EFEITOS DO USO DE BIOFILMES PROTETORES INCORPORADOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS NAS PROPRIEDADES DO PESCADO

Bárbara Miranda Vilela, Juan Philippe Teixeira, Miklos Maximiliano Bajay, Márcio Vargas Ramella

INTRODUÇÃO

Estima-se que até 35% da produção pesqueira e aquícola mundial seja perdida ou desperdiçada, problema associado, entre outros fatores, à deterioração microbiana e à oxidação lipídica do pescado (FAO, 2024). Filmes e revestimentos de quitosana podem atuar como barreira carreadora de óleos essenciais (OEs), combinando proteção física com a liberação gradual de compostos bioativos (Vargas-Ramella *et al.*, 2025). Como a diversidade química dos OEs dificulta a escolha de constituintes com base apenas em sua abundância, este trabalho teve como objetivo realizar a triagem computacional de compostos representativos frente a alvos proteicos de bactérias associadas à deterioração e à segurança do pescado. Para a priorização, foram integradas estimativas de afinidade e modos de ligação, métricas que ponderam o tamanho e a lipofilicidade molecular, reescoragem por rede neural, análise das interações proteína-ligante e predições de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET). Essa abordagem buscou fundamentar a seleção de candidatos a aditivos bioativos para posterior avaliação em filmes protetores à base de quitosana.

DESENVOLVIMENTO

Foram avaliados 21 estados moleculares derivados de 15 constituintes de OEs, diferenciados quanto à protonação ou à estereoquímica, quando aplicável (Figura 1, painéis 1a-b), frente a cinco alvos disponíveis no Protein Data Bank (Berman *et al.*, 2000): GyrB de *Escherichia coli* (1KZN), ThrRS de *Salmonella enterica* (7CBI), FabI de *Staphylococcus aureus* (3GR6), PrfA de *Listeria monocytogenes* (6T5I) e VtrA/VtrC de *Vibrio parahaemolyticus* (5KEW) (Figura 1, painel 1c). Os ligantes foram preparados com RDKit, Open Babel e Meeko. No redocking, a pose experimental foi recuperada em primeiro lugar em quatro alvos; para FabI, também foi examinada uma pose alternativa. O *docking* foi realizado no AutoDock Vina, com receptor rígido, ligante flexível, exhaustiveness 16, 20 modos por combinação e semente fixa, totalizando 105 combinações receptor-ligante (Trott e Olson, 2010). A análise primária utilizou a pose mais bem ranqueada, complementada pelas Eficiências Ligante (LE = -ΔG/N_átomos pesados) e por uma métrica lipofílica operacional (LLE = -ΔG - cLogP), a fim de reduzir vieses relacionados ao tamanho e à hidrofobicidade dos compostos. As poses prioritárias foram reescoradas pelo GNINA (McNutt *et al.*, 2021) e examinadas quanto a contatos hidrofóbicos, ligações de hidrogênio, pontes salinas e proximidades geométricas excessivas. O ADMET-AI (Swanson *et al.*, 2024) foi aplicado com limiar operacional de 0,50 para AMES, hERG, DILI e ClinTox. A priorização integrou cobertura dos alvos, afinidade, eficiências, reescoragem, interações e alertas preditivos.

RESULTADOS

Timol e acetato de eugenila lideraram a classificação global e integraram o Top-5 Vina de quatro dos cinco alvos, com interações polares e hidrofóbicas, suporte da reescoragem e ausência de alertas principais. Essa recorrência indicou consistência entre os alvos, mas não liderança em cada um deles. A integração das métricas priorizou GyrB-timol, ThrRS-carvacrol, FabI-timol, PrfA-acetato de eugenila e VtrA/VtrC-acetato de eugenila (Figura 1, painéis 3a-b).

Em quatro alvos, a escolha substituiu o líder de Vina por diferença máxima de 0,164 kcal/mol, favorecendo perfis menos dependentes exclusivamente da hidrofobicidade. Timol, para GyrB e FabI, e carvacrol, para ThrRS, foram priorizados em sítios funcionalmente caracterizados por coestruturas com inibidores derivados de cumarina (Lafitte *et al.*, 2002), NADP/triclosan (Priyadarshi, Kim e Hwang, 2010) e um inibidor de ThrRS (Guo *et al.*, 2020), respectivamente. Esses alvos participam do superenrolamento do DNA, da biossíntese de ácidos graxos e da aminoacilação do tRNA, processos essenciais à multiplicação bacteriana. Em *S. aureus*, restringir essa multiplicação poderia reduzir a oportunidade de formação de enterotoxinas, sem neutralizar toxinas previamente formadas (Schelin *et al.*, 2011). Timol e carvacrol são isômeros de posição, cuja distinta disposição dos substituintes pode alterar a complementaridade às cavidades. Como ambos também permeabilizaram e despolarizaram a membrana de *E. coli*, as poses levantam a hipótese de reconhecimento proteico adicional ao efeito membranar descrito (Xu *et al.*, 2008). O acetato de eugenila foi priorizado para dois reguladores de patogenicidade. PrfA coordena genes necessários à infecção por *L. monocytogenes,* cuja expressão e potencial de virulência variaram entre cepas cultivadas em salmão sob diferentes temperaturas; em 6T5I, a ocupação do sítio coativador por outro ligante comprometeu funções reguladas por PrfA em macrófagos (Tran *et al.*, 2022). Em *V. parahaemolyticus*, bactéria marinha associada ao consumo de pescado, VtrA/VtrC reconhece sais biliares e ativa VtrB e o sistema de secreção tipo III 2; a estrutura 5KEW registra esse complexo ligado ao taurodeoxicolato (Li *et al.*, 2016). Desse modo, as poses do acetato de eugenila ocorreram em cavidades funcionalmente demonstradas com outros ligantes. Sua atividade experimental contra *Vibrio* spp. fornece um precedente fenotípico, embora sem demonstrar participação de VtrA/VtrC (Acosta-Smith *et al.*, 2019). A aplicação em filmes deverá considerar as concentrações liberadas pela matriz preservam atividade microbiológica e compatibilidade sensorial. O ácido cinâmico neutro ocupou a terceira posição global, com cobertura e eficiência favoráveis; o ácido trans-cinâmico também apresentou atividade in vitro contra patógenos de peixes, embora sem elucidação dos alvos aqui avaliados (Yilmaz, Sova e Ergün, 2018). O alerta DILI limítrofe (0,554), maior no cinamato, não revela qual característica determinou a previsão. Ácidos carboxílicos podem formar conjugados reativos, mas essa associação não é universal nem comprova DILI (Weidolf e Wilson, 2023). Como o classificador não simula dose ou exposição, o alerta indica avaliação toxicológica dirigida, não lesão hepática confirmada; efeitos hepatoprotetores observados em modelo murino específico reforçam a dependência do contexto experimental (Yan *et al.*, 2017). Limoneno, p-cimeno e β-pineno apresentaram bom desempenho alvo-específico, porém contatos exclusivamente hidrofóbicos, oferecendo menos elementos para separar reconhecimento proteico da contribuição geral da lipofilicidade. A interação membranar já demonstrada para p-cimeno reforça essa interpretação alternativa. Por fim, a ausência de colisões estéricas severas reduz a possibilidade de artefatos geométricos grosseiros, sem estabelecer estabilidade de ligação ou mecanismo de ação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A triagem priorizou timol e acetato de eugenila como candidatos mais equilibrados, além de carvacrol para ThrRS e ácido cinâmico sob cautela toxicológica. Os resultados correspondem a hipóteses de interação, não comprovação de atividade ou segurança. A seleção orientará ensaios microbiológicos, toxicológicos e de compatibilidade com filmes de quitosana.

Palavras-chave: ADMET; bactéria patogênica; inocuidade alimento; *docking* molecular; metabólito bioativo; embalagem funcional.

ANEXOS

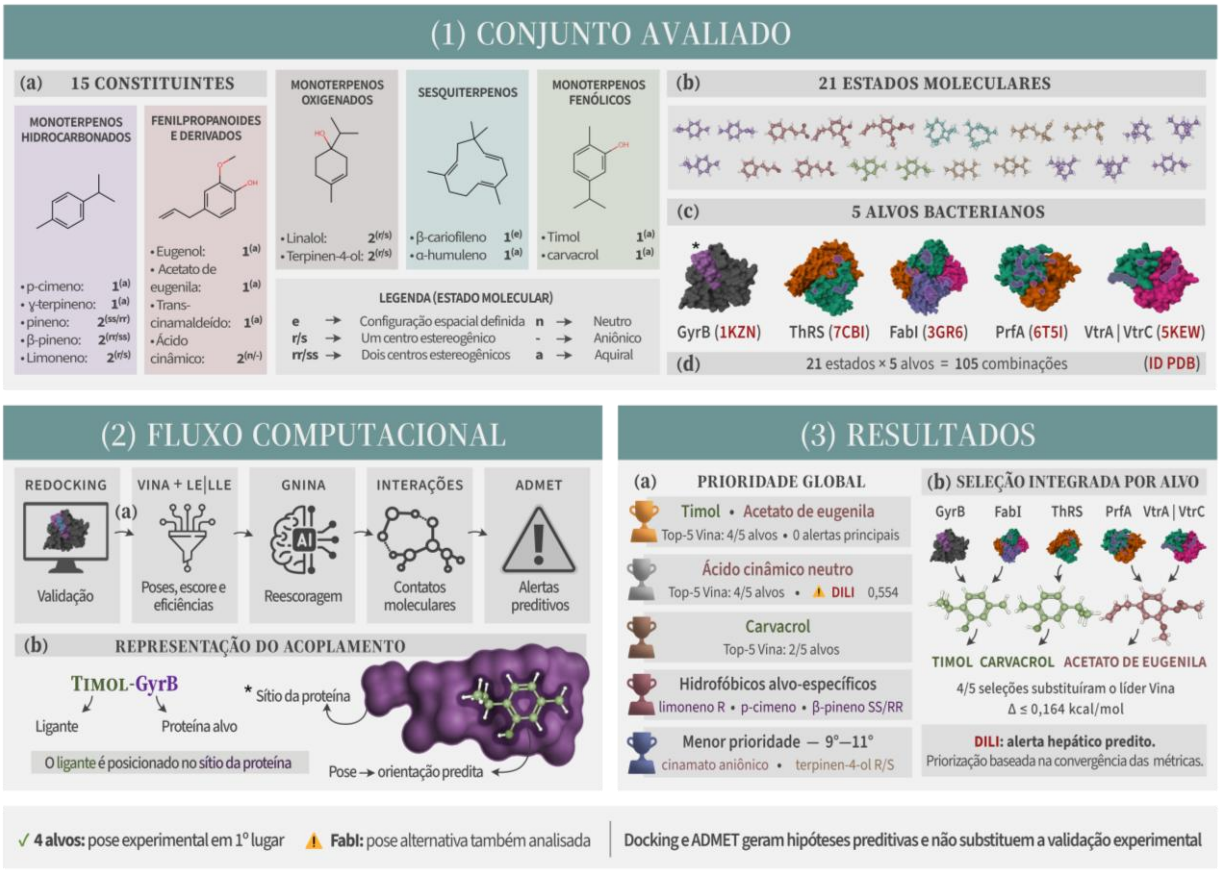


Figura 1. *Triagem computacional integrada de constituintes de óleos essenciais frente a alvos bacterianos associados à inocuidade e qualidade do pescado. Fonte: elaborado pela autora.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-SMITH, E. *et al*. Piper betel compounds piperidine, eugenyl acetate, and chlorogenic acid are broad-spectrum anti-Vibrio compounds that are also effective on MDR strains of the pathogen. **Pathogens**, v. 8, n. 2, p. 64, 2019. DOI: https://doi.org/10.3390/pathogens8020064.

BERMAN, H. M. *et al*. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022: towards Blue Transformation.** Rome: FAO, 2022. DOI: https://doi.org/10.4060/cc0461en.

GUO, J. *et al*. Structure-guided optimization and mechanistic study of a class of quinazolinone-threonine hybrids as antibacterial ThrRS inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 207, p. 112848, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112848.

LAFITTE, D. *et al*. DNA gyrase interaction with coumarin-based inhibitors: the role of the hydroxybenzoate isopentenyl moiety and the 5′-methyl group of the noviose. **Biochemistry**, v. 41, n. 23, p. 7217–7223, 2002. DOI: https://doi.org/10.1021/bi0159837.

LI, P. *et al*. Bile salt receptor complex activates a pathogenic type III secretion system. **eLife**, v. 5, p. e15718, 2016. DOI: https://doi.org/10.7554/eLife.15718.

MCNUTT, A. T. *et al*. GNINA 1.0: molecular docking with deep learning. **Journal of Cheminformatics**, v. 13, n. 1, p. 43, 2021. DOI: https://doi.org/10.1186/s13321-021-00522-2.

PRIYADARSHI, A.; KIM, E. E.; HWANG, K. Y. Structural insights into Staphylococcus aureus enoyl-ACP reductase (FabI), in complex with NADP and triclosan. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 78, n. 2, p. 480–486, 2010. DOI: https://doi.org/10.1002/prot.22581.

SCHELIN, J. *et al*. The formation of Staphylococcus aureus enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 580–592, 2011. DOI: https://doi.org/10.4161/viru.2.6.18122.

SWANSON, K. *et al*. ADMET-AI: a machine learning ADMET platform for evaluation of large-scale chemical libraries. **Bioinformatics**, v. 40, n. 7, p. btae416, 2024. DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btae416.

TRAN, T. T. *et al*. Inhibition of the master regulator of Listeria monocytogenes virulence enables bacterial clearance from spacious replication vacuoles in infected macrophages. **PLOS Pathogens**, v. 18, n. 1, p. e1010166, 2022. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010166.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry,** v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010. DOI: https://doi.org/10.1002/jcc.21334.

VARGAS-RAMELLA, M. *et al*. Natural polymer-based coatings for animal-derived products: a review of applications, functionality, characterization, and challenges. **Foods**, v. 14, n. 13, p. 2255, 2025. DOI: https://doi.org/10.3390/foods14132255.

WEIDOLF, L.; WILSON, I. Minimizing the DILI potential of carboxylic acid-containing drugs: a perspective. **Medicinal Chemistry Research**, v. 32, n. 9, p. 2034–2047, 2023. DOI: https://doi.org/10.1007/s00044-023-03140-9.

XU, J. *et al*. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against Escherichia coli**.** **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 174–179, 2008. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x.

YAN, S.-L. *et al*. Reversal of ethanol-induced hepatotoxicity by cinnamic and syringic acids in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 98, pt. B, p. 119–126, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.10.025.

YILMAZ, S.; SOVA, M.; ERGÜN, S. Antimicrobial activity of trans-cinnamic acid and commonly used antibiotics against important fish pathogens and nonpathogenic isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 6, p. 1714–1727, 2018. DOI: https://doi.org/10.1111/jam.14097.