

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Potencial antimicrobiano do muco epidérmico de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*), espécies nativas do Brasil

Marina Rodrigues Mazine

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2021

Marina Rodrigues Mazine
Bacharela em Ciências dos Alimentos

Potencial antimicrobiano do muco epidérmico de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e
tambaqui (*Colossoma macropomum*), espécies nativas do Brasil

Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011.

Orientadora:
Profª Drª THAIS MARIA FERREIRA DE SOUZA VIEIRA

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Mazine, Marina Rodrigues

Potencial antimicrobiano do muco epidérmico de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*), espécies nativas do Brasil / Marina Rodrigues Mazine. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

44 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Peixe 2. AMP 3. Espécies nativas 4. Antibacteriano 5. SDS-Page L. .
I. Título

DEDICATÓRIA

À Laura

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido, Fausto, por tantas horas insones compartilhadas, por tantos abraços acolhidos, à minha filha, Laura, por tanto amor, por entender e abraçar meu projeto e minha ausência.

À minha mãe, Lourdes, por todas as horas dedicadas ao que eu não pude estar presente, por tanto amor, por ser tão inteira; ao meu pai, Ernani, pelo apoio sempre tão dedicado e acolhedor, por toda a força sempre a mim confiada, aos meus irmãos, por toda a união, parceria e ajuda incondicional, Regina, Carina e Marcos.

Ao Daniel Vázquez Sánchez, pelos cafés, conversas, projeto, ensinamentos, artigos e tudo o que a mim, generosamente, foi partilhado. Obrigada por confiar em mim e me mostrar o caminho da pesquisa.

À minha orientadora, Thais M. F. de Souza Vieira, pela confiança, ensinamentos e parceria. E por toda oportunidade a mim concedida.

À Juliana Galvão, por todo ensinamento e, principalmente, por ter sido a primeira a acreditar em mim. Obrigada por ter enxergado em uma mulher recém mãe a força ali presente.

Ao GETEP, ao ESALQ Food, ao técnico Luis Felipe Freitas, por todo o suporte envolvido e à Renata, pela partilha e amizade.

Aos meus avós, que mostram todos os dias que a ansiedade da juventude é em vão e que a finitude da vida é logo ali.

À minha amiga e parceira Cláudia, por tantos momentos vividos, tantas cervejas e choros compartilhados, à Thayana, pela eterna conexão, ao 1604 e às “Minas que eu admiro”, por toda amizade e partilha.

À Universidade de São Paulo, à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

À professora Juliana Bell e à Fernanda Furlan Gonçalves Dias, da Universidade de Davis, meus agradecimentos especiais por todo o auxílio nas análises.

À técnica da Genética, pelo compartilhamento de métodos e materiais.

À Unesp Jaboticabal por disponibilizar os peixes e por todo o auxílio dos funcionários que entraram na água para me ajudar com tanto afinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo auxílio financeiro.

Ao Laboratório multiusuário de Bioquímica e Análise Instrumental, do Professor Doutor Severino Matias de Alencar, à técnica Adna Massaroli pelo empréstimo de equipamentos e auxílio nas análises. Aos amigos do Departamento de Solos, pelo material fornecido.

À Deus e São Francisco pelos momentos extraídos da solidão.

Muito obrigada!

*Quando nasci um anjo esbelto,
desses que tocam trombeta, anunciou:
vai carregar bandeira.
Cargo muito pesado pra mulher,
esta espécie ainda envergonhada.
Aceito os subterfúgios que me cabem,
sem precisar mentir(...)
Mulher é desdobrável. Eu sou.
Adélia Prado*

SUMÁRIO

RESUMO	7
1. Introdução	9
2. Objetivos	11
2.1. Objetivo geral.....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
REFERÊNCIAS	12
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1. Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....	13
3.2. Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>).....	13
3.3. Estresse e patógenos.....	14
3.4. Muco epidérmico do pescado.....	15
3.5. Controle Microbiano.....	16
3.6. Resistência a antimicrobianos.....	17
3.7. <i>One Health</i>	18
3.8. Peptídeos antimicrobianos.....	20
3.9. Conclusão.....	22
REFERÊNCIAS	23
4. PERFIL PEPTÍDICO E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO MUCO EPIDÉRMICO DE PACU (PIARACTUS MESOPOTAMICUS) E TAMBAQUI (COLOSSOMA MACROPOMUM)	29
RESUMO	29
4.1. Introdução.....	30
4.2. Material e métodos.....	31
4.2.1. Coleta do muco epidérmico de tambaqui e pacu.....	31
4.2.2. Purificação e fracionamento do muco epidérmico.....	33
4.2.3. Quantificação proteica.....	34
4.2.4. Caracterização por eletroforese (SDS-PAGE).....	34
4.2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	35
4.2.6. Análises estatísticas.....	35
4.3. Resultados e Discussão.....	35
4.3.1. Coleta.....	36
4.3.2. Conteúdo proteico das amostras de muco.....	37
4.3.3. Perfil de proteínas.....	39
4.3.4. Atividade antimicrobiana.....	41
4.4. Conclusão.....	43
REFERÊNCIAS	44

RESUMO

Potencial antimicrobiano do muco epidérmico de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*), espécies nativas do Brasil

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são compostos de defesa encontrados em plantas ou animais, relacionados a mecanismos de ação diferentes dos agentes antimicrobianos tradicionalmente utilizados. Os AMPs vêm sendo amplamente estudados e ainda possuem uma gama de ações e mecanismos a serem descobertos, podendo ser, portanto, uma alternativa aos antimicrobianos já conhecidos. Além disso, podem ser alternativas aos antibióticos convencionais utilizados na agricultura e piscicultura. Os peixes estão em constante contato com diversos microrganismos no ambiente aquático e isso torna relevante o estudo dos seus mecanismos de resposta imune, sendo o muco epidérmico o primeiro mecanismo de defesa, já que está em contato com o ambiente externo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano do muco (e suas frações) de duas espécies de pescado nativas do Brasil, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*), frente a quatro bactérias relevantes para saúde humana e produção de alimentos: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*. As coletas de amostras foram realizadas em dois momentos diferentes do ano para identificar a influência da sazonalidade na composição do muco. Foram realizadas etapas de purificação e fracionamento das amostras de muco por extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*) em diferentes concentrações de isopropanol (0%, 20%, 40%, 60% e 80%). A concentração de proteínas das amostras purificadas de muco foi em média $5,65 \pm 0,39$ mg/mL na estação seca (tambaqui) e $1,99 \pm 0,09$ mg/mL na mesma estação (pacu). Na estação úmida o tambaqui apresentou teor de proteína de $3,03 \text{ mg/mL} \pm 0,11$ e o pacu teve, em média $0,88 \text{ mg/mL} \pm 0,09$. Os resultados das análises das frações isoladas por eletroforese SDS-PAGE indicaram que a concentração de proteínas de $0,10 \text{ mg/mL}$ da amostra fracionada de muco de pacu, com massa molecular menor de 13 kDa, apresentou atividade inibitória diante das quatro bactérias. Da mesma forma, amostras com perfil similar (menos de 13 kDa) e concentração proteica de $0,40 \text{ mg/mL}$ proveniente de muco de tambaqui apresentou atividade inibitória diante das quatro bactérias estudadas, indicando que há potencial para estudo da composição dos mucos visando futuras aplicações. Além disso, o muco demonstrou diferenças sazonais, ampliando a possibilidade de estudos relativos aos peptídeos provenientes dessas espécies de pescado brasileiras.

Palavras-chave: Peixe; AMP; Espécies nativas; Antibacteriano; SDS-PAGE

ABSTRACT

Antimicrobial potential of epidermal mucus of Brazilian fish native species pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Antimicrobial peptides (AMPs) are defense compounds found in plants or animals, related to mechanisms of action that differ from the antimicrobial agents currently used. AMPs have been widely studied and there is still a range of actions and mechanisms to be further discovered, thus they can be an alternative to the antimicrobials already known. In addition, they can be alternatives to conventional antibiotics used in agriculture, livestock and fish farming. Fish are in constant contact with several microorganisms in the aquatic environment and this makes the study of their immune response mechanisms relevant, being the epidermal mucus the first layer of defense since it is in contact with the external environment. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial potential of mucus (and its fractions) from two native Brazilian fish species, pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and tambaqui (*Colossoma macropomum*), against four bacteria relevant to human health and food production: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica*. Sample collections were performed at two different times of the year to identify the influence of seasonality on mucus composition. Purification and fractionation steps of the mucus samples were performed by solid-phase extraction (SPE) in different concentrations of isopropanol at 0%, 20%, 40%, 60% and 80%. The protein concentration of the purified mucus samples averaged 5.65 ± 0.39 mg/mL in the dry season (tambaqui) and 1.99 ± 0.09 mg/mL in the same season (pacu). In the wet season tambaqui had a protein content of 3.03 mg/mL ± 0.11 and pacu had an average of 0.88 mg/mL ± 0.09 . The results of the analysis of the isolated fractions by SDS-PAGE electrophoresis indicated that the protein concentration of 0.10 mg/mL of the pacu mucus fraction sample, with a molecular mass lower than 13 kDa, showed inhibitory activity against the four bacteria. Similarly, samples with similar profile (less than 13 kDa) and protein concentration of 0.40 mg/mL from tambaqui mucus showed inhibitory activity against the four bacteria studied, indicating that there is potential for further studies regarding the composition of mucus for future applications. Furthermore, the mucus showed seasonal differences, expanding the possibilities of studies on mucus and peptides from these Brazilian fish species.

Keywords: Fish; AMP; Native species; Antibacterial; SDS-PAGE

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui ampla biodiversidade em pescado, tanto em águas continentais como marinhas, porém as propriedades, produção e alimentação advindas do pescado ainda possuem grandes lacunas para exploração e crescimento. Em 2019, segundo a Associação Brasileira da Piscicultura (PEIXE-BR, 2020), o crescimento da piscicultura no Brasil foi de 4,9%, atingindo 758.006 toneladas de peixes de cultivo no país, tendo a tilápia papel de liderança, representando 57% de toda a piscicultura no Brasil em 2019. Apesar de crescimento ascendente na produção total, as espécies nativas ficaram com produção estável nesse mesmo período (PEIXE-BR, 2020). A produção de espécies nativas no Brasil é um setor que passa por problemas estruturais, sanitários e de comercialização. Apesar da biodiversidade, o Brasil possui dificuldades com a produção e comercialização de espécies nativas. O país teve crescimento de 20 toneladas na produção das mesmas em 2019, invertendo a tendência de queda que havia para o setor em anos anteriores (PEIXE-BR, 2020). Dentre os peixes nativos, o tambaqui é a principal espécie em termos de produção e comercialização, sendo que após demonstrar redução de 4,7% em 2017 e 2018, diante de um trabalho de reorganização e estudo da cadeia produtiva de peixes nativos, apresentou produção estável em 2019. Estados da região norte do Brasil possuem grande papel nesse avanço, tendo Rondônia como líder de produção no segmento de peixes nativos de cultivo e somando uma produção de 68.800 toneladas, seguido de Mato Grosso, totalizando 46.200 toneladas, e pelo estado do Maranhão, com 38.511 toneladas cultivadas de peixes nativos. O total produzido em 2019 para esse segmento foi de 287.930 toneladas. Em contrapartida, a tilápia teve aumento de 7,96%, somando 432.139 toneladas no país (PEIXE-BR, 2020).

Empresas voltadas para a piscicultura no Brasil possuem confiança no desenvolvimento do setor e pesquisas relacionadas a espécies nativas podem contribuir para o fortalecimento do setor (PEIXE-BR, 2020). Além disso, essas espécies são pouco consumidas, justificando pesquisas de bioprospecção visando fortalecer o conhecimento referente aos peixes nativos. Instituições vem trabalhando para a criação de um pacote tecnológico de produção do tambaqui, incluindo otimização de desempenho zootécnico, criação de germoplasma, caracterização do genoma da espécie, análise de exigências nutricionais, fases de desenvolvimento, bem estar animal, formulação de rações específicas e diversas ações conjuntas para o setor, caracterizando uma ação planejada para o incentivo de produções de espécies nativas (EMBRAPA, 2017; PEIXE-BR, 2020).

Contribuir com pesquisas relacionadas a essas espécies contribuem para o reconhecimento e consolidação de tais e, juntamente com a demanda por fontes alternativas aos antimicrobianos utilizados, a bioprospecção de características intrínsecas da imunidade dos peixes vem a ser uma fonte de estudo para possíveis fontes biotecnológicas, além de ser uma nova via de tratamento aos antibióticos utilizados atualmente na aquicultura. A imunidade das espécies aquáticas chama a atenção por seu mecanismo de regulação e defesa, pois possuem contato com uma gama grande de microrganismos patogênicos no ambiente aquático. O muco epidérmico dos peixes é o primeiro contato com o ambiente externo, o que justifica a condução de pesquisas referentes aos peptídeos bioativos ali presentes. As propriedades físico-químicas e a ativação desses peptídeos dependem de vários fatores, como sequência de aminoácidos, massa molecular e composição. Tais peptídeos nos peixes podem vir de várias fontes já relatadas: músculos, esqueletos, pele e órgãos internos, como intestino e fígado, dentre outros (PEREZ ESPITIA et al., 2012; URAKOVA et al., 2013).

Os peptídeos bioativos são fragmentos específicos de proteínas que possuem funções em organismos vivos, eles constituem a primeira barreira química frente a microrganismos patogênicos, tendo o muco epidérmico papel importante em organismos aquáticos (PEREZ ESPITIA et al., 2012). Tais peptídeos bioativos podem contribuir para

uma nova geração de agentes antimicrobianos ainda pouco explorados e que podem ser uma vazão à resistência de microrganismos verificada atualmente (GAMES et al., 2016).

Como os peixes são fonte de proteínas e o muco possui papel na defesa desses peixes, é importante analisar componentes biologicamente ativos ali e que são ainda desconhecidos (BRAGADEESWARAN et al., 2011). O muco epidérmico ou cutâneo tem papel no metabolismo dos peixes, visto que ele separa o indivíduo do ambiente, sendo relacionado a funções como a respiração, a regulação iônica, osmótica e termal, a locomoção, a comunicação, além de exercer papel chave na imunidade dos peixes (ESTEBAN; CERZUELA, 2015; RIMOLDI et al., 2017). Ele é caracterizado como um gel colóide produzido em maior intensidade no momento que o peixe encontra-se em condições de estresse, pois visa proteger a integridade e a homeostase do corpo frente à diversidade ambiental, evitando a entrada de patógenos (GOMEZ; SUNYER; SALINAS, 2013). Essa camada é composta por diversas moléculas extracelulares com propriedades antioxidantes (NAJAFIAN; BABJI, 2012), antimicrobianas (RAKERS et al., 2013; MASSO-SILVA; DIAMOND, 2014; BRINCHMANN, 2016) e antifúngicas (SUNG; LEE, 2008). Alguns dos peptídeos encontrados no muco também demonstraram ter propriedades anti-hipertensivas, anticoagulantes, antitumorais e imunomodulatórias (RAJANBABU; CHEN, 2011a; URAKOVA et al., 2013).

Diante de tais possibilidades funcionais, bioprospectar e analisar as características do muco de espécies nativas contribui para pesquisas referentes ao caráter funcional dos peptídeos bioativos (SHABIR et al., 2018). Aliado a essas propriedades, existe uma realidade problemática na saúde, na sociedade e na indústria de alimentos em relação à resistência das bactérias aos antimicrobianos convencionalmente utilizados. Portanto, é necessário pensar em fontes alternativas para que esse problema de resistência a antimicrobianos seja minimizado (OCDE, 2018).

Sendo assim, o conhecimento das propriedades específicas e composição de frações bioativas de muco epidérmico de pescado apresenta alto potencial para exploração, possibilitando a origem de uma nova geração de antimicrobianos a partir dessas espécies.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Fazer uma pesquisa exploratória para identificar compostos bioativos no muco epidérmico de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*), espécies nativas do Brasil.

2.2. Objetivos específicos

- Purificar, fracionar e caracterizar o muco epidérmico das duas espécies nativas.
- Identificar o potencial antimicrobiano do muco e frações perante bactérias predominantes na indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

- BRAGADEESWARAN, S. et al. Antimicrobial and hemolytic activity of fish epidermal mucus *Cynoglossus arel* and *Arius caelatus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, p. 305–309, 2011.
- BRINCHMANN, M. F. Immune relevant molecules identified in the skin mucus of fish using -omics technologies. *Mol. BioSyst.*, v. 12, n. 7, p. 2056–2063, 2016.
- EMBRAPA. Cientistas sequenciam genoma de peixes brasileiros. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/21279591/cientistas-sequenciam-genoma-de-peixes-brasileiros>>.
- ESTEBAN, M. Á.; CEREUZUELA, R. Fish mucosal immunity: Skin. [s.l.: s.n.]
- GAMES, P. D. et al. Computer aided identification of a Hevein-like antimicrobial peptide of bell pepper leaves for biotechnological use. *BMC Genomics*, v. 17, n. Suppl 12, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-3332-8>>.
- GOMEZ, D.; SUNYER, J. O.; SALINAS, I. The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 35, n. 6, p. 1729–1739, dez. 2013.
- MASSO-SILVA, J. A.; DIAMOND, G. Antimicrobial peptides from fish. *Pharmaceuticals*, v. 7, n. 3, p. 265–310, 2014.
- NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. *Peptides*, v. 33, n. 1, p. 178–185, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2011.11.013>>.
- OCDE. Stemming the Superbug Tide. Paris: OECD, 2018.
- PEIXE-BR. Anuário Peixe Br da Piscicultura 2020 Associação Brasileira de Piscicultura. [s.l.: s.n.].
- PEREZ ESPITIA, P. J. et al. Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 11, n. 2, p. 187–204, 2012.
- RAJANBABU, V.; CHEN, J.-Y. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides*, v. 32, n. 2, p. 415–420, fev. 2011.
- RAKERS, S. et al. Antimicrobial peptides (AMPs) from fish epidermis: Perspectives for investigative dermatology. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 133, n. 5, p. 1140–1149, 2013.
- RIMOLDI, S. et al. Skin Mucus of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Protein mapping and regulation in chronically stressed fish. *Frontiers in Physiology*, v. 8, n. February, p. 1–18, 2017.
- SHABIR, U. et al. Fish antimicrobial peptides (AMP's) as essential and promising molecular therapeutic agents: A review. *Microbial Pathogenesis*, v. 114, n. October 2017, p. 50–56, 2018.
- SUNG, W. S.; LEE, D. G. Pleurocidin-derived antifungal peptides with selective membrane-disruption effect. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 369, n. 3, p. 858–861, 2008.
- URAKOVA, I. N. et al. The biological activities of fish peptides and methods of their isolation. *Russian Journal of Marine Biology*, v. 38, n. 6, p. 417–422, 2013.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*), também conhecido como caranha, pacu-caranha ou pacu-guaçu, pertence à família *Characidae*. Habita ecossistemas lóticos da Bacia do Rio Prata e do Pantanal do Mato Grosso, é uma espécie onívora, principalmente herbívora, do tipo podador e de caráter oportunista (DA COSTA; MATEUS, 2009). O pacu é um peixe que apresenta corpo alto, arredondado, coloração parda sendo mais escura no dorso e pálida no ventre, possui nadadeiras escuras, adiposa e arredondada. É um peixe com escamas pequenas e em grande número na linha lateral, possui boca pequena contendo dentes molariformes (MARING et al., 2007). O período reprodutivo dessa espécie é de novembro a janeiro, apresentando assim, a desova total, fecundação externa e migração para liberar seus gametas. Como é uma espécie de piracema, necessita de indução hormonal para reprodução quando é criado em cultivo (MARING et al., 2007).

O pacu é a segunda espécie nativa mais criada no Brasil, atingindo aproximadamente 11.570 toneladas em 2018 (IBGE, 2018a). Esta espécie apresenta diversos apelos mercadológicos, que se baseiam desde aspectos de produção (alta adaptação e crescimento em sistemas de cultivo intensivo) até aspectos sensoriais, dada sua carne saborosa de alto valor comercial (SOUZA et al., 2003; SILVA, 2011). Também é um peixe muito utilizado para repovoamento dos rios (MARING et al., 2007). Devido a essas características, o potencial de criação do pacu vem aumentando em sistemas de produção no Brasil, o que pode causar maiores estresses aos animais e expô-los a microrganismos patogênicos, recorrentes em mudanças de habitats dos animais e cultivo (SILVA, 2011).



Figura 1. Pacu. FONTE: Acervo pessoal.

3.2. Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

O gênero *Colossoma* pertence à família *Characidae* e possui três espécies de grande importância econômica no Brasil: *Colossoma macropomum* (tambaqui), *Colossoma bidens* (pirapitinga) e *Colossoma mitrei* (caranha). O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é teleosteo de água doce e endêmico da bacia Amazônica, proveniente do rio Solimões e trata-se da principal espécie do rio Amazonas (WOYNAROVICH, 1988; COSTA et al., 2012).

De dorso cinza-escuro e ventre esbranquiçado, é considerado o segundo maior peixe de escamas da América do Sul, atingindo até 40 kg e 90 a 100 cm de comprimento na natureza, sendo uma espécie rústica e com alta tolerância térmica que cresce rapidamente e se adapta facilmente a ambientes de cultivo (WOYNAROVICH, 1988; COSTA et al., 2012; MARQUES, 2018). De maneira geral, o tambaqui habita áreas com águas ricas em nutrientes e com temperaturas entre 25 e 34°C, é capaz de resistir a situações adversas e com baixa concentração de oxigênio dissolvido na água, porém possui dificuldades de resposta imune em temperaturas muito baixas (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005; MARQUES et al., 2016). O tambaqui é onívoro, alimenta-se de algas filamentosas, partes de plantas aquáticas frescas e em decomposição, frutas, crustáceos, insetos, caracóis, caramujos e outros moluscos, e também peixes pequenos (WOYNAROVICH, 1988). A alimentação dos alevinos é baseada em zooplâncton, porém os adultos se alimentam, principalmente, de sementes e frutas. A migração dos adultos acontece durante a vazante e a seca do rio (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005).

O tambaqui é uma espécie altamente demandada no Brasil, sendo a espécie nativa mais apreciada no país (ROSA, 2015). É um dos peixes de maior importância na aquicultura do país e um peixe grande, se não fosse seu valor de abate comercial, atrás apenas do pirarucu (*Arapaima gigas*) (CARVALO et al., 2014). Trata-se de um pescado com carne de sabor valorizado. Na região norte do Brasil é importante fonte de proteína e alimentação. Além disso, as suas características de crescimento e produtividade são consideradas muito atrativas para a aquicultura, incrementando-se significativamente o seu cultivo na última década (MARQUES, 2018). A espécie atingiu 102.554 toneladas aproximadamente em 2018 (IBGE, 2018b), o equivalente a 14,6% do valor de produção geral do país, sendo a espécie nativa mais cultivada no país.



Figura 2. Tambaqui. FONTE: (SOUZA, 2019)

3.3. Estresse e patógenos

Os peixes estão constantemente expostos a diferentes meios de estresses no meio aquático, incluindo o contato com microrganismos patogênicos, por isso desenvolvem diferentes mecanismos de proteção e sobrevivência como a produção de substâncias que auxiliam na defesa contra esses estresses externos (CHARLIE-SILVA et al., 2019).

O estresse é a principal causa de doenças em peixes de cultivo, pois quando crônico, ele afeta o sistema imune dos peixes tornando suscetíveis a muitos patógenos (TORT, 2011; MARQUES et al., 2016). O estresse é uma situação na qual um animal sente-se desafiado e pode representar um risco à sua integridade. A susceptibilidade a

patógenos em *catfish* (*Ictalurus punctatus*) estressados, por exemplo, aumentou a mortalidade em 20% dessa espécie. Em dourada (*Gilthead sea bream*) no inverno também já foi demonstrada maior susceptibilidade à *Pseudomonas* (TORT, 2011). Para a aquicultura, as bactérias são um grande problema e desafio, sendo a principal causa de morte em peixes de cultivo. O gênero *Aeromonas* é um grande causador dessas doenças, principalmente em tambaquis (MARQUES et al., 2016). Além de *Aeromonas*, Austin e Austin (2007) descreve ampla gama de patógenos encontrado em peixes, como *Pseudomonas*, Enterobactérias, Flavobactérias, *Vibrio*, dentre outras que podem trazer problemas à saúde dos peixes.

Em relação às bactérias relevantes para alimentação humana, *Staphylococcus aureus* foi notificado em carpas prateadas, causando doenças relacionadas aos olhos e córneas dos peixes, além de causar letargia (AUSTIN; AUSTIN, 2007). A *Salmonella enterica* foi associada à morte de pirarucu (AUSTIN; AUSTIN, 2007), caracterizando proximidade com a problemática de espécies nativas. A *Salmonella* não é um contaminante biológico originalmente reportado em peixes, porém ela pode ser encontrada em peixes cultivados em água contaminada (FERNANDES et al., 2018). *Listeria* também tem registro em peixes dentre as bactérias gram-positivas. Vázquez-Sánchez, Galvao; Oetterer (2017) analisaram plantas de processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) no estado de São Paulo e constataram a contaminação de *L. monocytogenes* em até 20% dos pontos coletados nas indústrias.

Doenças emergentes surgem rotineiramente na aquicultura, portanto, é importante dar ênfase em melhores diagnósticos, em mecanismos de patogenicidade e fazer controle da água e dos peixes (AUSTIN; AUSTIN, 2007).

3.4. Muco epidérmico do pescado

Diante da adversidade do meio externo, a epiderme dos peixes é o que os separa do ambiente em que vivem, protegendo-os de danos físicos, químicos e microbiológicos (ESTEBAN, 2012; GOMEZ; SUNYER; SALINAS, 2013). É na epiderme do pescado que é secretado o muco, denominado um gel colóide presente em toda a sua superfície. As glândulas que produzem o muco são extremamente numerosas na pele dos peixes, os quais possuem a característica distinta de possuir o muco na parte externa. Muitas vezes o muco captura partículas estranhas da pele, como vírus e bactérias e, portanto, os patógenos são impedidos de aderir às células epiteliais, conferindo ao muco características dinâmicas de acordo com a quantidade de substâncias presentes no ambiente em que vivem (ESTEBAN; CEREZUELA, 2015).

Rajan et al (2011) realizou uma análise proteômica do muco de bacalhau e concluiu que 28% das proteínas contidas ali estão relacionadas ao sistema imune, 18% são sobre o metabolismo proteico, mais 18% relacionado ao metabolismo de carboidratos, portanto, o muco tem grande parte de sua função associada à imunidade dos peixes.

O sistema imune dos peixes pode ser dividido em três partes: mucosa/pele; humoral e celular, sendo a primeira a principal barreira de proteção, pois trata-se de uma porta de entrada para infecções (ESTEBAN; CEREZUELA, 2015). As mucosas são responsáveis por fornecer condições de adaptabilidade aos vertebrados, cujas células e moléculas agem para proteger o hospedeiro, por exemplo o desenvolvimento de linfócitos com alta especificidade e capacidade de memória diante de patógenos (GOMEZ; SUNYER; SALINAS, 2013).

Além de defesa, o muco possui propriedades físico-químicas que desempenham funções relacionadas à hidrodinâmica, respiração, reprodução, locomoção, comunicação e regulação osmótica no pescado (GUARDIOLA et al., 2017). A secreção do muco sobre as células epiteliais forma uma camada protetora contra os estresses externos, mas que também faz parte do processo de osmorregulação dos animais (CHARLIE-SILVA et al., 2019). O muco tem uma composição que pode variar entre espécies, sazonalidade, estágio de desenvolvimento e ambiente, no qual podem conter lisozimas, lectinas, aglutininas, calmodulina, proteína C reativa, enzimas proteolíticas, peptídeos antimicrobianos, imunoglobulinas, glicoproteínas e peroxidases (SHEPHARD, 1994; VAN DER MAREL et al., 2010;

ESTEBAN; CERZUELA, 2015). Além da composição química, o muco, sendo um gel, forma uma barreira física que impede a aderência de patógenos aos tecidos subjacentes (GUARDIOLA et al., 2017; CHARLIE-SILVA et al., 2019). Essa camada mucosa é secretada e substituída pelas glândulas unicelulares presentes na epiderme do pescado, principalmente pelas células calciformes e saciformes (LECCHINI et al., 2018), impedindo a colonização de agentes infecciosos (BRINCHMANN, 2016).

O muco possui grande parte de sua composição de água e mucinas, o que explica suas características viscoelásticas e propriedades reológicas, resultado do gradiente eletroquímico existente entre o gel e a água. As mucinas são glicoproteínas de massa molecular, têm capacidade adesiva e possuem uma variedade de moléculas antimicrobianas em sua composição. As mucinas são estruturas proteicas fortemente glicosiladas, hidrofílicas intercaladas em proteínas hidrofóbicas, formando um surfactante natural. Uma característica importante das mucinas do muco é a sua polimerização, que ocorre por meio de simultaneidade de dois domínios proteicos: a Prolina, Treonina e Serina (PTS), que constitui o principal local de glicosilação ligada à proteína O; e o Von Willebrand Fator D (VWD) (SHEPHARD, 1994; JEVTOV et al., 2014; GUARDIOLA et al., 2017; CHARLIE-SILVA et al., 2019).

As lisozimas possuem destaque em peixes perante as bactérias gram-positiva, elas agem diretamente sobre a camada peptidoglicana mais externa, enquanto em gram-negativa elas atuam na degradação da membrana externa complementando outras enzimas que expõem a cama peptidoglicana. É uma proteína já encontrada em muitas espécies de peixes como salmão (*Salmo salar*), solha (*Pleuronectes platessa* L.) e carpa (*Cyprinus carpio*) (SUBRAMANIAN; MACKINNON; ROSS, 2007).

Nas mucosas, por fim também possuem destaque os peptídeos antimicrobianos (AMPs), que possuem papel de defesa e estão majoritariamente nos peixes teleosteos, contendo 70% dos AMPs na pele, comparado com 52% encontrados nas guelras e 29% no intestino (ESTEBAN; CERZUELA, 2015).

3.5. Controle Microbiano

Para fornecer produtos seguros, a indústria de alimentos utiliza diferentes procedimentos de sanitização que visam reduzir microrganismos patogênicos e deteriorantes, bem como resíduos indesejáveis presentes nas superfícies de contato com o alimento e torná-los seguros (KUMAR; ANAND, 1998; SIMÕES et al., 2010).

O controle de microrganismos pode ser feito por meios físicos, químicos ou biológicos e a efetividade desses tratamentos dependem de carga microbiana presente, tempo para reduzi-la a níveis seguros, condições ambientais, dose, temperatura, pH, presença de matéria orgânica, formação de biofilmes, o estado fisiológico do microrganismo e a estrutura celular. O modo de ação dos antibacterianos se dá principalmente por lise da parede celular e interferência nas suas funções, por inibição da síntese proteica, por interferência na síntese de ácidos nucleicos ou por inibição de vias de ação metabólicas (MARRIOT; GRAVANI, 2006; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Diversos sanitizantes têm sido tradicionalmente usados na indústria de alimentos, como álcoois (etanol), compostos de amônio quaternário (cloreto de benzalcônio), biocidas à base de cloro (hipoclorito de sódio) e peróxidos (ácido peracético, peróxido de hidrogênio) (WIRTANEN; SALO, 2003; MARRIOT; GRAVANI, 2006). A escolha depende de fatores como dose, eficácia, segurança, toxicidade, efeitos corrosivos e facilidade de remoção, entre outros (MARRIOT; GRAVANI, 2006). No entanto, a eficácia desses produtos é frequentemente afetada pela presença de materiais orgânicos, pH, temperatura, dureza da água, inibidores químicos, concentração, tempo de exposição e resistência bacteriana (BESSEMS, 1998; MARRIOT; GRAVANI, 2006). No Brasil, o hipoclorito de sódio é o desinfetante mais utilizado na indústria dos alimentos, porque é barato, fácil de usar e não é afetado pela água dura. É um oxidante de ação rápida de ampla ação microbiana, que impede a síntese do DNA e reage com proteínas

intracelulares, com a parede celular e com componentes da matriz extracelular (RUSSELL, 2003). No entanto, o hipoclorito de sódio possui algumas desvantagens por causar irritabilidade, ser inativado pela presença de matéria orgânica, ser sensível ao pH e ocasionar descoloração dos produtos (DE BEER; SRINIVASAN; STEWART, 1994; WIRTANEN; SALO, 2003; ZABALA et al., 2011).

Portanto, a introdução de novos antimicrobianos, bem como o desenvolvimento de novas estratégias de controle é desejável para proporcionar alternativas eficazes que evitem, ou pelo menos reduzam o risco de formação de biofilme e resistência bacteriana. Além disso, as opções seguras para os manipuladores, com menor impacto ambiental e rentáveis para a indústria devem ser preferencialmente selecionadas de forma a estar em conformidade com os atuais e futuros panoramas regulatórios.

3.6. Resistência a antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos representa uma grande ameaça e preocupação para órgãos de saúde pública. A chamada era pós-antibiótico está trazendo a atenção para esse problema no qual infecções simples podem causar sérios problemas (WHO, 2014). A luta contra doenças causadas por patógenos é histórica entre os humanos, vide a pandemia causada pelo vírus SARS-Cov-2 e que vem causando mortes no mundo inteiro desde 2020.

Os antibióticos descobertos no século XX e a evolução das drogas antimicrobianas vêm controlando as doenças infecciosas, mas assim como as drogas foram desenvolvidas, as bactérias desenvolveram formas de resistir a esses agentes antimicrobianos (TENOVER, 2006; WHO, 2014). A resistência acontece, principalmente, porque há uso inadequado de antibióticos e sanitizantes. A resposta das bactérias aos agentes de controle microbiano depende da sua natureza e dos organismos envolvidos. A resistência das bactérias causa um problema grande, pois deixa o método de tratamento falho, o que pode causar sérias consequências, não apenas nos locais de tratamento, como hospitais, mas em toda a comunidade, pois essas bactérias estão tendo altas taxas de ocorrência em toda a sociedade (TENOVER, 2006; MORENTE et al., 2013). As bactérias adaptam-se e tornam-se resistentes na mesma proporção que os antibióticos são criados, são seres que possuem formas de evolução avançadas (TENOVER, 2006; DANTAS; SOMMER, 2014). Os microrganismos presentes nas plantas, no campo e nos animais podem ser transmitidos por meio da cadeia alimentar e o uso intensivo de antibióticos no sistema produtivo podem colocar o ser humano em contato com esses microrganismos resistentes (THANNER; DRISSNER; WALSH, 2016).

Algumas espécies são resistentes naturalmente a um ou mais antimicrobianos, porém a resistência também pode ser adquirida (MORENTE et al., 2013). Existem duas vias de bactérias adquirirem resistência antibiótica: a vertical, na qual é acumulada a informação genética para resistência durante o processo natural de cópia do genoma (nesse caso a resistência é referente a apenas uma classe de antibióticos) e a horizontal, cuja ocorrência se dá quando o gene de resistência é transferido de um para outro microrganismo e cuja abrangência é de inúmeras classes de antimicrobianos. Em todos os casos de resistência adquirida, as cepas são selecionadas pela utilização dos próprios antimicrobianos, pois as bactérias suscetíveis são eliminadas e as resistentes sobrevivem (LIVERMORE, 2003; TENOVER, 2006; DANTAS; SOMMER, 2014; FOUNOU; FOUNOU; ESSACK, 2016).

Entre as bactérias vegetativas, as micobactérias são as mais resistentes, seguidas das bactérias gram-negativas e gram-positivas. Porém, a formação de esporos bacterianos e o crescimento microbiano em forma de biofilmes também podem aumentar a sua resistência (MORENTE et al., 2013).

Nas gram-negativas, a membrana externa é um fator de proteção frente aos biocidas. Em *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, as moléculas hidrofílicas conseguem entrar diretamente nas células pelos poros, mas as hidrofóbicas se dispersam na membrana externa. As micobactérias possuem maior resistência, por enquanto,

porque sua parede celular possui material ceroso que protege a célula contra os antimicrobianos. As bactérias gram-positivas possuem paredes celulares formadas de peptídeoglicanos, de alta massa molecular, pela qual alguns antimicrobianos penetram com maior facilidade. Como resultado, os *Staphylococci* e células vegetativas de *Bacillus* spp. são mais sensíveis a biocidas como os compostos de amônia quaternários (QACs) e as clorexidinas. Os esporos de *Clostridium* possuem alta relevância na indústria de alimentos por ser altamente resistentes aos biocidas (MORENTE et al., 2013).

3.7. One Health

Diante do desafio da resistência aos antibióticos e saúde de humano e animais na agricultura, a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2005 criou uma iniciativa denominada *One Health* a fim de coordenar ações através de um trabalho multissetorial para garantir uma vigilância abrangente, o acompanhamento e a implementação de políticas nos domínios humano, animal e ambiental para esse fim (WHO, 2008).

As abordagens de *One Health* visam entender as influências recíprocas que ocorrem no microbioma animal, humano e ambiental. Esse compartilhamento de microrganismos, patogênicos ou não, expandiu estudos moleculares e estatísticos sobre a transmissão, as interações e as possíveis consequências que essas relações podem ter. Há evidências que o microbioma de seres humanos e animais conviventes do mesmo ambiente podem ser compartilhados. A microbiologia clínica que focava tradicionalmente nas doenças que são causadas por patógenos específicos em humanos, com os avanços no sequenciamento de DNA agora ampliam o estudo para comunidades microbianas inteiras. Esse avanço propicia estudos que entendam o papel ecológico dessas comunidades (TRINH et al., 2018).

Como há muitas interconexões entre animais, seres humanos, campos e água por meio da produção de alimentos, a resistência aos antibióticos na cadeia de alimentos é um problema, pois diversos estudos comprovaram que animais e alimentos comercializados globalmente foram contaminados com cepas resistentes, tais como *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA), *Campylobacter* spp. e outras cepas que podem caracterizar uma pandemia. Em 2014, a Suíça investigou a presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em amostras de carnes e os resultados indicaram que 6,9% de carnes grelhadas possuíam *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) e 73,3% das amostras apresentaram Beta-Lactamase de Espectro Estendido (ESBL) produzidos por *Escherichia coli* (THANNER; DRISSNER; WALSH, 2016). Ou seja, as interconexões entre pessoas, animais e campo facilitam a transferência de genes de resistência bacterianos entre diversos ambientes (TENOVER, 2006; FOUNOU; FOUNOU; ESSACK, 2016).

Os solos também estão perdendo sua diversidade de microrganismos por meio de uso intensivo de fertilizantes e resíduos de antibióticos remanescentes da pecuária vem tornando um ambiente propício para o aumento de cepas resistentes (FOUNOU; FOUNOU; ESSACK, 2016). No solo acontece a transferência de genes resistentes horizontalmente, processo ainda intensificado pela utilização de esterco, incluindo alta carga de matéria orgânica e de microrganismos resistentes a antimicrobianos, os microrganismos ali presentes sofrem pressão seletiva e geram diminuição da comunidade e diversidade de microrganismos (THANNER; DRISSNER; WALSH, 2016).

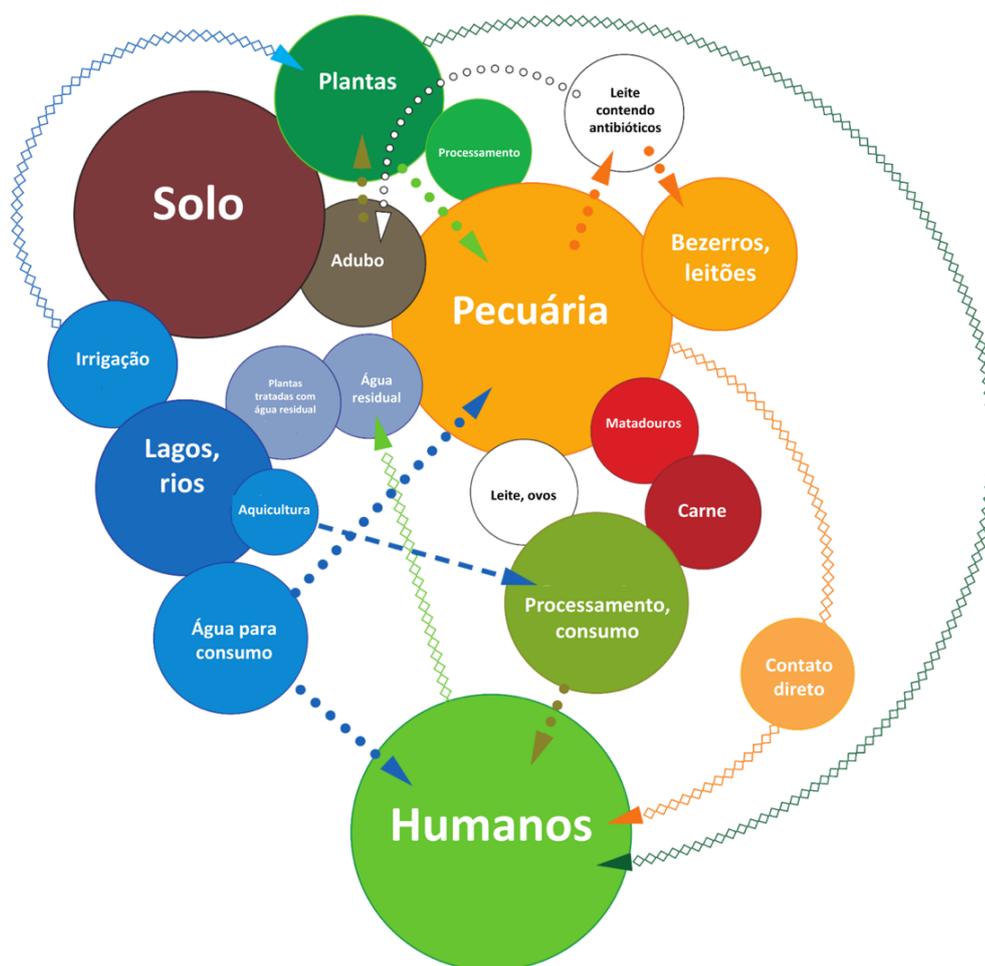


Figura 3. Disseminação dos agentes antimicrobianos e da resistência antimicrobiana na agricultura, no meio ambiente e na indústria de alimentos. Adaptado de THANNER; DRISSNER; WALSH (2016).

Uma forma importante de conter a resistência nos ambientes é prevenir o fluxo gênico resistente para os reservatórios ambientais, o que pode ser feito monitorando o uso de antibióticos e utilizando fontes alternativas aos antibióticos, mantendo a boa saúde dos animais distando de águas residuais de hospitais e indústrias, que possuem muitos genes resistentes aos antibióticos, segundo Thaner, Drissner e Walsh (2016),

Práticas como a implementação de medidas de biossegurança nas indústrias de alimentos e na cadeia de produção de alimentos, utilização de microbiologia preditiva, sistemas integrados de vigilância na cadeia alimentar, padronização de métodos laboratoriais, treinamentos de profissionais, fiscalização do uso de antibióticos, reforço e fiscalização da legislação veterinária também podem prevenir o aumento de microrganismos resistentes a antimicrobianos (FOUNOU; FOUNOU; ESSACK, 2016).

A OCDE e a Organização Mundial da Saúde recomendam que sejam promovidas campanhas de intervenção e promoção de hábitos de higiene em hospitais, conscientização de uso adequado de antibióticos, a utilização de testes rápidos e específicos para a detecção do microrganismo (vírus ou bactéria), a prescrição correta e campanhas públicas de alerta a esse grande problema. O investimento nesses pontos retornaria em um ano USD 1,5 para cada dólar investido nessas ações (OCDE, 2018).

3.8. Peptídeos antimicrobianos

Muitos organismos geralmente produzem peptídeos antimicrobianos (AMPs) como mecanismo de defesa, portanto, formas de identificação e aplicações desses peptídeos estão sendo pesquisadas a fim de encontrar novos compostos bioativos para diversas finalidades, sejam elas alimentícia, farmacêutica ou cosmética. Os AMPs de vertebrados foram encontrados em anfíbios, coelhos e humanos na década de 80, mas sua atividade antimicrobiana em peixes só foi comprovada no fim dos anos 90 (MASSO-SILVA; DIAMOND, 2014). O perfil desses peptídeos antimicrobianos caracteriza-se por compostos de cadeia curta, constituídos de 12 a 100 aminoácidos, carregados positivamente, com elevada atividade antimicrobiana e pouca ou nenhuma toxicidade para as células do hospedeiro. São anfílicos e estão sendo isolados de diversas fontes, como células de microrganismos, insetos, plantas, anfíbios, pássaros, peixes, mamíferos, inclusive humanos (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006; ESTEBAN, 2012).

Em nível celular, os AMPs inibem a síntese de DNA, RNA e de proteínas (ESTEBAN; CEREZUELA, 2015). Além do papel de agir diretamente nas células de microrganismos, danificando ou desestabilizando as células, os peptídeos possuem papel importante de moduladores no sistema imunológico. Os peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias são chamados bacteriocinas e possuem papel importante quando há competição de nutrientes no mesmo ambiente. A nisina, por exemplo, é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* e é utilizada como conservante em alimentos, foi um dos primeiros AMPs a ser descoberto. Nas plantas, os mais conhecidos peptídeos para defesa são as tioninas e as defensinas. Nos invertebrados o sistema defensivo é muito eficaz e a *Drosophila melanogaster* constitui um sistema imune muito estudado e que foi chave para desenvolvimento de marcadores de reconhecimento de patógenos. As defensinas constituem o grupo mais comum em invertebrados e podem ser encontradas também em humanos e vertebrados, elevando o número de estudos sobre seus mecanismos de funcionamento (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

No pescado, a produção dos AMPs nas mucosas (pele, guelras e trato digestivo) é constitutiva ou induzida por infecções para se defender contra patógenos invasores. Alguns AMPs também estão envolvidos na neutralização de endotoxinas, quimiotaxis de leucócitos, imunomodulação, angiogênese, metabolismo do Ferro e reparo de ferimentos (GUANÍ-GUERRA et al., 2010; ESTEBAN, 2012). Foram também demonstradas as suas propriedades anti-hipertensivas, anticoagulantes, antioxidantes e antitumorais (RAJANBABU; CHEN, 2011b; URAKOVA et al., 2013). Entre os AMPs identificados no muco epidérmico de pescado, destacam-se as piscidinas, as β -defensinas, as hepcidinas, as catelicidinas e os peptídeos derivados de histonas (ELLIS, 2001; RAKERS et al., 2013; MASSO-SILVA; DIAMOND, 2014; SHABIR et al., 2018).

As piscidinas compreendem uma família de AMPs lineares e anfipáticos, têm uma estrutura α -helicoidal. Exibem potente atividade antimicrobiana contra uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e negativas, fungos, parasitas e vírus (NIU et al., 2013; MASSO-SILVA; DIAMOND, 2014; SHABIR et al., 2018). As piscidinas são principalmente expressas em brânquias, pele e intestino por mastócitos, fagócitos granulocíticos e eosinófilos, embora também possam ser encontradas em cabeça e baço (MULERO et al., 2008; BUONOCORE et al., 2012; NIU et al., 2013). A síntese das piscidinas pode ser induzida por bactérias gram-positivas e negativas (PENG et al., 2012), parasitas (NIU et al., 2013) e vírus (DEZFULI et al., 2012), por componentes bacterianos como os lipo-polissacarídeos (BUONOCORE et al., 2012), assim como pela alta densidade de peixe em um tanque (CATTANEO et al., 2011). Dependendo da concentração, as piscidinas podem romper as membranas plasmáticas e causar saída de material celular pela formação de poros (SUNG; LEE, 2008) ou inibir a síntese de macromoléculas (PATRZYKAT et al., 2002). As piscidinas retêm atividade antibacteriana em altas concentrações

salinas (BULET et al., 2002), apresentam termoestabilidade (SUN et al., 2012) e relativamente baixa citotoxicidade contra células de mamíferos (KIM et al., 2010).

As β -defensinas são peptídeos antimicrobianos catiônicos ricos em cisteína, com atividade tanto contra bactérias Gram-positivas e negativas quanto vírus, embora com atividade moderada (MASSO-SILVA; DIAMOND, 2014; SHABIR et al., 2018). A síntese das β -defensinas de pescado ocorre principalmente na pele, olhos, cabeça e baço (CASADEI et al., 2009; ZHAO et al., 2009), sendo induzida por componentes da parede celular bacteriana como lipopolissacarídeos (ZHAO et al., 2009), β -glicanos (VAN DER MAREL et al., 2012) e peptídeoglicanos (CASADEI et al., 2013).

As hepcidinas também são peptídeos ricos em cisteína, com alta atividade antimicrobiana contra uma ampla variedade de bactérias, incluindo numerosos patógenos de pescado e vírus (CHIA et al., 2010; MASSO-SILVA; DIAMOND, 2014), porém sua atividade contra fungos é menor (WANG et al., 2009). As hepcidinas são sintetizadas no fígado, baço, rim e intestino, como consequência à exposição de microrganismos (MASSO-SILVA; DIAMOND, 2014; SHABIR et al., 2018).

As catelicidinas são definidas por uma região N-terminal homóloga do peptídeo precursor chamada domínio catequina, porém existe baixa homologia de sequência entre os peptídeos maduros (PAVLOPOULOU, 2013). Essa variabilidade na sequência peptídica madura dessas moléculas parece influenciar na sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e negativas e fungos, provavelmente como resultado de uma divergência evolutiva para enfrentar patógenos específicos (MASSO-SILVA; DIAMOND, 2014; SHABIR et al., 2018). A expressão de catelicidinas ocorre em numerosos tecidos, incluindo guelra, fígado, baço e intestino (MAIER et al., 2008).

Fragmentos de histonas de várias espécies de pescado também demonstraram ampla atividade antimicrobiana contra patógenos humanos e de peixes (NOGA et al., 2011). Estes derivados de histonas são expressos e secretados principalmente na pele do pescado sob condições de estresse, mas também foram encontrados nas guelras, no baço e no intestino (LEVY et al., 2002; CATTANEO et al., 2011; MASSO-SILVA; DIAMOND, 2014).

Em análises *in vitro*, a maioria dos AMPs demonstraram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, contra protozoários, fungos e até mesmo alguns vírus. As β -defensinas, por exemplo, possuem atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (bactérias relevantes em infecções da pele). As catelicidinas já demonstraram atividade contra *Streptococcus* e *Escherichia coli* em análises *in vivo* (LAI; GALLO, 2009).

Todas estas moléculas com propriedades bioativas presentes no muco epidérmico de pescado podem ter ampla aplicabilidade no setor alimentício e na área da saúde, assim como na aquicultura. Os AMPs possuem sinergia e os organismos modulam a concentração do peptídeo perante uma infecção, impedindo a colonização microbiana diante de sua concentração. Os microrganismos também não conseguem identificar proteases específicas para degradar as proteínas sem que afete as suas próprias proteínas para sobrevivência (LAI; GALLO, 2009), o que confere aos AMPs promissoras características para terapias antimicrobianas e que não sejam precursores de resistência.

Os AMPs podem ser uma fonte de tratamento para patógenos resistentes às drogas já existentes no mercado e, além desse fator antimicrobiano, AMPs podem ter outras características promissoras e que podem ser exploradas no futuro, como compostos adjuvantes ou inativadores em vacinas e agentes antitumorais (ESTEBAN, 2012). Há um esforço na pesquisa, portanto, voltado à identificação de atividades bioativas desses peptídeos, pois há um potencial para aplicação em diversas áreas da sociedade (MASSO-SILVA; DIAMOND, 2014).

3.9. Conclusão

Estudos relativos a novos sanitizantes, novos antimicrobianos e à ciência básica envolvida diante de espécies nativas são relevantes, uma vez tratando de uma problemática importante para a produção de alimentos e o muco epidérmico constitui uma matriz de relevância em relação a peptídeos antimicrobianos, pois os peixes estão em ambientes que nem sempre são controlados e, portanto, expostos a diversos microrganismos.

O muco dos peixes possui uma variedade de substâncias biologicamente ativas e que podem contribuir para um novo entendimento de antimicrobianos, podendo ser posteriormente utilizados por meio de síntese em fermentadores na indústria.

O conceito integrado de comunidades microbianas evidencia a importância de se estudar os mecanismos de defesa de diversas espécies, não somente para proveito humano, mas sim para entender como o microbioma integrado pode ser uma forma importante de defesa nos sistemas agroalimentares. Além de aspectos biotecnológicos, a temática *One Health* norteia um caminho de integração para novos estudos a fim de entender mecanismos importantes de defesa por uma via alternativa.

REFERÊNCIAS

- AUSTIN, B.; AUSTIN, D. **Bacterial Fish Pathogens**. 5. ed. [s.l.] Springer, 2007.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. UFSM ed. [s.l: s.n.]
- BESSEMS, E. The effect of practical conditions on the efficacy of disinfectants. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 41, n. 3–4, p. 177–183, 1998.
- BRINCHMANN, M. F. Immune relevant molecules identified in the skin mucus of fish using -omics technologies. **Mol. BioSyst.**, v. 12, n. 7, p. 2056–2063, 2016.
- BULET, P. et al. Discovery and Characterization of Two Isoforms of Moronecidin, a Novel Antimicrobial Peptide from Hybrid Striped Bass. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 7, p. 5030–5039, 2002.
- BUONOCORE, F. et al. A piscidin-like antimicrobial peptide from the icefish *Chionodraco hamatus* (Perciformes: Channichthyidae): Molecular characterization, localization and bactericidal activity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, n. 5, p. 1183–1191, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.005>>.
- CARVALO, E. V. M. M. et al. **Physiological and Biotechnological approaches of the Amazonian Tambaqui Fish (*Colossoma macropomum*)**. [s.l.] Nova, 2014.
- CASADEI, E. et al. Characterization of three novel β -defensin antimicrobial peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Molecular Immunology**, v. 46, n. 16, p. 3358–3366, 2009.
- CASADEI, E. et al. The effect of peptidoglycan enriched diets on antimicrobial peptide gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, n. 2, p. 529–537, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.027>>.
- CATTANEO, A. G. et al. Impact of acute stress on antimicrobial polypeptides mRNA copy number in several tissues of marine sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **BMC Immunology**, v. 12, n. 1, 2011.
- CHARLIE-SILVA, I. et al. Novel nanostructure obtained from pacamã, *Lophiosilurus alexandri*, skin mucus presents potential as a bioactive carrier in fish. **Aquaculture**, v. 512, n. April, p. 734294, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734294>>.
- CHIA, T. J. et al. Antimicrobial peptides (AMP) with antiviral activity against fish nodavirus. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 28, n. 3, p. 434–439, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.020>>.
- COSTA, G. de M. et al. Estrutura morfológica do fígado de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 947–950, 2012.
- DA COSTA, R. M. R.; MATEUS, L. A. de F. Reproductive biology of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Teleostei: Characidae) in the Cuiabá River Basin, Mato Grosso, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 3, p. 447–458, 2009.
- DANTAS, G.; SOMMER, M. O. A. How to fight back against antibiotic resistance. **American Scientist**, v. 102, n. 1, p. 42–51, 2014.
- DE BEER, D.; SRINIVASAN, R.; STEWART, P. S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4339–4344, 1994.
- DEZFULI, B. S. et al. Infiltration and activation of acidophilic granulocytes in skin lesions of gilthead seabream, *Sparus aurata*, naturally infected with lymphocystis disease virus. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 36, n. 1, p. 174–182, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.06.017>>.
- ELLIS, A. E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental and comparative immunology**, v. 25, p. 827–839, 2001. Disponível em:

<<http://search.ebscohost.com.ezproxy.liv.ac.uk/login.aspx?direct=true&db=edselp&AN=S0145305X01000386&site=eds-live&scope=site>>.

- ESTEBAN, M. A. An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. **ISRN Immunology**, v. 2012, p. 1–29, 2012.
- ESTEBAN, M. Á.; CEREZUELA, R. **Fish mucosal immunity: Skin**. [s.l: s.n.]
- FERNANDES, D. V. G. S. et al. Salmonella spp. In the fish production chain: A review. **Ciencia Rural**, v. 48, n. 8, 2018.
- FOUNOU, L. L.; FOUNOU, R. C.; ESSACK, S. Y. Antibiotic resistance in the food chain: A developing country-perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. NOV, p. 1–19, 2016.
- GOMEZ, D.; SUNYER, J. O.; SALINAS, I. The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 6, p. 1729–1739, dez. 2013.
- GUANÍ-GUERRA, E. et al. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. **Clinical Immunology**, v. 135, n. 1, p. 1–11, 2010.
- GUARDIOLA, F. A. et al. Terminal carbohydrates abundance, immune related enzymes, bactericidal activity and physico-chemical parameters of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) skin mucus. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 60, p. 483–491, 2017.
- IBGE. **Produção aquicultura por tipo de produto - pacu**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940#resultado>>.
- IBGE. **Produção aquicultura por tipo de produto - tambaqui**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940#resultado>>.
- JENSSEN, H.; HAMIL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.
- JEVTOV, I. et al. Zebrafish as a model to study live mucus physiology. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–6, 2014.
- KIM, J. K. et al. Structural flexibility and the positive charges are the key factors in bacterial cell selectivity and membrane penetration of peptoid-substituted analog of Piscidin 1. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1798, n. 10, p. 1913–1925, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmem.2010.06.026>>.
- KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 1–2, p. 9–27, 1998.
- LAI, Y.; GALLO, R. L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 3, p. 131–141, 2009.
- LECCHINI, D. et al. Biological and Ecological Roles of External Fish Mucus: A Review. **Fishes**, v. 3, n. 4, p. 41, 2018.
- LEVY, M. G. et al. Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, v. 54, n. 5, p. 467–475, 2002.
- LIVERMORE, D. M. Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. Supplement_1, p. S11–S23, 2003.
- MAIER, V. H. et al. Characterisation of cathelicidin gene family members in divergent fish species. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 14, p. 3723–3730, 2008.

- MARING, U. E. D. E. et al. **Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus***. 2007. 2007.
- MARQUES, D. S. C. et al. Impact of stress on *Aeromonas* diversity in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and lectin level change towards a bacterial challenge. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 37, n. 23, p. 3030–3035, 2016.
- MARQUES, M. F. **Associação de polimorfismo microssatélite no gene GH em Tambaqui (*Colossoma macropomum*) com características fenotípicas e expressão gênica**. 2018. Universidade de São Paulo, 2018.
- MARRIOT, N.; GRAVANI, R. B. **Principles of food sanitation**. 5. ed. [s.l: s.n.]
- MASSO-SILVA, J. A.; DIAMOND, G. Antimicrobial peptides from fish. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 3, p. 265–310, 2014.
- MORENTE, E. O. et al. Biocide tolerance in bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 13–25, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.028>>.
- MULERO, I. et al. The antimicrobial peptides piscidins are stored in the granules of professional phagocytic granulocytes of fish and are delivered to the bacteria-containing phagosome upon phagocytosis. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 12, p. 1531–1538, 2008.
- NIU, S. F. et al. Characterization of a novel piscidin-like antimicrobial peptide from *Pseudosciaena crocea* and its immune response to Cryptocaryon irritans. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, n. 2, p. 513–524, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.007>>.
- NOGA, E. J. et al. Application of antimicrobial polypeptide host defenses to aquaculture: Exploitation of downregulation and upregulation responses. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, v. 6, n. 1, p. 44–54, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbd.2010.06.001>>.
- OCDE. **Stemming the Superbug Tide**. Paris: OECD, 2018.
- PATRZYKAT, A. et al. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 605–614, 2002.
- PAVLOPOULOU, A. Cathelicidins Revisited: Molecular Evolution, Structure and Functional Implications. **International Journal of Systems Biology and Biomedical Technologies**, v. 2, n. 2, p. 8–32, abr. 2013.
- PENG, K. C. et al. Five Different Piscidins from Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*: Analysis of Their Expressions and Biological Functions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.
- RAJAN, B. et al. Proteome reference map of the skin mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*) revealing immune competent molecules. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, n. 2, p. 224–231, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2011.05.006>>.
- RAJANBABU, V.; CHEN, J. Y. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. **Peptides**, v. 32, n. 2, p. 415–420, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2010.11.005>>.
- RAKERS, S. et al. Antimicrobial peptides (AMPs) from fish epidermis: Perspectives for investigative dermatology. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 5, p. 1140–1149, 2013.
- ROSA, F. S. da. **Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/2627004/tambaqui>>.
- RUSSELL, A. D. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 750–763, 2003.
- SHABIR, U. et al. Fish antimicrobial peptides (AMP's) as essential and promising molecular therapeutic agents: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, n. October 2017, p. 50–56, 2018.

- SHEPHARD, K. L. Functions for fish mucus. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 4, n. 4, p. 401–429, 1994.
- SILVA, T. B. A. **Fontes de lipídios dietéticos e desempenho imunológico do pacu *Piaractus mesopotamicus***. 2011. Universidade de São Paulo, 2011.
- SIMÕES, M. et al. Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology. **Applied Microbiology**, p. 845–854, 2010.
- SOUZA, S. R. dos S. **Embrapa**, 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/4644001/tambaqui>>.
- SOUZA, V. L. et al. Evaluation of the Growth and Feeding Costs of Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Submitted to Alternate Cycles of Feeding Restriction and Refeeding. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 19–28, 2003. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0346343805&partnerID=40&md5=cd6c411fdd5f707143e1a81f6b903d98>>.
- SUBRAMANIAN, S.; MACKINNON, S. L.; ROSS, N. W. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 148, n. 3, p. 256–263, 2007.
- SUN, D. et al. Identification, synthesis and characterization of a novel antimicrobial peptide HKPLP derived from *Hippocampus kuda* Bleeker. **Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 3, p. 117–121, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ja.2011.120>>.
- SUNG, W. S.; LEE, D. G. Pleurocidin-derived antifungal peptides with selective membrane-disruption effect. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 369, n. 3, p. 858–861, 2008.
- TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5 SUPPL., 2006.
- THANNER, S.; DRISSNER, D.; WALSH, F. Antimicrobial resistance in agriculture. **mBio**, v. 7, n. 2, p. 1–7, 2016.
- TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1366–1375, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>>.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. [s.l.] Artmed, 2017.
- TRINH, P. et al. One Health Relationships Between Human, Animal, and Environmental Microbiomes: A Mini-Review. **Frontiers in Public Health**, v. 6, n. August, p. 1–9, 2018.
- URAKOVA, I. N. et al. The biological activities of fish peptides and methods of their isolation. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 38, n. 6, p. 417–422, 2013.
- VAN DER MAREL, M. et al. Changes in skin mucus of common carp, *Cyprinus carpio* L., after exposure to water with a high bacterial load. **Journal of Fish Diseases**, v. 33, n. 5, p. 431–439, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01140.x>>.
- VAN DER MAREL, M. et al. Molecular cloning and expression of two β -defensin and two mucin genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and their up-regulation after β -glucan feeding. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 32, n. 3, p. 494–501, 2012.
- VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; GALVÃO, J. A.; OETTERER, M. Contamination sources, biofilm-forming ability and biocide resistance of *Staphylococcus aureus* in tilapia-processing facilities. **Food Science and Technology International**, v. 24, n. 3, p. 108201321774275, nov. 2017.
- WANG, K. J. et al. Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish (*Pseudosciaena crocea*) and the antimicrobial activity of its synthetic peptide. **Peptides**, v. 30, n. 4, p. 638–646, 2009.

- WHO. Zoonotic Diseases: A guide to establishing collaboration between animal and human health sectors at the country level. **World Health Organization 2008**, 2008.
- WHO. ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on Surveillance. **World Health Organization**, 2014.
Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1>.
- WIRTANEN, G.; SALO, S. Disinfection in food processing - Efficacy testing of disinfectants. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 2, n. 2-4, p. 293-306, 2003.
- WOYNAROVICH, E. **Tambaqui e pirapitinga: propagação artificial e criação de alevinos**. Codevasf ed. [s.l.: s.n.]
- ZABALA, A. J. et al. Situación de los desinfectantes de uso ambiental y en industria alimentaria registrados en España tras la publicación de la Directiva 98/8/CE. **Rev. Esp. Salud Publica**, v. 85, p. 175-188, 2011.
- ZHAO, J. G. et al. Antimicrobial activity-specific to Gram-negative bacteria and immune modulation-mediated NF- κ B and Sp1 of a medaka β -defensin. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, n. 4, p. 624-637, 2009.

4. PERFIL PEPTÍDICO E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO MUCO EPIDÉRMICO DE PACU (*PIARACTUS MESOPOTAMICUS*) E TAMBAQUI (*COLOSSOMA MACROPOMUM*)

RESUMO

O muco epidérmico constitui a primeira linha de defesa para os organismos que vivem em ambientes aquáticos, dada a grande diversidade de microrganismos com os quais eles têm contato. Como mecanismo de proteção, o muco vem sendo estudado por possuir características biotecnológicas e com potencial de atividade antioxidante, antimicrobiana e antifúngica. Neste estudo foram coletadas amostras de muco epidérmico de duas espécies de peixes nativos do Brasil, pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*), em duas épocas do ano: estação seca e úmida. Os tambaquis apresentaram média de peso de 2,97 kg \pm 0,37 na época seca e o pacu de 2,45 kg, \pm 0,16, enquanto na época úmida os tambaquis apresentaram média de peso de 4,45 kg \pm 0,92 e o pacu de 2,89 kg \pm 0,33. A concentração proteica do muco coletado foi determinada, resultando em valores médios entre 0,88 e 5,65 mg/mL. As amostras foram purificadas (filtração e centrifugação) e fracionadas em colunas Sep-Pack (C18), utilizando isopropanol e TFA (0,1%) em concentrações de 0%, 20%, 40%, 60%, 80% e 100% para eluição e separação das frações. As frações foram analisadas quanto à atividade antimicrobiana frente a quatro bactérias de extrema relevância para a indústria de alimentos: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*. O perfil proteico obtido por eletroforese de gel de acrilamida a 12% indicou massas moleculares entre 10 kDa e 250 kDa. As frações que apresentaram maior atividade inibitória diante das quatro bactérias foram aqueles com menores massas moleculares, principalmente com menos de 13 kDa.

Palavras-chave: Muco epidérmico; atividade antimicrobiana; *Piaractus mesopotamicus*; *Colossoma macropomum*; SDS-PAGE

ABSTRACT

The epidermal mucus constitutes the first defense front-line for organisms living in aquatic environments, due to the wide diversity of microorganisms they have contact with. As a protection mechanism, mucus has been studied for having biotechnological characteristics and potential antioxidant, antimicrobial and antifungal activities. In this study, epidermal mucus samples were collected from two Brazilian native fish species, pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and tambaqui (*Colossoma macropomum*), in two seasons: dry and wet. The tambaqui individuals weighed 2.97 kg \pm 0.37 in the dry season and the pacu 2.45 kg, \pm 0.16, while in the wet season the tambaquis had a mean weight of 4.45 kg \pm 0.92 and the pacu 2.89 kg \pm 0.33. The protein concentration of the collected mucus was determined, resulting in average values between 0.88 and 5.65 mg/mL. The samples were purified (filtration and centrifugation) and fractionated on Sep-Pack columns (C18) using isopropanol and TFA (0.1%) at concentrations of 0%, 20%, 40%, 60%, 80% and 100% for elution and fractions separation. The fractions were analyzed for antimicrobial activity against four bacteria of extreme relevance to the food industry: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica*. The protein profile obtained by 12% acrylamide gel electrophoresis indicated molecular weights between 10 kDa and 250 kDa. The fractions that showed the highest inhibitory activity against the four bacteria were those with lower molecular weights, mainly less than 13 kDa.

Keywords: Epidermal mucus; antimicrobial; *Piaractus mesopotamicus*; *Colossoma macropomum*; SDS-PAGE

4.1. Introdução

Segundo o relatório da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) de 2018, as taxas crescentes de resistência a antimicrobianos vem se tornando um grande problema de saúde pública. Medidas como melhoramento de práticas de higiene em hospitais, contenção de superdosagens de antibióticos, uso de testes apropriados para verificar se infecções são virais ou bacterianas e campanhas de mídia de massa podem salvar 1,6 milhões de vidas até 2050 dos 33 países incluídos na análise da OCDE. As consequências desse problema, segundo a previsão da OCDE é de que o custo chegue a 3,5 bilhões de dólares, em média, por ano a esses 33 países do estudo. O estudo também aponta que 2,4 milhões de pessoas podem morrer por contaminações de microrganismos resistentes a antimicrobianos entre 2015 e 2050 na Europa, Estados Unidos e Austrália, sendo quase 30.000 mortes por ano nos Estados Unidos por essa causa. Em países como Brasil, Indonésia e Rússia a ocorrência da resistência é ainda mais preocupante, pois entre 40 e 60% das infecções já são causados por microrganismos resistentes, contra 17% em outros países da OCDE, o que pode vir a causar ônus nos custos nos sistemas e na saúde das populações (OCDE, 2018).

Além disso, diante do conceito de *One Health*, essa problemática é ampliada a toda a cadeia de produção de alimentos, visto que as comunidades microbianas são compartilhadas, formando um microbioma entre humanos, animais e ambientes, sejam esses agrários ou urbanos (TRINH et al., 2018).

Os peptídeos antimicrobianos (AMP – *antimicrobial peptides*) representam uma possível solução a essa problemática, pois constituem famílias de peptídeos provenientes da natureza que possuem atividade antimicrobiana. Os primeiros AMPs foram encontrados em anfíbios na década de 80 e a partir de então diversas famílias vem sendo estudadas e descobertas. Os peptídeos provenientes dos peixes passaram a ser estudados posteriormente e vem sendo notado, pois possuem grande atividade antimicrobiana e propriedades imunomodulatórias. Portanto, há um grande esforço recente para avaliar o potencial desses peptídeos como agentes terapêuticos na medicina e na aquicultura (MASSO-SILVA; DIAMOND, 2014).

Ademais a bioprospecção de novos agentes antimicrobianos provenientes de plantas e animais é um campo acentuado em biotecnologia, visto que essa imunidade dada aos organismos possui diferentes tipos de resposta e defesa para conter a propagação de patógenos e coincidem com a demanda por produtos alternativos aos já existentes como sanitizantes e antibióticos (GAMES et al., 2015).

Contudo, entender mecanismos de defesa de diversas espécies pode contribuir para uma nova via de entendimento e alternativa aos antibióticos. Além disso, estudar espécies nativas de pescado fortalece e traz visibilidade para um setor com oportunidade de crescimento no país.

Apesar de o Brasil possuir uma das maiores biodiversidades de espécies de água doce do planeta, essas espécies nativas ainda são pouco estudadas. O tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) são importantes espécies nativas, inclusive o tambaqui é altamente atrativo aos pescadores e moradores da região Norte por ter uma carne saborosa (COSTA et al., 2012), justificando estudos de ciência básica e bioprospecção inerentes à essas espécies. Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar amostras de muco de duas espécies de pescado nativas do Brasil - pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) – com foco na atividade antibacteriana diante de quatro bactérias relevantes à saúde humana e à produção de alimentos: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*.

4.2. Material e métodos



Figura 4. Diagrama de análises realizadas neste trabalho.

4.2.1. Coleta do muco epidérmico de tambaqui e pacu

As coletas de muco epidérmico de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) foram realizadas no Centro de Aquicultura da Unesp (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), localizado em Jaboticabal (SP). Foram realizadas duas coletas, denominadas seca (novembro) e úmida (fevereiro). A temperatura e o pH da água do tanque dos peixes coletados foram monitoradas em três pontos diferentes, usando um termômetro e fitas teste de pH. Na primeira coleta, foram coletados muco de 15 indivíduos de cada espécie e na segunda coleta, 15 indivíduos de tambaqui e 25 de pacu, todos vivos e saudáveis. A coleta foi realizada anteriormente ao fornecimento de ração aos animais para evitar contaminação fecal e os peixes foram retirados por meio de rede dos tanques escavados. Cada indivíduo foi imobilizado em bandeja plástica esterilizada. Nesse processo os olhos foram tapados com um pano, conforme a Figura 5. Todos os peixes foram medidos com comprimento total e pesados.

O muco epidérmico foi coletado por raspagem suave da superfície dorsolateral do corpo com espátula para evitar qualquer contaminação urogenital no lado ventral. Os peixes voltaram aos mesmos tanques posteriormente, com os cuidados necessários, visando o bem estar animal.



Figura 5. Raspagem de pacu em bandeja plástica esterilizada

As amostras coletadas foram acondicionadas em frascos estéreis e imediatamente encaminhadas ao laboratório sob condições refrigeradas em caixa térmica para evitar o crescimento bacteriano e a degradação proteica.



Figura 6. Local da coleta de peixes na Unesp Jaboticabal



Figura 7. Tanque de cultivo majoritário de pacu



Figura 8. Tanque de cultivo majoritário de tambaqui – processo de despesca

4.2.2. Purificação e fracionamento do muco epidérmico

O método de purificação e fracionamento de amostras de muco previamente descrito por Conceição et al. (2012) foi adaptado para tratamento das amostras coletadas. As amostras de muco epidérmico de pacu e tambaqui foram diluídas em tampão fosfato salino PBS (composto por 7,6 g de cloreto sódico, 0,2g de cloreto potássico, 0,71 g de fosfato dipotássico e 0,245 g de fosfato sódico por litro de água destilada) em uma relação 1:1. As amostras diluídas foram então centrifugadas durante 30 min a 20000×g a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para

posterior quantificação proteica e purificação. Essa fração do muco de pacu e tambaqui foi submetida à extração de fase reversa utilizando os cartuchos Sep-Pak C18 1 g Vac (55-105 μm) de 6 mL (Waters) sob vácuo. Os cartuchos foram primeiramente ativados com 30 mL de metanol e equilibrados com 10 mL de ácido acético 10% (v/v). Volumes de 30 mL de amostra foram carregados em cada cartucho. Depois, os cartuchos foram lavados com 10 mL de TFA a 0,1% (v/v). As proteínas e peptídeos retidos nos cartuchos foram então eluídos sequencialmente com 10 mL de isopropanol a 20%, 40%, 60% e 80% (v/v), sequencialmente, contendo 0,1% (v/v) TFA. Cada fração foi coletada separadamente em tubos tipo Falcon estéreis e armazenados em freezer.

Após o fracionamento, o isopropanol da eluição foi evaporado com nitrogênio em cilindro e, posteriormente, as amostras foram liofilizadas no Lioptop L101 (Lioptop) a -50°C , 187 μHg e 208 Vca, durante 96 horas, aproximadamente. Os materiais liofilizados foram ressuspensos em 0,5 mL de água Milli-Q e o conteúdo proteico foi determinado através do método de Bradford (1976) antes e após a purificação.

4.2.3. Quantificação proteica

O teor de proteína do sobrenadante e das frações extraídas dos cartuchos Sep-Pack das duas espécies e das duas coletas foi determinado pelo método de Bradford (1976) utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Foi adicionado 1 mL de reagente de Bradford a 20 μL de cada amostra, permitindo a reação durante 2 minutos sob temperatura ambiente. As amostras foram diluídas em água Milli-Q estéril até obter leituras de densidade ótica a 595 nm entre 0,2 e 0,4. A concentração de proteína (mg/mL) foi calculada com a equação resultante da curva padrão obtida com concentrações de BSA entre 0,1 e 0,9 mg/mL.

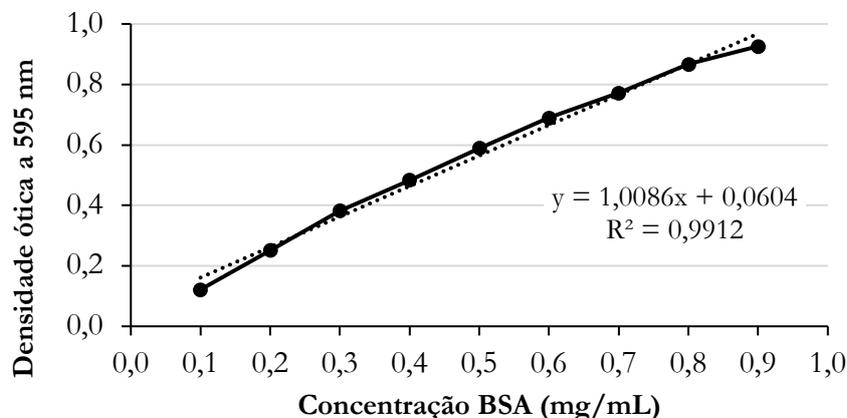


Figura 9. Curva padrão obtida com a leitura da densidade ótica a 595 nm de concentrações de albumina de soro bovino (BSA) entre 0,1 e 0,9 mg/mL.

4.2.4. Caracterização por eletroforese (SDS-PAGE)

A análise de caracterização de proteínas através de massa molecular foi realizada em parceria com a Universidade de Davis, na Califórnia. As amostras liofilizadas foram misturadas em vortex em proporção 1:1 (v/v) em solução Laemmli e colocadas em banho-maria a 95°C durante 5 min, como descrito por Laemmli (1970). Uma solução tampão Tris-HCl (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3) foi utilizado como tampão de corrida (Bio Rad, Hercules, CA, USA).

A separação por eletroforese das proteínas foi realizada em gel de acrilamida 12% (CriterionTM TGX Precast Gels, Bio Rad, Hercules, CA, USA) a 200 V, temperatura ambiente durante 1 hora. Após a corrida, o gel foi

reavalado com Comassie Blue e sua imagem foi obtida por digitalização em sistema Gel DOCTM EZ. Um padrão de proteínas de 10 a 250 kDa (Precision Plus Protein™ Dual Color Standard, Bio Rad, Hercules, CA, USA) foi utilizado como referência para o cálculo dos fatores de retenção e respectivas massas moleculares das proteínas das amostras. A distribuição relativa das bandas para cada amostra foi calculada utilizando o software Image Lab software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada seguindo recomendações da CLSI (CLSI, 2018) e com um método de microdiluição em caldo previamente otimizado (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ; GALVÃO; OETTERER, 2017). A atividade antimicrobiana foi realizada com cada uma das frações eluídas em Sep-Pak C18 (Waters).

Cepas de referência adquiridas da Coleção Espanhola de Cultivos (CECT, Valencia, Espanha) dos principais patógenos veiculados por alimentos (*Escherichia coli* (ATCC 13706), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Salmonella enterica subsp. enterica* (CECT 704) foram testadas diante das frações de isopropanol, (0%, 20%, 40%, 60% e 80%) utilizadas em Sep-Pack.

Para verificar a atividade antimicrobiana, os cultivares bacterianos foram crescidos durante 24 h em caldo trypticase de soja (TSB) e ajustados a uma absorbância de $0,100 \pm 0,01$ a 700 nm com tampão fosfato salino (PBS). Este valor corresponde a uma concentração celular de aproximadamente 10^8 UFC/mL. As células suspensas em PBS foram diluídas em TSB até obter 10^5 UFC/mL, aproximadamente. Aliquotas de 20 μ L de cada inóculo (equivalente a $\sim 2 \times 10^4$ UFC) foram expostas a 20 μ L de cada uma das concentrações de muco eluídas em Sep-Pak C18 (0%, 20%, 40%, 60% e 80% de ambas as espécies) em uma microplaca estéril de 96 poços de fundo plano (Kasvi). Foram incluídas em todas as análises um controle positivo com o inóculo das bactérias sem o muco e o branco com cada uma das frações do muco sem o inóculo.

As microplacas foram incubadas durante 24 h a 37°C sob condições estáticas em estufa. Transcorrido esse tempo, os poços foram coloridos com 10 μ L de sal de sódio resazurina 0,01% (m/v) (Sigma-Aldrich) e incubados a 37°C. Foi realizada a verificação de mudança de cor (de roxo a rosa, sendo rosa com crescimento bacteriano e roxo, ausência) produzida pelas bactérias sobreviventes a cada 30 min, indicando assim quais as frações de muco inibiram as bactérias.

4.2.6. Análises estatísticas

Os resultados experimentais foram analisados com o software IBM SPSS 19.0. A significância estatística foi calculada mediante análise de variância unidirecional. A homogeneidade de variâncias foi examinada mediante um teste post hoc de diferença mínima significativa (LSD). Foram realizados também testes t-Student para amostras independentes para determinar diferenças estatísticas entre pares de cepas. A significância estatística foi aceita a um nível de confiança maior de 95% ($p < 0,05$).

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Coleta

Os tanques nos quais foram capturados os indivíduos de cada espécie na coleta seca apresentaram média de temperatura de $22,67^{\circ}\text{C} \pm 0,78$ e pH de $6,0 \pm 0,0$. Na coleta úmida a média foi de $21,2^{\circ}\text{C} \pm 1,3$ e pH de $6,7 \pm 0,3$. Segundo Garcia et al. (2008), a maioria das espécies de peixes tropicais possui faixa térmica para crescimento e reprodução entre 20 e 28°C . Para o pacu, a condição térmica entre 23 e 29°C é a que garante melhores condições de crescimento, sendo 16°C uma temperatura letal para essa espécie. Para o tambaqui, a melhor faixa para crescimento é de 25 a 34°C , sendo letal temperaturas menores de 18°C (GARCIA et al., 2008). As condições apresentadas, portanto, nos tanques de coleta são melhores para o pacu e um pouco abaixo das condições ótimas para o tambaqui, o que pode configurar um fator de estímulo ou de estresse para produção a mais de muco dessa espécie.

As medidas de peso (kg) e comprimento (cm) estão na Figura 10.

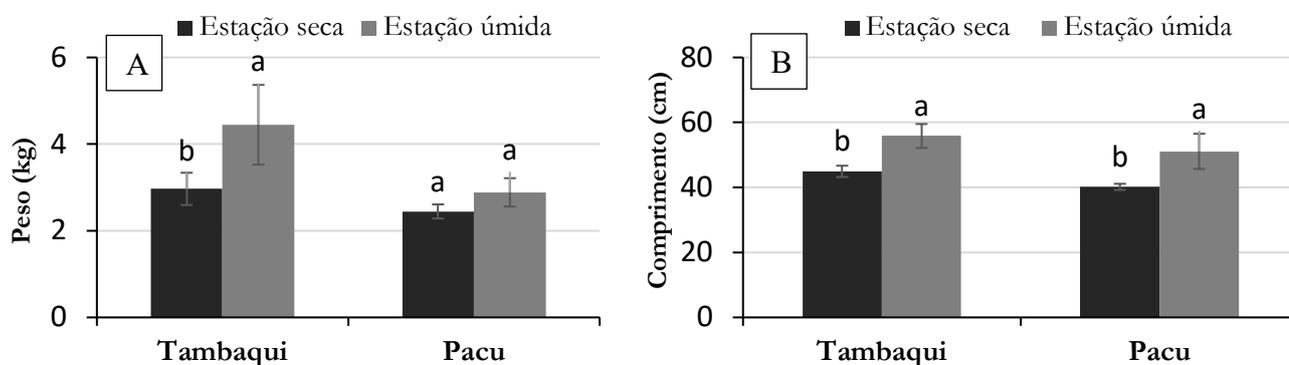


Figura 10. Peso (A) e comprimento (B) médio de pacu e tambaqui na estação seca (novembro) e úmida (fevereiro). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as estações para cada espécie com $p < 0,05$, feitas para cada grupo de amostras separadamente.

O peso do pacu não apresentou diferença significativa entre as estações (para a estação seca foi $2,45 \text{ kg} \pm 0,16$ e $2,89 \text{ kg} \pm 0,33$ para a úmida). Enquanto para o tambaqui houve diferença significativa ($p < 0,05$) no peso, demonstrando $2,97 \text{ kg} \pm 0,37$ na estação seca e $4,45 \text{ kg} \pm 0,92$ na estação úmida. Em relação ao comprimento, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) nas duas espécies entre os períodos de coleta. Para o pacu o comprimento foi de $40,17 \text{ cm} \pm 0,96$ na estação seca, enquanto na estação úmida foi maior, apresentando média de $51,10 \text{ cm} \pm 5,42$. No tambaqui, o comprimento também foi maior na estação úmida, sendo $44,95 \text{ cm} \pm 1,74$ na estação seca e $55,83 \text{ cm} \pm 3,69$ na estação úmida. Essas diferenças podem estar relacionadas ao manejo alimentar e às condições de cultivo dos peixes, porém não é objetivo desse trabalho analisar produtividade e manejo, mas apenas apresentar quanto a superfície disponível de muco pode ter sofrido influências durante as épocas do ano. Além disso, o tambaqui, por ser um peixe de grande rusticidade e adaptação elevada tanto aos ambientes, quanto a clima e rações, possui alta taxa de crescimento em relação a outras espécies (SANTOS et al., 2018).

No total, foram obtidos 30 mL de muco provenientes de 15 indivíduos de pacu (2 mL/peixe) e 40 mL em 15 indivíduos de tambaqui ($2,66 \text{ mL/peixe}$) na coleta seca. Na estação úmida foram coletados 120 mL de muco de 25 indivíduos de pacu ($4,8 \text{ mL/peixe}$) e 140 mL de 15 indivíduos de tambaqui ($9,33 \text{ mL/peixe}$). As células que produzem o muco epidérmico dependem constantemente de fatores fisiológicos e ecológicos, ficando suscetíveis a fatores como

pH, salinidade, estresses e condições de crescimento, podendo explicar essa diferença de volume entre coletas (SUBRAMANIAN; ROSS; MACKINNON, 2008).

A temperatura da água é um dos fatores externos que mais influencia o crescimento dos peixes e, nos meses de inverno, como há queda na temperatura, os peixes diminuem o metabolismo, reduzindo a ingestão de alimentos e a resposta imune (SANTOS et al., 2018).

4.3.2. Conteúdo proteico das amostras de muco

O teor de proteína quantificado por Bradford das amostras de muco antes da etapa de purificação em Sep-Pack apresentou-se maior significativamente ($p < 0,05$) nas amostras de tambaqui em relação ao pacu. O muco de tambaqui apresentou média de $5,65 \text{ mg/mL} \pm 0,39$ na estação seca e o pacu $1,99 \text{ mg/mL} \pm 0,09$. Na estação úmida o tambaqui apresentou $3,03 \text{ mg/mL} \pm 0,11$ e o pacu teve, em média $0,88 \text{ mg/mL} \pm 0,09$ de proteína. Entre as duas coletas houve diferença significativa entre as quantidades de proteínas entre as estações, sendo maior na estação seca que na úmida e também entre as espécies, com valores superiores de tambaqui em relação ao pacu, demonstrado pelo asterisco no gráfico.

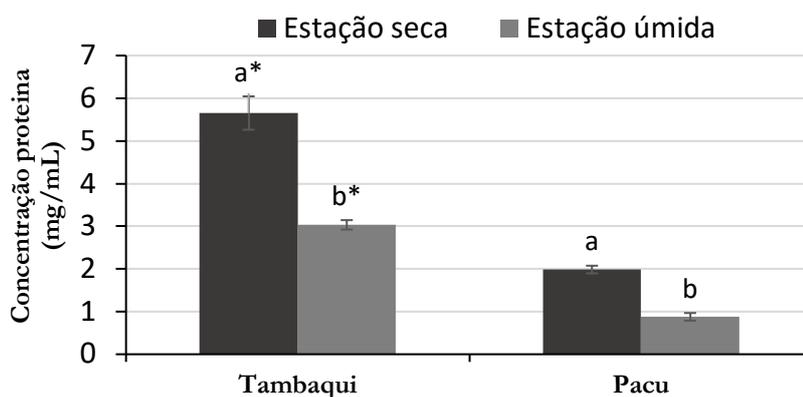


Figura 11. Análise de quantidade de proteína (mg/mL) no muco nas duas coletas realizadas e nas duas espécies antes da eluição. As letras diferenciam as concentrações na mesma espécie entre as estações ($p < 0,05$) e os asteriscos indicam a diferença significativa ($p < 0,05$) de concentração de proteínas entre as duas espécies quando coletadas na mesma estação

Após a eluição nos cartuchos Sep-Pak C18, as frações de muco de tambaqui apresentaram maiores concentrações de proteína em mg/mL. Com a separação das frações do muco epidérmico, diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas entre as eluídas com 0,1% (v/v) de TFA e 20%, 40%, 60% e 80% de isopropanol (Figuras 12 e 13) de amostras de ambas as estações, exceto para a fração eluída com 80% de isopropanol (tambaqui) e 20% (pacu). No muco de tambaqui, o maior conteúdo proteico foi detectado na fração eluída com 0,1% (v/v) de TFA na estação seca, com média de $7,95 \pm 2,79 \text{ mg/mL}$ de proteína, seguida das frações eluídas com 40% de isopropanol ($1,87 \text{ mg/mL} \pm 0,06$) na estação úmida. Entretanto, conteúdos reduzidos de proteína foram detectados na estação úmida, se comparados com a estação seca. As frações eluídas a 20% e 60% demonstraram conteúdo proteico em torno de 1 mg/mL . Nas amostras coletadas na estação úmida os 40% de isopropanol extraíram mais proteínas do muco do tambaqui.

Para o pacu as maiores concentrações de proteína foram na estação úmida ($1,51 \text{ mg/mL} \pm 0,03$) na extração com 40% de isopropanol. As extrações com 20% em ambas as estações não tiveram diferença significativa nessa espécie.

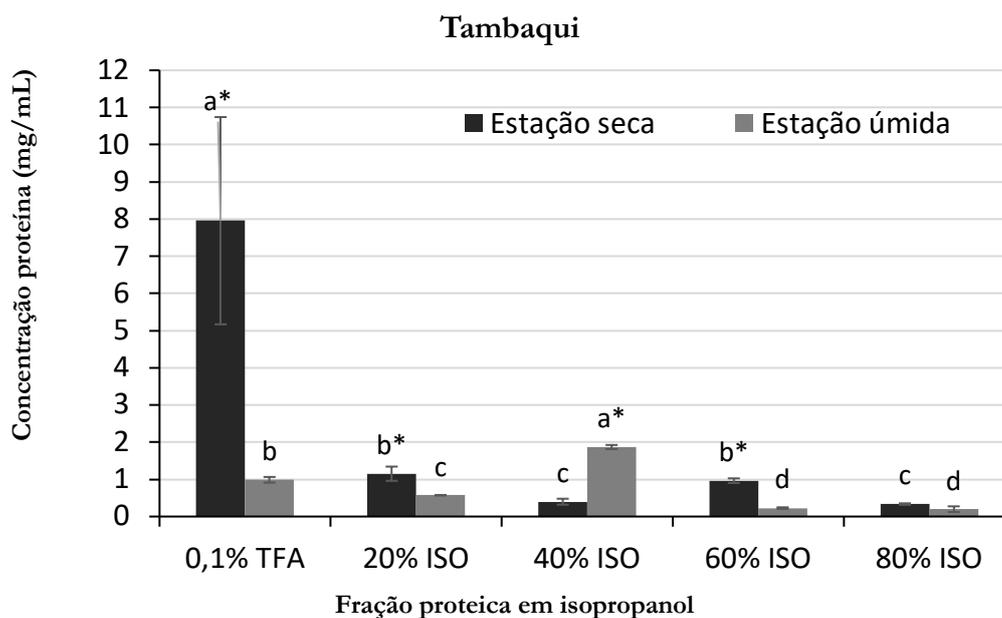


Figura 12. Concentração proteica (mg/mL) de muco epidérmico de tambaqui e suas frações em duas coletas. As letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as frações de isopropanol para cada estação e o asterisco indica quando a concentração de uma mesma fração foi significativamente maior ($p < 0,05$) em uma estação em relação a outra.

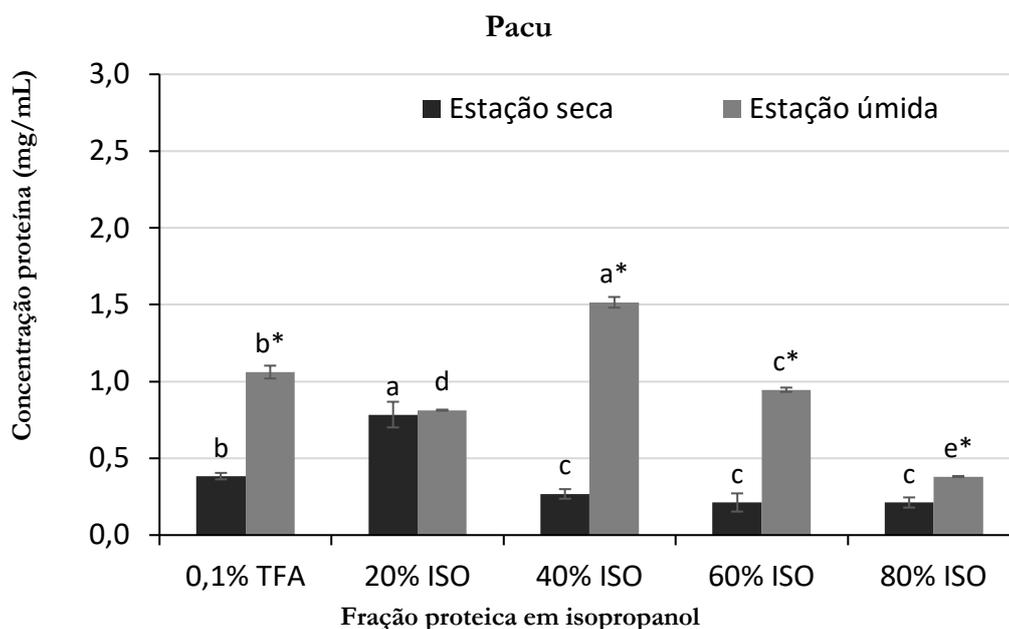


Figura 13. Concentrações proteica (mg/mL) de muco epidérmico de pacu e suas frações em duas coletas. As letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as frações de isopropanol para cada estação e o asterisco indica quando a concentração de uma mesma fração foi significativamente maior ($p < 0,05$) em uma estação em relação a outra.

As estações e condições ambientais, ecológicas, de crescimento, amadurecimento ou possíveis estresses podem ter influenciado nas diferenças entre as duas coletas realizadas, já que o muco varia sensivelmente de acordo com as condições adversas externas e internas, modificando as características bioquímicas (SUBRAMANIAN; ROSS; MACKINNON, 2008; CONCEIÇÃO et al., 2012).

Como foram utilizados cartuchos de fase reversa, o perfil de peptídeos deve ser mais polar nas primeiras extrações, pois trata-se de uma fase móvel mais polar que a fase estacionária (WATERS, 2013). Para o tambaqui, houve

maiores concentrações proteicas nos volumes menores de isopropanol, com cadeias mais polares, porém para o pacu esse perfil muda, estando na concentração de 40% a maior concentração proteica. Além disso, essas concentrações proteicas mudam de acordo com as coletas de estação seca e úmida e não demonstram, necessariamente, relação direta entre maior atividade antibacteriana e maior concentração proteica.

4.3.3. Perfil de proteínas

O perfil de proteínas dos extratos obtidos de pacu e tambaqui analisados por meio de gel de eletroforese apresentaram perfis de proteína entre 10 e 250 kDa, sendo proeminente em ambas as espécies peptídeos entre 10 e 15 kDa. Subramanian; Ross; Mackinnon (2008) encontraram massas moleculares em hadoque (*Melanogrammus aeglefinus*) e truta (*S. fontinalis*) inferiores a 25 kDa, endossando a possibilidade de peptídeos menores existentes em mucos de pescado e que possuem características de peptídeos antimicrobianos de baixa massa molecular. Em Conceição et al (2012), a banda encontrada no muco extraído de arraia foi de 16 kDa de massa molecular. Hiwarale et al. (2016) encontrou perfil de proteínas de 20 kDa.

O perfil em SDS representado na Figura 14 demonstra bandas concentradas em poços com massas moleculares menores.

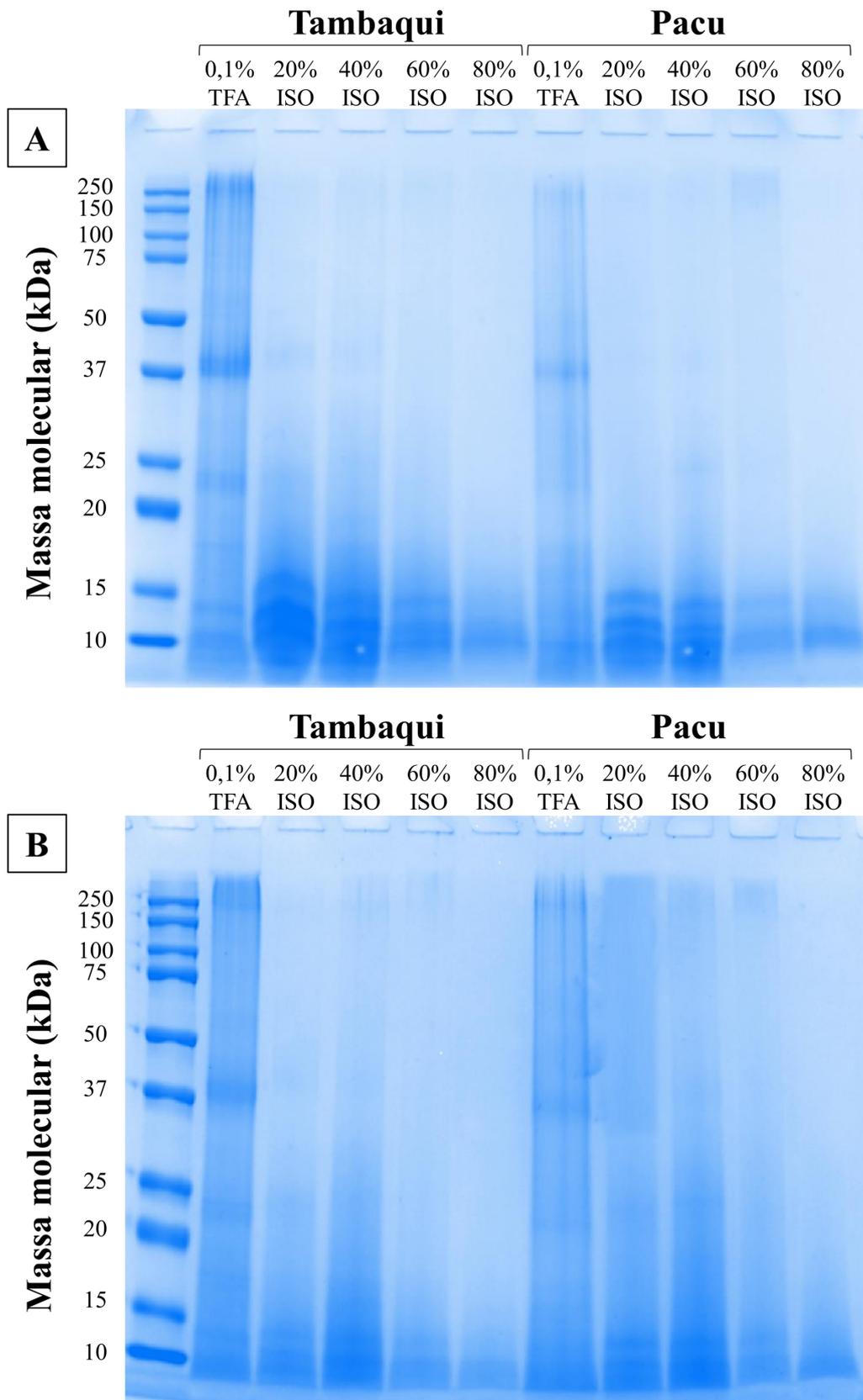


Figura 14. Perfil de proteínas SDS-PAGE das frações de muco epidérmico de tabacqui e pacu coletadas na estação seca (A) e úmida (B).

Tabela 1. Massa molecular das amostras de tabaqui em época seca e úmida distribuídas proporcionalmente nos poços de SDS-PAGE

Distribuição relativa de polipeptídeos de tabaqui										
Época seca						Época úmida				
MW (kDa)	0,1% TFA	20% ISO	40% ISO	60% ISO	80% ISO	0,1% TFA	20% ISO	40% ISO	60% ISO	80% ISO
≥ 250	25,5					27				
38,5	26,6					28				
22,9	7,5					7				
15,3	1,7					0,7				
13,1	4,3	32	27,3	17,9		2	25	23	3	
11,8	15,7	42,2	41,9	49,9		13,7	37	36	43	2
≤ 10	18,7	25,8	30,8	32,5	100	21,6	38	41	54	98

Porcentagem (v/v)

Tabela 2. Massa molecular das amostras de pacu em época seca e úmida distribuídas proporcionalmente nos poços de SDS-PAGE

Distribuição relativa de polipeptídeos de pacu										
Época seca						Época úmida				
MW (kDa)	0,1% TFA	20% ISO	40% ISO	60% ISO	80% ISO	0,1% TFA	20% ISO	40% ISO	60% ISO	80% ISO
≥ 250	6,6					8				
38,5	18,8					20				
22,9	5,6					4				
15,3	15,5					10				
13,1	2,7	31,5	26,2			1	25	25	3	
11,8	24,7	28,5	24,1	35		28	36	24	35	5
≤ 10	26,1	40	49,7	65	100	29	39	51	62	95

Porcentagem (v/v)

As duas coletas apresentaram perfis parecidos de proteínas e, portanto, demonstram peptídeos de menor massa molecular conforme aumenta a porcentagem de isopropanol na eluição. Os menores peptídeos são extraídos e concentrados em 80% de isopropanol na eluição, para ambas as espécies. A proporção que cada tamanho em kDa representa em cada fração de extração pode ser verificada nas tabelas 1 e 2. Em torno de 90% das massas moleculares concentram-se abaixo de 15 kDa para ambas as espécies.

Comparando com os teores proteicos, os perfis de distribuição demonstram que as frações eluídas com 60% e 80% de isopropanol possuem cadeias menores, demonstrando menor concentração de proteínas e com massas moleculares menores. Essas cadeias menores e com baixa massa molecular são os peptídeos que possuem maior interesse relativos aos AMPs. Provavelmente, o isopropanol em maiores concentrações extraiu os peptídeos com menores polaridades e que possuem cadeias menores de aminoácidos. Rajan et al. (2011) ao analisar o proteoma do muco epidérmico de bacalhau do Atlântico, encontraram um cluster de proteínas relacionadas ao sistema imune dos peixes, correspondente a 28% do total de outras funções do proteoma e essas proteínas possuíam de 12 a 43 kDa, aproximadamente, enfatizando quanto o proteoma do muco de peixes pode ser a fonte de inúmeras proteínas importantes, algumas ainda podendo ser desconhecidas.

4.3.4. Atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana foi avaliada para cada fração obtida, para amostras de muco da estação seca para cada espécie. As bactérias foram expostas a cada fração seguindo uma relação 1:1, referente às concentrações de proteínas.

As frações de muco do pacu eluídas a 40%, 60% e 80% de isopropanol inibiram todas as cepas testadas, exceto para *Listeria monocytogenes* exposta à fração de 40%. Com o muco do tambaqui houve inibição de todas as cepas a partir de 20% até 80% dos eluatos da purificação, com a exceção de inibição para *S. aureus* a 80%.

Conceição et al. (2012) apontam que as frações eluídas a 80% oriundas do muco da espécie de arraia (*Potamotrygon cf. henlei*) apresentaram maior atividade antimicrobiana comparadas com as de 0% e 40% frente aos microrganismos *M. luteus*, *E. coli* and *C. Tropicalis*. No presente trabalho, as frações eluídas a 40% e 80% também apresentaram atividade inibitória perante *E. coli*, tanto nas amostras de muco de pacu quanto de tambaqui. O muco de tambaqui, inclusive, apresentou atividade inibitória de *E. coli* nas frações a partir de 20% de isopropanol, como demonstrado nas tabelas 3 e 4.

As frações também possuem concentrações diferentes de proteínas. Portanto, os poços com maiores concentrações proteicas não necessariamente possuem maior atividade antibacteriana, como é possível observar nos poços de 0% e 20% para pacu e de 0% para tambaqui, cujas concentrações de proteínas totais são maiores do que as outras frações de isopropanol, mas não são as que demonstram maior atividade antibacteriana. Além disso, os resultados demonstrados no perfil de proteínas por SDS-PAGE permitem depreender que resultados mais significativos estão associados aos perfis proteicos de menores massas moleculares, associando o potencial antibacteriano aos peptídeos antimicrobianos de cadeias curtas.

Estes resultados demonstraram que grande parte do proteoma do muco epidérmico de pacu e tambaqui apresenta atividade tanto contra bactérias gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) como gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*), sendo os compostos de cadeias curtas, com massas moleculares pequenas, de grande potencial de associação com peptídeos antimicrobianos.

As frações obtidas em 60% de isopropanol, com concentração proteica de 0,10 mg/mL do pacu com massa molecular majoritariamente menores de 13 kDa e com concentração proteica de 0,40 mg/mL do tambaqui, apresentaram atividade inibitória diante das quatro bactérias, indicando o potencial para futuros trabalhos visando a identificação e quantificação dos compostos presentes para o desenvolvimento de novos antimicrobianos.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana das diferentes frações de muco epidérmico de pacu da estação seca

Isopropanol (%)	Concentração proteica (mg/mL)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC13706)	<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC15313)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC6538)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (CECT 704)
0,1% TFA	0,19	-	-	-	-
20	0,38	-	-	-	-
40	0,13	+	-	+	+
60	0,10	+	+	+	+
80	0,11	+	+	+	+

(+) indica atividade antimicrobiana; (-) indica ausência de atividade antimicrobiana

Tabela 4. Atividade antimicrobiana das diferentes frações de muco epidérmico de tambaqui da estação seca

Isopropanol (%)	Concentração proteica (mg/mL)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC13706)	<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC15313)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC6538)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (CECT 704)
0,1% TFA	3,58	-	-	-	-
20	0,55	+	+	+	+
40	0,19	+	+	+	+
60	0,49	+	+	+	+
80	0,17	+	+	-	+

(+) indica atividade antimicrobiana; (-) indica ausência de atividade antimicrobiana

4.4. Conclusão

Diante dos resultados obtidos neste trabalho é ponderado que o potencial para estudo do muco de espécies nativas e suas frações consiste em uma linha de pesquisa promissora. Os resultados demonstram que o muco analisado de pacu e tambaqui na estação seca foi capaz de inibir as quatro bactérias utilizadas nesse estudo, mesmo diante das variações de peso, comprimento e teor proteico observada entre as coletas. Além disso, sugere-se que a atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) observada pode ser relacionada aos peptídeos de cadeia curta encontrada no perfil de proteínas.

Esses peptídeos analisados podem servir de alternativas aos antimicrobianos já utilizados, não coletando diretamente dos peixes, mas depois de caracterizados e identificados, eles podem ser produzidos por meio de fermentadores biotecnologicamente, de forma a ampliar uma nova família de AMPS e que, futuramente, podem ser utilizados tanto na produção agropecuária quanto na indústria alimentícia.

REFERÊNCIAS

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 11, p. 91, 2018.
- CONCEIÇÃO, K. et al. Potamotrygon cf. henlei stingray mucus: Biochemical features of a novel antimicrobial protein. v. 60, p. 821–829, 2012.
- COSTA, G. de M. et al. Estrutura morfológica do fígado de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 947–950, 2012.
- GAMES, P. D. et al. In vitro anti-bacterial and anti-fungal activities of hydrophilic plant defence compounds obtained from the leaves of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) P. v. 0316, 2015.
- GARCIA, L. D. O. et al. Freshwater temperature in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, and its implication for fish culture. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n. 2, p. 275–281, 2008.
- HIWARALE*, D. K. et al. Assessment of Antibacterial Properties of Fish Mucus. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 5, p. 666–672, 2016. Disponível em: <file:///C:/Users/user/Downloads/article_wjpps_1461931074.pdf>.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.
- MASSO-SILVA, J. A.; DIAMOND, G. Antimicrobial peptides from fish. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 3, p. 265–310, 2014.
- OCDE. **Stemming the Superbug Tide**. Paris: OECD, 2018.
- RAJAN, B. et al. Proteome reference map of the skin mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*) revealing immune competent molecules. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, n. 2, p. 224–231, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2011.05.006>.
- SANTOS, E. L. et al. Desempenho de tambaquis (*Colossoma macropomum*) submetidos a restrição alimentar e a realimentação em tanques-rede. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 3, p. 931–938, 2018.
- SUBRAMANIAN, S.; ROSS, N. W.; MACKINNON, S. L. Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, n. 1, p. 85–92, 2008.
- TRINH, P. et al. One Health Relationships Between Human, Animal, and Environmental Microbiomes: A Mini-Review. **Frontiers in Public Health**, v. 6, n. August, p. 1–9, 2018.
- VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; GALVÃO, J. A.; OETTERER, M. Contamination sources, biofilm-forming ability and biocide resistance of *Staphylococcus aureus* in tilapia-processing facilities. **Food Science and Technology International**, v. 24, n. 3, p. 108201321774275, nov. 2017.
- WATERS. Sep-Pak Cartridges. Pioneering a Revolution in Modern Sample Preparation. p. 14, 2013. Disponível em: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000860en.pdf>.