



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0710360-3 B1



(22) Data do Depósito: 24/04/2007

(45) Data de Concessão: 28/09/2021

(54) Título: PEPTÍDEOS LINEARES ANTIMICROBIANOS, SEU USO, COMPOSIÇÃO FITOSSANITÁRIA E MÉTODO PARA PREVENIR E TRATAR INFECÇÕES E DOENÇAS DE PLANTAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS

(51) Int.Cl.: C07K 14/435; A01N 37/18; A61K 38/08; A61P 31/04.

(30) Prioridade Unionista: 28/04/2006 ES P200601098.

(73) Titular(es): UNIVERSITAT DE GIRONA.

(72) Inventor(es): BARDAJÍ RODRÍGUEZ, EDUARD; MONTESINOS SEGUI, EMILI; BADOSA ROMACHO, ESTHER; FELIU SOLEY, LIDIA; PLANAS GRABULEDA, MARTA; FERRE MALAGÓN, RAFAEL.

(86) Pedido PCT: PCT ES2007000244 de 24/04/2007

(87) Publicação PCT: WO 2007/125142 de 08/11/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 28/10/2008

(57) Resumo: PEPTÍDEOS LINEARES ANTIMICROBIANOS, SEU USO, COMPOSIÇÃO FITOSSANITÁRIA E MÉTODO PARA PREVENIR E TRATAR INFECÇÕES E DOENÇAS DE PLANTAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS, que apresentam atividade antimicrobiana. Os ditos peptídeos são compostos por 11 aminoácidos e têm o grupo amina do aminoácido, que constitui a extremidade N-terminal, sem derivar ou é funcionalizado com o grupo acetila, p-toluenossulfonila, benzila ou benzoila. O aminoácido que constitui a extremidade C-terminal dos ditos peptídeos tem a forma de carboxamida. A presente invenção descreve a síntese e a utilização dos ditos peptídeos lineares como agentes antimicrobianos contra bactérias patogênicas para plantas. Também se refere a composições que compreendem os ditos peptídeos lineares e um agente auxiliar, bem como a um método para prevenir e tratar infecções e doenças de plantas causadas por bactérias patogênicas.

**“PEPTÍDEOS LINEARES ANTIMICROBIANOS, SEU USO, COMPOSIÇÃO
FITOSSANITÁRIA E MÉTODO PARA PREVENIR E TRATAR INFECÇÕES E
DOENÇAS DE PLANTAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS”**

Campo Técnico

[001] Trata-se a presente invenção de peptídeos lineares, que apresentam propriedades antimicrobianas, são particularmente eficazes contra bactérias patogênicas das plantas e podem ser utilizados em composições fitossanitárias.

Fundamentos da Invenção

[002] As bactérias fitopatogênicas são responsáveis por perdas de grande importância econômica na produção vegetal. Entre elas, destacam-se, por exemplo, as bacterioses causadas pelas bactérias *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* e *Xanthomonas vesicatoria*.

[003] Atualmente, na Europa, apenas alguns produtos são autorizados para a proteção de plantas contra doenças bacterianas, que são baseados principalmente em derivados cúpricos, com uma eficácia de controle insuficiente.

[004] Os antibióticos, como, por exemplo, casugamicina ou estreptomicina, que até poucos anos atrás eram autorizados em alguns países, não são atualmente autorizados na Europa. Os antibióticos estreptomicina e tetraciclina estão autorizados em alguns países, como, nos Estados Unidos, mas em muitos casos, tem sido destaque o surgimento de linhagens do agente patogênico resistentes, tornando, portanto, sua utilização ineficaz, ou podem representar um risco de transferência da dita resistência a outras bactérias patogênicas. No caso de infecções fúngicas provocadas por fungos fitopatogênicos, embora existam substâncias ativas disponíveis, é necessário que haja novos fungicidas de forma contínua, em parte, devido ao surgimento de resistências, com certa frequência.

[005] Além disso, muitos dos compostos antibacterianos conhecidos mais eficazes apresentam uma persistência no meio ambiente, o que não é desejável.

[006] Nos últimos anos, intensificou-se o desenvolvimento de novos tipos de antibióticos, que podem evitar a resistência das bactérias. Entre estes antibióticos, destacam-se os compostos isolados da própria natureza, como, por exemplo, os peptídeos, que estão presentes em plantas e animais, e alguns deles apresentam propriedades antimicrobianas.

[007] As cecropinas são peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa do bicho-da-seda *Hyalophora Cecropia*, em resposta a uma infecção bacteriana. Em particular, a cecropina A é um peptídeo linear composto de 37 aminoácidos, que apresenta uma potente atividade lítica contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. No entanto, existe certa relutância quanto ao seu emprego em aplicações fitossanitárias, devido ao seu elevado custo de produção, tendo uma extensão considerável e baixa estabilidade contra degradação por protease.

[008] Em Ali e outros, Mol. Plant-Microbe Interact., 2000, 13, 847-859, descreve-se um peptídeo ativo contra algumas bactérias patogênicas das plantas, como *Erwinia carotovora subsp. carotovora* e *Erwinia carotovora subsp. atroseptica*. Trata-se de um undecapeptídeo preparado pela primeira vez por Cavallarin e outros, Mol. Plant-Microbe Interact., 1998, 11, 218-227, que é formado pela seqüência de aminoácidos Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu, e que o aminoácido da extremidade C-terminal apresenta um grupo carboxamida. O dito peptídeo é um peptídeo híbrido formado por fragmentos dos peptídeos de origem natural cecropina A e melitina. Especificamente, o dito peptídeo é constituído pelos aminoácidos 2-8 de cecropina A e 6-9 de melitina.

[009] Não há descrição da aplicação do dito undecapeptídeo contra outras bactérias fitopatogênicas, como, por exemplo,

Erwinia amylovora, *Xanthomonas vesicatoria* e *Pseudomonas syringae*, que são particularmente importantes porque afetam plantas que são de grande importância econômica, e contra as quais até agora os métodos utilizados para combatê-las não são muito eficazes.

[010] Conseqüentemente, ainda há a necessidade de novos compostos antimicrobianos, que apresentem uma boa eficácia contra bactérias patogênicas das plantas, em particular, contra as bactérias *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, ou *Pseudomonas syringae*.

Objetos da Invenção

[011] Os autores da presente invenção desenvolveram novos peptídeos que são fáceis de preparar e apresentam alto índice de eficácia para inibir o crescimento de bactérias patogênicas das plantas, além de apresentarem baixa citotoxicidade nas células eucariotas e uma boa estabilidade à degradação por protease.

[012] O objeto da presente invenção consiste em apresentar peptídeos lineares que apresentem propriedades antimicrobianas.

[013] Faz parte do objeto da presente invenção, o uso dos ditos peptídeos como agentes antimicrobianos.

[014] Outro objeto da presente invenção consiste em apresentar uma composição fitossanitária que compreende os peptídeos da presente invenção e um agente auxiliar.

[015] Outro objeto da presente invenção consiste em apresentar um método para prevenir e tratar infecções e doenças das plantas causadas por bactérias.

Sumário da Invenção

Peptídeos

[016] O objeto da presente invenção consiste em

apresentar peptídeos lineares que correspondem à fórmula geral (I):



sendo que:

- X_1 é hidrogênio, acetila, *p*-toluenossulfonila, benzila ou benzoíla;
- X_2 é Lys, Tyr, Leu, Phe ou Trp, e;
- X_3 é Lys, Tyr, Val, Phe ou Trp,

com a condição de que o peptídeo em que X_1 é hidrogênio, X_2 é Trp e X_3 é Val seja expressamente excluído da presente invenção.

[017] Na fórmula geral, quando X_1 é hidrogênio, ele é representado como H, o grupo acetila é representado como Ac, o grupo *p*-toluenossulfonila é representado como Ts, o grupo benzila é representado como Bn e o grupo benzoíla é representado como Bz. As abreviaturas utilizadas para os aminoácidos no presente relatório descritivo estão de acordo com a Normativa da Comissão para a Nomenclatura Bioquímica da IUPAC-IUB, conforme descrito no livro Biochemical Nomenclature and Related Documents, 2^a edição, Portland Press, 1992, Londres [ISBN 1-85578-005-4]. Desta forma, Leu é L-leucina, Lys significa L-lisina, Ile é L-isoleucina, Phe é L-fenilalanina, L-tirosina é Tyr, Trp é L-triptofano e Val é L-valina.

[018] De acordo com a dita normativa, os peptídeos são representados pelas abreviaturas dos aminoácidos que os compõem unidos por hífen, que representam as ligações peptídicas. Assim, por exemplo, o peptídeo denominado glicilglicilglicina é simbolizado como Gly-Gly-Gly. Isto exige a alteração do símbolo Gly para glicina, $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-COOH}$, de três diferentes maneiras:

- (i) "Gly-" significa $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CO-}$
- (ii) "Gly-" significa $\text{HN-CH}_2\text{-CO-}$, e

(iii) "-Gly" significa $\text{HN-CH}_2\text{-COOH}$

[019] Portanto, quando o hífen for colocado à direita do símbolo, como no caso (i), indica que foi eliminado o grupo OH do grupo carboxílico do aminoácido; quando o hífen for colocado à esquerda do símbolo, como no caso (iii), indica que foi eliminado um átomo de hidrogênio do grupo amina do aminoácido; no caso (ii), ambas as alterações foram aplicadas ao mesmo símbolo.

[020] O aminoácido Gly- constitui a extremidade N-terminal do peptídeo e o aminoácido -Gly constitui a extremidade C-terminal do peptídeo.

[021] Como se pode observar na fórmula geral (I), todos os peptídeos da presente invenção têm o aminoácido Leu da extremidade C-terminal sob a forma de carboxamida, representado como -Leu-NH₂. O aminoácido que constitui a extremidade N-terminal dos peptídeos da presente invenção pode manter seu grupo amina sem derivar, ou então ele mesmo pode ser funcionalizado com um grupo acetila, *p*-toluenossulfonila, benzoíla ou benzila, conforme expresso na fórmula geral (I).

[022] Quando o grupo amina não é derivado, isto é, quando X₁ é hidrogênio, no presente relatório, considera-se que o símbolo H-X- é equivalente ao símbolo X-, que é a forma adotada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), no caso (i) já mencionado.

[023] As estruturas do peptídeo da presente invenção são definidas de acordo com a fórmula geral (I).

[024] Outra maneira de definir a estrutura dos peptídeos da presente invenção consiste em utilizar as seqüências de aminoácidos SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 25, e também especificando a funcionalidade que representam na extremidade N-terminal e na extremidade C-terminal dos peptídeos. Como indicado acima, todos os peptídeos da presente invenção têm o aminoácido que forma a extremidade C-terminal sob a forma de carboxamida.

[025] As seqüências mencionadas apresentam os aminoácidos que são apresentados na Tabela I:

TABELA I

SEQ_ID_NO:	Estrutura
1	Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu
2	Tyr-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu
3	Leu-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu
4	Phe-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu
5	Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu
6	Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu
7	Tyr-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu
8	Leu-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu
9	Phe-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu
10	Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu
11	Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu
12	Tyr-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu
13	Leu-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu
14	Phe-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu
15	Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu
16	Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Phe-Leu
17	Tyr-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Phe-Leu
18	Leu-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Phe-Leu
19	Phe-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Phe-Leu

20	Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Phe-Leu
21	Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Trp-Leu
22	Tyr-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Trp-Leu
23	Leu-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Trp-Leu
24	Phe-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Trp-Leu
25	Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Trp-Leu

[026] A sequência denominada SEQ_ID_NO:15 corresponde à sequência do peptídeo descrito por Cavallarin e outros, Mol. Plant-Microbe Interact., 1998, 11, 218-227, cujo derivado carboxamida na extremidade C-terminal da sequência encontra-se expressamente excluído da presente invenção.

[027] Entre os peptídeos da presente invenção considerados preferidos, encontram-se os peptídeos definidos pelas seqüências SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 14, e SEQ_ID_NO: 16 a SEQ_ID_NO: 25, e têm o aminoácido da extremidade C-terminal sob a forma do grupo carboxamida.

[028] Dentro deste grupo, são especialmente preferidos os peptídeos definidos pelas seqüências SEQ_ID_NO: 6 a SEQ_ID_NO: 11, SEQ_ID_NO: 13, SEQ_ID_NO: 16, SEQ_ID_NO: 18 a SEQ_ID_NO: 22, e SEQ_ID_NO: 25, e têm o aminoácido da extremidade C-terminal na forma de grupo carboxamida.

[029] Particularmente preferidos são os peptídeos definidos pelas seqüências SEQ_ID_NO: 6 e SEQ_ID_NO: 16, e têm o aminoácido da extremidade C-terminal na forma de grupo carboxamida. O último destes dois peptídeos preferidos tem a seguinte estrutura: H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Phe-Leu-NH₂, correspondente à fórmula geral (I), sendo que X₁ é H, X₂ é Lys e X₃ é Phe.

[030] Também são preferidos os peptídeos definidos pelas seqüências SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 25, e que têm o aminoácido da extremidade N-terminal funcionalizado com o grupo acetila e o aminoácido da extremidade C-terminal na forma do grupo carboxamida.

[031] Dentro deste grupo, o peptídeo especialmente preferido é o peptídeo definido pela seqüência SEQ_ID_NO: 16, que tem o aminoácido da extremidade N-terminal funcionalizado com o grupo acetila e o aminoácido da extremidade C-terminal na forma do grupo carboxamida. O dito peptídeo tem a estrutura Ac-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Ile-Lys-Leu-Lys-Phe-Leu-NH₂, correspondente à fórmula geral (I), sendo que X₁ é acetila (Ac), X₂ é Lys e X₃ é Phe.

[032] Também são preferidos os peptídeos definidos pelas seqüências SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 25, e que têm o aminoácido da extremidade N-terminal funcionalizado com o grupo *p*-toluenossulfonila, e o aminoácido da extremidade C-terminal na forma do grupo carboxamida.

[033] Dentro deste grupo, os peptídeos especialmente preferidos são os peptídeos definidos pelas seqüências SEQ_ID_NO: 1, 6, 11 e 16, e têm o aminoácido da extremidade N-terminal funcionalizado com o grupo *p*-toluenossulfonila e o aminoácido da extremidade C-terminal na forma do grupo carboxamida.

[034] O peptídeo mais preferido é definido pela seqüência SEQ_ID_NO:1 e que tem o aminoácido da extremidade N-terminal funcionalizado com o grupo *p*-toluenossulfonila e o aminoácido da extremidade C-terminal na forma do grupo carboxamida. Este peptídeo tem a estrutura Ts-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-NH₂, correspondente à fórmula geral (I), sendo que X₁ é *p*-toluenossulfonila (Ts), X₂ é Lys e X₃ é Lys.

[035] Também são preferidos os peptídeos definidos pelas seqüências de aminoácido SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 25, e que têm o aminoácido da extremidade N-terminal funcionalizado com o grupo benzila e o

aminoácido da extremidade C-terminal na forma do grupo carboxamida.

[036] Dentro deste grupo, o peptídeo especialmente preferido é o peptídeo definido pela seqüência SEQ_ID_NO: 15, e que tem o aminoácido da extremidade N-terminal funcionalizado com o grupo benzila e o aminoácido da extremidade C-terminal na forma de grupo carboxamida. Este peptídeo tem a estrutura Bn-Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu-NH₂, correspondente à fórmula geral (I), sendo que X₁ é benzila (Bn), X₂ é Trp e X₃ é Val.

[037] Também são preferidos os peptídeos definidos pelas seqüências de aminoácidos SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 25, e que têm o aminoácido da extremidade N-terminal funcionalizado com o grupo benzoíla e o aminoácido da extremidade C-terminal na forma do grupo carboxamida.

[038] Dentro deste grupo, os peptídeos especialmente preferidos são os peptídeos definidos pelas seqüências SEQ_ID_NO: 1 e a SEQ_ID_NO:11, e que têm o aminoácido da extremidade N-terminal funcionalizado com o grupo benzoíla e o aminoácido da extremidade C-terminal na forma do grupo carboxamida. O mais preferido dentre estes peptídeos é o primeiro peptídeo, que tem a estrutura Bz-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-NH₂, correspondente à fórmula geral (I), sendo que X₁ é benzoíla (Bz), X₂ é Lys e X₃ é Lys.

[039] Os peptídeos descritos na presente invenção são formados por 11 aminoácidos, o que os tornam apropriados para serem preparados por meio do uso dos procedimentos habituais de síntese de peptídeos em fase sólida, descritos por R.B. Merrifield, J.Am.Chem.Soc., 1963, 85, 2149-2154.

[040] Entre eles, pode-se mencionar o peptídeo que emprega, como suporte sólido, a resina 4-metilbencidrilamino (MBHA) funcionalizada com grupos amina. Sobre o dito suporte sólido, foram realizadas sucessivas reações de acoplamento entre os diferentes aminoácidos que

compõem o peptídeo.

[041] Este procedimento é bastante conhecido pelos especialistas na técnica e é descrito, por exemplo, por Sakata, F. Albericio Eds., Solid-Phase Synthesis. Um guia prático, Marcel Dekker, New York, 2000 [ISBN: 0-8247-0359-6], ou K. Burgess Eds., Solid-Phase Organic Synthesis, Wiley, John & Sons, Nova Iorque, 1999 [ISBN: 0471318256].

[042] Quando se emprega a resina MBHA como suporte líquido, normalmente se incorpora à dita resina um espaçador bifuncional sensível ao meio ácido, que permite o desencaxe sob condições suaves do peptídeo, uma vez sintetizado. Por exemplo, um espaçador bifuncional apropriado é o Fmoc-Rink-Linker (CAS: 145469-56-3) comercializado pela empresa Senn Chemicals (Suíça).

[043] O dito espaçador, uma vez unido através de seu grupo carboxílico ao grupo amina da resina MBHA e removido o grupo Fmoc protetor, apresenta um grupo amina livre, que permite o encaixe de um aminoácido, que tem um grupo carboxílico livre.

[044] No mercado, pode-se adquirir a resina Fmoc-Rink-MBHA junto à empresa Senn Chemicals, que já tem o espaçador acima incluído na mesma.

[045] Um procedimento para a preparação dos peptídeos da presente invenção pode ser, por exemplo, conforme descrição abaixo.

[046] O dito procedimento utiliza a química do grupo Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonila) como o protetor do grupo α -amina dos aminoácidos que são utilizados para preparar os peptídeos da presente invenção.

[047] Para a proteção da cadeia lateral da lisina (Lys) e do triptofano (Trp), foi utilizado o grupo *tert*-butiloxycarbonila (Boc). Para a proteção da cadeia lateral da tirosina (Tyr), foi utilizado o grupo *tert*-butila (t-Bu).

[048] Na primeira etapa, realiza-se a eliminação do grupo

protetor Fmoc, presente no grupo amina do espaçador bifuncional. Depois disso, ocorre o encaixe do aminoácido leucina, que também tem o grupo α -amina protegido pelo grupo Fmoc.

[049] Antes de fazer o novo acoplamento, elimina-se o grupo protetor Fmoc da leucina encaixada na resina.

[050] O ciclo de acoplamento-desproteção é repetido até completar a estrutura do peptídeo.

[051] A incorporação dos últimos dois aminoácidos do peptídeo é feita normalmente por meio de 2 ou 3 acoplamentos sucessivos, para completar a reação de acoplamento do aminoácido com o peptídeo encaixado sobre a resina.

[052] A separação do peptídeo do suporte sólido é feita sob condições ácidas, ao mesmo tempo em que se eliminam os grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos que compõem o peptídeo.

[053] Após um processo convencional de isolamento, os peptídeos da presente invenção são obtidos com boa pureza, geralmente acima de 90%, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sob a forma de sólidos cobertos por pó, e são caracterizados por espectrometria de massa (ESI-MS).

[054] Surpreendentemente, verificou-se que os peptídeos da presente invenção apresentam uma atividade antimicrobiana, que é particularmente eficaz contra microorganismos patogênicos das plantas, como, por exemplo, as bactérias patogênicas *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Pseudomonas syringae*.

[055] Faz parte do objeto da presente invenção o uso dos peptídeos da presente invenção, para a preparação de uma composição antimicrobiana.

[056] De preferência, os peptídeos da presente invenção

são utilizados como agentes antimicrobianos contra bactérias patogênicas das plantas.

[057] De preferência, as bactérias fitopatogênicas são selecionadas do grupo que consiste em *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, e *Pseudomonas syringae*.

[058] Os peptídeos da presente invenção, que são considerados preferidos para uso como agentes antimicrobianos contra bactérias patogênicas das plantas, são os peptídeos preferidos mencionados anteriormente.

[059] As bactérias mencionadas são indicadores apropriados para determinar a atividade antimicrobiana de compostos que podem ser empregados para combater infecções e doenças causadas por bactérias em plantas.

[060] *Erwinia amylovora* é uma bactéria gram-negativa que causa a doença conhecida como fogo bacteriano, que afeta as plantas da família das rosáceas, incluindo árvores frutíferas de grande importância econômica, como, por exemplo, maçã e pêra, e plantas ornamentais, como, por exemplo, sorveira, espinheiro e montajeiro branco. Na Europa, *Erwinia amylovora* está catalogada como uma bactéria de quarentena na agricultura. O fogo bacteriano pode afetar praticamente todos os órgãos da planta e, muitas vezes, implica na morte das árvores ou dos arbustos doentes. Não existem atualmente métodos eficazes para controlar o fogo bacteriano e é necessário combinar várias medidas para eliminar ou reduzir o inóculo.

[061] *Xanthomonas vesicatoria* é uma bactéria gram-negativa que causa a doença conhecida como mancha bacteriana em plantas pertencentes à família *Solanaceae*, que têm grande importância econômica, como tomate e pimentão. Esta doença afeta folhas, caules e frutos, fazendo com que a planta murche ou morra.

[062] *Pseudomonas syringae* é uma bactéria gram-

negativa que causa doenças conhecidas como necrose bacteriana em plantas de cultivo hortícolas e lenhosos, como frutas. A patogenicidade da *Pseudomonas syringae* reside, em muitos casos, em sua atividade nucleadora de gelo (INA +) que potencializa os danos por geada, e a produção de diversas fitotoxinas, como siringomicinas.

[063] De preferência, as plantas que podem ser tratadas com os peptídeos da presente invenção são selecionadas do grupo que consiste em árvores frutíferas, plantas hortícolas e plantas ornamentais.

[064] Entre as árvores frutíferas, encontram-se as árvores de frutas com semente (maçã, pêra), frutas com caroço (pêssego, damasco, ameixa, cereja) e bananeira.

[065] Entre as plantas hortícolas, encontram-se as solanáceas (tomate, pimentão, batata) e cucurbitáceas (melão, melancia). Exemplos de plantas ornamentais são sorveira, cravo, espinheiro e montajeiro branco.

Composições Fitossanitárias

[066] Um objeto da presente invenção consiste em apresentar uma composição fitossanitária que compreende:

- um peptídeo linear que corresponde à fórmula geral (I):

$X_1\text{-}X_2\text{-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-X}_3\text{-Leu-NH}_2$ (I)

sendo que:

X_1 é hidrogênio, acetila, *p*-toluenossulfonila, benzila ou benzoíla;

X_2 é Lys, Tyr, Leu, Phe ou Trp, e;

X_3 é Lys, Tyr, Val, Phe ou Trp,

com a condição de que o peptídeo em que X_1 é hidrogênio, X_2 é Trp e X_3 é Val seja expressamente excluído, e

- um agente auxiliar.

[067] Entre os peptídeos da presente invenção considerados preferidos para fazer parte das ditas composições fitossanitárias, destacam-se os peptídeos mencionados como preferidos, na seção anterior denominada Peptídeos.

[068] As composições fitossanitárias da presente invenção apresentam boas propriedades antimicrobianas contra bactérias patogênicas das plantas.

[069] Normalmente, nas composições antimicrobianas, combinam-se vários princípios ativos para a obtenção de maior eficácia ou um espectro mais amplo de ação. Neste caso, as composições fitossanitárias da presente invenção também podem incluir outros agentes antibacterianos para obter maior eficácia antimicrobiana, como, por exemplo, a combinação de diversos peptídeos da presente invenção, ou sua combinação com outras substâncias ativas diferentes.

[070] Os peptídeos da presente invenção também podem ser combinados com agentes antifúngicos e, conseqüentemente, podem apresentar uma ação antimicrobiana mais ampla.

[071] A quantidade de peptídeos que faz parte da composição fitossanitária pode variar de acordo com diversos fatores, como, por exemplo, o tipo de planta, a concentração das bactérias patogênicas na planta, a extensão da doença e assim por diante. A concentração efetiva do peptídeo pode ser determinada e facilmente adaptada por meio de métodos conhecidos pelos especialistas na técnica. Normalmente, a concentração efetiva do peptídeo varia entre 0,01 e 0,5 g/l.

[072] O agente auxiliar que acompanha os peptídeos da presente invenção nas ditas composições fitossanitárias podem ter várias funções, como, por exemplo, facilitar a dosagem dos peptídeos, fornecer um produto facilmente manipulável, melhorar a molhagem das plantas com a

composição fitossanitária, entre outras.

[073] O dito agente auxiliar pode ser selecionado do grupo que consiste em: dissolventes, diluentes, cargas inertes, agentes tensoativos, agentes hidratantes, agentes tampão, agentes dispersantes, agentes antiaglomerantes, agentes lubrificantes, filtros de radiação ultravioleta e/ou suas misturas.

[074] De preferência, o agente auxiliar é selecionado do grupo que consiste em dissolventes, agentes tensoativos, agentes tampão, filtros de radiação ultravioleta e/ou suas misturas.

[075] De preferência, o solvente é água.

[076] As composições podem ser na forma líquida ou na forma sólida. Por exemplo, no caso de formulações líquidas, a composição da presente invenção pode ser na forma de uma composição diluída pronta para ser utilizada ou sob a forma de uma composição concentrada, que exige diluição antes de ser utilizada, normalmente com água.

[077] No caso das composições líquidas aquosas, a presença de agentes tensoativos hidratantes facilita a molhagem das plantas quando são pulverizadas com a dita composição.

[078] Uma vantagem dos peptídeos da presente invenção é que eles podem ser facilmente dissolvidos em água e, em geral, podem ser formulados como soluções aquosas, sem a necessidade de utilizar dissolventes orgânicos adicionais.

[079] As composições na forma sólida podem ser na forma de grânulos ou em pó, sendo que os peptídeos da presente invenção são misturados com cargas inertes finamente divididas, como, por exemplo, caulim, terras diatomáceas, dolomita, carbonato de cálcio ou talco. Os peptídeos da presente invenção também podem apresentar-se na forma de pó ou de grânulos dispersíveis, que compreendem um agente umectante para facilitar a dispersão

dos mesmos no líquido.

[080] Um objeto da presente invenção consiste em apresentar um método de prevenção e tratamento de infecções e doenças de plantas causadas por bactérias, que compreende a colocação das plantas em contato com uma composição fitossanitária, que inclui os peptídeos da presente invenção.

[081] No método da presente invenção, a composição fitossanitária pode ser aplicada preventivamente às plantas, para evitar o aparecimento de infecções e doenças causadas por bactérias. O tratamento preventivo é baseado nos peptídeos da presente invenção, que inibem o crescimento de bactérias patogênicas nas plantas.

[082] No método da presente invenção, a composição fitossanitária também pode ser utilizada para tratar as ditas infecções e doenças, uma vez que sua presença tenha sido detectada nas plantas, uma vez que os peptídeos da presente invenção inibem o crescimento das bactérias causadoras das ditas infecções e doenças.

[083] No presente relatório descritivo, o termo “infecção” refere-se à invasão e destruição de um órgão, por exemplo, folhas, flores ou frutas, por parte dos microrganismos patogênicos. Conseqüentemente, trata-se de um processo localizado. Em contraste, o termo “doença” refere-se a um processo que afeta a planta, levando a sintomas.

[084] De preferência, o método da presente invenção é utilizado para prevenir e tratar infecções e doenças causadas por bactérias patogênicas de plantas selecionadas do grupo que consiste em *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, e *Pseudomonas syringae*.

[085] De preferência, as plantas que podem ser tratadas com os peptídeos da presente invenção são selecionadas do grupo que consiste em árvores frutíferas, plantas hortícolas e plantas ornamentais.

[086] No método da presente invenção, a composição pode ser colocada em contato com as partes das plantas selecionadas do grupo que consiste em sementes, raízes, caules, folhas ou frutos, ou com o solo ou com qualquer meio de crescimento em torno das raízes das plantas.

[087] No método da presente invenção, a composição fitossanitária pode ser colocada em contato com a planta por meio de qualquer técnica convencional, entre as quais se destacam pulverização, imersão ou irrigação.

[088] Por exemplo, pode-se preparar uma dissolução aquosa dos peptídeos da presente invenção e executar a pulverização das partes da planta afetadas ou que possam ser afetadas. Se for um fruto de uma árvore frutífera, por exemplo, o tratamento também pode ser realizado por meio de aspersão ou imersão, antes de sua colheita ou pós-colheita.

[089] O tratamento das raízes pode ser feito, por exemplo, por meio do emprego de uma composição sólida, na qual os peptídeos se encontram dispersos em uma carga inerte, ou por meio da pulverização da solução aquosa acima mencionada, ou através de sua aplicação, por meio de irrigação.

Ensaio biológico

[090] A atividade antimicrobiana dos peptídeos da presente invenção contra bactérias patogênicas para plantas foi avaliada pela determinação da concentração de peptídeos mínima necessária para inibir o crescimento dos microorganismos. Normalmente, a dita concentração é chamada de concentração inibitória mínima (CIM).

[091] Este tipo de teste é comum em microbiologia e é bastante conhecido pelos especialistas na técnica. Uma descrição da metodologia utilizada é encontrada, por exemplo, em MJPelczar Jr, ECChan, NRKrieg, Microbiology: Concepts and Applications. New York: McGraw-Hill, 1997.

[092] Para avaliar o efeito antimicrobiano dos peptídeos da presente invenção foram utilizadas as seguintes linhagens de bactérias patogênicas: *Erwinia amylovora* PMV6076 (INRA, Angers, França), *Xanthomonas vesicatoria* 2133-2 (IVIA, Valência, Espanha) e *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* EPS94 (INTEA, Universidade de Girona, Espanha).

[093] Verificou-se que as composições que incluem os peptídeos da presente invenção dissolvidos em água a concentrações que variam entre 2,5 e 7,5 μM são eficazes para inibir o crescimento de bactérias como *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria* e/ou *Pseudomonas syringae*.

[094] Estes resultados demonstram a eficácia da atividade antimicrobiana dos peptídeos da presente invenção, uma vez que, em Avrahami e outros, *Biochemistry*, 2001, 40, 12591-12603, descreve-se que uma concentração inibitória mínima inferior a 50 μM é considerada significativa.

[095] Os peptídeos da presente invenção são mais efetivos contra as ditas bactérias do que o peptídeo descrito por Cavallarin e outros, definido pelas seqüências SEQ_ID_NO: 15 e que tem a extremidade C-terminal sob a forma do grupo carboxamida, pois este peptídeo apresenta concentrações inibitórias mínimas superiores a 7,5 μM , quando testado contra as bactérias *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, e *Pseudomonas syringae*.

[096] A atividade hemolítica dos peptídeos é um indicador da toxicidade em células eucariotas e uma característica que normalmente é determinada para aqueles compostos que podem entrar em contato com o corpo humano. Este seria o caso se frutas ou vegetais tratados com os peptídeos da presente invenção contivessem vestígios dos mesmos e fossem consumidos por seres humanos, ou ao serem manipulados por operadores durante sua aplicação ou preparação.

[097] A dita atividade hemolítica foi avaliada pela determinação da liberação de hemoglobina, que ocorre quando uma solução dos

ditos peptídeos é colocada em contato com uma solução tampão Tris com suspensões de eritrócitos a 5% em volume/volume provenientes de sangue humano fresco. O resultado desta determinação é expresso como a percentagem de hemólise que ocorre com uma concentração conhecida de peptídeos. Uma descrição da metodologia empregada para a determinação da atividade hemolítica está em Oren e outros, *Biochemistry*, 2000, 39, 6103-6114, e em Ragusa e outros, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 12774-12785.

[098] Verificou-se que a grande maioria dos peptídeos da presente invenção apresenta uma atividade hemolítica significativa a uma concentração que varia entre dez e cem vezes superior à concentração à qual são ativos para inibir o crescimento de bactérias patogênicas em plantas.

[099] A estabilidade dos peptídeos à degradação por protease é uma característica que permite avaliar se os peptídeos se encontram inalterados ao redor da planta durante um tempo de vida meio razoável. Os peptídeos podem ser degradados tanto por protease presente no tecido das plantas, como nos microorganismos epífitos.

[0100] A estabilidade dos peptídeos à degradação por protease foi avaliada mediante o tratamento das soluções dos peptídeos em solução tampão Tris com Proteinase K (Sigma-Aldrich) e o monitoramento da sua degradação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em diferentes intervalos de tempo. A degradação é expressa como a porcentagem de peptídeos degradados após um determinado intervalo de tempo calculado a partir da diminuição da área do pico do peptídeo nativo por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Uma descrição da metodologia empregada para a determinação da estabilidade a protease está em Rozek e outros, *Biochemistry*, 2003, 42, 14130-14138.

[0101] Verificou-se que alguns peptídeos da presente invenção são mais estáveis à degradação por protease do que o peptídeo descrito por Cavallarin e outros.

[0102] Por fim, com a finalidade de completar suficientemente a descrição acima, são apresentados os exemplos abaixo.

Exemplos

[0103] Nos exemplos abaixo, são empregadas as seguintes abreviações: Ac: acetila; Ac₂O: anidrido acético; Bn: benzila; Boc: *tert*-butiloxycarbonila; t-Bu: *tert*-butila; Bz: benzoíla; CIM: concentração inibitória mínima; DIEA: N, N-diisopropiletilamina; DMF: N, N-dimetilformamida; EDTA: ácido etilenodiaminotetracético; ESI-MS: espectrometria de massas com ionização por eletronebulização; Fmoc: 9-fluorenilmetoxycarbonila; HBTU: Hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il) (dimetilamina) metileno]-N-metilmetanamínio; HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência; LB: Luria Bertani; MBHA: 4-metilbenzidrilamina; NMP: N-metilpirrolidona; TFA: ácido trifluoroacético; TIS: Triisopropilsilano; TRIS: tris(hidroximetil)aminometano; Ts: *p*-toluenossulfonila; TSB: caldo tripticase de soja; UV: ultravioleta.

[0104] Os produtos Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tbu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, a resina Fmoc-Rink-MBHA funcionalizada com grupos amina, e HBTU, foram obtidos junto à empresa Senn Chemicals. Os produtos cloreto de benzila, cloreto de benzoíla, ácido trifluoroacético, N-metilpirrolidona e TIS foram obtidos junto à empresa Aldrich. Os produtos cloreto de benzila, piperidina e DIEA foram obtidos junto à empresa Fluka.

[0105] As seguintes informações sobre o procedimento para a preparação dos peptídeos são de caráter geral:

- Foram utilizados aminoácidos que têm o grupo α -amina protegido com o grupo Fmoc.
- Para a proteção da cadeia lateral da lisina e do triptofano, foi utilizado o grupo *tert*-butiloxycarbonila (Boc).

- Para a proteção da cadeia lateral de tirosina, foi utilizado o grupo *terc*-butila (t-Bu).

- As reações foram realizadas em seringas de 2 ou 5 ml, que tinham incorporado um filtro microporoso de polipropileno.

- Todas as transformações e lavagens foram realizadas a 25°C, salvo indicação contrária.

- A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada com um fluxo de 1,0 ml/min, por meio do uso de uma coluna de etapa reversa Kromasil (4,6 x 40 mm, tamanho das partículas de 3,5 µm). Foram empregados gradientes lineares com TFA aquoso a 0,1% e TFA em acetonitrila a 0,1%, com uma proporção entre 0,98:0,02 e 0,98:0,1 e durante um tempo de 7 minutos, com detecção ultravioleta a um comprimento de onda de 220 nm.

- Os espectros ESI-MS foram adquiridos por meio do uso de um instrumento quadripolar Navigator; operando no modo positivo de íons (ES+) com uma voltagem na amostra de 30 kV.

- Todas as relações entre os dissolventes são volume/volume, exceto quando há outro tipo de proporção.

Exemplo 1 - Preparação de H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val- Leu-NH₂ (Fórmula geral (I), sendo que X₁ é hidrogênio (H), X₂ é Lys e X₃ é Val)

[0106] Em uma seringa de 2 ml de capacidade, equipada com um filtro microporoso na parte inferior, foram colocados 30 mg de resina Fmoc-Rink-MBHA com uma funcionalidade de 0,66 mmol/g, o equivalente a 19,8 µmoles de grupos amina, e a seringa foi cheia com dissolvente para inchar-lavar a resina de acordo com a seguinte seqüência: CH₂Cl₂ (1 × 20 min) e DMF (1 × 20 min). A expressão CH₂Cl₂ (1 × 20 min) refere-se a uma lavagem de 20 minutos realizada com cloreto de metileno. Após cada etapa de lavagem, o solvente foi

removido com um filtro de vácuo múltiplo (Vac Man Laboratory Vacuum Manifold da Promega Distribuidora).

[0107] Depois de inchar-lavar a resina, a resina foi tratada com uma mistura de piperidina e DMF (3:7, 1 x 2 x 1 min e 10 min) para remover o grupo Fmoc presente no grupo amina do espaçador bifuncional e depois foi lavada com DMF (6 x 1 min).

[0108] Em seguida, a resina foi tratada com 21 mg de Fmoc-Leu-OH (59 μ moles), 22 mg de HBTU (59 μ moles) e 11 μ l de DIEA (63 μ moles) em 0,1 ml de DMF. Depois de 4 horas, a resina foi lavada com DMF (6 x 1 min) e verificou-se que o teste de ninidrina foi negativo (Kaiser e outros, Anal. Biochem., 1970, 34, 595-598).

[0109] A eliminação do grupo Fmoc e as lavagens subsequentes foram realizadas conforme descrição acima.

[0110] O ciclo de acoplamento-desproteção foi repetido para os seguintes quatro aminoácidos protegidos com o grupo N^α-Fmoc: Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH e Fmoc-Ile-OH. Em cada etapa foi feita a lavagem com DMF (6 x 1 min).

[0111] A partir do quinto aminoácido incorporado, tanto a eliminação do grupo Fmoc, os ciclos de acoplamento-desproteção, como as lavagens correspondentes foram realizadas da mesma forma, nesses casos, substituindo a DMF por NMP. Os últimos seis aminoácidos foram incorporados protegidos com o grupo N^α-Fmoc: Fmoc-Lys (Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH e Fmoc-Leu-OH. Para a incorporação dos últimos dois aminoácidos foram feitos de 2 a 3 acoplamentos sucessivos para obter um teste de ninidrina negativo.

[0112] Depois de eliminar o grupo Fmoc do último aminoácido acoplado, conforme descrição acima, a resina foi lavada com NMP (6 x 1 min) e CH₂Cl₂ (6 x 1 min), e obteve-se o peptídeo linear unido à resina, H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu-Rink-MBHA. Em seguida, separou-se o peptídeo da resina por meio de um tratamento com 1 ml de uma

mistura de TFA, água e TIS (95:2,5:2,5) durante duas horas. Os filtrados foram coletados em um frasco através de uma pressão positiva de nitrogênio. A resina foi lavada com uma mistura de TFA, água e TIS (95:2,5:2,5, 2 × 0,5 ml). Os filtrados misturaram-se e evaporaram quase à secura sob uma corrente de nitrogênio até a obtenção de um óleo. Este óleo foi precipitado com éter dietílico, centrifugado e o éter foi decantado. Este processo foi repetido 3 ou 4 vezes. Finalmente, o produto sólido obtido foi dissolvido em água e foi liofilizado.

[0113] Obteve-se um sólido coberto por pó, que tinha uma pureza superior a 90% analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (tempo de retenção: 4,39 minutos), e sua estrutura foi confirmada por ESI-MS.

[0114] A síntese deste peptídeo também foi efetuada à maior escala por meio do uso de 200 mg da resina Fmoc-Rink-MBHA com uma funcionalidade de 0,66 mmol/g, equivalente a 132 μ moles do grupo amina, por meio do uso do procedimento descrito neste Exemplo 1.

Exemplo 2 - Preparação de Ac-Lys-Lys-Leu-Lys Phe--Ile-Lys-Leu-Lys-Val-Leu-NH₂ (Fórmula geral (I), sendo que X₁ é acetila (Ac), X₂ é Lys e X₃ é Val)

[0115] A peptidil-resina H-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Ile-Lys-Leu-Lys-Val-Leu-Rink-MBHA obtida no Exemplo 1 foi tratada com 0,2 ml de uma mistura de anidrido acético (Ac₂O), piridina e CH₂Cl₂ (1:1:1), à temperatura ambiente, durante uma hora. Posteriormente, a resina foi lavada com CH₂Cl₂ (6 x 1 min).

[0116] Em seguida, o peptídeo foi separado da resina e isolado, de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 1. A pureza do peptídeo obtido foi superior a 90%, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (tempo de retenção 4,59 minutos), e sua estrutura foi confirmada por ESI-MS.

Exemplo 3 - Preparação de Ts-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Ile-

Lys-Leu-Lys-Val-Leu-NH₂ (fórmula geral (I), sendo que X₁ é *p*-toluenossulfonila (Ts), X₂ é Lys e X₃ é Val)

[0117] A peptidil-resina H-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Ile-Lys-Leu-Lys-Val-Leu-Rink-MBHA obtida no Exemplo 1 foi tratada com cloreto de *p*-toluenossulfonila (TsCl) (792 µmoles) e DIEA (1,58 moles) em 0,2 ml de uma mistura de CH₂Cl₂ e NMP (9:1) à temperatura ambiente, durante uma hora. Posteriormente, a resina foi lavada com NMP (6 x 1 min).

[0118] Em seguida, o peptídeo foi separado da resina e isolado, de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 1. A pureza do peptídeo obtido foi superior a 90%, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (tempo de retenção 4,89 minutos), e sua estrutura foi confirmada por ESI-MS.

Exemplo 4 - Preparação de Bz-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Ile-Lys-Leu-Lys-Val-Leu-NH₂ (Fórmula geral (I), sendo que X₁ é benzoíla (Bz), X₂ é Lys e X₃ é Val)

[0119] A peptidil-resina H-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Ile-Lys-Leu-Lys-Val-Leu-Rink-MBHA obtida no Exemplo 1 foi tratada com cloreto de benzoíla (BzCl) (792 µmoles) e DIEA (1,58 mmoles) em 0,2 ml de uma mistura de CH₂Cl₂ e NMP (9:1) à temperatura ambiente, durante uma hora. Posteriormente, a resina foi lavada com NMP (6 x 1 min).

[0120] Em seguida, o peptídeo foi separado da resina e isolado, de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 1. A pureza do peptídeo obtido foi superior a 90%, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (tempo de retenção 5,00 minutos), e sua estrutura foi confirmada por ESI-MS.

Exemplo 5 - Preparação de Bn-Lys-Lys-Leu-Lys-Phe-Ile-Lys-Leu-Lys-Val-Leu-NH₂ ((Fórmula geral (I), sendo que X₁ é benzila (Bn), X₂ é Lys e X₃ é Val)

[0121] A peptidil-resina H-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Val-Leu-Rink-MBHA obtida no Exemplo 1 foi tratada com brometo de benzila (BnBr) (792 μ moles) e DIEA (1,58 mmoles) em 0,2 ml de uma mistura de CH_2Cl_2 e NMP (9:1) à temperatura ambiente, durante 48 horas. Posteriormente, a resina foi lavada com NMP (6 x 1 min).

[0122] Em seguida, o peptídeo foi separado da resina e isolado, de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 1. A pureza do peptídeo obtido foi superior a 90%, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (tempo de retenção 4,73 minutos), e sua estrutura foi confirmada por ESI-MS.

Exemplo 6 - Preparação de uma quimioteca de peptídeos lineares em fase sólida

[0123] Foi projetada uma quimioteca para a obtenção de 125 peptídeos, que correspondem à fórmula geral (I):



sendo que:

X_1 é hidrogênio, acetila, *p*-toluenossulfonila, benzila ou benzoíla;

X_2 é Lys, Tyr, Leu, Phe ou Trp, e;

X_3 é Lys, Tyr, Val, Phe ou Trp,

com a condição de que o peptídeo em que X_1 é hidrogênio, X_2 é Trp e X_3 é Val seja expressamente excluído dos peptídeos da presente invenção.

[0124] Em cinco seringas de 5 ml de capacidade, devidamente etiquetadas e equipadas com um filtro microporoso na parte inferior, foram colocados 350 mg de resina Fmoc-Rink-MBHA com uma funcionalidade de 0,66 mmol/g, o equivalente a 231 μ moles de grupos amina. As

seringas foram cheias com dissolvente para inchar-lavar a resina, de acordo com a seguinte seqüência: CH₂Cl₂ (1 × 20 min) e DMF (1 × 20 min). Após cada etapa de lavagem, o solvente foi removido com um filtro de vácuo múltiplo (Vac Man Laboratory Vacuum Manifold de Promega Distribuidora).

[0125] Depois de inchar-lavar as resinas, as resinas foram tratadas com uma mistura de piperidina e DMF (3:7, 1 x 2 min e 1 x 10 min) para remover o grupo Fmoc presente no grupo amina do espaçador bifuncional e, depois, foram lavadas com DMF (6 x 1 min).

[0126] Em seguida, as cinco resinas foram tratadas com 245 mg de Fmoc-Leu-OH (693 µmoles), 263 mg de HBTU (693 µmoles) e 121 µl de DIEA (693 µmoles) em 0,8 ml de DMF. Após 4 horas, as resinas foram lavadas com DMF (6 x 1 min), e verificou-se que o teste de ninidrina foi negativo (Kaiser e outros, Anal. Biochem., 1970, 34, 595-598).

[0127] Em seguida, eliminou-se o grupo Fmoc e foram realizadas as lavagens, conforme descrição acima. Depois, acoplou-se a cada resina o aminoácido X₃ correspondente: Fmoc-Val-OH, Fmoc-Trp (Boc)-OH, Fmoc-Tyr(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH ou Fmoc-Lys(Boc)-OH, seguindo o procedimento utilizado para acoplar o aminoácido protegido Fmoc-Leu-OH.

[0128] A eliminação do grupo Fmoc e as lavagens subseqüentes foram realizadas conforme descrição acima.

[0129] O ciclo de acoplamento-desproteção foi repetido para os seguintes três aminoácidos. Desta forma, acoplaram-se seqüencialmente: Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH e Fmoc-Ile-OH. Esses acoplamentos foram feitos para cada uma das cinco resinas. Em cada etapa foi realizada a lavagem com DMF (6 x 1 min).

[0130] A partir do quinto aminoácido incorporado, tanto a eliminação do grupo Fmoc, os ciclos de acoplamento-desproteção, como as lavagens correspondentes foram realizadas da mesma forma, nesses casos, substituindo a DMF por NMP. Seguindo este procedimento, acoplaram-se, de

forma seqüencial, a cada uma das cinco resinas, dois resíduos Fmoc-Lys (Boc)-OH, um resíduo Fmoc-Phe-OH e um resíduo Fmoc-Leu-OH. Em cada etapa foi feita a lavagem com NMP (6 x 1 min). Para a incorporação do décimo resíduo, foi necessário um acoplamento duplo para obter um teste de ninidrina negativo.

[0131] Uma vez acoplado o décimo resíduo, cada uma das peptidil-resinas confinadas nas cinco seringas foi dividida em cinco frações. As 25 frações obtidas, correspondentes a aproximadamente 46 μ moles de peptidil-resina cada uma, foram colocadas em 25 seringas de 2 ml de capacidade, devidamente etiquetadas e equipadas com um filtro microporoso, na parte inferior. Depois, o grupo Fmoc foi removido e foram feitas as lavagens, conforme descrição acima. A cada uma das cinco frações de resina que tem integrado o mesmo aminoácido X_3 , acoplou-se o resíduo X_2 correspondente: Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH, Fmoc-Lys(Boc) ou Fmoc-Leu-OH. Os acoplamentos foram feitos por meio do uso de 138 μ moles do aminoácido N^α -Fmoc protegido correspondente, 138 μ moles de HBTU e 138 μ moles de DIEA em 0,3 ml de NMP. Para a incorporação desses aminoácidos foi necessário fazer um acoplamento duplo para a obtenção de um teste de ninidrina negativo.

[0132] Depois, cada uma das cinco frações anteriores foi dividida em cinco frações iguais. As 125 frações de resina obtidas, correspondentes a aproximadamente 9,2 μ moles de peptidil-resina, foram colocadas em 125 seringas de 2 ml de capacidade, devidamente etiquetadas e equipadas com um filtro microporoso, na parte inferior. Depois, o grupo Fmoc foi removido e foram realizadas as lavagens, conforme descrição acima.

[0133] Quatro das cinco frações de resina obtidas a partir de cada uma das 25 frações anteriores derivaram-se na extremidade N-terminal por acetilação, tosilação, benzoilação ou benzilação, respectivamente.

[0134] A acetilação foi realizada por meio do tratamento com 0,2 ml de uma mistura de Ac_2O , piridina e CH_2Cl_2 (1:1:1), à temperatura

ambiente, durante uma hora.

[0135] A tosilação foi realizada por meio do tratamento com TsCl (368 μ moles) e DIEA (736 μ moles) em 0,2 ml de uma mistura de CH₂Cl₂ e NMP (9:1) à temperatura ambiente, durante uma hora.

[0136] A benzoilação foi realizada por meio do tratamento com BzCl (368 μ moles) e DIEA (736 μ moles) em 0,2 ml de uma mistura de CH₂Cl₂ e NMP (9:1) à temperatura ambiente, durante uma hora.

[0137] A benzilação foi realizada por meio do tratamento com BnBr (368 μ moles) e DIEA (736 μ moles) em 0,2 ml de uma mistura de CH₂Cl₂ e NMP (9:1) durante 48 horas, à temperatura ambiente.

[0138] Depois destes tratamentos, as resinas foram lavadas com NMP (6 x 1 min).

[0139] Finalmente, foi realizada a separação dos 125 peptídeos da resina na seringa correspondente e o isolamento de cada um deles, seguindo o procedimento descrito no Exemplo 1.

[0140] Os peptídeos obtidos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e sua estrutura foi confirmada por meio de ESI-MS. Em todos os casos, obteve-se uma pureza superior a 90%.

Exemplo 7 - Testes de atividade antimicrobiana

[0141] O efeito antimicrobiano dos peptídeos da presente invenção foi determinado contra as seguintes linhagens de bactérias patogênicas: *Erwinia amylovora* PMV6076 (INRA, Angers, França), *Xanthomonas vesicatoria* 2133-2 (IVIA, Valência, Espanha) e *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* EPS94 (INTEA, Universidade de Girona, Espanha).

[0142] Todas as bactérias foram mantidas a uma temperatura de -80°C no meio Luria-Bertani (LB) complementado com glicerina a 20% de volume/volume.

[0143] As suspensões de *E.amylovora* PMV6076 e *P.syringae* pv. *syringae* EPS94 foram obtidas após um crescimento de 24 horas a 25° C e a amostra de *X.vesicatoria* 2133-2 foi obtida após a incubação durante 48 horas a 25°C, em ágar LB. Em todos os casos, foi realizada a re-suspensão em água esterilizada para obter uma suspensão ajustada a uma absorbância de 0,2 a 600 nm, que corresponde aproximadamente a 10⁸ unidades formadoras de colônias/ml.

[0144] Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), os peptídeos se solubilizaram em água esterilizada Milli-Q até uma concentração final de 1000 µM e filtrados através de um filtro de 0,22 µm de poro.

[0145] Foram feitas diluições dos peptídeos da presente invenção para a obtenção de soluções a concentrações de 750, 500, 250, 200, 150, 125, 100, 75, 50 e 25 µM.

[0146] Foram misturados 20 µl de cada diluição com 20 µl da suspensão do indicador bacteriano em questão e 160 µl do meio líquido TSB (caldo tripticase de soja), até um volume total de 200 µl em cada cavidade de uma microplaca. Portanto, as concentrações eficazes às quais as suspensões de bactérias foram submetidas foram 75, 50, 25, 20, 15, 12.5, 10, 7,5, 5 e 2,5 µM.

[0147] Foram feitas duas réplicas de cada linhagem, concentração e peptídeo em teste.

[0148] Os controles positivos continham água em vez de peptídeos e os controles negativos continham peptídeos sem a suspensão bacteriana.

[0149] O crescimento microbiano foi determinado automaticamente mediante a medição da densidade óptica a 600 nm, por meio do uso do analisador Microbiology Analyser Bioscreen C (Labsystems).

[0150] As microplacas foram incubadas a 25°C durante 48 horas com uma agitação de 20 segundos antes da medida da absorbância a cada hora. Cada experimento foi realizado duas vezes.

[0151] A concentração inibitória mínima (CIM) tornou-se a concentração mais baixa do peptídeo, à qual não se produziu nenhum crescimento bacteriano no final do experimento.

[0152] A Tabela II apresenta a variação de concentrações entre as quais se encontra a concentração inibitória mínima (CIM), expressa em μM , após 48 horas de incubação a 25°C, para diferentes peptídeos da presente invenção contra as bactérias *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Pseudomonas syringae*. Os peptídeos da Tabela II são identificados com os parâmetros X_1 , X_2 e X_3 contidos na fórmula geral (I). Além disso, a Tabela II inclui o número de referência relacionado à quimioteca apresentada no Exemplo 6. Na Tabela II, estão incluídos, como exemplo comparativo, os resultados correspondentes ao peptídeo descrito por Cavallarin e outros, que não faz parte da presente invenção:

TABELA II

Referência	X_1	X_2	X_3	<i>P.syringae</i>	<i>X.vesicatoria</i>	<i>E.amylovora</i>
Exemplo comparativo	H	Trp	Val	>7,5	>7,5	>7,5
BP017	H	Lys	Trp	5-7.5	5-7.5	>7.5
BP100	H	Lys	Tyr	2.5-5	5-7.5	2.5-5
BP095	H	Tyr	Tyr	5-7.5	2.5-5	5-7.5
BP105	H	Leu	Tyr	5-7.5	2.5-5	5
BP090	H	Phe	Tyr	5-7.5	2.5-5	5-7.5
BP020	H	Trp	Tyr	2,5-5	2,5-5	2,5-5
BP015	H	Lys	Val	2,5-5	>7,5	5-7,5
BP033	H	Leu	Val	5-7,5	>7,5	5-7,5
BP076	H	Lys	Phe	2,5-5	2,5-5	2,5-5

BP081	H	Leu	Phe	2,5-5	<2,5	2,5-5
BP066	H	Phe	Phe	5-7,5	2,5-5	2,5-5
BP019	H	Trp	Phe	5-7,5	2,5-5	5-7,5
BP052	H	Lys	Trp	5	2,5-5	2,5-5
BP047	H	Tyr	Trp	5-7,5	2,5-5	5-7,5
BP018	H	Trp	Trp	5-7,5	2,5	5-7,5
BP120	Ac	Tyr	Lys	5-7,5	5-7,5	>7,5
BP101	Ac	Lys	Tyr	5-7,5	2,5	>7,5
BP029	Ac	Lys	Val	5-7,5	7,5	5-7,5
BP077	Ac	Lys	Phe	5-7,5	<2,5	5-7,5
BP053	Ac	Lys	Trp	5-7,5	2,5-5	>7,5
BP038	Ac	Trp	Trp	>7,5	<2,5	>7,5
BP125	Ts	Lys	Lys	2,5-5	2,5-5	>7,5
BP121	Ts	Tyr	Lys	2,5-5	2,5-5	>7,5
BP102	Ts	Lys	Tyr	2,5-5	<2,5	5-7,5
BP097	Ts	Tyr	Tyr	>7,5	<2,5	>7,5
BP030	Ts	Lys	Val	5-7,5	5-7,5	5-7,5
BP078	Ts	Lys	Phe	5-7,5	<2,5	5-7,5
BP054	Ts	Lys	Trp	5-7,5	<2,5	>7,5
BP059	Ts	Leu	Trp	>7,5	2,5	>7,5
BP011	Bn	Trp	Val	5-7,5	2,5-5	5-7,5
BP126	Bz	Lys	Lys	2,5-5	2,5-5	5-7,5
BP122	Bz	Tyr	Lys	5-7,5	2,5-5	>7,5
BP103	Bz	Lys	Tyr	5-7,5	<2,5	7,5
BP031	Bz	Lys	Val	5-7,5	<2,5	2,5-5
BP010	Bz	Trp	Val	>7,5	<2,5	>7,5
BP055	Bz	Lys	Trp	>7,5	<2,5	>7,5

[0153] Pode-se verificar que os peptídeos da presente

invenção apresentam uma boa eficácia para inibir o crescimento das bactérias *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria* e/ou *Erwinia amylovora*.

[0154] Além disso, a eficácia dos peptídeos da presente invenção é superior à eficácia dos peptídeos já conhecidos, cujos resultados são apresentados na primeira linha da tabela acima, sob o título Exemplo Comparativo.

Exemplo 8 - Testes de atividade hemolítica

[0155] A atividade hemolítica dos peptídeos da presente invenção foi avaliada por meio da determinação da liberação de hemoglobina, que é produzida quando uma solução de peptídeos entra em contato com uma suspensão de glóbulos vermelhos a 5% em volume, provenientes de sangue humano fresco.

[0156] O sangue foi colhido assepticamente por meio do uso de um sistema Vacutainer® K2E (Belliver, Grã-Bretanha) com EDTA e armazenado a 4°C durante um período inferior a duas horas.

[0157] O sangue foi centrifugado a 6.000g durante 5 minutos para separar os glóbulos vermelhos. Estes foram lavados três vezes com solução tampão TRIS (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,2), e foram suspensos na solução tampão TRIS para a obtenção de uma suspensão contendo 10% em volume de glóbulos vermelhos.

[0158] Os peptídeos foram solubilizados na solução tampão TRIS até uma concentração final de 100, 300 e 500 µM.

[0159] Foram utilizadas três réplicas para cada peptídeo e concentração.

[0160] Foram misturados 65 µl da suspensão de glóbulos vermelhos a 10% em volume com 65 µl da solução de peptídeos, em cada cavidade de uma placa de 96 cavidades Micro-Amp® (Applied Biosystems, EUA) (5% em volume de glóbulos vermelhos), e a mistura foi incubada durante uma

hora a 37°C, sob agitação. Deste modo, as suspensões de glóbulos vermelhos foram submetidas a concentrações de peptídeos de 50, 150 e 250 µM.

[0161] Em seguida, as placas foram centrifugadas a 3.500g durante 10 minutos, e alíquotas de 80 µl do sobrenadante foram transferidas para microplacas de 100 cavidades (Bioscreen), que foram diluídas com 80 µl de água esterilizada Milli-Q.

[0162] O grau de hemólise foi determinado com base na absorbância a 540 nm, por meio do uso de um leitor de placa Bioscreen.

[0163] O controle positivo de hemólise completa foi determinado em uma solução tampão TRIS contendo melitina 200 µM (Sigma-Aldrich, Espanha).

[0164] O percentual de hemólise (H) foi determinado através da equação:

$$H = 100 \times [(Op - Ob) / (Om - Ob)]$$

[0165] sendo que Op era a densidade óptica medida a uma concentração do peptídeo determinada, Ob era a densidade óptica da solução tampão e Om era a densidade óptica para o controle positivo com melitina.

[0166] A Tabela III apresenta os resultados da atividade hemolítica expressada como a porcentagem de hemólise calculada por meio do uso da equação acima, para concentrações de peptídeos da presente invenção correspondentes a 50, 150 e 250 µM. Os peptídeos da Tabela III se identificam com os parâmetros X₁, X₂ e X₃ contidos na fórmula geral (I). Além disso, a Tabela III inclui o número de referência relativo à quimioteca apresentada no Exemplo 6:

TABELA III

Referência	X ₁	X ₂	X ₃	% Hemólise 50 µM	% Hemólise 150 µM	% Hemólise 250 µM
------------	----------------	----------------	----------------	---------------------	----------------------	----------------------

BP119	H	Tyr	Lys	4	19	45
BP100	H	Lys	Tyr	3	22	43
BP095	H	Tyr	Tyr	7	50	76
BP105	H	Leu	Tyr	14	91	90
BP090	H	Phe	Tyr	11	57	84
BP020	H	Trp	Tyr	78	77	72
BP015	H	Lys	Val	0	16	45
BP033	H	Leu	Val	4	38	68
BP076	H	Lys	Phe	3	34	65
BP081	H	Leu	Phe	10	65	88
BP066	H	Phe	Phe	9	63	89
BP019	H	Trp	Phe	57	94	100
BP128	H	Leu	Lys	2	31	66
BP052	H	Lys	Trp	51	84	79
BP047	H	Tyr	Trp	81	76	82
BP018	H	Trp	Trp	78	68	74
BP124	Ac	Lys	Lys	1	5	23
BP101	Ac	Lys	Tyr	4	31	62
BP096	Ac	Tyr	Tyr	47	86	85
BP077	Ac	Lys	Phe	6	40	81
BP053	Ac	Lys	Trp	60	82	85
BP038	Ac	Trp	Trp	80	86	80
BP125	Ts	Lys	Lys	2	8	23
BP121	Ts	Tyr	Lys	22	81	86
BP102	Ts	Lys	Tyr	39	79	80
BP097	Ts	Tyr	Tyr	83	81	88
BP030	Ts	Lys	Val	25	70	80
BP078	Ts	Lys	Phe	40	85	95
BP126	Bz	Lys	Lys	2	14	24

BP122	Bz	Tyr	Lys	32	78	96
BP103	Bz	Lys	Tyr	42	83	80
BP031	Bz	Lys	Val	34	71	76
BP010	Bz	Trp	Val	77	77	76
BP011	Bn	Trp	Val	81	96	100

[0167] Em todos os casos, observa-se que a concentração em que chega a produzir uma significativa hemólise é entre 10 e 100 vezes superior à concentração em que os peptídeos da presente invenção apresentam atividade antimicrobiana.

Exemplo 9 - Testes de estabilidade à degradação por protease

[0168] A estabilidade dos peptídeos da presente invenção à degradação por protease foi determinada pelo teste de digestão do peptídeo por proteinase K (Sigma-Aldrich Corporation, Madri, Espanha).

[0169] Foi empregada uma dissolução de 50 µg/ml de peptídeos e 1 µg/ml de proteinase K em uma solução tampão TRIS 100 mM com um pH de 7,6, à temperatura ambiente.

[0170] O progresso da separação dos peptídeos foi determinado por meio de cromatografia de tempo em tempo, entre 5 e 45 minutos. Para tanto, utilizou-se uma coluna de fase reversa C₁₈ (Kromasil, 4,6 x 40 mm, 3,5 µm de tamanho de partícula) e gradientes lineares de TFA aquoso a 0,1% e TFA em acetonitrila a 0,1% de 0,98:0,02 a 0:1 durante 7 minutos, realizando a detecção por meio de absorbância no ultravioleta a 220 nm.

[0171] A Tabela IV apresenta os resultados de estabilidade à degradação por protease, expressa como a percentagem de degradação de cada peptídeo após 45 minutos. Os peptídeos da Tabela IV são identificados com os parâmetros X₁, X₂, e X₃ contidos na fórmula geral (I). Além disso, a Tabela IV inclui o número de referência relativo à quimioteca

apresentada no Exemplo 6. Na Tabela IV, estão incluídos, como exemplo comparativo, os resultados correspondentes ao peptídeo descrito por Cavallarin e outros, que não faz parte da presente invenção:

TABELA IV

Referência	X ₁	X ₂	X ₃	% Degradação em 45 minutos
Exemplo comparativo	H	Trp	Val	100
BP008	Ac	Trp	Val	100
BP077	Ac	Lys	Phe	84
BP009	Ts	Trp	Val	100
BP125	Ts	Lys	Lys	67
BP010	Bz	Trp	Val	100
BP126	Bz	Lys	Lys	53
BP015	H	Lys	Val	100
BP019	H	Trp	Phe	87
BP020	H	Trp	Tyr	85
BP033	H	Leu	Val	100
BP076	H	Lys	Phe	49
BP100	H	Lys	Tyr	60

[0172] Pode-se observar que alguns peptídeos da presente invenção são mais estáveis à degradação por protease do que o peptídeo descrito por Cavallarin e outros (exemplo comparativo). Em particular, os peptídeos correspondentes à fórmula geral (I), na qual X₁ é hidrogênio, X₂ é Lys, X₃ é Phe, ou X₁ é benzoíla, X₂ é Lys e X₃ é Lys, demonstram ser duas vezes mais estáveis do que o peptídeo do exemplo comparativo.

REIVINDICAÇÕES

1. PEPTÍDEOS LINEARES ANTIMICROBIANOS

caracterizados pelo fato de que correspondem à fórmula geral (I):



sendo que:

X₁ é hidrogênio;

X₂ é Lys, Tyr, Leu, Phe ou Trp, e;

X₃ é Lys, Tyr, Val, Phe ou Trp,

com a condição de que o peptídeo em que X₁ é hidrogênio, X₂ é Trp e X₃ é Val seja expressamente excluído da presente invenção.

2. PEPTÍDEOS LINEARES ANTIMICROBIANOS, de

acordo com a reivindicação 1, ***caracterizados pelo fato de*** serem definidos pelas seqüências SEQ_ID_NO: 1 a SEQ_ID_NO: 14 e a SEQ_ID_NO: 16 a SEQ_ID_NO: 25, e pelo fato de terem o aminoácido da extremidade C-terminal na forma do grupo carboxamida.

3. PEPTÍDEOS LINEARES ANTIMICROBIANOS, de

acordo com a reivindicação 2, ***caracterizados pelo fato de*** serem definidos pelas seqüências SEQ_ID_NO: 6 a SEQ_ID_NO: 11, SEQ_ID_NO: 13, SEQ_ID_NO: 16, SEQ_ID_NO: 18 a SEQ_ID_NO: 22 e a SEQ_ID_NO: 25, e pelo fato de terem o aminoácido da extremidade C-terminal na forma do grupo carboxamida.

4. PEPTÍDEOS LINEARES ANTIMICROBIANOS, de

acordo com a reivindicação 3, ***caracterizados pelo fato de*** serem definidos pelas seqüências SEQ_ID_NO: 6 e a SEQ_ID_NO: 16, e pelo fato de terem o aminoácido da extremidade C-terminal na forma do grupo carboxamida.

5. PEPTÍDEOS LINEARES ANTIMICROBIANOS, de

acordo com a reivindicação 2, ***caracterizados pelo fato de*** serem definidos pela

seqüência SEQ_ID_NO: 6, SEQ_ID_NO: 16, SEQ_ID_NO: 21 e SEQ_ID_NO: 25, pelo fato de terem o aminoácido da extremidade N-terminal funcionalizado com o grupo acetila e pelo fato de terem o aminoácido da extremidade C-terminal na forma do grupo carboxamida.

6. PEPTÍDEOS LINEARES ANTIMICROBIANOS, de acordo com a reivindicação 2, ***caracterizados pelo fato de*** serem definidos pelas seqüências SEQ_ID_NO: 1, SEQ_ID_NO: 2, SEQ_ID_NO: 6, SEQ_ID_NO: 7, SEQ_ID_NO: 11, SEQ_ID_NO: 16, SEQ_ID_NO: 21 e SEQ_ID_NO: 23, pelo fato de terem o aminoácido da extremidade N-terminal funcionalizado com o grupo *p*-toluenossulfonila e pelo fato de terem o aminoácido da extremidade C-terminal na forma do grupo carboxamida.

7. PEPTÍDEOS LINEARES ANTIMICROBIANOS, de acordo com a reivindicação 2, ***caracterizados pelo fato de*** serem definidos pela seqüência SEQ_ID_NO:15, pelo fato de terem o aminoácido da extremidade N-terminal funcionalizado com o grupo benzila e pelo fato de terem o aminoácido da extremidade C-terminal na forma do grupo carboxamida.

8. PEPTÍDEOS LINEARES ANTIMICROBIANOS, de acordo com a reivindicação 2, ***caracterizados pelo fato de*** serem definidos pelas seqüências SEQ_ID_NO: 1, SEQ_ID_NO: 2, SEQ_ID_NO: 6, SEQ_ID_NO: 11, SEQ_ID_NO: 15 e SEQ_ID_NO: 21, pelo fato de terem o aminoácido da extremidade N-terminal funcionalizado com o grupo benzoíla e pelo fato de terem o aminoácido da extremidade C-terminal na forma do grupo carboxamida.

9. UTILIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS LINEARES ANTIMICROBIANOS, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, ***caracterizada pelo fato de*** ser realizada para a preparação de uma composição antimicrobiana.

10. UTILIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS LINEARES ANTIMICROBIANOS, de acordo com a reivindicação 9, ***caracterizada pelo fato***

de os peptídeos lineares antimicrobianos serem utilizados como agentes antimicrobianos contra bactérias patogênicas das plantas.

11. UTILIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS LINEARES ANTIMICROBIANOS, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada pelo fato de** a bactéria patogênica das plantas ser selecionada do grupo que consiste em *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Pseudomonas syringae*.

12. UTILIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS LINEARES ANTIMICROBIANOS, de acordo com as reivindicações 10 ou 11, **caracterizada pelo fato de** as plantas serem selecionadas do grupo que consiste em árvores frutíferas, plantas hortícolas e plantas ornamentais.

13. COMPOSIÇÃO FITOSSANITÁRIA caracterizada pelo fato de compreender um peptídeo linear antimicrobiano, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, e um agente auxiliar.

14. COMPOSIÇÃO FITOSSANITÁRIA, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizada pelo fato de** a concentração do peptídeo variar entre 0,01 e 0,5 g/l

15. COMPOSIÇÃO FITOSSANITÁRIA, de acordo com as reivindicações 13 ou 14, **caracterizada pelo fato de** o agente auxiliar ser selecionado do grupo que consiste em dissolventes, agentes tensoativos, agentes tampão, filtros de radiação ultravioleta e/ou suas misturas.

16. COMPOSIÇÃO FITOSSANITÁRIA, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizada pelo fato de** o dissolvente ser água.

17. MÉTODO PARA PREVENIR E TRATAR INFECÇÕES E DOENÇAS DE PLANTAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS, **caracterizado pelo fato de** compreender a colocação da planta em contato com uma composição fitossanitária, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 13 a 16.

18. MÉTODO PARA PREVENIR E TRATAR INFECÇÕES

E DOENÇAS DE PLANTAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado pelo fato de** as bactérias serem selecionadas do grupo que consiste em *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Pseudomonas syringae*.

19. MÉTODO PARA PREVENIR E TRATAR INFECÇÕES

E DOENÇAS DE PLANTAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS, de acordo com as reivindicações 17 ou 18, **caracterizado pelo fato de** as plantas serem selecionadas do grupo que consiste em árvores frutíferas, plantas hortícolas e plantas ornamentais.

20. MÉTODO PARA PREVENIR E TRATAR INFECÇÕES

E DOENÇAS DE PLANTAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 19, **caracterizado pelo fato de** a composição fitossanitária entrar em contato com as partes das plantas selecionadas do grupo que consiste em sementes, raízes, caules, folhas ou frutos, ou com o solo ou com qualquer meio de crescimento em torno das raízes das plantas.

21. MÉTODO PARA PREVENIR E TRATAR INFECÇÕES

E DOENÇAS DE PLANTAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 20, **caracterizado pelo fato de** a composição fitossanitária entrar em contato com as plantas por meio de pulverização, imersão ou irrigação.