

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

**Produção, caracterização, purificação parcial e aplicação  
de um peptídeo antimicrobiano produzido por *Bacillus  
licheniformis* P40**

Florencia Cladera Olivera  
Engenheira de Alimentos - UFRGS

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

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil  
Fevereiro, 2004

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Adriano Brandelli pela orientação, confiança, presença constante, cumplicidade e humildade. Obrigada por me mostrar o caminho.

A Geruza Caron pela amizade, dedicação e grande ajuda nestes dois anos de trabalho. Na esperança de ter contribuído com a tua formação tanto quanto contribuiste com a minha.

Aos colegas de laboratório: Adriane, Alessandro, Ana Paula, Eduardo, Fabiana, Franciani, Jaqueline, Juliana, Larissa, Laura, Luis Fernando, Márcia, Mariana, Patrícia, Samanta, Samantha, Sílvia e Taís, por fazer do laboratório uma segunda casa, e em especial ao Delmar e Amanda, pela valiosa colaboração neste trabalho. A Danusa, pelo companheirismo.

À colega Roberta Thys pela amizade que tanto me ajudou a andar nestes anos de graduação e de mestrado.

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

Ao pessoal do Laboratório de Bromatologia do ICTA, em especial ao Roberval e Mariângela, pela colaboração de todos os dias.

Ao pessoal da sala 204 do Instituto de Biofísica pela liofilização das amostras.

À Prof. Simone H. Flôres pela ajuda no planejamento experimental.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS por fornecer o suporte institucional e as instalações para este trabalho.

Ao CNPq e a FAPERGS pelo indispensável apoio financeiro.

Ao meu amor.

A minha família.

Ao meu pai *por las enseñanzas*, na vida e depois.

# PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO PARCIAL E APLICAÇÃO DE UM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO PRODUZIDO POR *Bacillus licheniformis* P40

Autor: Florencia Cladera Olivera

Orientador: Adriano Brandelli

## RESUMO

Uma bactéria identificada como *Bacillus licheniformis* P40 isolada de intestino de peixe (*Leporinus* sp.) da bacia amazônica foi estudada quanto à sua capacidade de produzir antimicrobianos. O sobrenadante da cultura obtido em caldo de cérebro e coração (BHI) foi caracterizado, sendo ativo contra importantes bactérias patogênicas e deteriorantes como *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. carotovora* e isolados clínicos de *Streptococcus*. Este foi parcialmente purificado através de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração e de troca iônica. Foram assim isoladas duas substâncias com atividade antimicrobiana, sendo uma delas de natureza protéica. Esta foi estável a altas temperaturas (100° C), numa ampla faixa de pH e mostrou propriedades de biosurfactante. O sobrenadante parcialmente purificado foi utilizado para o combate a um importante fitopatógeno: *Erwinia carotovora*. Uma dose de 6400 UA/mL foi bactericida para uma concentração de 10<sup>7</sup> UFC/mL em 20 minutos *in vitro*. A substância foi capaz de evitar a formação da podridão mole em batatas (*in vivo*). Foi estudada a produção da atividade antimicrobiana em resíduos e subprodutos da indústria de alimentos, sendo escolhido o soro de queijo para otimizar a produção através de um experimento fatorial 2<sup>3</sup> variando as condições de temperatura, pH e concentração de soro de queijo em pó. As melhores condições foram para temperaturas entre 26 e 37° C e pH entre 6,5 e 7,5 para uma concentração de soro de 7%, sendo que aumentos na concentração levaram a aumentos na produção.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (120p). Fevereiro, 2004

**PRODUCTION, CHARACTERIZATION, PARTIAL PURIFICATION AND APPLICATION OF AN ANTIMICROBIAL PEPTIDE PRODUCED BY *Bacillus licheniformis* STRAIN P40**

Author: Florencia Cladera Olivera

Advisor: Adriano Brandelli

**ABSTRACT**

A bacterium identified as *Bacillus licheniformis* strain P40 isolated from fish intestine (*Leporinus* sp.) of the Amazonian basin was studied for its capacity to produce antimicrobial compounds. The supernatant of the culture obtained in brain heart infusion (BHI) was characterized, being active against important pathogenic and spoilage bacteria such as *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. carotovora* and clinical isolates of *Streptococcus*. The supernatant was partially purified by ammonium sulfate precipitation, gel filtration and ion exchange chromatography. Two substances with antimicrobial activity were isolated, one of them showed proteinaceous nature. This substance was stable at high temperatures (100° C), in a wide pH range and it showed biosurfactant properties. The partially purified supernatant against to an important phytopathogen: *Erwinia carotovora*. A dose of 6400 UA/mL was bactericidal to a concentration of 10<sup>7</sup> UFC/mL in 20 minutes *in vitro*. The substance was capable to avoid the formation of the soft rot in potatoes (*in vivo*). The production of antimicrobial activity in residues and by-products of the food industry was studied and cheese whey was selected to optimize production by a factorial 2<sup>3</sup> experiment varying temperature, initial pH and cheese whey concentration. The best conditions were at temperatures between 26 and 37° C and initial pH between 6,5 and 7,5 for a cheese whey concentration of 7%. Increasing cheese whey concentration resulted in increase in antimicrobial activity production.

<sup>1</sup>Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (120p). February, 2004.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	v
RELAÇÃO DE TABELAS .....	viii
RELAÇÃO DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Antimicrobianos.....	4
2.1.1 O problema da resistência .....	5
2.1.2 Antimicrobianos e alimentos .....	6
2.2 Peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias .....	7
2.2.1 Classificação.....	7
2.2.2 Mecanismo de ação.....	10
2.2.3 Purificação .....	11
2.2.4 Aplicações.....	12
2.2.5 Desenvolvimento de resistência a bacteriocinas.....	14
2.3 Antimicrobianos produzidos por espécies do gênero <i>Bacillus</i> .....	15
2.3.1 <i>Bacillus licheniformis</i> .....	19
2.4 Otimização da produção de antimicrobianos e Metodologia de Superfície de Resposta .....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Equipamentos .....	24
3.2 Meios de cultura.....	25
3.3 Reagentes.....	25
3.4 Microrganismo produtor .....	26
3.4.1 Caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica.....	26
3.5 Microrganismos indicadores.....	27
3.6 Manutenção dos microrganismos.....	28
3.7 Determinação do número de células viáveis.....	29
3.8 Obtenção do sobrenadante da cultura .....	31
3.8.1 Preparação do pré-inóculo.....	31
3.8.2 Obtenção do sobrenadante bruto.....	31
3.9 Determinação das unidades arbitrárias por mililitro.....	32
3.10 Curva de crescimento e produção.....	33
3.10.1 Preparação do pré-inóculo.....	33
3.10.2 Curva de crescimento .....	34
3.11 Caracterização inicial do sobrenadante .....	34
3.11.1 Espectro de ação .....	35
3.11.2 Estabilidade térmica.....	35
3.11.3 Estabilidade frente ao pH e ação em diferentes pHs .....	36
3.11.4 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas.....	37
3.11.5 Estabilidade frente a solventes orgânicos, detergentes e outras substâncias químicas.....	37

3.11.6	Cromatografia de gel filtração .....	38
3.11.7	Determinação do efeito e modo de ação contra <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 e <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> 132 .....	39
3.12	Purificação parcial .....	40
3.12.1	Precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	41
3.12.2	Cromatografia de gel filtração (G-100).....	42
3.12.3	Cromatografia de troca iônica (CM-sephadex).....	43
3.12.4	Caracterização da fração III .....	43
3.12.5	Determinação da concentração de proteína solúvel .....	45
3.13	Aplicação no combate a um fitopatógeno: <i>Erwinia carotovora</i> .....	45
3.13.1	Determinação da concentração inibitória mínima .....	46
3.13.2	Determinação da concentração bactericida mínima .....	47
3.13.3	Curva dose-resposta.....	47
3.13.4	Cinética de ação da substância antimicrobiana .....	47
3.13.5	Proteção de tubérculos de batata in vivo .....	48
3.14	Otimização da produção .....	48
3.14.1	Avaliação da produção em resíduos e sub-produtos da indústria de alimentos .....	48
3.14.2	Otimização da produção em soro de queijo pela Metodologia de Superfície de Resposta.....	49
3.14.3	Determinação de crescimento e produção nas condições ótimas de temperatura e pH .....	53
4	RESULTADOS.....	54
4.1	Caracterização da linhagem produtora .....	54
4.2	Curva de crescimento e produção.....	57
4.3	Caracterização inicial do sobrenadante bruto .....	58
4.3.1	Espectro de ação .....	58
4.3.2	Estabilidade térmica.....	59
4.3.3	Estabilidade e ação em diferentes pHs.....	63
4.3.4	Estabilidade frente a enzimas proteolíticas.....	63
4.3.5	Estabilidade frente a solventes orgânicos, detergentes e outras substâncias químicas.....	64
4.3.6	Estimativa do peso molecular .....	65
4.3.7	Determinação do efeito contra <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 e <i>Erwinia carotovora</i> <i>atroseptica</i> 132 .....	66
4.4	Purificação parcial das substâncias antimicrobianas .....	68
4.4.1	Precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	68
4.4.2	Cromatografia líquida de gel filtração (G-100) .....	70
4.4.3	Cromatografia de troca iônica (CM-sephadex).....	72
4.4.4	Caracterização da fração III .....	74
4.5	Aplicação no combate a <i>Erwinia carotovora</i> .....	81
4.5.1	Determinação da concentração inibitória mínima .....	81
4.5.2	Determinação da concentração bactericida mínima .....	82
4.5.3	Curva dose-resposta.....	82
4.5.4	Cinética de ação .....	83
4.5.5	Proteção <i>in vivo</i> .....	84
4.6	Otimização da produção .....	86

4.6.1	Avaliação da produção em diferentes meios .....	86
4.6.2	Otimização da produção em soro de queijo pela Metodologia de Superfície de Resposta .....	86
4.6.3	Determinação do crescimento e produção nas condições ótimas de temperatura e pH .....	96
5	DISCUSSÃO .....	97
6	CONCLUSÕES .....	107
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	109
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	111
9	APÊNDICES .....	121
	VITA .....	123

## RELAÇÃO DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Microrganismos indicadores utilizados e condições de crescimento.....	30
<b>TABELA 2:</b> Codificação das variáveis para o planejamento fatorial $2^3$ .....	51
<b>TABELA 3:</b> Ensaios realizados no experimento fatorial $2^3$ .....	52
<b>TABELA 4:</b> Resultados dos testes bioquímicos e morfológicos.....	55
<b>TABELA 5:</b> Resultados dos testes bioquímicos obtidos através do sistema API 50 CH.....	57
<b>TABELA 6:</b> Espectro de ação do sobrenadante bruto.....	60
<b>TABELA 7:</b> Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto .....	61
<b>TABELA 8:</b> Atividade residual do sobrenadante bruto após tratamento com enzimas proteolíticas.....	64
<b>TABELA 9:</b> Efeito de diferentes substâncias na atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto .....	65
<b>TABELA 10:</b> Resultados da precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	69
<b>TABELA 11:</b> Tabela de purificação.....	74
<b>TABELA 12:</b> Verificação da ação da fração III contra alguns microrganismos indicadores.....	75
<b>TABELA 13:</b> Atividade residual da fração III após tratamento com enzimas proteolíticas.....	77
<b>TABELA 14:</b> Resultados dos testes para a determinação da CIM e da CBM .....	82
<b>TABELA 15:</b> Produção de atividade antimicrobiana em diferentes meios.....	86
<b>TABELA 16:</b> Resultados obtidos no experimento fatorial $2^3$ .....	89
<b>TABELA 17:</b> Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático da produção de atividade antimicrobiana.....	90
<b>TABELA 18:</b> Coeficientes do modelo quadrático .....	90
<b>TABELA 17:</b> Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático da produção de atividade proteolítica.....	95



## RELAÇÃO DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Estrutura de peptídeos antimicrobianos produzidos por <i>B. licheniformis</i> .....	21
<b>FIGURA 2:</b> Teste de difusão em ágar e determinação das unidades arbitrárias por mL.....	33
<b>FIGURA 3:</b> Esquema de purificação utilizado.....	41
<b>FIGURA 4:</b> Colorações de Gram e de esporos da bactéria produtora.....	56
<b>FIGURA 5:</b> Curva de crescimento e produção.....	58
<b>FIGURA 6:</b> Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana em diferentes temperaturas.....	62
<b>FIGURA 7:</b> Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana a 100° C.....	62
<b>FIGURA 8:</b> Influência do pH na atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto.....	63
<b>FIGURA 9:</b> Perfis de eluição da atividade antimicrobiana durante cromatografia de gel filtração.....	66
<b>FIGURA 10:</b> Efeito e modo de ação do sobrenadante bruto contra <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7466.....	67
<b>FIGURA 11:</b> Efeito e modo de ação do sobrenadante bruto contra <i>E. carotovora atroseptica</i> 132 .....	68
<b>FIGURA 12:</b> Resultados da precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	69
<b>FIGURA 13:</b> Perfil de eluição do sobrenadante bruto em coluna de gel filtração G-100.....	71
<b>FIGURA 14:</b> Perfil de eluição do precipitado eluído em coluna de gel filtração G-100.....	71
<b>FIGURA 15:</b> Perfil de eluição da Fração II em coluna de troca iônica (CM-Sephadex).....	76
<b>FIGURA 16:</b> Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana da fração III a 100° C.....	78
<b>FIGURA 17:</b> Influência do pH na atividade antimicrobiana da fração III.....	79
<b>FIGURA 18:</b> Índice de emulsificação da fração III com diversos hidrocarbonetos.....	80

<b>FIGURA 19:</b> Eletroforese realizada com o sobrenadante bruto e a fração III .....	83
<b>FIGURA 20:</b> Curva de dose-resposta contra <i>E. carotovora atroseptica</i> 132.....	84
<b>FIGURA 21:</b> Cinética da ação do sobrenadante parcialmente purificado contra <i>E. carotovora carotovora</i> 132 .....	85
<b>FIGURA 22:</b> Efeito <i>in vivo</i> contra <i>E. carotovora</i> .....	91
<b>FIGURA 23:</b> Gráfico de pareto para o modelo quadrático da produção de atividade antimicrobiana .....	91
<b>FIGURA 24:</b> Superfície de resposta da produção de antimicrobianos como função da temperatura e do pH inicial.....	92
<b>FIGURA 25:</b> Superfície de resposta da produção de antimicrobianos como função da concentração de soro de queijo e da temperatura.....	92
<b>FIGURA 26:</b> Superfície de resposta da produção de antimicrobianos como função da concentração de soro de queijo e do pH inicial.....	93
<b>FIGURA 27:</b> Gráfico de pareto para o crescimento bacteriano.....	93
<b>FIGURA 28:</b> Superfície de resposta da atividade proteolítica como função da temperatura e da concentração de soro de queijo.....	94
<b>FIGURA 29:</b> Gráfico de pareto para a produção de protease .....	95
<b>FIGURA 30:</b> Curva de crescimento e produção nas condições ótimas de temperatura e pH em soro de queijo 7%.....	96

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: Infusão de cérebro e coração

BHA: Ágar de cérebro e coração

EDTA: etilenodiaminotetracético

GRAS: *generally regarded as safe*

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

ICBS: Instituto de Ciência Básicas da Saúde - UFRGS

ICTA: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UFRGS

LACEN: Laboratório Central

LARA: Laboratório de Referência Animal – Ministério da Agricultura

MHA: Ágar Müeller Hinton

MRSA: Ágar Man Rogosa e Sharpe

MSR: metodologia de superfície de resposta

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

NCTC: *National Collection of Type Cultures*

PBS: solução tampão fosfato salina

PetLab: PetLab - Laboratório Veterinário de Análises Clínicas

rpm: Revoluções por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

TCA: ácido tricloroacético

TRIS: hidroximetilaminometano

TSA: Ágar triptona de soja

TSB: Caldo triptona de soja

UA: unidades arbitrárias

UFA: Universidade Federal do Amazonas

UFC: unidades formadoras de colônias

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas têm-se apresentado novos desafios para as indústrias farmacêutica e de alimentos no que se refere ao combate a microrganismos patogênicos e deteriorantes.

O desenvolvimento e a proliferação de bactérias resistentes a antibióticos, que diminuem as opções terapêuticas, têm se tornado um grave problema de saúde pública no mundo todo. A rápida escalada da resistência microbiana pode fazer com que algumas infecções bacterianas não possam ser tratadas com os agentes antimicrobianos existentes. Esforços a nível mundial para estudar e contornar este problema vêm sendo realizados há anos. Dentre as soluções está o uso mais racional dos antibióticos e a descoberta de novos antimicrobianos.

Além disso, nas últimas décadas tem-se assistido a uma evolução bastante pronunciada da incidência das doenças de origem alimentar provocadas por microrganismos. Como exemplo está o surgimento de novos patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 ou o reconhecimento de *Listeria monocytogenes* como um patógeno de origem alimentar. A preservação dos alimentos é uma luta constante contra microrganismos que os deterioram ou que os tornam inseguros. Neste sentido, a descoberta de novas alternativas na preservação dos alimentos é um assunto amplamente estudado, sendo por exemplo sugerida nos últimos anos a utilização de bacteriocinas. Estas são substâncias com atividade antimicrobiana,

de natureza protéica e produzidas por bactérias, que podem ser empregadas de diferentes formas no alimento para inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis.

Muitas vezes, o combate a microrganismos deteriorantes tem início no campo ou no pós-colheita, onde os fitopatógenos podem provocar perdas importantes. Um exemplo são as bactérias do gênero *Erwinia* que causam doenças em tubérculos conhecidas como Podridão Mole e Canela Preta.

Desta forma, a pesquisa por novos agentes antimicrobianos é um campo de grande importância tanto para indústria farmacêutica quanto para a indústria de alimentos.

A bacia amazônica constitui uma fonte de enormes recursos biológicos cujo potencial não tem sido plenamente estudado. Poucos trabalhos foram publicados sobre a diversidade microbiana da região e a sua aplicação biotecnológica. Por exemplo, não existem relatos específicos de antimicrobianos produzidos por isolados bacterianos desta região.

O objetivo deste trabalho é verificar o potencial antimicrobiano, caracterizar, purificar e otimizar a produção de uma substância antimicrobiana por uma bactéria isolada de intestino de peixe da bacia amazônica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A bacia amazônica é bem conhecida pela sua diversidade de flora e fauna, incluindo 15.000 espécies animais documentadas sendo que pelo menos 40% dos peixes de água doce do planeta residem nesta região. Esta possui o maior corpo de água doce e a maior floresta do mundo. Constitui assim, uma fonte de enorme diversidade biológica e que não foi ainda plenamente estudada. Quanto à vida microbiana poucos trabalhos foram publicados (Borneman & Triplett, 1997).

Borneman & Triplett (1997) mostraram evidências da enorme diversidade microbiana em solos da Amazônia através de um estudo filogenético. Mais recentemente, a caracterização de alguns microrganismos com interesse biotecnológico tem sido reportada. Daisy et al. (2002) estudaram a produção de naftaleno por um novo fungo isolado na Amazônia peruana e a sua aplicação no combate a insetos. Chies et al. (2002) identificaram uma nova endonuclease de restrição produzida por *Bacillus anthracis* com aplicação na biologia molecular. Bastos et al. (2000) isolaram microrganismos degradadores de fenol de amostras de solo da região. Peixoto (2002) caracterizou e estudou a atividade celulolítica de dois isolados bacterianos de peixes da região. Heck et al. (2002) pesquisaram a produção de celulasas e xilanasas por espécies de *Bacillus*. No entanto, a

produção de antimicrobianos por isolados bacterianos da região não foi ainda descrita.

## **2.1 Antimicrobianos**

Os antimicrobianos são substâncias utilizadas para controlar as populações microbianas, por interferirem de diferentes formas no seu crescimento. Eles podem impedir o crescimento dos microrganismos ou destruí-los (Katzung, 1995).

Os antimicrobianos podem ser produzidos por microrganismos ou ser de origem sintética. Existem ainda aqueles que são semi-sintéticos, isto é, uma parte da molécula é produzida por um microrganismo e outra é adicionada sinteticamente. Neste trabalho serão considerados apenas os antimicrobianos produzidos por microrganismos.

Estes podem ser classificados segundo diversos critérios. Quanto à origem (produzidos por bactérias, actinomicetos e eumicetos); quanto à biossíntese (antimicrobianos derivados de aminoácidos, de carboidratos, de acetatos e propionato, entre outros); quanto à ação predominante (ação sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, micobactérias, de ampla ação, antimicóticos e antiprotozoários); quanto ao mecanismo de ação e quanto a sua ação (bactericidas ou bacteriostáticos).

Os antimicrobianos afetam os microrganismos através de diferentes mecanismos de ação: inibição da síntese da parede celular, danos à membrana citoplasmática, inibição da síntese de proteínas, de ácidos nucléicos e de metabólitos essenciais (Katzung, 1995).

### 2.1.1 O problema da resistência

Desde que Alexander Fleming descobriu o primeiro antibiótico, a penicilina em 1928, o homem e o microrganismo disputam uma espécie de corrida biológica em que a liderança vem se alternando o tempo todo (Lopes, 2000). A era dos antibióticos foi marcada assim, por ciclos consistindo na introdução de novos antimicrobianos e subsequente emergência de resistência a estas drogas (Swartz, 2000).

A prevalência de resistência a antimicrobianos entre patógenos microbianos chave tem aumentado de forma alarmante no mundo todo, tornando-se assim um dos maiores problemas de saúde pública. São exemplos de destaque o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) ou com resistência intermediária à vancomicina (VISA) e o *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE). Outras espécies como *Streptococcus pneumoniae* também tornaram-se cada vez mais resistentes aos agentes antimicrobianos nos anos 1990 (Jacoby, 1996). Em 2002 surgiu nos Estados Unidos o primeiro caso de *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA). Soluções a este problema envolvem o uso mais racional dos antibióticos e a descoberta de novos antimicrobianos. Esta última é de grande importância, já que o problema da rápida escalada a nível mundial da resistência microbiana pode tornar os agentes antimicrobianos existentes insuficientes para controlar algumas infecções bacterianas (Bhavnani & Ballou, 2000).

Os mecanismos de resistência são complexos, variados e não totalmente compreendidos (Koneman et al., 1997). Entre os mecanismos que explicam esta resistência têm-se: a produção de quantidades suficientes de uma enzima que



destrói ou modifica a estrutura do antibiótico; a incapacidade do fármaco de penetrar na célula bacteriana; a existência de uma via metabólica alternativa da bactéria que desvia a reação particular que é inibida pelo antibiótico e o fato da bactéria possuir tipos de enzimas, ribossomos ou outros componentes celulares que não são afetados pelo antimicrobiano (Lopes, 2000). Os genes responsáveis por estes mecanismos podem estar localizados no cromossomo da bactéria ou em plasmídios e a sua transferência dá-se principalmente por conjugação.

### **2.1.2 Antimicrobianos e alimentos**

A incidência das doenças de origem alimentar provocadas por microrganismos tem evoluído bastante nas últimas duas décadas com o surgimento de novos patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 ou o reconhecimento de *Listeria monocytogenes* como um patógeno de origem alimentar (Meng & Doyle, 1998).

As técnicas utilizadas para preservar os alimentos constituem uma batalha constante contra microrganismos que deterioram os alimentos ou que os tornam inseguros. A indústria de alimentos pesquisa cada vez mais a substituição de técnicas tradicionais de preservação (tratamento térmico intenso, salga, acidificação, secagem e preservação química) por novas técnicas, devido a um aumento na demanda por produtos alimentícios nutritivos, saborosos, naturais e práticos. Dentre as novas alternativas na preservação está a utilização de peptídeos antimicrobianos (Devlieghere et al, 2003).

Deve-se ter em conta que o combate a microrganismos deteriorantes muitas vezes inicia-se no campo ou no pós-colheita onde os fitopatógenos podem

provocar perdas importantes. Um exemplo são as bactérias do gênero *Erwinia* que causam doenças em tubérculos conhecidas como Podridão Mole e Canela Preta (Pérombelon & Kelmand, 1987).

Desta forma, a pesquisa por novos agentes antimicrobianos é também um campo de interesse para a indústria de alimentos.

## **2.2 Peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias**

A produção de compostos antimicrobianos parece ser um fenômeno geral para a maioria das bactérias. São produzidos diversos sistemas de defesa microbianos incluindo antibióticos clássicos de amplo espectro, sub-produtos metabólicos como ácido lático produzido por lactobacilos, agentes líticos como a lisozima, diversos tipos de exotoxinas protéicas e bacteriocinas (Riley & Wertz, 2002).

O aparecimento na metade dos anos 1980 de linhagens bacterianas multi-resistentes demonstrou a necessidade de buscar alternativas aos antibióticos sintéticos. Os antibióticos baseados em peptídeos são considerados hoje como uma resposta potencial ao crescente problema da resistência aos antibióticos tradicionais (Papagianni, 2003). Centenas de peptídeos antibióticos têm sido descritos nos últimos 50 anos (Hancock & Chapple, 1999).

### **2.2.1 Classificação**

Os peptídeos antimicrobianos podem ser divididos em dois grandes grupos dependendo da sua biossíntese. Estes são, aqueles não sintetizados

ribossomalmente, como as bacitracinas e os glicopeptídeos, e os peptídeos sintetizados ribossomalmente. Os primeiros contêm, em geral, aminoácidos drasticamente modificados e são amplamente produzidos por bactérias, enquanto que os segundos são produzidos pelos mais diversos tipos de vida como moléculas de defesa (Hancock & Chapple, 1999).

Os peptídeos sintetizados não ribossomalmente podem ser descritos como peptídeos elaborados por microrganismos, que contêm duas ou mais porções derivadas de aminoácidos. Este tipo de peptídeos é sintetizado através de uma enzima ou de um complexo multienzimático. Estes englobam compostos com uma grande diversidade estrutural como gramicidinas, polimixinas, glicopeptídeos, lipopeptídeos, peptídeos cíclicos, entre outros (Hancock, 1997). Muitos dos antibióticos utilizados hoje se enquadram nesta classe ou são derivados destes peptídeos. Este tipo de peptídeos são considerados metabólitos secundários (Stachelhans et al., 1996).

Os peptídeos produzidos por bactérias e sintetizados ribossomalmente são conhecidos como bacteriocinas. Estas têm recebido cada vez mais atenção devido a sua grande diversidade, à ampla distribuição entre as bactérias e ao seu potencial uso como conservante na indústria de alimentos e como antibióticos na indústria farmacêutica (Riley, 1998). As bacteriocinas foram inicialmente definidas como compostos de natureza protéica produzidos por bactérias que inibem ou matam espécies estritamente relacionadas à linhagem produtora (Tagg et al. 1976). Mais recentemente, esta definição foi ampliada para incluir compostos similares que atuam numa faixa mais ampla de espécies e contêm outras porções funcionais como carboidratos e lipídeos (Riley, 1998).

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

a) A classe I, formada pelos lantibióticos, são bacteriocinas pequenas, compostas geralmente por um ou dois peptídeos de aproximadamente 3 kDa, termoestáveis e que contêm aminoácidos com anéis tioéter intramoleculares, como lantionina e  $\beta$ -metil-lantionina (exemplo: nisina);

b) A classe II são bacteriocinas não modificadas, sendo estas pequenos peptídeos termoestáveis (PM < 10 KDa), ativos em membrana e que não contêm lantionina na sua molécula. Esta classe é dividida em três subgrupos. O subgrupo IIA, formado por peptídeos ativos contra *Listeria* spp, conhecidos como bacteriocinas similares à pediocina. O subgrupo IIB, formado por bacteriocinas cuja ação antimicrobiana depende da atividade complementar de dois peptídeos. O subgrupo IIC, composto por peptídeos ativados por tiol que requerem resíduos de cisteína para atividade, como a lactococcina B.

c) A classe III é composta por grandes proteínas termo-sensíveis (>30KDa) como a helveticina J e as lactacinas A e B.

d) A classe IV inclui bacteriocinas complexas compostas por uma ou mais unidades protéicas e unidades químicas (lipídica ou carboidrato) necessárias para a atividade, como a plantaricina S.

Existem também as substâncias chamadas de substâncias semelhantes a bacteriocina (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).

### **2.2.2 Mecanismo de ação**

Os peptídeos antibióticos catiônicos sintetizados não ribossomalmente, como a polimixina B e a gramicidina, atuam geralmente da mesma forma que à descrita para as bacteriocinas. Já, outros peptídeos de origem não ribossomal atuam como inibidores da síntese de proteínas (Hancock & Chapple, 1999).

A atividade antibiótica das bacteriocinas baseia-se na interação destas com a membrana bacteriana (Hécharde & Sahl, 2002). A formação de poros na membrana citoplasmática é um mecanismo de ação comum destes compostos (Klaenhammer, 1993). A membrana externa das bactérias Gram-negativas, impenetrável para estes peptídeos, geralmente previne a atividade antimicrobiana (Papagianni, 2003). Algumas bacteriocinas requerem receptores específicos na membrana enquanto que outras não. A classe II são peptídeos ativos na membrana que destroem a sua integridade pela formação de canais. A perda da integridade da membrana geralmente leva ao extravazamento de íons, perda da força protomotiva e morte celular (Klaenhammer, 1993). Já, a classe IB não forma poros na membrana mas atua interferindo em atividades enzimáticas essenciais (McAuliffe et al., 2001).

Após penetrar na célula alvo, as bacteriocinas levam à morte da célula pela formação de canais permeáveis de íons na membrana citoplasmática; pela

degradação não específica do DNA celular; pela inibição da síntese de proteínas; pela clivagem específica do rRNA 16S ou pela lise celular resultante da inibição da síntese do peptidoglicano (Riley, 1998; Hancock & Chapple, 1999).

### **2.2.3 Purificação**

A utilização de peptídeos antimicrobianos, tanto para estudo quanto para aplicação, requer geralmente a purificação destas substâncias. Diversas técnicas têm sido utilizadas pelos pesquisadores para conseguir este objetivo. Como são substâncias com diferentes características estruturais e propriedades químicas, não é possível generalizar um método único de purificação. Porém, muitos trabalhos apresentam etapas similares. Geralmente, o processo inicia-se com a centrifugação da cultura para separar as células do sobrenadante. Este é posteriormente concentrado através de precipitação com sulfato de amônio (outros sais ou solventes podem ser utilizados nesta etapa). Em etapas posteriores são utilizados métodos cromatográficos como cromatografia de gel filtração, de troca iônica, de interação hidrofóbica e de fase reversa (Santos et al., 1994; Jack et al., 1995; Uteng et al., 2002). Pode ser utilizada também a extração com solventes orgânicos. Apesar de que estas técnicas levam à produção de preparações de antimicrobianos altamente puros, o rendimento final é baixo e geralmente inferior a 20% (Jack et al., 1995). Além disso, estes procedimentos funcionam bem para pequenas quantidades de sobrenadante, mas, tornam-se inviáveis para uma produção em escala semi-industrial (Uteng et al., 2002).

Alguns pesquisadores têm utilizado a propriedade das bacteriocinas de serem adsorvidas pelas células produtoras para purificar estas substâncias. Um

exemplo consiste no aquecimento da cultura após produção da bacteriocina (para matar as bactérias) sendo previamente ajustado o pH (a adsorção da bacteriocina é dependente do pH). Posteriormente deixa-se uma noite a 4° C sob agitação magnética a fim de permitir a absorção da bacteriocina nas células mortas. Após separar as células do sobrenadante estas são lavadas e ressuspensas em tampão adequado e agitadas novamente sob refrigeração para permitir a liberação da bacteriocina adsorvida. Esta é obtida, assim, no sobrenadante (Yildirim & Johnson, 1997; Atrih et al., 2001).

#### **2.2.4 Aplicações**

O potencial uso clínico dos peptídeos antimicrobianos foi sugerido nos anos 1950. No entanto, o enorme impacto da era dos antibióticos restringiu muitas das pesquisas na área (Riley, 1998). Como exemplo do estudo da aplicação destes peptídeos tem-se a inibição de *Shigella sonnei* em conjuntivite por *E. coli* colicinogênica; a utilização de peptídeos produzidos por microrganismos para prevenir cáries (Chikindas et al., 1997); o uso de nisina para inibir bactérias formadoras de placa (Riley, 1998) assim como para o tratamento de úlcera provocada por *Helicobacter pylori* (Hancock & Chapple, 1999). Foi também sugerida a utilização para inibir a formação de biofilmes em cateteres (Fontana, 2002)

Uma das limitações dos antibióticos de amplo espectro é que eles matam quase qualquer espécie bacteriana não especificamente resistente à droga. Isto resulta numa intensa pressão seletiva para a evolução da resistência aos antibióticos, tanto em patógenos quanto em comensais. As bacteriocinas, com o

seu espectro de ação relativamente restrito podem ser consideradas “drogas planejadas” que alvejam patógenos humanos específicos. O desenvolvimento e uso destes antimicrobianos de particular espectro aumenta o seu tempo de vida já que diminui a frequência de uso, limitando a intensidade da seleção por resistência. Além disso, leva a uma redução na morte de espécies não patogênicas (espécies comensais) o que implica na diminuição dos níveis de infecção nosocomial (Riley & Wertz, 2002).

Quanto à aplicação de bacteriocinas como biopreservativos em alimentos, aquelas produzidas por bactérias lácticas receberam atenção especial nos últimos anos devido a que estas bactérias têm sido utilizadas por séculos em alimentos fermentados e são vistas como GRAS (*generally regarded as safe*). O espectro inibitório destas bacteriocinas é geralmente restrito às bactérias Gram-positivas, porém ativas contra importantes microrganismos deteriorantes e patogênicos como *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Riley, 1998). No entanto, a nisina é a única bacteriocina permitida para uso alimentar pelo Comitê do Codex Alimentarius da FAO (*Food and Agriculture Organization*). As bacteriocinas podem ser usadas em diversas formas em alimentos, desde o uso das linhagens produtoras diretamente nos alimentos como biocontroladores ou como culturas “starters” em alimentos fermentados, até o uso de preparações concentradas da bacteriocina como aditivo ou no desenvolvimento de embalagens com bacteriocinas imobilizadas (Muriana, 1996; Scannell et al., 2000; Papagianni, 2003).



No entanto, existem dois aspectos que devem ser considerados na utilização das bacteriocinas em alimentos: (1) as mudanças nas características organolépticas e na textura do alimento e (2) a interação entre estes compostos e os ingredientes do alimento e a influência desta interação na sua eficiência (Devlieghere et al., 2003). Por exemplo, concentrações moderadas de cloreto de sódio, presentes em muitos produtos alimentícios, podem neutralizar o potencial antimicrobiano de bacteriocinas como a sakacina K (Leroy & De Vust, 1999). Outros componentes dos alimentos como amido, proteínas e gorduras podem também alterar a capacidade antimicrobiana destes compostos (Devlieghere et al., 2003). Por serem substâncias de natureza proteica, as bacteriocinas são sensíveis à degradação por enzimas proteolíticas. Este é outro fator importante na sua aplicação em alimentos, onde enzimas estão presentes, seja como constituinte do próprio alimento ou como resultado do metabolismo de microrganismos proteolíticos.

### **2.2.5 Desenvolvimento de resistência a bacteriocinas**

Em algumas populações de espécies normalmente sensíveis a bacteriocinas foram encontradas linhagens resistentes. Apesar de não ser ainda demonstrado, pode-se esperar que classes similares de resistência possam existir para todas as bacteriocinas (Dykes, 1995). O desenvolvimento de resistência a bacteriocinas é pouco caracterizado ainda, sendo necessárias pesquisas para compreender melhor o fenômeno (Gravesen et al., 2002b).

A célula alvo pode desenvolver resistência ou tolerância à ação das bacteriocinas geralmente alterando receptores da superfície celular ou sistema de translocação (Ryley, 1998).

Podem ser observados três tipos de mecanismos de resistência: imunidade, resistência transferível e resistência espontânea (Dykes, 1995). A imunidade é aquela apresentada pela célula produtora ou por bactérias que também produzem bacteriocinas (Klaenhammer, 1993). A resistência transferível é aquela codificada por elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, e que não estão ligados à produção de bacteriocina. A ocorrência de resistência espontânea pode ocorrer em baixos níveis em populações bacterianas. Porém, esta não leva à proliferação de linhagens resistentes no ambiente já que os mecanismos de resistência podem levar a uma perda na habilidade de concorrer contra linhagens não resistentes na ausência da bacteriocina (Dykes, 1995).

Resistência cruzada entre diferentes bacteriocinas já tem sido reportada por diversos autores (Gravesen et al., 2002b).

### **2.3 Antimicrobianos produzidos por espécies do gênero *Bacillus***

O gênero *Bacillus* inclui uma variedade de espécies importantes industrialmente e tem um histórico de uso seguro tanto na indústria quanto em alimentos (Paik et al. 1997). As características que definem este gênero segundo o Manual Bergey de Bacteriologia Sistemática (Sneath et al., 1986) são: bactérias com forma de bastonete, Gram-positivas (ou positivas só nos primeiros estágios de crescimento), formadoras de esporos (não mais do que um por célula),

aeróbias ou anaeróbias facultativas, sendo a maioria catalase positiva. Exibem uma grande variedade de habilidades fisiológicas podendo ser psicrotóricas ou termofílicas, acidófilas ou alcalófilas.

Constitui um gênero interessante para a pesquisa de atividade antimicrobiana já que espécies de *Bacillus* produzem um grande número de peptídeos antibióticos apresentando diversas estruturas químicas diferentes (Gebhardt et al., 2002). Membros do gênero *Bacillus* são conhecidos como produtores de uma ampla variedade de peptídeos antibióticos. Peptídeos cíclicos como a gramicidina S, tyrocidina e bacitracina e lipopeptídeos como as iturinas, bacilomicinas e fengycinas são metabólitos secundários característicos isolados deste grupo de microrganismos (Gebhardt et al., 2002). Membros do gênero que foram reclassificados como *Paenibacillus* também produzem peptídeos antibióticos como o *P. polymyxa*, produtor da polimixina B e da polixina (Piuri et al., 1998).

Uma bactéria do gênero *Bacillus* foi isolada de intestino de peixe da costa japonesa, sendo produtora de atividade antimicrobiana (Sugita et al., 1998). Foram realizados outros estudos onde foi demonstrada a produção de substâncias antimicrobianas por bactérias aquáticas isoladas de diversas fontes (Dopazo et al. 1988, Sugita et al. 1997). Foi sugerido que bactérias intestinais produtoras de antimicrobianos podem prevenir o estabelecimento de bactérias invasoras no intestino do peixe (Sugita et al. 1997).

Membros do gênero *Bacillus* foram reportados como sendo agentes biocontroladores em diversas doenças de plantas. Yoshida et al. (2001) isolaram uma linhagem de *B. amyloliquefaciens* produtora de compostos que inibiam fungos e bactérias fitopatogênicas como *Colletotrichum dematium* e *Erwinia carotovora*, respectivamente. Sharga & Lyon (1998) utilizaram uma linhagem de *B. subtilis* originária da Ucrânia para inibir o desenvolvimento de Podridão Mole em tubérculos-batata causada por *E. carotovora*.

A produção de bacteriocinas ou de substâncias relacionadas tem sido descrita para várias espécies do gênero *Bacillus*. Entre elas estão *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; Le Marrec et al., 2000; Yoshida et al., 2001). Destas, a subtilina é a mais estudada, sendo um lantibiótico produzido por *B. subtilis* cuja estrutura e modo de ação são similares aos da nisina (Oscáriz et al., 1999).

Diversas bacteriocinas produzidas por *B. cereus*, chamadas de cereinas, foram reportadas. A cereina 7 (Oscáriz et al., 1999; Oscáriz & Pisabarro, 2000) é secretada em agregados, possui um peso molecular entre 3 e 10 KDa, é termoestável (100° C 15 min), estável numa ampla faixa de pH (entre 2 e 9), tendo efeito bactericida e bacteriolítico contra *L. innocua*. Já a cereina 8 A (Bizani & Brandelli, 2002) perde a sua atividade a 85° C, sendo estável numa faixa de pH entre 5 e 8 e possui um peso molecular maior que 20 kDa. A cereina produzida por *B. cereus* GN105 só tem ação contra espécies do mesmo gênero e possui um

peso molecular de aproximadamente 9 kDa, perdendo a atividade a 90° C e sendo estável numa ampla faixa de pH (Naclerio et al., 1993).

Le Marrec et al. (2000) isolaram pela primeira vez uma bacteriocina da família das pediocinas produzida por uma bactéria não ácido láctica. A coagulina pl<sub>4</sub>, produzida por *B. coagulans* I<sub>4</sub> é codificada por plasmídeo, tem ação contra *Listeria* e possui um PM de 4,6 KDa.

*B. subtilis* é conhecido por produzir diversos antibióticos, alguns deles sintetizados ribossomalmente e produzidos durante a fase ativa de crescimento, e outros sintetizados não ribossomalmente durante a fase estacionária. Entre os primeiros estão a subtilosina, a subtilina, a sublancina, o TasA e, entre os segundos, a surfactina, a bacilisina e as iturinas (Tamehiro et al., 2002). A surfactina é um biosurfactante produzido por diversas linhagens de *Bacillus subtilis*. É um lipopeptídeo ácido que possui uma estrutura cíclica. Contém sete resíduos de aminoácidos e é fechado por formação de lactona. É um biosurfactante muito poderoso devido a sua natureza anfifílica, com uma cabeça de aminoácido polar e uma cadeia de hidrocarbonos. Além das propriedades de biosurfactante, a surfactina exibe outras atividades biológicas como atividade anti-tumoral, antiviral, antibiótica e é capaz de lisar eritrócitos (Carrillo et al., 2003). Tamehiro et al. (2002) reportaram pela primeira vez um antibiótico com estrutura fosfolipídica produzido por *B. subtilis*, chamado de bacilisocina.

*B. thuringiensis* é uma bactéria amplamente utilizada na agricultura, sendo que foram caracterizadas as seguintes bacteriocinas por ele produzidas: thuricina

(Favret & Yousten, 1989), tochicina (Paik et al., 1997) e thuricina 7 (Cherif et al., 2001). O peso molecular destas foi determinado como sendo de 950 Kda (forma nativa), 10,5 Kda e 11,6 Kda respectivamente. As duas últimas foram relativamente termoestáveis (90° C 30 min), ativas numa faixa de pH entre 3 e 9 e sensíveis ao tratamento com proteinase K.

### **2.3.1 *Bacillus licheniformis***

*Bacillus licheniformis* é utilizado para a produção industrial de diversas substâncias como as enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -lactamase, protease alcalina e fosfatase alcalina e o peptídeo antibiótico bacitracina (Tran et al., 1998). A estrutura da bacitracina é mostrada na Figura 1b.

Foram reportadas nos últimos anos algumas substâncias antimicrobianas de natureza protéica produzidas por esta espécie. Entre elas estão a produção de biosurfactantes conhecidos como lichenisinas, peptídeos ativos contra amebas (amebocinas) e uma bacteriocina designada como lichenina.

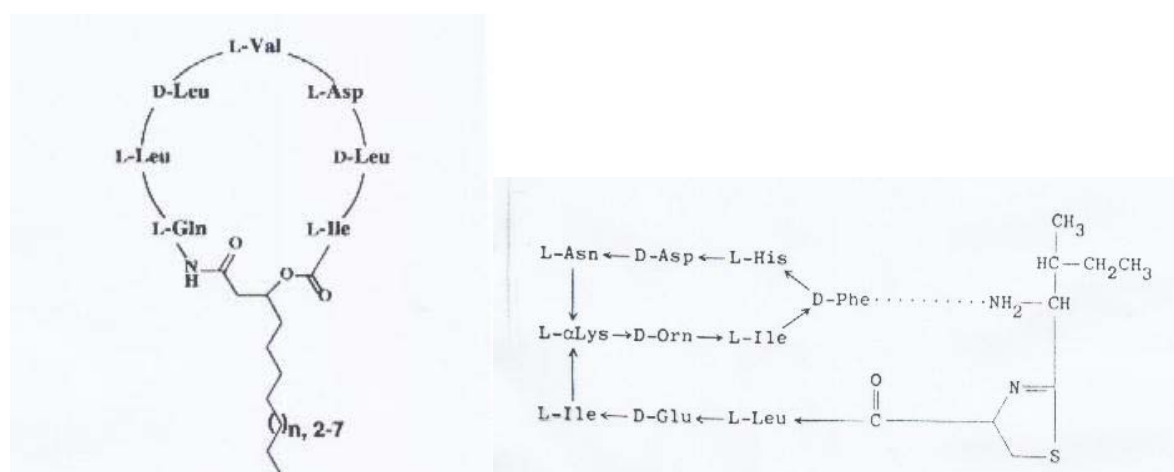
A lichenina foi produzida anaerobicamente por uma linhagem de *B. licheniformis* isolado de rumem de búfalo. Tanto a produção quanto a atividade foram dependentes da falta de oxigênio. A bacteriocina foi termoestável (100° C); ativa numa faixa de pH entre 4 e 9; sensível à proteinase K e apresentou um peso molecular menor a 1,5 KDa (Pattnaik et al., 2001).

Amebocinas têm sido isoladas por linhagens de *B. licheniformis* e a sua atividade contra *Nagleria fowleri* foi determinada (Galvez et al., 1993; Galvez et al., 1994; Lebbadi et al., 1994). *B. licheniformis* D-13 produz três peptídeos

hidrofóbicos (amebocinas d-13A, d-13B e d-13C) que possuem atividade contra *Naegleria* e têm um amplo espectro antibacteriano. Estas três amebocinas possuem a mesma composição de aminoácidos e um peso molecular de 1.870 Da (Galvez et al., 1994). A amebocina m4-A (Lebbadi et al., 1994) possui ação bactericida e bacteriolítica contra *B. megaterium* GR10. Neste caso há inibição da síntese de proteínas, DNA e RNA, sendo também afetado o potencial de membrana. As amebocinas A12-A e A12-B são peptídeos resistentes ao calor e proteases com um peso molecular de 1.430 Da, sendo ativas contra alguns fungos e leveduras, mas o espectro antibacteriano parece restrito a *B. megaterium*, *Corynebacterium glutamicum* e *Sarcina* sp. (Galvez et al., 1993).

As lichenisinas são lipopeptídeos conhecidos por suas propriedades biosurfactantes. Lichenisina A é um complexo de lipoheptapeptídeos cíclicos produzidos por diversas linhagens de *B. licheniformis* e exibe um amplo espectro inibitório contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Yakimov et al, 1995). A sua estrutura geral é mostrada na Figura 1a. Constitui uma mistura de pelo menos 14 componentes com PMs entre 992 e 1034 Da e é sintetizada não ribossomalmente (Yakimov et al, 1999). Mikkola et al. (2000) demonstraram que a lichenisina A possui ação tóxica contra espermatozóides, provocando danos na membrana celular e ativando a reação acrossomal. A surfactina (produzida por *B. subtilis*) também mostrou estas características (Mikkola et al., 2000). Porém, esta última foi utilizada por Vollenbroich et al. (1997) para o combate de espécies de *Mycoplasma* em células de mamíferos, sendo determinado que a baixa toxicidade da surfactina nestas células permite o seu uso terapêutico com eficiência. Outras lichenisinas (B, C e D) têm sido caracterizadas por outros autores, sendo que

existem pequenas diferenças entre elas, dependendo da linhagem produtora (Konz et al., 1999).



A

B

**Figura 1:** Estrutura de peptídeos antimicrobianos produzidos por *B. Licheniformis*. a) estrutura geral da lichenisina A. b) bacitracina, Fonte: Index Merck, Yakimov et al. (1999).

## 2.4 Otimização da produção de antimicrobianos e Metodologia de Superfície de Resposta

Existem diversos fatores que influenciam na produção de antimicrobianos pelos microrganismos. Entre eles pode-se citar a composição do meio de cultura, o pH, a temperatura, a aeração e o tempo de incubação. O efeito do pH e da temperatura é muito importante na produção de bacteriocinas e tem sido estudado por Krier et al (1998) para *Leuconostoc mesenteroides* FR52, por Vignolo et al (1995) para *Lactobacillus casei* CRL 70, por Motta & Brandelli (2003) para *Brevibacterium linens*, entre outros. Estes estudos foram realizados utilizando o método clássico.

A otimização da produção de antimicrobianos pelo método clássico envolve a mudança de uma variável independente (nutriente, pH, temperatura, etc) fixando



todas as outras variáveis. Isto consome muito tempo e é de custo elevado para um grande número de variáveis (Adinarayana et al., 2003). Além disso, pode levar a conclusões errôneas (Oh et al., 1995). A metodologia de superfície de resposta (MSR) é um conjunto de técnicas estatísticas para desenhar experimentos, construir modelos, avaliar o efeito de fatores e procurar condições ótimas dos fatores para uma resposta desejada (Li et al., 2002). Tem a vantagem de permitir estudar efeitos realizando um número pequeno de experimentos, além de possibilitar o estudo das interações entre estes efeitos, o que o método clássico não permite. Esta metodologia foi aplicada com sucesso em diversas áreas da biotecnologia como a bioconversão de soro de queijo em micélios de *Ganoderma lucidum* (Lee et al., 2002), a otimização da produção de neomicina por *Streptomyces marinensis* (Adinarayana et al., 2003), a produção de enzimas diversas (Bocchini et al., 2002; Beg et al., 2003; Puri et al., 2002), entre outros. Com respeito à produção de bacteriocinas, Flôres (2000) otimizou a produção de nisina por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* variando a composição do meio utilizando a MSR. Li et al. (2002) sugeriram ser os primeiros em utilizar esta metodologia para otimizar o meio de cultura na produção desta mesma bacteriocina. Neste estudo foram variados os seguintes fatores: concentração de sacarose, de peptona de soja, de extrato de levedura e de alguns sais. Porém, condições de cultivo como temperatura e pH não foram estudadas. Mais recentemente, Leal-Sánchez et al. (2002) otimizaram a produção de bacteriocina por *Lactobacillus plantarum* utilizando a MSR, variando as concentrações de glicose e NaCl no meio, o tamanho do inóculo, a aeração e a temperatura de crescimento.

Geralmente, os estudos de produção de bacteriocinas são realizados em meios de cultura comerciais o que implica em elevados custos.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Equipamentos**

Foram utilizados os seguintes equipamentos: 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 Prosdócimo R26; freezer vertical, marca Consul, 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 infravermelho, marca Perkin Elmer, modelo SpectrumOne; agitador de tubos “vortex”, 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

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: ágar-ágar (Merck); caldo de cérebro e coração (Merck); ágar nutriente (BBL Becton Dickinson); caldo Mueller Hinton (Oxoid); ágar triptona de soja (Mast Dagnostics); 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 triplice (Biobrás); ágar MacConkey (Oxoid). Os resíduos e sub-produtos agroindustriais utilizados como meio foram: soro de queijo em pó (Parmalat), penas de frango (Avipal S.A.), farinha de pena (Bunge Alimentos S.A.), resíduo industrial fibroso de soja (Bunge Alimentos S.A.), bagaço de uva (vinícola Valmarino, Bento Gonçalves, RS), farinha de peixe (Indústria localizada em Rio Grande, RS).

### 3.3 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: acetona (Nuclear), metanol (Merck); etanol (Merck); 2-propanol (Merck); butanol (Merck); dimetil-sulfóxido (Merck); tolueno (Vetec); xileno (Merck); clorofórmio (Merck); n-hexano (Merck); ciclo-hexano (Riedel-deHaën); querosene, óleo mineral;  $\beta$ -mercaptoetanol (Riedel de Haën); N,N'-metilendiacrilamida (Merck); N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED - Riedel de Haën); Tween 20 (Reagen); Tween 80 (Nuclear); Triton X100 (Sigma); deoxicalato de sódio (Merck); Dodecil Sulfato de Sódio (Nuclear); ácido clorídrico (Merck); ácido tricloroacético (Nuclear); ácido etilendiaminotetracético dissódico (EDTA - Riedel de Haën); sulfato de amônio (Nuclear); fosfato de sódio

(Merck), hidróxido de sódio (Nuclear), iodeto de potássio (Nuclear); citrato tri-sódico (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), fucsina (Inlab); cristal violeta (Inlab), verde de malaquita (Nuclear); safranina T (Riedel de Haën); Sephadex G100 (Pharmacia); CM-Sephadex (Pharmacia); papaína solúvel (Merck); tripsina de pâncreas suino tipo II (Sigma); pronase E (Sigma); proteinase K (GibcoBRL); azocaseína (Sigma).

### **3.4 Microrganismo produtor**

Foi utilizado como microrganismo produtor de atividade antimicrobiana uma bactéria codificada como P40 isolada de intestino do peixe Piau-com-pinta (família Anostomidae, gênero *Leporinus*) 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 uma cultura produtora de substâncias antimicrobianas. Este isolado foi gentilmente cedido pelo Prof. Spartaco Astolfi Filho da Universidade Federal do Amazonas (UFA).

#### **3.4.1 Caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica**

Foram realizados diversos testes bioquímicos e análises morfológicas para caracterização da cultura, segundo Sneath et al. (1986). Após elucidação de gênero foi utilizado o sistema API 50 CHB e o software APILAB Plus (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, França) para determinação da espécie.

### 3.5 Microrganismos indicadores

Como culturas indicadoras para os testes de sensibilidade das substâncias antimicrobianas foram utilizados microrganismos patogênicos para humanos e animais, fitopatógenos, microrganismos deteriorantes de alimentos, entre outros. Os microrganismos utilizados foram: *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966; *Aeromonas* sp. (isolado clínico, PetLab – Laboratório Veterinário de Análises Clínicas, Porto Alegre); *Actinomyces* sp. (isolado clínico, PetLab); *Bacillus cereus* ATCC 14579; *Bacillus cereus* (alimento, LARA); *Bacillus cereus* 8AI (isolado do solo, ICTA); *Bacillus licheniformis* P34 (isolado de peixe, UFA); *Bacillus subtilis* (alimento, ICBS); *Bacillus subtilis* P6 (isolado de peixe, UFA); *Brevibacterium linens* ATCC 19394; *Brevibacterium linens* ATCC 9175; *Corynebacterium fimi* NCTC 7547; *Chryseobacterium* sp. KR6 (isolado de penas de frango, ICTA); *Enterobacter aerogenes* (alimento, LARA); *Enterococcus faecalis* (alimento, ICTA); *Erwinia carotorovora* subsp. *atroseptica* 132 (alimento, Departamento de Fitossanidade da UFRGS); *Erwinia carotorovora* subsp. *atroseptica* 365 (alimento, Departamento de Fitossanidade da UFRGS); *Erwinia carotorovora* subsp. *atroseptica* 416 (alimentos, Departamento de Fitossanidade da UFRGS); *Erwinia carotorovora* subsp. *carotorovora* 325 (alimento, Departamento de Fitossanidade da UFRGS); *Escherichia coli* ATCC 25922; *Escherichia coli* 1 (alimento, LACEN); *Escherichia coli* 2 (isolado clínico - urina, PetLab); *Escherichia coli* 3 (isolado clínico - fezes, PetLab); *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; *Listeria innocua* (alimento, LARA); *Listeria monocytogenes* ATCC 7644; *Microbacterium* sp. KR10 (isolado de penas de frango, ICTA); *Paenibacillus polymyxa* P45II (isolado de peixe, UFA); *Pasteurella haemolytica* (isolado clínico, PetLab); *Pseudomonas*

*aeruginosa* (isolado clínico, HCPA), *Pseudomonas* sp. 1 (isolado clínico, HCPA), *Pseudomonas* sp. 2 (isolado clínico, PetLab); *Pseudomonas* sp. 3 multi-resistente (isolado clínico, PetLab); *Rhodococcus* sp. (isolado clínico, PetLab); *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076; *Salmonella* Enteritidis (alimento, LACEN); *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus aureus* (alimento, LACEN); *Staphylococcus aureus* 4059 (isolado clínico, PetLab); *Staphylococcus aureus* 5089 (isolado clínico, PetLab); *Streptococcus* sp. 1  $\beta$ -hemolítico (isolado clínico, PetLab); *Streptococcus* sp. 2 (isolado clínico – sinusite, PetLab); *Streptococcus* sp. 3 (isolado clínico – urina, PetLab); *Xanthomonas campestris* ATCC 13951. Foram utilizadas as seguintes leveduras: *Candida kefir*, isolada de uma lagoa de tratamento de efluentes da empresa de processamento de soja Bunge Alimentos S.A.; *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, proveniente do *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (Holanda) e fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia do ICTA e *Candida* sp. (alimento, ICTA).

### **3.6 Manutenção dos microrganismos**

Os microrganismos utilizados neste trabalho com os meios utilizados e as temperaturas ótimas de crescimento estão relacionados na Tabela 1. Os microrganismos foram mantidos congelados a  $-20^{\circ}$  C. Para isto, foram inoculados em tubos de ensaio com seus respectivos meios na forma de caldo e incubados na temperatura ótima de crescimento durante 24-48 horas. Para a cultura produtora foi utilizado o agar de cérebro e coração (BHA) e a temperatura de  $30^{\circ}$

C. Posteriormente foram transferidos para tubos de microcentrífuga 800 $\mu$ L do cultivo e 200 $\mu$ L de glicerol estéril.

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

### **3.7 Determinação do número de células viáveis**

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



**TABELA 1:** Microrganismos indicadores utilizados e condições de crescimento

<b>Culturas indicadoras</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<b>Gram positivas</b>		
<i>Actinomyces</i> sp. (clínico)	MHA	30
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	BHA	37
<i>Bacillus cereus</i> (alimento)	BHA	37
<i>Bacillus cereus</i> 8A1 (solo)	BHA	37
<i>Bacillus licheniformis</i> P34 (peixe)	BHA	37
<i>Bacillus licheniformis</i> P40 (peixe, bactéria produtora)	BHA	37
<i>Bacillus subtilis</i> (alimento)	BHA	37
<i>Bacillus subtilis</i> P6 (peixe)	BHA	37
<i>Brevibacterium linens</i> ATCC 19391	BHA	25
<i>Brevibacterium linens</i> ATCC 9175	BHA	25
<i>Brochotrix termosphaeta</i> ATCC 11105	BHA	37
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	BHA	37
<i>Enterococcus faecalis</i> (alimento)	BHA	37
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	MRSA	30
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	BHA	37
<i>Listeria innocua</i> (alimento)	BHA	37
<i>Microbacterium</i> sp. KR10 (penas)	AL	37
<i>Paenibacillus polymyxa</i> P45II (peixe)	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. 1 (clínico - $\beta$ -hemolítico)	MHA	37
<i>Streptococcus</i> sp. 2 (clínico - sinusite)	MHA	37
<i>Streptococcus</i> sp. 3 (clínico - urina)	MHA	37
<b>Gram negativas</b>		
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	MHA	37
<i>Aeromonas</i> sp. (clínico)	MHA	37
<i>Chryseobacterium</i> sp. KR6 (penas)	AL	30
<i>Enterobacter aerogenes</i> (alimento)	BHA	37
<i>Erwinia carotorovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> 132 (alimento)	BHA	25
<i>Erwinia carotorovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> 365 (alimento)	BHA	25
<i>Erwinia carotorovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> 416 (alimento)	BHA	25
<i>Erwinia carotorovora</i> subsp. <i>carotorovora</i> 325 (alimento)	BHA	25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	BHA	37

**TABELA 1:** Continuação - Microrganismos indicadores utilizados e condições de crescimento

<i>Escherichia coli</i> 1(alimento)	BHA	37
<i>Escherichia coli</i> 2 (clínico - urina)	BHA	37
<i>Escherichia coli</i> 3 (clínico - fezes)	BHA	37
<i>Pasteurella heamolytica</i> (clínico)	MHA	37
<i>Pseudomonas</i> sp. 1 (clínico)	BHA	37
<i>Pseudomonas</i> sp. 2 (clínico)	BHA	37
<i>Pseudomonas</i> sp. 3 (clínico)	BHA	37
<i>Salmonella</i> Enteritidis (alimento)	MHA	37
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	MHA	37
<i>Salmonella gallinarium</i> (clínico)	MHA	37
<i>Xanthomonas campestris</i> ATCC 13951	YMA	30
<b>Leveduras</b>		
<i>Candida Kefyr</i> (efluente)	PA	25
<i>Candida</i> sp. (alimento)	PA	25
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	PA	25

AL, ágar leite; BHA, ágar de cérebro e coração; MHA, ágar Muller Hinton; PA, ágar batata; TSA, ágar triptona de soja; MRSA, ágar Man Rogosa e Sarpe; YMA, ágar de malte e extrato de levedura.

### 3.8 Obtenção do sobrenadante da cultura

#### 3.8.1 Preparação do pré-inóculo

O pré-inóculo foi realizado em frascos de 50 mL contendo 20 mL de caldo de cérebro e coração (BHI) e uma alçada da cultura raspada de placas de ágar cérebro e coração (BHA). A cultura foi incubada por 24 horas em equipamento incubador com agitação (125 rpm) a 30°C.

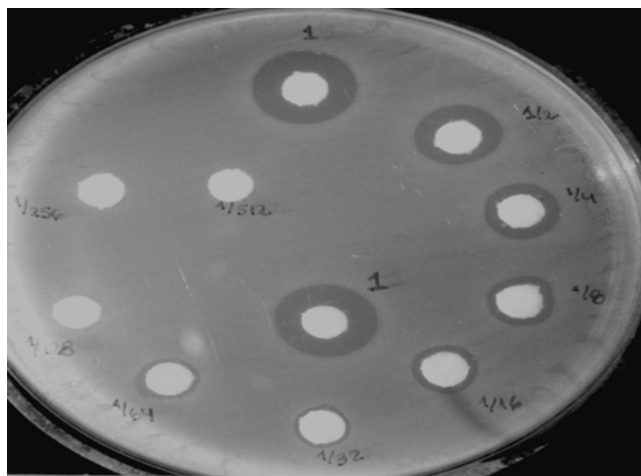
#### 3.8.2 Obtenção do sobrenadante bruto

Uma alíquota de 1 mL do pré-inóculo foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de BHI, incubando-se durante 48 horas

em equipamento incubador com agitação (125 rpm) a 30°C. Posteriormente, centrifugou-se a cultura durante 15 min a 10.000 g. O sobrenadante foi esterilizado por filtração através de filtros de celulose com poros de 0,22 µm (para volumes pequenos) ou mediante filtração a vácuo com filtros de sílica de 0,22 µm (para volumes maiores). 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**

Para determinar o número de unidades arbitrárias por mililitro utilizou-se o método de diluição seriada. Em placas de microtitulação o sobrenadante foi diluído sucessivamente na proporção de 1:1 em PBS (solução fosfato 0,01M e NaCl 0,15M), tendo-se as diluições  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{16}$ ,  $\frac{1}{32}$ , etc. Alíquotas de 20µL destas diluições foram inoculadas em discos e testadas em placas de BHA previamente inoculadas com uma solução fisiológica estéril contendo  $10^8$  células/mL (0,5 na escala de Mac Farland) de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e incubadas a 37° C durante 24 horas. Foi considerado que o disco onde foi colocada a primeira diluição a não apresentar atividade contém 1 UA/mL (Figura 2). Multiplicando-se a recíproca da diluição por 50 foram obtidas as UA/mL.



**FIGURA 2:** Teste de difusão em ágar e determinação das unidades arbitrárias por mL (UA/mL), mostrando os halos de inibição das diluições seriadas (1; 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32; 1/64; etc). ICTA-UFRGS, 2004.

### 3.10 Curva de crescimento e produção

Foi realizada uma curva de crescimento e produção a 30°C em meio líquido (BHI) para avaliar a cinética de produção da substância antimicrobiana.

#### 3.10.1 Preparação do pré-inóculo

A bactéria produtora foi inoculada em frascos de 50 mL contendo 20 mL de BHI 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 BHI, ajustando-se a absorbância a 600 nm em espectrofotômetro até atingir o valor de 0,3. Este valor coincide com um número de unidades formadoras de colônias de

aproximadamente  $10^7$  UFC/mL (previamente determinado através de uma curva padrão relacionando a absorbância da cultura e as UFC/mL).

### 3.10.2 Curva de crescimento

Uma alíquota de 1,0 mL do pré-inóculo foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL de BHI. Este foi considerado o ponto zero da curva. Em intervalos de 4 horas foram realizadas a medida da absorbância a 600 nm, a determinação das UFC/mL e das UA/mL conforme descrito nos itens 3.7 e 3.9 respectivamente. Foi calculada a taxa específica de produção segundo a seguinte equação:

$$Taxa_2 = \frac{(UA/mL)_2 - (UA/mL)_1}{(UFC/mL)_2 - (UFC/mL)_1} \quad (1)$$

Sendo: taxa<sub>2</sub>, a taxa específica de produção no tempo 2; (UA/mL)<sub>2</sub>, a atividade no tempo 2; (UA/mL)<sub>1</sub>, a atividade no tempo 1; (UFC/mL)<sub>2</sub>, o número de células no tempo 2; (UFC/mL)<sub>1</sub>, o número de células no tempo 1.

Foi também acompanhado o pH da cultura com fita universal de pH. O experimento foi realizado em duplicata.

### 3.11 Caracterização inicial do sobrenadante

O sobrenadante bruto da cultura (obtido conforme item 3.8) foi testado quanto à sua estabilidade frente a tratamento térmico, estabilidade frente a variação do pH, ação em diferentes pHs, estabilidade frente a enzimas

proteolíticas, solventes orgânicos e outras substâncias químicas, a fim de avaliar a natureza da substância antimicrobiana produzida por *Bacillus licheniformis* P40.

### **3.11.1 Espectro de ação**

A atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto contra as culturas indicadoras descritas no item 3.5 foi avaliada pelo método de difusão em ágar com discos (Kimura *et al.*, 1998).

Para isto, foram realizadas suspensões das culturas indicadoras em solução fisiológica com  $10^8$  células/mL (0,5 na escala de Mac Farland) e espalhadas com *swab* em placas contendo os meios indicados na tabela 1. Após secagem foram colocados discos de celulose (diâmetro de 6 mm) e inocularam-se neles 20  $\mu$ L do sobrenadante bruto. Após o período de incubação de 24-48h nas condições ótimas das culturas indicadoras, foi observada a formação de halos de inibição ao redor dos discos indicando a presença de substâncias inibidoras (Figura 1). Os halos foram medidos com régua milimetrada. O teste foi realizado em quadruplicata com dois sobrenadantes obtidos em diferentes datas.

### **3.11.2 Estabilidade térmica**

Alíquotas do sobrenadante bruto (600  $\mu$ L) foram incubadas em temperaturas de 10°C (geladeira), 20°C (estufa), 30°C (estufa), 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C (banho Maria) durante 30 min e 121°C (autoclave) durante 15 min. Testou-se a estabilidade a 100° C durante 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Após cada tratamento foi testada a atividade antimicrobiana contra *Listeria*

*monocytogenes* ATCC 7644 conforme descrito no item 3.11.1. Foram realizados controles com o sobrenadante bruto sem tratamento térmico a fim de calcular a atividade antimicrobiana residual em cada caso. Cada experimento foi realizado em duplicata com três sobrenadantes obtidos em datas diferentes. A fórmula utilizada para calcular a atividade residual em porcentagem foi:

$$A.R.(%) = \frac{H_T - 6}{H_C - 6} \times 100 \quad (2)$$

Sendo:  $H_T$  = Halo do sobrenadante após tratamento (mm)

$H_C$  = Halo do controle (mm)

A.R. = Atividade residual

### 3.11.3 Estabilidade frente ao pH e 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 numa concentração de 0,25 M. Posteriormente, avaliou-se a atividade antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 conforme descrito no item 3.11.1 para avaliar a ação nos diferentes pHs. Imediatamente após, as soluções foram neutralizadas, e então foi avaliada novamente a atividade antimicrobiana, a fim de avaliar a estabilidade frente aos diversos pHs. O controle do sobrenadante bruto foi realizado colocando

200  $\mu\text{L}$  de PBS no lugar do tampão. A atividade antimicrobiana residual foi calculada segundo a equação 1. Os testes foram realizados em duplicata com três sobrenadantes obtidos em datas diferentes.

#### **3.11.4 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas**

A resistência às enzimas proteolíticas foi avaliada por incubação do sobrenadante (pH = 7,0) em presença de protease tipo XXV (Pronase E), papaína, proteinase K e tripsina em concentrações finais de 2 e 10 mg/mL durante 60 min a 37°C. Para isto, foram preparadas suspensões enzimáticas de 20 e 100 mg/mL em PBS. Alíquotas de 180  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram incubadas com 20  $\mu\text{L}$  de solução enzimática. Foram feitos controles para as enzimas com 20  $\mu\text{L}$  de solução enzimática e 180  $\mu\text{L}$  de PBS e para o sobrenadante com 180  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e 20  $\mu\text{L}$  de PBS. Em todos os casos, após incubação a 37°C durante 60 min foi avaliada a atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 conforme descrito no item 3.11.1. A atividade antimicrobiana residual foi calculada segundo a equação 1. Os testes foram realizados em duplicata com três sobrenadantes obtidos em datas diferentes.

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

Foi avaliada a estabilidade do sobrenadante frente a diferentes solventes orgânicos. Para isto, colocaram-se alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  com 100  $\mu\text{L}$  de cada solvente orgânico e incubando-se (após homogeneização) durante 2 horas a



37°C. Os solventes utilizados foram: acetona, metanol, etanol, 2-propanol, butanol, dimetil-sulfóxido (DMSO), tolueno, xileno e clorofórmio. Foram realizados controles do sobrenadante e dos solventes tendo-se em conta a miscibilidade ou não entre o solvente e o sobrenadante.

A estabilidade frente a detergentes foi determinada utilizando Tween 20, Tween 80 e Triton X100 numa concentração final de 10% (v/v) e deoxicolato de sódio (concentração final de 1 mg/mL). Alíquotas do sobrenadante foram incubadas com os detergentes durante 60 min a 37°C.

Foi avaliada também a estabilidade frente a tratamento com EDTA (concentração final de 10 mM) e ácido tricloroacético (TCA - concentração final de 100 mg/mL). No caso do TCA, o sobrenadante foi previamente incubado com o ácido por 2 h a 4°C, centrifugado a 10.000 g por 5 min e neutralizado antes de realizar o teste de atividade antimicrobiana.

Em todos os casos a atividade residual foi avaliada contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 conforme descrito no item 3.11.1 e calculada segundo a equação 1. Os testes foram realizados em duplicata com três sobrenadantes obtidos em datas diferentes.

### **3.11.6 Cromatografia de gel filtração**

A fim de estimar o peso molecular da substância com atividade antimicrobiana foi realizada uma 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 e estimar o valor do peso molecular da substância antimicrobiana.

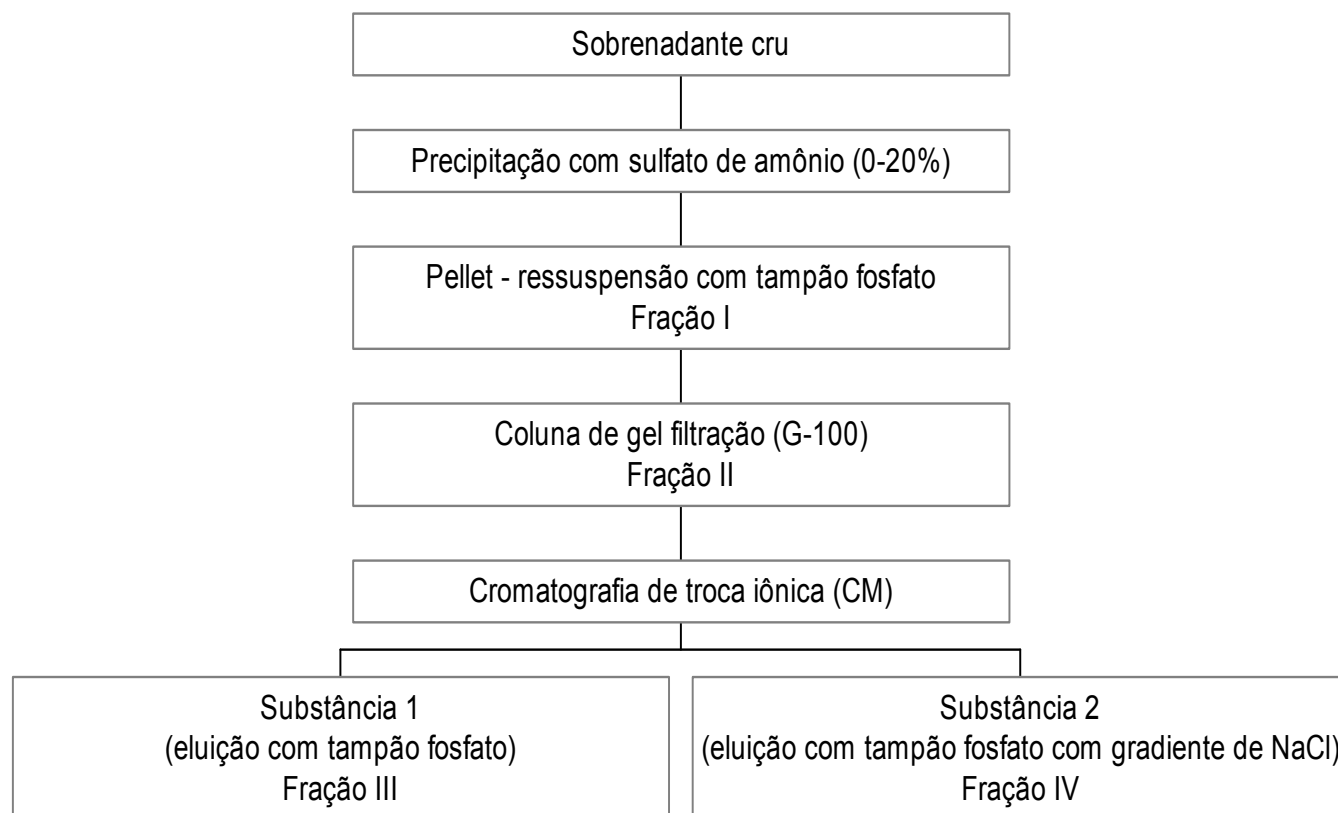
### **3.11.7 Determinação do efeito e modo de ação contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 132**

Este experimento buscou avaliar o efeito e modo de ação (bacteriostático ou bactericida) do sobrenadante bruto sobre uma bactéria indicadora. 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<sup>5</sup> 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* e 200 UA/mL para *Erwinia carotovora*). 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).

Em outro experimento foram adicionados 4 mL do sobrenadante bruto em uma cultura de 4 horas de cada uma das bactérias indicadoras com uma absorbância de aproximadamente 1,0 (a 600 nm). Acompanhou-se o decréscimo da absorbância em alguns intervalos de tempo (após 1, 2, 3 e 4 horas) a fim de determinar se houve lise celular (modo de ação bacteriolítico). Realizou-se um controle colocando BHI no lugar do sobrenadante bruto.

### **3.12 Purificação parcial**

Diversos passos foram executados para purificar parcialmente 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 3.12.7) para poder 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 utilizado

### 3.12.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio

O primeiro passo da purificação foi determinar o melhor intervalo de precipitação com sulfato de amônio através de uma precipitação fracionada. A precipitação foi realizada nos seguintes intervalos: 0-20%; 20-40%; 40-60%; 60-80% e 80-100% de saturação. Para isto, colocaram-se 50 mL de sobrenadante em banho de gelo com agitação magnética e foram adicionados aos poucos a quantidade suficiente de sulfato de amônio para atingir uma concentração de 20 % (Englard & Seiffter, 1990). Após deixar sob agitação durante 15 min, realizou-se a centrifugação (4°C) a 10.000 g durante 10 min. O pellet foi separado do sobrenadante e ressuspendido com 1,0 mL de tampão fosfato 10 mM pH 6,0. O

sobrenadante foi recolocado em banho de gelo e foi adicionada a quantidade suficiente de sulfato de amônio para atingir 40% de saturação (Englard & Seifter, 1990). Repetiu-se a operação anterior e o sobrenadante foi precipitado novamente até 60% de saturação. O mesmo procedimento foi realizado para a precipitação nos intervalos de 80% e 100% de sulfato de amônio. Nas diferentes alíquotas foi quantificada a atividade antimicrobiana em UA/mL (conforme item 3.9) e a proteína solúvel pelo método de Lowry (conforme item 3.12.7). O teste foi realizado três vezes com sobrenadantes obtidos em diferentes datas.

### **3.12.2 Cromatografia de gel filtração (G-100)**

Após determinar o melhor intervalo para precipitação com sulfato de amônio precipitou-se neste intervalo (0-20%) 50 mL do sobrenadante em banho de gelo e agitação magnética. Foi realizada a centrifugação conforme descrito no item anterior. Posteriormente, o pellet foi ressuspendido em 1,5 mL de tampão fosfato 10 mM pH 6,0. Esta foi designada como fração I. Uma alíquota de 1 mL desta foi aplicada numa coluna de gel filtração (0,8 x 30 cm) Sephadex G-100 pré-equilibrada com tampão fosfato 10 mM pH 6,0. O fluxo utilizado foi de aproximadamente 20 mL/h (gravidade simples). Frações de 1 mL foram coletadas em tubos de microcentrífuga e a absorbância a 280 nm foi determinada em espectrofotômetro. Todas as frações foram testadas quanto à atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 conforme item 3.11.1.

### 3.12.3 Cromatografia de troca iônica (CM-sephadex)

As alíquotas com atividade antimicrobiana obtidas no item anterior foram agrupadas e designadas como fração II. Esta foi aplicada numa coluna de troca iônica CM-sephadex (1 x 10 cm) equilibrada com tampão fosfato 10 mM pH 6,0. A coluna foi eluída com este tampão e posteriormente com um gradiente linear de NaCl (de 0 a 1 M). O fluxo utilizado foi de 30 mL/h, controlado através de uma bomba peristáltica. Alíquotas de 2 mL foram coletadas através de um coletor sendo determinada a absorvância a 280 nm e a atividade antimicrobiana de cada alíquota contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 segundo item 3.11.1. Foram obtidas aqui as frações III e IV.

### 3.12.4 Caracterização da fração III

A fração III foi caracterizada realizando-se alguns dos testes descritos no item 3.11 (estabilidade térmica, estabilidade frente a enzimas proteolíticas e TCA e estabilidade e ação em diferentes pHs). Ao serem notadas características de biosurfactante, foi determinado o índice de emulsificação com os seguintes hidrocarbonetos: xileno, tolueno, querosene, óleo de girassol, n-hexano, ciclohexano e óleo mineral. O teste foi realizado conforme Bicca (1998) pela adição de 2 mL da fonte de hidrocarboneto em 2 mL da fração III e agitando em vortex por dois minutos. Depois de 24 horas, o índice de emulsificação em 24 horas ( $E_{24}$ ) foi calculado pela fórmula abaixo:

$$E_{24} = \frac{\text{altura} \cdot \text{da} \cdot \text{camada} \cdot \text{de} \cdot \text{emulsão}}{\text{altura} \cdot \text{da} \cdot \text{camada} \cdot \text{total}} \times 100 \quad (3)$$

Para descartar a hipótese de que esta fração seja uma protease com atividade antimicrobiana foi determinada a atividade proteolítica da fração (conforme item 3.14.2.1) e comparada com os valores para o sobrenadante bruto e para a fração II.

#### **3.12.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida**

A pureza da fração III e o seu peso molecular foram estimados por eletroforese em gel de poliacrilamida, conforme descrito por Bhunia & Johnson (1992), com algumas modificações. Duas alíquotas de 1 mL do sobrenadante bruto e da fração III foram liofilizadas e ressuspendidas em 50 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 10<sup>6</sup> 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  $\beta$ -mercaptoetanol) foi corada com Coomassie blue G250 para observar as bandas de proteína.

#### **3.12.4.2 Espectroscopia de Infra-Vermelho**

A espectroscopia de infra-vermelho foi realizada no Instituto de Química de Pontifícia Universidade Católica (PUC-RS). A fração III foi previamente extraída com 1-butanol na proporção 2:3, sendo o solvente posteriormente evaporado a 30° C. O resíduo foi ressuspenso em água e seco em placa ótica de ZnSe. Em seguida, determinou-se o espectro da amostra em espectrofotômetro de infra-vermelho equipado com módulo de refletância total atenuada (ATR).

#### **3.12.5 Determinação da concentração de proteína solúvel**

Para determinar a concentração de proteína solúvel em cada uma das frações obtidas nas etapas de purificação foi utilizado o método de Lowry et al. (1951) com a utilização do reagente de Folin e Ciocalteu (FC). Foi realizada uma curva padrão com soro albumina bovina (BSA). A absorbância foi medida a 560 nm calculando-se as concentrações de proteína solúvel. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

### **3.13 Aplicação no combate a um fitopatógeno: *Erwinia carotovora***

A fim de determinar a possível utilização das substâncias no combate a uma bactéria fitopatogena, de importância em alimentos, utilizaram-se amostras



de uma etapa intermediária da purificação. Foi utilizada a fração II (contendo ambas substâncias) para avaliar a atividade *in vitro* e *in vivo*. A determinação das concentrações bacteriostática e bactericida mínimas foi realizada com quatro linhagens de *Erwinia carotovora* descritas no item 3.5. Para os demais testes foi utilizada a linhagem de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 132.

### **3.13.1 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) Tabelas M7-T2 (1988), modificado para a utilização de microplacas.

Nesta avaliação, 100  $\mu$ L de uma suspensão contendo  $10^6$  UFC/mL do microrganismo em BHI foram adicionados em 100  $\mu$ 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  $\mu$ L de meio BHI estéril e 100  $\mu$ 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.

### 3.13.2 Determinação da concentração bactericida mínima

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada semeando uma alíquota de 20  $\mu$ L dos poços que não apresentaram crescimento em poços de outra microplaca contendo 100  $\mu$ 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.

### 3.13.3 Curva dose-resposta

Uma suspensão em BHI de *E. carotovora* subsp. *atroseptica* 132 contendo  $10^7$  UFC/mL foi inoculada com diferentes concentrações da fração II (entre 7 UA/mL e 6400 UA/mL concentração final) durante 60 minutos. Foram determinadas em cada caso as UFC/mL finais. O experimento foi realizado em triplicata.

### 3.13.4 Cinética de ação da substância antimicrobiana

Após determinar a dose mínima capaz de eliminar  $10^7$  UFC/mL em 60 minutos, foi determinada a cinética de ação da fração II. Para isto, inoculou-se uma suspensão em BHI contendo  $10^7$  UFC/mL de *E. carotovora* subsp. *atroseptica* 132 com a dose de 6400 UA/mL 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. Foi acompanhada a absorbância a 600 nm em alguns dos pontos. O controle foi realizado colocando

solução fisiológica estéril no lugar da fração II. O experimento foi realizado em duplicata.

### **3.13.5 Proteção de tubérculos de batata in vivo**

A capacidade da fração II de evitar a podridão mole em tubérculos-batata foi realizada conforme descrito por Medina (2002). Foram utilizadas batatas da variedade Mona Lisa adquiridas em mercado local, sendo previamente lavadas e desinfetadas externamente com água sanitária. As batatas foram perfuradas em triplicata com palitos estéreis (2 cm de profundidade) e foram aplicados 10  $\mu$ L da fração II em concentrações de 6400 e 102400 UA/mL. Para obter esta última, a fração II foi liofilizada e ressuspendida em água Milli-Q. Após 30, min 10  $\mu$ L de uma suspensão de *E. carotovora* subsp. *atroseptica* 132, contendo  $10^6$  UFC/mL em solução fisiológica estéril, foi aplicada nos mesmos locais. Controles para a fração II e para a bactéria foram realizados com solução fisiológica.

As batatas foram incubadas em câmara úmida durante 48 horas a 25° C. Posteriormente, foram cortadas na altura das lesões e fotografadas.

## **3.14 Otimização da produção**

### **3.14.1 Avaliação da produção em resíduos e sub-produtos da indústria de alimentos**

Foi avaliada a produção da atividade antimicrobiana em resíduos e sub-produtos agroindustriais: soro de queijo em pó 7%, meio pena 1% (conforme

Anexo I), farinha de pena 1% (conforme Anexo I), farinha de pena 2,5 % hidrolizada (conforme Anexo I), resíduo industrial fibroso de soja (RIFS) 3%, bagaço de uva 3% (conforme Anexo I), farinha de peixe 1%. A concentração dos meios utilizados foi escolhida conforme trabalhos anteriores ou de forma que o meio ficasse com uma consistência adequada. Em todos os meios, o pH foi ajustado previamente a 7,0. O pré-inóculo foi realizado em BHI conforme item 3.10.1. Alíquotas de 1 mL foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio a ser testado. Após incubação sob agitação (125 rpm) durante 48 h o sobrenadante foi obtido centrifugando alíquotas de 1 mL e tratando o sobrenadante em banho-maria a 100° C durante 5 minutos para eliminação das células. Posteriormente foi determinada a atividade antimicrobiana (em UA/mL conforme item 3.9). Os testes foram realizados em duplicata.

### **3.14.2 Maximização da produção em soro de queijo pela Metodologia de Superfície de Resposta**

Após a seleção do meio mais adequado para a produção da atividade antimicrobiana, a próxima etapa foi determinar os níveis ótimos de três variáveis: concentração de soro de queijo, temperatura de cultivo e pH inicial do meio. Estas variáveis foram escolhidas já que estudos afirmam que a temperatura e o pH do meio influenciam fortemente na produção de substâncias antimicrobianas. Para isto foi aplicada a metodologia de superfície de resposta, realizando previamente ensaios através de um experimento fatorial 2<sup>3</sup>. Foi realizado um planejamento em estrela com três pontos centrais (desenho central composto). A tabela 2 apresenta os valores codificados e reais para o experimento e a tabela 3 os 17 ensaios

realizados. Cada ensaio foi realizado em duplicata. O pré-inóculo foi realizado conforme item 3.10.1. Os valores centrais (nível zero) foram escolhidos como sendo: temperatura, 30° C; pH, 7,0 e concentração de soro de queijo, 7%. A codificação dos valores foi realizada através da seguinte equação:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad (4)$$

Onde  $x_i$  é o valor codificado para a variável independente  $i$ ,  $X_i$  o valor real para a variável independente  $i$ ,  $X_0$  o valor real para a variável independente  $i$  no ponto central e  $\Delta X_i$  a mudança no valor. Para a temperatura  $\Delta X_i$  é 7, para o pH inicial é 1 e para a concentração de soro de queijo é 3.

Para um sistema de três fatores a equação do modelo é:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (5)$$

Onde  $Y$  é a resposta predita (produção de atividade antimicrobiana),  $b_0$ , o valor independente;  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$ , os coeficientes lineares;  $b_{11}$ ,  $b_{22}$ ,  $b_{33}$ , os coeficientes quadráticos e  $b_{12}$ ,  $b_{13}$ ,  $b_{23}$ , os coeficientes de interação.

Os resultados foram analisados pelo Módulo de Desenho Experimental do programa Statistic for Windows 5.0 (Statsoft, USA). O modelo permite a avaliação de efeitos lineares, quadráticos e as interações das variáveis independentes. As superfícies tri-dimensionais foram graficadas para ilustrar estes efeitos. Os valores ótimos para as variáveis foram obtidos ao solucionar a equação e também analisando os gráficos mencionados.

Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio incubados durante 24 h na temperatura de cada experimento. Após incubação foi quantificada a atividade antimicrobiana como descrito no item anterior. Foi também determinado o número inicial e final de unidades formadoras de colônias por mL (conforme item 3.7) para avaliar o crescimento bacteriano em cada caso. O pH final da cultura foi determinado com fita universal de pH (Merck). Para verificar se a atividade antimicrobiana estava relacionada à produção de protease foi determinada em cada um dos experimentos a atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato conforme Item 3.14.2.1.

**TABELA 2:** Codificação das variáveis para o planejamento fatorial  $2^3$

Variável independente	Símbolo	Nível				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Temperatura (° C)	$X_1$	18,2	23	30	37	41,8
pH inicial	$X_2$	5,32	6,0	7,0	8,0	8,68
Soro de queijo em pó (%)	$X_3$	1,96	4,0	7,0	10,0	12,04

Foram realizados 17 experimentos (em duplicata) segundo a tabela 4.

**TABELA 3:** Ensaios realizados no experimento fatorial 2<sup>3</sup>

Ensaio	Temperatura	pH inicial	Soro de queijo
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

### 3.14.2.1 Determinação da atividade proteolítica com azocaseína

Como substrato foi utilizada azocaseína (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) suspensa em tampão tris 0,1M, pH 7,0 em concentração de 10 g/L. São colocados 480 mL desta solução com 120 mL da amostra. Colocou-se no banho-maria a 45° C durante 40 min. Posteriormente adiciona-se 600 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% para parar a reação enzimática. Coloca-se na geladeira (4° C) durante 30 min e centrifuga-se a 10.000 g por 10 min. O branco da reação é preparado através da adição de ácido tricloroacético 800 µl do sobrenadante é adicionado à 200 µl de NaOH, 1.8N e realiza-se a leitura da absorbância a 420 nm (visível). O branco da reação é realizado colocando-se o TCA no mesmo momento

da colocação da amostra (tempo zero) realizando os mesmo procedimentos descritos após da adição do mesmo. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade necessária de enzima para aumentar a absorbância em 0,01.

### **3.14.3 Determinação de crescimento e produção nas condições ótimas de temperatura e pH**

Foi realizada uma curva de crescimento bacteriano e produção de atividade antimicrobiana nas condições ótimas de temperatura e pH inicial e no ponto central de concentração de soro de queijo (7%). 100 mL de meio foram colocados em frascos Erlenmeyer de 250 mL e inoculados como descrito no item 3.10.1 em incubadora com agitação (125 rpm). Em intervalos de tempo estabelecidos foram determinadas as UFC/mL conforme item 3.7 e as UA/mL conforme item 3.9.



## 4 RESULTADOS

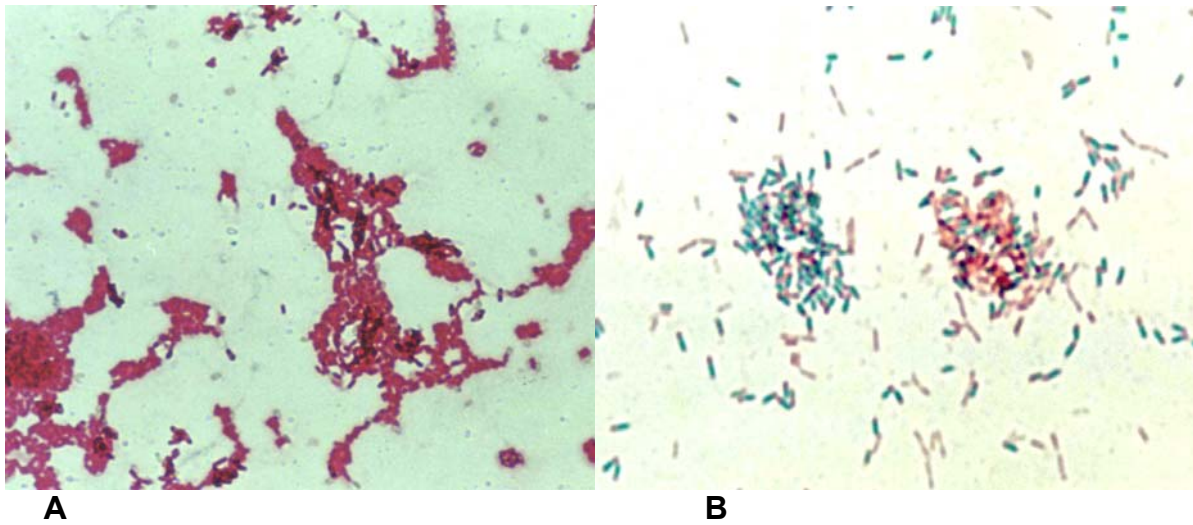
### 4.1 Caracterização da linhagem produtora

A linhagem produtora foi submetida a estudos taxonômicos baseados na morfologia celular, morfologia da colônia, características de crescimento e diversos testes bioquímicos. O isolado apresentou uma morfologia da cultura característica, mostrando colônias amplas, membranosas e irregulares. Em BHA foram observadas vesículas arredondadas. Já em ágar nutriente não foram formadas vesículas, e sim, colônias amplas em forma de “dedos”. As colorações de Gram e esporos mostraram bastonetes com endosporo central (figura 4). A bactéria cresceu aeróbicamente, foi fortemente catalase positiva e apresentou uma coloração de Gram variável, sendo Gram positiva pelo teste de KOH (Tabela 4). Os testes realizados indicaram que a bactéria pertence ao gênero *Bacillus* (Sneath et al., 1986; MacFaddin & Lippincott, 2000).

**TABELA 4:** Resultados dos testes bioquímicos e morfológicos.

<b>TESTE</b>	<b>RESULTADO</b>
<b>Morfológicos</b>	
Coloração de Gram	v
Teste KOH	+
Coloração de esporos	+
Coloração de cápsula	-
<b>Fisiológicos</b>	
Catalase	+
Oxidase	+
Amilase	+
Gelatinase	+
Motilidade	+
Oxidação da glicose	+
Fermentação da glicose	+
Indol	-
Citrato	-
Redução de nitratos	+
Urease	-
Voges-Proskauer	+
Crescimento em NaCl 3 %	+
Crescimento em NaCl 5 %	+
Crescimento em NaCl 7 %	+
TSI	ác/ác sem gás
Fenilalanina	-
Crescimento a 10° C	+
Crescimento a 37° C	+
Crescimento a 55° C	+
DNase	-

v, Variável; +, positivo; -, negativo; ac, ácido



**FIGURA 4:** A) Coloração de Gram e B) coloração de esporos da bactéria produtora. ICTA-UFRGS, 2004.

A tabela 5 mostra os resultados obtidos através do sistema API 50 CHB. Estes resultados foram analisados com o software APILAB Plus obtendo-se 99,5% de identificação com a espécie *Bacillus licheniformis*.

**TABELA 5:** Resultados dos testes bioquímicos obtidos através do sistema API 50

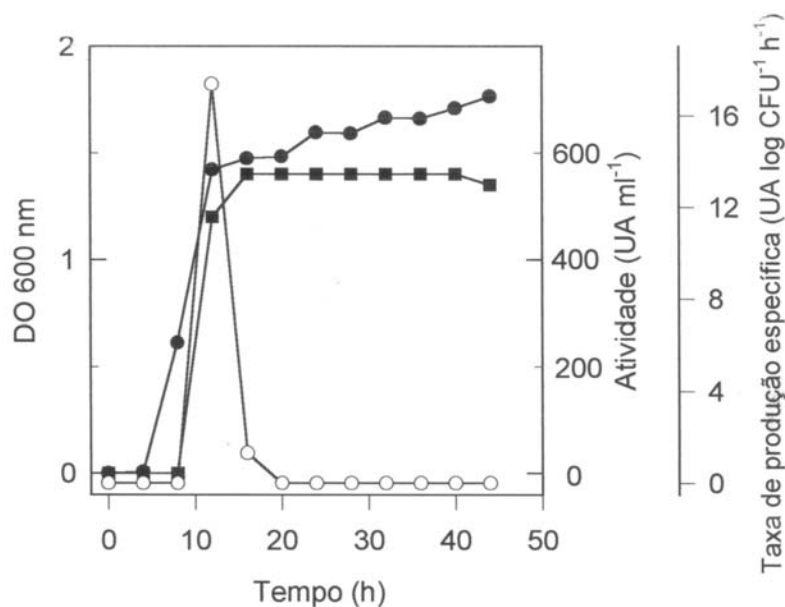
Nº	Teste	Resultado	Nº	Teste	Resultado
0	Controle	-	25	Esculina	+
1	Glicerol	+	26	Salicina	D
2	Eritritol	-	27	Cellobiose	+
3	D-Arabinose	-	28	Maltose	+
4	L-Arabinose	+	29	Lactose	+
5	Ribose	+	30	Melobiose	-
6	D-Xilose	+	31	Sacarose	+
7	L-Xilose	-	32	Trealose	+
8	Adonitol	-	33	Inulina	-
9	B Metil-xilosídio	-	34	Melezitose	-
10	Galactose	+	35	D-Rafinose	+
11	D-Glicose	+	36	Amido	D
12	D-Frutose	+	37	Glicogeno	-
13	D-Manose	+	38	Xilitol	-
14	L-Sorbose	-	39	B Gentiobiose	-
15	Ramnose	-	40	D-Turanose	-
16	Dulcitol	-	41	D-Lixose	-
17	Inositol	+	42	D-Tagatose	-
18	Manitol	+	43	D-Fucose	-
19	Sorbitol	+	44	L-Fucose	-
20	A Metil-D-manosídio	-	45	D-Arabitól	-
21	A Metil-D-glicosídio	+	46	L-Arabitól	-
22	N Acetil glicosamina	-	47	Gluconato	-
23	Amigdalina	D	48	2 ceto-gluconato	-
24	Arbutina	D	49	5 ceto-gluconato	-

+, positivo (cor amarela); -, negativo (cor vermelha); D, duvidoso (cor laranja)

#### 4.2 Curva de crescimento e produção

A bactéria produtora foi incubada aerobicamente em BHI a 30° C sob agitação. O crescimento bacteriano alcançou a fase estacionária após 12 h de cultivo e a máxima atividade antimicrobiana foi observada a partir das 15 h (Figura 6). Foi observado que o pH manteve-se aproximadamente constante durante o experimento e igual a 7,0-7,5. Foi observado também, um pico na taxa específica

de produção (calculada segundo equação 1) às 12 h de cultivo, coincidindo com o final da fase exponencial de crescimento (Figura 5).



**FIGURA 5:** Curva de crescimento e produção de atividade antimicrobiana por *B. licheniformis* P40. A densidade ótica (●), e a atividade antimicrobiana (■) foram monitorados e a taxa de produção específica (o) calculada nos tempos indicados. ICTA-UFRGS, 2004.

### 4.3 Caracterização inicial do sobrenadante bruto

#### 4.3.1 Espectro de ação

O sobrenadante bruto da cultura de *Bacillus licheniformis* P40 foi testado para a presença de atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. A tabela 6 mostra os halos de inibição obtidos ao serem aplicados 20  $\mu$ L do sobrenadante sobre

discos de celulose (diâmetro de 6 mm) em placa previamente inoculada com o microrganismo indicador. Foi observada atividade inibitória contra diversas bactérias incluindo importantes patógenos e deteriorantes como *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. carotovora* e isolados clínicos de *Streptococcus* sp.

#### **4.3.2 Estabilidade térmica**

O sobrenadante bruto foi incubado durante 30 min em diferentes temperaturas e a sua atividade residual foi determinada. Mostrou-se estável a todas as temperaturas testadas, mantendo pelo menos 80% da sua atividade (Figura 6). A atividade também foi mantida ao ser incubado a 100° C por até 10 min, perdendo parcialmente a sua atividade em intervalos de tempo maiores (Figura 7). A atividade foi perdida totalmente após autoclavagem (121° C / 15 min) e ao ser estocado em geladeira por um período de 10 dias (Tabela 7).

**TABELA 6:** Espectro de ação do sobrenadante bruto

<b>Microrganismo indicador</b>	<b>Halo de inibição (mm)<sup>†</sup></b>
<b>Gram positivas</b>	
<i>Actinomyces</i> sp. (clínico)	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	11
<i>Bacillus cereus</i> (alimento)	10*
<i>Bacillus cereus</i> 8A1 (solo)	8,5
<i>Bacillus licheniformis</i> P34 (peixe)	8
<i>Bacillus licheniformis</i> P40 (peixe – bactéria produtora)	7
<i>Bacillus subtilis</i> (alimento)	10*
<i>Bacillus subtilis</i> P6 (peixe)	7,5
<i>Brevibacterium linens</i> ATCC 19391	11,5
<i>Brevibacterium linens</i> ATCC 9175	9
<i>Brochothrix thermosphacta</i> ATCC 11509	-
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7545	12
<i>Enterococcus faecalis</i> (alimento)	8
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	11*
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	12
<i>Listeria innocua</i> (alimento)	11
<i>Microbacterium</i> sp. KR10 (penas)	10
<i>Paenibacillus polymyxa</i> P45II (peixe)	9
<i>Rhodococcus</i> sp. (clínico)	15
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (alimento)	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 4059 (clínico)	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 5089 (clínico)	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (clínico)	-
<i>Staphylococcus intermedius</i> (clínico)	7
<i>Streptococcus</i> sp. (clínico - β-hemolítico)	11
<i>Streptococcus</i> sp. 1 (clínico – sinusite)	13
<i>Streptococcus</i> sp. 2 (clínico – urina)	11
<b>Gram negativas</b>	
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	9
<i>Aeromonas</i> sp. (clínico)	10
<i>Chryseobacterium</i> sp. KR6 (penas)	14
<i>Enterobacter aerogenes</i> (alimento)	15
<i>Erwinia carotorovora</i> subsp. <i>atroséptica</i> 132 (alimento)	15
<i>Erwinia carotorovora</i> subsp. <i>atroséptica</i> 365 (alimento)	11
<i>Erwinia carotorovora</i> subsp. <i>atroséptica</i> 416 (alimento)	8
<i>Erwinia carotorovora</i> subsp. <i>carotorova</i> 325 (alimento)	11
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-

**TABELA 6:** Continuação - Espectro de ação do sobrenadante bruto

<i>Escherichia coli</i> (alimento)	-
<i>Escherichia coli</i> (urina)	-
<i>Escherichia coli</i> (fezes)	-
<i>Pasteurella haemolytica</i> (clínico)	12
<i>Pseudomonas</i> sp. 1 (clínico)	-
<i>Pseudomonas</i> sp. 2 (clínico)	-
<i>Pseudomonas</i> sp. 3 (clínico)	-
<i>Salmonella</i> Enteretidis ATCC 13076	-
<i>Salmonella</i> Enteretidis (alimento)	-
<i>Salmonella gallinarium</i> (clínico)	9
<i>Xanthomonas campestris</i> ATCC 13951	12,5
<b>Leveduras</b>	
<i>Candida kefyr</i> (efluente)	-
<i>Candida</i> sp. (alimento)	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	10

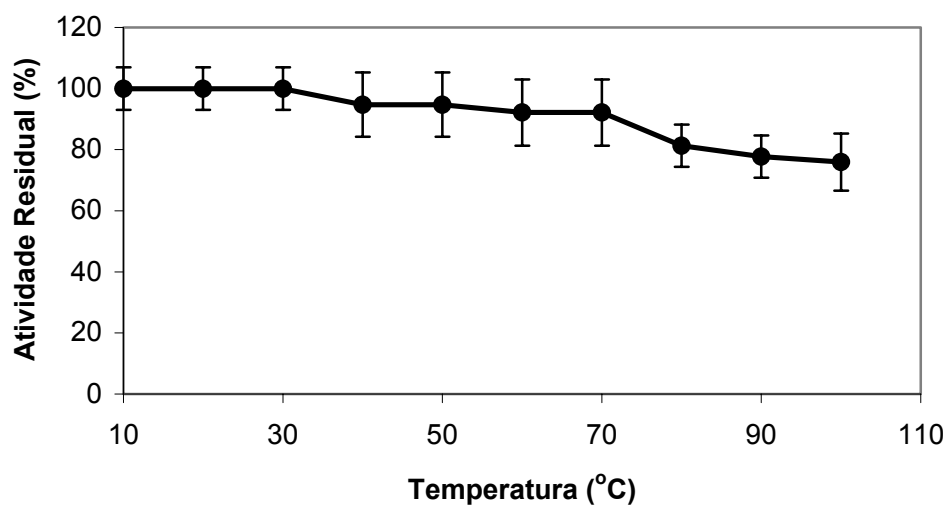
† Diâmetro ao redor do disco; \* Halos com inibição parcial; - sem inibição

**TABELA 7:** Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto.

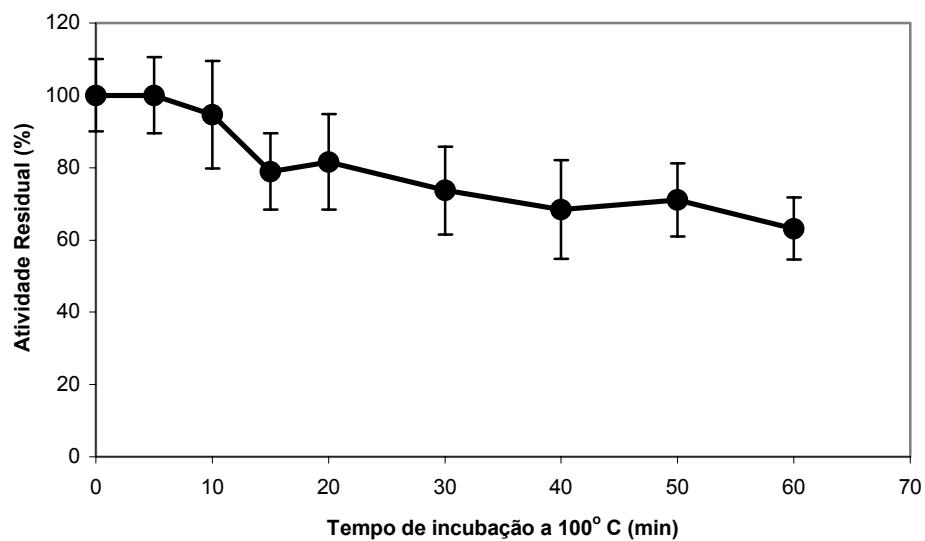
Tratamento	Atividade residual (%)*
40°C / 30 min	95 ± 11
60°C / 30 min	92 ± 11
80°C / 30 min	81 ± 7
100°C / 30 min	76 ± 9
121°C / 103,5 kPa / 15min	0
4°C / 10 d	0
-20°C / 15 d	100 ± 20
Liofilização	100 ± 20

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





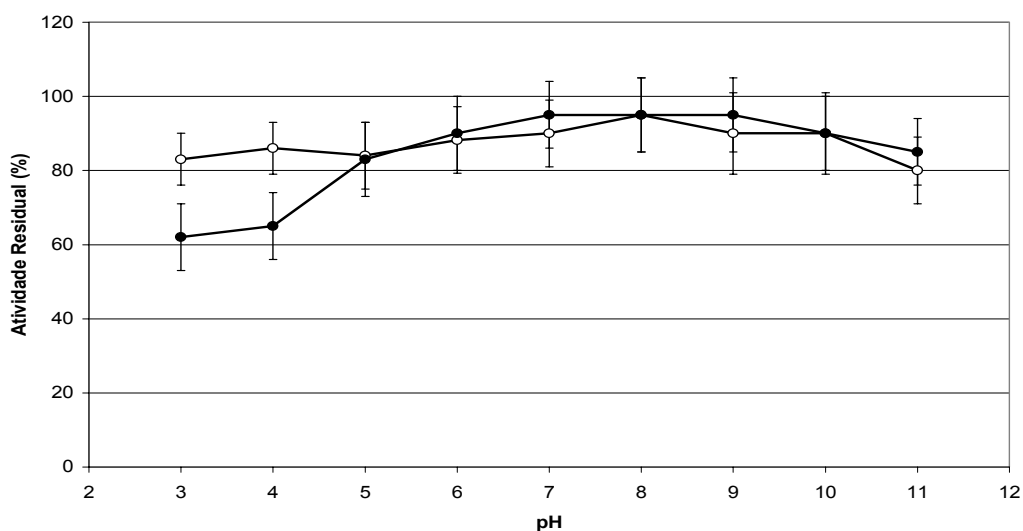
**FIGURA 6:** Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto após incubação em diferentes temperaturas durante 30 min. ICTA-UFRGS, 2004.



**FIGURA 7:** Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana a 100° C durante diferentes intervalos de tempo. ICTA-UFRGS, 2004.

### 4.3.3 Estabilidade e ação 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 8. O sobrenadante mostrou-se estável em todos os pHs testados, mantendo pelo menos 80% da sua atividade. O sobrenadante mostrou aproximadamente a mesma atividade em pHs entre 5 e 10 (80 a 100%), sendo de aproximadamente 60 % em pHs 3 e 4.



**FIGURA 8:** Influência do pH na atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto. Estabilidade frente a diversos pHs (○) e ação em diferentes pHs (●). ICTA-UFRGS, 2004

### 4.3.4 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas

Para testar o efeito de enzimas proteolíticas o sobrenadante bruto (pH 7,0) foi tratado com papaína, pronase E, proteinase K e tripsina, sendo determinada a atividade residual. A tabela 8 mostra os resultados, onde pode-se observar que o sobrenadante manteve praticamente toda a sua atividade ao ser tratado com uma

concentração final de 2 mg/mL de enzima. Ao ser tratado com uma concentração maior (10 mg / mL) só foi sensível a ação da pronase E.

**TABELA 8:** Atividade residual do sobrenadante bruto após tratamento com enzimas proteolíticas.

<b>Enzima</b>	<b>Concentração final (mg/mL)</b>	<b>Atividade residual (%)</b>
Pronase E	2	86 ± 15
	10	24 ± 10
Proteinase K	2	98 ± 6
	10	105 ± 10
Tripsina	2	95 ± 9
	10	89 ± 12
Papaína	2	97 ± 9
	10	96 ± 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**

Foi avaliado o efeito de diferentes substâncias químicas no sobrenadante bruto. Este perdeu totalmente a sua atividade antimicrobiana ao ser tratado com ácido tricloroacético. Quando tratado com solventes orgânicos e outras substâncias, a atividade só foi afetada com o 1-butanol (Tabela 9).

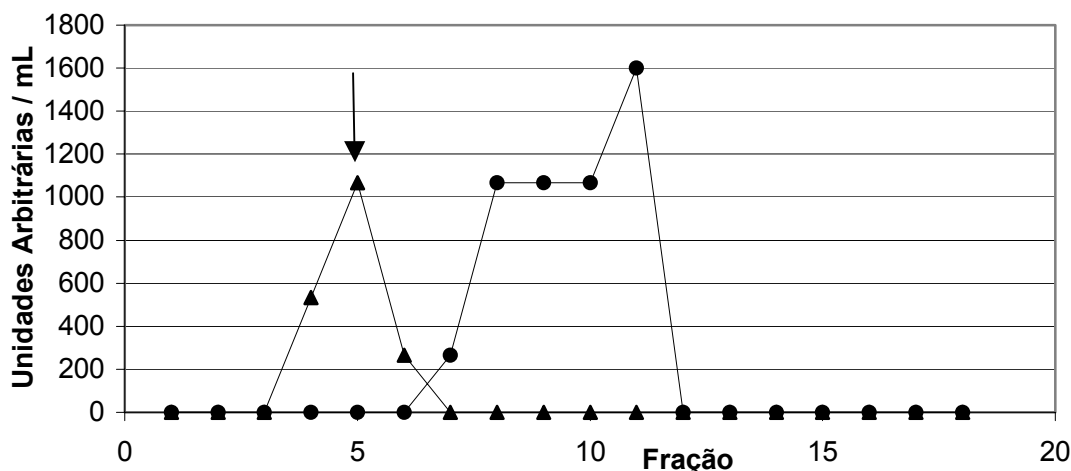
**TABELA 9:** Efeito de diferentes substâncias químicas na atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto

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)	100
EDTA	10 mM	100
Ácido tricloroacético	100 mg/mL	0
Deoxicalato de sódio	1 mg/mL	100
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

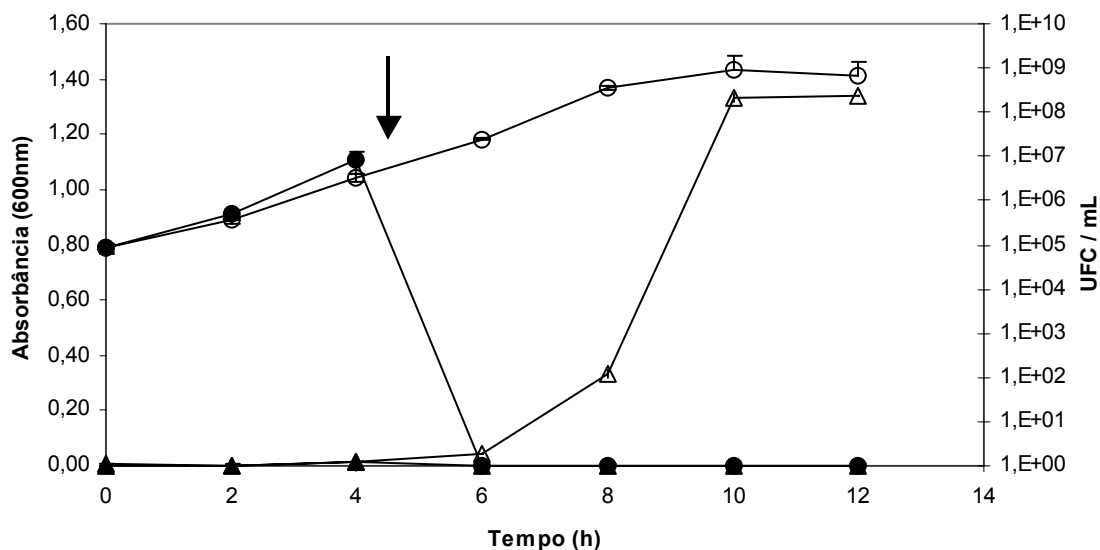
O sobrenadante bruto foi analisado por cromatografia de gel filtração em coluna de Sephadex G-100. A atividade antimicrobiana foi eluída no volume morto da coluna (previamente determinado), sugerindo um peso molecular maior que 150 kDa. Quando a eluição foi realizada com tampão com alta força iônica (1,5 M NaCl), a atividade antimicrobiana foi detectada dentro do volume de resolução da coluna (Figura 9). Isto sugere que a substância forma aglomerados, que são separados através de uma solução salina concentrada. Além disso, a comparação do perfil de eluição da substância com o do inibidor de tripsina (peso molecular conhecido) sugere um peso molecular para a substância antimicrobiana inferior a 20 kDa (resultado não mostrado).



**FIGURA 9:** Perfis de eluição da atividade antimicrobiana durante cromatografia de gel filtração. O sobrenadante bruto foi aplicado em coluna de Sephadex G-100 e eluído com tampão fosfato 10 mM (▲) ou tampão fosfato 10 mM contendo 1,5 M de NaCl (●). O volume morto da coluna é indicado com uma seta ( $V_0$ ). ICTA-UFRGS, 2004.

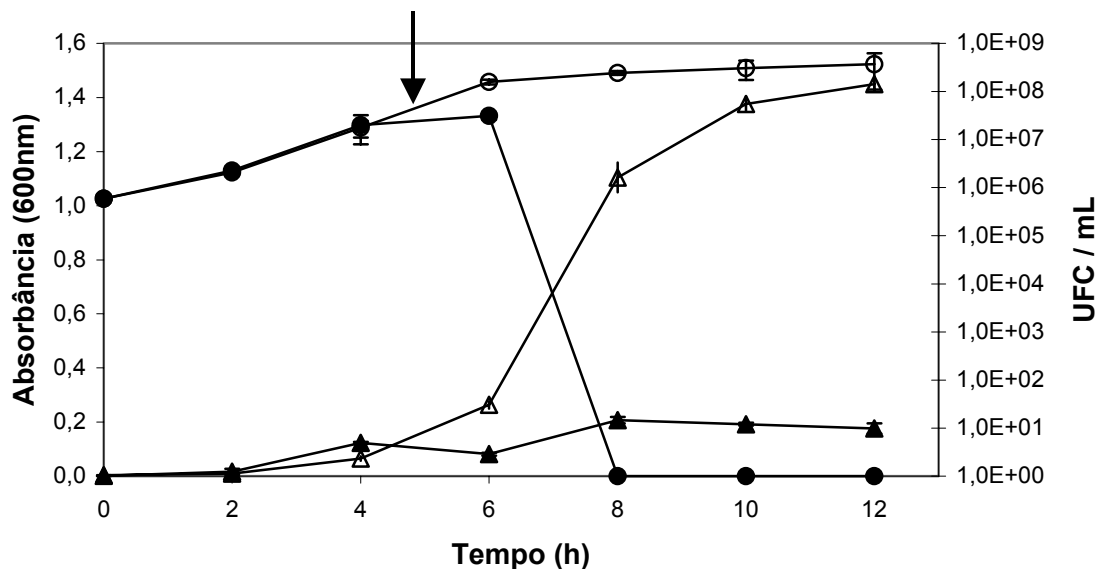
#### 4.3.7 Determinação do efeito contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Erwinia corotovora atroseptica* 132

A figura 10 mostra o efeito do sobrenadante bruto contra a cultura de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 na fase inicial de crescimento exponencial. Pode-se observar que 1:30 horas após a aplicação do sobrenadante bruto todas as células da bactéria indicadora foram mortas. O efeito bacteriolítico foi verificado em outro experimento, ao adicionar 100 UA/mL (concentração final) em uma cultura de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 obtendo-se uma absorbância inicial (600nm) de aproximadamente 1,0. Após 1 hora constatou-se a diminuição da absorbância para aproximadamente 0,05 (resultado não mostrado).



**FIGURA 10:** 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 ( $\Delta$ ) e do tratado ( $\blacktriangle$ ) e as UFC / mL do controle (o) e do tratado ( $\bullet$ ). ICTA-UFRGS, 2004.

A figura 11 mostra o efeito do sobrenadante bruto contra uma cultura de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 132 na fase inicial de crescimento exponencial. Pode-se observar que após 3:30 horas da aplicação do sobrenadante bruto todas as células da bactéria indicadora foram mortas. O efeito bacteriolítico foi avaliado em outro experimento, ao adicionar 200 UA/mL (concentração final) em uma cultura da mesma bactéria obtendo-se uma absorbância inicial (600nm) de aproximadamente 1,0. Não foi verificado efeito bacteriolítico ao acompanhar a absorbância da cultura por até 4 horas de ação, já que a absorbância manteve-se constante (resultado não mostrado).



**FIGURA 11:** Efeito do sobrenadante bruto contra *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 132. Após 4:30 min (indicado com uma seta) foi adicionado o sobrenadante com uma concentração final de 200 UA/mL. Foi acompanhada a absorbância a 600 nm do controle ( $\Delta$ ) e do tratado ( $\blacktriangle$ ) e as UFC/mL do controle ( $\circ$ ) e do tratado ( $\bullet$ ). ICTA-UFRGS, 2004.

#### 4.4 Purificação parcial das substâncias antimicrobianas

##### 4.4.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio

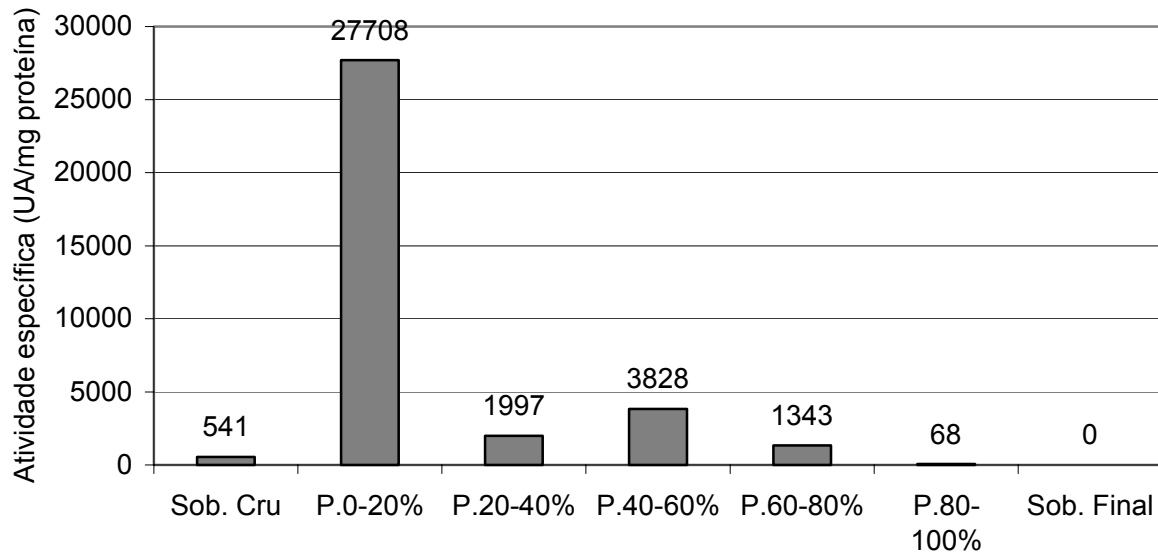
A precipitação fracionada com sulfato de amônio foi realizada com três sobrenadantes obtidos em diferentes datas. A tabela 10 mostra os resultados obtidos para um destes sobrenadantes (os resultados para os outros dois foram similares). A Figura 12 mostra o perfil de precipitação fracionada para este caso. Pode-se observar que o precipitado obtido com 20% de saturação de sulfato de amônio apresenta a maior atividade específica (27.708 UA/mg de proteína). Este valor é 7 vezes maior do que o precipitado obtido com 40-60% de sulfato de

amônio, e 50 vezes maior do que a atividade específica do sobrenadante bruto. O rendimento para o precipitado é de aproximadamente 64%.

**TABELA 10:** Tabela de purificação para os diferentes precipitados obtidos na precipitação fracionada com sulfato de amônio.

Fração	A (UA/mL)	Vol (mL)	AT (UA)	Prot (mg/mL)	Prot. T (mg)	A.E.	F.P.	Y (%)
Sob.cru	3200	50	160000	5,910	295,5	541	1,0	100
P. 0-20%	102400	1	102400	3,696	3,696	27708	51,2	64
P. 20-40%	3200	1	3200	1,602	1,602	1997	3,7	2
P. 40-60%	12800	1	12800	3,344	3,344	3828	7,1	8
P. 60-80%	6400	1	6400	4,767	4,767	1343	2,5	4
P. 80-100%	200	1	200	2,926	2,926	68	0,1	0,1
Sob. Final	0	58	0	3,052	177,0	0	0,0	0

P, Precipitado; 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 (%).

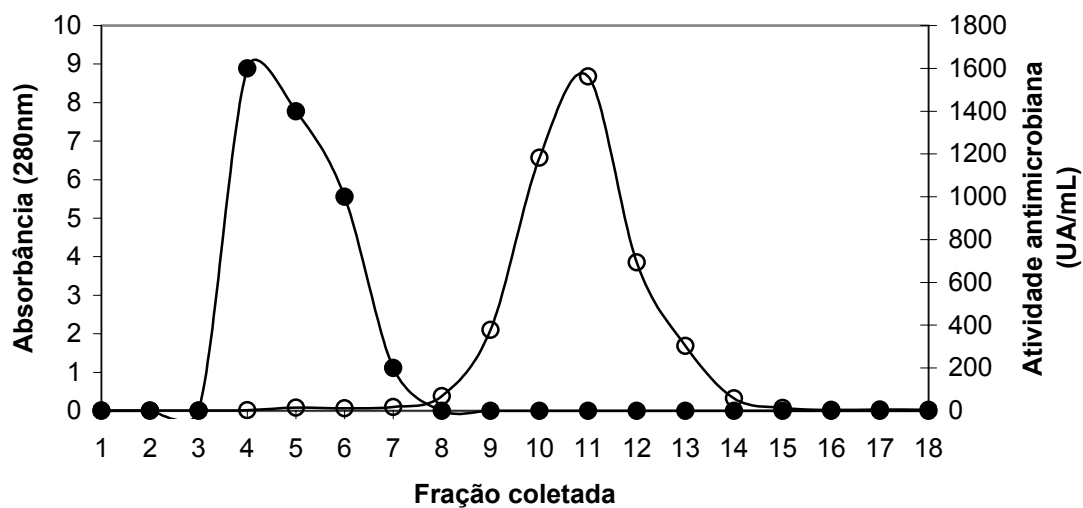


**FIGURA 12:** Resultados da precipitação fracionada com sulfato de amônio mostrando a atividade específica (UA/mg proteína) do sobrenadante bruto (Sob. Cru), de cada precipitado (P) com as diferentes concentrações de sulfato de amônio e do sobrenadante final da precipitação (Sob. Final). ICTA-UFRGS, 2004.

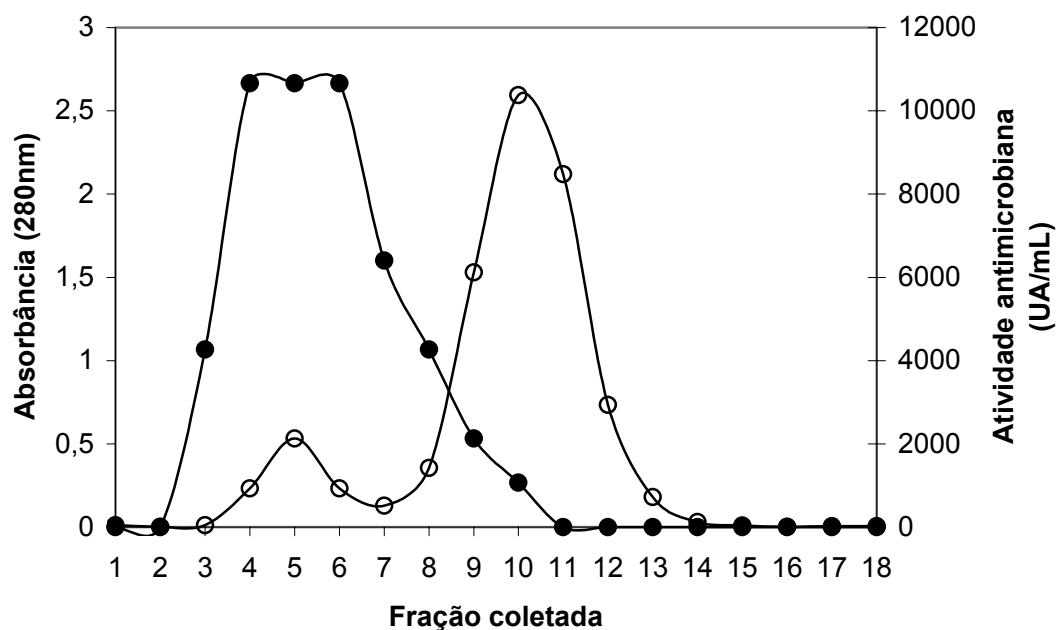


#### **4.4.2 Cromatografia líquida de gel filtração (G-100)**

Os resultados do item anterior mostraram que o melhor intervalo de precipitação com sulfato de amônio é de 0-20% de saturação. Portanto, este intervalo foi escolhido para continuar o processo de purificação. O passo seguinte foi a 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. Para comparar o perfil obtido do precipitado com o perfil obtido com o sobrenadante bruto nesta coluna foi aplicada uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante bruto nas mesmas condições. Os resultados são mostrados nas Figuras 13 e 14. Pode ser observado que, para o sobrenadante bruto (figura 13) o maior pico de proteína (frações 9, 10, 11 e 12) não coincide com o pico de atividade e sim, com um pequeno pico de proteína (frações 4, 5 e 6). Quando a cromatografia é realizada com o precipitado (0-20%) ressuspendido (figura 14), observa-se que o pico de proteína que coincide com a atividade antimicrobiana aumenta (frações 4, 5 e 6) enquanto que o outro pico de proteína diminui (frações 9, 10, 11 e 12). Este segundo pico é o correspondente às proteínas do meio de cultura (BHI) pois ele também é obtido ao inocular 1,0 mL de BHI na coluna (dados não mostrados).



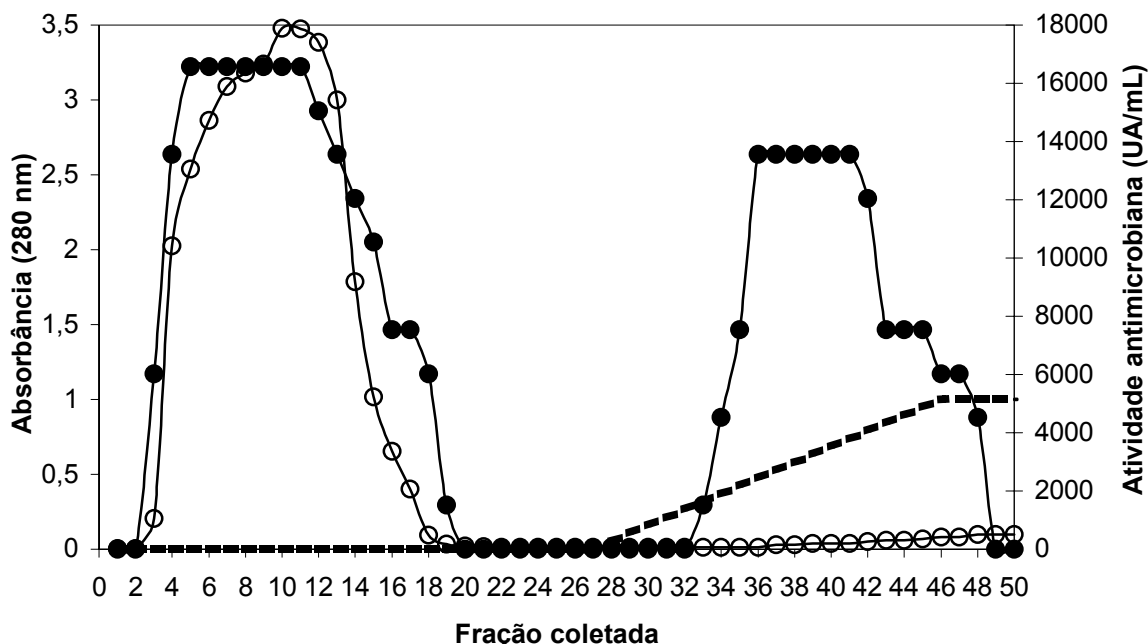
**FIGURA 13:** Perfil de eluição do sobrenadante bruto em coluna de gel filtração G-100. A absorbância a 280 nm (○) e a atividade antimicrobiana em UA/mL (●) foram determinadas para cada fração coletada. ICTA-UFRGS, 2004.



**FIGURA 14:** Perfil de eluição do precipitado (0-20%) em coluna de gel filtração G-100. A absorbância a 280 nm (○) e a atividade antimicrobiana em UA/mL (●) foram determinadas para cada fração coletada. ICTA-UFRGS, 2004.

#### **4.4.3 Cromatografia de troca iônica (CM-sephadex)**

A fim de continuar com o processo de purificação foram utilizadas alíquotas de 6 colunas de gel filtração conforme descrito anteriormente. As frações 4, 5, 6 e 7 de cada coluna foram agrupadas e aplicadas numa coluna (1 x 10 cm) de troca iônica (CM-Sephadex) equilibrada com tampão fosfato 10 mM pH 6,0. A amostra foi eluída com o mesmo tampão e posteriormente com um gradiente linear de NaCl de 0 a 1 M. A absorbância a 280 nm e a atividade antimicrobiana (UA/mL) das frações coletadas (2,0 mL) foram determinadas. Os resultados são mostrados na Figura 15. Observa-se que foram obtidos dois picos de atividade antimicrobiana, sendo que o primeiro (designado como fração III) foi eluído com tampão fosfato e coincidiu com o único pico de proteína obtido (absorbância a 280 nm). O segundo pico de atividade, designado como fração IV, não absorveu neste comprimento de onda e apresentou resultado nulo na determinação de proteína pelo método de Lowry, sugerindo que não é de origem protéica.



**FIGURA 15:** Perfil de eluição da Fração II em coluna de troca iônica (CM-Sephadex), com tampão fosfato 10 mM pH 6,0 até a alíquota 27 e gradiente linear de NaCl (0-1M), indicado pela linha tracejada a partir da alíquota 28. A absorbância a 280 nm (○) e a atividade antimicrobiana em UA/mL (●) foram determinadas para cada fração coletada. ICTA-UFRGS, 2004.

A fim de determinar o fator de purificação e o rendimento da fração III foi realizado todo o processo de purificação a partir de um volume de 200 mL de sobrenadante bruto, determinando-se a quantidade de proteína e a atividade antimicrobiana em UA. Os resultados obtidos são mostrados na tabela 11. Este procedimento foi realizado outras vezes com volumes maiores de sobrenadante obtendo-se valores semelhantes para o fator de purificação e o rendimento em cada fração. Observa-se que o valor do fator de purificação diminui um pouco entre a fração I e a II devido a uma perda de atividade no processo. Entre a fração II e a III também é observado este fenômeno, devido em parte à perda de atividade e em parte à separação da fração IV.

**TABELA 11:** Tabela de purificação mostrando as frações obtidas nos diferentes passos da purificação parcial.

Fração	A (UA/mL)	Vol (mL)	AT (UA)	Prot (mg/mL)	Prot. T (mg)	A.E.	F.P.	Y (%)
Sob.bruto	3200	200	640000	3,241	648,246	987,3	1,0	100
Fração I	102400	3,5	358400	3,312	11,590	30922,2	31,3	56
Fração II	26300	12	315600	0,962	11,545	27337,3	27,7	49
Fração III	12800	15	192000	0,579	8,683	22111,9	22,4	30
Fração IV	800	24	19200	0,000	0,000	-	-	3

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 fração IV foi extraída com butanol obtendo-se um sólido branco, designado como fração V e que ao ser ressuspensionado em água Milli-Q manteve a sua atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* ATCC 7644. Porém, a atividade mostrou-se instável, sendo perdida após 24 horas ao ser estocada em geladeira a 4° C. A determinação de proteína pelo método de Lowry foi feita também nesta fração sendo que o resultado foi zero.

#### 4.4.4 Caracterização da fração III

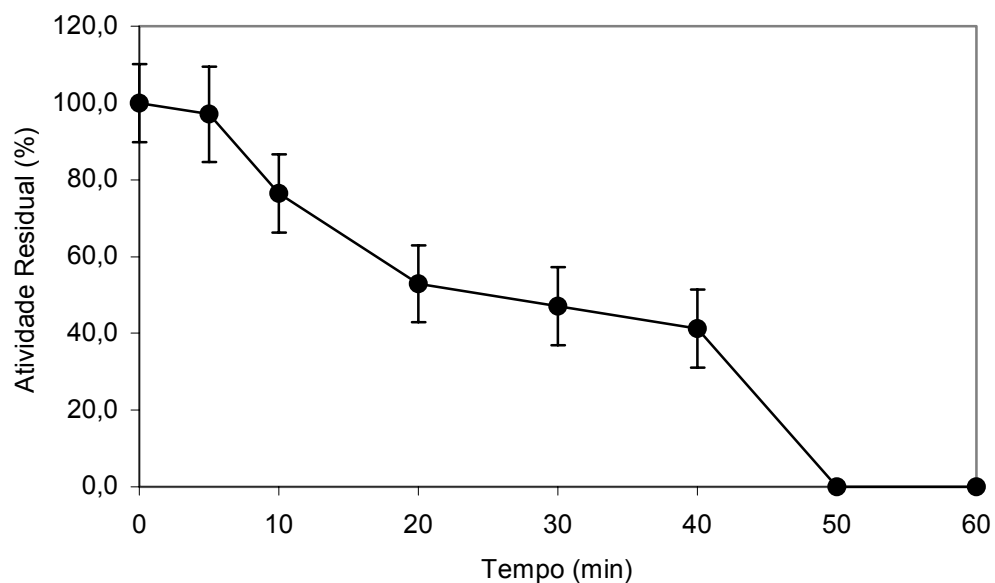
O pico protéico com atividade antimicrobiana obtido durante a cromatografia de troca iônica (fração III) foi testado pelo método de difusão em ágar contra algumas das bactérias para as quais o sobrenadante bruto mostrou atividade. Os resultados são mostrados na tabela 12.

**TABELA 12:** Verificação da ação da fração III contra alguns microrganismos.

<b>Microrganismo indicador</b>	<b>Halo de inibição (mm)<sup>†</sup></b>
<b>Gram positivas</b>	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	9
<i>Bacillus subtilis</i> (alimento)	9*
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	13
<i>Enterococcus faecalis</i> (clínico)	7,5
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	10*
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	11
<i>Listeria innocua</i> (alimento)	10
<i>Rhodococcus</i> sp. (clínico)	15
<i>Streptococcus</i> sp (clínico - β-hemolítico)	10
<i>Staphylococcus intermedius</i> (clínico)	7,5
<b>Gram negativas</b>	
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	9
<i>Aeromonas</i> sp. (clínico)	10
<i>Enterobacter aerogenes</i> (alimento)	13
<i>Erwinia carotorovora</i> subp. <i>atroséptica</i> 132 (alimento)	11
<i>Pasteurella haemolítica</i> (clínico)	11
<i>Salmonella gallinarium</i> (clínico)	9

<sup>†</sup> Halo ao redor do disco, \* inibição parcial

A fração III foi tratada termicamente a 100° C durante 5-60 min (Figura 16) sendo que se mostrou menos resistente ao tratamento térmico do que o sobrenadante bruto. Após 50 min a atividade foi totalmente perdida.



**FIGURA 16:** Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana da fração III a 100° C durante diferentes intervalos de tempo. ICTA-UFRGS, 2004.

Os resultados obtidos da estabilidade frente a enzimas proteolíticas são mostrados na tabela 13. Observa-se que numa concentração final de 10 mg/mL a fração III foi totalmente resistente à proteinase K e papaína, parcialmente à tripsina e sensível à pronase E.

**TABELA 13:** Atividade residual da fração III após tratamento com enzimas proteolíticas.

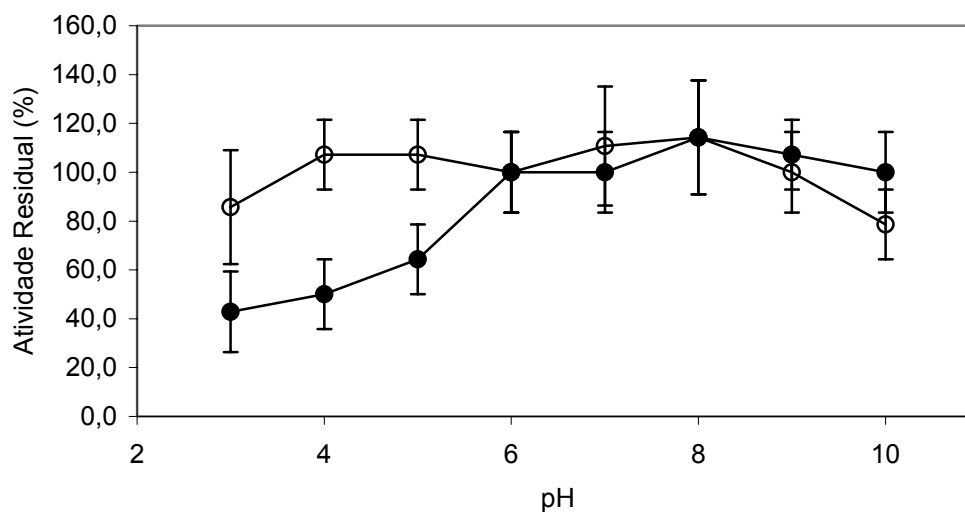
Enzima	Concentração final (mg / mL)	Atividade residual (%)
Pronase E	2	88 ± 10
	5	91 ± 10
	10	0 ± 10
Tripsina	2	94 ± 8
	5	95 ± 17
	10	50 ± 17
Papaína	2	95 ± 8
	5	97 ± 11
	10	89 ± 9
Proteinase K	2	88 ± 14
	5	95 ± 9
	10	91 ± 15

Testes realizados em pH 6,0 para a papaína e pH 8,0 para as demais enzimas. O tempo de incubação foi de 1 h a 37° C. Posteriormente foi avaliada a atividade residual frente a *L. monocytogenes* ATCC 7644.

A fração III foi tratada com ácido tricloroacético perdendo totalmente a sua atividade.

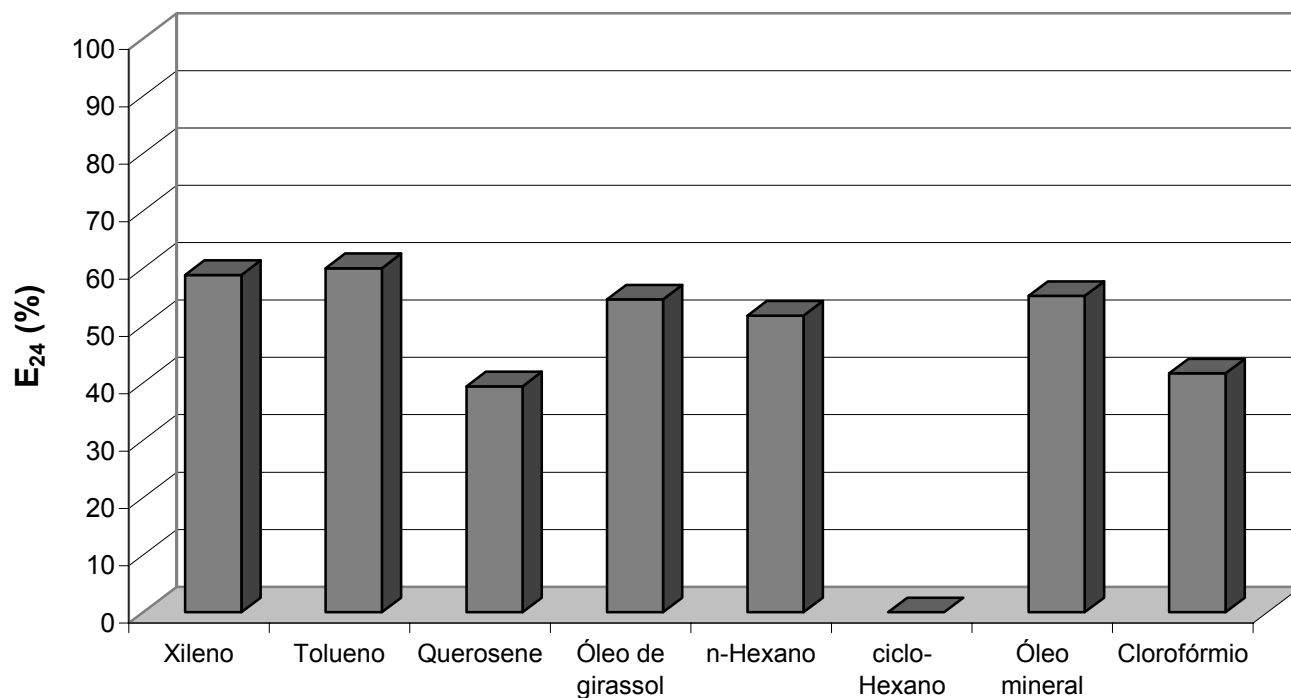
Quando foi avaliada a estabilidade em diferentes pHs mostrou o mesmo perfil que o sobrenadante bruto (mantendo pelo menos 80% da sua atividade em todos os pHs testados). A ação foi maior entre pH 6 e 10 (Figura 17).





**FIGURA 17:** Influência do pH na atividade antimicrobiana da fração III. Estabilidade frente a diversos pHs (○) e ação em diferentes pHs (●).ICTA-UFRGS, 2004.

Além disso, foi avaliada a capacidade emulsificante com diversos hidrocarbonetos através do cálculo do índice de emulsificação (Figura 18). A fração III formou emulsões com quase todos os hidrocarbonetos testados.



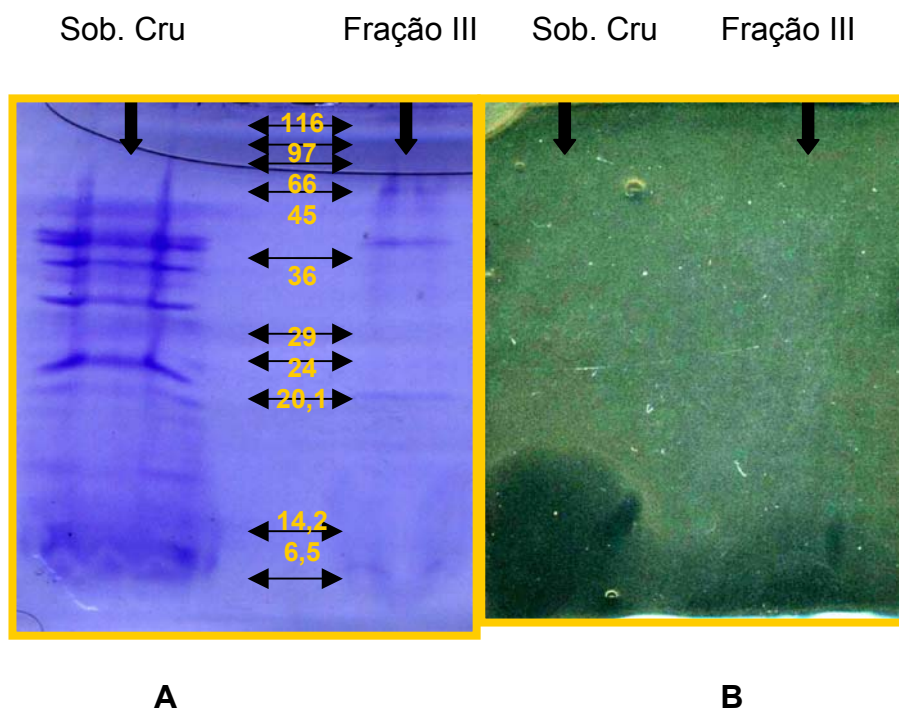
**FIGURA 18:** Índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) da fração III com diversos hidrocarbonetos. ICTA-UFRGS, 2004.

Foi testada a atividade proteolítica com azocaseína das diferentes frações em pH 7,0 e temperatura de incubação de 45° C (conforme item 3.14.2.1). O sobrenadante bruto apresentou um alto valor de atividade proteolítica (1725 U/mL), mas a atividade foi eliminada durante a purificação, sendo de 110 U/mL para a fração II e 5 U/mL para a fração III (nas condições de temperatura e pH testadas).

#### 4.4.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os resultados obtidos na eletroforese são mostrados na Figura 19. Pode-se observar que a fração III não está ainda totalmente purificada pois são visualizadas pelo menos 3 bandas. No gel de atividade, ao ser aplicado o

sobrenadante bruto observa-se que a inibição aparece na região com um PM de aproximadamente 9,4 kDa. Quando é aplicada a fração III, observa-se que a região com atividade fica mais abaixo no gel, numa região com peso molecular inferior a 6,5 kDa, porém não consegue-se visualizar uma banda de proteína correspondente no gel corado.



**FIGURA 19:** Eletroforese: a) gel corado com as bandas de proteína do sobrenadante bruto e da fração III; b) gel de atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 do sobrenadante bruto e da fração III, podendo ser observado na região escura a inibição do crescimento da bactéria indicadora (atividade antimicrobiana). Valores dos Padrões de PM em kDa. ICTA-UFRGS, 2004

#### 4.4.4.2 Espectroscopia de infravermelho

O espectro de infravermelho da fração III (previamente extraída com butanol) é mostrado no Apêndice II. Podem ser observados um pico largo a  $3280\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento da ligação N-H; a  $1640\text{ cm}^{-1}$  resultante do estiramento da ligação CO-N; a  $1532\text{ cm}^{-1}$  resultante da deformação angular da ligação N-H combinado com o estiramento da ligação C-N. As banda entre  $2955\text{ cm}^{-1}$  e  $2853\text{ cm}^{-1}$  resultam do estiramento da ligação C-H e aquelas entre  $1448$  e  $1387\text{ cm}^{-1}$  da deformação angular desta ligação, sugerindo a presença de uma cadeia alifática. A banda a  $1727\text{ cm}^{-1}$  é devida à absorção da lactona (Silverstein et al., 1991; Yakimov et al., 1995).

#### 4.5 Aplicação no combate a *Erwinia carotovora*

Utilizou-se o sobrenadante parcialmente purificado (Fração II, contendo as duas substâncias antimicrobianas) a fim de determinar a possível utilização no combate a uma bactéria fitopatogena: *Erwinia carotovora*.

##### 4.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima

Os resultados da determinação da concentração inibitória mínima para as quatro linhagens testadas foram os mesmos. Foi observado que uma concentração de  $400\text{ UA/mL}$  são necessários para inibir o crescimento das linhagens (Tabela 14).

#### 4.5.2 Determinação da concentração bactericida mínima

Os resultados da determinação da concentração bactericida mínima para as quatro linhagens testadas foram os mesmos. Foi observado que uma concentração de 800 UA/mL são necessários para obter um efeito bactericida (Tabela 14).

**Tabela 14:** Resultados dos testes para a determinação da CIM e da CBM da fração II contra *E. carotovora* subsp. *atroseptica* 132.

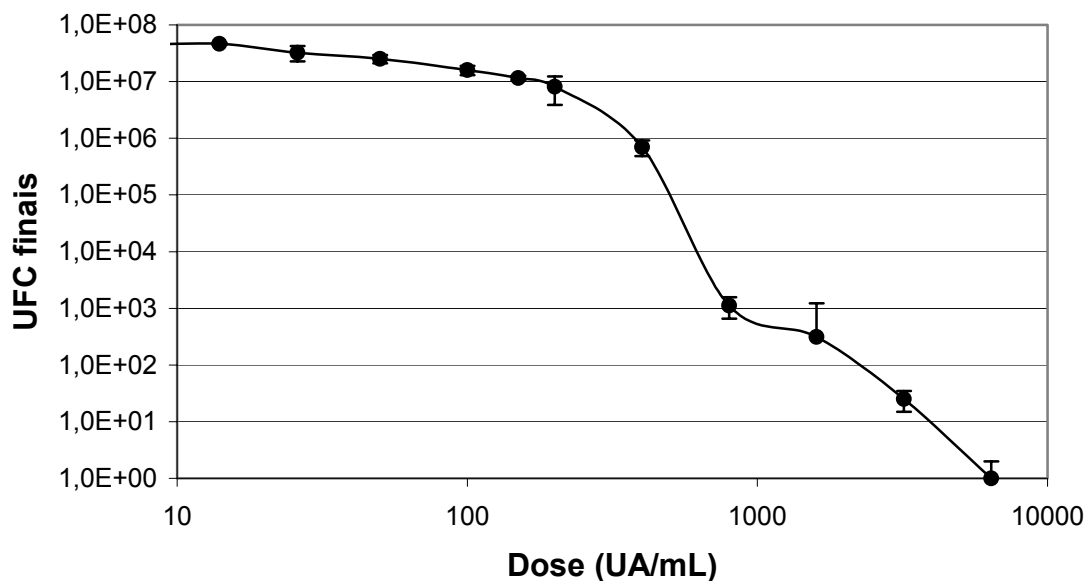
UA/mL	<i>Eca</i> 132		<i>Eca</i> 365		<i>Eca</i> 416		<i>Ecc</i> 325	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
0	+	nt	+	nt	+	nt	+	nt
50	+	nt	+	nt	+	nt	+	nt
100	+	nt	+	nt	+	nt	+	nt
200	+	nt	+	nt	+	nt	+	nt
300	+	nt	+	nt	+	nt	+	nt
400	-	+	-	+	-	+	-	+
500	-	+	-	+	-	+	-	+
600	-	+	-	+	-	+	-	+
700	-	+	-	+	-	+	-	+
800	-	-	-	-	-	-	-	-
900	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-
1200	-	-	-	-	-	-	-	-
2400	-	-	-	-	-	-	-	-

CIM, concentração inibitória mínima; CBM, concentração bactericida mínima; *Eca*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*; *Ecc*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; UA/mL, concentração final da fração II utilizada no teste; +, houve crescimento; -, não houve crescimento; nt, não testado. A concentração de bactéria indicadora foi de aproximadamente  $10^6$  UFC/mL e a incubação foi realizada a 25° C durante 24 h.

#### 4.5.3 Curva dose-resposta

A linhagem *E. carotovora* subsp. *atroseptica* 132 foi utilizada para determinar a curva de dose-resposta. Diversas concentrações da fração II foram testadas, determinando-se que uma dose de 800 UA/mL provoca uma diminuição

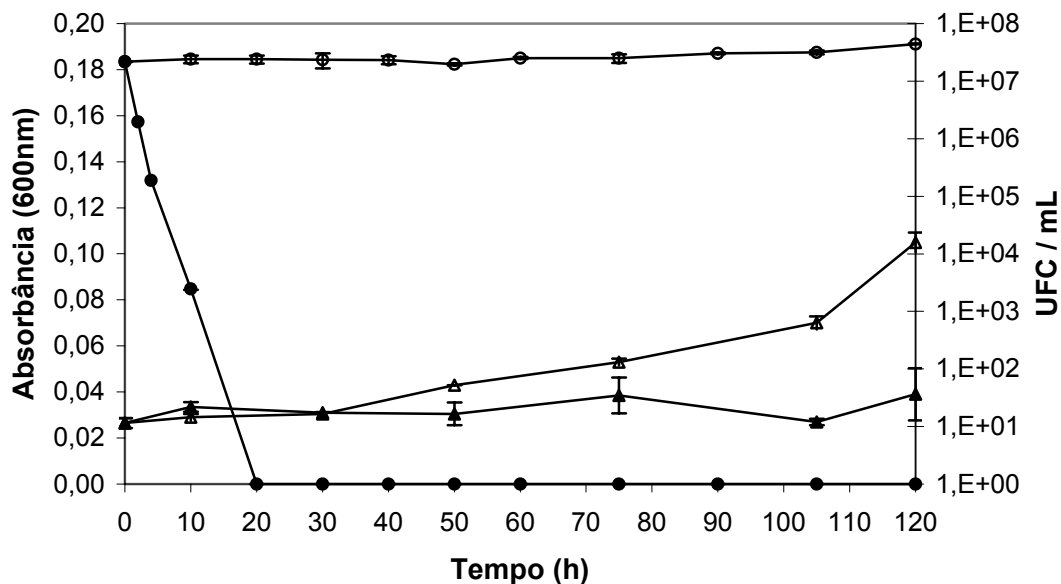
de aproximadamente 50% nas UFC/mL ( $EC_{50}$ ). Já, uma dose de 6400 UA/mL provoca a morte de todas a células no intervalo de 1 hora (Figura 20).



**FIGURA 20:** Curva de dose-resposta contra *E. carotovora carotovora* subsp. *atroseptica* 132 utilizando a fração II. ICTA-UFRGS, 2004.

#### 4.5.4 Cinética de ação

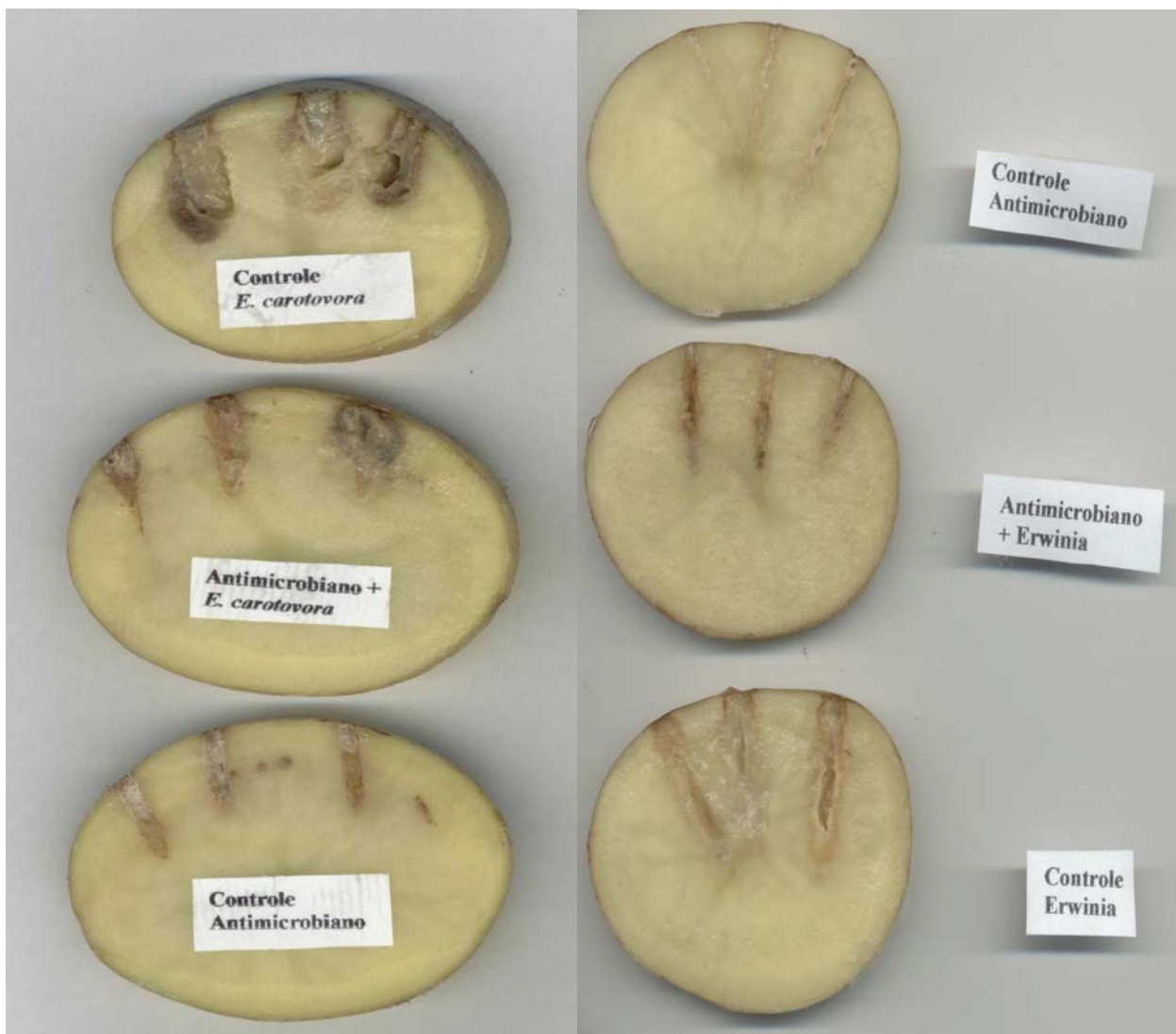
Foi acompanhada a cinética de ação da fração II com uma concentração final de 6400 UA/mL. Observou-se que em 10 min há uma diminuição de células de aproximadamente 50% e aos 20 min todas as células foram mortas (Figura 21).



**FIGURA 21:** Cinética da ação da fração II (concentração final de 6400 UA/mL) contra *E. carotovora carotovora* 1. Absorbância a 600 nm do controle ( $\Delta$ ) e do tratado ( $\blacktriangle$ ) e UFC/mL do controle (O) e do tratado ( $\bullet$ ).ICTA-UFRGS, 2004.

#### 4.5.5 Proteção *in vivo*

Foi testada a capacidade da fração II de inibir o crescimento de *E. carotovora atroseptica* 132 em tubérculos-batata (*in vivo*). Foram testadas diversas concentrações entre 400 e 102.400 UA/mL. Os resultados para as concentrações de 6400 e 102.400 UA/mL são mostrados na figura 22. Observa-se que a fração II foi capaz de inibir a podridão mole mas foi necessária uma dose consideravelmente mais alta do que nos testes *in vitro*.



A

B

**FIGURA 22:** Efeito *in vivo* contra *E. carotovora* subsp. *atroseptica* utilizando a fração II com uma concentração de a) 6400 UA/mL e b) 102400 UA/mL. Nos dois casos são mostrados o controle da fração II, o controle da bactéria e a bactéria tratada com a fração II. ICTA-UFRGS, 2004.



## 4.6 Otimização da produção

### 4.6.1 Avaliação da produção em diferentes meios

Dentre os resíduos e sub-produtos estudados, *Bacillus licheniformis* P40 apresentou uma máxima produção de atividade antimicrobiana em soro de queijo (3200 UA/mL), seguido pelo resíduo industrial fibroso de soja (1600 UA/mL) (Tabela 15). Em meio pena, farinha de pena hidrolizada ou não, bagaço de uva e farinha de peixe não foi produzida atividade antimicrobiana.

**TABELA 15:** Produção de atividade antimicrobiana em diferentes meios após 48 h a 30° C e 125 rpm.

Meio	(%)	Atividade antimicrobiana (UA/mL)
Meio pena	1	0
Farinha de pena	1	0
Farinha de pena hidrolizada	2,5	0
Bagaço de uva	3	0
Farinha de peixe	1	0
RIFS	3	1600
Soro de queijo	7	3200

RIFS, resíduo industrial fibroso de soja

### 4.6.2 Otimização da produção em soro de queijo pela Metodologia de Superfície de Resposta

Os resultados dos experimentos realizados para estudar os efeitos das três variáveis independentes (temperatura, pH inicial e concentração de soro de queijo) na produção da atividade antimicrobiana são mostrados na Tabela 16, junto com o valor predito pelo modelo. O pH final das culturas variou entre 6,65 e 7,65.

A análise estatística mostrou que, na faixa estudada, as três variáveis tiveram um efeito significativo na produção a 95% de confiança (Figura 23). A interação entre a temperatura e a concentração de soro de queijo também foi significativa, enquanto que a interação entre a temperatura e o pH não foi significativa. O efeito quadrático do pH inicial foi o efeito mais significativo seguido pelo efeito linear da concentração de soro de queijo e o efeito quadrático da temperatura (Figura 23).

Os resultados do modelo quadrático na forma de análise de variância (ANOVA) são mostrados na Tabela 17. A equação obtida após a regressão indica um valor de  $R^2$  de 0,9506 (um valor de  $R^2 > 0,75$  indica a aptidão do modelo). Este valor assegura um ajuste satisfatório do modelo quadrático e indica que 95 % da variabilidade na resposta pode ser explicada pelo modelo. Os coeficientes da regressão foram calculados utilizando o software Statistica 5.0 obtendo-se a seguinte equação:

$$Y = 3261.4 + 250.35x_1 - 175.89x_2 + 822x_3 - 785.46x_1^2 - 1104.34x_2^2 - 378.01x_3^2 - 150x_1x_2 + 525x_1x_3 - 250x_2x_3 \quad (6)$$

Sendo Y a resposta obtida (produção de antimicrobiano em UA/mL),  $x_1$ , a temperatura;  $x_2$ , o pH inicial e  $x_3$ , a concentração de soro de queijo (valores codificados). A significância de cada coeficiente foi avaliada pelos valores de P, listados na tabela 18. Quanto menor o valor de P mais significativo é o coeficiente (Barros Neto et al., 1995).

O teste de Fisher apresentou um valor de F calculado de  $F_{(9,7)} = 14.97$ . Este é 4 vezes maior que o valor tabelado ( $F_{(9,7)} = 3.68$ ) demonstrando a significância do modelo. O valor de F para a falta de ajuste ( $F_{(5,2)} = 2,91$ ) foi 6 vezes menor que o F tabelado ( $F_{(5,2)} = 19,30$ ) (tabela 17), mostrando o ajuste do modelo (Barros Neto et al., 1995).

As superfícies de resposta foram graficadas, sendo mostradas nas figuras 24, 25 e 26.

**TABELA 16:** Resultados obtidos no experimento fatorial  $2^3$ 

<b>Ensaio</b>	<b>Valores codificados</b>			<b>Ativ. Antim.</b>		<b>UFC/mL</b>	<b>Ativ. proteolítica</b>	
	<b>x<sub>1</sub></b>	<b>x<sub>2</sub></b>	<b>x<sub>3</sub></b>	<b>Obs.</b>	<b>Pred.</b>	<b>Obs.</b>	<b>Obs.</b>	<b>Pred.</b>
<b>1</b>	-1	-1	-1	800	222	$4,33 \times 10^8$	754	461,9
<b>2</b>	+1	-1	-1	100	0*	$8,33 \times 10^7$	2064	1636,1
<b>3</b>	-1	+1	-1	700	670	$2,20 \times 10^8$	601	461,9
<b>4</b>	+1	+1	-1	0	0*	$6,67 \times 10^6$	1838	1636,1
<b>5</b>	-1	-1	+1	1200	1316	$4,67 \times 10^8$	446	440,2
<b>6</b>	+1	-1	+1	3200	3167	$2,70 \times 10^7$	856	873,8
<b>7</b>	-1	+1	+1	700	764	$3,50 \times 10^8$	287	440,2
<b>8</b>	+1	+1	+1	1500	2015	$4,50 \times 10^6$	943	873,8
<b>9</b>	-1,68	0	0	400	624	$2,71 \times 10^7$	55	0*
<b>10</b>	+1,68	0	0	1600	1465	$1,52 \times 10^7$	956	1321,0
<b>11</b>	0	-1,68	0	100	440	$3,52 \times 10^8$	697	645,7
<b>12</b>	0	+1,68	0	100	0*	$2,08 \times 10^8$	599	645,7
<b>13</b>	0	0	-1,68	300	814	$8,83 \times 10^7$	1045	1560,0
<b>14</b>	0	0	+1,68	4000	3575	$1,97 \times 10^8$	1075	901,6
<b>15</b>	0	0	0	3200	3261	$1,87 \times 10^8$	562	645,7
<b>16</b>	0	0	0	3000	3261	$5,70 \times 10^8$	732	645,7
<b>17</b>	0	0	0	3600	3261	$4,07 \times 10^8$	700	645,7

x<sub>1</sub>, valor codificado para a temperatura; x<sub>2</sub>, valor codificado para o pH; x<sub>3</sub>, valor codificado para a concentração de soro de queijo; Obs., valor observado; Pred., valor predito pelo modelo

\* Para estes experimentos o modelo previu valores negativos.

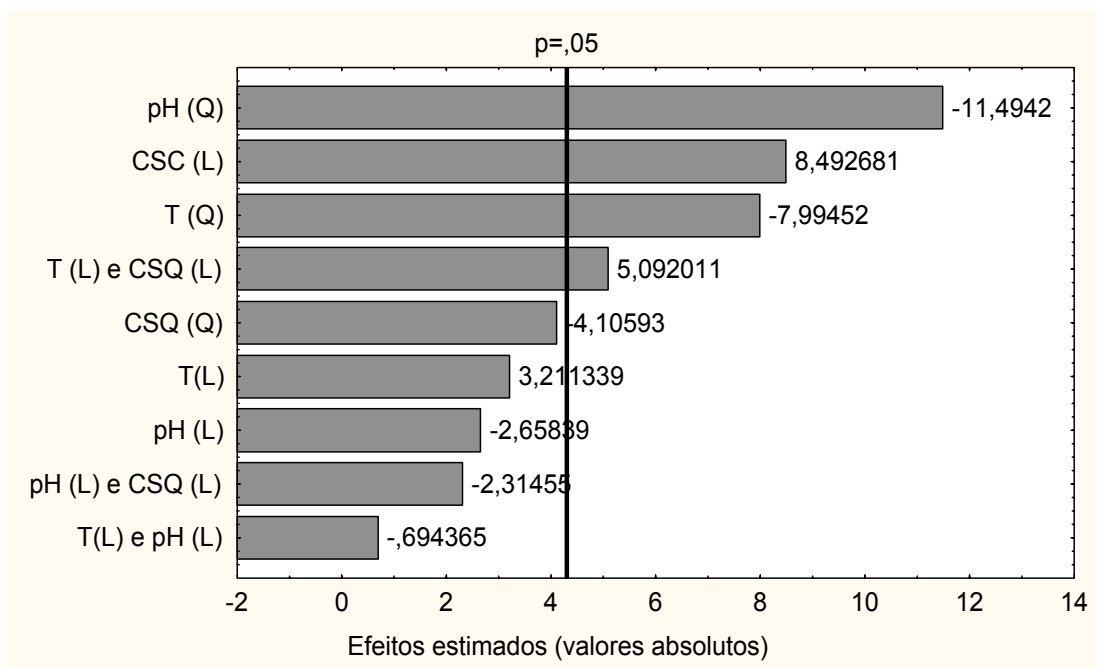
**TABELA 17:** Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático da produção de atividade antimicrobiana

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	29736518	9	3304058	14,97	3,68
Resíduo	1544659	7	220665,5		
Falta de ajuste	1357992	5	271598	2,91	19,30
Erro puro	186666,7	2	93333,33		
Total	31281176	16			

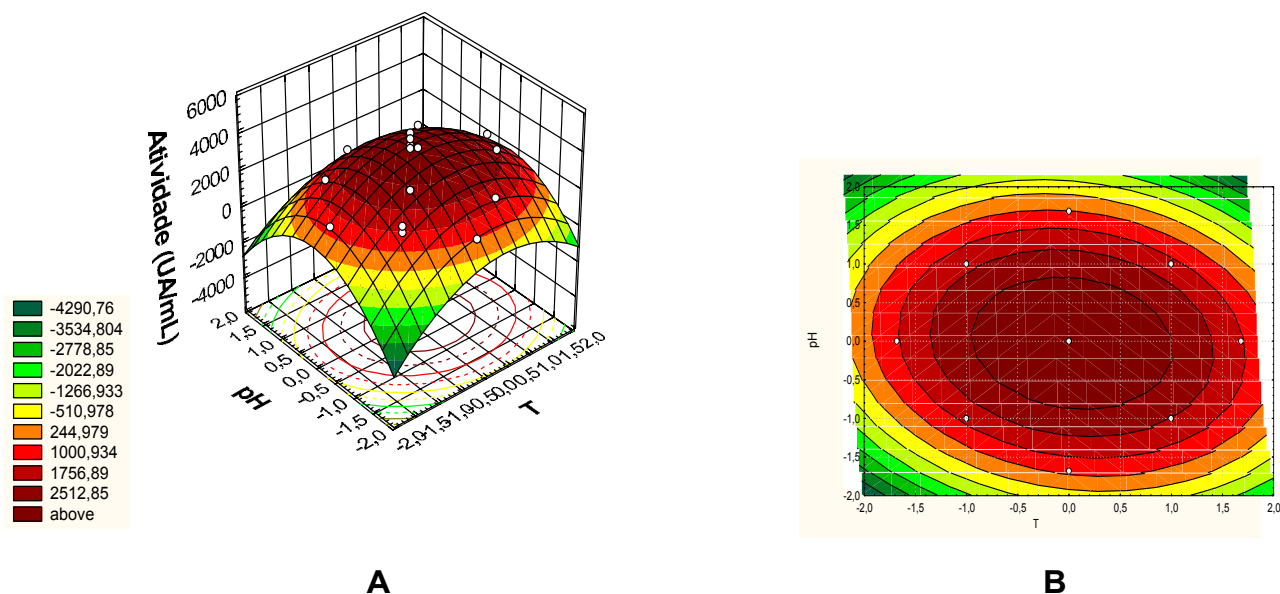
**TABELA 18:** Coeficientes do modelo estimados por múltiplas regressões lineares.

Fator	Coeficiente	Valor de P
Intersecção	3261,40	0,002900*
$X_1$	250,35	0,094001
$X_2$	-175,89	0,167300
$X_3$	822,00	0,009972*
$X_1X_1$	-785,46	0,013191*
$X_2X_2$	-1104,34	0,006739*
$X_3X_3$	-378,01	0,053482
$X_1X_2$	-150,00	0,299351
$X_1X_3$	525,00	0,039817*
$X_2X_3$	-250,00	0,146680

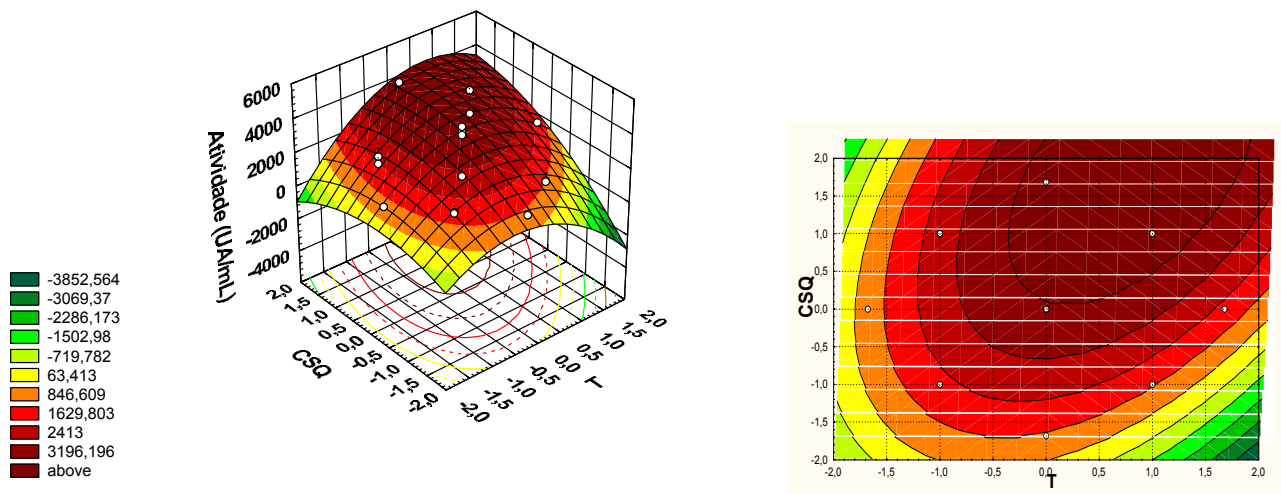
\* Estatisticamente significativo a 95% de confiança



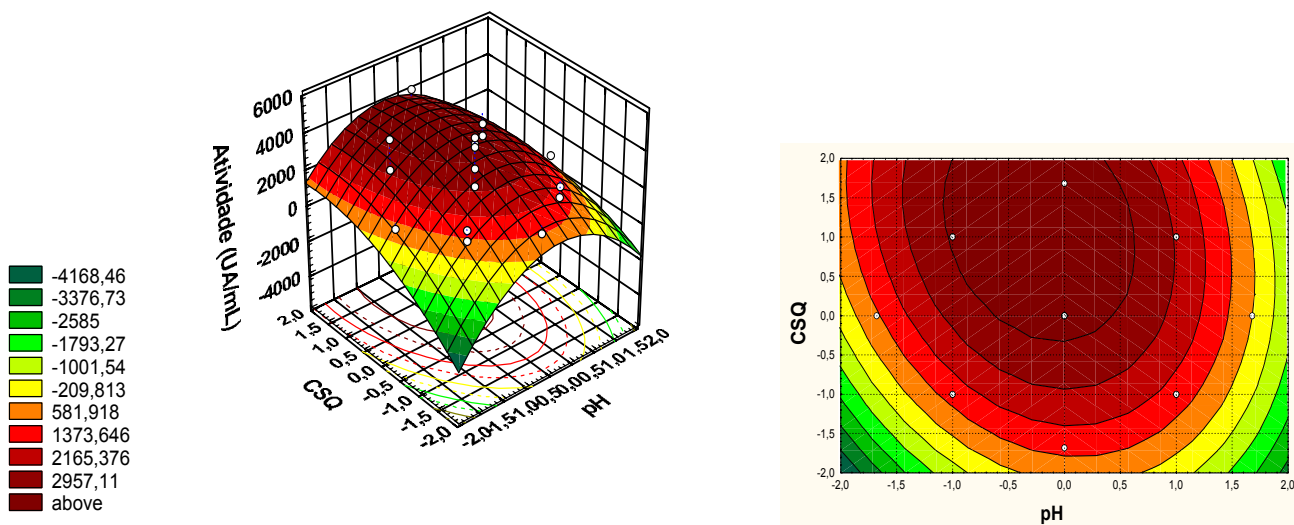
**FIGURA 23:** Gráfico de Pareto para o modelo quadrático mostrando os efeitos lineares (L), quadráticos (Q) ou de interação das diferentes variáveis testadas na produção da atividade antimicrobiana por *B. licheniformis* P40. As variáveis testadas foram temperatura (T), pH inicial (pH) e a concentração de soro de queijo (CSQ). O ponto onde os efeitos foram significativos (para  $P = 0,05$ ) é indicado por uma linha vertical. ICTA-UFRGS, 2004.



**FIGURA 24:** a) Superfície de resposta da produção de antimicrobianos (UA/mL) por *B. licheniformis* P40 como função da temperatura e do pH inicial; b) Superfície de contorno. ICTA - UFRGS, 2004.



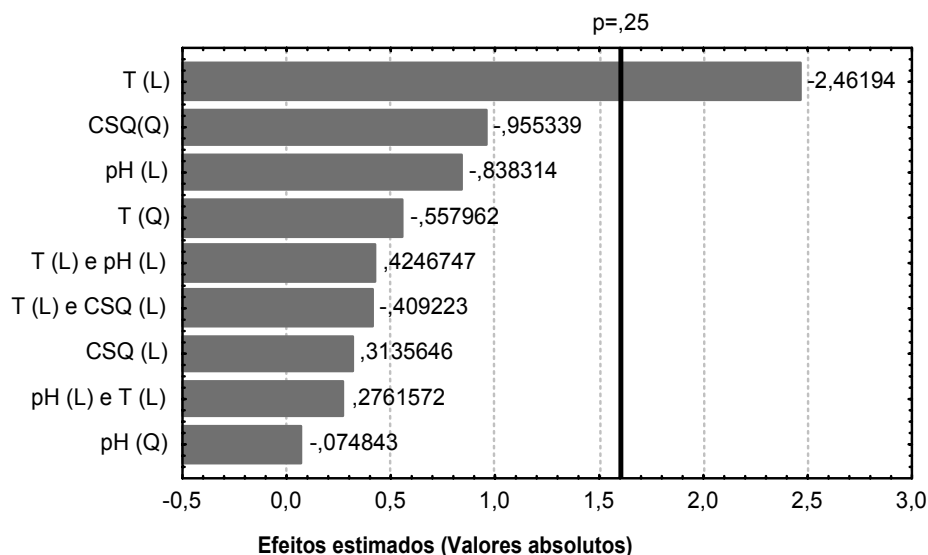
**FIGURA 25:** a) Superfície de resposta da produção de antimicrobianos (UA/mL) por *B. licheniformis* P40 como função da concentração de soro de queijo e da temperatura; b) Superfície de contorno. ICTA-UFRGS, 2004.



**FIGURA 26:** a) Superfície de resposta da produção de antimicrobianos (UA/mL) por *B. licheniformis* P40 como função da concentração de soro de queijo e do pH inicial; b) Superfície de contorno. ICTA-UFRGS, 2004.

Com relação ao crescimento bacteriano, só a temperatura mostrou um efeito significativo (Figura 27) mas não foi possível determinar um modelo pois o

teste de Fisher não mostrou significância para o modelo e o  $R^2$  obtido foi menor que 0,75 (resultados não mostrados).



**FIGURA 27:** Gráfico de Pareto mostrando os efeitos lineares (L), quadráticos (Q) ou de interação das diferentes variáveis testadas no crescimento bacteriano. As variáveis testadas foram temperatura (T), pH inicial (pH) e a concentração de soro de queijo (CSQ). O ponto onde os efeitos foram significativos (para  $P = 0,25$ ) é indicado por uma linha vertical. ICTA-UFRGS, 2004.

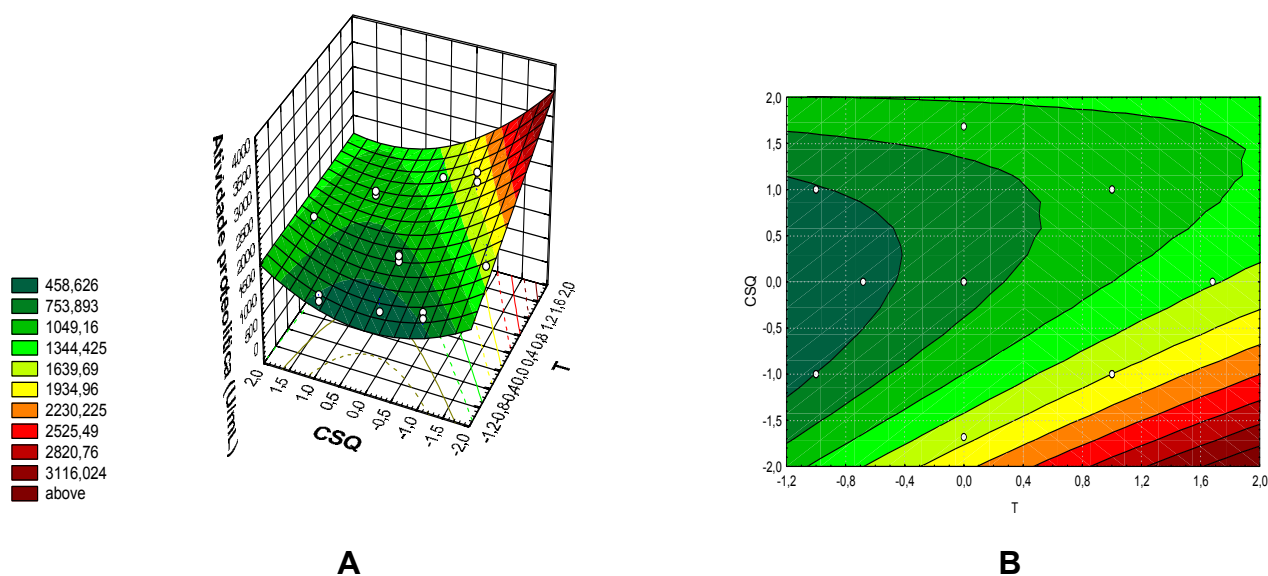
Para verificar se a produção de atividade antimicrobiana estava relacionada com a produção de atividade proteolítica, foi avaliado em cada um dos ensaios a atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato (conforme item 3.14.2.1). Os valores obtidos em cada experimento são mostrados na tabela 16 (junto com os valores preditos) e a superfície de resposta da atividade proteolítica em função da temperatura e da concentração de soro de queijo na figura 28. Pode-se observar que não há relação entre a produção de atividade antimicrobiana e proteolítica. No gráfico de Pareto (figura 29) pode-se observar



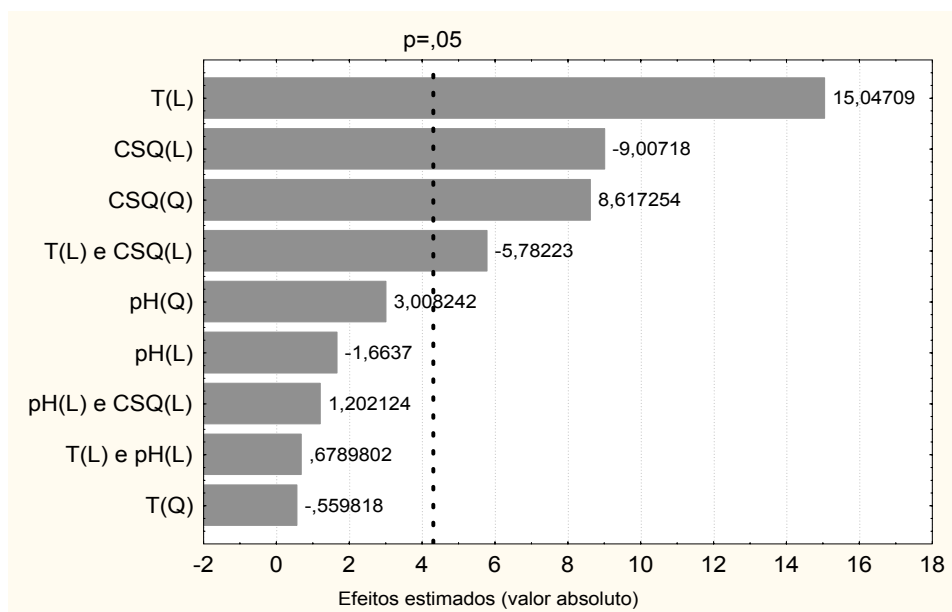
que o efeito mais significativo na produção de protease foi o efeito linear da temperatura seguido pelos efeitos linear e quadrático da concentração de soro de queijo. O pH não teve um efeito significativo. A ANOVA para este experimento é mostrada na tabela 19. O teste de Fisher apresentou um valor de F calculado de  $F_{(4,12)} = 10,02$ . Este é 3 vezes maior que o valor tabelado ( $F_{(4,12)} = 3,26$ ) demonstrando a significância do modelo. O valor de F para a falta de ajuste ( $F_{(10,2)} = 10,88$ ) foi menor que o F tabelado ( $F_{(10,2)} = 19,4$ ) e o valor de  $R^2$  foi de 0,7696. A equação obtida para o modelo (desprezando os coeficientes não significativos) foi:

$$Y = 710,01 + 675,27.x_1 - 451,19.x_3 + 414,61.x_3^2 - 311,03.x_1.x_3$$

Sendo Y a resposta obtida para a produção de atividade proteolítica em U/mL,  $x_1$ , a temperatura;  $x_2$ , o pH inicial e  $x_3$ , a concentração de soro de queijo (valores codificados).



**FIGURA 28:** a) Superfície de resposta da atividade proteolítica (U/mL) como função da temperatura e da concentração de soro de queijo; b) Superfície de contorno. ICTA-UFRGS, 2004.



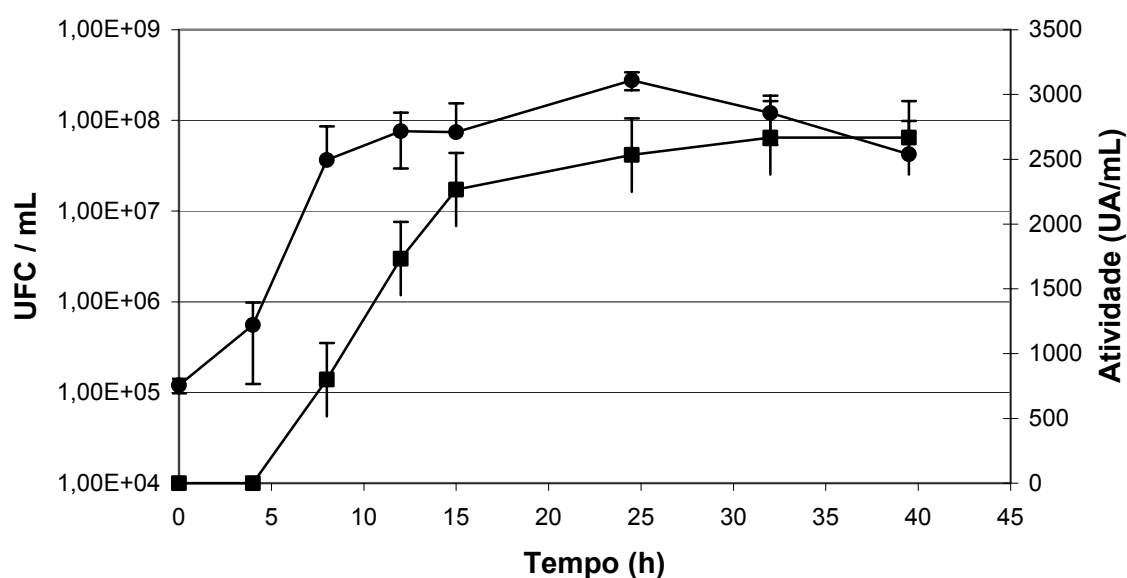
**FIGURA 29:** Gráfico de Pareto mostrando os efeitos lineares (L), quadráticos (Q) ou de interação das diferentes variáveis testadas na atividade proteolítica por *B. licheniformis* P40. As variáveis testadas foram temperatura (T), pH inicial (pH) e a concentração de soro de queijo (CSQ). O ponto onde os efeitos foram significativos (para  $P = 0,05$ ) é indicado por uma linha vertical. ICTA-UFRGS, 2004.

**TABELA 19:** Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático da produção de atividade proteolítica

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	3035977	4	758994,1	10,02	3,26
Resíduo	909061,5	12	75755,13		
Falta de ajuste	892659,5	10	89265,95	10,88	19,4
Erro puro	16402	2	8201		
Total	3945038	16			

#### 4.6.3 Determinação do crescimento e produção nas condições ótimas de temperatura e pH

*Bacillus licheniformis* P40 foi incubado aerobicamente a 30° C, pH 7.0 e 7% de soro de queijo a 125 rpm. As células alcançaram a fase estacionária após aproximadamente 12 horas de cultivo e a produção máxima de antimicrobiano foi observada a partir das 15 horas de cultivo, no início da fase estacionária (figura 30).



**FIGURA 30:** Curva de crescimento e produção nas condições ótimas de temperatura e pH em soro de queijo 7%. Foi acompanhada a absorbância a 600 nm (■) e a atividade antimicrobiana (UA/mL) (●).ICTA-UFRGS, 2004.

## 5 DISCUSSÃO

A linhagem P40 isolada de intestino do peixe Piau-com-pinta (*Leporinus* sp.) da bacia amazônica, produtora de substâncias antimicrobianas, foi identificada como *Bacillus licheniformis* através de testes bioquímicos e fisiológicos e utilização do sistema API CHB. A atividade antimicrobiana foi excretada para o meio durante incubação em caldo.

Apesar dos trabalhos realizados quanto à biodiversidade da Amazônia, poucos estudos examinaram microrganismos específicos provenientes da região. Alguns microrganismos foram investigados para fins biotecnológicos (Bastos et al. 2000; Chies et al. 2002; Heck et al., 2002), porém, não existem relatos específicos da produção de substâncias antimicrobianas por bactérias isoladas da região amazônica.

Durante o cultivo da bactéria produtora em caldo (BHI), a atividade antimicrobiana máxima coincidiu com o máximo de biomassa e as taxas de produção específicas máximas foram observadas no final da fase exponencial de crescimento. Como a produção aconteceu durante a fase exponencial, sugere-se que as substâncias antimicrobianas produzidas sejam metabólitos primários. Diversas bacteriocinas, como aquelas produzidas por *Enterococcus faecium* (Parente & Ricciardi 1994), *Lactobacillus amylovorus* (De Vuyst et al. 1996) e

*Brevibacterium linens* (Motta & Brandelli, 2003) mostram também cinéticas de metabólito primário. Porém, a maioria dos peptídeos antimicrobianos produzidos não ribossomalmente são considerados metabólitos secundários (Stachelhaus et al., 1996). Cabe ressaltar que a produção da substância antimicrobiana obtida na fração IV (após purificação) pode ser produzida na fase estacionária de crescimento e que esta seja produzida em pequena quantidade, não sendo detectado aumento de atividade durante a curva de crescimento e produção. Na tabela 11 pode ser visto que a recuperação final para a fração IV é de apenas 3%, sendo 10 vezes maior para a fração III. Isto pode sugerir que a fração IV é produzida numa quantidade consideravelmente menor do que a fração III (considerando perdas similares para ambas substâncias durante a purificação). Portanto, o teste para a quantificação da atividade antimicrobiana pode não ser suficientemente eficiente para detectar diferenças na atividade durante a fase estacionária do microrganismo produtor.

Substâncias antimicrobianas produzidas por bactérias intestinais de peixe têm sido descritas. As substâncias produzidas pelo *Vibrio* sp. NM10 (Sugita et al. 1997) e pelo *Bacillus* sp. NM12 (Sugita et al., 1998) foram postuladas como tendo uma função de proteção no controle da contaminação intestinal por patógenos invasores. Além disso, também foram isoladas de intestino de peixes, bactérias lácticas apresentando um espectro de atividade restrito contra espécies relacionadas (Halami et al., 1999). No entanto, existem algumas diferenças entre as substâncias produzidas pelo *B. licheniformis* P40 e outros antimicrobianos produzidos por estas bactérias de peixes. As substâncias previamente descritas

são termolábeis (Sugita et al., 1997; Sugita et al. 1998) enquanto que a caracterização do peptídeo antimicrobiano produzido por *B. licheniformis* P40 mostrou maior estabilidade térmica. Além disso, apresenta um espectro de ação mais amplo quando comparado com estas substâncias (Sugita et al., 1997; Halami et al, 1999).

Diversas bactérias patogênicas e deteriorantes foram inibidas pelo sobrenadante da cultura, entre elas *B. cereus*, *E. carotovora*, *L. monocytogenes* e isolados clínicos de *Streptococcus*. Vale salientar que também foi inibida a bactéria *C. fimi* NCTC 7547, que é descrita como sensível a todas as bacteriocinas já testadas (Oliveira et al. 1998).

O patógeno *L. monocytogenes* está envolvido em surtos ligados ao consumo de produtos lácteos ou vegetais contaminados (Muriana 1996). O uso de bacteriocinas para inibir este patógeno foi descrito para diversos alimentos, como carnes e queijos (Davies et al. 1997; Ennahar et al. 1998). No entanto, tem sido descrita resistência de linhagens de *L. monocytogenes* a bacteriocinas convencionais tais como nisina e pediocina (Rasch & Knochel 1998; Gravesen et al., 2002a). 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.

A ação contra isolados clínicos de *Streptococcus* indicam seu potencial uso na prevenção ou tratamento de mastite. Nesse sentido, o uso de bacteriocinas tem sido sugerido como uma possível estratégia (Milles et al., 1992).

Também observou-se atividade contra o fitopatógeno *E. carotovora*. Esta bactéria é conhecida por causar perdas importantes na produção de tubérculos-batata (*Solanum tuberosum*), através das doenças chamadas de Podridão Mole e Canela Preta (Pérombelon & Kelman, 1980). Geralmente as perdas são originadas durante a estocagem, sendo que o controle das doenças baseia-se em boas práticas sanitárias, refrigeração e sanitização superficial com cloro (Sharga & Lyon, 1998; Wells et al., 1998). A fração II (contendo ambas substâncias antimicrobianas produzidas) foi utilizada para avaliar a aplicação no combate a este fitopatógeno, mostrando uma ação bactericida. A  $EC_{50}$  foi de aproximadamente 800 UA/mL e uma dose de 6400 UA/mL foi capaz de eliminar  $10^7$  UFC/mL em 20 min. A substância mostrou ação *in vivo*, demonstrando potencial aplicação no combate à Podridão Mole em tubérculos-batata, mas sendo necessária uma concentração muito maior da necessária *in vitro*. Sharga & Lyon (1998) utilizaram um peptídeo antimicrobiano produzido por *B. subtilis* BS 107 para inibir o desenvolvimento destas doenças, obtendo resultados positivos. Este peptídeo era ativo *in vitro* contra uma ampla gama de bactérias e fungos. Ali & Reddy (2000) utilizaram peptídeos sintéticos no combate a fungos e bactérias fitopatogênicas. Bactérias do gênero *Erwinia* foram tratadas com os peptídeos e injetadas em tubérculos-batata. Foi observada a inibição da doença com o aumento da concentração dos peptídeos. Os autores sugerem que a expressão

destes peptídeos em batatas transgênicas poderia aumentar a resistência contra estes patógenos.

A atividade antimicrobiana do sobrenadante da cultura foi sensível à ação de pronase E e a sua atividade foi perdida com TCA, indicando a existência de pelo menos uma substância de natureza protéica. No entanto, foi resistente ao tratamento com papaína, tripsina e concentrações de pronase E de 2 mg/mL. Após purificação parcial, a fração III apresentou as mesmas características, ocorrendo diminuição de atividade residual após tratamento com 10 mg/mL de pronase E e tripsina do que o sobrenadante bruto. O peptídeo antimicrobiano presente é mais resistente ao tratamento proteolítico do que diversas bacteriocinas produzidas por espécies de *Bacillus* (Paik et al. 1997; Hyronimus et al. 1998). Isto vem ao encontro do fato de que alguns *Bacillus* produzem antimicrobianos que são peptídeos cíclicos contendo aminoácidos não usuais, geralmente mais resistentes a proteases (Gebhardt et al., 2002). A fração III mostrou-se menos ativa pHs ácidos (entre 3 e 6), podendo este fato ser uma limitação para a sua utilização em alimentos (Figura 17).

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. Isto indica que o peptídeo é secretado como grandes agregados, similarmente à bacteriocina linocina M18 produzida por *Brevibacterium linens*



(Valdés-Stauber & Scherer, 1994). A associação de moléculas em grandes agregados insolúveis tem sido atribuída à natureza altamente hidrofóbica dos peptídeos. O peso molecular do peptídeo antimicrobiano no sobrenadante bruto foi estimado através de eletroforese com gel de poliacrilamida em 9,4 kDa, porém, quando parcialmente purificado (fração III) a atividade antimicrobiana apareceu numa região com PM inferior a 6,5 kDa. Dados contraditórios na massa molecular também foram descritos para a cereína 7, um peptídeo antimicrobiano produzido por *Bacillus cereus* (Oscáriz & Pisabarro, 2000). Nesse sentido, o comportamento anormal de proteínas altamente hidrofóbicas em SDS-PAGE, levando à superestimação do peso molecular, tem sido descrito (Kaufmann et al., 1984).

Durante as etapas de purificação do sobrenadante bruto foi observado que a ação antimicrobiana deste é devida à presença de duas substâncias. Estas foram parcialmente purificadas através de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração e separadas durante a cromatografia de troca iônica, obtendo-se finalmente a fração III e a fração IV. A fração III foi caracterizada, apresentando propriedades muito similares às demonstradas pelo sobrenadante bruto da cultura. Foi observado que esta substância possui natureza protéica através do acompanhamento da absorvância a 280 nm, do teste de Lowry e da inativação com pronase E (10 mg/mL) e TCA. O espectro de infravermelho da fração III sugere que o peptídeo produzido não é bacitracina pelo fato de possuir uma cadeia alifática maior da apresentada pela bacitracina e pela lactona (evidenciada no espectro) que não consta na estrutura da bacitracina (Figura 1). Além disso, a bacitracina é estável em pH ácido e instável em pH alcalino (Index

Merck), propriedades contrárias às apresentadas pela fração III (Figura 17). Foi observado também que a substância possui propriedades surfactantes através da determinação do índice de emulsificação com diversos hidrocarbonetos (propriedade que a bacitracina não possui). Estes resultados vêm ao encontro da produção de lipopeptídeos, chamados de lichenisinas, por diversas linhagens de *B. licheniformis* (Konz et al., 1999). As lichenisinas são potentes biosurfactantes com propriedades antimicrobianas. O espectro infra-vermelho obtido mostrou características muito similares às obtidas para a lichenisina A (Yakimov et al., 1995), produzida por *B. licheniformis* BAS50 e do lipopeptídeo antimicrobiano biosurfactante produzido por *B. subtilis* (Bechard et al., 1998). Algumas diferenças podem ser observadas na estrutura das lichenisinas dependendo da linhagem produtora (Konz et al., 1999). Porém, o peso molecular destas substâncias são de pouco mais de 1000 Da, o que não corresponde com o peso molecular obtido para o peptídeo produzido por *B. licheniformis* P40. Além disso, a lichenisina A possui atividade contra *S. aureus* e *Pseudomonas* sp. (Yakimov et al., 1995) e a fração III não apresentou ação contra as linhagens testadas. Cabe ressaltar que o efeito surfactante destas substâncias faz delas substâncias atrativas para serem aplicadas em diversos processos industriais independentemente de sua atividade antimicrobiana. Entre estas pode-se citar recuperação de óleos, biorremediação e emulsificante na indústria de alimentos (Desai & Banat, 1997).

Quanto à outra substância antimicrobiana produzida (fração IV), não absorve a 280 nm e o teste de Lowry determina um valor nulo para a quantidade de proteína na fração. No entanto, outros testes devem ser realizados para

determinar a sua natureza protéica ou não. A substância possui carga positiva em pH 6 pois fica retida na matriz da coluna de CM-Sephadex.

Neste trabalho foi estudada a produção da atividade antimicrobiana em resíduos e sub-produtos da indústria de alimentos. Só foi observada atividade quando foram utilizados o RIFS e o soro de queijo como meio de cultura. Este último foi escolhido para otimizar a produção por resultar em maior atividade. Além disso, o soro de queijo é um resíduo da produção de queijo gerado em grande quantidade no mundo todo, com uma alta concentração de substâncias orgânicas (principalmente lactose e proteínas) (Rech, 1998). No que se refere à produção de bacteriocinas, estas são geralmente obtidas em meios de cultura comerciais, apresentando custos elevados.

O efeito do pH e da temperatura são muito importantes na produção de substâncias antimicrobianas e foram estudados para diversas bacteriocinas como aquelas produzidas por *Leuconostoc mesenteroides* (Krier et al., 1998); *Lactobacillus casei* (Vignolo et al., 1995), entre outras. Neste trabalho foi mostrado que o pH e a temperatura são também importantes para a produção de atividade antimicrobiana por *B. licheniformis* P40. A otimização do meio pelo método clássico envolve a mudança de uma variável independente (nutriente, pH, temperatura, etc) fixando todas as outras variáveis. Isto consome tempo e é de custo elevado para um grande número de variáveis além do que pode levar a conclusões errôneas já que ignora a interação entre os parâmetros. A metodologia de superfície de resposta utilizada para otimizar a produção de atividade antimicrobiana por *B. licheniformis* P40 indicou que a interação entre a temperatura e a concentração de soro de queijo foi significativa enquanto que a

interação entre temperatura e pH não foi significativa. Os resultados também indicaram que dentro da faixa estudada, as três variáveis tiveram efeitos significativos na produção, sendo o efeito quadrático do pH o mais significativo. A produção de bacteriocina por *B. licheniformis* isolado de rúmen de búfalo foi estudado por Pattnaik et al. (2001) sob condições anaeróbicas. Neste caso, foi mostrado que o pH inicial do meio não teve efeito na indução de atividade antimicrobiana.

Vários autores notaram que um aumento no crescimento celular freqüentemente vem associado a aumentos na produção de bacteriocina (Mataragas et al., 2003). Isto é normalmente observado em bactérias lácticas. Uma alta correlação entre produção de biomassa e síntese de bacteriocina foi observada para *Lactococcus lactis* (De Vuyst & Vandamme, 1992); *Lactobacillus amylovorus* (de Vuyst et al., 1996), *Brevibacterium linens* (Motta & Brandelli, 2003), entre outros. No entanto, ótimas condições de crescimento nem sempre levam a altas taxas de produção. Vários estudos mostraram que a maior produção de bacteriocina é obtida em valores de pH e temperatura menores do que aqueles ótimos para o crescimento (Mataragas et al., 2003). Neste trabalho não foi possível determinar um modelo para o crescimento bacteriano mas aparentemente não houve relação entre o crescimento e a produção de atividade antimicrobiana. Na tabela 17 pode ser observado que os dois valores menores obtidos para o crescimento bacteriano (ensaios 4 e 8) apresentaram valores muito diferentes para a produção de atividade antimicrobiana (0 e 1500 UA/mL, respectivamente). Além disso, o único efeito significativo para o crescimento bacteriano foi o efeito linear da temperatura. Também foi observado que a

produção de atividade antimicrobiana não está relacionada com a produção de protease pelo *B. licheniformis* P40. Além, disso, o pH, que foi o efeito mais significativo para a produção de atividade antimicrobiana, não teve efeito significativo para a produção de protease. Foi avaliada a cinética de produção nas condições ótimas de temperatura e pH e no ponto central para a concentração de soro de queijo. Apesar de ter sido maior a produção em concentrações de queijo maiores, a cinética foi avaliada nestas condições para não aumentar o custo de produção. A cinética apresentada foi similar àquela obtida em caldo BHI, mas a produção em soro de queijo atingiu valores 5 vezes maiores àqueles obtidos durante a curva realizada em BHI, sendo este último um meio de alto custo. Cabe ressaltar que não foram realizados testes com o sobrenadante da cultura obtida em soro de queijo e que a característica da(s) substância(s) antimicrobiana(s) produzida(s) pode ser diferente das obtidas em BHI.

A identificação e caracterização de novas substâncias antimicrobianas formam um assunto de interesse para as indústrias alimentícias e farmacêuticas, devido à rápida escalada da resistência microbiana aos antibióticos e à necessidade de se obter alimentos seguros e com uma vida de prateleira cada vez maior. Este estudo indicou a relevância do peptídeo antimicrobiano produzido pelo *B. licheniformis* P40 como um biopreservativo natural para o controle de microrganismos patógenos e deteriorantes, sendo que outras propriedades podem ser ainda aproveitadas devido à ação surfactante.

## 6 CONCLUSÕES

A bactéria *B. licheniformis* P40 isolada de intestino de peixe Piau com pinta (*Leporinus* sp.) possui atividade antimicrobiana contra uma ampla faixa de bactérias patogênicas e deteriorantes, tanto Gram-positivas como Gram-negativas. A atividade é estável numa ampla faixa de pH (entre 3 e 10) e apresenta uma termo-estabilidade relativa (100° C / 10 min.).

A atividade antimicrobiana é produzida durante a fase exponencial de crescimento, obtendo uma atividade máxima após 15 horas de cultivo, no início da fase estacionária.

O sobrenadante bruto da cultura produtora obtido em BHI apresentou efeito bactericida e bacteriolítico contra *L. monocytogenes* e bactericida contra *E. carotovora*.

A atividade antimicrobiana do sobrenadante é devida à produção de duas substâncias antimicrobianas, sendo uma delas de natureza protéica. Estas foram parcialmente purificadas utilizando precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de gel filtração e de troca iônica. A substância de natureza protéica apresentou propriedades de biosurfactante sendo capaz de formar emulsões com diversos hidrocarbonetos. O espectro infra-vermelho foi muito semelhante ao da lichenisina A produzida por *B. licheniformis* BAS50.

A fração II obtida durante o processo de purificação (contendo ambas substâncias) foi utilizada para combater um fitopatógeno (*Erwinia carotovora*), apresentando uma CIM de 400 UA/mL e CBM de 3200 UA/mL para as 4 linhagens testadas. A  $EC_{50}$  foi de aproximadamente 800 e uma concentração de 6400 UA/mL foi capaz de eliminar uma população de  $10^7$  UFC/mL de *E. carotovora* em 20 min. A fração apresentou efeito *in vivo* em batatas, sendo necessária uma concentração de aproximadamente 100.000 UA/mL para evitar a formação de podridão mole nas condições testadas e apresentando assim potencial uso no combate a esta doença, causadora de importantes perdas econômicas na produção de batatas.

O soro de queijo foi utilizado como meio barato de produção e as condições ótimas de produção em termos de temperatura e pH encontram-se na faixa de temperatura entre 26 e 37° C e de pH entre 6,5 e 7,5 para uma concentração de soro de queijo de 7%. Ao aumentar a concentração de soro de queijo aumentou a produção, obtendo-se um máximo na máxima concentração testada (12 %).

As substâncias antimicrobianas estudadas neste trabalho apresentam potencial uso no combate a microrganismos patogênicos, tanto em alimentos quanto em doenças de plantas, animais e humanos.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A descoberta de novas substâncias antimicrobianas produzidas por microrganismos deve passar por diversas etapas até a utilização, seja esta em humanos, animais, plantas ou para a conservação de alimentos. Através deste trabalho foi possível identificar duas substâncias antimicrobianas produzidas por uma bactéria isolada de peixe da região amazônica e caracterizar uma delas. Apresentou-se também a otimização da produção utilizando-se meio barato e uma possível aplicação no combate a um fitopatógeno de importância. No entanto, a utilização de uma nova substância antimicrobiana deve ser realizada somente após a confirmação de que esta não é tóxica para o organismo e que ela será eficiente *in vivo*, já que muitas substâncias apresentam uma boa ação *in vitro*, mas quando utilizadas *in vivo* a sua eficácia fica comprometida pela interação com outros compostos presentes no organismo. Portanto, os próximos passos para dar continuidade a este trabalho seriam estudar a citotoxicidade, toxicidade *in vivo* (em camundongos e plantas), ação *in vivo* no combate a patógenos (em camundongos) e avaliar a inibição de microrganismos patogênicos e deteriorantes em alimentos. Como o processo de purificação parcial apresentado neste trabalho foi realizado a partir de um cultivo em BHI (meio extremamente caro), seria de interesse obter os passos de purificação a partir do sobrenadante da cultura



realizada em soro de queijo e com etapas que sejam viáveis a nível industrial. Pode-se citar também, como perspectivas para este trabalho, a identificação química da substância antimicrobiana obtida na fração iV (que está sendo realizada no Instituto de Química da UFRGS) assim como a avaliação da sua toxicidade e ação *in vivo*.

Além disso, como foi comentado na discussão, as características surfactantes da substância antimicrobiana caracterizada fazem dela um assunto de estudo de interesse em outros campos como o de biorremediação e ação emulsificante, entre outros.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADINARAYANA et al. Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinensis* under solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v.38, p.1565-1572, 2003.
- ALI, G.S.; REDDY, S.N. Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens by synthetic peptides: in vitro growth inhibition, interaction between peptides and inhibition of disease progression. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v.13, n.8, p.847-859, 2000.
- ATRIH, A. et al. Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.68, p.93-104, 2001.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRENS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: UNICAMP, 1995, 2ed.
- 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.
- BECHARD, J. et al. Isolation and partial chemical characterization of an antimicrobial peptide produced by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Bethesda, v.46, p.5355-5361, 1998.
- BECTON DICKINSON Microbiology Systems. **Zone Diameter Interpretative Chart**. Becton Dickinson Co., Cockeysville, 1995.
- BEG, Q.K. et al. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. **Process Biochemistry**, London, v.39, p.203-209, 2003.
- BHAVNANI, S.M.; BALLOU, C.H. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v.3, p.528-534, 2000.

- 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.
- BICCA, **Avaliação da produção de biosurfactantes por bactérias biodegradadoras de hidrocarbonatos**. 1998. 104f. Mestrado (Dissertação) - Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.
- 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.
- BOCCHINI, D.A. et al. Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v.38, p.727-731, 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.
- CARRILLO, C. et al. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1611, p.91-97, 2003.
- CHERIF, A. et al. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.32, p.243-247, 2001.
- 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.
- CHIKINDAS, M.L. et al. Microbially-produced peptides having potential application to the prevention of dental caries. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.9, p.95-105, 1997.
- DAISY et al. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, London, v.148, p.3737-3741, 2002.
- DAVIES, E.A.; BEVIS, H.E.; DELVES-BROUGHTON, J. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.24, p.343-346, 1997.

- DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.61, n.1, p.47-64, 1997.
- DEVLIEGHERE, F. et al. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, Barking, (in press).
- DE VUYST, L.D.; VANDAMME, E.J. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. **Journal General of Microbiology**. London, v.138, p.571-578, 1992.
- DE VUYST, L.D.; VANDAMME, E.J. **Bacteriocins of lactic-acid bacteria: Microbiology, genetics and applications**. London: Blackie Academic & Profisional, 1994, 540p.
- DE VUYST, L., CALLEWAERT, R.; CRABBÉ, K. 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.
- DOPAZO, C.P. et al. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.64, p.97-101, 1988.
- DYKES, G.A. Bacteriocins: ecological and evolutionary significance. **Tree**, v.10 n.5, 1995.
- ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation Techiques. **Methods in Enzymology**, New York, v.182, p.285-296, 1990.
- ENNAHAR, S. et al. Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.85, p.521-526, 1998.
- FAVRET, M.E. ; YOUSTEN, A.A. Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.53, p.206-216, 1989.
- FLÔRES, S.H. **Estudo da produção do bioconservante nisina por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis***. 97f. Doutorado (Tese) – Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000.
- FONTANA, M.B.C. **Avaliação do efeito de bacteriocinas sobre microrganismos aderentes a cateter de silicone**. 2002. 88f. Mestrado (Dissertação) - Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

- GALVEZ, A. et al. Purification, characterization, and lytic activity against *Naegleria fowleri* of two amoebicins produced by *Bacillus licheniformis* A12. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.5, p.1480-1486, 1993
- GALVEZ, A. et al. Characterization and biological activity against *Naegleria fowleri* of amoebicins produced by *Bacillus licheniformis* D-13. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.38, n.6, p.1314-1319, 1994.
- 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.
- GRAVESEN, A., et al. Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p.756-764, 2002a.
- GRAVESEN, A. et al. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. **Microbiology**, London, v.148, p.2361-2369, 2002b.
- HALAMI, P.M., CHANDRASHEKAR, A. AND JOSEPH, R. Characterization of bacteriocinogenic strains of lactic acid bacteria in fowl and fish intestines and mushroom. **Food Biotechnology**, New York, v.13, p.121-136, 1999.
- HANCOCK, R.E.W. Peptide antibiotics. **The Lancet**, London, v.349, p.418-423, 1997.
- HANCOCK, R.E.W.; CHAPPLE, D.S. Peptide antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.43, n.6, p.1317-1323, 1999.
- 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.
- HECK, J.X.; HERTZ, P.F.; AYUB, A.Z. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.33, p.213-218, 2002.
- HINDLER, J.A. et al. Antimicrobial agents and antimicrobial susceptibility testing. In: HOWARD B.J. **Clinical and Pathogenic microbiology**. Mosby, St. Louis, p.145-194, 1994.
- HYRONIMUS, B.; LE MARREC, C.; URDACIM, M.C. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.85, p.42-50, 1998.

- JACOBY, G.A. Antimicrobial-resistant pathogens in the 1990s. **Annual Reviews of Medicine**, London, v.47, p.169-179, 1996.
- JACK, R.W.; TAGG, J.R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v.59, n.2, p.171-200, 1995.
- KATZUNG, B.G. **Basic and Clinical Pharmacology**. Appleton & Lange, Norwalk, USA, 1995.
- KAUFMANN, E.; GEISLER, N.; WEBER, K. SDS-PAGE strongly overestimates the molecular masses of the neurofilament proteins. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.170, p.81-84, 1984.
- KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.12, p.39-86, 1993.
- KONEMAN, E.W. et al. **Microbiology**. 5 ed. Philadelphia, 1997.
- KONZ, D.; DOEKEL, S.; MARAHIEL, M.A. Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.181, n.1, p.133-140, 1999.
- KRIER, F.; REVOL-JUNELLES, A.M.; GERMAIN, P. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.50, p.359-363, 1998.
- LEAL-SÁNCHEZ, M.V. et al. Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.9, 2002.
- LEBBADI, M. et al. Biological activity of amoebicin m4-A from *Bacillus licheniformis* M-4. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.38, n.8, p.1820-1823, 1994.
- LEE, H. SONG, M.; HWANG, S. Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**, London, v.38, p.1685-1693, 2003.
- LE MARREC et al. Biochemical and Genetic Characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I<sub>4</sub>. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.12, p.5213-5220, 2000.
- LEROY, F.; DE VUYST, L. The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potential starter

- culture for sausage fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.78, p.217-226, 1999.
- LI, C et al. Optimizing of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 93, p.27-34, 2002.
- LOPES, C.H. **Perfil de susceptibilidade-resistência de amostras de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp. de diferentes fontes clínicas.** Porto Alegre: UFRGS, 2000. 35p. Monografia. Curso de Farmácia. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.
- MACFADDIN, J.P.; LIPPINCOTT, P. **Biochemical tests for identification of medical bacteria.** Baltimore: Williams & Wilkins, 2000, 912p.
- MATARAGAS, M. et al. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. **Meat Science**, Barking, v. 64, p.265-271, 2003.
- MCAULIFFE, O.; ROSS, R.P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.25, p.285-308, 2001.
- MEDINA, L.F.C. **Caracterização da atividade antimicrobiana de uma nova série de naftoquinonas contra microrganismos fitopatogênicos e *Staphylococcus aureus*.** 2002. 70f. Mestrado (Dissertação) - Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- MENG, J.; DOYLE, M.P. Emerging and evolving microbial foodborne pathogens. **Bulletin de L'Institut Pasteur**, Paris, v.96, p.151-164, 1998.
- MIKKOLA, R. et al. Toxic lactonic lipopeptide from food poisoning isolates of *Bacillus licheniformis*. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.267, p. 4068-4074, 2000.
- MILLES, H.; LESSER, W.; SEARS, P. The economic implication of bioengineered mastitis control. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, p.596-605, 1992.
- MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Influence of growth conditions on bacteriocin production by *Brevibacterium linens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 62, p.163-167, 2003.
- MURIANA, P.M. Bacteriocins for control *Listeria* spp in food. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, Supplement, p.54-63, 1996.

- 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.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**, 2<sup>nd</sup> ed. Wayne: Lancaster, 1988. Approved standards NCCLS Document M7-A2, 1988.
- 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.
- OH, S. et al. Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT9018 in tryptone-glucose medium by using response surface methodology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.3809-3814, 1995.
- 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.; LASA, I.; PISABARRO, A.G. 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.
- OSCÁRIZ, J.C.; PISABARRO, A.G. Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.89, p.361-369, 2000.
- 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.
- PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. **Biotechnology Advances**, New York, v.21, p.465-499, 2003.
- 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.
- PEIXOTO, S.B. **Caracterização e atividade celulolítica de bactérias da região amazônica**. 2002. 96f. Mestrado (Dissertação) - Programa de Pós Graduação



- em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- PÉROMBELON, M.C.M.; KELMAND, A. Blackleg and other potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: proposal for revision of terminology. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 71, n. 3, p.283-285, 1987.
- PÉROMBELON, M.C.M.; KELMAND, A. Ecology of the soft rot *Erwinia*. **Annual Review in Phytopathology**, Palo Alto, v.12, p.361-387, 1980.
- PIURI, M.; SANCHEZ-RIVAS, C.; RUZAL, S.M. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.27, p.9-13, 1998.
- PURI, S.; BEG, Q.K.; GUPTA, R. Optimization of Alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. **Current Microbiology**, New York, v.44, p.286-290, 2002.
- RASCH, M.; KNOCHEL, S. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.27, p.275-278, 1998.
- RECH, R. **Aproveitamento de soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus***. 1998. 74f. Mestrado (Dissertação) - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.
- RILEY, M.A. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. **Annual Review Genetics**, Palo Alto, 32, 1998. p.255-278.
- RILEY, M.A.; WERTZ, J.E. Bacteriocins: evolution, ecology and application. **Annual Review Microbiology**. Palo Alto, v.56, p.117-137, 2002.
- SANTOS, W.L.M. et al. Bacteriocinas: definição e características. **Higiene Alimentar**, Campinas, v.8, n.34, 1994.
- SCANNELL, A.G.M. et al. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins Lacticin 3147 and NisaplinR. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.60, p.241-249, 2000.
- SHARGA, B.M.; LYON, G.D. *Bacillus subtilis* BS 107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.44, p.777-783, 1998.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **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.
- STACHELHAUS, T.; SCHNEIDER, A.; MARAHIEL, M.A. Engineered biosynthesis of peptide antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 52, p.177-186, 1996.
- 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.
- 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.
- SWARTZ, M.N. Minireview: Impact of Antimicrobial agents and chemotherapy from 1972 to 1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.48, n.8, p.2009-2016, 2000.
- TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria **Bacteriology Reviews**, Baltimore, v.40, p.722-756, 1976.
- TAMEHIRO, N. et al. Bacilysoicin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.46, n.2, p.315-320, 2002.
- TRAN, L.S.P. et al. Construction of a single-copy integration vector and its use to study gene expression in *Bacillus licheniformis*. **Microbiology**, London, v.144, p.2573-2578, 1998.
- 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.
- 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.
- VIGNOLO, et al. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.78, p.5-10, 1995.
- VOLLENBROICH, D. et al. Antimycoplasma properties and application in cell culture surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.1, p.44-49, 1997.

- WELLS, J.M.; LIAO, C.H.; HOTCHKISS, A.T. In vitro inhibition of soft-rotting bacteria by EDTA and nisin and in vivo response on inoculated fresh cut carrots. **Plant Diseases**, Saint Paul, v.82, p.491-495, 1998.
- 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, 1995.
- YAKIMOV, M.M. et al. Structural characterization of lichenysin A components by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1439, p.273-280, 1999.
- YILDIRIM, Z.; JOHNSON, M.G. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. **Journal of Food Protection**, Ames, v.61, n.1, p.47-51, 1997.
- 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.

## 9 APÊNDICES

### **Apêndice1: Meios utilizados na otimização da produção**

#### **Obtenção de farinha de pena hidrolisada**

Para a obtenção de farinha de pena hidrolisada foram colocadas 2,5 g farinha de pena para cada 100 mL de NaOH, 0,4N deixando sob agitação (com agitador magnético) durante 2 horas. Posteriormente foi autoclavado durante 40 minutos (121° C) e neutralizada com HCl. Após filtragem foi colocada em frascos Erlenmeyer para esterilização em autoclave durante 15 min.

#### **Obtenção de bagaço de uva 3%**

Foram pesados 18 g de bagaço de uva branca sendo colocados com 600 mL de água destilada e liquidificados. Alíquotas de 100 mL foram colocadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, sendo neutralizado o pH com solução de NaOH e autoclavados durante 15 min (121° C).

#### **Obtenção de caldo pena e caldo farinha de pena**

As penas de frango foram lavadas e secas em estufa antes de serem utilizadas. O meio líquido utilizado foi meio mineral contendo:  $K_2HPO_4$  0,3 g/L;  $KH_2PO_4$  0,4 g/L e NaCl 0,5 g/L.

## **Apêndice 2: Espectro infra-vermelho da fração III extraída com butanol**

## VITA

**Nome:** Florencia Cladera Olivera

**Data de Nascimento:** 26 de agosto de 1976

**Local de Nascimento:** Buenos Aires, Argentina

**Filiação:** Luis Eduardo Cladera Pereira e Stella María Olivera Piaggio

**Primeiro Grau:** Escuela N° 17 “Brasil” (Montevideo, Uruguay), 1988.

**Segundo Grau:** Opção Engenharia - Liceo N° 35 “Instituto Alfredo Vázquez Acevedo – IAVA” (Montevideo, Uruguay), 1995.

**Terceiro Grau:** Engenharia de alimento, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS (Porto Alegre, Brasil), 2002.

**Mestrado:** Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, UFRGS (Porto Alegre, Brasil), 2004.

**Atividade Profissional:** Bolsista voluntária (Laboratório de Bromatologia – ICTA-UFRGS -1998); Monitora de Análise de Alimentos e Bromatologia (ICTA- UFRGS - 1999), Bolsista de Iniciação Científica (ICTA- UFRGS – 2000 a 2002), Estagiária na empresa COROA – SA Indústrias Alimentares (2001).

### **Artigos publicados:**

Cladera-Olivera, F.; Caron, G.R.; Brandelli, A. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40, **Letters in Applied Microbiology** (*in press*);

Olivera, F.C. Diário de uma monitora, **Fascículos Prograd UFRGS**, n.13, p.19-26, Porto Alegre, RS, 1999.

### **Trabalhos em Eventos:**

Olivera, F.C.; Caron, G.R.; Brandelli, A. Caracterização de uma bacteriocina produzida por *Bacillus licheniformis* P40 isolado de peixe da bacia amazônica e avaliação do seu modo de ação contra *Listeria monocytogenes* e *Erwinia carotovora* (**V Simpósio Latinoamericano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 2003);

Olivera, F.C.; Caron, G.R.; Brandelli, A. Otimização da produção de uma bacteriocina por *Bacillus licheniformis* P40 em soro de queijo utilizando a metodologia de superfície de resposta (**V Simpósio Latinoamericano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 2003 – Menção Honrosa);

Olivera, F.C.; Caron, G.R.; Brandelli, A. Caracterização de uma substância antimicrobiana produzida por *Paenibacillus polymyxa* e avaliação do seu modo de ação contra *Listeria monocytogenes* (**XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Florianópolis, 2003);

Thys, R.C.S; Guzzon, S.O.; Olivera, F.C.; Brandelli, A. Otimização da produção de uma protease por *Microbacterium* sp. Utilizando a metodologia de superfície de resposta (**XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Florianópolis, 2003).