

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA BACTERIOCINA PRODUZIDA
POR *Bacillus* sp. P45**

Lisana Reginini Sirtori
Farmacêutica – UFRGS

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

AGRADECIMENTOS

A todos os funcionários do ICTA, que de alguma forma contribuíram para o bom andamento dos trabalhos.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia e de Bromatologia do ICTA pela ajuda constante.

Aos companheiros de laboratório Ana Paula, Ana Paula, Daniel, Daniele, Fabiana, Franciani, Ingrid, Laura, Luís Fernando, Mário, Marina e Rosiele por fazer do laboratório um ótimo ambiente e em especial a Amanda pela colaboração diária ao trabalho.

A Florência pelo auxílio inicial no laboratório.

A Amanda por toda a experiência compartilhada.

As colegas Márcia e Janice, por todo o conhecimento e toda a amizade compartilhada nestes dois anos.

Ao professor Adriano Brandelli, pela oportunidade e pela orientação.

Ao Flávio por ser meu companheiro em todos os momentos.

Ao meu irmão, meu amigo, pelo apoio indispensável.

Aos meus pais, por todo o amor, carinho e dedicação em todos os meus anos de vida.

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA BACTERIOCINA PRODUZIDA POR *Bacillus* sp. P45

Autor: Lisana Reginini Sirtori
Orientador: Adriano Brandelli

RESUMO

Uma bacteriocina produzida por um microrganismo isolado do intestino do peixe Jaraqui, da bacia Amazônica, foi caracterizada. A bactéria foi identificada como pertencente ao gênero *Bacillus* por testes citomorfológicos, bioquímicos e fisiológicos. A análise filogenética feita através da seqüência do rDNA 16S revelou que a bactéria é geneticamente próxima de bactérias como *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*. A bacteriocina foi produzida no início da fase exponencial de crescimento e a sua concentração atingiu o nível máximo no início da fase estacionária, caracterizando-se como metabólito primário. O sobrenadante inibiu *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Gallinarium, *Listeria monocytogenes*, *Erwinia caratorvora* entre outras espécies patogênicas. A atividade manteve-se constante em temperaturas de 10 a 100 °C, por 30 minutos, iniciando um declínio a 100 °C por 40 minutos. No teste do efeito de enzimas proteolíticas, a pronase E causou a perda do efeito antimicrobiano, indicando que se trata de uma substância de natureza protéica. A purificação foi realizada inicialmente por precipitação com sulfato de amônio, seguida de uma cromatografia de gel filtração (Sephadex G-100). A etapa final foi a cromatografia de troca iônica (DEAE Sepharose). No final deste processo, obteve-se um fator de purificação de 42,6 com uma recuperação de 6,75%. A bacteriocina purificada manteve sua estabilidade térmica, mas perdeu a estabilidade frente a enzimas proteolíticas. O espectro de infravermelho indicou grupamentos NH e ligações peptídicas e o espectro de massas indicou um peptídeo de 1518,554 Da. A bacteriocina parcialmente purificada tem um EC₅₀ de 400UA/mL e provocou uma diminuição de 6 logs de células de *Listeria monocytogenes* com 800UA/mL, provavelmente provocando lise celular.

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF A BACTERIOCIN PRODUCED BY *Bacillus* sp. P45

Author: Lisana Reginini Sirtori
Advisor: Adriano Brandelli

ABSTRACT

A bacteriocin produced by a microorganism isolated from the intestine of the fish Jaraqui of the Amazonian basin was characterized. The bacterium was identified as a species of the *Bacillus* genus by cytomorphological, biochemical and physiological tests. The phylogenetical analysis done by 16S rDNA sequence revealed that the bacterium is genetically close to *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens*. The bacteriocin is produced at exponential growth phase and its concentration achieves the maximum level at stationary growth phase, suggesting that this compound is a primary metabolite. The culture supernatant was active against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Gallinarium, *Listeria monocytogenes*, *Erwinia caratorvora* among other pathogenic species. The activity was constant in temperatures from 10 to 100 °C for 30 minutes, beginning to decline at 100 °C for 40 minutos. When treated with proteolytic enzymes, pronase E caused the lost of the antimicrobial effect, proving that is a substance of proteinaceous nature. The purification was developed by ammonium sulfate precipitation, followed by gel filtration chromatography (Sephadex G-100). The last step was an ion exchange chromatography (DEAE Sepharose). By the end of this process, we have a purification factor of 42,6 and a yield of 6,75%. The purified bacteriocin keeps its thermal stability, but loses the stability towards proteolytic enzymes. The infrared spectrum indicates NH groups and peptidic bounds and the mass spectrum indicates a peptide of 1518,554 Da. The bacteriocin partially purified has a EC₅₀ of 400UA/mL and kills all viable cells of *Listeria monocytogenes* with 800UA/mL, probably by cell lysis.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	v
RELAÇÃO DE TABELAS	viii
RELAÇÃO DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Antimicrobianos	3
2.2 Resistência a antimicrobianos	4
2.3 Peptídeos antimicrobianos.....	6
2.4 Bacteriocinas	7
2.4.1 Histórico.....	7
2.4.2 Definição.....	7
2.4.3 Classificação.....	8
2.4.4 Mecanismo de ação.....	9
2.4.4.1 Classe I.....	10
2.4.4.2 Classe II.....	13
2.4.5 Síntese	16
2.4.6 Imunidade	16
2.4.7 Modificações pós-translocacionais	17
2.4.8 Transporte através da membrana celular	17
2.5 Purificação	18
2.5.1 Purificação de proteínas	18
2.5.2 Purificação de bacteriocinas	22
2.6 Aplicações das bacteriocinas.....	23
2.7 Resistência a bacteriocinas	26
2.8 Antimicrobianos produzidos por espécies de <i>Bacillus</i>	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Equipamentos	29
3.2 Meios de Cultura.....	30
3.3 Reagentes	30
3.4 Microorganismo produtor	31
3.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão	31
3.4.2 Caracterização citomorfológica, bioquímica e fisiológica.....	32
3.4.3 Análise filogenética.....	32
3.5 Microrganismos indicadores	33
3.6 Manutenção dos microrganismos	34
Gram negativas	35
3.7 Determinação do número de células viáveis	36

3.8	Obtenção do sobrenadante da cultura.....	36
3.8.1	Preparação do pré-inóculo	36
3.8.2	Obtenção do sobrenadante bruto	36
3.9	Determinação das unidades arbitrárias por mililitro	37
3.10	Curva de crescimento e produção	37
3.10.1	Preparação do pré-inóculo	37
3.10.2	Curva de crescimento.....	38
3.11	Caracterização inicial do sobrenadante	38
3.11.1	Espectro de ação.....	39
3.11.2	Estabilidade térmica	39
3.11.3	Estabilidade frente ao pH e ação em diferentes pHs.....	40
3.11.4	Estabilidade frente a enzimas proteolíticas	41
3.11.5	Estabilidade frente a solventes orgânicos, detergentes e outras substâncias químicas.....	41
3.11.6	Cromatografia de gel filtração.....	42
3.12	Determinação do efeito contra <i>Listeria monocytogenes</i>	43
3.12.1	Curva de crescimento.....	43
3.13	Purificação	43
3.13.1	Precipitação fracionada com sulfato de amônio	44
3.13.2	Cromatografia de gel filtração.....	45
3.13.3	Cromatografia de troca iônica.....	46
3.14	Caracterização da fração V	48
3.14.1	Eletrforese em gel de poliacrilamida.....	48
3.14.2	Eletrforese capilar.....	49
3.14.3	Espectroscopia de Infra-Vermelho.....	49
3.14.4	Espectroscopia de massas.....	49
3.15	Determinação da proteína solúvel	50
3.16	Efeitos sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	50
3.16.1	Microscopia eletrônica de transmissão.....	50
3.16.2	Determinação da concentração inibitória mínima.....	51
3.16.3	Determinação da concentração bactericida mínima.....	51
3.16.4	Curva dose-resposta	52
3.16.5	Cinética de ação da substância antimicrobiana.....	52
4	RESULTADOS	53
4.1	Microrganismo produtor	53
4.1.1	Microscopia eletrônica	53
4.1.2	Caracterização citomorfológica, bioquímica e fisiológica.....	54
4.1.3	Análise filogenética.....	56
4.2	Curva de crescimento e produção.....	56
4.3	Caracterização do sobrenadante bruto.....	57
4.3.1	Espectro de ação.....	57
4.3.2	Estabilidade térmica	59
4.3.3	Estabilidade e atividade em diferentes pHs.....	61
4.3.4	Estabilidade frente a enzimas proteolíticas	61
4.3.5	Estabilidade frente a solventes orgânicos, detergentes e outras substâncias químicas.....	62

4.3.6	Estimativa do peso molecular	63
4.4	Determinação do efeito contra <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644..	64
4.5	Purificação da substância antimicrobiana.....	65
4.5.1	Precipitação fracionada com sulfato de amônio	65
4.5.2	Cromatografia líquida de gel filtração (G-100)	67
4.5.3	Cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose)	67
4.6	Caracterização da fração V	71
4.6.1	Estabilidade térmica	71
4.6.2	Estabilidade frente a enzimas proteolíticas	74
4.6.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	74
4.6.4	Eletroforese capilar	75
4.6.5	Espectroscopia de infravermelho.....	75
4.6.6	Espectroscopia de massas	76
4.7	Efeitos sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	77
4.7.1	Microscopia eletrônica de transmissão	77
4.7.2	Determinação da concentração inibitória mínima.....	78
4.7.3	Determinação da concentração bactericida mínima.....	79
4.7.4	Curva dose-resposta	79
4.7.5	Cinética de ação	80
5	DISCUSSÃO	82
6	CONCLUSÕES	89
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
9	VITA	102

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1: Microrganismos indicadores utilizados e condições de crescimento.....	35
TABELA 2: Resultados da citomorfologia.....	55
TABELA 3: Resultados das provas bioquímicas e fisiológicas.....	55
TABELA 4: Espectro de ação do sobrenadante bruto.....	58
TABELA 5: Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto.....	58
TABELA 6: Atividade residual do sobrenadante bruto após tratamento com enzimas proteolíticas.....	62
TABELA 7: Efeito de diferentes substâncias químicas na atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto.....	63
TABELA 8: Tabela de purificação para os diferentes precipitados obtidos na precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	66
TABELA 9: Tabela de purificação mostrando as frações obtidas na purificação bruto.....	71
TABELA 10: Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana da fração V.....	73
TABELA 11: Resultado dos testes para determinação CIM e da CBM das frações I e II contra <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644.....	78

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1: Atividades moleculares dos lantibióticos	12
FIGURA 2: Modelo para o modo de ação das bacteriocinas da subclasse IIa.....	15
FIGURA 3: Esquema de purificação.....	44
FIGURA 4: Microscopia eletrônica de transmissão de células de <i>Bacillus</i> sp. P45.....	54
FIGURA 5: Dendograma filogenético baseado na seqüência do rDNA 16S.....	56
FIGURA 6: Curva de crescimento e produção de atividade antimicrobiana.....	57
FIGURA 7: Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto após incubação em diferentes temperaturas durante 30 min.....	59
FIGURA 8: Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana a 100 °C durante diferentes intervalos de tempo.....	60
FIGURA 9: Influência do pH na atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto.....	61
FIGURA 10: Perfis de eluição da atividade antimicrobiana durante cromatografia de gel filtração.....	64
FIGURA 11: Efeito do sobrenadante bruto contra <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7466.....	65
FIGURA 12: Precipitação fracionada com sulfato de amônio	66
FIGURA 13: Perfil de eluição do precipitado (20 - 50%) em coluna de Sephadex 100.....	67
FIGURA 14: Perfil de eluição da Fração II em coluna de troca iônica (DEAE-Sepharose).....	68
FIGURA 15: Perfil de eluição da Fração IV em coluna de troca iônica (DEAE-Sepharose).....	70
FIGURA 16: Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana da fração V após incubação em diferentes temperaturas durante 30 min.....	72
FIGURA 17: Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana da fração V a 100 °C durante diferentes intervalos de tempo.....	73
FIGURA 18: Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	74
FIGURA 19: Eletroforese capilar da fração V.....	75
FIGURA 20: Espectro infra-vermelho da fração V.....	76
FIGURA 21: Espectro de massas da fração V.....	77
FIGURA 22: Microscopia eletrônica de transmissão de células de <i>L. monocytogenes</i> tratadas e não tratadas.....	78
FIGURA 23: Curva de dose-resposta contra <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 utilizando a fração I e a fração II.....	80
FIGURA 24: Cinética de ação da fração I e da fração II.....	81

1 INTRODUÇÃO

Apesar da introdução de modernas tecnologias e conceitos de segurança, como o APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), o número de doenças de origem alimentar ainda aumenta. Por outro lado, é crescente o número de consumidores que prefere alimentos minimamente processados e sem conservantes químicos.

O processamento de alimentos moderno é dependente de tecnologias de conservação para assegurar que o alimento seja mantido em um nível aceitável de qualidade, da produção até o consumo.

O aumento de microrganismos resistentes aos processos físicos e químicos tradicionais de conservação de alimentos apresenta um novo perigo à segurança dos alimentos.

Somado aos fenômenos de resistência bacteriana, o aumento da procura por alimentos sem aditivos químicos leva a indústria alimentícia a pesquisar novos agentes antimicrobianos que possam ser utilizados na conservação de alimentos.

Os microrganismos produzem uma enorme gama de sistemas de defesa, incluindo antibióticos de amplo espectro, produtos do metabolismo como ácido lático, lisozima, exotoxinas entre outros. Algumas destas

substâncias podem ser empregadas de diferentes formas no alimento para inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis.

A biodiversidade microbiana da Amazônia bem como o seu potencial biotecnológico não tem sido plenamente estudado. Poucos trabalhos mostram produtos do metabolismo microbiano com potencial uso em indústrias e mostram menos ainda antimicrobianos produzidos por isolados bacterianos desta região.

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial antimicrobiano, caracterizar e purificar uma substância antimicrobiana produzida por uma bactéria isolada de intestino de peixe da bacia Amazônica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O solo sempre foi uma das principais fontes de substâncias antimicrobianas, ainda que o número de novas substâncias detectadas por técnicas de cultivo tenha diminuído nos últimos anos (Steele & Streit, 2005).

A fauna e a flora da região amazônica contêm uma grande diversidade biológica, com 40% dos peixes de água fresca (Borneman & Triplett, 1997). Apesar de relativamente poucos trabalhos desenvolvidos para investigar a complexidade genética desta região, sabe-se que a biodiversidade também é enorme na vida microbiana da Amazônia (Benner *et al.*, 1995).

A caracterização de alguns microrganismos que produzem substâncias com interesse biotecnológico tem sido descrita. Chies *et al.* (2002) identificaram uma endonuclease de restrição, produzida por *Bacillus anthracis*, com aplicação em microbiologia molecular. Soares *et al.* (2003) estudaram a produção de uma transglutaminase por *Bacillus circulans* isolado da bacia Amazônica. Mais recentemente, Cladera-Olivera *et al.* (2004) descreveram uma bacteriocina produzida por *Bacillus licheniformis* isolado de intestino de peixe da bacia Amazônica.

2.1 Antimicrobianos

Segundo a definição original, antimicrobianos são substâncias químicas produzidas por diversas espécies de microrganismos capazes, em pequenas concentrações, de inibir o crescimento de outros microrganismos. Entretanto, o advento de métodos sintéticos resultou em uma modificação nesta definição. O termo antimicrobiano se refere agora às substâncias produzidas por microrganismos ou por síntese química total ou parcial que, em baixas concentrações, inibe o crescimento de outros microrganismos (Jolik, 2003).

Os antimicrobianos estão amplamente distribuídos na natureza, onde desempenham importante papel na regulação da população microbiana do solo, águas cloacais e adubos. Estas substâncias diferem tanto quimicamente como em seu mecanismo de ação e há pouca ou nenhuma relação entre elas, exceto por sua capacidade em afetar adversamente processos vitais de certos microrganismos (Jolik, 2003).

Estes agentes quimioterápicos interferem em diversos sítios vulneráveis na célula, como a síntese da parede celular, as funções da membrana citoplasmática, a síntese protéica, o metabolismo de ácidos nucléicos e o metabolismo intermediário (Hardman *et al.*, 2003).

2.2 Resistência a antimicrobianos

Os microrganismos devem sua existência à habilidade de seus ancestrais de se adaptar e de mudar. Uma conseqüência desse processo é o desenvolvimento de resistência a antibióticos clínicos, agentes conservantes de alimentos e processos desinfetantes.

Resistência é a falha da inibição ou eliminação do microrganismo por um tratamento antimicrobiano. Esta pode ser intrínseca (presente antes da exposição à droga) ou adquirida (desenvolvida subsequente a exposição à droga). A resistência da bactéria aos efeitos tóxicos do agente antimicrobiano se desenvolve tanto em laboratório quanto na clínica e tem se tornado um problema de saúde pública cada vez mais sério (Williams, 2002).

O desenvolvimento da resistência a um antimicrobiano envolve uma mutação genética estável e transmissível de geração a geração. Este evento pode ocorrer através de qualquer mecanismo que resulte em alteração da composição genética bacteriana: mutação, transdução, transformação ou conjugação. Os três primeiros mecanismos participam do desenvolvimento da resistência às substâncias em microrganismos gram-positivos, enquanto que todos os quatro podem ser responsáveis pela aquisição de resistência de microrganismos gram-negativos. Independente do mecanismo genético envolvido no desenvolvimento de resistência, as alterações básicas são relacionadas com enzimas que metabolizam os antimicrobianos, alteração da permeabilidade da célula bacteriana à substância, aumento da quantidade de um antagonista endógeno à ação da substância ou alteração da quantidade de receptores da substância ou das características de ligação do composto com seu alvo crítico (Hardman, 2003).

O impacto da crescente resistência de microrganismos a medicamentos e a substâncias antimicrobianas específicas tem movimentado vários grupos de pesquisa, assim como a indústria farmacêutica, para o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas que sejam capazes de

lidar efetivamente com as estratégias de adaptação que os microrganismos elaboram.

2.3 Peptídeos antimicrobianos

Uma estratégia de proteção constantemente encontrada na natureza contra microrganismos patogênicos e utilizada pela grande maioria dos organismos vivos, como, por exemplo, plantas, animais vertebrados (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos), animais invertebrados (insetos e crustáceos) e microrganismos é a produção de peptídeos com atividade antimicrobiana.

Apesar de possuírem características estruturais diversificadas, em sua maioria são peptídeos catiônicos, de natureza anfifílica, podendo ser lineares ou cíclicos, e com tamanho que varia de 30 a 100 resíduos e uma grande variedade de aminoácidos em sua composição (Hwang & Vogel, 1998).

Os peptídeos antimicrobianos descobertos até o momento foram divididos em vários grupos baseados em seu peso molecular, estrutura secundária e terciária e presença ou ausência de pontes de dissulfeto. Esses peptídeos exibem ações bactericida, fungicida, virucida e tumoricida (Reddy *et al.*, 2004)

Os peptídeos antimicrobianos são divididos em duas classes (Hancock & Chapple, 1999):

a) Peptídeos sintetizados não-ribossomalmente: são drasticamente modificados e amplamente produzidos por bactérias. São exemplos os glicopeptídeos como a vancomicina.

b) Peptídeos sintetizados ribossomalmente: são produzidos por todas as espécies de vida, incluindo as bactérias, como o componente principal do sistema de defesa do hospedeiro. Neste grupo estão as bacteriocinas.

2.4 Bacteriocinas

2.4.1 Histórico

De acordo com Jack *et al.* (1995), já no final do século XIX, Pasteur e Joubert relataram a ocorrência de interações antagonísticas entre bactérias, ao observar que um isolamento bacteriano (possivelmente *E. coli*) era capaz de interferir com o crescimento de *Bacillus anthracis*. Da mesma forma, Babes, citado pelos mesmos autores observou, em 1885, a inibição de *Corynebacterium diphtheriae* por um isolado de *Staphylococcus* sp., isolado esse que passou a ser utilizado no tratamento de difteria na época, sob forma de nebulizadores para aplicação nasal (Florey, 1946). Contudo, foi o trabalho de Gratia (1925) o primeiro claramente elucidativo sobre bacteriocinas, ao encontrar que um isolado de *E. coli* produzia, em meio líquido de cultura, uma substância termoestável e dialisável, capaz de inibir, em baixas concentrações, o crescimento de outra linhagem da mesma espécie. É possível que esse tenha sido o passo inicial para o estudo das bacteriocinas (Jack *et al.*, 1995).

2.4.2 Definição

O termo bacteriocina era originalmente definido em termos de moléculas do tipo colicinas como sendo pequenos peptídeos com relativamente extensa atividade antibacteriana. Atualmente, o termo se refere a produtos bacterianos sintetizados ribossomalmente, modificados ou não, liberados no

meio extracelular, que possuem espectro de ação bactericida relativamente restrito (incluindo pelo menos algumas linhagens relacionadas com a espécie produtora) e que a espécie produtora tenha algum mecanismo de imunidade. (Jack *et al.*, 1995)

2.4.3 Classificação

Segundo Klaenhammer (1993), as bacteriocinas podem ser divididas em quatro classes segundo sua estrutura primária, estabilidade térmica, peso molecular e mecanismo de ação:

a) Classe I: pequenos peptídeos (<5kDa), compostos geralmente por um ou dois aminoácidos. São termoestáveis e contêm aminoácidos incomuns como lantionina e β -metillantionina. São chamados de lantiobióticos. Exemplos: nisina, lactacina 481, carnocina UI49 e lactocina S.

b) Classe II: pequenos peptídeos (<10 kDa) hidrofóbicos, termoestáveis, ativos em membrana e que não contêm lantionina. As bacteriocinas dessa classe formam hélices anfífilas com hidrofobicidade variável, estrutura de β -folha e estabilidade térmica moderada (100 °C) a alta (121 °C). Dentro dessa classe podem ser definidas três subclasses. Na subclasse IIa estão peptídeos ativos contra *Listeria* spp., com uma seqüência N-terminal comum, composta por -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys. Exemplos: pediocina PA-1, sakacinas A e P, leucocina A, bavaricina MN e curvacina A. Na subclasse IIb estão os peptídeos formadores de poros na membrana celular, constituídos de duas subunidades importantes para a atividade. Exemplos: lactococina G, lactococina M e lactacina F. Na subclasse IIc estão os peptídeos

ativados por tiol, que requerem resíduos de cisteína reduzida para tornarem-se ativos. Exemplo: lactacina B.

c) Classe III: grandes proteínas termolábeis (>30 kDa). Exemplos: helveticina J, helveticina V-1829, acidofilina e lactacinas A e B.

d) Classe IV: bacteriocinas complexas, compostas por uma fração protéica e frações lipídicas ou glicídicas necessárias para a atividade. Exemplos. plantaricina S, leuconocina S, lactocina 27 e pediocina SJ1.

Existem outras propostas de classificação de bacteriocinas de bactérias lácticas e a pesquisa na área de bacteriocinas é muito dinâmica, devendo ser necessário algum tempo até que um sistema de classificação definitivo seja obtido (De Martinis & Freitas, 2003).

Existem também as substâncias chamadas de substâncias semelhantes a bacteriocinas (bacteriocin-like) que englobam os compostos antimicrobianos de natureza protéica que ainda não estão completamente definidas ou não cumprem com todas as características das bacteriocinas. Estas substâncias geralmente possuem um espectro de ação maior, atuando contra uma variedade de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e até alguns fungos (De Vuyst & Vandamme, 1994).

2.4.4 Mecanismo de ação

Os fatores determinantes dos mecanismos microbicidas das bacteriocinas estão relacionados às características das membranas celulares das células microbianas e à natureza físico-química do peptídeo. A atividade e a seletividade dos peptídeos catiônicos são determinadas pelo modo de

interação com as membranas celulares dos microrganismos (Liang & Kim, 1999).

A maioria possui carga catiônica e hidrofobicidade relativamente alta em pH fisiológico, o que facilita a ligação e inserção na membrana das células microbianas. Em bactérias Gram-positivas, a interação ocorrerá com a única membrana citoplasmática que envolve a célula bacteriana, enquanto que em bactérias Gram-negativas a interação com a membrana externa e com a membrana citoplasmática se faz necessária para efetivação da atividade bactericida (Cleveland *et al.*, 2001).

2.4.4.1 Classe I

Como um esquema geral, pode-se afirmar que os lantiobióticos agem na membrana citoplasmática das bactérias sensíveis. Alguns, como mersadicina, actagardina e o grupo da cinamicina ligam-se a um lipídio específico ou ao alvo ligado a um lipídio, inibindo as reações enzimáticas subseqüentes. Em concentrações micromolares, os lantiobióticos catiônicos anfifílicos rompem a membrana sem especificidade. Após este passo, essas substâncias devem ligar-se adicionalmente a alvos específicos e, então, formar poros; esse processo é de alta afinidade e mediado por este alvo específico. Para o grupo da nisina e da epidermina, o alvo foi identificado como sendo o lipídio II. Este alvo é o mesmo das bacteriocinas não-formadoras de poro mersadicina e actagardina. Quando um alvo é utilizado para a formação do poro, fica imediatamente bloqueado para sua função natural (McAuliffe *et al.*, 2001).

Os mecanismos de ação utilizados por estas bacteriocinas são três, ilustrados na Figura 1. Os dois primeiros explicam a formação de poros:

1) o modelo de cunha ('wedge model') propõe que em contato com a membrana, o peptídeo adota uma conformação anfifílica com os resíduos carregados alinhados para uma face das moléculas e os resíduos hidrofóbicos alinhados para a outra. Os peptídeos catiônicos interagem com as cabeças dos grupos fosfolipídicos por forças iônicas causando um distúrbio na bicamada, enquanto os resíduos hidrofóbicos se inserem na membrana.

2) No segundo modelo, o lipídio II serve como molécula que "ancora" a ligação específica com a membrana da bactéria.

3) O alvo molecular da mersacidina e da actagardina no lipídio II é diferente do alvo da nisina. A nisina liga-se ao lipídio II pelo dipeptídeo D-Ala D-Ala C-terminal da cadeia lateral do pentapeptídeo; em contraste, a mersacidina e a actagardina interagem com o dissacarídeo-pirofosfato do lipídio II.

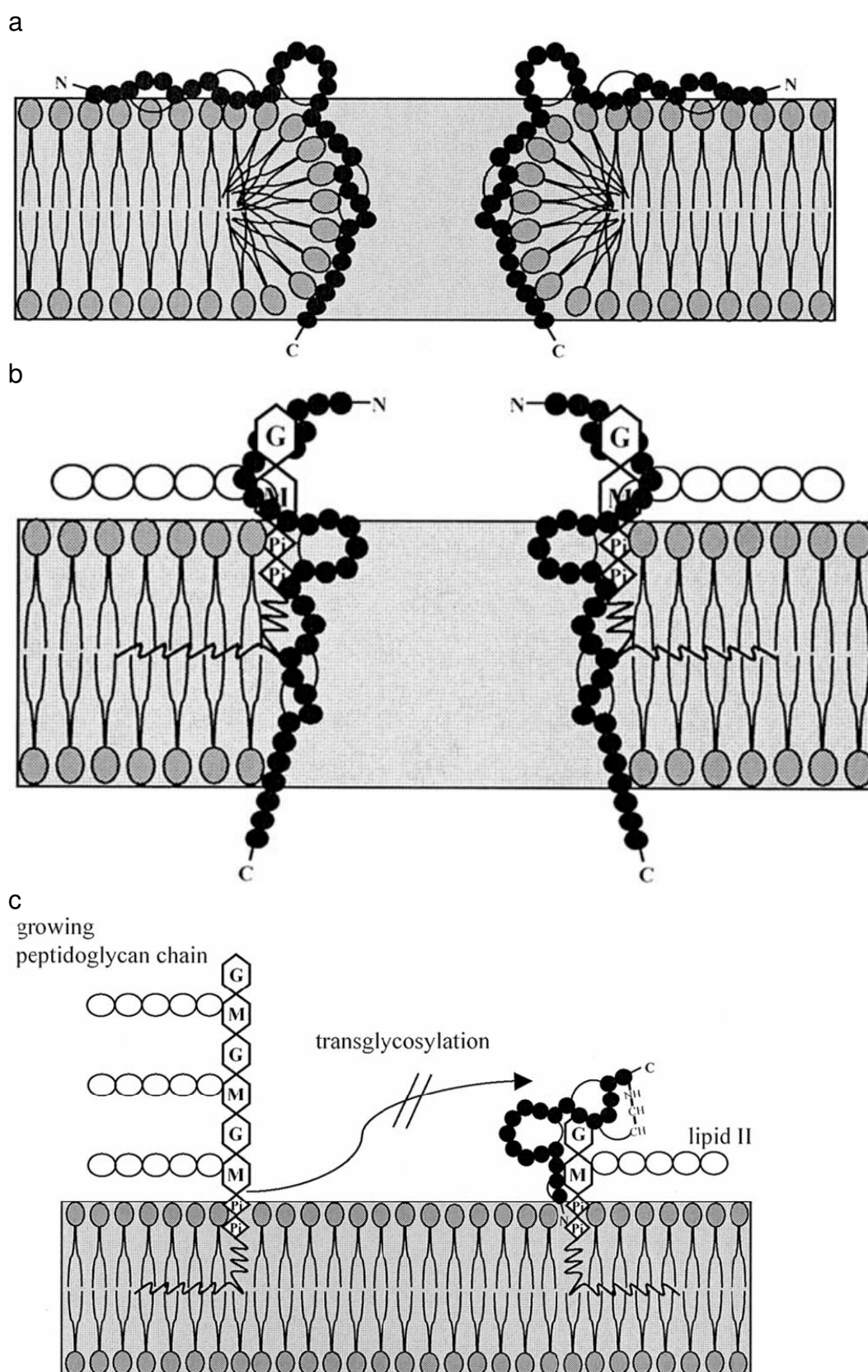


FIGURA 1: Atividades moleculares dos lantiobióticos. (a) em concentrações micromolares, os peptídeos catiônicos tipo A (nisina, epidermina,

Pep5 e outros) formam poros (wedge-like) e não dependentes de alvo específico. (b) em concentrações nanomolares, nisina e epidermina formam poros alvo-mediados usando o lipídio II como uma molécula “âncora”. (c) mersacidina e actagardina também se ligam ao lipídio II, mas apenas bloqueiam sua incorporação ao peptideoglicano (Wiedeman *et al.*, 2001).

Um efeito antibiótico adicional, a indução de autólise pela nisina e pela Pep5 tornam o mecanismo de ação destas bacteriocinas ainda mais complexo, porém podem explicar bem porque lantibióticos podem ser tão potentes (Hécharad & Sahl, 2002).

2.4.4.2 Classe II

A atividade desta classe de bacteriocinas, em concentrações nanomolares, induz, principalmente, permeabilização da membrana e extravazamento de moléculas das células sensíveis.

As bacteriocinas pertencentes à subclasse IIa propagam a força próton-motora pela dissipação do potencial de membrana ($\Delta\psi$) e/ou ΔpH . Particularmente, o ATP intracelular é reduzido em 98%, a captação de aminoácidos é bloqueada e os aminoácidos acumulados anteriormente são extravazados (Saïd *et al.*, 2000).

Foi sugerido que estas bacteriocinas poderiam formar poros na membrana citoplasmática, mas não há dados para suportar esta hipótese; diferentes modelos para a formação de poros foram propostos (Moll *et al.*, 1999). Estas bacteriocinas necessitam de um alvo molecular na superfície das células sensíveis para serem ativas. Esta classe exibe um espectro de ação estreito e apenas contra linhagens relacionadas. As mínimas diferenças na

composição dos fosfolipídios da mesma espécie ou de espécies relacionadas não poderiam explicar um espectro tão estreito. Além disso, a inatividade de compostos D (como a D-leucocina A) sugere que uma interação quiral da superfície da bactéria com a bacteriocina é necessária para a atividade, o que indica o envolvimento uma proteína de superfície como alvo molecular (Yan *et al.*, 2000). Por outro lado, evidências indicam que não é necessário um alvo protéico (Saïd *et al.*, 2000). Baseando-se nestes resultados contraditórios, Héchard & Sahl (2002) propuseram um modelo para o modo de ação das bacteriocinas da subclasse IIa (Figura 2). Inicialmente, a bacteriocina interage com a molécula-alvo, possivelmente uma manose permease. Esta interação é necessária para a atividade, provavelmente favorecendo a eminente interação com a membrana citoplasmática, ou mudando a conformação da permease para um estado aberto e, portanto, permeabilizando a célula-alvo. Em um segundo passo, a bacteriocina pode interagir com a membrana citoplasmática levando a formação do poro ou uma ruptura localizada na membrana. Para este segundo passo pode não ser necessária uma molécula-alvo, podendo ser dependente principalmente de interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas com a membrana.

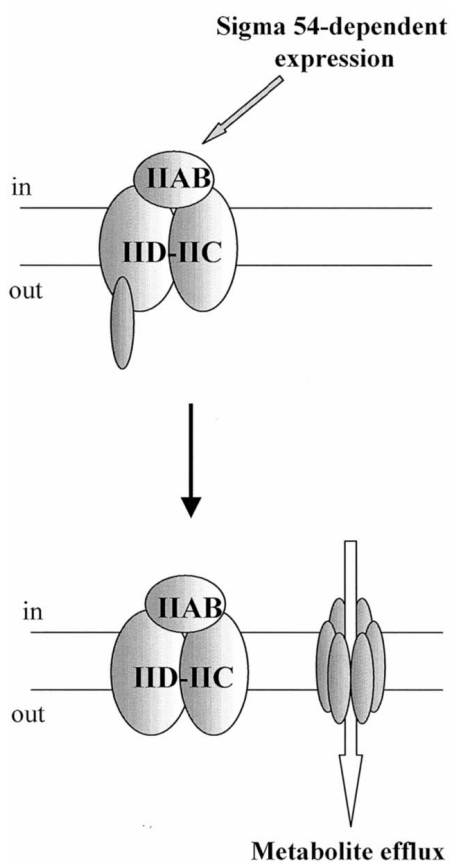


FIGURA 2: Modelo para o modo de ação das bacteriocinas da subclasse IIa. IIAB, IIC e IID representam, as subunidades da manose permease. A bacteriocina reconhece a permease e então forma poros na membrana citoplasmática. (Hécharde & Sahl, 2002).

Todas as bacteriocinas da subclasse IIb estudadas dissipam $\Delta\psi$. É proposto que elas formam poros hidrofílicos na membrana das células-alvo, levando-as a permeabilização. Os resultados indicam que, devidos às suas diferenças na estrutura primária, as bacteriocinas da subclasse IIb apresentam um mecanismo de ação diferente (Hécharde & Sahl, 2002).

As bacteriocinas da subclasse IIc são uma miscelânea de peptídeos sem similaridade estrutural; elas estão envolvidas em várias funções como alteração na permeabilidade da membrana, atividade de ferormônio e inibição da formação do septo (Hécharde & Sahl, 2002).

As classes III e IV são compostas por grandes bacteriocinas, as quais o mecanismo de ação é pouco estudado (Hécharde & Sahl, 2002).

2.4.5 Síntese

Os genes para a produção da bacteriocina ativa estão geralmente organizados em operons. Estes podem estar localizados no cromossomo ou em um plasmídeo ou transposon. De uma maneira geral, os microrganismos possuem genes codificando o peptídeo estrutural, proteínas que auxiliam no processamento para a forma ativa, proteínas que auxiliam o transporte da bacteriocina através da membrana, proteínas regulatórias e proteínas que conferem imunidade ao organismo produtor (Cleveland *et al.* 2001).

2.4.6 Imunidade

A imunidade da célula produtora da bacteriocina é um fenômeno que diferencia bacteriocinas de antibióticos. Os genes que codificam as proteínas responsáveis pela imunidade frente às bacteriocinas estão próximos aos genes estruturais, muito comumente no mesmo operon e freqüentemente próximos um ao outro (Siegers & Entian, 1995; Nes *et al.*, 1996).

Pensava-se inicialmente que existia um gene responsável pela imunidade dos lantiobióticos, mas aparentemente, a influência de várias proteínas é responsável pela imunidade destas bacteriocinas. O mecanismo pelo qual estas proteínas protegem a célula produtora não está totalmente elucidado (Saris *et al.*, 1996).

O fenômeno da imunidade é mais simples nas bacteriocinas de classe II. Um gene codifica para uma proteína imunitária, que, geralmente, é uma proteína básica, contendo 50 a 150 resíduos de aminoácidos, associada com a membrana. O mecanismo responsável pela imunidade também não está completamente elucidado (Nissen-Meyer *et al.*, 1993; Venema *et al.*, 1994, 1995).

2.4.7 Modificações pós-translocacionais

Embora as bacteriocinas sejam sintetizadas ribossomalmente, o transcrito primário deve ser modificado antes de tornar-se ativo. Os genes que codificam as enzimas que facilitam estas modificações estão, geralmente, próximos aos genes estruturais. Os lantibióticos sofrem as maiores modificações. Uma característica da síntese destas bacteriocinas é a presença de um peptídeo líder N-terminal seguido de um pró-peptídeo C-terminal. Além disso, aminoácidos não-usuais são formados (Kupke & Gotz, 1996).

Os pré-peptídeos das bacteriocinas de classe II também são modificados por clivagem da seqüência líder. Estas modificações são necessárias para a secreção e o transporte através da membrana celular (Diep *et al.*, 1996; Ehrmann *et al.*, 2000).

2.4.8 Transporte através da membrana celular

A maioria das bacteriocinas de classes I e II são translocadas para o exterior da célula por um sistema chamado transportador ABC. Estas bacteriocinas são secretadas por uma forma única de transportador ABC, que

possui um líder N-terminal de aproximadamente 150 resíduos de aminoácidos exercendo uma atividade proteolítica específica. Concomitante com a secreção, o transportador cliva a líder e ativa a bacteriocina. As únicas exceções são algumas bacteriocinas de classe II que são externalizadas pelo sistema sec-dependente. Nestas bacteriocinas, a clivagem é feita por uma protease específicas (Havarstein *et al.* 1994).

2.5 Purificação

2.5.1 Purificação de proteínas

A utilização de proteínas, para a aplicação, exige a sua purificação, uma vez que qualquer célula contém milhares de proteínas diferentes, que apresentam uma ampla faixa de atividade biológica.

Tipicamente, o processo de purificação de uma proteína é composto por múltiplas etapas cuidadosamente definidas. A escolha de um processo de purificação de uma proteína depende de suas características físico-químicas, de suas propriedades biológicas, da fonte da qual a proteína será purificada e da tecnologia de purificação disponível.

As cromatografias em coluna de gel, filtração ou adsorção (Deutscher, 1990) são os sistemas mais utilizados para a distinção entre proteínas e, apesar de existir uma lógica no emprego desses métodos, geralmente a otimização de um protocolo de purificação envolve muita experimentação do tipo tentativa e erro, especialmente pelo fato de que mesmo quando se conhecem as características físico-químicas das proteínas a serem purificadas, é muitas vezes imprevisível o comportamento destas no decorrer

do processo de purificação. Durante a purificação, não raramente ocorrem mudanças na conformação estrutural das proteínas, que podem provocar desde pequenas alterações nas suas características físico-químicas até modificação ou perda de sua atividade biológica.

O grande desafio dos processos de purificação de proteínas é o exaustivo trabalho para se encontrar a melhor estratégia, e, se for o caso, a adequação da metodologia para a escala de produção pretendida, garantindo que o produto final tenha todas as características necessárias para seu uso, seja em humanos, para diagnóstico, uso veterinário ou para processos analíticos de interesse para a pesquisa básica. É essencial considerar que, na maioria dos casos, as proteínas são macromoléculas muito frágeis, ou seja, sofrem facilmente alterações físico-químicas que levam a modificação ou perda de sua atividade (Deutscher, 1990).

O esquema ideal de purificação vai depender não só das características da proteína de interesse, como já citado anteriormente, mas também das características dos contaminantes presentes no extrato bruto. A linha geral a se seguir em um processo de purificação pode ser dividida em três fases indicadas abaixo (Janson & Rydén, 1998; Deutscher, 1990).

(I) Os primeiros passos de purificação geralmente são aqueles que possuem um menor poder de resolução, porém que permitem o tratamento de grande quantidade de material como a diálise, através de membrana, com porosidade inferior ao tamanho da proteína de interesse; a desnaturação por calor, quando a enzima de interesse é estável a altas temperaturas (geralmente acima de 70 °C), ou a precipitação com grande concentração de etanol,

acetona, sais inorgânicos, etc., que perturbam a distribuição de cargas e grupamentos hidrofóbicos das proteínas, aumentam a constante dielétrica da água e/ou diminuem a quantidade efetiva de moléculas de solvente disponíveis devido à mobilização deste em suas camadas de solvatação. Pode-se, inclusive, induzir uma precipitação fracionada das proteínas presentes no extrato bruto adicionando-se sais para concentrações finais definidas e, posteriormente, separando-se o precipitado protéico formado em cada concentração de sal do sobrenadante que contém aquelas com maior capacidade de solvatação. O sulfato de amônio é um dos agentes precipitantes amplamente usados nessa etapa. Apresenta como características a capacidade de precipitar irreversivelmente as proteínas sem aumento considerável de temperatura. Além disso, a solução final não apresenta alta densidade, facilitando a obtenção do precipitado protéico após centrifugação. Esse primeiro passo na purificação de proteínas tem como vantagem aumentar a concentração de proteína na amostra e/ou preparar amostra para ser aplicada em uma cromatografia.

(II) Esta é a fase mais eficiente da purificação de proteínas, uma vez que se exploram diferentes características físico-químicas das proteínas. Muito freqüentemente compreende o uso de diferentes técnicas de cromatografia em coluna que são classificadas de acordo com a característica protéica selecionada. A filtração em gel consiste na passagem de uma solução protéica em uma coluna preenchida com uma resina (o tipo de resina especifica a resolução, a velocidade do processo e, principalmente, a faixa de peso molecular a ser separado) que apresenta poros de uma determinada faixa

de tamanho. Moléculas com diâmetro molecular menor do que o do poro serão capazes de penetrar na resina, percorrendo então um caminho mais sinuoso e maior do que as moléculas que apresentam diâmetro molecular superior ao do poro, que não seriam retidas. As colunas de adsorção possuem, em suas matrizes, grupamentos químicos responsáveis pela interação com a proteína. Incluem-se nesse caso as matrizes que possuem grupamentos ionizados (carregados positivamente ou negativamente) nas cromatografias de troca iônica; que apresentam grupamentos hidrofóbicos (geralmente hidrocarbonetos lineares) nas cromatografias de fase reversa ou interação hidrofóbica e que possuem ligantes específicos nas chamadas cromatografias de afinidade. As proteínas retidas na coluna são eluídas gradualmente e, o que é mais importante, seletivamente, através da passagem de um gradiente de concentração de uma substância que compete pela ligação da proteína com os grupamentos químicos da resina (por exemplo: sais para as resinas de troca iônica, solventes orgânicos para fase reversa e solução contendo ligante específico para as de afinidade).

(III) A fase final inclui, geralmente, um único passo, que retira quaisquer contaminantes que porventura ainda estejam presentes na amostra. Pode ser uma liofilização que permita a retirada de contaminantes voláteis sob baixas pressões; uma diálise para excluir sais ou outras moléculas não voláteis da solução protéica, ultrafiltração, com o mesmo propósito que a diálise, porém tem como princípio a filtração da solução de proteína por uma membrana com poros de pequeno diâmetro, forçada por pressão, entre outras técnicas.

A atividade da proteína deve ser acompanhada em todos os passos de purificação, assim como a quantidade total de proteína, uma vez que esses parâmetros, em conjunto são cruciais para a avaliação da eficiência da purificação.

É comum sacrificar razoavelmente a recuperação da proteína para obtenção de um maior enriquecimento; desse modo, uma boa prática é iniciar a purificação com passos simples e com menor resolução, que geralmente são baratos e de maior capacidade, e, no decorrer do processo, ir aumentando a seletividade e a resolução dos passos de purificação, que são mais caros e que possuem menor capacidade.

2.5.2 Purificação de bacteriocinas

A caracterização de bacteriocinas é dependente da sua purificação e diversas técnicas são combinadas para a obtenção de proteínas puras (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997). Esta variação é atribuída à natureza extremamente heterogênea das bacteriocinas (Tagg *et al.*, 1976; Klaenhammer, 1993).

A produção de muitas bacteriocinas não é induzível e são detectados títulos relativamente baixos nas culturas. Portanto, para que a purificação seja possível são necessários o estudo da produção e a produção de uma grande quantidade da bacteriocina. As condições da incubação, como tempo, temperatura e pH influenciam fortemente a produção da bacteriocina (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997).

Quanto mais pura a bacteriocina, mais instável ela se torna. O problema de instabilidade não é atribuído à proteólise. A inativação é resultado, possivelmente, de um efeito específico no sítio catalítico, como a perda de cofatores ou modificações covalentes (Hécharde *et al.*, 1992).

A natureza catiônica e hidrofóbica das bacteriocinas é utilizada para sua recuperação de meios de cultura. Os protocolos de purificação em laboratório normalmente incluem um passo de precipitação com sulfato de amônio, seguido de várias combinações de cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica, com um passo final de RP-HPLC. Estes procedimentos podem produzir excelentes resultados em termos de purificação e rendimento, no entanto, são inviáveis para purificação em larga escala (Parente & Ricciardi, 1999; Uteng *et al.*, 2001). Para aumentar o rendimento, pode-se utilizar metodologias que purificam a bacteriocina por adsorção em “one-step”, utilizando-se suportes com carga oposta a da bacteriocina, como por exemplo células da espécie produtora (Yang *et al.*, 1992). Este procedimento pode ser utilizado para a purificação de grandes quantidades de bacteriocina.

2.6 Aplicações das bacteriocinas

Biopreservação é a extensão do tempo de armazenamento e o aumento da segurança de alimentos usando a sua microflora natural ou controlada e/ou seus produtos antimicrobianos (Stiles, 1996) como ácido lático, bacteriocinas e outros (Hugas, 1998).

As bactérias ácido-láticas recebem maior atenção quanto ao uso das suas bacteriocinas na biopresevação por serem utilizadas há muitos séculos na

fermentação e serem GRAS (generally regarded as safe). O espectro de ação destas bacteriocinas é, geralmente, restrito às bactérias Gram-positivas, porém são ativas contra importantes microrganismos deteriorantes e patogênicos como *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Ross *et al.*, 2002).

Apesar do grande número de trabalhos de pesquisa sobre a aplicação de bacteriocinas em bioconservação, o uso efetivo desses compostos em alimentos ainda é bastante limitado.

A nisina é a única bacteriocina disponível comercialmente para utilização em alimentos, produzida por algumas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. Essa bacteriocina é atóxica, destruída por enzimas digestivas e não confere sabores e odores desagradáveis aos alimentos. Uma vantagem das bacteriocinas sobre os antibióticos clássicos é que as enzimas digestivas as destroem (Caplice & Fitzgerald, 1999). A nisina pertence à classe dos lantibióticos, sendo composta por 34 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 3510 Daltons, podendo apresentar-se na forma de dímeros e tetrâmeros (De Martinis *et al.*, 2002).

A nisina foi reconhecida como aditivo alimentar pela Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS) em 1969, com o limite máximo de ingestão de 33.000 Unidades Internacionais/kg de peso corpóreo. Diversos países permitem o uso de nisina em produtos como leite, queijo, produtos lácteos, tomates e outros vegetais enlatados, sopas enlatadas, maionese e alimentos infantis (De Martinis *et al.*, 2002).

No Brasil, a nisina é aprovada para uso em todos os tipos de queijo no limite máximo de 12,5 mg/kg e é permitida a utilização desta bacteriocina em produtos cárneos com aplicação na superfície externa de salsichas de diferentes tipos. O produto pode ser aplicado como solução comercial de nisina a 0,02% em solução de ácido fosfórico grau alimentício (De Martinis *et al.*, 2002).

Assim como a nisina, a lacticina 3174 mostrou-se efetiva como conservadora quando adicionada a alimentos, tais como sopa desidratada (Morgan *et al.*, 2001) e salsicha suína (Scannel *et al.*, 2000) como ingrediente seco.

A efetividade das bacteriocinas como conservadores, entretanto, pode ser limitada por vários fatores como o relativo estreito espectro de ação (não são ativas contra patógenos Gram-negativos e esporos), difusão limitada em matrizes sólidas, inativação por enzimas proteolíticas ou por ligação a componentes do alimento como lipídios e bactérias resistentes às bacteriocinas (Devlieghere *et al.*, 2004).

Aos lantiobióticos ainda é atribuído o potencial de aplicação biomédico, podendo promover alternativas viáveis aos antibióticos no tratamento de infecções humanas e animais. Estudos mostram que a administração de lacticina 3147 pode proteger animais de infecção com patógenos causadores de mastite, como *Streptococcus dysgalactiae* e *Staphylococcus aureus* (Twomey *et al.*, 2002).

2.7 Resistência a bacteriocinas

A ocorrência de tolerância ou resistência a bacteriocinas entre bactérias deteriorantes de alimentos e patógenos em bactérias que normalmente são sensíveis é preocupante em relação ao uso prático como bioconservantes (Ennahar *et al.*, 2000). Em uma determinada espécie, linhagens tolerantes e/ou resistentes podem ocorrer naturalmente ou como resultado da exposição.

Dentro de uma mesma espécie, linhagens diferem enormemente em relação a sua sensibilidade em relação a uma determinada bacteriocina (Hurst, 1981; Ray & Daeschel, 1992).

Foi demonstrado que linhagens de *L. monocytogenes* desenvolvem espontaneamente resistência contra nisina em uma frequência relativamente alta (Mazzotta & Montville, 1997).

O mecanismo de resistência desenvolvido a bacteriocinas parece ser complexo e envolve várias mudanças estruturais e fisiológicas na célula bacteriana. Em particular, modificações na composição da membrana citoplasmática, como no caso da nisina, onde a resistência de linhagens *L. monocytogenes* está associada a alterações na composição de ácidos graxos (Mazzotta & Montville, 1997) e fosfolípidios (Verheul *et al.*, 1997).

2.8 Antimicrobianos produzidos por espécies de *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é um dos maiores da microbiologia. Suas características são muito variadas, sendo encontradas espécies com importância industrial e agrícola e espécies patogênicas produtoras de toxinas.

As espécies importantes industrialmente têm um histórico de uso seguro na indústria e em alimentos (Paik *et al.*, 1997).

Segundo o Manual Bergey's de Bacteriologia Sistemática, os *Bacillus* são bactérias em forma de bastonetes, Gram-positivas (ou positivas nos primeiros estágios de crescimento), formadoras de esporos, aeróbias ou anaeróbias facultativas e a maioria é catalase positiva. São agrupadas de acordo com as exigências físicas, químicas, nutricionais ou genéticas.

Membros do gênero *Bacillus* são conhecidos como produtores de peptídeos antimicrobianos, estes com diversas estruturas químicas. Peptídeos cíclicos como a gramicidina S, tyrocidina e bacitracina e lipopeptídeos como as iturinas, as bacilomicinas e as fengicinas são metabólitos secundários característicos isolados deste grupo de microrganismos (Gebhardt *et al.*, 2002).

As origens destes *Bacillus* produtores de substâncias antimicrobianas são diversas. Sugita *et al.* (1998) relataram a presença de bactérias intestinais produtoras de substâncias antimicrobianas em sete espécies de peixe da costa japonesa. Ao *B. amyloliquefaciens* encontrado na amoreira é atribuída a produção de um composto que impede a proliferação de bactérias e fungos fitopatogênicos (Yoshida *et al.*, 2001).

A produção de bacteriocinas ou de substâncias relacionadas tem sido descrita para várias espécies do gênero *Bacillus*, entre elas *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thermoleovarans* e *B. thuringiensis* (Novotny & Perry, 1992; Oscáriz *et al.*, 1999; Hyronimus *et al.*, 1998; Pattnaik *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2001).

A coagulina, produzida por *B. coagulans* I₄, possui um amplo espectro de ação que inclui bactérias pertencentes aos gêneros *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria* e *Pediococcus*. A bactericina foi estável em ampla faixa de pH e a 60 °C por 90 minutos (Hyronimus *et al.*, 1998).

Pattnaik *et al.* (2001) descreveram a lichenina, composto do tipo bacteriocina produzido por *B. licheniformis* que possui atividade surfactante e peso molecular de aproximadamente 1400 daltons.

B. subtilis produz diversos antibióticos, alguns deles sintetizados ribossomalmente e produzidos durante a fase ativa de crescimento como a subtilosina, a subtilina, a sublancina, o TasA, e outros sintetizados não ribossomalmente durante a fase estacionária, como a surfactina, a bacilisina e as iturinas (Tamehiro *et al.*, 2002).

As cereínas são as bacteriocinas produzidas por *B. cereus*. Algumas possuem amplo espectro de ação, como a cereína 7 e a cereína 8A (Oscáriz *et al.*, 1999; Bizani & Brandelli, 2002). Outras, como a cereína GN105 (Naclerio *et al.*, 1993) só tem ação contra espécies do mesmo gênero.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: câmara de fluxo laminar vertical marca Pachane, modelo PA 115; autoclave vertical, marca Phoenix, modelo AV75, incubador com agitação, marca Nova Técnica, modelo NTPH2; geladeira, marca Electrolux, modelo Prosdóscimo R26; freezer vertical, marca Cônsul, modelo Practice 240; estufas incubadoras, marca De Leo; aparelho purificador de água, marca Honeywell Braukmann TKA, destilador de água, marca Biomatic; banho-maria, marca Thermomix, centrífuga refrigerada, marca Hermle, modelo Z323K; centrífuga de bancada para tubos cônicos, marca Eppendorf, modelo 5410; espectrofotômetro, marca Hitachi, modelo U-1100; coletor de frações, marca BioRad, modelo 2128; medidor de pH, marca Nova Técnica; contador de colônias, marca Phoenix, modelo CP 608; microscópio, marca Olympus CX40; espectrofotômetro de infra-vermelho, marca Perkin Elmer, modelo SpectrumOne; agitador de tubos “vórtex”, marca Biomatic; capela de exaustão de gases; bomba de vácuo, marca Quimis Aparelhos Científicos LTDA, modelo 355B1; cuba para eletroforese marca Hoefer Scientific, modelo Mighty Small, fonte de eletroforese Pharmacia LKP EPS 500/400.

3.2 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados foram: ágar-ágar (Merck), caldo de cérebro e coração (Merck), ágar nutriente (BBL Becton Dickinson), caldo Mueller Hinton (Oxoid), ágar triptona de soja (Mast Diagnostics), caldo triptona de soja (Acumedia), ágar Man Rogosa e Shape (Oxoid), extrato de levedura (Biobrás), peptona bacteriológica (Oxoid), peptona de carne (Merck), ágar de ferro e açúcar tríplice (Biobrás) e ágar MacConkey (Oxoid).

3.3 Reagentes

Os reagentes utilizados foram: acetona (Nuclear), metanol (Merck), etanol (Merck), 2-propanol (Merck), butanol (Merck), dimetil-sulfóxido (Merck), tolueno (Vetec), xileno (Merck), clorofórmio (Merck), n-hexano (Merck), ciclohexano (Riedel de Haën), β -mercaptoetanol (Riedel de Haën), N,N'-metilendiácridamida (Merck), N,N,N',N'-tetrametiletildiamina – “TEMED” (Riedel de Haën), Tween 20 (Reagen); Tween 80 (Nuclear), Triton X-100 (Sigma), deoxicalato de sódio (Merck), dodecil sulfato de sódio (Nuclear), ácido clorídrico (Merck), ácido tricloroacético (Nuclear), ácido etilendiaminotetracético – “EDTA” (Riedel de Haën), sulfato de amônio (Nuclear), fosfato de sódio (Merck), hidróxido de sódio (Nuclear), iodeto de potássio (Nuclear), citrato trissódico (Merck), fosfato de sódio (Merck), cloreto de sódio (Merck), persulfato de amônio (Merck), hidroximetilaminometano – “tris” (Sigma), glicina (Merck) Coomassie R250 (Merck), verde de malaquita (Nuclear), safranina T (Riedel de Haën), papaína solúvel (Merck), tripsina de

pâncreas suíno tipo II (Sigma), pronase E (Sigma), proteinase K (GibcoBRL), azocaseína (Sigma).

3.4 Microrganismo produtor

O microrganismo utilizado como produtor do composto com atividade antimicrobiana foi uma bactéria isolada do intestino do peixe Jaraqui (*Piaractus mesopotamicus*), da bacia amazônica (região próxima a Manaus, 3°06'S, 60°01'W). A bactéria foi selecionada em trabalhos anteriores dentre 87 isolados de solos e peixes da região amazônica, como sendo um microrganismo produtor de substâncias antimicrobianas (Motta *et al.*, 2004). Este isolado foi gentilmente cedido pelo Prof^o. Spartaco Astolfi Filho da Universidade Federal do Amazonas (UFA).

3.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão

As células de dois cultivos diferentes (24 e 48h) foram centrifugadas e lavadas duas vezes com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3). As células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (v/v), formaldeído 2,0% (v/v) em tampão fosfato 0,12M por 10 dias e então fixadas em tetróxido de ósmio a 2% no mesmo tampão, por 45 minutos. As amostras foram desidratadas em série cetônica (30–100%) e incluídas em Araldite-Durcupan por 72 horas a 60 °C. Os cortes ultrafinos, obtidos em ultramicrotomo Leica Ultracult UCT, foram coletados em grades, cobertos com filme collodion (solução de nitrocelulose) e contrastados com acetato de uranila 2% em citrato de chumbo Reynolds. Todas as

preparações foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão Phillips EM 208-5.

3.4.2 Caracterização citomorfológica, bioquímica e fisiológica

Para a caracterização da cultura, provas bioquímicas e fisiológicas e análises citomorfológicas foram realizados segundo Sneath *et al.* (1986). Após elucidação do gênero foi feita a análise filogenética da cultura.

3.4.3 Análise filogenética

A sequência do rDNA 16S foi obtida após extração do DNA genômico, PCR amplificação e sequenciamento (Bastos *et al.*, 2000). O DNA foi amplificado utilizando-se o Geneamp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, USA) por desnaturação a 96 °C (3 min), 30 ciclos de 94 °C (1 min), 55 °C (30 segundos) e 72 °C (2 min), e um passo final de extensão a 72 °C (7min). O rDNA 16S amplificado por PCR foi seqüenciado pelo ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elemer), utilizando dideoxinucleotídeos terminadores fluorescentes. A seqüência de 1.522 pb foi submetida ao GenBank (AY962472). O algoritmo BLAST foi utilizado para a busca por seqüências homologas no GenBank. A árvore filogenética foi construída a partir das distâncias de Jukes-Cantor usando o método neighbor-joining (software MEGA3, Kumar *et al.*, 2004). O padrão de ramificação foi conferido por 1000 replicações de bootstrap.

3.5 Microrganismos indicadores

Os microrganismos utilizados como culturas indicadoras para os testes de sensibilidade da substância antimicrobiana foram microrganismos patogênicos para humanos e animais, fitopatógenos, microrganismos deteriorantes de alimentos entre outros. Os seguintes microrganismos foram testados: *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966; *Aeromonas* sp. (isolado clínico, PetLab – Laboratório Veterinário de Análises Clínicas, Porto Alegre); *Actinomyces* sp. (isolado clínico, PetLab); *Bacillus cereus* (alimento – LARA); *Bacillus cereus* 8AI (isolado do solo – ICTA); *Bacillus subtilis* (isolado de alimento – ICBS); *Brevibacterium linens* ATCC 9172; *Brevibacterium linens* ATCC 19391; *Brochotrix termosphaeta* ATCC 11105; *Corynebacterium fimi* NTCS 7547; *Enterobacter aerogenes* (isolado de alimento – LARA); *Enterococcus faecalis* (isolado de alimento – ICTA); *Erwinia caratorovora* subsp. *atroseptica* 132 (isolado de alimento – Departamento de Fitossanidade da UFRGS); *Erwinia caratorovora* subsp. *atroseptica* 325 (isolado de alimento – Departamento de Fitossanidade da UFRGS); *Erwinia caratorovora* subsp. *caratorovora* 325 (alimento – Departamento de Fitossanidade da UFRGS); *Escherichia coli* ATCC 25922; *Escherichia coli* (isolado de alimento – LACEN); *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; *Listeria innocua* (isolado de alimento – LARA); *Listeria monocytogenes* ATCC 7644; *Pasteurella haemolytica* (isolado clínico – PetLab); *Pseudomonas* sp. (isolado clínico – PetLab); *Rhodococcus* sp. (isolado clínico – PetLab); *Salmonella* Enteritidis (isolado de alimento – LACEN); *Salmonella* Gallinarium (isolado de alimento – ICTA); *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus aureus* (isolado de alimento – LACEN);

Staphylococcus aureus 4059 (isolado clínico – PetLab); *Staphylococcus aureus* 5089 (isolado clínico – PetLab); *Staphylococcus epidermidis* (isolado clínico – PetLab); *Staphylococcus intermedius* (isolado clínico – PetLab); *Streptococcus* sp. 1 β -hemolítico (isolado clínico – PetLab); *Streptococcus* sp. 2 sinusite (isolado clínico – PetLab); *Streptococcus* sp. 3 urina (isolado clínico – PetLab). As seguintes leveduras foram testadas: *Candida kefir*, (isolada de uma lagoa de tratamento de efluentes da empresa de processamento de soja Bunge Alimentos S.A.); *Candida* sp. (isolado de alimento – ICTA); *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, proveniente do *Centraalbureau vor Schimmelcultures* (Holanda) e fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia do ICTA.

3.6 Manutenção dos microrganismos

Os microrganismos utilizados neste trabalho, assim como os meios de cultivo utilizados e as temperaturas ótimas de crescimento estão relacionados na Tabela 1. Os microrganismos foram mantidos congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. As culturas foram preparadas sendo inicialmente inoculadas em tubos de ensaio com seus respectivos meios de cultivo na forma de caldo e incubados na respectiva temperatura ótima de crescimento durante 24-48 horas. Posteriormente, 800 μL do cultivo acrescidos de 200 μL de glicerol estéril foram transferidos para tubos de plástico. Para a cultura produtora foi utilizado BHA na temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A partir dos congelados as culturas foram inoculadas em caldo e posteriormente em placa, sendo re-inoculados periodicamente.

TABELA 1: Microrganismos indicadores utilizados e condições de crescimento

Culturas indicadoras	Medio de cultura	Temperatura (°C)
Gram positivas		
<i>Actinomyces</i> sp. (clínico)	MHA	30
<i>Bacillus cereus</i> (alimento)	BHA	37
<i>Bacillus cereus</i> 8AI (solo)	BHA	37
<i>Bacillus subtilis</i> (alimento)	BHA	37
<i>Bacillus</i> sp. BL16	BHA	37
<i>Brevibacterium linens</i> ATCC 9172	TSA	25
<i>Brevibacterium linens</i> ATCC 19391	TSA	25
<i>Brochotrix termosphaeta</i> ATCC 11105	BHA	37
<i>Corynebacterium fimi</i> NTCS 7547	BHA	37
<i>Enterococcus faecalis</i> (alimento)	BHA	37
<i>Erwinia caratorvora</i> A132	BHA	25
<i>Erwinia caratorvora</i> A325	BHA	25
<i>Erwinia caratorvora caratorvora</i> 329	BHA	25
<i>Listeria innocua</i> (alimento)	BHA	37
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC7644	BHA	37
<i>Rhodococcus</i> sp. (clínico)	MHA	37
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	BHA	37
<i>Staphylococcus aureus</i> (alimento)	BHA	37
<i>Staphylococcus aureus</i> 4059 (clínico)	BHA	37
<i>Staphylococcus aureus</i> 5089 (clínico)	BHA	37
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (clínico)	BHA	37
<i>Staphylococcus intermedius</i> (clínico)	MHA	37
<i>Streptococcus</i> sp. (clínico- β hemolítico)	MHA	37
<i>Streptococcus</i> sp. (clínico – sinusite)	MHA	37
<i>Streptococcus</i> sp. (clínico – urina)	MHA	37
Gram negativas		
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	MHA	37
<i>Aeromonas</i> spp. (clínico)	MHA	37
<i>Enterobacter aerogenes</i> (alimento)	BHA	37
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	BHA	37
<i>Escherichia coli</i> (alimento)	BHA	37
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	MRSA	30
<i>Pasteurella haemolytica</i> (clínico)	MHA	37
<i>Pseudomonas</i> sp. (clínico)	BHA	37
<i>Salmonella</i> Enteritidis (alimento)	MHA	37
<i>Salmonella</i> Gallinarium (clínico)	MHA	37
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	PA	25

BHA, ágar de cérebro e coração; MHA, ágar Müeller Hinton; PA, ágar batata; TSA, ágar triptona de soja; MRSA, ágar Man Rogosa Sarpe.

3.7 Determinação do número de células viáveis

Para determinar o número de células viáveis por mL (UFC/mL), foram coletadas alíquotas de 100 μ L e diluídas de 10^1 até 10^7 em tubos de microcentrífuga já contendo 900 μ L de solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%). Após a homogeneização em vórtex, três alíquotas de 20 μ L foram aplicadas em placas com meio adequado. As placas foram incubadas em estufa por 24 horas na temperatura ótima de crescimento da bactéria testada. Realizou-se a contagem na diluição com um número de colônia entre 20 e 200, em contador de colônias.

3.8 Obtenção do sobrenadante da cultura

3.8.1 Preparação do pré-inóculo

Em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 20 mL de caldo cérebro coração (BHI) foi colocada uma alçada da cultura que estava contida em placas de ágar de cérebro e coração (BHA). A cultura foi incubada por 24 horas em equipamento incubador com agitação (125 rpm) a 30 °C.

3.8.2 Obtenção do sobrenadante bruto

Uma alíquota de 1 mL do pré-inóculo foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de BHI. A cultura foi incubada por 48 horas em equipamento incubador com agitação (125 rpm) a 30 °C. Após este período, a cultura foi centrifugada durante 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi esterilizado por filtração através de filtros de celulose com poros de 0,22 μ m (para volumes pequenos) ou mediante filtração a vácuo com

filtros de sílica de 0,22 μm (para volumes grandes). O filtrado foi conservado em geladeira a 4 °C até utilização, por um período máximo de 10 dias.

3.9 Determinação das unidades arbitrárias por mililitro

Foi utilizado o método da diluição seriada para determinar o número de unidades arbitrárias por mL. O sobrenadante foi diluído sucessivamente em placas de microtitulação na proporção desde 1:1 em solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%), tendo-se diluições de $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{64}$ e assim sucessivamente. Alíquotas de 20 μL destas diluições foram inoculadas em discos e testadas em placas de BHA previamente inoculadas com um solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%) contendo 10^8 células/mL de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas. O título designado como UA/mL foi definido como sendo a recíproca da última diluição que apresentou halo de inibição.

3.10 Curva de crescimento e produção

Foi realizada uma curva de crescimento do microrganismo produtor e da produção da substância antimicrobiana a 30 °C em meio TBS para avaliar a cinética de produção da substância antimicrobiana.

3.10.1 Preparação do pré-inóculo

A bactéria produtora foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 20 mL de TSB e incubada em equipamento com agitação (125 rpm) a 30 °C por 24 horas. Após este período, uma alíquota foi transferida para um

tubo contendo TSB, ajustando-se a absorvância a 600 nm em espectrofotômetro até atingir o valor de 0,3; valor este que corresponde a aproximadamente 10^7 UFC/mL (previamente determinado através de uma curva padrão relacionando a absorvância e UFC/mL).

3.10.2 Curva de crescimento

Uma alíquota de 1 mL do pré-inóculo foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL de TBS. Este foi considerado o ponto zero da curva. A medida da absorvância a 600 nm, a determinação das UFC/mL e das UA/mL conforme descrito nos itens 3.7 e 3.9 respectivamente foram realizados em intervalos de 4 horas. O pH foi acompanhado durante todo o experimento através de fita universal de pH. O experimento foi realizado em duplicata.

3.11 Caracterização inicial do sobrenadante

O sobrenadante bruto da cultura (conforme item 3.8) foi testado quanto à estabilidade frente a tratamento térmico, estabilidade frente a variação do pH, ação em diferentes pHs, estabilidade frente a ação de enzimas proteolíticas, estabilidade frente a solventes orgânicos e outras substâncias químicas, com a finalidade de avaliar a natureza da substância antimicrobiana.

3.11.1 Espectro de ação

A atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto contra as culturas indicadoras indicadas no item 3.6 foi avaliada pelo método de difusão em ágar com discos (Kimura et al., 1998).

Foram realizadas suspensões das culturas indicadoras em solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%) com 10^8 células/mL (0,5 na escala de Mac Farland) e espalhadas com suabe estéril em placas contendo os meios conforme citados na tabela 1. Após a secagem, discos de celulose de 6 mm de diâmetro foram colocados na placa. Alíquotas de 20 μ L do sobrenadante bruto foram inoculadas nos discos. Após o período de incubação de 24-48 horas nas condições ótimas de crescimento das culturas indicadoras e a observação da formação dos halos de inibição, foi realizada a medida dos halos com uma régua milimetrada. O teste foi realizado em quadruplicata com dois sobrenadantes de datas diferentes.

3.11.2 Estabilidade térmica

Alíquotas de 600 μ L do sobrenadante bruto foram incubadas em temperaturas de 10 °C (geladeira), 20 e 30 °C (estufa), 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C (banho de água) durante 30 minutos e 121 °C/115 kPa (autoclave) durante 15 minutos. Na temperatura de 100 °C testou-se a estabilidade durante 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Após cada tratamento, a atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foi testada conforme descrito no item 3.11.1. Realizou-se, paralelamente, controles sem tratamento térmico para o cálculo da

atividade antimicrobiana residual em cada caso. A fórmula utilizada para o cálculo da atividade residual em percentagem foi:

$$A.R. (\%) = (H_T - 6) / (H_C - 6) \times 100 \quad (1)$$

Onde: H_T = halo do sobrenadante após tratamento (mm)

H_C = halo do controle (mm)

A.R. = atividade residual

Cada experimento foi realizado em duplicata com três sobrenadantes de datas diferentes.

3.11.3 Estabilidade frente ao pH e ação em diferentes pHs

Para avaliar a ação em diferentes pHs, o sobrenadante bruto foi incubado em pHs entre 3 e 10 por 2 horas a 25 °C, utilizando 200 µL do sobrenadante e 200 µL de tampão. Os tampões utilizados foram tampão glicina pH 3,0; tampão citrato (pH 4,0 e 5,0); tampão fosfato (pH 6,0 a 8,0) e tampão tris (pH 9,0 e 10,0) todos em uma concentração de 0,25 M. Após a incubação, a atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foi testada conforme descrito no item 3.11.1. Imediatamente após, para avaliar a estabilidade frente a diferentes pHs, as soluções foram neutralizadas. Para ambos os casos, o controle foi realizado com 200 µL do sobrenadante e 200 µL de PBS ao invés de tampão. A atividade residual foi calculada segundo a equação 1. Cada experimento foi realizado em duplicata com três sobrenadantes de datas diferentes.

3.11.4 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas

A resistência às enzimas proteolíticas foi avaliada por incubação do sobrenadante em presença de papaína, protease tipo XXV (pronase E), proteinase K e tripsina em concentrações finais de 2 e 10 mg/mL durante 60 minutos a 37 °C. Alíquotas de 180 µL do sobrenadante foram incubadas com alíquotas de 20 µL de solução enzimática (preparadas na concentrações de 2 e 10 mg/mL em PBS). Para o controle das enzimas, 180 µL de PBS foram incubados com 20 µL de solução enzimática. Para o controle do sobrenadante 180 µL do sobrenadante foram incubados com 20 µL de PBS. Em todos os casos, depois da incubação a atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foi testada conforme descrito no item 3.11.1. A atividade residual foi calculada segundo a equação 1. Cada experimento foi realizado em duplicata com três sobrenadantes de datas diferentes.

3.11.5 Estabilidade frente a solventes orgânicos, detergentes e outras substâncias químicas

Para avaliar a estabilidade do sobrenadante bruto frente a diversos compostos orgânicos, alíquotas de 200 µL do sobrenadante com 100 µL de cada solvente orgânico foram homogeneizadas e incubadas durante 2 horas a 37 °C. Os seguintes solventes foram utilizados: acetona, metanol, etanol, 2-propanol, butanol, dimetil-sulfóxido (DMSO), tolueno, xileno, e clorofórmio. Os controles do sobrenadante e dos solventes foram realizados levando-se em consideração a miscibilidade ou não entre o solvente e o sobrenadante.

A estabilidade frente a detergentes foi determinada utilizando Tween 20, Tween 80 e Triton X-100 em uma concentração final de 10% (v/v) e deoxicolato de sódio em uma concentração final de 1 mg/mL. Alíquotas do sobrenadante foram incubadas com os detergentes por 60 minutos a 37 °C.

A estabilidade ao tratamento com EDTA (concentração final de 10 mM) e com ácido tricloroacético (TCA - concentração final de 100 mg/mL) também foi avaliada. Para o tratamento com TCA, o sobrenadante foi incubado com o ácido por 2 horas a 4 °C, centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos, e neutralizado antes do teste de atividade antimicrobiana.

Em todos os testes, a atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foi testada conforme descrito no item 3.11.1. A atividade residual foi calculada segundo a equação 1. Cada experimento foi realizado em duplicata com três sobrenadantes de datas diferentes.

3.11.6 Cromatografia de gel filtração

O padrão de eluição da substância com atividade antimicrobiana foi avaliado por cromatografia de gel filtração. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante bruto foi eluído em coluna de gel filtração (0,8 x 30 cm) Sephadex G-100 pré-equilibrada com tampão fosfato 10 mM pH 7 ou com o mesmo tampão com alta força iônica (contendo NaCl 1,5 M). Foram coletadas 18 alíquotas de 1 mL determinando-se a sua absorbância a 280 nm e a atividade antimicrobiana conforme item 3.11.1 contra *L. monocytogenes* ATCC 7644.

Uma alíquota de 1 mL de inibidor de tripsina (de peso molecular igual a 21 kDa) foi também inoculada na coluna a fim de se obter um valor de referência.

3.12 Determinação do efeito contra *Listeria monocytogenes*

3.12.1 Curva de crescimento

Foi realizado um pré-inóculo da bactéria indicadora em tubo contendo 10 mL de BHI incubado na estufa a 37 °C durante 18 horas. Após este período, a cultura foi diluída com meio BHI até obter uma concentração de aproximadamente 10^5 células por mL (através de realização prévia de curva padrão). Usou-se um inóculo de 500 µL em tubos contendo 16 mL de BHI. O crescimento foi monitorado em intervalos de 2 horas através da absorbância (600 nm) e a contagem de UFC/mL. Após 4:30 horas de incubação foram adicionados 4 mL de sobrenadante (concentração final de 100 UA/mL para *Listeria monocytogenes*. No cultivo controle adicionou-se 4 mL de meio (BHI) no lugar do sobrenadante. Após 1:30, 3:30, 5:30 e 7:30 horas foram monitorados a absorbância e a viabilidade celular (UFC/mL).

3.13 Purificação

Diversos passos foram executados para purificar a substância antimicrobiana. Em cada um deles foi quantificada a atividade antimicrobiana (UA/mL) conforme item 3.9 e a quantidade de proteína pelo método de Lowry (conforme item 3.15) para calcular o fator de purificação e o rendimento em cada passo. A figura 3 mostra o esquema de purificação utilizado.

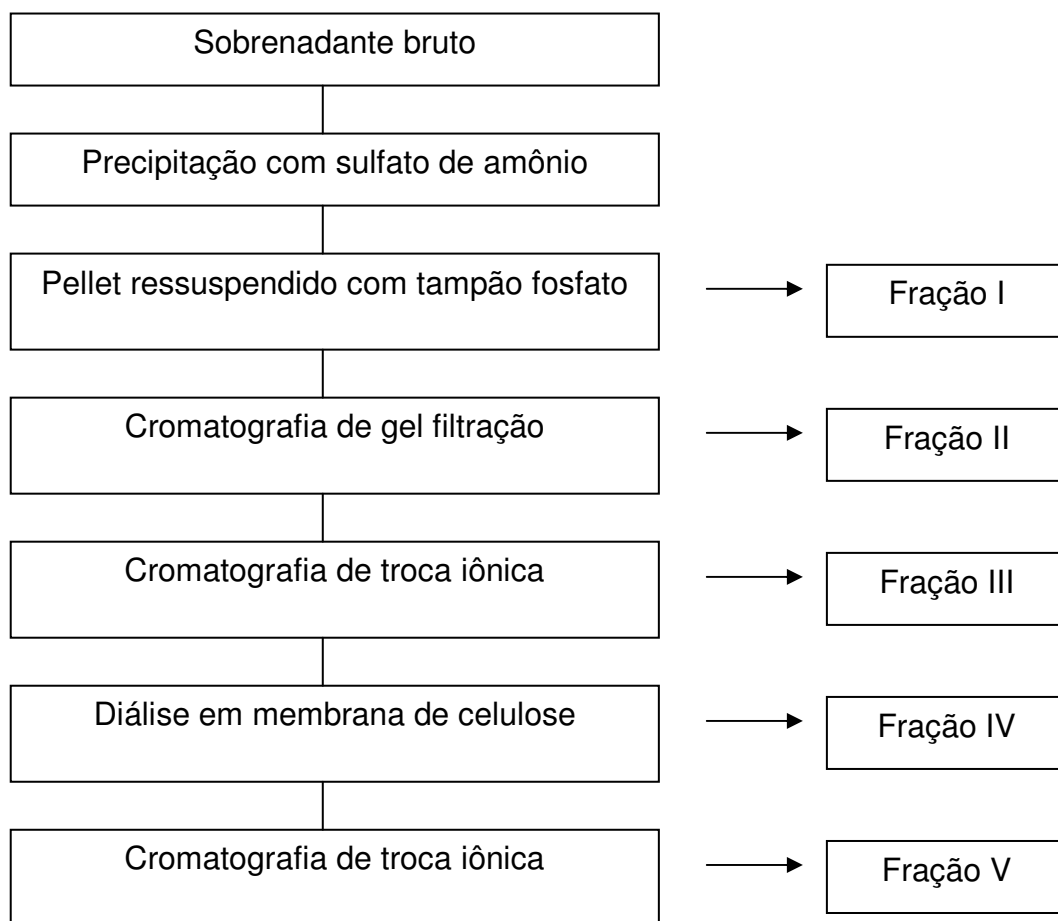


FIGURA 3: Esquema de purificação.

3.13.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio

A bactéria foi cultivada nas condições ótimas de produção da substância com atividade antimicrobiana conforme descrito no item 3.8, sendo o volume de cultivo 100 mL.

As seguintes faixas de saturação inicialmente utilizadas foram: 0-20%; 20-40%; 40-60%; 60-80% e 80-100%. Para uma melhor concentração da atividade antimicrobiana, foram utilizadas, então, as seguintes faixas: 0-20%; 20-50%; 50-100%.

O sobrenadante foi colocado em banho de gelo com agitação magnética e o sulfato de amônio foi sendo adicionado aos poucos até atingir a

concentração de 20%. Após deixar sob agitação por 30 minutos, a suspensão foi centrifugada a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi separado do sobrenadante e ressuspendido em 1 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,0. O sobrenadante foi recolocado em banho de gelo e então foi adicionada a quantidade de sulfato de amônio para atingir 40% de saturação. A operação anterior foi repetida e o sobrenadante foi precipitado até 60% de saturação. O procedimento foi repetido para os intervalos de 80 e 100% de saturação com sulfato de amônio.

Amostras de cada etapa da precipitação foram reservadas para a determinação da proteína solúvel pelo método de Lowry (conforme item 3.15) e a quantificação da atividade antimicrobiana em UA/mL (conforme item 3.9).

3.13.2 Cromatografia de gel filtração

Esta técnica baseia-se na separação pela diferença de tamanho de moléculas em uma solução através da passagem destas por uma matriz cromatográfica. A resina utilizada foi a Sephadex G-100, que foi hidratada por um período de 72 horas e montada em uma coluna de 0,8 x 30 cm.

Uma nova precipitação de 100 mL do sobrenadante foi realizada. Desta vez, o precipitado do intervalo de 0-20% foi desprezado e o precipitado da faixa de saturação do sulfato de amônio que obteve a maior atividade antimicrobiana (20-50%) foi novamente ressuspendido em 1,5 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,0.

Uma alíquota de 1 mL foi aplicada na coluna Sephadex G-100 pré-equilibrada com tampão fosfato 10 mM pH 7,0. O fluxo utilizado foi de

aproximadamente 20 mL/h (gravidade simples). Um total de 20 frações de 1 ml foram coletadas em tubos de microcentrífuga e a absorbâncias a 280 nm foi determinada em espectrofotômetro. Todas as frações foram testadas quanto a atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foi testada conforme descrito no item 3.11.1.

As frações com atividade antimicrobiana foram agrupadas e alíquotas foram reservadas para a determinação da proteína solúvel pelo método de Lowry (conforme item 3.15) e a quantificação da atividade antimicrobiana em UA/mL (conforme item 3.9).

3.13.3 Cromatografia de troca iônica

A separação por cromatografia de troca iônica depende da adsorção reversível de moléculas de soluto carregadas a um grupo imobilizado de moléculas de carga opostas. A matriz cromatográfica consiste em uma matriz porosa insolúvel onde um grupo carregado está ligado covalentemente. Este grupo é associado a íons, que podem ser reversivelmente trocados com outros íons de mesma carga, sem alterar a matriz. O grupo carregado escolhido foi a dietilaminoetil (DEAE), que consiste em uma coluna catiônica, e a matriz utilizada foi a Sepharose. A matriz foi montada em uma coluna de 1 x 10 cm.

O conjunto de frações com atividade antimicrobiana obtidas na etapa anterior foi aplicado na coluna DEAE-Sepharose previamente equilibrada com tampão fosfato 10 mM pH 7,0. Inicialmente, a coluna foi eluída com este tampão e, posteriormente, com um gradiente linear de NaCl, formado através

da combinação gradual do tampão fosfato 10 mM pH 7,0 e deste contendo 1,5 M de NaCl.

Um total de 60 frações de 3 mL foram coletadas através de um coletor, sendo determinadas a absorvância a 280 nm e a atividade antimicrobiana de cada alíquota contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foi testada conforme descrito no item 3.11.1.

As frações que continham a substância antimicrobiana foram agrupadas e dialisadas em sacos de diálise previamente ativados, contra tampão fosfato 10 mM pH 7,0, durante 24 horas, sob agitação magnética e refrigeração.

O conjunto de alíquotas com atividade antimicrobiana dialisado foi novamente submetido a cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose nas mesmas condições descritas anteriormente. As alíquotas que continham a substância antimicrobiana foram agrupadas e novamente dialisadas.

Alíquotas dos dois conjuntos de frações com atividade antimicrobiana, antes e depois das diálises, foram reservadas para a determinação da proteína solúvel pelo método de Lowry (conforme item 3.15) e a quantificação da atividade antimicrobiana em UA/mL (conforme item 3.9).

O último dialisado foi fracionado em tubos de microcentrífuga contendo 1 mL cada, os quais foram congelados, liofilizados e mantidos congelados a -20°C . Este material foi denominado fração V.

3.14 Caracterização da fração V

A fração V foi caracterizada realizando-se alguns dos testes descritos no item 3.11 (estabilidade térmica e estabilidade frente a enzimas proteolíticas).

3.14.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A pureza da fração V e o seu peso molecular foram estimados por eletroforese em gel de poliacrilamida, conforme descrito por Bhunia & Johnson (1992), com algumas modificações. Seis alíquotas de 1 mL fração V foram liofilizadas e ressuspendidas em 200 µL de tampão tris 125 mM pH 6,8 contendo 0,1% de SDS (dodecil sulfato de sódio) e 20% de glicerol. Em uma das alíquotas de cada fração foi adicionado 5% de β-mercaptoetanol sendo colocadas em banho-maria a 100 °C por 5 min. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 14% e a eletroforese foi realizada utilizando um sistema Mighty Small com uma corrente de 20 mA por gel. Após a eletroforese o gel foi cortado e uma das metades (aquela contendo as frações sem β-mercaptoetanol) foi lavada com água destilada estéril várias vezes para a remoção do SDS e posteriormente colocada sobre uma placa contendo uma fina camada de BHA. Sobre ele foi despejado um BHA contendo aproximadamente 10⁶ UFC/mL de *L. monocytogenes* ATCC 7644. Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C, foi observada a presença de halos de inibição na banda correspondente à substância antimicrobiana de natureza protéica existente. A outra metade do gel (onde foram colocadas as amostras

com β -mercaptoetanol) foi corada com Coomassie blue G250 para observar as bandas de proteína.

3.14.2 Eletroforese capilar

A eletroforese capilar foi realizada em (equipamento) conforme descrito por Kist *et al.* (1994), utilizando um capilar de 60 cm x 50 μ m. Amostras de 5 ml foram aplicadas utilizando tampão citrato 50 mM, pH 4,5 para a corrida e detecção por fluorescência.

3.14.3 Espectroscopia de Infra-Vermelho

O espectro de infra-vermelho foi medido como um pellet de brometo de potássio, registrado em um espectrômetro por transformada de Fourier (Madison, WI, USA).

3.14.4 Espectroscopia de massas

Esta determinação foi realizada pelo Dr. Daniel Lorenzini do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo. Uma amostra de bacteriocina purificada foi dialisada contra água Milli-Q e liofilizada. Este material foi dissolvido em ácido trifluoroacético 0,046%, aplicado em resina cromatográfica C18 (Vydac, EUA) empacotada em uma ponteira de 200 μ l para micropipetadores, eluído da resina com 80% acetonitrila e 0,046% ácido trifluoroacético e concentrado em centrífuga a vácuo (modelo SpeedVac SC100, Savant, EUA). Em seguida a amostra foi analisada em um espectrômetro de massas MALDI-TOF (Ettan

MALDI-TOF/Pro system, Amersham Biosciences, Sweden), operando em modo "reflectron" e usando a matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico.

3.15 Determinação da proteína solúvel

Para determinar a concentração de proteína solúvel em cada uma das etapas de purificação foi utilizado o método de Lowry *et al.* (1951) com a utilização de reagente de Folin e Ciocalteu (FC). A curva padrão foi realizada com soro de albumina bovina. A absorbância foi medida a 560 nm. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

3.16 Efeitos sobre *Listeria monocytogenes*

3.16.1 Microscopia eletrônica de transmissão

Foi realizado um pré-inóculo da bactéria indicadora em tubo contendo 10 mL de BHI incubado na estufa a 37 °C durante 18 horas. Após este período, a cultura foi diluída com meio BHI até obter uma concentração de aproximadamente 10^5 células por mL (através de realização prévia de curva padrão). Em tubo de microcentrífuga, uma alíquota de 1 mL da solução da bactéria indicadora foi incubada por 1 hora com a 1600 UA/mL da substância com atividade antimicrobiana. O controle foi feito colocando-se tampão fosfato 10 mM pH 7,0. A preparação das amostras para a microscopia eletrônica foi feita conforme descrito no item 3.4.1.

3.16.2 Determinação da concentração inibitória mínima

Na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizaram-se os métodos descritos no manual do National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2006), modificado para a utilização de microplacas.

Nesta avaliação, 100 μ L de uma suspensão contendo 10^6 UFC/mL do microrganismo em BHI foram adicionados em 100 μ L de solução fisiológica estéril contendo diferentes concentrações da fração II. As concentrações utilizadas foram de 50 UA/mL a 12800 UA/mL (concentração final). No controle positivo foi utilizada solução fisiológica estéril no lugar da fração II. Nos controles negativos foram colocados 100 μ L de meio BHI estéril e 100 μ L das diferentes concentrações da fração II. Posteriormente, as placas foram incubadas durante 24 h a 25 °C.

A menor diluição da fração II onde não houve crescimento foi considerada como a CIM.

3.16.3 Determinação da concentração bactericida mínima

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada semeando uma alíquota de 20 μ L dos poços que não apresentaram crescimento em poços de outra microplaca contendo 100 μ L de BHI estéril. Os controles também foram reinoculados. A microplaca foi incubada em estufa a 25 °C durante 24 h. A menor diluição da fração II onde não houve crescimento foi considerada como a CBM.

3.16.4 Curva dose-resposta

Uma suspensão em BHI de *Listeria monocytogenes* contendo 10^5 UFC/mL foi inoculada com diferentes concentrações da fração I (entre 50 UA/mL e 6400 UA/mL concentração final) durante 120 minutos. Foram determinadas em cada caso as UFC/mL finais. O experimento foi realizado em triplicata.

O mesmo experimento foi realizado com a fração II. Para esta foram utilizadas concentrações entre 50 UA/mL e 3200 UA/mL de concentração final.

3.16.5 Cinética de ação da substância antimicrobiana

Após determinar a dose mínima capaz de eliminar 10^5 UFC/mL para as Frações I e II em 0 minutos, foi determinada a cinética de ação de ambas frações. Para isto, inoculou-se uma suspensão em BHI contendo 10^5 UFC/mL de *L. monocytogenes* ATCC 7644 com a dose de 3200 UA/mL da fração I e determinaram-se as UFC/mL após 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90 e 105 minutos de incubação a 25 °C. O controle foi realizado colocando solução fisiológica estéril no lugar da fração I. O experimento foi realizado em duplicata.

O mesmo experimento foi realizado com a fração II. Neste caso também foi utilizada uma concentração final de 3200 UA/mL. As UFC/mL foram determinadas após 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos de incubação a 25 °C.

4 RESULTADOS

4.1 Microrganismo produtor

4.1.1 Microscopia eletrônica

A figura 4 mostra as fotos da microscopia eletrônica de transmissão de células do microrganismo produtor com 24 e 48 horas de cultivo. A observação do isolado mostra bastonetes com endósporos. Os esporos são elípticos, localizados em posição terminal. A microscopia eletrônica de transmissão mostrou características morfológicas típicas de células Gram-positivas. A membrana citoplasmática é coberta por uma camada de peptideoglicanos.

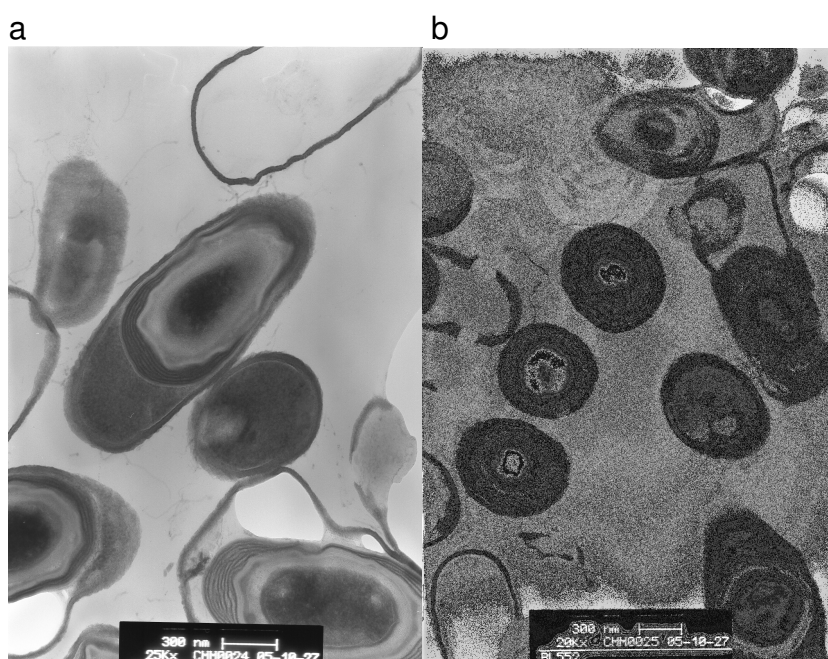


FIGURA 4: Microscopia eletrônica de transmissão de células de *Bacillus* sp. P45 em cultivo de 24 (a) e 48 (b) horas. ICTA-UFRGS, 2006.

4.1.2 Caracterização citomorfológica, bioquímica e fisiológica

A linhagem produtora foi submetida a estudos taxonômicos baseados na morfologia celular, morfologia da colônia, características de crescimento e diversos testes bioquímicos.

Os resultados dos testes citomorfológicos estão mostrados na tabela 2 e os resultados dos testes bioquímicos e fisiológicos na tabela 3.

TABELA 2: Resultados da citomorfologia.

	TESTE	RESULTADO
Tamanho das células	Comprimento (μm)	2,8
	Largura (μm)	0,8
Esporos	Forma	elíptico
	Deformação/ Esporângio	-
	Posição	terminal
Coloração	Gram	+
Mobilidade		+

+, positivo; - negativo.

TABELA 3: Resultados das provas bioquímicas e fisiológicas.

	TESTE	RESULTADO
	Hidrólise da Esculina	+
	Hidrólise da Caseína	+
	Hidrólise do Amido	+
	Hidrólise da Tirosina	-
	Produção da Catalase	+
	Produção da Lecitinase	-
	Produção do Acetil-Metil Carbinol (Acetoína)	+
	Produção do Indol	-
	Utilização do Citrato	+
	Liquefação da Gelatina	+
	Redução do $\text{NO}_3 - \text{NO}_2$	+
	Crescimento Anaeróbico	+
	Crescimento em NaCl 5%	+
	Crescimento em NaCl 7%	+
	Crescimento em NaCl 10%	+
	Crescimento em pH 5,7	+
	Crescimento na Temperatura de 50°C	+
	Fermentação da Glicose	+
	Fermentação da Arabinose	-
	Fermentação da Xilose	+
	Fermentação do Manitol	+
	Fermentação da Glicose – P/ Produção de Gás	-

+, positivo; - negativo.

As células são bastonetes Gram-positivos e são anaeróbios facultativos. As colônias são amplas, membranosas e irregulares. A bactéria foi catalase positiva e oxidase negativa.

Os testes realizados indicaram que a bactéria pertence ao gênero *Bacillus* (Sneath *et al.*, 1986; MacFaddin & Lippincott, 2000).

4.1.3 Análise filogenética

O sequenciamento do rDNA 16S e a subsequente comparação com as espécies do gênero *Bacillus* indicou que a bactéria utilizada neste estudo está relacionada às espécies *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*. A figura 5 mostra o dendograma filogenético.

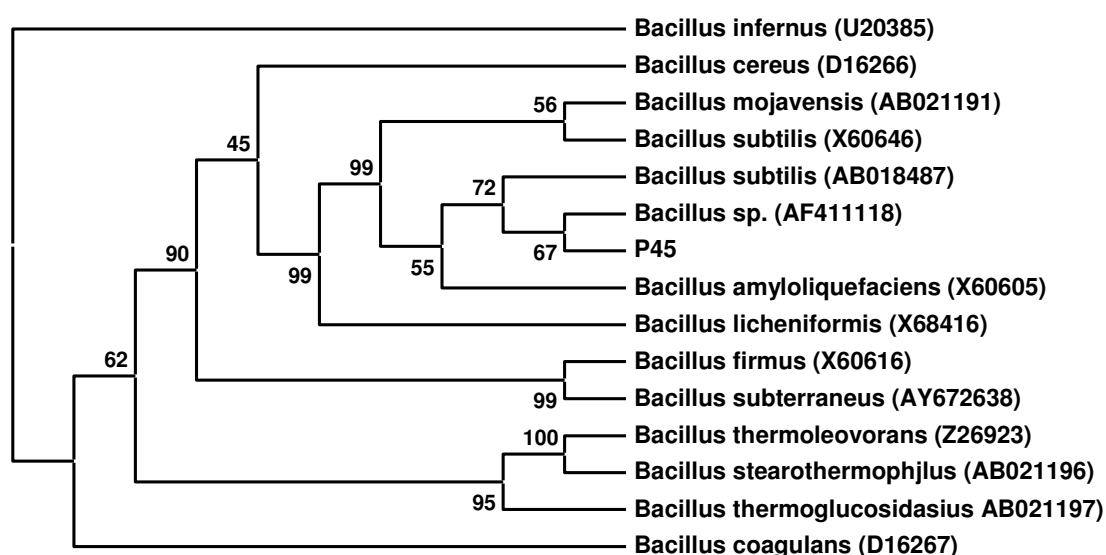


FIGURA 5: Dendograma filogenético baseado na seqüência do rDNA 16S indicando a posição do isolado P45 entre representantes do gênero *Bacillus*. ICTA-UFRGS, 2006.

4.2 Curva de crescimento e produção

A bactéria produtora foi incubada aerobicamente em TBS a 30 °C sob agitação mecânica. O crescimento celular alcançou a fase estacionária após 16 horas de incubação. A atividade antimicrobiana foi inicialmente detectada na fase de crescimento exponencial e a atividade máxima foi

observada em 30 horas, quando a bactéria estava na fase estacionária (Figura 6). O pH manteve-se constante em 7,5 durante todo o crescimento. Não foi observada inativação da atividade antimicrobiana durante o cultivo

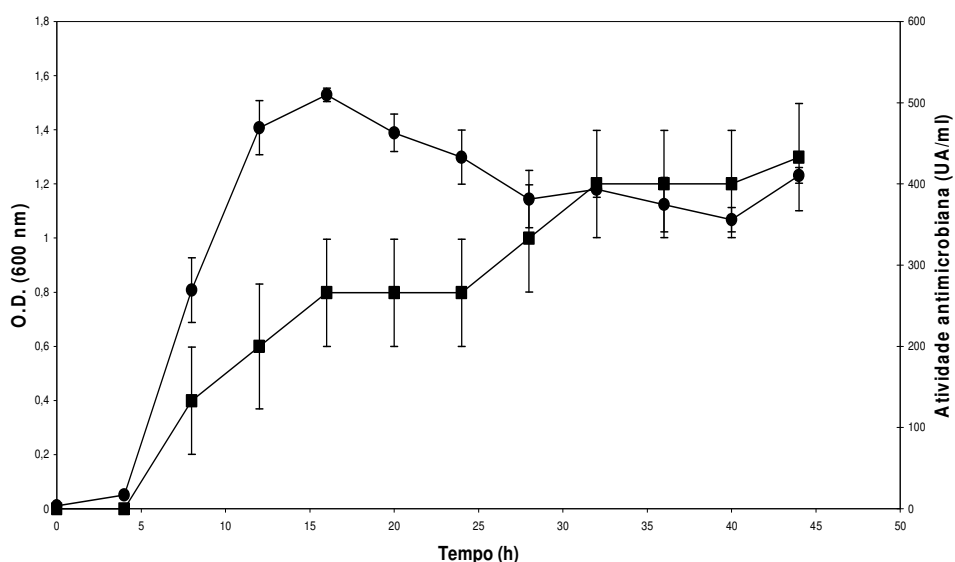


FIGURA 6: Curva de crescimento e produção de atividade antimicrobiana. A densidade óptica (●), e a atividade antimicrobiana (■) foram monitorados. ICTA-UFRGS, 2006.

4.3 Caracterização do sobrenadante bruto

4.3.1 Espectro de ação

A atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto foi testada contra diversos microrganismos, entre eles bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e também leveduras. Os halos de inibição obtidos quando 20 μ L do sobrenadante foram aplicados sobre discos de celulose de 6 mm de diâmetro nas placas previamente inoculadas com os microrganismos indicadores estão demonstrados na tabela 4. Foi encontrada atividade entre microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Algumas bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos como *L. monocytogenes*, *E. carotovora* e isolados

clínicos de *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus aureus* foram inibidas pelo sobrenadante.

TABELA 4: Espectro de ação do sobrenadante bruto.

Culturas indicadoras	Halo de inibição (mm)^ψ
Gram positivas	
<i>Actinomyces</i> sp. (clínico)	-
<i>Bacillus cereus</i> (alimento)	9,7*
<i>Bacillus cereus</i> 8A (solo)	8,5
<i>Bacillus subtilis</i> (alimento)	8,5*
<i>Bacillus</i> sp. BL16	7
<i>Brevibacterium linens</i> ATCC 9172	13
<i>Brevibacterium linens</i> ATCC 19391	13
<i>Brochotrix termosphaeta</i> ATCC 11105	20
<i>Corynebacterium fimi</i> NTCS 7547	10,5
<i>Enterococcus faecalis</i> (alimento)	13
<i>Erwinia caratorvora</i> A132	12,5
<i>Erwinia caratorvora</i> A325	13
<i>Erwinia caratorvora caratorvora</i> 329	-
<i>Listeria innocua</i> (alimento)	8*
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC7644	11
<i>Rhodococcus</i> sp. (clínico)	11
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (alimento)	12*
<i>Staphylococcus aureus</i> 4059 (clínico)	15*
<i>Staphylococcus aureus</i> 5089 (clínico)	10*
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (clínico)	13*
<i>Staphylococcus intermedius</i> (clínico)	12
<i>Streptococcus</i> sp. (clínico- β hemolítico)	13
<i>Streptococcus</i> sp. (clínico – sinosite)	15
<i>Streptococcus</i> sp. (clínico – urina)	14
Gram negativas	
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	-
<i>Aeromonas</i> sp. (clínico)	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (alimento)	-
<i>Escherichia coli</i> (alimento)	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	13,3*
<i>Pasteurella haemolitica</i> (clínico)	8
<i>Pseudomonas</i> sp. (clínico)	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis (alimento)	-
<i>Salmonella</i> Gallinarium (clínico)	10
Leveduras	
<i>Candida</i> sp. (alimento)	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	8

^ψ Diâmetro ao redor do halo; * Halos com colônias resistentes; - sem inibição.

4.3.2 Estabilidade térmica

O sobrenadante bruto foi incubado durante 30 min em diferentes temperaturas e a sua atividade residual foi determinada. A atividade mostrou-se estável a todas as temperaturas testadas, mantendo aproximadamente 100% da sua atividade (Figura 7).

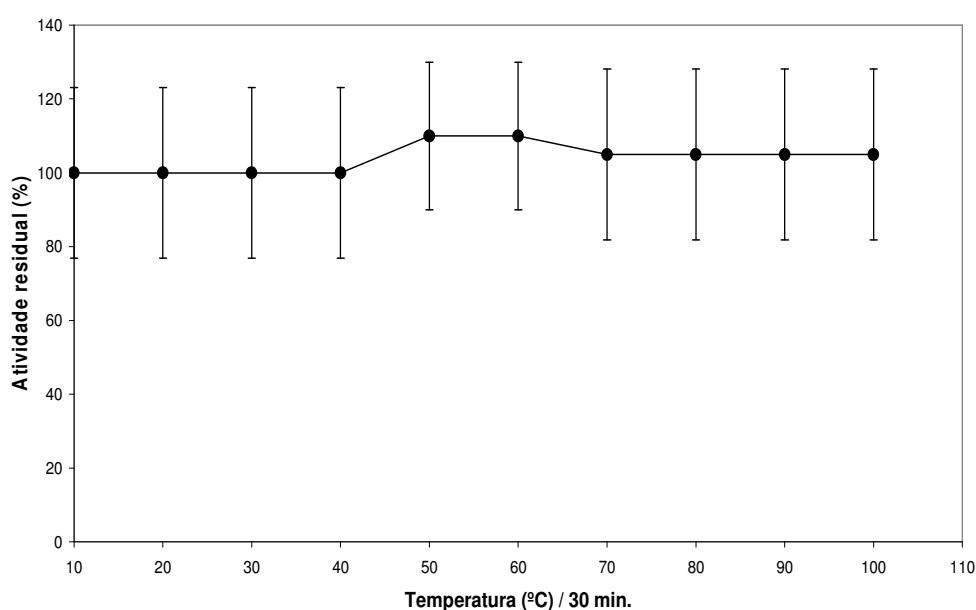


FIGURA 7: Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto após incubação em diferentes temperaturas durante 30 min. ICTA-UFRGS, 2006.

A atividade também foi mantida ao ser incubado a 100 °C por até 30 min, perdendo parcialmente a sua atividade em intervalos de tempo maiores e sendo reduzida a metade após 60 minutos (Figura 8).

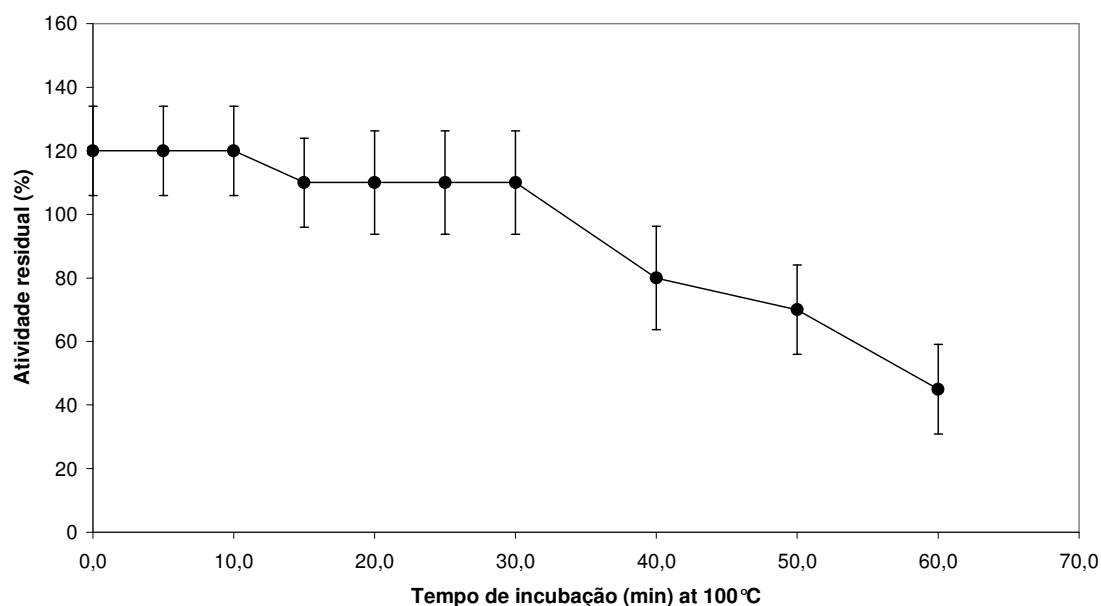


FIGURA 8: Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana a 100 °C durante diferentes intervalos de tempo. ICTA-UFRGS, 2006.

A atividade foi perdida totalmente a 4 °C por um período de 10 dias (Tabela 5). Ao passar pelo processo de liofilização houve perda parcial da sua atividade, mantendo-se em 80%.

TABELA 5: Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto.

TRATAMENTO	ATIVIDADE RESIDUAL * (%)
40 °C / 30 min	100 ± 15
60 °C / 30 min	100 ± 15
80 °C / 30 min	100 ± 15
100 °C / 30 min	110 ± 25
121 °C / 115 kPa / 15 min	70 ± 10
4 °C / 10 dias	0
-20 °C / 15 dias	100 ± 10
Liofilização	80 ± 10

Atividade residual comparada com a atividade antimicrobiana antes do tratamento térmico (conforme equação 1).

4.3.3 Estabilidade e atividade em diferentes pHs

Foi avaliada a atividade em diferentes pHs e a estabilidade da atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto em diversos pHs (de 3 a 10). O resultado é mostrado na Figura 9. O sobrenadante mostrou-se estável até o pH 10, mantendo pelo menos 80% da sua atividade, perdendo 40% da sua atividade em pH 11. O sobrenadante mostrou aproximadamente a mesma atividade em pHs entre 6 e 10 (90 a 110%), sendo de aproximadamente 125 % em pH 5.

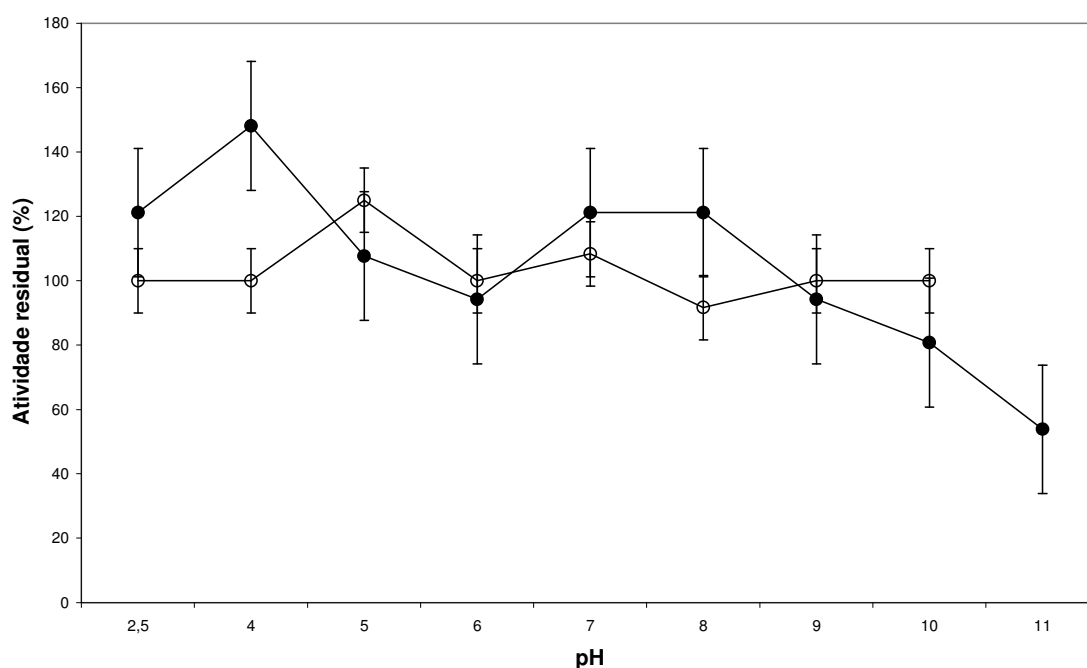


FIGURA 9: Influência do pH na atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto. Estabilidade frente a diversos pHs (●) e ação em diferentes pHs (○). ICTA-UFRGS, 2006.

4.3.4 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas

O sobrenadante bruto foi tratado com papaína, pronase E, proteinase K e tripsina para testar o efeito de enzimas proteolíticas, sendo

determinada sua atividade residual. O sobrenadante manteve a sua atividade ao ser tratado com 2 mg/mL de todas as enzimas testadas. Já com uma concentração final de 10 mg/mL só manteve a sua atividade frente a papaína (Tabela 6).

TABELA 6: Atividade residual do sobrenadante bruto após tratamento com enzimas proteolíticas.

ENZIMA	CONCENTRAÇÃO FINAL (mg/mL)	ATIVIDADE RESIDUAL (%)
Pronase E	2	86 ± 15
	10	0
Proteinase K	2	98 ± 6
	10	0
Tripsina	2	98 ± 9
	10	0
Papaína	2	100 ± 9
	10	95 ± 12

Testes realizados em pH 7,0 e incubação a 37° C durante 1 h. Posteriormente foi avaliada a atividade residual frente a *L. monocytogenes* ATCC 7644.

4.3.5 Estabilidade frente a solventes orgânicos, detergentes e outras substâncias químicas

O efeito de diferentes substâncias químicas no sobrenadante bruto foi avaliado. A atividade antimicrobiana foi totalmente perdida ao ser tratado com ácido tricloroacético. Quando tratado com solventes orgânicos e outras substâncias, a atividade foi diminuída a 70% por tolueno e deoxicolato de sódio e totalmente perdida com o 1-butanol (Tabela 7).

TABELA 7: Efeito de diferentes substâncias químicas na atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto

TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO	ATIVIDADE RESIDUAL (%)
Acetona	50% (v/v)	100
Clorofórmio	50% (v/v)	100
Dimetil sulfóxido	50% (v/v)	100
Etanol	50% (v/v)	100
Metanol	50% (v/v)	100
Butanol	50% (v/v)	0
Xilol	50% (v/v)	100
Tolueno	50% (v/v)	70
EDTA	10 mM	100
Ácido tricloroacético	100 mg/mL	0
Deoxicolato de sódio	1 mg/mL	70
Tween 20	10% (v/v)	100
Tween 80	10% (v/v)	100

Testes realizados incubando o sobrenadante tratado a 37° C durante 2 h para os solventes orgânicos e 1 h para detergentes. Para o TCA a incubação foi realizada a 4° C durante 2 h, centrifugado e neutralizado. Posteriormente foi avaliada a atividade residual em cada caso frente a *L. monocytogenes* ATCC 7644.

4.3.6 Estimativa do peso molecular

O sobrenadante bruto foi submetido a duas condições de cromatografia de gel filtração em coluna de Sephadex G-100. Na primeira, que foi realizada com tampão fosfato 10 mM, a atividade antimicrobiana foi eluída no volume morto da coluna (previamente determinado), sugerindo um peso molecular maior que 150 kDa. Foi então realizada uma eluição com tampão com alta força iônica (contendo 1,5 M NaCl) e, neste caso, a atividade antimicrobiana foi detectada dentro do volume de resolução da coluna (Figura 10). A comparação do perfil de eluição da substância com o padrão de peso

molecular conhecido (inibidor de tripsina) sugere um peso molecular para a substância antimicrobiana inferior a 20 kDa (resultado não mostrado).

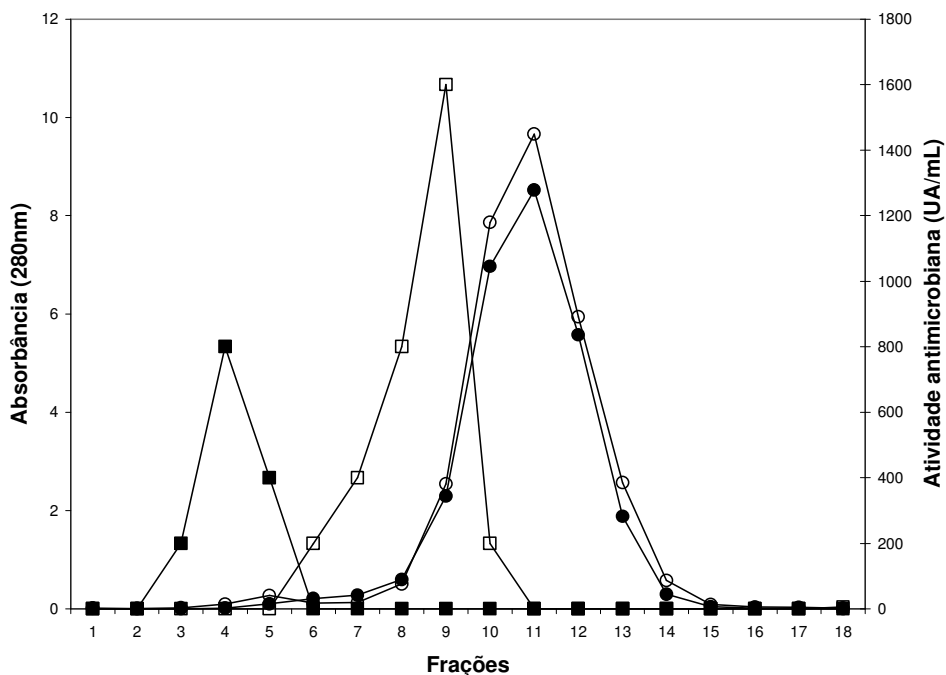


FIGURA 10: Perfis de eluição da atividade antimicrobiana durante cromatografia de gel filtração. Foi medida a absorbância a 280 nm do sobrenadante eluído com tampão fosfato 10 mM (●) ou tampão fosfato 10 mM contendo 1,5 M de NaCl (○) e a atividade do sobrenadante eluído com tampão fosfato 10 mM (■) ou tampão fosfato 10 mM contendo 1,5 M de NaCl (□). ICTA-UFRGS, 2006.

4.4 Determinação do efeito contra *Listeria monocytogenes*

ATCC 7644

A figura 11 mostra o efeito do sobrenadante bruto contra a cultura de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 na fase inicial de crescimento exponencial. Pode-se observar que 1,5 horas após a aplicação do sobrenadante bruto todas as células da bactéria indicadora foram mortas. O efeito bacteriolítico foi verificado pela queda da absorbância para aproximadamente 0,06.

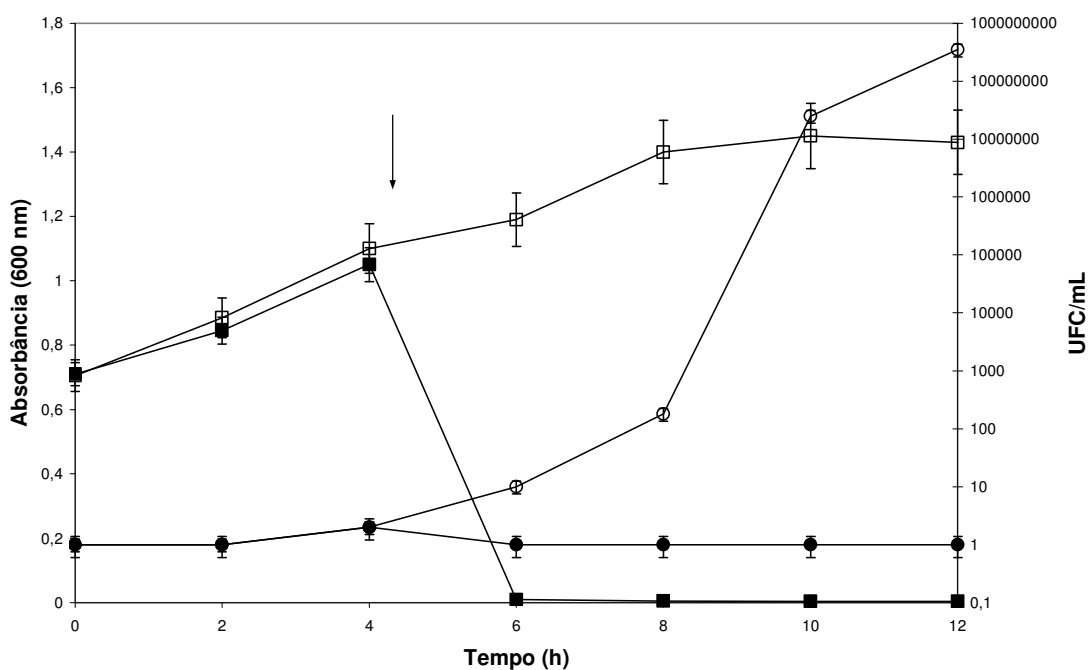


FIGURA 11: Efeito do sobrenadante bruto contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7466. Após 4:30 min (indicado com uma seta) foi adicionado o sobrenadante com uma concentração final de 100 UA/mL. Foi acompanhada a absorbância a 600 nm do controle (□) e do tratado (■) e as UFC / mL do controle (○) e do tratado (●). ICTA-UFRGS, 2006.

4.5 Purificação da substância antimicrobiana

4.5.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio

A tabela 8 mostra os dados da precipitação fracionada. Pode-se observar que o precipitado obtido no intervalo de 20 a 50% de saturação de sulfato de amônio apresenta a maior atividade específica (1.240 UA/mg de proteína). O rendimento para o precipitado é de aproximadamente 16%, e a atividade específica é 8 vezes maior que a do sobrenadante bruto.

TABELA 8: Tabela de purificação para os diferentes precipitados obtidos na precipitação fracionada com sulfato de amônio.

FRAÇÃO	A UA/mL	V (mL)	AT (UA)	Prot (mg/mL)	Prot.T (mg)	A.E.	F.P.	Y (%)
Sobrenadante bruto	1600	50	80000	10,23	511,5	156	1,0	100
0-20%	0	1	0	3,07	3,07	0	0	0
20-50%	6400	1	6400	5,16	5,16	1240	7,9	16
50-60%	100	1	100	3,12	3,12	32	0,2	0
60-80%	100	1	100	4,55	4,55	22	0,1	0
80-100%	0	1	0	2,06	2,06	0	0	0
Sob. Final	0	51	0	4,56	232,6	0	0,0	0

Sob, Sobrenadante; A, Atividade (UA/mL); Vol, Volume (mL); AT, Atividade total (UA); Prot., Proteína (mg/mL); Prot. T., Proteína total (mg); A.E., Atividade específica (UA/mg proteína); F.P., Fator de purificação; Y, Rendimento (%).

A Figura 12 mostra o perfil obtido de precipitação fracionada.

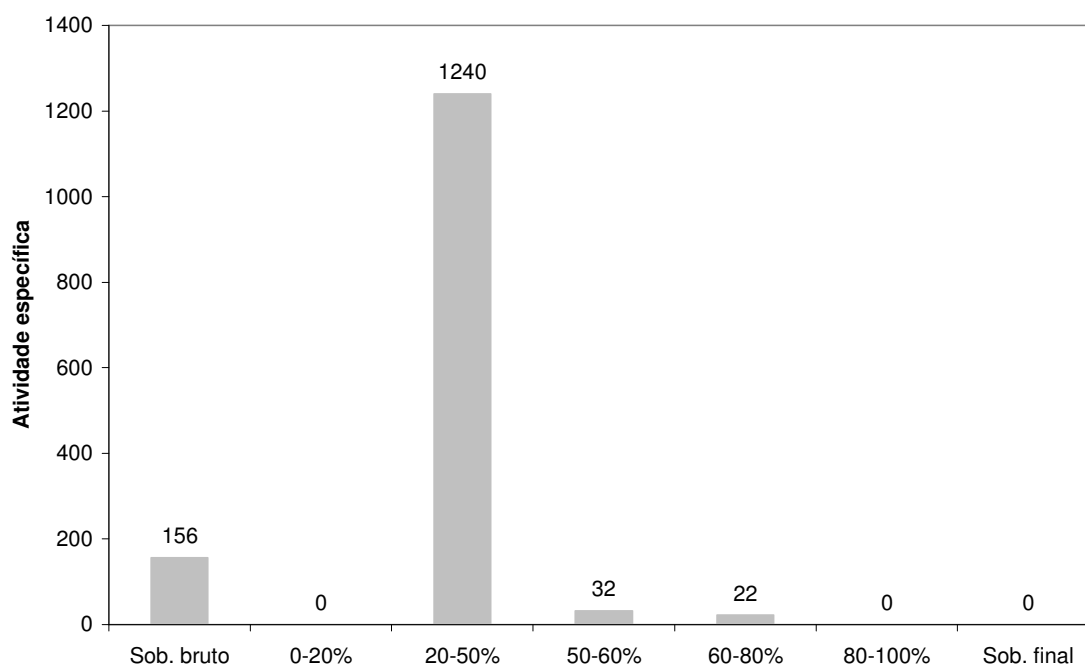


FIGURA 12: Precipitação fracionada com sulfato de amônio mostrando a atividade específica (UA/mg proteína) do sobrenadante bruto (Sob. bruto), de cada precipitado com as diferentes concentrações de sulfato de amônio e do sobrenadante final da precipitação (Sob. final). ICTA-UFRGS, 2006.

4.5.2 Cromatografia líquida de gel filtração (G-100)

O melhor intervalo de precipitação com sulfato de amônio obtido foi o de 20 - 50% de saturação (denominado Fração I). Este intervalo foi escolhido para ser submetido ao passo seguinte do processo de purificação, que consistiu de uma cromatografia de gel filtração em coluna (0,8 x 30 cm) Sephadex G-100 pré-equilibrada com tampão fosfato 10 mM pH 6,0.

Uma alíquota de 1,0 mL do precipitado ressuspendido neste tampão foi aplicada na coluna. As frações de 1,0 mL foram coletadas sendo avaliadas quanto à sua absorbância a 280 nm e atividade antimicrobiana (Figura 13).

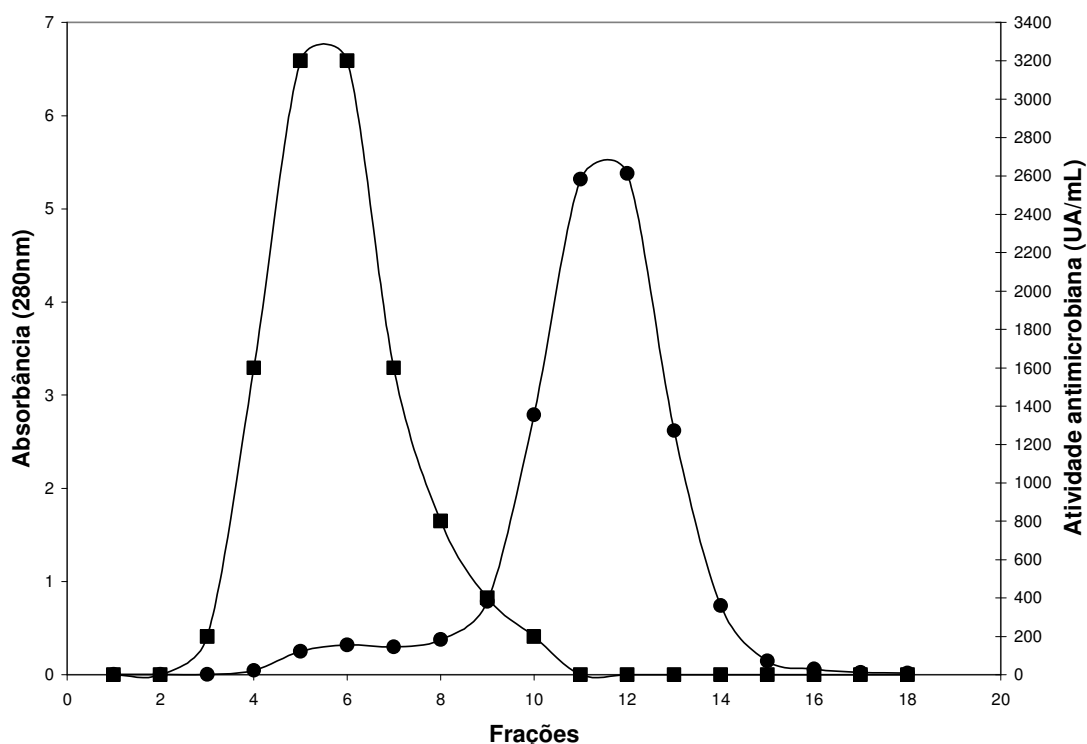


FIGURA 13: Perfil de eluição do precipitado (20 - 50%) em coluna de gel filtração Sephadex G-100. A absorbância a 280 nm (●) e a atividade antimicrobiana em UA/mL (■) foram determinadas para cada fração coletada. ICTA-UFRGS, 2006.

4.5.3 Cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose)

O passo seguinte do processo de purificação consistia em aplicar a substância antimicrobiana obtida no passo anterior em uma coluna de troca iônica (DEAE-Sepharose).

As frações 4, 5, 6 e 7 obtidas de quatro eluições da coluna de gel filtração foram agrupadas, denominadas de fração II e aplicadas numa coluna (1 x 10 cm) de troca iônica (DEAE-Sepharose) equilibrada com tampão fosfato 10 mM pH 7,0. A amostra foi eluída com o mesmo tampão e posteriormente com um gradiente linear de NaCl de 0 a 1,5 M. A absorbância a 280 nm e a atividade antimicrobiana (UA/mL) das frações coletadas (3,0 mL) foram determinadas. Os resultados são mostrados na Figura 14.

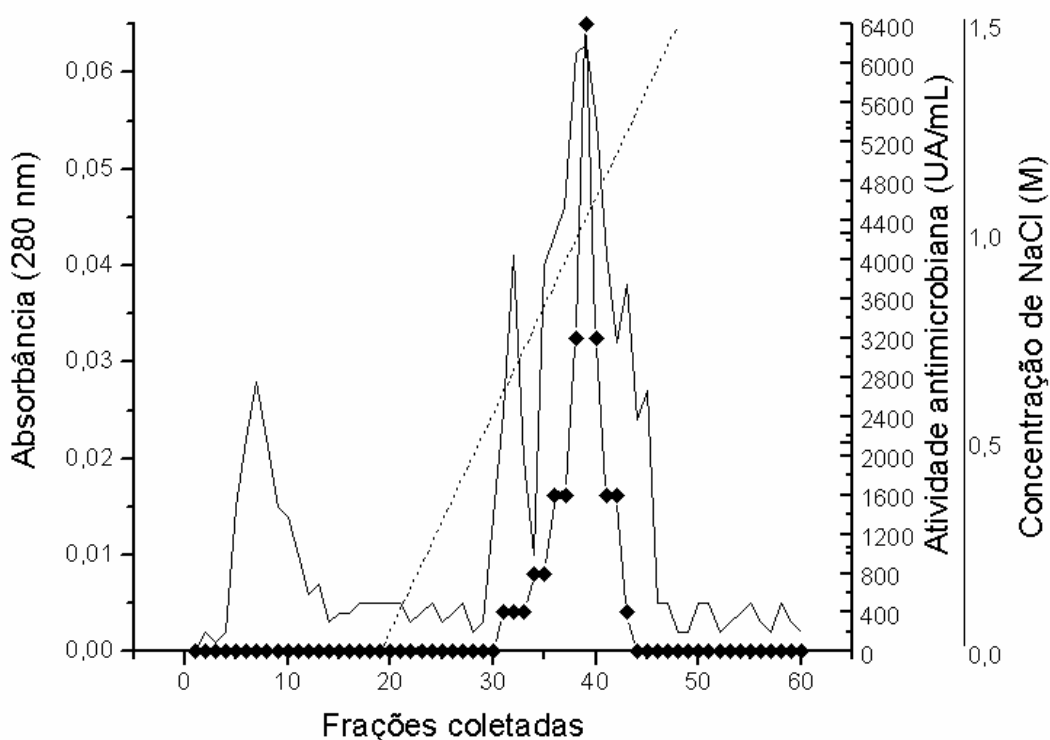


FIGURA 14: Perfil de eluição da Fração II em coluna de troca iônica (DEAE-Sepharose), com tampão fosfato 10 mM pH 7,0 e gradiente linear de NaCl (0 – 1,5M), indicado pela linha tracejada a partir

da alíquota 19. A absorvância a 280 nm (linha cheia) e a atividade antimicrobiana em UA/mL (♦) foram determinadas para cada fração coletada. ICTA-UFRGS, 2006.

As frações 34 a 44 foram agrupadas e denominadas Fração III. Esta fração foi submetida a uma diálise contra tampão fosfato 10 mM pH 7,0 com a finalidade de retirar o sal, já que a substância antimicrobiana foi eluída durante o gradiente salino, em aproximadamente 1,0 M de NaCl. Fração III dialisada foi denominada Fração IV.

O passo seguinte da purificação foi submeter a Fração IV a uma nova cromatografia de troca iônica em coluna (DEAE-Sepharose), nas mesmas condições do passo anterior, buscando obter a purificação total da substância. Os resultados são mostrados na Figura 15. O protocolo de purificação foi realizado em com três sobrenadantes de dias diferentes, encontrando-se resultados similares.

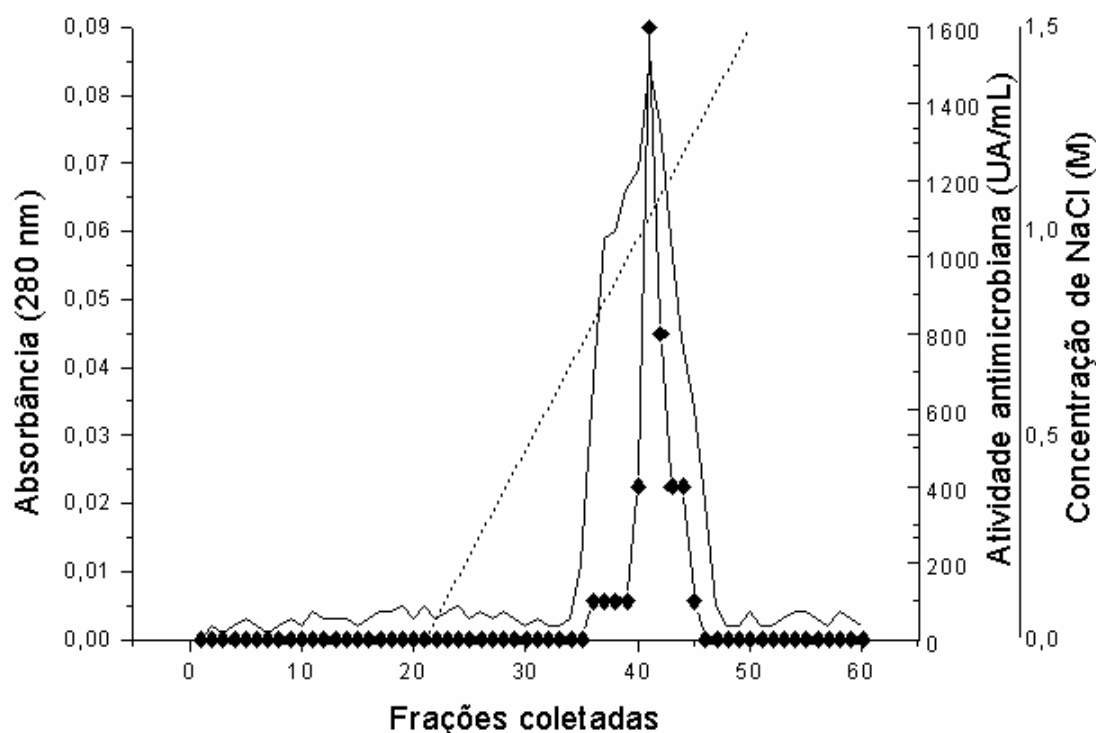


FIGURA 15: Perfil de eluição da Fração IV em coluna de troca iônica (DEAE-Sepharose), com tampão fosfato 10 mM pH 7,0 e gradiente linear de NaCl (0 – 1,5M), indicado pela linha tracejada a partir da alíquota 22. A absorbância a 280 nm (linha cheia) e a atividade antimicrobiana em UA/mL (♦) foram determinadas para cada fração coletada. ICTA-UFRGS, 2006.

As frações 37 a 46 foram agrupadas e denominadas Fração V. A quantidade de proteína e a atividade antimicrobiana em UA de todas as frações foram realizadas a fim de determinar o fator de purificação e o rendimento da fração. Os resultados obtidos são mostrados na tabela 9.

TABELA 9: Tabela de purificação mostrando as frações obtidas na purificação.

FRAÇÃO	A UA/mL	V (mL)	AT (UA)	Prot (mg/mL)	Prot.T (mg)	A.E.	F.P.	Y (%)
Sobrenadante bruto	1600	100	160000	10,23	1023,0	156	1	100
I	51200	2	102400	9,34	18,7	5482	35,0	64
II	3200	16	51200	1,05	16,8	3048	19,5	16
III	1600	30	48000	0,21	6,3	7619	48,7	30
IV	800	30	24000	0,16	4,8	5000	32,0	15
V	400	27	10800	0,06	1,6	6667	42,6	6,75

Sob, Sobrenadante; A, Atividade (UA/mL); Vol, Volume (mL); AT, Atividade total (UA); Prot., Proteína (mg/mL); Prot. T., Proteína total (mg); A.E., Atividade específica (UA/mg proteína); F.P., Fator de purificação; Y, Rendimento (%).

4.6 Caracterização da fração V

4.6.1 Estabilidade térmica

A substância antimicrobiana isolada no processo de purificação (Fração V) foi incubada durante 30 min em diferentes temperaturas e a sua atividade residual foi determinada. A atividade mostrou-se estável a todas as temperaturas testadas, mantendo aproximadamente 70% da sua atividade (Figura 16).

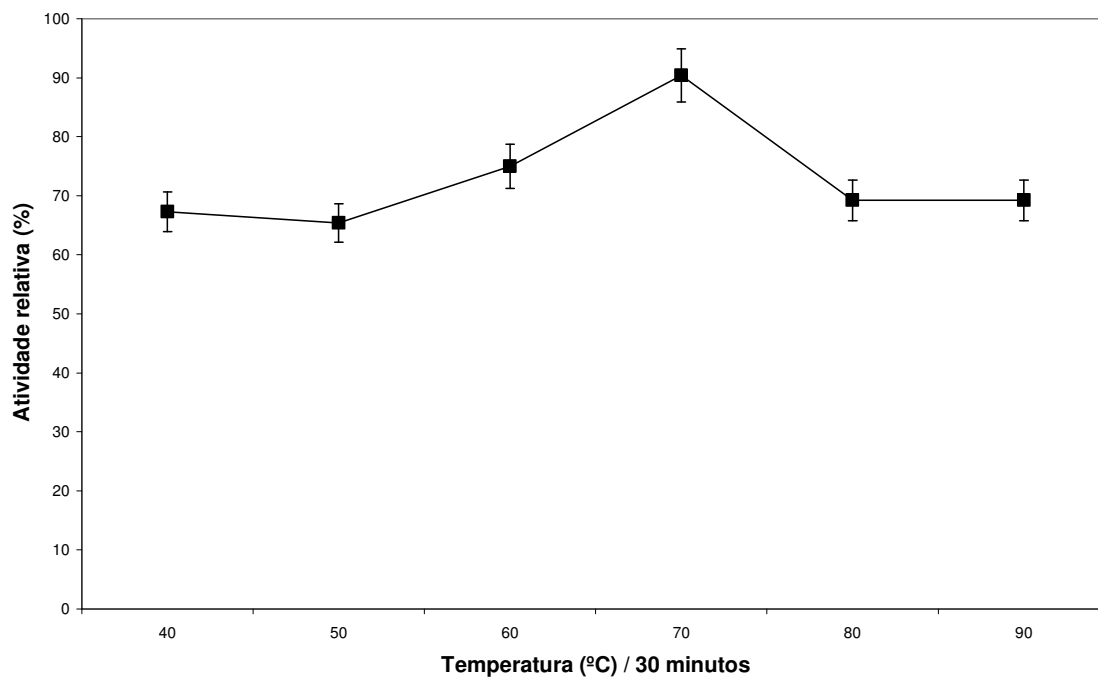


FIGURA 16: Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana da fração V após incubação em diferentes temperaturas durante 30 min. ICTA-UFRGS, 2006.

Ao ser mantida incubada a 100 °C, a atividade antimicrobiana decresceu com o aumento do tempo de incubação. Em 60 minutos de incubação a atividade foi mantida em aproximadamente 30%. (Figura 17).

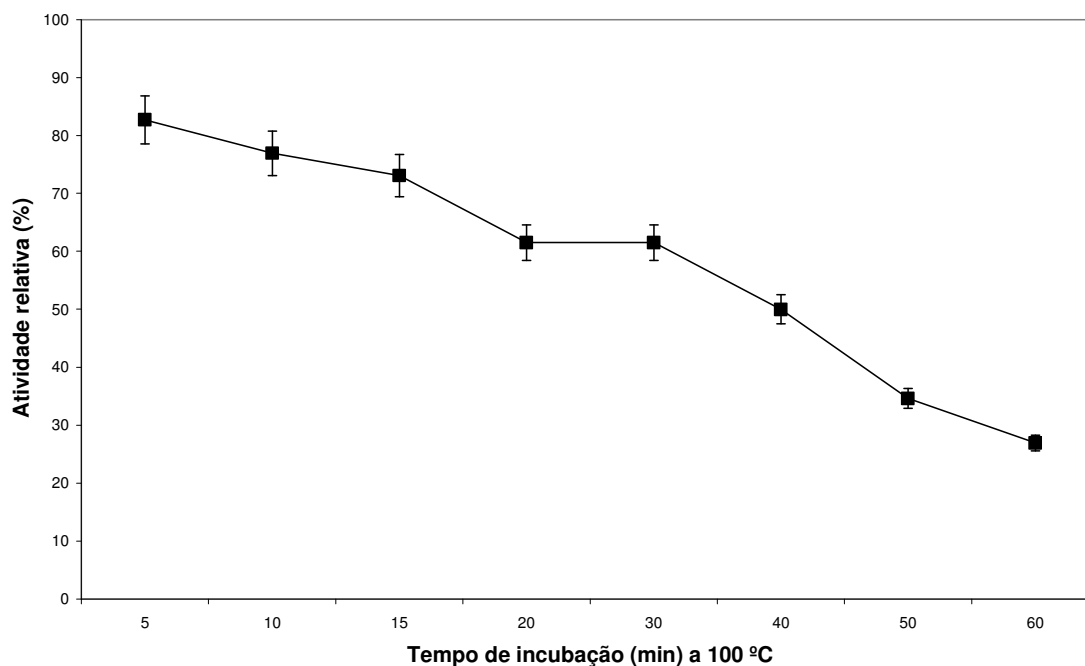


FIGURA 17: Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana da fração V a 100 °C durante diferentes intervalos de tempo. ICTA-UFRGS, 2006.

A atividade foi perdida totalmente após autoclavagem (121 °C / 15 min) e ao ser estocado em geladeira por um período de 10 dias, mas foi mantida ao ser congelada por 15 dias e ao sofrer o processo de liofilização (Tabela 10).

TABELA 10: Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana da fração V

TRATAMENTO	ATIVIDADE RESIDUAL (%)
40 °C / 30 min	67 ± 6
60 °C / 30 min	76 ± 7
80 °C / 30 min	68 ± 9
100 °C / 60 min	35 ± 10
121 °C / 115 kPa / 15 min	0
4 °C / 10 dias	0
-20 °C / 15 dias	100 ± 10
Liofilização	95 ± 10

Atividade residual comparada com a atividade antimicrobiana antes do tratamento térmico (conforme equação 1).

4.6.2 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas

A fração V perdeu totalmente a atividade antimicrobiana frente às enzimas proteolíticas testadas (papaína, pronase E, proteinase K e tripsina) em concentrações de 2 mg/mL.

4.6.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os resultados obtidos na eletroforese são mostrados na Figura 18. A região com atividade aparece em um nível que corresponde a um peso molecular inferior a 6,5 kDa. Não é possível visualizar, no entanto, uma banda de proteína correspondente no gel corado.

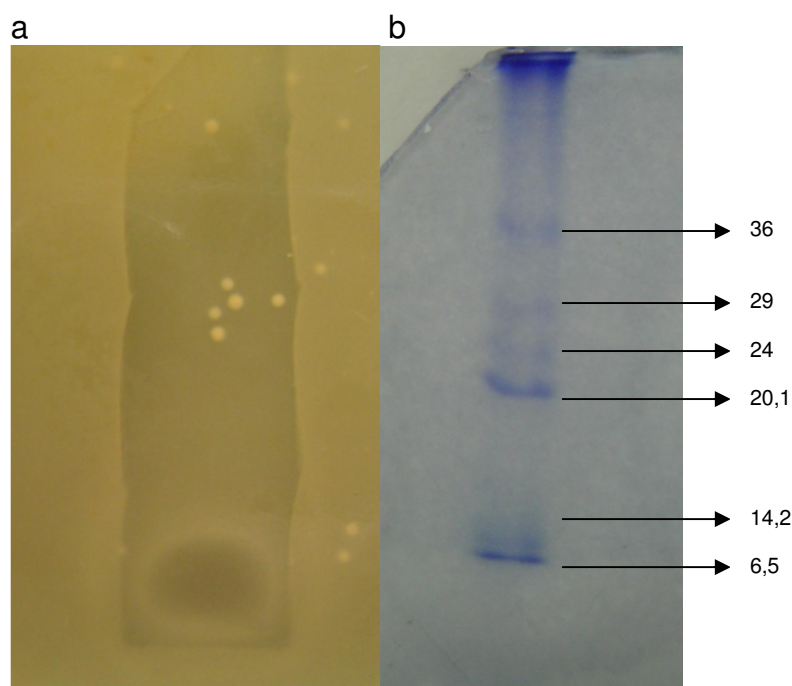


FIGURA 18: Eletroforese em gel de poliacrilamida: a) gel de atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 da fração V, podendo ser observado na região escura a inibição do crescimento da bactéria indicadora (atividade antimicrobiana). b) gel corado do padrão de peso molecular; ICTA-UFRGS, 2006.

4.6.4 Eletroforese capilar

A fração V foi submetida a eletroforese capilar. Os resultados obtidos são mostrados na figura 19. A existência de um único pico confirma a purificação da substância antimicrobiana.

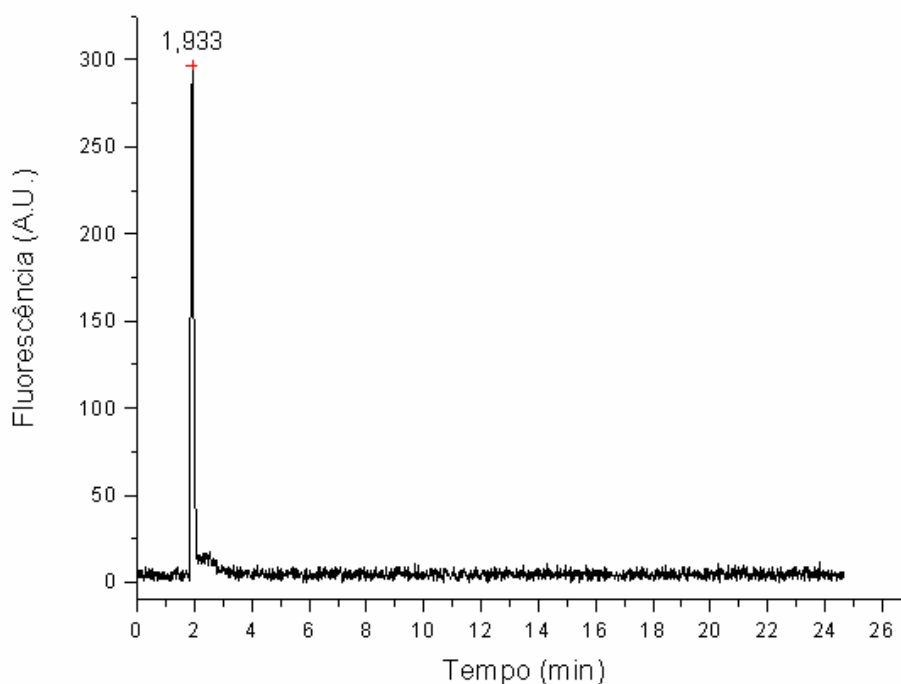


FIGURA 19: Eletroforese capilar da fração V. ICTA-UFRGS, 2006.

4.6.5 Espectroscopia de infravermelho

O espectro de infravermelho da fração V é mostrado na figura 20. Podem ser observados os seguintes picos: um pico largo próximo a 3500 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação O-H de grupos hidroxil; pico assimétrico a 2925 cm^{-1} resultante do estiramento do grupamento $-\text{CH}_2$; a 1639 cm^{-1} resultante da deformação angular da ligação N-H combinado com o

estiramento da ligação C-N. Em 1546 há uma banda devido à absorção de uma amida secundária. (Silverstein *et al.*, 1991; Yakimov *et al.*, 1995).

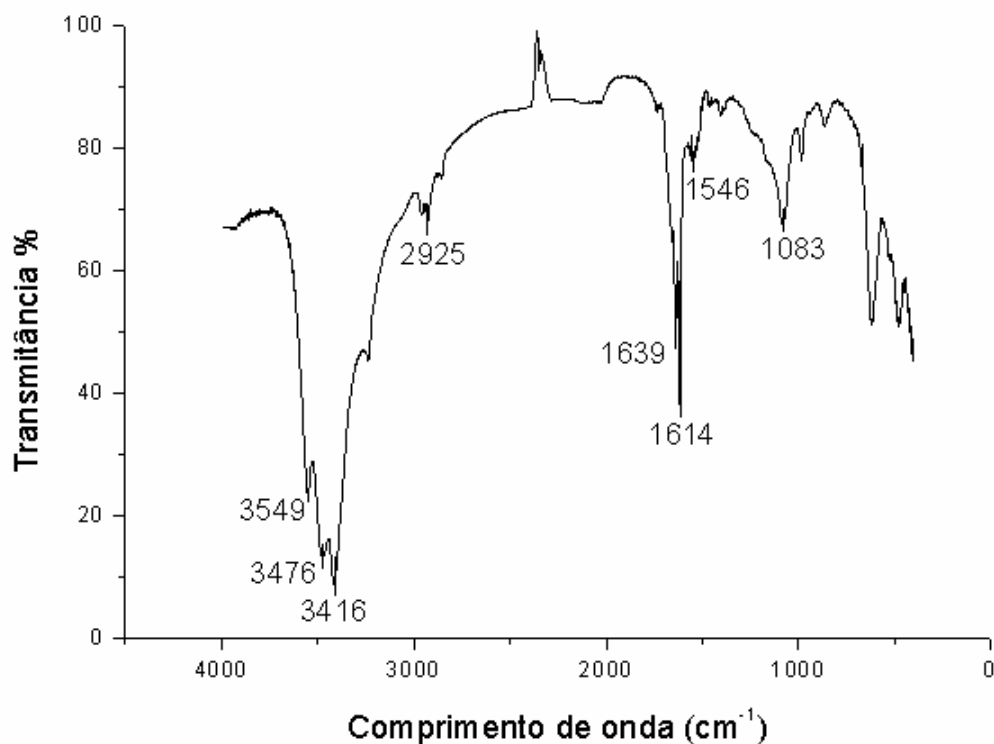


FIGURA 20: Espectro de infra-vermelho da fração V. ICTA-UFRGS, 2006.

4.6.6 Espectroscopia de massas

A análise do espectro de massas revela um cluster contendo moléculas que foram observadas a partir de m/z 1518, com picos decrescendo com diferença em cerca de 14 Da (Fig. 21). Este padrão indica uma série de fragmentos homólogos com diferença no tamanho de uma cadeia associada de ácido graxo ($-\text{CH}_2 = 14$ Da).

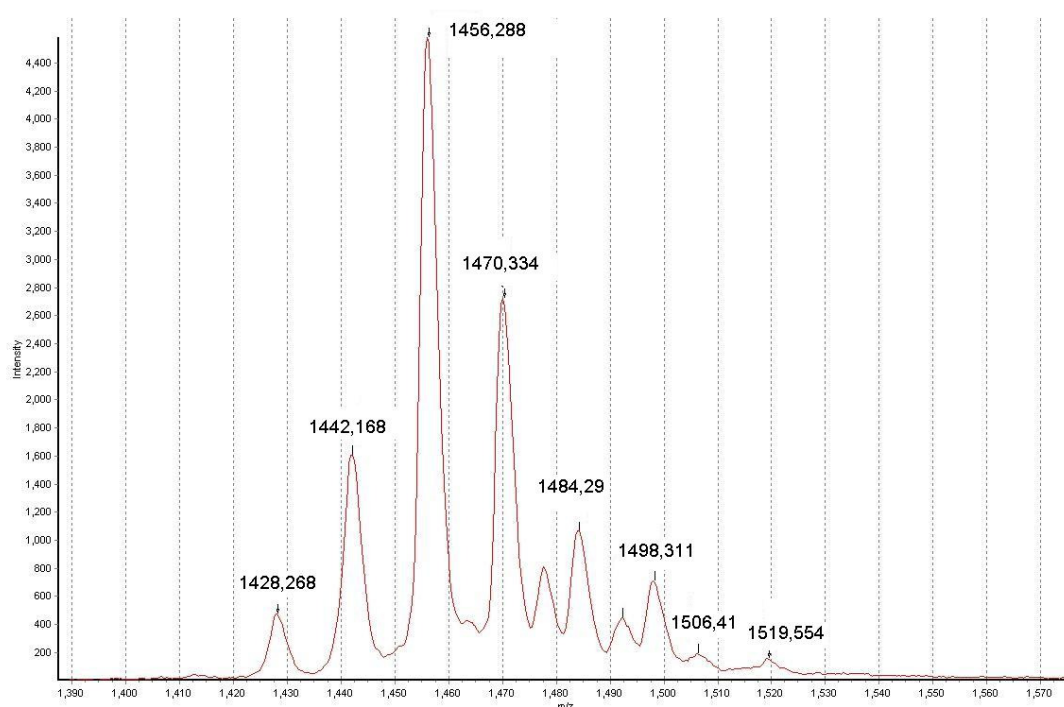


Figura 21: Espectro de massas da fração V. (ICTA-UFRGS, 2006).

4.7 Efeitos sobre *Listeria monocytogenes*

4.7.1 Microscopia eletrônica de transmissão

As células de *L. monocytogenes* (10^5 UFC/mL) tratadas com 1600 UA/mL da substância antimicrobiana sofreram formação de poro, com completa desintegração da célula (Fig. 22a) o que não ocorre com o controle (Fig.22b)

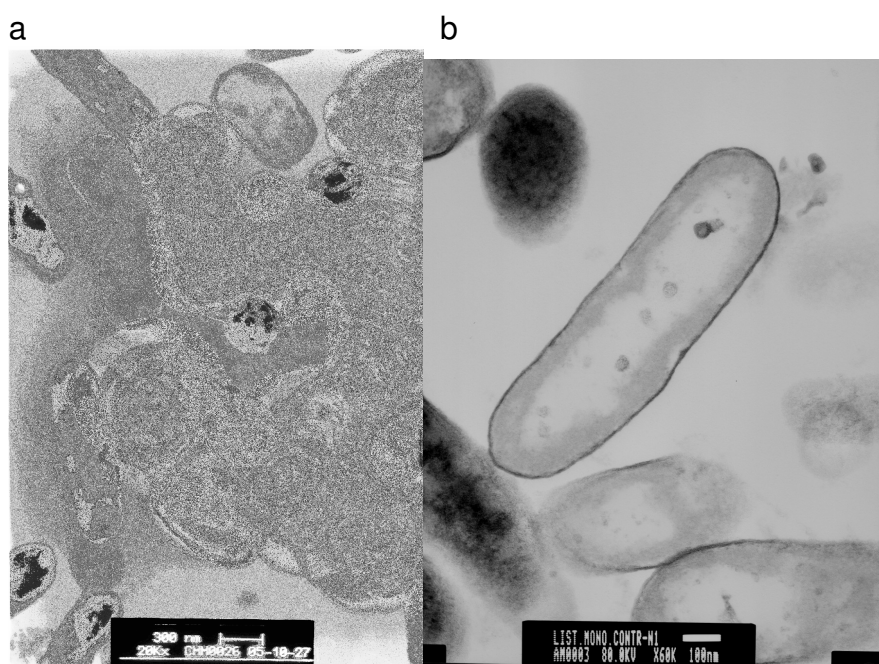


FIGURA 22: Microscopia eletrônica de transmissão de células de *L. monocytogenes* tratadas (a) e não tratadas (b) ICTA-UFRGS, 2006.

4.7.2 Determinação da concentração inibitória mínima

Os resultados da determinação da concentração inibitória mínima da fração para *L. monocytogenes* ATCC 7644 são mostrados na tabela 11. Foi necessária uma concentração de 400 UA/mL tanto da Fração I quanto da Fração II para inibir o crescimento da linhagem testada.

Tabela 11: Resultado dos testes para determinação CIM e da CBM das frações I e II contra *L. monocytogenes* ATCC 7644.

UA/mL	FRAÇÃO I		FRAÇÃO II	
	CIM	CBM	CIM	CBM
0				
50	+	nt	+	nt
100	+	nt	+	nt
200	+	nt	+	nt
400	-	+	-	+
800	-	-	-	-
1600	-	-	-	-
3200	-	-	-	-

CIM, concentração inibitória mínima; CBM, concentração bactericida mínima; +, houve crescimento; -, não houve crescimento; nt, não testado. A concentração de bactéria

4.7.3 Determinação da concentração bactericida mínima

Como demonstrado na tabela 11, foi necessário uma concentração de 800 UA/mL das duas frações testadas (I e II) para obter um efeito bactericida sobre *L. monocytogenes* ATTC 7644.

4.7.4 Curva dose-resposta

Os resultados da curva dose-resposta para *L. monocytogenes* ATTC 7644 estão mostrados na Figura 23 (Fração I) e Figura 24 (Fração II). O número de células viáveis diminuiu a medida que a concentração da bacteriocina aumentou. Para a Fração I, uma dose de 400 UA/mL corresponde a uma diminuição de aproximadamente 50% nas UFC/mL (EC_{50}). A dose necessária para provocar a morte de todas as células foi de 800 UA/mL. Os mesmos resultados foram encontrados para a fração II.

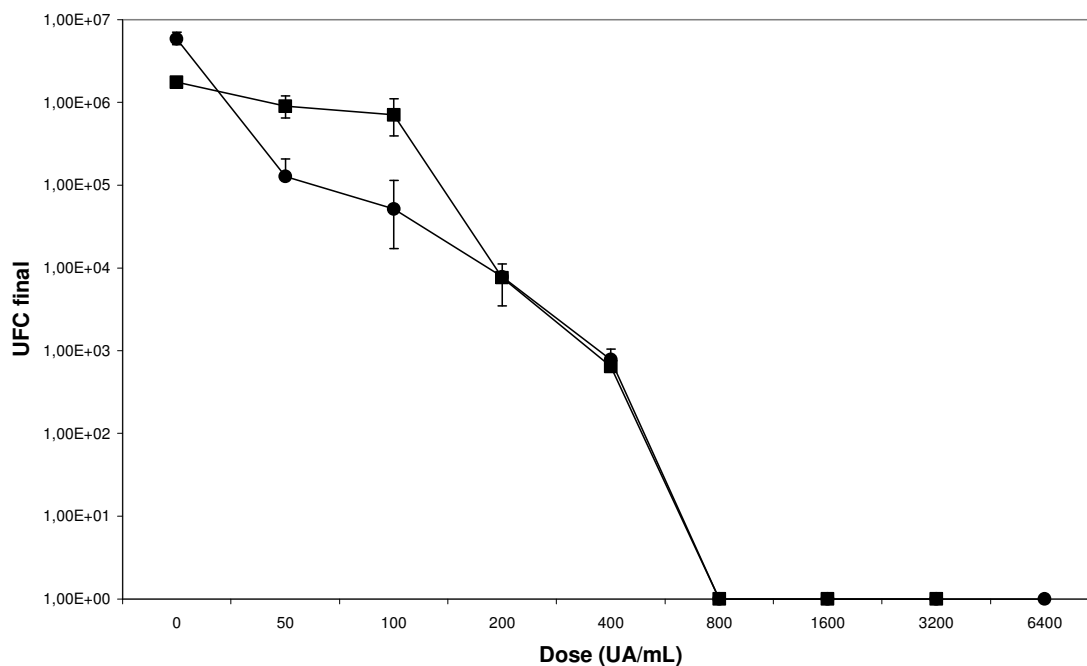


FIGURA 23: Curva de dose-resposta contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 utilizando a fração I (●) e a fração II (■). ICTA-UFRGS, 2006.

4.7.5 Cinética de ação

A cinética das frações I e II foi acompanhada. Os resultados estão mostrados nas Figuras 25 e 26. Para ambos os casos, em 10 minutos houve uma redução de aproximadamente 50% da células e em 20 minutos todas as células estavam mortas.

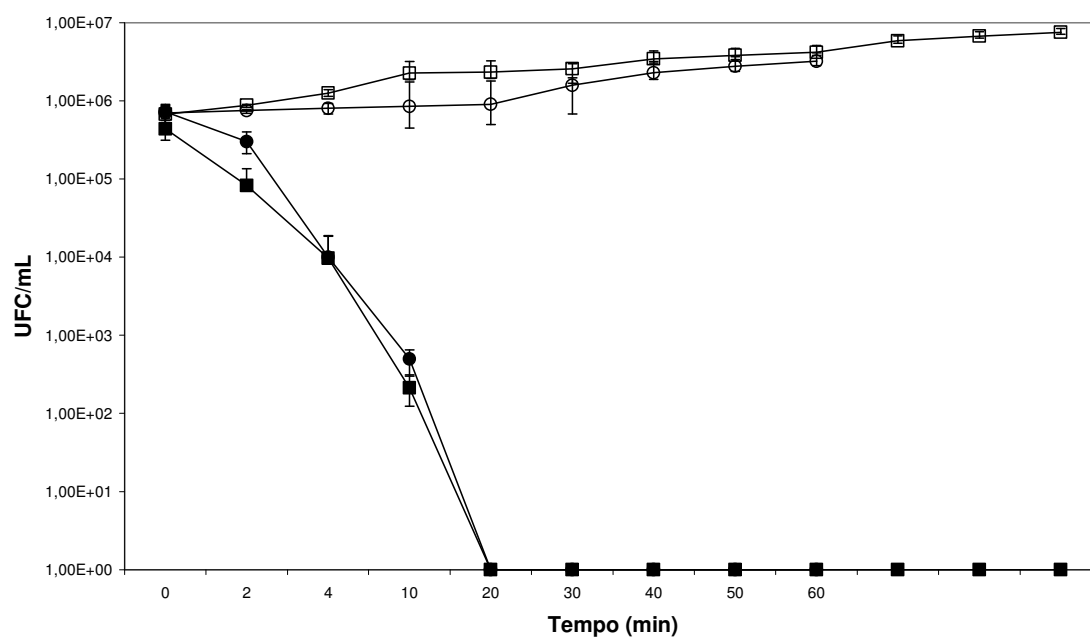


FIGURA 24: Cinética de ação das frações I e II (concentração final de 3200 UA/mL) contra *L. monocytogenes* ATCC 7644. UFC/mL do controle da fração I (O) e do tratado com a fração I (●); controle da fração II (□) e do tratado com a fração II (■). ICTA-UFRGS, 2006.

5 DISCUSSÃO

A bactéria produtora de uma substância com atividade antimicrobiana utilizada neste estudo foi identificada inicialmente, através de testes bioquímicos, morfológicos e fisiológicos, como pertencente ao gênero *Bacillus*.

O sequenciamento do rDNA 16S indicou que a linhagem utilizada neste estudo foi relacionada a *Bacillus subtilis* e a *Bacillus amyloliquefaciens*, entretanto não foi possível identificá-la como alguma espécie já conhecida. A maior similaridade foi observada com uma linhagem de *Bacillus* sp. isolada de *Sclerotinia sclerotiorum* removido de um girassol (*Heliantus annus* L.) (Souto *et al.* 2004). Para a confirmação da espécie ou verificar se trata de uma nova espécie seriam necessários outros testes como hibridização DNA-DNA, determinação do conteúdo de G+C e determinação da composição de ácidos graxos celulares (Takami *et al.* 1999; Nazina *et al.* 2001).

Apenas algumas espécies produtoras de bacteriocinas foram isoladas de peixe como *Carnobacterium divergens* V41 e *C. piscicola* V1 de intestino de trutas (Pilet *et al.*, 1995), *C. piscicola* UI 49 de peixe (Stoffels *et al.*, 1992), *C. piscicola* 2762 de (Buchanan & Bagi, 1997), *Vibrio* sp. NM10 de um peixe japonês (Sugita *et al.* 1997) e *Bacillus* sp. NM12 (Sugita *et al.*, 1998).

Como a maioria das bacteriocinas, a substância antimicrobiana produzida por *Bacillus* sp. P45 foi produzida na fase exponencial de crescimento e a sua concentração atingiu o nível máximo na fase estacionária (Pilet *et al.*, 1995). Sugere-se, portanto, que esta substância seja um metabólito primário.

A atividade de algumas bacteriocinas diminui quando a bactéria produtora entra na fase estacionária, devido à adsorção de moléculas da bacteriocina pela superfície das células produtoras e degradação proteolítica. (Parente & Ricciardi, 1994; De Vuyst *et al.*, 1996). No caso da bacteriocina descrita neste trabalho, não foi observada diminuição na atividade, indicando uma relativa estabilidade da bacteriocina, embora biossíntese de novo não possa ser excluída.

Algumas bacteriocinas produzidas por *Bacillus* sp. possuem um espectro de ação restrito, com atividade apenas contra espécies filogeneticamente relacionadas à espécie produtora. A bacteriocina caracterizada neste estudo apresentou um espectro de ação amplo, com a atividade estendendo-se a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Bactérias como *Brevibacterium linens* e *Aeromonas hydrophila*, foram inibidas, além de bactérias patogênicas e deteriorantes como *Bacillus cereus*, *E. carotovora*, *L. monocytogenes* e isolados clínicos e de alimentos de *Staphylococcus aureus*. *Corynebacterium fimi* NCTS 7547, que é descrita como sensível a todas as bacteriocinas já testadas (Oliveira *et al.*, 1998) também foi inibida.

Listeriose é uma das doenças de origem alimentar mais importantes e diversas agências regulatórias pelo mundo tentam controlar esta doença nos últimos anos. A *L. monocytogenes* é amplamente distribuída no ambiente natural (Fenlon *et al.*, 1996), e, conseqüentemente, presente em muitos produtos alimentícios de origem vegetal e animal. Esta bactéria é sensível a várias bacteriocinas como nisina, pediocina, lactococina, entre outros (Mantovani & Russell, 2003). O uso de bacteriocinas ou de espécies produtoras de bacteriocinas para inibir este patógeno em produtos cárneos e lácteos já foi descrito (Ananou *et al.*, 2005). Entretanto, esta bactéria pode tornar-se altamente resistente a bacteriocinas como nisina e pediocina (Gravesen *et al.*, 2004, Vadyvaloo *et al.*, 2002). A redução no número de células viáveis de *L. monocytogenes* registrada após 2 horas da adição da substância sugere que o modo de ação é bactericida. O rápido decréscimo da absorbância no teste suplementar indica que as células de *L. monocytogenes* foram lisadas, sugerindo que a linhagem P45 apresenta um efeito bacteriolítico sobre este patógeno.

A mastite bovina é hoje um dos problemas mais sérios encontrados na pecuária leiteira (Bradley, 2002). Esta infecção geralmente não é tratada satisfatoriamente com antibióticos para eliminar a doença ou prevenir sua cronicidade. Além da ineficiência, o tratamento com antibióticos gera a preocupação de deixar resíduos no leite (Clements, 1998; Van-den-Bogaard & Stobberingh, 1999). *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp. são os agentes etiológicos mais comuns. O potencial patogênico de *Staphylococcus* spp. é aumentado pela sua habilidade em adquirir resistência a antibióticos

(Lowy, 2003). A ação da bacteriocina contra isolados clínicos de *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. indica um uso potencial como alternativa a antibióticos no tratamento e prevenção da mastite. Twomey *et al.* (2000) reportaram a diminuição de células viáveis de *Staphylococcus aureus* em tetos pela ação lacticina. Também a lacticina foi atribuída a diminuição da infecção por *Streptococcus* em vacas (Ryan *et al.*, 1999).

A inibição de *Lactobacillus acidophilus*, utilizada como cultura iniciadora de produtos lácteos e com propriedades probióticas, torna-se uma desvantagem, uma vez que inviabiliza o uso desta bacteriocina neste tipo de produto.

Na avaliação das propriedades da bacteriocina no sobrenadante bruto, a atividade antimicrobiana foi sensível a enzimas proteolíticas (pronase E, proteinase K e tripsina), ainda que em altas concentrações (10 mg/mL). A atividade também foi perdida no tratamento com TCA, indicando a natureza protéica da substância. Diversas bacteriocinas produzidas por espécies de *Bacillus* (Paik *et al.*, 1997; Hyronimus *et al.*, 1998), não apresentam tal estabilidade. Alguns *Bacillus* produzem antimicrobianos que são peptídeos cíclicos contendo aminoácidos não usuais, geralmente mais resistentes a proteases (Gebhardt *et al.*, 2002). Além disso, a atividade não foi sensível a mudança de pH e relativamente estável ao tratamento com altas temperaturas. A estabilidade a tratamentos térmicos e a clivagem por proteases é atribuída a estruturas cíclicas no esqueleto de bacteriocinas como a microcina J25 e B17 (Semenova *et al.*, 2005; Kelleher *et al.*, 1999).

A atividade antimicrobiana foi eluída no volume morto de uma coluna de Sephadex G-100, sugerindo um peso molecular maior do que 150 kDa. No entanto, na presença de uma alta concentração salina, a atividade foi eluída dentro do volume de separação da coluna, correspondendo a um peso molecular inferior a 20 kDa, sugerindo que o peptídeo secretado forma grandes agregados extracelulares. Este fato também ocorreu com a bacteriocina linocina M18, produzida por *Brevibacterium linens* (Valdés-Stauber & Scherer, 1994). A associação de moléculas de bacteriocinas em grandes agregados tem sido atribuída à natureza altamente hidrofóbica dos peptídeos.

A detecção direta da atividade antimicrobiana em gel de poliacrilamida sugere que a atividade inibitória é devida a um peptídeo de baixo peso molecular, isto é, aparecendo numa região com peso molecular inferior a 6,5 kDa. Entretanto, o gel de poliacrilamida não revelou uma banda específica correspondendo ao peptídeo ativo. Outras bacteriocinas foram difíceis de corar por razões desconhecidas (Hécharde *et al.*, 1992; Van Laack *et al.*, 1992; Villani *et al.*, 1995; Hyronimus *et al.*, 1998). O baixo peso molecular (1518,554 Da) foi confirmado por espectroscopia de massas. Outras bacteriocinas produzidas por *Bacillus* apresentam baixo peso molecular, como a lichenina produzida por *Bacillus licheniformis* com 1400 Da (Pattnaik *et al.*, 2001), algumas bacteriocinas produzida por *Bacillus thuringiensis* como a thuricina 439A com 2919,9 Da e a thuricina 439B com 2803,8 Da (Ahern *et al.*, 2003) e a bacthucina F4 com 316005 Da (Kamoun *et al.*, 2005).

A bacteriocina estudada neste trabalho foi purificada do meio de cultivo com uma combinação de precipitação com sulfato de amônio, gel

filtração e cromatografia de troca iônica. A substância se ligou ao grupo carregado dietilaminoetil da coluna DEAE – Sepharose, indicando que a natureza do peptídeo é aniônica. O passo correspondente a primeira cromatografia de troca iônica, um pico eluído a aproximadamente 0,9 M de NaCl contém aproximadamente 100% da atividade antimicrobiana. Este pico, entretanto, não foi bem resolvido e, possivelmente, não correspondeu a apenas uma substância. As frações com maior atividade foram agrupadas e uma segunda cromatografia de troca iônica nas mesmas condições da primeira foi realizada. Neste passo foi possível visualizar um único pico também correspondendo a 100% da atividade antimicrobiana. Este protocolo levou ao isolamento do composto com atividade antimicrobiana. Um fator de purificação de 42,6 foi encontrado, mas a recuperação foi de apenas 6,75%. Considerando-se que a bacteriocina tem características aniônicas e hidrofóbicas, estas características podem ser utilizadas na elaboração de um método para a recuperação em grande escala.

A bacteriocina purificada foi mais susceptível aos tratamentos com proteases, embora a estabilidade a altas temperaturas foi mantida. A maior estabilidade da bacteriocina na forma bruta quando comparada a forma purificada frente a tratamento enzimático pode estar relacionada à formação de agregados moleculares que seriam desagrupados durante a purificação, tornando-a mais sensível.

Como foi possível identificar no espectro de infravermelho realizado com a substância purificada, bandas de absorção características em 1546, 1649 e 3416 cm^{-1} indicaram que a substância apresenta ligações peptídicas.

Essas bandas corresponderam a absorções típicas de proteínas (Maquelin *et al.*, 2002).

Diferentes experimentos foram realizados com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação da bacteriocina produzida por *Bacillus* sp. Os resultados sugeriram que esta substância tem um efeito bactericida sobre *L. monocytogenes*, baseado no declínio do número de células viáveis, iniciado logo após a adição da substância, com total morte celular em vinte minutos. O efeito bactericida ainda foi demonstrado pela redução da OD₆₀₀, mostrando que as células da cultura foram lisadas. A microscopia eletrônica, que confirmou a lise celular após tratamento com a substância antimicrobiana. O efeito da substância, entretanto, depende das condições do experimento, como a dose e o grau de pureza da substância, a cultura indicadora e a sua concentração celular (Dalmau *et al.*, 2002).

O crescente aumento da resistência microbiana e a busca por novos métodos de preservação de alimentos despertam o interesse da indústria, na pesquisa de substâncias como as bacteriocinas. Neste trabalho identificou-se, caracterizou-se e purificou-se uma bacteriocina produzida por uma bactéria isolada do intestino do peixe Jaraqui (*Piaractus mesopotamicus*) da bacia amazônica. O potencial de aplicação desta substância é seu uso como bioconservador natural para o combate de microrganismos patogênicos e deteriorantes.

6 CONCLUSÕES

A bactéria *Bacillus* sp. P45 produz uma bacteriocina durante a fase exponencial de crescimento e com uma concentração máxima na fase estacionária, caracterizando-a como um metabólito primário.

A bacteriocina foi capaz de inibir uma ampla faixa de microrganismos gram-positivos e gram-negativos, incluindo microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos, como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Erwinia carotovora*.

A substância antimicrobiana foi purificada por protocolo relativamente simples, incluindo precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de gel filtração e cromatografia de troca iônica.

A substância antimicrobiana contida no sobrenadante bruto do cultivo do *Bacillus* sp. foi mais estável ao tratamento com enzimas proteolíticas do que a bacteriocina purificada, mas esta mantém a estabilidade a altas temperaturas como 100 °C.

O peso molecular da substância estudada é 1518,554 Da.

A substância parcialmente purificada tem um EC₅₀ de 400UA/mL sobre o patógeno *Listeria monocytogenes* e mata toda as células com

800UA/mL, provavelmente provocando lise celular. O efeito bactericida foi observado em 20 minutos após a adição da substância.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível citar como perspectivas de novos estudos, baseando-se nos resultados deste trabalho:

- otimizar as condições de produção da substância antimicrobiana, e buscar substratos mais baratos para a sua produção;
- buscar um método de purificação mais simples e barata, viabilizando a sua produção em larga escala;
- complementar a caracterização química, com o seqüenciamento de aminoácidos;
- realizar testes de proteção em alimentos;
- determinar propriedades como toxicidade, citotoxicidade e DL₅₀ *in vivo* e também *in vitro*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHERN, M. *et al.* Isolation and characterization of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thurigiensis* strain B439. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.220, p.127-131, 2003.
- ANANOU, S. *et al.* Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.103, n.2, p.179-190, 2005.
- BASTOS, A.E.R. *et al.* Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.174, p. 346-352, 2000.
- BENNER, R.S. *et al.* Bacterial carbon metabolism in the Amazon River system. **Limnology and Oceanography**, Canmore, v.40, p.1262-1270, 1995.
- BHUNIA, A.K. & JOHNSON, M.G. A modified method to directly detect in SDS-PAGE the bacteriocin of *Pediococcus acidilactici*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.15, p.5-7, 1992.
- BIZANI, D. & BRANDELLI, A. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus sp.* strain 8A. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.93, p.512-519, 2002.
- BORNEMAN, J. & TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soils from eastern amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.7, p.2647-2653, 1997.
- BRADLEY, A. Bovine mastitis: an evolving disease. **Veterinary Journal**, London, v.164, p.116–128, 2002.
- BUCHANAN, R.L. & BAGI, L.K. Microbial competition: effect of culture conditions on the suppression of *Listeria monocytogenes* Scott A by *Carnobacterium piscicola*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, p.254–261, 1997

- CAPLICE, E & FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.50, p.131-149, 1999.
- CAROLISSEN-MACKAY, V. *et al.* Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 34, p. 1-16, 1997.
- CHIES, J.M. *et al.* BanAI a new isoschizomer of the type II restriction endonuclease HaeIII discovered in a *Bacillus anthracis* isolate from Amazon basin. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.215, p.97-101, 2002.
- CLADERA-OLIVERA *et al.* Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.38, n.4, p.251-256, 2004.
- CLEMENTS, M. Outdated mastitis controls ripe for overhaul. **Animal Pharmacology**, v.407, p.22–23,1998.
- CLEVELAND, J. *et al.* Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.71, p. 1-20, 2001.
- DALMAU, M. *et al.* Bacterial membrane injuries induced by lacticin F and nisin. **International Microbiology**, Barcelona, v.5, p.73-80, 2002.
- DE MARTINIS, E.C.P. & FREITAS, F.Z. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. **Food Control**, Surrey, v.14, p.197-200, 2003.
- DE VUYST, L. *et al.* Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. **Microbiology**, London, v.142, p.817-827, 1996.
- DE VUYST, L.D. & VANDAMME, E.J. **Bacteriocins of lactic-acid bacteria: Microbiology, genetics and applications.** London: Blackie Academic & Professional, 1994, 540p.
- DEVLEIGH, F. *et al.* New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, Barking, v.14, p.273-285, 2004.
- DEUTSCHER, M.P. Guide to Protein Purification. **Methods in Enzymology**, New York, v.182, 1990.
- DIEP, D.B. *et al.* Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, p.4472–4483, 1996.

- EHRMANN, M.A. *et al.* A gene cluster encoding plantaricin 1.25 beta and other bacteriocin-like peptides in *Lactobacillus plantarum* TMW1.25. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1490, p.355–361, 2000.
- ENNAHAR, S. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Reviews**, Amsterdam, v.24, p.85-106, 2000.
- FENLON, D.R. *et al.* The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.81, p.641–650, 1996.
- FLOREY, H. W. The use of micro-organisms for therapeutic purposes. **Yale Journal of Biological Medicine**, n.19, p.101-117, 1946.
- GEBHARDT, K. *et al.* Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic *bacilli* isolated from arthropods. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 217, p.199-205, 2002.
- GRATIA, A. Sur un remarquable exemple d'antagénisme entre deux souches de colibacille. **Comptes-rendus des Séances de la Société de Biologie Et De Ses Filiales**, Paris, n.93, p.1040-1041, 1925.
- GRAVESEN, A. *et al.* pbp2229-mediated nisin resistance mechanism in *Listeria monocytogenes* confers cross-protection to class IIa bacteriocins and affects virulence gene expression. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.3, p.1669-1679, 2004.
- HANCOCK, R.E.W. & CHAPPLE, D.S. Peptide antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.43, n.6, p.1317-1323, 1999.
- HARDMAN, J. *et al.* **Goodman & Gilman The pharmacological basis of therapeutics**, Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003, 10.ed.
- HAVARSTEIN, L.S. *et al.* The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. **Microbiology**, London, v.140, n.9, p.2383–2389, 1994.
- HÉCHARD, Y. *et al.* Characterization and purification of mesentericin Y 105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal General of Microbiology**, London, v.138, p.2725-2731, 1992.
- HÉCHARD, Y. & SAHL, H.G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. **Biochimie**, Paris, v.84, p.545-557, 2002.
- HUGAS, M. Bacteriogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, Barking, v. 49, S1, p.139-150, 1998.

- HURST, A. Nisin. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v.27, p.85-123, 1981.
- HWANG, P.M & VOGEL, H.J. Structure-function relationships of antimicrobial peptides. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v.76, p.235-246, 1998.
- HYRONIMUS, B. *et al.* Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* 14. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.85, p.42-50, 1998.
- JACK, R.W.; TAGG, J.R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v.59, n.2, p.171-200, 1995.
- JANSON, J.C. & RYDÉN L. **Protein Purification**. New York: VCH Publishers. 2^a ed. 1998.
- JOLIK. *et al.* **Zinsser Microbiología**. Buenos Aires: Médica Panamericana, 1993, 20^o ed.
- KAMOUN, F. *et al.* Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produces by *Bacillus thurigiensis*. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.95, p.881-888, 2005.
- KELLEHER, N.L. Posttranslational Heterocyclization of Cysteine and Serine Residues in the Antibiotic Microcin B17: Distributivity and Directionality. **Biochemistry**, Washington, v.38, p.15623-15630, 1999.
- KIMURA, H. *et al.* Novel bacteriocin of *Pediococcus sp.* ISK-1 isolated from well-aged bed of fermented rice bran. **Annals of New York Academy of Science**, New York, v.864, p345-348, 1998.
- KIST, T.B.L. *et al.* Capillary zone electrophoresis separation of kinins using a novel laser fluorescence detector. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.27, p.11-19, 1994.
- KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.12, p.39-86, 1993.
- KUMAR, S. *et al.* MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, New York, v.5, p. 150-163, 2004.
- KUPKE, T. & GOTZ, F. Post-translational modifications of lantibiotics. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.69, p.139-150, 1996.
- LIANG, J.F. & KIM, S.G. Not only the nature of peptide but also the characteristics of cell membrane determine the antimicrobial mechanism of a peptide. **Journal of Peptide Research**, Copenhagen, v.53, p.518-522, 1999.

- LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.
- LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v.111, p.1265–1273, 2003.
- MACFADDIN, J.P. & LIPPINCOTT, P. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 2000, 912p.
- MANTOVANI H.C. & RUSSELL, J.B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.89, p.77-83, 2003.
- MAQUELIN, K. *et al.* Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.51, p.255–271, 2002.
- MAZZOTTA, A.S. & MONTVILLE, T.J. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisinresistant strains at 10°C and 30 °C. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.82, p.32-38, 1997.
- MCAULIFFE, O. *et al.* Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.25, p.285-308, 2001.
- MOLL, G.N. *et al.* Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.76, p.185–198, 1999.
- MORGAN, S.M. *et al.* Evaluation of a spray dried lacticin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.33, p.387– 391, 2001.
- MOTTA, A. *et al.* Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon basin. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, p.307-310, 2004.
- NACLERIO, G. *et al.* Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.12, p.4313-4316, 1993.
- NAZINA, T.N. *et al.* Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius*, and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. **International Journal of**

- Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, p.433-446, 2001.
- NES, I.F. *et al.* Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.70, p.113–128, 1996.
- NISSEN-MEYER, J. *et al.* Association of the lactococcin A immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor. **Journal General of Microbiology**. London, n.139, p.1503–1509, 1993.
- NOVOTNY, J.F. & PERRY, J.J. Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans*, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2393-2396, 1992.
- OLIVEIRA, S.S. *et al.* *Staphylococcal* strains involved in bovine mastitis are inhibited by *Staphylococcus aureus* antimicrobial peptides. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.27, p.287-291, 1998.
- OSCÁRIZ, J.C. *et al.* Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.178, p.337-341, 1999.
- PAIK, H.D. *et al.* Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp *tochigiensis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v.19, p.294-298, 1997.
- PARENTE, E. & RICCIARDI, A. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.19, p.12-15, 1994.
- PATTNAIK, P. *et al.* Purification and characterization of a bacteriocin-like compound (Lichenin) produced anaerobically by *Bacillus licheniformis* isolated from water buffalo. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.91, p.636-645, 2001.
- PILET, M.F. *et al.* Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, p.256–262, 1995.
- RAY, B. & DAESCHEL, M.A. **Food biopreservatives of microbial origin**. Boca Raton: CRC Press, 1992.
- REDDY, K.V.R. *et al.* Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, London, n.24, p.536–547, 2004.

- ROSS, R.P. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.79, p.3-16, 2002.
- RYAN, M.P. The natural food grade inhibitor, lacticin 3147, reduced the incidence of mastitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, p.2625–2531, 1999.
- SAÏD, E. *et al.* Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.24, p.85-106, 2000.
- SARIS, P.E. *et al.* Immunity to lantibiotics. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.69, p.151–159, 1996.
- SCANNELL, A.G. *et al.* An effective lacticin biopreservative in fresh pork sausage. **Journal of Food Protection**, Ames, v.63, p.370–375, 2000.
- SEMENOVA, E. *et al.* Structure-activity analysis of Microcin J25: distinct parts of the threaded lasso molecule are responsible for interaction with bacterial RNA polymerase. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, p.3859-3863, 2005.
- SIEGERS, K. & ENTIAN, K.D. Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1082–1089, 1995.
- SILVERSTEIN, R.M. *et al.* **Spectrometric identification of organic compounds**. 5 ed. John Wiley & Sons, INC., New York, 1991.
- SNEATH, P.H.A. *et al.* **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams & Wilkin, Baltimore, v.2, 1986.
- SOARES, L.H. *et al.* Production of transglutaminase from *Bacillus circulans* on solid-state and submerged cultivations, **Biotechnology Letters**, Dordrecht v.25, n.23, p.2029-2033, 2003.
- SOUTO *et al.* Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.97, p.1247-1256, 2004.
- STEELE, H & STREIT, W. Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.247, p.105-111, 2005.
- STILES, M. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.70, p.331-45, 1996.

- STOFFELS, G. *et al.* Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.73, p.309-316, 1992.
- SUGITA, S. *et al.* Production of the antibacterial substance by *Bacillus sp.* strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v.165, p.269-280, 1998.
- SUGITA, S. *et al.* *Vibrio sp.* strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.4986-4989, 1997.
- TAGG, J.R. *et al.* Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriology Reviews**, Baltimore, v.40, p.722-756, 1976.
- TAMEHIRO, N. *et al.* Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.46, n.2, p.315-320, 2002.
- TAKAMI, H. *Et al.* Reidentification of the keratinase-producing facultatively alkaliphilic *Bacillus sp.* AH-101 as *Bacillus halodurans*. **Extremophiles**, Toquio, v.3, p.293-296, 1999.
- TWOMEY, D.P. *et al.* Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.82, p.165-185, 2002.
- TWOMEY, D.P. Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, Lacticin 3147. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, p.1981–1988, 2000.
- UTENG, M. *et al.* Rapid two-step procedure for large-scale purification of pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.2, p.952-956, 2002.
- VADYVALOO, V. *et al.* Membranes of class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.11, p.5223-5230, 2002.
- VALDÉS-STAUBER, N. & SCHERER, S. Isolation and characterization of linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.3809-3814, 1994.
- VAN LAACK, R. *et al.* Characterization and partial purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* LA4A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.16, p.183-195, 1992.

- VAN-DEN-BOGAARD, A.; STOBBERINGH, E. Antibiotic usage in animals. Impact on bacterial resistance and public health. **Drugs**, Auckland, v.58, p.589–607, 1999.
- VENEMA, K. *et al.*, Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. **Trends in Microbiology**, Cambridge, n.3, p.299–304, 1995.
- VERHEUL, A. *et al.* Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.3451-3457, 1997.
- VILLANI, F. *et al.* Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 25, p.179-190, 1995.
- WIEDEMANN, I. *et al.* Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.276, p.1772–1779, 2001.
- WILLIAMS, D.A. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2002, 5^a ed.
- YAKIMOV, M.M. *et al.* Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.5, 1706-13.1995.
- YAN, L.Z. *et al.* Analogues of bacteriocins: antimicrobial specificity and interactions of leucocin A with its enantiomer, carnobacteriocin B2, and truncated derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v.43, p.4579–4581, 2000.
- YANG. *et al.* Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, 1992.
- YOSHIDA *et al.* Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v.91, n.2, 181-187, 2001.

VITA

Nome: Lisana Reginini Sirtori

Data de Nascimento: 16 de Junho de 1981

Local de Nascimento: Cachoeira do Sul

Filiação: Nelson Antonio Sirtori e Maria Izabel Reginini Sirtori

Primeiro Grau: Colégio Farroupilha (Porto Alegre), 1995.

Segundo Grau: Colégio Farroupilha (Porto Alegre), 1998.

Terceiro Grau: Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS (Porto Alegre, Brasil), 2003.

Mestrado: Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, UFRGS (Porto Alegre, Brasil), 2006.

Atividade Profissional: Bolsista Iniciação Científica (Laboratório de Análise de Metabólitos – Serviço de Genética Médica – HCPA – 2001 a 2003); Monitora de Análises Bioquímicas (Faculdade de Farmácia- UFRGS -1999), Estagiária na Farmácia Simília (2003).

Artigos publicados:

Sirtori, L.R.; Dutra-Filho, C.S.; Fitarelli, D.; Sitta, A.; Haeser, A.; Barschak, A.G.; Wajner, M.; Coelho, D.M.; Llesuy, S.; Bello-Klein, A.; Giugliani, R.; Deon, M.; Vargas, C.R. Oxidative stress in patients with phenylketonuria. **Biochimica et Biophysica Acta** 2005 Apr 15;1740(1):68-73.

Vargas, C.R.; Wajner, M.; Sirtori, L.R.; Goulart, L.; Chiochetta, M.; Coelho, D.; Lattini, A.; Llesuy, S.; Klein, A.; Giugliani, R.; Deon, M.; Mello, C. Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy., **Biochimica et Biophysica Acta** 2004 Jan 20;1688(1):26-32.

Wajner, M.; Raymond, K.; Barschak, A.; Luft, A.; Ferreira, G.; Domingues, G.; Chiochetta, M.; Sirtori, L.R.; Goulart, L.; Pulrolnik, V.; Pires, R.; Grillo, E.; Lohr, A.; Funayama, C.; Sanseverino, M.; Leite, J.; Coelho, J.; Giugliani, R.; Vargas, C.. Detection of Organic Acidemias in Brazil. **Archives of Medical Research**, 2002 Nov-Dec;33(6):581-5.

Trabalhos em Eventos:

Sirtori, L.R.; Sitta, A.; Klein, A.; Mello, C.; Goulart, L.; Deon, M.; Llesuy, S.; Giugliani, R.; Vargas, C. Efeito in vitro da Lovastatina sobre o estresse oxidativo em córtex e fígado de ratos jovens. In: XXVIII **Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos**, 2003, Porto Alegre, 2003.

SIRTORI, L.R.; VARGAS, C.; WAJNER, M.; DEON, M.; PESSUTTO, F.; COELHO, D.; DUTRA FILHO, C.; LLESUY, S.; KLEIN, A.; GIUGLIANI, R. Estresse oxidativo na fenilcetonúria. In: **XV Salão de Iniciação Científica e XII Feira de Iniciação Científica**, 2003, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2003. p. 457-458.