídeos antimicrobianos originalmente secretados em peles de anfíbios têm sido propostas<sup>5</sup>.

Uma aplicação importante, que envolve o campo da bionanotecnologia, é a incorporação de peptídeos antimicrobianos a embalagens de alimentos, com o objetivo de reduzir o risco de

contaminação microbiana do produto e da própria embalagem, assim como aumentar o tempo de prateleira do produto<sup>6</sup>.

Para algumas dessas aplicações é necessária a utilização de peptídeos sintéticos ou de peptídeos obtidos por expressão heteróloga<sup>7</sup>. A síntese em fase sólida é atualmente o método de escolha para a produção de peptídeos de cinco a trinta resíduos de aminoácidos, na escala de miligramas ou gramas. A síntese inicia-se no resíduo C-terminal, que é ligado ao suporte sólido, e prossegue até o último resíduo N-terminal. Embora o custo da síntese em fase sólida ainda seja relativamente elevado, a produção de vários peptídeos sintéticos na escala de toneladas tem sido relatada<sup>8</sup>. Uma vantagem da síntese em fase sólida é que se pode, por exemplo, investigar a atividade

antimicrobiana de peptídeos ligados à própria resina utilizada para a síntese <sup>6</sup>, normalmente um co-polímero de poliestireno e divinilbenzeno que pode ainda ser modificado com polietilenoglicol <sup>9</sup>.

O desenvolvimento de nanoestruturas contendo peptídeos sintéticos pode, portanto, ser uma estratégia valiosa para a criação de novos materiais poliméricos com atividade antimicrobiana, cuja aplicação comercial dependerá de avanços que já estão ocorrendo na produção de peptídeos em grande escala <sup>8</sup>.

Como uma estratégia inicial para a inserção na Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, a Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia implementou a tecnologia de síntese de peptídeos para a incorporação em nanoestruturas metálicas por meio de ligação covalente ou em partículas vítreas por meio de encapsulamento.

## Material e métodos

Os peptídeos antimicrobianos, cujas seqüências estão mostradas na Tabela 1, foram sintetizados manualmente pela técnica da fase sólida <sup>9</sup> por meio da estratégia química Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonila). Os acoplamentos foram conduzidos com *N,N'*-diisopropiletilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazola (DIC/HOBt) durante 2-3h utilizando-se *N,N*-dimetilformamida (DMF) como solvente. A desproteção do grupo Fmoc foi realizada com uma solução de piperidina a 20% em DMF durante 30min. A clivagem e a desproteção final foram conduzidas com ácido trifluoroacético (TFA) a 90% em volume na presença de sequestradores de carbocátions (água, tioanisol e triisopropilsilano). Os produtos sintetizados foram purificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) e a identidade e a pureza foram confirmadas por espectrometria de massa (MALDI-ToF-ToF, Bruker Ultraflex 2).

Tabela 1. Seqüências e massas moleculares  $[M+H]^+$  dos peptídeos antimicrobianos sintetizados.

Seqüência	$[M+H]^+$
H-GILEAIKAIKAAG-NH <sub>2</sub>	1324,9
H-FFFDTLKKNLAGKVIGALT-NH <sub>2</sub>	1954,2
H-FFSMIPKIATGIASLVKNL-NH <sub>2</sub>	2049,2

## Resultados e discussão

Peptídeos antimicrobianos podem ser ferramentas importantes para diversas aplicações biotecnológicas. Na área de nanobiotecnologia, tais moléculas podem ser incorporadas em embalagens de alimentos.

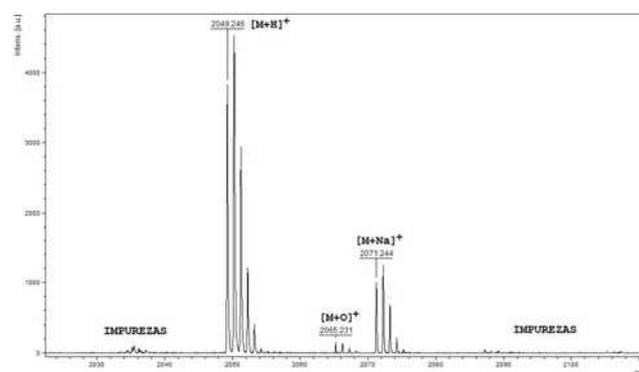
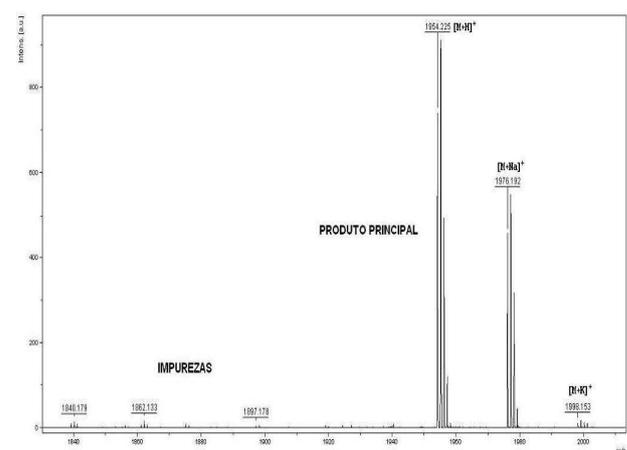
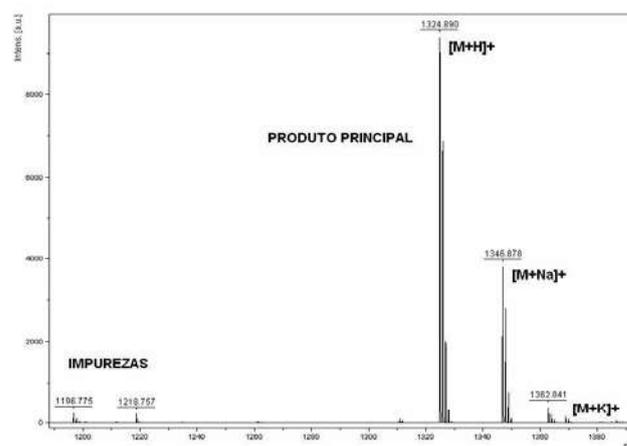


Figura 1. Espetro de massa dos peptídeos sintéticos apresentados na Tabela 1, antes da purificação.

Com o objetivo de obter peptídeos antimicrobianos para a incorporação em partículas vítreas ou em nanopartículas de alumina, a tecnologia para síntese de peptídeos em fase sólida foi implementada na EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia. Foram sintetizados e caracterizados por espectrometria de massa os peptídeos apresentados na Tabela 1. Os três produtos foram obtidos com grau elevado de pureza, conforme mostra a análise dos espectros de massa dos mesmos (Figura 1). Os peptídeos brutos foram analisados por cromatografia de fase reversa. A Figura 2 mostra o cromatograma analítico do peptídeo H-GILEAIKAIKAAG-NH<sub>2</sub> e a Figura 3 mostra a confirmação de sua seqüência por espectrometria de massa *in tandem* (MALDI-ToF-ToF). Os resultados foram semelhantes para os outros dois peptídeos, sendo que o produto principal do cromatograma analítico sempre correspondeu ao peptídeo esperado, cuja seqüência foi confirmada por espectrometria de massa (MALDI-ToF-ToF).

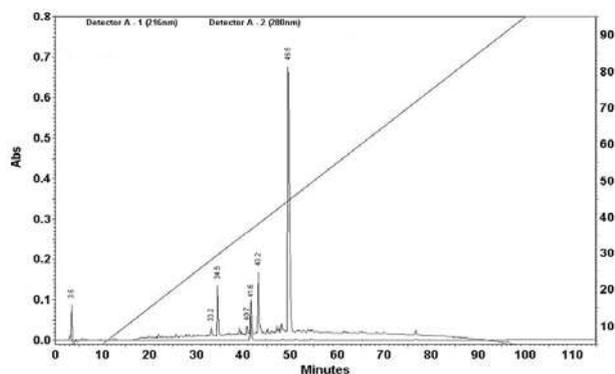


Figura 2. Cromatograma analítico do peptídeo sintético bruto H-GILEAIKAIKAAG-NH<sub>2</sub>. O traço rosa indica a concentração de acetonitrila.

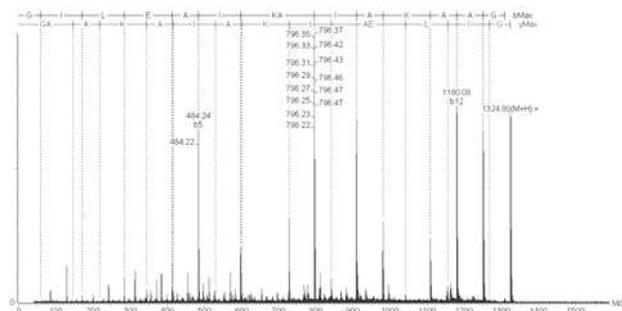


Figura 3. Espectro de massa de seqüenciamento do peptídeo purificado H-GILEAIKAIKAAG-NH<sub>2</sub>.

## Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a primeira etapa da produção de materiais nanoestruturados contendo peptídeos antimicrobianos, que é a obtenção das biomoléculas sintéticas com pureza elevada (superior a 95%), foi alcançada.

## Referências

- ZASLOFF, M. **Nature**, [S. l.], V. 415, P. 389-395, 2002.
- HANCOCK, R. E. W, SAHL, H-G. **Nature Biotechnol.**, [S. l.], V. 24, P. 1551-1557, 2006.
- PRATES, M. V.; SFORÇA, M. L.; REGIS, W. C. B.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; PERTINHEZ, T. A.; ARAÚJO, A. L. T.; AZEVEDO, R. B.; SPISNI, A.; BLOCH Jr., C. J. **Biol. Chem.**, [S. l.], v. 279, p. 13018-13026-, 2004.
- Pukala, T. L.; Bowie, J. H.; Maselli, V. M.; Musgrave, I. F.; Tyler, M. J. **Nat. Prod. Rep.**, [S. l.], V. 23, P. 368-393, 2006.
- CONLON, J. M.; AL-GHAFFER, N.; ABRAHAM, B. J. **Leprince. Methods**, [S. l.], V. 42, P. 349-357, 2007.
- APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, [S. l.], V. 3, P. 113-126, 2002.
- INGHAM, A. B.; MOORE, R. J. **Biotechnol Appl Biochem.**, [S. l.], v. 47, p. 1-9, 2007.
- BRUCKDORFER, T.; MARDER, O.; ALBERICIO, F. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, [S. l.], v. 5, p. 29-43, 2004.
- CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 2000.