

ARTIGO ORIGINAL

# Avaliação *in vitro* de atividade antimicrobiana de peptídeos anfipáticos derivados de proteínas do soro de leite

*In vitro evaluation of antimicrobial activity of amphipathic peptides derived from whey proteins*

Jessica Audrey Feijó Corrêa<sup>1</sup>, Chibuikwe Udenigwe<sup>2</sup>, Fernando Bittencourt Luciano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR, Brasil

<sup>2</sup> Faculty of Health Sciences, University of Ottawa (uOttawa), Ottawa, ON, Canada

## Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana de peptídeos anfipáticos derivados de proteínas do soro de leite contra importantes microrganismos patogênicos e toxigênicos. Para isto, foram testados dois peptídeos de 16 e 6 aminoácidos, de sequências HQPHQLPPTVMFPPQ e KIPAVF respectivamente, frente às bactérias *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, e frente aos fungos *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium verticillioides* e *Fusarium graminearum*. Buscou-se determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos dois peptídeos contra os microrganismos utilizando o método de microdiluição em placas de 96 poços. Foram testadas doses de até 5000 mg.L<sup>-1</sup> de cada peptídeo, contudo, não foi possível determinar suas CIMs frente aos patógenos e contaminantes testados. Analisando trabalhos similares com peptídeos e/ou lisados proteicos de soro de leite, percebe-se uma variação muito grande entre os resultados. Isso demonstra a divergência de

bioatividade de peptídeos com diferentes sequências, além das possíveis diferentes respostas celulares a estas moléculas, tais como metabolização e alterações não-letais. Assim, conclui-se que os peptídeos aqui testados não são bons candidatos para aplicação na indústria de alimentos. Doses mais elevadas dos peptídeos não foram testadas, pois inviabilizaria sua aplicação em alimentos devido ao alto custo de obtenção.

**Palavras-chave:** Antimicrobianos naturais. Patógenos. Contaminantes.

## Abstract

*The objective of this research was to evaluate the antimicrobial activity of amphipathic peptides derived from whey protein against important pathogenic and contaminant microorganisms. Two peptides, of 16 and 6 amino acids, composed respectively by the sequences*

\* Autor correspondente: jessicaafc@gmail.com

Recebido: 1 jul 2018 | Aprovado: 27 ago 2018

*HQPHQLPPTVMFPPQ and KIPAVF, were tested against the pathogenic bacteria Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, and Escherichia coli, and against the mycotoxigenic fungi Aspergillus parasiticus, Fusarium verticillioides, and Fusarium graminearum. The 96-well plate microdilution method was performed in order to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs) of the two peptides against each microorganism. Doses up to 5000 mg.L<sup>-1</sup> of the peptides were applied, however it was not possible to determine their MICs against the pathogens and contaminants tested. Analyzing similar work with peptides and/or whey protein lysates in the literature, a severe variation is observed among the results. This denotes a bioactivity divergence of peptides with distinct sequences, in addition to the possible different cellular responses to these molecules, such as metabolism and non-lethal changes. Thus, we conclude that the peptides tested herein are not good candidates for application in the food industry. Higher doses were not tested because their use in food would not be feasible due to high costs of obtainment.*

**Keywords:** *Natural antimicrobials. Pathogens. Contaminants.*

## Introdução

A aplicação de peptídeos antimicrobianos na agricultura e na indústria de alimentos tem ganhado força, visto que essas moléculas apresentam eficiência contra microrganismos sem apresentar os riscos da utilização de substâncias empregadas na clínica humana e animal (Keymanesh et al., 2009; Blair et al., 2015). Esses peptídeos podem ser aplicados diretamente nos alimentos ou como constituintes de embalagens bioativas (Appendini e Hotchkiss, 2002; Quintavalla e Vicini, 2002; Neris et al., 2013; ).

Peptídeos antimicrobianos podem ser obtidos a partir de diferentes fontes vegetais, animais e microbianas (Epanand e Vogel, 1999). Uma matriz com crescente interesse é o soro de leite que, por se tratar de um resíduo rico em proteínas (Oliveira et al., 2012), apresenta baixo custo e conseqüente potencial para geração de subprodutos de alto

valor agregado. Lisados proteicos de soro de leite têm apresentado efeitos promissores (Demers-Mathieu et al., 2013; Théolier et al., 2013; Abdel-Hamid et al., 2016; Osman et al., 2016), com frações peptídicas de alta atividade antimicrobiana. Além disso, peptídeos derivados de proteínas do soro de leite têm demonstrado atividade quelante, o que leva à perturbação do metabolismo de metais e de processos dependentes de metais em microrganismos (Mohan et al., 2015; Udechukwu et al., 2016).

A utilização de substâncias para controle microbiológico na indústria é essencial para manutenção da segurança e integridade de alimentos suscetíveis à contaminação. Os microrganismos que atualmente mais causam problemas de *recall* de alimentos, levando a significantes perdas econômicas para as indústrias, são as bactérias e fungos (Greig et al., 2015). Além da deterioração do alimento e da alteração de seu valor nutricional, o crescimento desses microrganismos pode afetar a segurança do produto quando há proliferação de espécies patogênicas e/ou toxigênicas (Umesha et al., 2017).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de peptídeos anfipáticos de cadeia curta derivados de proteínas do soro de leite, isoladamente, contra importantes microrganismos patogênicos e toxigênicos de interesse da indústria de alimentos.

## Materiais e métodos

### Peptídeos

Os peptídeos utilizados neste estudo foram obtidos a partir de processamento enzimático de proteínas isoladas do soro de leite. O isolado proteico foi incubado em banho maria (General Purpose Water Bath 89501-460, VWR, Radnor, PA) por 5 h, a 60 °C e pH 8,0 com Esperase® (Novozymes Corp., Bagsværd, Dinamarca) na proporção 100:1, respectivamente, e o hidrolisado resultante foi fracionado por ultrafiltração por membrana com peso molecular de corte de 1 kDa. O conteúdo filtrado, contendo peptídeos de massa molecular < 1 kDa, foi fracionado por cromatografia de

de afinidade por metal imobilizado (IMAC - Immobilized Metal-Affinity Chromatography) com colunas de 1 mL HiTrap IMAC Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), carregadas com zinco, visando recuperação de peptídeos quelantes. Após lavagem da coluna com solução-tampão, os peptídeos ligados à coluna foram eluídos com acetato de sódio 0,02 M (pH 4).

Na sequência, os peptídeos foram liofilizados (FreeZone® 4.5 Liter Benchtop Freeze Dryer, Labconco Corp., Kansas City, MO) e analisados por cromatografia líquida associada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) com analisador Orbitrap (Q-Exactiva, ThermoFisher, San Jose, CA), equipado com nanospray e sistema EASY-nLC nano-LC (Thermo Fisher), visando identificação

dos peptídeos quelantes recuperados. Dentre os peptídeos identificados na fração recuperada, dois foram selecionados para estudo: um de dezesseis aminoácidos, derivado de beta-caseína bovina (P16), e um de seis aminoácidos, derivado de beta-lactoglobulina bovina (P6). P16 foi selecionado por apresentar fortes ligantes metálicos em sua estrutura, principalmente histidina e fenilalanina, e P6 foi selecionado por apresentar característica anfipática (lisina catiônica seguida de *motif* hidrofóbico). Assim, para avaliar a atividade antimicrobiana dos peptídeos selecionados, P16 e P6 foram quimicamente sintetizados pela GenScript Inc. (Piscataway, NJ).

As sequências e características técnicas dos peptídeos podem ser observadas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Peptídeos derivados de proteínas de soro de leite bovino

Peptídeo	Proteína original	Sequência de aminoácidos	Número de aminoácidos	Massa molar (g/mol)	Pureza (%)
P16	Beta-caseína bovina 145 - 160	HQPHQPLPPTVMFPPQ	16	1851,14	98,5
P6	Beta-lactoglobulina bovina 77 - 82	KIPAVF	6	673,85	98,7

### Microrganismos e meios de cultura

As cepas bacterianas utilizadas neste estudo foram *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Escherichia coli* O157:H7 02-0304, patógenos alimentares de relevância. As cepas fúngicas testadas foram *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, *Fusarium verticillioides* CECT 2983 e *Fusarium graminearum* CECT 2150, importantes cepas micotoxigênicas. Todas as cepas foram obtidas do estoque do Laboratório de Pesquisa e Inovação Agropecuária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Curitiba, Brasil).

Os meios de cultura utilizados nos testes foram caldo e ágar Mueller-Hinton (MH) (Himedia, Paris, França) e Caldo Triptona de Soja (TSB) (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil).

### Determinação das concentrações inibitórias mínimas frente a bactérias

Buscou-se inicialmente determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos dois peptídeos contra as bactérias, utilizando o método de microdiluição em placas de microtitulação de 96 poços (CLSI, 2017).

Diluições em série (2<sup>\*</sup>) dos antimicrobianos foram feitas em MH, sendo, então, realizada a inoculação dos microrganismos alvo. As doses testadas foram de 1 a 5000 mg.L<sup>-1</sup> de cada peptídeo, sendo cada dose testada em triplicata. Cada poço recebeu 100 µL de caldo MH com tratamento e 100 µL de inóculo bacteriano - equilibrado em espectrofotômetro (Thermo Scientific GENESYS 20, Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, NY) na absorbância 0,35 - 0,4 (densidade ótica lida a 600 nm), que corresponde à concentração

de aproximadamente  $3 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup>, com exceção dos controles positivos, que não receberam tratamento, e negativos, que não receberam inóculo. As placas foram incubadas por 24 h, a 37 °C, sendo avaliada, então, a turbidez dos poços e as CIMs determinadas como sendo as menores doses sem crescimento bacteriano aparente.

### **Determinação das concentrações inibitórias mínimas frente a fungos**

Os fungos micotoxigênicos *A. parasiticus*, *F. verticillioides* e *F. graminearum* foram testados frente a P16 e P6, isoladamente. A técnica utilizada também foi a de microdiluição em microplacas (CLSI, 2017). As doses testadas foram de 1 a 5000 mg.L<sup>-1</sup> de cada peptídeo, sendo cada dose testada em triplicata (n = 3).

Cada poço recebeu 50 µL de caldo TSB com tratamento e 50 µL de inóculo concentrado, contendo aproximadamente  $2 \times 10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>. Os controles positivo e negativo não receberam tratamento e inóculo, respectivamente. As placas foram incubadas por 48 h, a 25 °C, sendo então avaliado o crescimento fúngico dos poços. As CIMs foram determinadas como as menores doses, com redução visual de 50% dos micélios, em comparação ao controle positivo.

### **Resultados e discussão**

Apesar de ambos os peptídeos avaliados terem demonstrado potencial antimicrobiano a partir de avaliações *in silico* de suas sequências (dados não publicados), os testes *in vitro* aqui desenvolvidos não geraram resultados que comprovassem atividade inibitória contra as cepas bacterianas Gram-positivas e -negativas testadas e/ou contra os fungos micotoxigênicos. Concentrações superiores a 5000 mg.L<sup>-1</sup>, maior dose testada no estudo e já bastante elevada, deixariam de ser industrialmente viáveis devido ao elevado custo de obtenção destes peptídeos, considerando suas aplicações em formas purificadas.

Osman et al. (2016) trabalharam com hidrolisados proteicos de soro de leite de cabra e encontraram resultados de inibição bacteriana

para *E. coli* ATCC 8739, *Bacillus cereus* ATCC 33018 e *S. aureus* ATCC 25923 em concentrações de 90, 30 e 20 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses resultados provavelmente são provenientes de possíveis interações sinérgicas entre diferentes peptídeos contidos no lisado e/ou presença de peptídeos com bioatividade superior aos aqui testados. Contudo, no estudo de Abdel-Hamid et al. (2016), utilizando hidrolisado proteico de soro de leite de camelo, foram determinados valores de CIMs até 20 vezes superiores aos de Osman e colaboradores contra as mesmas espécies bacterianas. Isso indica a variação de bioatividade entre peptídeos de diferentes origens proteicas e sequências.

Estudo conduzido por Demers-Mathieu et al. (2013) comparou os efeitos antimicrobianos de hidrolisados proteicos de soro de leite bovino e de peptídeos derivados de beta-lactoglobulina bovina purificados nas concentrações 20.000 e 10.000 mg.L<sup>-1</sup>, encontrando diferenças significativas, sendo os peptídeos purificados aqueles com maior poder antimicrobiano. Contudo, essas concentrações não proporcionaram inibição completa de *Listeria innocua* RBL29, *L. ivanovii* HPB28, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* MC4100, e *E. coli* O157:H7 ATCC 35150. Por outro lado, Théolier et al. (2013) encontraram CIMs de 20 - 40 mg.L<sup>-1</sup> de peptídeos isolados derivados de soro de leite frente à *Listeria ivanovii* HPB28 e *E. coli* MC4100. Novamente, esses dados divergentes acentuam as diferentes características e consequentes bioatividades dos peptídeos contidos em proteínas de soro de leite.

Um exemplo de peptídeo antimicrobiano (PAM) utilizado na indústria de alimentos atualmente é a nisina, com efeitos inibitórios satisfatórios sob baixas concentrações (Punyaappa-Path et al., 2015). A principal diferença da nisina quando comparada aos peptídeos derivados de soro de leite reside em a primeira, por possuir uma maior complexidade devido a sua sequência mais longa, apresentar seu mecanismo de ação mediado por receptores na membrana de bactérias e, por conseguinte, maior especificidade. Esse é também o caso de peptídeos com ação contra fungos, já que neste tipo celular a presença de receptores específicos na membrana é essencial para a atuação dessas moléculas, que atuam de maneira não lítica (Brogden, 2005).

Cabe ressaltar, também, que PAMs podem sofrer alterações pós-traducionais, em especial aqueles produzidos por organismos eucariotos. No caso de utilizar as sequências gênicas codificantes para sintetizar essas moléculas em sistemas bacterianos de expressão, essas modificações provavelmente não ocorrerão devido à diferença entre os maquinários proteicos envolvidos, o que certamente afetará a bioatividade da sequência (Rosano e Ceccarelli, 2014; Grabsztunowicz et al., 2017). No caso de purificar os peptídeos a partir de suas fontes naturais, além do menor rendimento e maior custo (Kobbi et al., 2017), os processos utilizados podem acarretar em alterações indesejadas nos peptídeos, diminuindo ou inibindo completamente suas atividades (Kobbi et al., 2015). Em ambas as situações, quanto maior a cadeia do PAM, mais suscetível ele será a esses efeitos (Rosano e Ceccarelli, 2014).

A maioria dos PAMs de cadeia curta atua através de mecanismos não mediados por receptor, com menor especificidade, e demanda, assim, maiores concentrações para produzir o efeito antimicrobiano desejado (Shai, 2002). Outra característica de PAMs já caracterizados é a carga líquida positiva, que possibilita a ligação da molécula à membrana dos microrganismos, passo inicial de sua ação. Contudo, é importante que a molécula não interaja muito fortemente com a cabeça polar dos fosfolípidos de membrana, o que poderia impedir interações subsequentes necessárias à atividade antimicrobiana (Yeaman e Yount, 2003). Assim, experimentos avaliando a carga dos peptídeos podem elucidar as diferenças de capacidade antimicrobiana existentes.

Em relação aos microrganismos testados, a não suscetibilidade frente aos peptídeos de cadeia curta P16 e P6 pode ser explicada por diferentes mecanismos de resistência constitutiva e induzida. A ativação de bombas de efluxo, a alteração de cargas na membrana, a metabolização e degradação dos peptídeos podem, de maneira conjunta ou interdependente, evitar a ação dessas moléculas (Yeaman e Yount, 2003). Contudo, não deve ser descartada a possibilidade de os peptídeos terem provocado alterações moleculares nos microrganismos, embora sem resultar na inibição do crescimento (Brogden, 2005).

Sabe-se que muitos microrganismos podem permanecer viáveis mesmo após extensivos danos em suas membranas, sendo que PAMs conhecidamente efetivos se utilizam de outros mecanismos além da lise de membranas para desempenhar seus efeitos (Brogden, 2005), que podem não estar presentes nos peptídeos testados neste estudo.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, é possível afirmar apenas que P16 e P6 não apresentam potencial de aplicação na indústria de alimentos, por não apresentarem efeito inibitório contra patógenos e contaminantes importantes em concentrações de até 5000 mg.L<sup>-1</sup>. Cabe ressaltar, também, que métodos de predição *in silico* não são totalmente precisos (Udenigwe, 2014) e, justamente por isso, não descartam a necessidade de experimentações posteriores, tais como as desenvolvidas neste estudo, para verificação de hipóteses.

## Conclusão

Nas condições estudadas, não foi possível observar atividade antimicrobiana in vitro de peptídeos anfipáticos de cadeia curta derivados de proteínas do soro de leite de sequências HQPHQLPPTVMFPPQ e KIPAVF contra bactérias e fungos de interesse da indústria de alimentos. Acredita-se que as moléculas foram metabolizadas pelos microrganismos, não desempenhando a atividade antimicrobiana correlacionada às suas conformações previamente observadas *in silico*. Contudo, visto que outros peptídeos derivados de proteínas de soro de leite de diferentes sequências podem desempenhar função antimicrobiana, o estudo de sequências peptídicas desta fonte mantém seu potencial na elucidação de PAMs.

## Referências

- Abdel-Hamid M, Goda HA, De Gobba C, Jenssen H, Osman A. Antibacterial activity of papain hydrolyzed camel whey and its fractions. *Int Dairy J.* 2016;61:91-8.
- Appendini P, Hotchkiss JH. Review of antimicrobial food packaging. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2002;3(2):113-26.

- Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(1):42-51.
- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(3):238-50.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institution. In: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
- Demers-Mathieu V, Gauthier SF, Britten M, Fliss I, Robitaille G, Jean J. Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolysate of whey protein by nanofiltration. *Int Dairy J.* 2013;28(2):94-101.
- Epand RM, Vogel HJ. Discovery of antimicrobial peptides and their mechanism of action. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1462(1-2):11-28.
- Grabsztunowicz M, Koskela MM, Mulo P. Post-translational modifications in regulation of chloroplast function: recent advances. *Front Plant Sci.* 2017;8:240.
- Greig J, Rajić A, Young I, Mascarenhas M, Waddell L, Lejeune J. A scoping review of the role of wildlife in the transmission of bacterial pathogens and antimicrobial resistance to the food chain. *Zoonoses Public Health.* 2015;62(4):269-84.
- Keymanesh K, Soltani S, Sardari S. Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry. *World J Microbiol Biotechnol.* 2009;25(6):933-44.
- Kobbi S, Balti R, Bougatef A, Le Flem G, Firdaous L, Bigan M, et al. Antibacterial activity of novel peptides isolated from protein hydrolysates of RuBisCO purified from green juice alfalfa. *J Funct Foods.* 2015;18:703-13.
- Kobbi S, Bougatef A, Le Flem G, Balti R, Mickael C, Fertin B, et al. Purification and recovery of RuBisCO protein from alfalfa green juice: antioxidative properties of generated protein hydrolysate. *Waste Biomass Valorization.* 2017;8(2):493-504.
- Mohan A, Udechukwu MC, Rajendran SRCK, Udenigwe CC. Modification of peptide functionality during enzymatic hydrolysis of whey proteins. *RSC Adv.* 2015;5:97400-7.
- Neris DJG, Bordignon-Junior SE, Baratto CM, Gelinski JMLN. Nisin in the biopreservation of Bordô (Ives) and Niágara table wines from Santa Catarina, Brazil. *J Biotec Biodivers.* 2013;4(3):176-83.
- Oliveira DF, Bravo CEC, Tonial IB. Soro de leite: um subproduto valioso. *Rev Inst Latic CAndido Tostes.* 2012;67(385):64-71.
- Osman A, Goda HA, Abdel-Hamid M, Badran SM, Otte J. Antibacterial peptides generated by alcalase hydrolysis of goat whey. *LWT Food Sci Technol.* 2016;65:480-6.
- Punyaappa-Path S, Phumkhachorn P, Rattanachai-kunsopon P. Nisin: production and mechanism of antimicrobial action. *Int J Cur Res Rev.* 2015;7(2):47-53.
- Quintavalla S, Vicini L. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Sci.* 2002;62(3):373-80.
- Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014;5:172.
- Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 2002;66(4):236-48.
- Théolier J, Hammami R, Labelle P, Fliss I, Jean J. Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *J Funct Foods.* 2013;5(2):706-14.
- Udechukwu MC, Collins SA, Udenigwe CC. Prospects of enhancing dietary zinc bioavailability with food-derived zinc-chelating peptides. *Food Funct.* 2016;7(10):4137-44.
- Udenigwe CC. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends Food Sci Technol.* 2014;36(2):137-43.
- Umesha S, Manukumar HM, Chandrasekhar B, Shivakumara P, Kumar JS, Raghava S, et al. Aflatoxins and food pathogens: impact of biologically active aflatoxins and their control strategies. *J Sci Food Agric.* 2017;97(6):1698-707.
- Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev.* 2003;55(1):27-55.