

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE UM PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO PRODUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa* 4B**

Roberta Fontoura
Farmacêutica/Bioquímica – PUCRS

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

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março, 2008

AGRADECIMENTOS

Toda lista de agradecimentos peca pela ausência de uma ou outra pessoa que teve papel, ainda que pequeno, na conclusão de um trabalho como este. Mesmo assim, arrisco-me a relacionar os nomes de alguns que participaram dessa jornada comigo, ou antes, dela forneceram-me os meios para a travessia.

Ao professor Adriano Brandelli pela oportunidade, confiança e orientação.

A Susi e ao Delmar por terem me indicado o caminho.

Aos companheiros e amigos de laboratório: Aline, Amanda, Ana Paula, Cássia, Daniel, Fernanda, Florência, Jordana, Juliana, Karina, Lisiane, Lucas, Manuela, Marilene, Melina, Natália, Nísia, Rosiele, Sabrine, Simone, Voltaire, por fazerem do laboratório um lugar ótimo de se trabalhar.

Em especial a Silvana que em todos os momentos sempre me incentivou e por sua indispensável colaboração neste trabalho.

A amiga Priscilla do laboratório de genética evolutiva pela grande ajuda.

Aos professores e funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo uso dos laboratórios e seus equipamentos.

Aos amigos de longe que tanto me incentivaram.

A Capes pela ajuda financeira.

Ao Vladimir por acreditar em mim e estar sempre ao meu lado.

A minha família pela formação que me permitiu ter, com os sacrifícios que só ela sabe quais foram. Obrigada pelo apoio, paciência, coragem, força; por acreditarem em mim e sempre estarem presentes com todo seu amor.

PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE UM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO PRODUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa* 4B

Autor: Roberta Fontoura
Orientador: Adriano Brandelli

RESUMO

Uma substância antimicrobiana produzida por *Pseudomonas aeruginosa* foi caracterizada. O microrganismo produtor foi isolado de um lago de tratamento de efluentes em um frigorífico localizado na região do vale do Rio Pardo, no Rio Grande do Sul. O isolado foi caracterizado por análise bioquímica e seqüenciamento do 16S rDNA. As condições de maior produção ocorreram a 30°C, sob agitação contínua, com o maior pico de produção a partir de 108 horas. A substância antimicrobiana foi parcialmente purificada através de precipitação com sulfato de amônio 70%, cromatografia de gel filtração (Sephadex G-100) e de troca iônica (DEAE Sepharose). A substância antimicrobiana foi caracterizada com as duas alíquotas coletadas a partir do eluato da coluna de gel filtração. Os dados da caracterização indicam que ambas as alíquotas são a mesma substância. A atividade antimicrobiana foi analisada sobre o gel de poliacrilamida. Uma banda majoritária no gel de poliacrilamida sugere que o peptídeo apresente uma massa molecular de aproximadamente 30 kDa. A substância apresentou uma ampla atividade antimicrobiana sobre cepas indicadoras, tais como *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* e importantes bactérias patogênicas e deteriorantes. A atividade antimicrobiana foi constante na faixa de 10 a 100°C, por até 60 minutos, iniciando um declínio a 120°C. O peptídeo antimicrobiano resistiu a todas as proteases testadas e teve sua atividade diminuída com DMSO, Tween 20 e 80, TCA e uréia. A substância parcialmente purificada foi utilizada no combate de *S. aureus* artificialmente inoculados em hambúrgueres crus de carne bovina e não inibiu seu crescimento nas condições do experimento.¹

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (125p.). Março, 2008.

PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN ANTIMICROBIAL PEPTIDE PRODUCED BY *Pseudomonas aeruginosa* 4B

Author: Roberta Fontoura
Advisor: Adriano Brandelli

ABSTRACT

An antimicrobial substance produced by *Pseudomonas aeruginosa* was characterized. The producer microorganism was isolated from an effluents treatment lake from an abattoir localized in Rio Pardo valley area, Rio Grande do Sul, Brazil. The strain was characterized by chemical profiling and 16S sequencing. It has reached its maximum of production under the following conditions: 86°F, continuous agitation and aeration, 108 h. The antimicrobial substance was partially purified by ammonium sulfate precipitation 70%, gel filtration (Sephadex G-100) and ion exchange chromatography (DEAE Sepharose). The antimicrobial substance was characterized into two fractions collected from gel filtration's eluate. The characterization data indicates that both fractions are the same substance. Direct activity on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was observed. A major band on SDS-PAGE suggested that the peptide had a molecular mass of about 30 kDa. The substance was inhibitory to a broad range of indicator strains such as *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, and important pathogenic and spoilage bacterias. The activity was constant from 50 to 212°F, for 60 minutes, beginning to decline at 248°F. The antimicrobial peptide resisted to all proteolytic enzymes tested and only reduced its activity with dimethyl sulfoxide, polysorbate 20, polysorbate 80, trichloroacetic acid and urea. The partially purified substance was used to combat *S. aureus* in meat hamburgers and didn't inhibit its growth at the experiment conditions.²

² Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (125p.). March, 2008.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Antimicrobianos.....	3
2.2. Peptídeos antimicrobianos.....	4
2.3. Bacteriocinas.....	6
2.3.1. Histórico.....	6
2.3.2. Definição.....	6
2.3.3. Bacteriocinas de bactérias Gram-negativas.....	8
2.3.4. Bacteriocinas de bactérias Gram-positivas.....	11
2.3.5. Bacteriocinas de Archaea.....	12
2.3.6. Classificação das bacteriocinas.....	13
2.3.7. Função e modo de ação das bacteriocinas.....	16
2.4. Bacteriocinas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
2.4.1. Histórico.....	18
2.4.2. Definição.....	19
2.4.3. Produção das piocinas.....	20
2.4.4. Tipos de piocinas.....	22
2.4.5. Comparação das seqüências dos aminoácidos das piocinas S e das colicinas.....	28
2.4.6. Regulação da síntese de piocinas.....	29
2.4.7. Relações entre os genes das piocinas do tipo R e F e os genes dos bacteriófagos e evolução.....	32
2.4.8. Função fisiológica das piocinas.....	34
2.5. Aplicações das bacteriocinas.....	35
2.5.1. Aplicação em alimentos.....	35
2.5.2. Aplicação das bacteriocinas na saúde.....	38
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1. Equipamentos.....	42
3.2. Meios de cultura.....	43
3.3. Reagentes.....	43
3.4. Microrganismo produtor.....	44
3.4.1. Seleção do microrganismo produtor de atividade antimicrobiana.....	44
3.4.2. Microrganismos indicadores utilizados na seleção do microrganismo com atividade antimicrobiana.....	45
3.4.3. Caracterização citomorfológica, bioquímica e fisiológica do microrganismo com atividade antimicrobiana.....	46

3.4.4.	Análise filogenética	46
3.4.5.	Detecção da produção de piocianina	47
3.5.	Microrganismos indicadores.....	47
3.6.	Manutenção dos microrganismos indicadores	51
3.7.	Determinação do número de células viáveis dos microrganismos	51
3.8.	Obtenção do sobrenadante da cultura de <i>P. aeruginosa</i>	52
3.8.1.	Preparação do pré-inóculo	52
3.8.2.	Obtenção do sobrenadante bruto.....	52
3.9.	Determinação das unidades arbitrárias por mililitro.....	52
3.10.	Curva de crescimento e produção	53
3.10.1.	Preparação do pré-inóculo	53
3.10.2.	Curva de crescimento	54
3.11.	Purificação.....	54
3.11.1.	Precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	55
3.11.2.	Cromatografia de gel filtração	56
3.11.3.	Cromatografia de troca iônica (DEAE Sepharose).....	57
3.11.4.	Eletroforese em gel de poliacrilamida	57
3.11.5.	Determinação da concentração de proteína solúvel	58
3.12.	Caracterização das frações II e III	58
3.12.1.	Espectro de ação	59
3.12.2.	Estabilidade térmica	59
3.12.3.	Estabilidade frente ao pH e ação em diferentes pHs	60
3.12.4.	Estabilidade frente a solventes orgânicos, detergentes e outras substâncias químicas.....	61
3.12.5.	Atividade como biosurfactante	62
3.12.6.	Determinação da atividade proteolítica com azocaseína	62
3.13.	Efeitos da substância antimicrobiana sobre o crescimento de microrganismos	63
3.13.1.	Determinação do efeito e modo de ação do sobrenadante bruto contra <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	63
3.13.2.	Determinação da concentração inibitória mínima	64
3.13.3.	Determinação da concentração bactericida mínima	64
3.13.4.	Curva dose resposta	65
3.14.	Avaliação da atividade da fração II em hambúrgueres bovinos artificialmente contaminados	65
3.14.1.	Seleção e armazenamento dos hambúrgueres de carne bovina.....	65
3.14.2.	Tratamento dos hambúrgueres de carne bovina.....	66
3.14.3.	Avaliação da atividade da fração II em hambúrguer de carne bovina.....	66
4.	RESULTADOS	68
4.1.	Microrganismo produtor	68
4.1.1.	Caracterização citomorfológica, bioquímica e fisiológica ...	68
4.1.2.	Análise filogenética	69
4.1.3.	Detecção da produção de piocianina	72
4.2.	Curva de crescimento e produção da <i>P. aeruginosa</i> 4B	72

4.3.	Purificação parcial da substância antimicrobiana.....	73
4.3.1.	Precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	73
4.3.2.	Cromatografia líquida de gel filtração (Sephadex G-100) ..	75
4.3.3.	Cromatografia de troca iônica (DEAE Sepharose).....	76
4.3.4.	Eletroforese em gel de poliacrilamida	78
4.4.	Caracterização da fração II e III	80
4.4.1.	Espectro de ação	80
4.4.2.	Estabilidade térmica da substância antimicrobiana.....	84
4.4.3.	Estabilidade e atividade da substância antimicrobiana em diferentes pHs.....	85
4.4.4.	Estabilidade da substância antimicrobiana frente a enzimas proteolíticas.....	86
4.4.5.	Estabilidade da substância antimicrobiana frente a solventes orgânicos, detergentes e outras substâncias químicas.....	88
4.4.6.	Atividade da substância antimicrobiana como biosurfactante	90
4.4.7.	Determinação da atividade proteolítica da substância antimicrobiana com azocaseína.....	90
4.4.8.	Determinação do efeito do sobrenadante bruto contra <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	91
4.4.9.	Determinação da concentração inibitória mínima	92
4.4.10.	Determinação da concentração bactericida mínima	95
4.4.11.	Curva dose resposta	96
4.5.	Avaliação da atividade da fração II em hambúrgueres bovinos artificialmente contaminados	97
4.5.1.	Avaliação da atividade da fração II em hambúrguer de carne bovina frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	97
5.	DISCUSSÃO	100
6.	CONCLUSÕES	111
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das bacteriocinas	14
Tabela 2 - Microrganismos indicadores utilizados e condições de crescimento	49
Tabela 3 - Resultados dos testes bioquímicos e morfológicos do microrganismo selecionado.....	69
Tabela 4 - Dados de purificação para as diferentes frações obtidas na precipitação fracionada com sulfato de amônio.	74
Tabela 5 - Dados da purificação mostrando as frações obtidas nos diferentes passos da purificação parcial da substância antimicrobiana.	78
Tabela 6 - Espectro de ação da fração I, II e III de acordo com o halo de inibição (mm).....	82
Tabela 7 - Atividade residual da fração II após o tratamento com enzimas proteolíticas.....	87
Tabela 8 - Atividade residual da fração III após o tratamento com enzimas proteolíticas.....	88
Tabela 9 - Efeito de diferentes substâncias químicas na atividade antimicrobiana da fração II e III	89
Tabela 10 - Comparação da atividade proteolítica do sobrenadante bruto e das frações I, II, III e IV.....	90
Tabela 11 - Resultados dos testes para a determinação da CIM e CBM da fração I contra <i>B. cereus</i> ATCC 14579 e <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	93
Tabela 12 - Resultados dos testes para a determinação da CIM e CBM da fração II contra <i>B. cereus</i> ATCC 14579 e <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	94
Tabela 13 - Resultados dos testes para a determinação da CIM e CBM da fração III contra <i>B. cereus</i> ATCC 14579 e <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	95

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema representativo da piocina R. (ES) bainha estendida constituída por 34 anéis, sendo cada um deles composto por 6 subunidades; (CS) bainha contraída, terminando na base da placa (BP) com as fibras da cauda (TFi), revelando o *core*. Fonte: Michel-Briand & Baysse (2002). 23
- Figura 2** - Microscopia eletrônica da piocina R purificada. X 195.000. Fonte: Higerd et al. (1967)..... 24
- Figura 3** - Estrutura esquemática da piocina F. Ela se parece com um bastão flexível e não-contrátil constituído de 23 anéis e a parte distal (DP) de onde saem as fibras (Fi), composta de 3 filamentos com algumas estruturas globulares. Fonte: Michel-Briand & Baysse (2002). 25
- Figura 4** - Microscopia eletrônica da piocina F1 purificada – 100 nm x 124.000 Fonte: Kuroda et al. (1979)..... 26
- Figura 5** - Seqüência de nucleotídeos da P box em uma região não-codificante acima dos genes das piocinas S1, S2, AP41 e S3. Estas seqüências consenso em que o ATTGnn(n)GTnn(n) é repetido quatro vezes, estão envolvidas na regulação dos promotores das piocinas via ativação transcripcional PrtN. Os números indicam as posições dos nucleotídeos dos finais 5' das seqüências publicadas. As regiões repetidas na P box são marcadas em azul. Fonte: Michel-Briand & Baysse (2002)..... 30
- Figura 6** - Regulação da atividade dos genes das piocinas. (I) Na ausência de um indutor, poucas células produzem piocinas, pois o ativador da proteína PrtN é reprimido pelo repressor PrtR (*recA* produz poucas moléculas da proteína RecA). (II) Na presença de um agente mutagênico (MA) causador de dano ao DNA, ocorre um aumento na expressão do gene *recA* que codifica a proteína RecA de reparo ao DNA e ativa a proteína RecA em RecA*, que cliva a proteína repressora PrtR e libera a expressão do ativador PrtN: que os promotores das piocinas e estas são então sintetizadas. A SOS box e P box são representadas pelas caixas azul e preta, respectivamente. Fonte: Michel-Briand & Baysse (2002). 31
- Figura 7** - Esquema de purificação da substância antimicrobiana 55
- Figura 8** - Árvore filogenética indicando a posição do isolado de *Pseudomonas* sp. 4B (indicado pela seta) entre representantes do gênero *Pseudomonas*, obtida a partir da seqüência do rDNA 16S através do método de *neighbor-joining*. Os números sobre os ramos indicam os valores de *bootstrap*. 71
- Figura 9** – Detecção de piocianina, pigmento verde-azulado em meio de cultura para detecção do pigmento piocianina. 72
- Figura 10** - Curva de crescimento e produção de atividade antimicrobiana. A densidade óptica (●), e a atividade antimicrobiana (o) foram monitoradas. ICTA-UFRGS, 2007..... 73
- Figura 11** - Atividade específica (UA/mg) para cada uma das frações obtidas durante a saturação com sulfato de amônio. SN: sobrenadante bruto. ICTA-UFRGS, 2007. 74
- Figura 12** - Perfil de eluição do precipitado (0-70%) em coluna de gel filtração Sephadex G-100. A absorbância a 280 nm (●) e a atividade antimicrobiana em UA/mL (o) foram determinadas para cada fração coletada. ICTA-UFRGS, 2007. 76

Figura 13 - Perfil de eluição da fração II em coluna de troca-iônica (DEAE Sepharose), com tampão tris 10 mM pH 7,5 até a alíquota 10. A absorbância a 280 nm e a antimicrobiana em UA/mL (▪) foram determinadas para cada fração coletada. O gradiente de NaCl é apresentado através da linha tracejada. ICTA-UFRGS, 2007.....	77
Figura 14 – Gel de atividade antimicrobiana contra <i>B. cereus</i> ATCC 14579 do precipitado e da fração IV. ICTA-UFRGS.....	79
Figura 15 – Eletroforese: gel de poliacrilamida corado com prata apresentando as bandas de proteína da fração IV e do marcador molecular. ICTA-UFRGS, 2007.	79
Figura 16 – Eletroforese: gel corado com prata com as bandas de proteína das frações II e III. ICTA-UFRGS, 2007.....	80
Figura 17 - Estabilidade térmica da substância antimicrobiana da fração III após incubação em diferentes temperaturas durante 30 min demonstrando sua atividade residual (AR). ICTA-UFRGS, 2007.....	84
Figura 18 – Avaliação da atividade antimicrobiana da fração II (●) e fração III (o) em diferentes pHs. ICTA-UFRGS, 2007.	85
Figura 19 – Avaliação da estabilidade da substância antimicrobiana da fração II (●) e da fração III (o) em diferentes pHs. ICTA-UFRGS, 2007.	86
Figura 20 - Efeito do sobrenadante bruto da <i>P. aeruginosa</i> 4B sobre <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579. Após 4:30 min. (indicado pela seta) foi adicionado o sobrenadante com uma concentração final de 320 UA/mL. As UFC/mL foram acompanhadas no controle (●) e no tratado (o). ICTA-UFRGS, 2007.	91
Figura 21 - Efeito do sobrenadante bruto da <i>P. aeruginosa</i> 4B sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. Após 4:30 min. (indicado pela seta) foi adicionado o sobrenadante com uma concentração final de 320 UA/mL. As UFC/mL foram acompanhadas no controle (●) e no tratado (o). ICTA-UFRGS, 2007.	92
Figura 22 - Curva dose-resposta contra <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 com a fração II (●) e com a fração III (o). ICTA-UFRGS, 2007.....	96
Figura 23 - Contagem das UFC/mL do grupo de controle positivo na avaliação da atividade da fração II em hambúrguer de carne bovina.	98
Figura 24 - Contagem das UFC/mL do grupo teste (fração II + <i>S. aureus</i>) na avaliação da atividade da fração II em hambúrguer de carne bovina.	99

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: *American Type Culture Collection*
BA: ágar sangue
BHI: infusão de cérebro e coração
BHA: ágar de cérebro e coração
°C: graus Celsius
EDTA: etilenodiaminotetracético
°F: graus Fahrenheit
FAO: *Food and Agriculture Organization*
FDA: *Food and Drug Administration*
g: unidade de medida da força centrífuga relativa
GRAS: *generaly regarded as safe*
ICTA: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFRGS
LPS: lipopolissacarídeo
mA: miliamperagem
MHA: ágar Müller Hinton
Min: minuto
mL: mililitro
MRS: Man Rogosa e Sharpe
MRSA: ágar Man Rogosa e Sharpe
MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina
NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
NCTC: *National Collection of Type Cultures*
OMS: Organização Mundial da Saúde
PA: ágar batata
pb: pares da base
PBS: solução tampão fosfato salina
PCR: *Polimerase Chain Reaction*
rpm: rotações por minuto
SDS: dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
seg: segundos
TCA: ácido tricloroacético
TRIS: hidroximetilaminometano
TSA: ágar triptona de soja
TSB: caldo triptona de soja
UA: unidades arbitrárias
UFC: unidades formadoras de colônias
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UI: unidades internacionais
µL: microlitro

1. INTRODUÇÃO

A deterioração de alimentos causada por microrganismos leva a perdas econômicas significativas, além das toxinfecções e de seus prejuízos econômico-sanitários. Os problemas de segurança alimentar ainda não foram resolvidos mesmo tendo em mãos diversas técnicas de manipulação e conservação dos alimentos. Surto de infecções alimentares de origem microbiana ainda ocasionam muitos óbitos, tendo um custo de vários bilhões de dólares todo ano. Além disso, descobertas que nitrosaminas carcinogênicas são formadas a partir de nitritos, trazem preocupações a respeito da segurança dos aditivos utilizados nos alimentos.

A busca de uma alimentação mais saudável está promovendo uma procura por novas substâncias consideradas “naturais” para uma boa conservação dos alimentos. As bactérias produzem várias moléculas com atividade antimicrobiana, tal como os antibióticos, enzimas líticas e bacteriocinas, para defenderem seu nicho ecológico contra os competidores. Algumas dessas substâncias podem ser empregadas de diferentes formas na inibição do crescimento bacteriano, tornando-se alvo de pesquisas das indústrias farmacêuticas e de alimentos.

As bacteriocinas vêm recebendo muita atenção, principalmente pelo seu potencial como um conservante “natural” de alimentos, além de poderem ser aplicadas como aditivos no controle e preservação de alimentos, principalmente contra microrganismos patogênicos. Até o momento, a nisina é a única bacteriocina aprovada, para uso em aproximadamente 50 países, incluindo o Brasil.

Além de problemas na segurança alimentar, vem rapidamente aumentando a resistência bacteriana aos mais diversos antibióticos disponíveis. O advento da resistência bacteriana tem diminuído a possibilidade nos tratamentos clínicos, tornando-se um grave problema de saúde pública em todo o mundo. A resistência bacteriana vem aumentando rapidamente devido ao mau uso dos antibióticos, tanto por clínicos, pacientes e também pelo uso indiscriminado na ração animal. As poucas medidas que podemos tomar incluem o uso racional dos antibióticos e maiores cuidados na eliminação de cepas resistentes no ambiente, como dejetos provenientes de hospitais.

O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial antimicrobiano, purificar e caracterizar uma substância antimicrobiana produzida por uma bactéria isolada das águas de tratamento de efluentes de um frigorífico da região do vale do Rio Pardo, Rio Grande do Sul.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antimicrobianos

Antimicrobianos são substâncias utilizadas na inibição ou destruição de populações microbianas, que interferem de diferentes maneiras em seu crescimento. Podem ter origem natural (produzidos por microrganismos), sintética ou semi-sintética (Tripathi, 2006).

Os agentes antimicrobianos podem ser classificados pela sua estrutura química, mecanismo de ação, tipos de microrganismos contra os quais são primariamente ativos, espectro de atividade, tipo de ação (bacteriostática ou bactericida) e através de sua origem (produzidos por fungos ou bactérias) (Tripathi, 2006).

O problema atual com os antibióticos é a elevada taxa de multiresistência dos microrganismos, que pode ser decorrente de uma resistência natural ou adquirida. Essa resistência pode ser adquirida através de mutação ou transferência gênica (conjugação, transdução e transformação) (Tripathi, 2006).

O desenvolvimento e a descoberta de um novo antimicrobiano é uma tarefa muito difícil, pois demanda anos de pesquisa, além de ser extremamente dispendioso para as indústrias farmacêuticas. Mais comumente, o que ocorre são modificações estruturais nas moléculas já existentes sendo a criação de uma nova classe uma situação excepcional (Caierão et al., 2004).

2.2. Peptídeos antimicrobianos

A produção de peptídeos antimicrobianos não ocorre somente em bactérias, mas sim em diversos organismos estudados até o momento, como, por exemplo, plantas, animais invertebrados e vertebrados e microrganismos. (Joerger, 2003). Os peptídeos antimicrobianos são uma estratégia de proteção observada na natureza e milhares deles já foram isolados dos organismos vivos (De Simone & Souza, 2002).

Peptídeos com atividade antimicrobiana podem ser divididos, dependendo de sua biossíntese, em duas classes: classe I, peptídeos não-sintetizados ribossomicamente, como a gramicidina, a polimixina, a bacitracina, os glicopeptídeos, e classe II, os peptídeos sintetizados ribossomicamente. Os primeiros contêm, em geral, aminoácidos modificados são amplamente sintetizados por bactérias, enquanto os segundos são sintetizados pelos mais diversos organismos como moléculas de defesa (Baba & Schneewind, 1998; Hancock & Chapple, 1999).

Apesar dos peptídeos antimicrobianos possuírem características estruturais diversificadas, em sua maioria são peptídeos catiônicos, que podem ser classificados em cinco principais grupos (lineares com estrutura β , lineares

com α -hélice, lineares com ombros, cíclicos com alça e derivados de grandes peptídeos de função desconhecida) dependendo de sua estrutura primária e secundária. Possuem natureza anfifílica, podem ser lineares ou cíclicos, com tamanho que varia de 30 a 100 resíduos e uma grande variedade de aminoácidos em sua composição (De Simone & Souza, 2002).

Os fatores determinantes dos mecanismos de atividade microbicidas desses peptídeos estão relacionados às características das membranas celulares das células microbianas e a natureza físico-química do peptídeo (Liang & Kim, 1999). A atividade e a seletividade dos peptídeos catiônicos são determinadas pelo modo de interação com as membranas celulares dos microrganismos.

Os microrganismos têm desenvolvido estratégias que permitem evitar ou impedir a atividade microbicida do hospedeiro ao agente microbiano. A resistência adquirida a peptídeos parece ser inata e/ou não adquirida e controlada transcricionalmente (De Simone & Souza, 2002). O determinante para a resistência bacteriana aos peptídeos antimicrobianos pode ser dividido em tipos ou classes: (I) interferência na capacidade de achar o alvo (ex. modificação do LPS); (II) inibição ou destruição da atividade biológica do peptídeo (membrana externa ou atividade peptidásica); (III) restauração do balanço fisiológico perturbado como consequência da ação do peptídeo, controlado por locus específico (Groisman, 1998).

2.3. Bacteriocinas

2.3.1. Histórico

No final do século XIX, Pasteur e Joubert relataram a ocorrência de interações antagonísticas entre bactérias ao observar que um isolado bacteriano era capaz de interferir com o crescimento do *Bacillus anthracis*. Da mesma forma, em 1885, uma ação inibitória manifestada por *Staphylococcus* sp., interagindo com *Corynebacterium diphtheriae*, também foi observada. Esse isolado passou a ser utilizado no tratamento da difteria na época, sob forma de nebulizadores para a aplicação nasal. Contudo, foi Gratia (1925), na Bélgica, o primeiro a elucidar os mecanismos neste processo de interação microbiana, ao observar que células de *Escherichia coli* produziam em meio líquido de cultura, uma substância termoestável e dializável, capaz de inibir, em baixas concentrações, o crescimento de outro isolado da mesma espécie (De Souza et al., 2005; Garcia-Quintana, 1992).

O termo bacteriocina foi inicialmente proposto por Jacob et al. (1953), para descrever a atividade inibitória exibida por certas bactérias sobre espécies afins.

2.3.2. Definição

Bacteriocinas são compostos de natureza protéica letais a outras bactérias que não a cepa produtora. Como um grupo, as bacteriocinas são heterogêneas e elas são classificadas baseadas principalmente nas diferenças

de pesos moleculares (Klaenhammer, 1993). Algumas bacteriocinas são peptídeos que apresentam apenas de 19 a 37 aminoácidos, enquanto outras são peptídeos maiores com peso molecular acima de 90 kDa. Algumas pequenas bacteriocinas contêm aminoácidos incomuns, originados através de modificações de aminoácidos convencionais através de translocações (Joerger, 2003).

O espectro de atividade das bacteriocinas pode ser estreito e confinado a inibir somente espécies proximamente relacionadas, ou pode ser relativamente amplo e incluir diferentes espécies de bactérias (Tagg et al., 1976).

A maioria das bacteriocinas são moléculas pequenas, apresentam um elevado ponto isoelétrico e contêm propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas (Barreto et al., 2004).

As bacteriocinas e as moléculas parecidas com bacteriocinas são diretamente produzidas como polipeptídeos, sintetizadas nos ribossomos, ou como polipeptídeos precursores. As bacteriocinas de baixo peso molecular sintetizadas por bactérias Gram-positivas demonstram atividade direcionada principalmente contra certas bactérias Gram-positivas. Por exemplo, o protótipo do lantibiótico nisina foi demonstrado ser efetivo contra muitas linhagens de bactérias Gram-positivas (Jack et al., 1995, Montville & Kaiser, 1993).

A nisina é atualmente a única bacteriocina considerada *Generally Regarded as Safe* (GRAS), status conferido pelo órgão norte-americano *Food and Drug Administration* (FDA). Esta bacteriocina é produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. A nisina foi reconhecida como aditivo alimentar pela Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial de

Saúde (FAO/OMS) em 1969, com o limite máximo de ingestão de 33.000 Unidades Internacionais/Kg de peso corpóreo. Diversos países permitem o uso da nisina em produtos como os derivados lácteos, queijo, leite, tomates e outros vegetais enlatados, sopas enlatadas, maionese e alimentos infantis. No Brasil, a nisina é aprovada para uso em todos os tipos de queijo no limite máximo de 12,5 mg/Kg e nosso país é pioneiro na utilização desta bacteriocina em produtos cárneos, sendo permitida a sua aplicação na superfície externa de salsichas de diferentes tipos (De Martinis et al., 2002; De Martinis & Freitas, 2003).

Em contraste com os atuais antibióticos, as bacteriocinas são freqüentemente consideradas mais naturais, pois estas estão presentes em vários alimentos desde tempos antigos (Cleveland et al., 2001). Além disso, os antibióticos não estão incluídos no mesmo grupo das bacteriocinas, pois não são sintetizados ribossomicamente (Nissen-Meyer & Nes, 1997).

2.3.3. Bacteriocinas de bactérias Gram-negativas

A família das bacteriocinas inclui uma diversidade de proteínas em termos de tamanho, alvo microbiano, modo de ação e mecanismos de imunidade (Riley & Wertz, 2002). As colicinas e as microcinas são as bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram-negativas mais estudadas. As microcinas são peptídeos pequenos que alcançam um tamanho de até 10 kDa. No entanto, as colicinas são proteínas relativamente grandes (González-Pastor et al., 1995).

As colicinas são produzidas pela *Escherichia coli*. Os genes das colicinas são codificados no plasmídeo, que apresenta também os genes de imunidade à célula produtora (codificam uma proteína que confere imunidade específica à célula produtora mediante ligação e inativação da toxina) e também um gene de lise (codifica uma proteína envolvida na liberação da colicina mediante a lise da célula produtora).

A produção de colicina é mediada pela resposta do sistema SOS, e por esta razão, é produzida principalmente em condições de estresse. No entanto, condições ambientais específicas também influenciam fortemente a expressão das colicinas. A toxina é letal para a célula produtora como para qualquer célula vizinha. Um domínio receptor na proteína colicina, que une um receptor de superfície de uma célula específica determina o alvo de reconhecimento. Esta forma específica de reconhecimento propicia uma faixa filogenética relativamente estreita de antagonismo freqüentemente referido para as bacteriocinas (Riley & Wertz, 2002).

O modo de ação das bacteriocinas varia da formação de poros na membrana celular, até a atividade de nuclease contra alvos de DNA, rRNA e tRNA. As colicinas formadoras de poros são proteínas grandes produzidas por bactérias Gram-negativas, cujo tamanho varia de 449 até 629 aminoácidos. As bacteriocinas com atividade de nuclease têm um tamanho mais variável, de 178 até 777 aminoácidos (Riley & Wertz, 2002).

Em média, 30% da população de *E. coli* produzem colicinas e 25 tipos diferentes de colicinas já foram caracterizados. No entanto, cada estudo de população microbiana diferencia a combinação das colicinas sintetizadas, e geralmente há uma dominante entre os presentes. Numerosas células

microbianas são resistentes a uma ou mais colicinas, com uma média de 70% sendo resistente a somente um tipo de colicina e 30% resistentes a todas colicinas produzidas (De Souza et al., 2005).

Embora as colicinas representem as bacteriocinas de bactérias Gram-negativas, há intrigantes diferenças encontradas dentro deste subgrupo da família das bacteriocinas. A *E. coli* codifica as colicinas exclusivamente nos plasmídeos, enquanto que as piocinas, produzidas pela *Pseudomonas aeruginosa*, têm sido localizadas exclusivamente no cromossomo. As piocinas mostram similaridade de seqüência com as colicinas e outras bacteriocinas, ainda não caracterizadas. As bacteriocinas da bactéria *Serratia marcescens* são proximamente relacionadas à família das colicinas, e são encontradas tanto no plasmídeo quanto no cromossomo (Riley & Wertz, 2002).

Muitas bacteriocinas isoladas de bactérias Gram-negativas parecem ter ocorrido por recombinação entre bacteriocinas existentes. Tal freqüência de recombinação é facilitada pela estrutura do domínio das bacteriocinas. Nas colicinas, o domínio central abrange cerca de 50% das proteínas e é envolvido no reconhecimento de receptores de superfície de células específicas. O domínio amino-terminal (aproximadamente 25% da proteína) é responsável pela translocação da proteína dentro da célula alvo. O resto da proteína abriga o domínio tóxico e a região de imunidade. Embora as piocinas produzidas pela *P. aeruginosa* apresentem um domínio estrutural similar, os domínios de translocação e reconhecimento do receptor estão trocados. A estrutura dos domínios dessas bacteriocinas é responsável, em grande parte, pela diversidade de bacteriocinas que encontramos na natureza (Riley & Wertz, 2002).

2.3.4. Bacteriocinas de bactérias Gram-positivas

As bacteriocinas de bactérias Gram-positivas são mais abundantes e diversas que aquelas encontradas nas bactérias Gram-negativas. Elas diferem das bacteriocinas das bactérias Gram-negativas em dois aspectos fundamentais. Primeiro, a produção das bacteriocinas não é necessariamente um evento letal como ocorre nas bactérias Gram-negativas. Esta diferença crítica é devida aos mecanismos de transporte das bactérias Gram-positivas para a liberação das bacteriocinas. Algumas possuem um sistema de transporte específico de bacteriocinas, enquanto que outras usam uma via de exportação *sec*-dependente. Em segundo lugar, as bactérias Gram-positivas têm desenvolvido uma forma de regulação mais complexa que as das bactérias Gram-negativas. Além disso, as bacteriocinas de bactérias Gram-positivas são, em sua maioria, pequenos peptídeos (Jack et al., 1995; Riley & Wertz, 2002).

As bacteriocinas de bactérias Gram-positivas e, em particular os lantibióticos, requerem muito mais genes para sua expressão do que as bactérias Gram-negativas. Por exemplo: o agrupamento de genes necessários para a síntese da nisina inclui o gene pré-peptídeo (*nisA*); os genes para as enzimas que modificam aminoácidos (*nisB*, *nisC*); o gene de clivagem do peptídeo líder (*nisP*); o gene da secreção (*nisT*); e os genes para a imunidade (*nisR*, *nisK*). Estes grupos de genes se localizam geralmente em plasmídeos, mas também são ocasionalmente encontrados no cromossomo. Muitas bacteriocinas de bactérias Gram-positivas, incluindo a nisina, estão localizadas em *transposons* (Riley & Wertz, 2002).

É conhecido que a faixa de ação inibitória das bacteriocinas de Gram-positivas se restringe as bactérias Gram-positivas. No entanto, o alcance de

ação pode variar significativamente, de uma faixa relativamente restrita, como nos casos das lactococinas A, B e M, as quais somente inibem o *Lactococcus* spp., até uma faixa extremamente ampla, como, por exemplo, alguns antibióticos do tipo A, nisina A e a mutacina B-Ny266, que são capazes de inibir uma ampla faixa de organismos, incluindo espécies dos gêneros *Actinomyces* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Gardnerella* spp., *Lactococcus* spp., *Listeria* spp., *Micrococcus* spp., *Mycobacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. Ao contrário do que se conhece para outras bacteriocinas, a nisina A e a mutacina B-Ny266, são também ativas contra um número de bactérias Gram-negativas de importância médica, incluindo bactérias dos gêneros *Campylobacter* spp., *Haemophilus* spp., *Helicobacter* spp. e *Neisseria* spp. (De Vuyst & Vandamme, 1994).

A produção de bacteriocinas por bactérias Gram-positivas está geralmente associada com a troca da fase *log* para a fase estacionária. A produção de nisina inicia na metade da fase logarítmica e aumenta ao máximo quando as células entram na fase estacionária. A regulação da expressão não é dependente do ciclo celular, mas, sim, da densidade do cultivo (De Vuyst & Vandamme, 1994).

2.3.5. Bacteriocinas de Archaea

As Archaea são organismos procariotos e quimiotróficos, hoje considerados um domínio do Reino Monera. Elas produzem sua própria família de compostos antimicrobianos, conhecidos como archaeocinas. A família das

halocinas produzidas por halobactérias é até o momento a única caracterizada, e poucas halocinas têm sido descritas em detalhes. A primeira halocina descoberta, S8, é um peptídeo hidrofóbico curto de 36 aminoácidos, cuja proteína precursora é de 34 kDa e a halocina S8 é codificada por um megaplasmídeo. Estas halocinas são muito resistentes, não perdem a atividade por dessalinização, fervura, presença de solventes orgânicos e armazenamento a 4°C por períodos extensos. O mecanismo de ação tem sido estabelecido unicamente para a halocina H6 (um inibidor “antiporter” Na⁺ / H⁺) e o mecanismo de imunidade ainda é desconhecido (Riley & Wertz, 2002).

As archaeocinas são produzidas no início da fase estacionária. Quando as fontes de nutrientes são limitadas, as células produtoras lisam as células sensíveis e enriquecem de nutrientes o meio ambiente local. Assim, as proteínas estáveis podem permanecer no meio ambiente o tempo necessário para inibir a seus competidores, e subseqüentes condições de fluxo de nutrientes (Riley & Wertz, 2002).

2.3.6. Classificação das bacteriocinas

Segundo Diep & Nes (2002), as bacteriocinas podem ser divididas em três grandes classes, segundo a Tabela 1.

Tabela 1 Classificação das bacteriocinas

Categoria principal	Subcategoria
Classe I - lantibióticos	Tipo A – moléculas alongadas Tipo B – moléculas globulares
Classe II - bacteriocinas não modificadas, termoestáveis	Classe IIa – bacteriocinas tipo pediocina Classe IIb – bacteriocinas com dois peptídeos; outras bacteriocinas
Classe III – bacteriocinas grandes, termolábeis	

a) Classe I: contém bacteriocinas modificadas, denominadas lantibióticos, que são pequenos peptídeos (<5 kDa) encontradas entre diversas bactérias Gram-positivas, sendo também identificadas em bactérias Gram-negativas. Os aminoácidos residuais modificados, lantionina e metilantionina (daí a denominação lantibióticos) são formados após a translocação. Este processo ocorre pela desidratação de uma serina ou treonina criando dideidroalanina e didehidrobutirina, respectivamente, seguida pela formação de pontes de dissulfeto com cisteínas vizinhas para dar lugar a lantionina e a metilantionina dos seus respectivos aminoácidos residuais. Os dois aminoácidos desidratados podem também existir como tal em um lantibiótico. Um número de outras modificações já foram encontrados em certos lantibióticos e em particular a descoberta de três resíduos de D-alanina entioméricas em lactocina S. Desde então, mais lantibióticos foram identificados contendo resíduos de D-alanina (Diep & Nes, 2002).

Em geral, os lantibióticos são subdivididos em duas subclasses: A) os peptídeos lineares e catiônicos e B) os peptídeos globulares, que normalmente são hidrofóbicos, mas não catiônicos. A maior diferença entre essas duas subcategorias está nos modos de ação. Enquanto os peptídeos lineares são principalmente ativos na membrana, os peptídeos globulares são inibidores

enzimáticos ou inibidores da síntese da parede celular, RNA ou DNA. No entanto, recentes descobertas indicam que esta classificação é um pouco arbitrária porque parece existir bacteriocinas com multi-modo de ação, pertencendo a ambas categorias (Diep & Nes, 2002).

b) Classe II: é composta por bacteriocinas pequenas e termoestáveis que perderam as modificações pós-traslacionais, como as encontradas nos lantibióticos. As bacteriocinas de classe II parecem ser mais abundantes que as bacteriocinas de classe I e são separadas em dois subgrupos: IIa) bacteriocinas tipo pediocina e IIb) bacteriocinas com dois peptídeos. Subclasses adicionais das bacteriocinas de classe II têm sido sugeridas, mas este subagrupamento não tem sido simples, desde que houve um aumento no número de novas bacteriocinas que não podem ser classificadas de acordo com as subclasses estabelecidas. O presente critério escolhido para a classificação parece incoerente e inadequado. Isto é demonstrado pelo fato de que algumas bacteriocinas podem ser alocadas em mais de um subgrupo, tal como a enterocina P tipo pediocina, que é secretada por uma via *sec*-dependente, enquanto outras bacteriocinas tipo pediocina são secretadas por transportadores ABC.

c) Classe III: esta é composta por moléculas grandes e termosensíveis, como a helveticina J, produzida pelo *Lactobacillus helveticus* e a enterolisina, produzida pelo *Enterococcus faecalis* (Klaenhammer, 1993).

2.3.7. Função e modo de ação das bacteriocinas

Um dos mecanismos propostos para a ação biológica das bacteriocinas ocorre a partir de receptores específicos localizados na superfície da célula-alvo. Após se ligar com esses receptores, vários mecanismos de ação causam a morte da célula microbiana. As bacteriocinas são “poderosas toxinas”, além de muito específicas, e normalmente produzidas durante a exposição a alguma linhagem bacteriana sob condições de estresse. Quando liberadas no ambiente, causam rapidamente a eliminação de células microbianas vizinhas sem imunidade ou não resistentes (De Souza et al., 2005).

As bacteriocinas normalmente atuam provocando a formação de poros na membrana plasmática das células-alvo. Isto tem um efeito deletério através da dissipação da força próton-motiva, depleção do ATP e perda de nutrientes e metabólitos. Apesar da formação dos poros ser característica comum às bacteriocinas, o tamanho, a estabilidade e a condutividade desses poros difere consideravelmente de bacteriocina para bacteriocina (Eijsink et al., 2002).

Para formar o poro, as bacteriocinas têm que interagir com a membrana citoplasmática das células-alvo. Este processo é em parte governado pelas interações eletrostáticas entre um peptídeo carregado positivamente e lipídeos aniônicos que estão abundantemente presentes na membrana de bactérias Gram-positivas. A ligação das bacteriocinas à membrana plasmática e subsequente formação de poro é normalmente afetada por fatores tais como o potencial de membrana da célula-alvo e o pH. O potencial de membrana supostamente acentua a inserção da bacteriocina para dentro da membrana e talvez também afete a associação entre as moléculas de bacteriocinas.

Conseqüentemente, a sensibilidade às bacteriocinas depende, em parte, do estado fisiológico da célula-alvo (Moll et al., 1999; Eijsink et al., 2002).

A ação antagonica exercida pelas bactérias produtoras de bacteriocinas em outras bactérias inseridas no mesmo ambiente é definida como antibiose. A antibiose ocorre quando dois ou mais microrganismos presentes no ambiente podem adversamente interferir no crescimento e sobrevivência de outros. Competição por nutrientes essenciais, acúmulo de *D*- aminoácidos, redução do potencial de oxidação-redução podem causar o antagonismo. A morte das células-alvo pela ação das bacteriocinas pode ocorrer por um desequilíbrio na função da membrana plasmática (afetando a síntese de energia e a permeabilidade), inibição da síntese de ácidos nucleicos, interferência na síntese de proteínas e mudança nos mecanismos de tradução da célula. Há ainda algumas linhagens de bactérias que podem sofrer a lise das células. As células produtoras de bacteriocinas não são afetadas pela ação de suas bacteriocinas devido ao desenvolvimento de imunidade específica mediada por uma proteína. Uma vez secretada e ativada, a bacteriocina tem uma excelente propriedade de detecção e de causar a morte na bactéria competidora, enquanto provoca pequeno ou nenhum dano às células produtoras (De Souza et al., 2005).

2.4. Bacteriocinas de *Pseudomonas aeruginosa*

2.4.1. Histórico

A primeira piocina de *Pseudomonas aeruginosa* descrita foi descoberta em 1954, pelo francês François Jacob. Jacob isolou e estudou uma linhagem de *P. aeruginosa* C10 que, quando tratada com um agente mutagênico (irradiação com luz ultravioleta; comprimento de onda de 253,7 nm), provocava a indução de uma propriedade piocinogênea, que, após 1h e 30 min., liberava, através de lise bacteriana, a bacteriocina. Estas se adsorviam na superfície da célula bacteriana sensível (pertencentes à mesma espécie) e provocavam sua morte. Pela analogia às colicinas foi dado o nome para o composto de piocina. A piocina isolada por Jacob não era dialisável, insensível a ação das proteases e suportava até 70°C; podia ser concentrada através da precipitação com sulfato de amônio em uma concentração final de 66%. A atividade letal produzida pela cepa C10 é provavelmente devida a piocina do tipo R (Jacob, 1954; Reeves, 1965).

Em 1956, Hamon se propôs a procurar outras cepas de *P. aeruginosa* produtoras de substâncias com atividade antimicrobiana, comprovando a capacidade piocinogênea da espécie. Sua pesquisa indicou a presença de piocinas sensíveis a proteases e também variedades resistentes.

Em 1962, Kageyama & Egami, descreveram outra piocina produzida por *P. aeruginosa* cepa R. Este estudo foi o primeiro de inúmeros outros que se seguiram sobre piocinas continuados até hoje. No final de 1960, outro grupo de

pesquisa japonês encontrou a piocina tipo F. Em 1970, um terceiro tipo de piocina, denominada S, foi descrita (Michel-Briard & Baysse, 2002).

Durante todos esses anos, inúmeros grupos de pesquisa contribuíram para o conhecimento das piocinas. Alguns descreveram novas piocinas, como Higerd et al. (1967), Holloway et al. (1973), Govan (1974), Duport et al. (1995) e Parret & De Mot (2000). Outros estudaram receptores, como Ikeda & Egami (1973), Meadow & Wells (1978), Dennis et al. (1996) e Baysse et al. (1999). E outros ainda estudaram adequados métodos de tipagem, como Govan (1978) e Fyfe et al. (1984).

2.4.2. Definição

Bastonetes Gram-negativos do gênero *Pseudomonas* spp. são habitantes comuns do solo, água fresca e ambientes marinhos. A bactéria *P. aeruginosa* vem recebendo mais atenção por ser um patógeno oportunista em humanos. As bacteriocinas de *P. aeruginosa* são chamadas piocinas, um termo derivado do nome anterior da espécie, *Pseudomonas pyocyanea* (Michel-Briard & Baysse, 2002).

As piocinas são produzidas por mais de 90% das cepas de *P. aeruginosa* e cada linhagem pode sintetizar diferentes piocinas. Os genes das piocinas estão localizados no cromossomo da *P. aeruginosa* e sua expressão é induzida por agentes mutagênicos como a mitomicina C. Três tipos de piocinas são descritas. A piocina R é semelhante a uma cauda de bacteriófago não-flexível e contrátil. Ela provoca a despolarização da membrana citoplasmática com a formação de um poro. As piocinas F lembram a cauda de um bacteriófago, mas

com uma estrutura tipo bastão flexível e não contrátil. As piocinas S são como as colicinas, proteínas sensíveis às proteases. Elas são constituídas por dois componentes. O componente maior carrega a atividade *killing* (atividade de DNase para as piocinas S1, S2, S3 e AP41; tRNase nas piocinas S4; atividade de formação de canal nas piocinas S5). Elas interagem com um componente menor (proteína de imunidade) (Michel-Briand & Baysse, 2002).

A síntese das piocinas começa quando um agente mutagênico induz o gene *recA* e aumenta a expressão da proteína RecA. Esta proteína cliva o repressor PrtR, liberando a expressão da proteína ativadora do gene *prtN*. As piocinas R e F são derivadas de um gene ancestral, com similaridade à família dos fagos P2 e à família dos fagos λ , respectivamente. Os domínios *killing* das piocinas S1, S2 e AP41 demonstram a relação evolucionária com o grupo das colicinas E2 a piocina S4 com a colicina E5, e a piocina S5 com as colicinas Ia e Ib (Michel-Briand & Baysse, 2002).

2.4.3. Produção das piocinas

A piocinogenia, capacidade de produzir piocinas, é generalizada na espécie de *P. aeruginosa*. Níveis de produção espontâneos são baixos, com poucas bactérias envolvidas no processo. O tratamento da cultura por agentes físicos com ação mutagênica, como a irradiação ultravioleta e a adição de mitomicina C (1-2 $\mu\text{g/mL}$), aumenta significativamente a taxa de produção (Kageyama, 1964; Takeya et al., 1967; Higerd et al., 1967; Ohkawa et al., 1973). Chang et al. (2005) fornecem evidências de que tratamentos com

reações oxidativas, como com peróxido de hidrogênio, resultam na indução dos três tipos de genes de piocinas na *P. aeruginosa*.

Jones et al. (1973) desenvolveram um meio de cultura, denominado meio 81, que apresenta componentes que induzem em uma maior produção de piocinas. Eles utilizam a característica da maioria das linhagens de *P. aeruginosa* de utilizarem o nitrogênio como aceptor final de elétrons. A composição do meio é de caldo triptona de soja (TSB) sem glicose e adicionado de 1% de nitrato de prata.

As piocinas são bacteriocinas produzidas por cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Estas são classificadas em três grupos de acordo com suas estruturas: piocina tipo R, F ou S. O grupo heterogêneo das piocinas R e F apresenta estrutura similar à cauda de bacteriófagos, visualizadas através de microscopia eletrônica; são facilmente sedimentados por ultra centrifugação e apresentam resistência aos tratamentos com proteases. As piocinas S formam um grupo de simples proteínas, de baixo peso molecular, sensíveis às proteases e que não são sedimentáveis, nem visíveis sob microscopia eletrônica (Michel-Briand & Baysse, 2002).

As piocinas do tipo R e F são produzidas por mais de 90% das cepas de *P. aeruginosa* e as piocinas do tipo S são produzidas por 70% das cepas de *P. aeruginosa* (Michel-Briand & Baysse, 2002).

2.4.4. Tipos de piocinas

2.4.4.1. Piocina R

Todas as piocinas do tipo R são resistentes a nucleases e a proteases. A estrutura da piocina R é a de um bastão não-flexível e contrátil, que lembra a cauda de um bacteriófago. É formada por um cilindro oco, que consiste em uma bainha (envoltório) e um núcleo (120 nm de comprimento e 15 nm de largura). A bainha (ES) é constituída por ± 200 subunidades protéicas arranjadas em simetria helicoidal, demonstrado na Figura 1, com 34 anéis, cada anel com 6 subunidades, capaz de se contrair. A forma contraída (CS) tem 46 nm de comprimento e 18 nm de largura e expõe o núcleo. O núcleo, constituído por ± 180 subunidades, é localizado dentro da bainha com o mesmo comprimento (120 nm) e 5.7 nm de largura. A base da placa (BP) é visível no comprimento final da partícula da piocina e é composta de 6 fibras da cauda (TFi). Essas fibras consistem de subunidades protéicas, onde a especificidade do subgrupo pode ser localizada na região carbóxi-terminal. Uma única bactéria pode produzir cerca de 200 partículas de piocina R (Shinomiya, 1972; Michel-Briand & Baysse, 2002). A microscopia eletrônica da piocina R é mostrada na Figura 2.

Através de uma análise da seqüência do gene da piocina R, ficou elucidado que este é derivado de um ancestral comum com o fago P2 (Nakayama et al., 2000). Trabalhos anteriores, relacionavam-na com os bacteriófagos T (Kageyama et al., 1979) e bacteriófagos PS17 (Shinomiya, 1984; 1989).

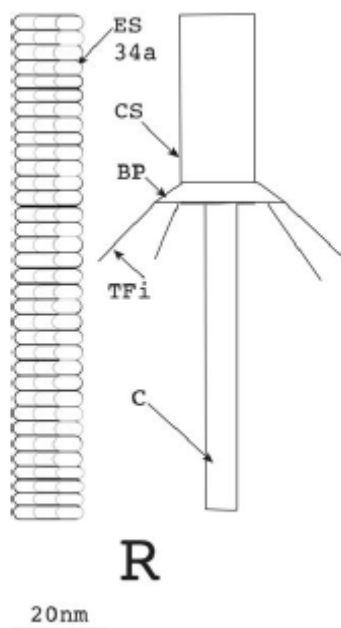


Figura 1 - Esquema representativo da piocina R. (ES) bainha estendida constituída por 34 anéis, sendo cada um deles composto por 6 subunidades; (CS) bainha contraída, terminando na base da placa (BP) com as fibras da cauda (TFi), revelando o *core*. Fonte: Michel-Briand & Baysse (2002).

O receptor para a fibra da cauda (TFi) é constituído principalmente por lipopolissacarídeos (LPS) ou lipooligosacarídeos encontrados na membrana externa de bactérias Gram-negativas (Govan, 1974; Ikeda & Egami, 1973). Logo que a piocina R é adsorvida pelo receptor, o contato é firme, e ele é seguido por rápida contração da bainha e penetração do *core* através da membrana externa, um processo necessário para a atividade bactericida (Higerd et al., 1969; Shinomiya et al., 1975).

Imediatamente após a adsorção, todos os tipos de piocinas R agem interrompendo a síntese de macromoléculas das células sensíveis e liberam material intracelular, que é seguido pela morte da célula dentro de 20 minutos (Kageyama, 1964; Ohsumi et al., 1980). A morte da célula resulta da

despolarização da membrana citoplasmática (de no mínimo 90 mV), em relação com a formação do poro (Uratani & Hoshino, 1984).



Figura 2 - Microscopia eletrônica da piocina R purificada. X 195.000. Fonte: Higerd et al. (1967).

A presença de partículas de ssDNA em forma circular fechada, de aproximadamente 4.0 kb de extensão, no interior de uma piocina do tipo R foi descrita por Lee et al.,1999. Estas partículas eram derivadas do DNA cromossômico da *P. aeruginosa*.

2.4.4.2. Piocina F

A piocina F apresenta forma de um bastão flexível e não-contrátil de 106 nm de comprimento com uma largura uniforme de 10 nm que lembra a cauda de fagos flexíveis. O bastão é constituído por 23 anéis (cada anel é composto por uma subunidade protéica de 19,5 kDa), mostrado na Figura 3. Suas fibras são constituídas de vários filamentos curtos e longos cuja composição química determina a diferença entre as piocinas do tipo F e a especificidade da

anexação à célula sensível (Kuroda & Kageyama, 1979, 1981; Michel-Briand & Baysse, 2002).

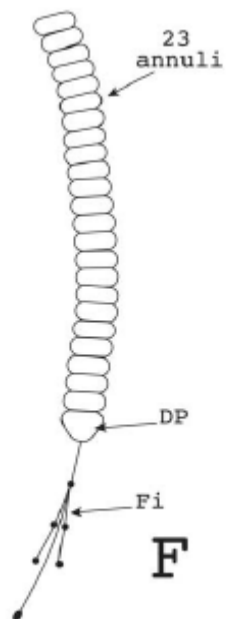


Figura 3 - Estrutura esquemática da piocina F. Ela se parece com um bastão flexível e não-contrátil constituído de 23 anéis e a parte distal (DP) de onde saem as fibras (Fi), composta de 3 filamentos com algumas estruturas globulares. Fonte: Michel-Briand & Baysse (2002).

A seqüência dos genes da piocina F foi analisada para elucidar a relação entre piocinas e bacteriófagos. Ficou demonstrado, então, que a piocina F é originária de um ancestral comum com o fago λ (Nakayama et al., 2000). A microscopia eletrônica da piocina F é mostrada na Figura 4.

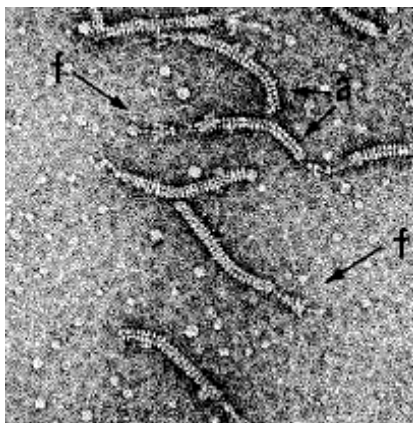


Figura 4 - Microscopia eletrônica da piocina F1 purificada – 100 nm x 124.000
Fonte: Kuroda et al. (1979).

2.4.4.3. Piocinas S

A piocina do tipo S é sensível a proteases. Ela apresenta dois componentes protéicos que permanecem associados por todo o processo de purificação, entretanto podem ser separados por gel filtração na presença de tampão uréia. Somente a proteína maior apresenta atividade *killing*. Ambos componentes estão ligados em um complexo. A proteína pequena apenas reconhece as seqüências de DNA homólogas, como aquelas da colicina E2, e é identificada como uma proteína de imunidade, protegendo a bactéria hospedeira da atividade *killing* da proteína maior. A determinação do peso molecular das duas proteínas é de 65,6 e 10 kDa para a piocina S1 e de 74 e 10 kDa para a piocina S2. (Sano & Kageyama, 1981; Sano et al., 1990, 1993; Seo & Galloway, 1990).

A piocina S causa a morte da célula por romper a ligação fosfo-diéster do DNA, devido à atividade de uma endonuclease localizada na região carbóxi-terminal do componente maior. No entanto, esse composto não expressa nenhuma atividade de DNase *in vitro* quando este está ligada no complexo. O

componente pequeno atua, portanto, como um inibidor, confirmando sua função como uma proteína de imunidade (Sano et al., 1990, 1993).

As piocinas S1 e S2 são capazes de inibir a formação de fosfolípidos muito rapidamente (em torno de 5 min.) sob condições de limitação de ferro (Ohkawa et al., 1975; Sano & Kageyama, 1993). Esta inibição está relacionada com a presença do domínio de DNase, mas é independente da atividade de DNase. A extensão da inibição vai paralelamente com a *killing*, e pode ser o evento primário da ação da piocina (Kageyama et al., 1996). A piocina AP41 causa a indução da síntese de outras piocinas (R2 e S2) em células-alvo sensíveis PAO1, tão bem como a indução de fagos (F116L ou PS17) em células lisogênicas, de um modo RecA independente (Sano & Kageyama, 1981; Sano, 1993; De Mot, 2000).

As piocinas S4 têm um domínio carboxi-terminal constituído de uma estrutura de tRNase e a piocina S5 tem a atividade de formação de poro (Parret & De Mot, 2000).

As piocinas S se ligam a receptores específicos na membrana externa de espécies de bactérias Gram-negativas, sendo depois translocadas através da membrana e atacando seu alvo (Michel-Briand & Baysse, 2002).

As piocinas S são liberadas das células produtoras através de um complexo equimolar formado pelas proteínas de imunidade e *killing*. As piocinas S não têm nenhuma sequência sinal nem sequência com similaridade ao gene da proteína de lise da colicina. No entanto, Nakayama et al. (2000) sugerem que o sistema lítico descrito na PAO1 para R2 e F2 pode ser comum a todas as piocinas S. A linhagem de *P. aeruginosa* PAO1 é conhecida por secretar os três tipos de piocinas (Parret & De Mot, 2002).

Sob condições de limitação de ferro (1mM Fe²⁺ ou concentrações menores) as piocinas S1, S2 e S3 são melhores adsorvidas por células sensíveis e apresentam sua atividade *killing* com maior eficiência. Sob essas condições de limitação de ferro novas proteínas de membrana externa reguladoras de ferro aparecem na membrana externa da cepa indicadora. Uma delas de 85 kDa, sugere que o receptor da piocina S2 ou Sa é o receptor específico para a ferropioverdina. Mais estudos observados levam a mesma conclusão para piocina S3. Esta piocina usa o receptor de membrana externa da ferropioverdina tipo II (85 kDa) para entrar na célula bacteriana (Smith et al.; 1992; Baysse et al., 1999).

2.4.5. Comparação das seqüências dos aminoácidos das piocinas S e das colicinas

As piocinas S compartilham similaridades funcionais com as colicinas, como atividade de nuclease, e algumas similaridades nas seqüências do DNA com uma subclasse de colicinas de *E. coli*. No entanto, as piocinas S são codificadas através do cromossomo, enquanto que as colicinas são sempre codificadas através do plasmídeo (Riley, 1998).

As proteínas das piocinas são organizadas dentro de domínios funcionais, exatamente como é observado para as colicinas. No entanto, a ordem de reconhecimento do receptor e dos domínios de translocação é invertida nas colicinas. A região amino-terminal da proteína está envolvida no reconhecimento do receptor, seguida pela translocação e então ligação aos domínios de imunidade e nuclease (Riley, 1998; Riley & Gordon, 1999).

Existe uma pequena similaridade entre os domínios de translocação entre as piocinas do tipo S, colicinas E2, E3 e a cloacina DF13. No entanto, isto não parece ter nenhum significado funcional, desde que construções quiméricas mostram que este domínio é um pouco espécie-específica. Em particular, a substituição na piocina S1, do seu único domínio de DNase pelo domínio de RNase da colicina E3, produz uma bacteriocina que somente inibe a *P. aeruginosa* (Kageyama et al., 1996). Contudo, há uma região conservada entre as piocinas e as colicinas no final do domínio de translocação, região que poderia ser requerida para a atividade *killing* (Sano et al., 1993).

As proteínas de imunidade das piocinas S1, S2 e AP41 são 53% idênticas com a subunidade correspondente da colicina E2 (Sano et al., 1993).

Se considerarmos a organização geral, a maior diferença existente entre esses dois tipos de bacteriocinas é que a colicina E2 é constituída por um *operon* de três grupos de genes: unidade *killing*, imunidade e gene de lise, enquanto que o sistema lítico responsável pela liberação da molécula de piocina para fora da célula é dividido em duas partes (Nakayama et al., 2000).

2.4.6. Regulação da síntese de piocinas

Uma seqüência regulatória conservada chamada *P box* está localizada a aproximadamente 60-100 pb acima do local de ligação do ribossomo (Figura 5). Ela é constituída de uma seqüência única composta de uma região consenso de 10-12 nucleotídeos (ATTGnn(n)GTnn(n)), repetido duas vezes na *box P* da seqüência de piocina R2, e quatro vezes para as *box P* de piocinas

do tipo S (Duport et al., 1995; Parret & De Mot, 2000; Matsui et al., 1993; Sano et al., 1993), exceto no caso da piocina S5 (Parret & De Mot, 2000).

```

S1  gattgcaatttgattgctgtgtattccagtgattggcgttcatt  296----- 358 taggagatacatatg
S2  gattgaaatttgattgcaattgattgacagatgcattggcgttatt  282----- 342 taggggagatcatatg
AP41 gattgtagtttg.ttgctgtgcatcgctcgtgcatcacggttatt  441----- 537 taagggaaatcatatg
S3  catggctgtgtggagggattgtagttgattggcgtgtgtgacaggtgcattggcgttg  60--- 133 cgaggtataaaactatg

```

Figura 5 - Seqüência de nucleotídeos da *P box* em uma região não-codificante acima dos genes das piocinas S1, S2, AP41 e S3. Estas seqüências consenso em que o ATTGnn(n)GTnn(n) é repetido quatro vezes, estão envolvidas na regulação dos promotores das piocinas via ativação transcripcional PrtN. Os números indicam as posições dos nucleotídeos dos finais 5' das seqüências publicadas. As regiões repetidas na *P box* são marcadas em azul. Fonte: Michel-Briand & Baysse (2002).

A expressão das piocinas na *P. aeruginosa* é induzida por tratamentos que causem danos ao DNA, um sistema análogo em *E. coli* já foi investigado. A síntese das piocinas é efetivamente dependente do gene *recA* (Sano & Kageyama, 1987), mas a *P box* não apresentam similaridades com a *SOS box* e o repressor LexA parece não estar envolvido na síntese das piocinas (Matsui et al., 1993). Estudos com piocinas sem mutação derivadas da cepa PAO produziram três piocinas R2, F2 e S2, junto com testes complementares, sendo identificado dois genes regulatórios. (Shinomya et al., 1983; Matsui et al., 1993).

Os genes *prtN*, localizados acima do *cluster* das piocinas R2-F2, codificam um novo tipo de regulador positivo (Nakayama et al., 2000). Este produto, composto de 104 aminoácidos, se liga às seqüências conservadas na *P box* (Matsui et al., 1993). O gene *prtR* codifica uma proteína repressora de 256 aminoácidos, que regula negativamente a atividade do promotor do gene *prtN* e contém uma seqüência de clivagem para a proteína ativadora RecA.

PrtR tem uma grande similaridade com o repressor *cl* do fago $\Phi 80$. O mecanismo de regulação da síntese de proteínas, envolvendo os três genes (*recA*, *prtN* e *prtR*) é demonstrado na Figura 6.

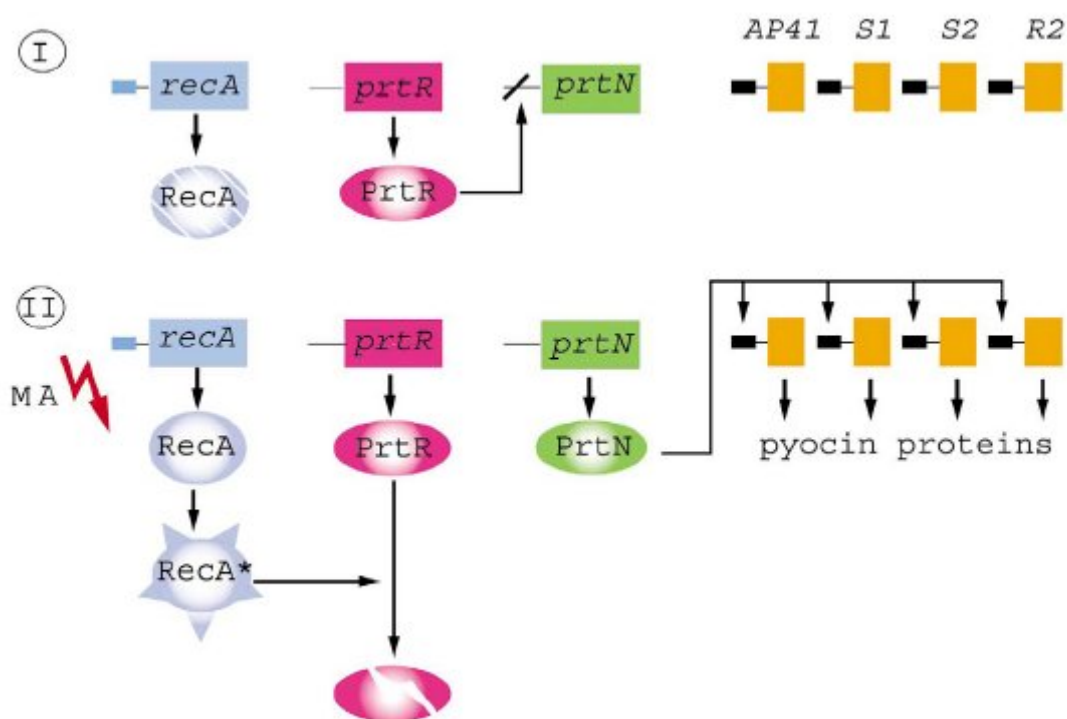


Figura 6 - Regulação da atividade dos genes das piocinas. (I) Na ausência de um indutor, poucas células produzem piocinas, pois o ativador da proteína PrtN é reprimido pelo repressor PrtR (*recA* produz poucas moléculas da proteína RecA). (II) Na presença de um agente mutagênico (MA) causador de dano ao DNA, ocorre um aumento na expressão do gene *recA* que codifica a proteína RecA de reparo ao DNA e ativa a proteína RecA em RecA*, que cliva a proteína repressora PrtR e libera a expressão do ativador PrtN: que os promotores das piocinas e estas são então sintetizadas. A SOS box e P box são representadas pelas caixas azul e preta, respectivamente. Fonte: Michel-Briand & Baysse (2002).

Com relação à lise da célula produtora, nenhum gene relacionado à função de lise foi identificado para qualquer tipo de piocina (Nakayama et al., 2000). No entanto, em um estudo de uma seqüência de DNA de 31 kb da cepa PAO1 que inclui o gene da piocina foi possível identificar uma seqüência de DNA similar ao dos bacteriófagos, que estava distribuída em ambos os lados

do gene R2 da cepa PAO1 (Kageyama, 1975). Foram identificados dois genes, um codifica uma proteína que forma um canal aquoso ao periplasma e o outro codifica uma proteína lítica que rompe o mucopeptídeo. Esta atividade poderia ser naturalmente controlada na cepa PAO por dois outros genes. Acredita-se que este sistema (identificado no fragmento de DNA levando os genes R2 e F2) é compartilhado por todos os tipos de piocina S (Nakayama et al., 2000).

2.4.7. Relações entre os genes das piocinas do tipo R e F e os genes dos bacteriófagos e evolução

Correlações entre as bacteriocinas e os fagos já têm sido consideradas há muito tempo por Jacob et al. (1952). São observadas similaridades fisiológicas, indução por agentes mutagênicos, necessidade de receptor, ação bactericida. No entanto, há uma notável diferença: piocinas não se replicam nas células sensíveis. A questão dessas relações tornou-se mais evidente quando se observou, através de microscopia eletrônica, que as piocinas do tipo R pareciam-se às caudas inflexíveis e contráteis dos bacteriófagos (Ishii et al., 1965), enquanto que as piocinas do tipo F lembravam as caudas dos bacteriófagos flexíveis e não-contráteis (Takeya et al., 1967).

Existem efetivamente analogias entre as piocinas e os fagos. A infectividade de certos fagos é neutralizada por soro anti-piocina: fagos PS3, PS17 e Φ CTX são neutralizados por soro anti-R, e o fago KF1 é neutralizado pelo soro anti-F (Kuroda et al., 1983; Nakayama et al., 2000).

Nakayama et al. (2000) compararam as seqüências de DNA da cepa PAO1 nas regiões compreendidas entre os genes *trpE* e *trpGCD* contendo os

genes R2 (16 ORFs) e F2 (16 ORFs) com aqueles dos fagos P2 e Φ CTX e o fago λ , respectivamente. Entre os 16 ORFs identificados na região piocina-específica de R2, 12 ORFs mostraram similaridades significantes com os genes da cauda do fago P2, então essas funções poderiam ser atribuídas aos genes da piocina R2. Além disso, a organização do gene é de fato a mesma. A região da piocina F2 contendo 8 ORFs com similaridades aos genes da cauda do fago λ , bem como uma idêntica organização (Nakayama et al., 2000).

Essas observações nos deixam concluir que a piocina R2 e a piocina F2 são próximas aos fagos P2 e λ , respectivamente. No entanto, não há nenhum gene para a formação da cabeça, nem para replicação e integração. Portanto, as piocinas do tipo R e F são vistas como caudas de fagos que se tornaram evolutivamente especializadas como bacteriocinas, ao invés de simples fagos defeituosos (Nakayama et al., 2000).

A porcentagem de G + C nas seqüências das piocinas tipo R e F são muito similares ao cromossomo da *P. aeruginosa* (66,6%). No entanto, alguns ORFs correspondentes às fibras da cauda são ricos em AT, que poderia significar que eles vieram de outros genomas (Michel-Briand & Baysse, 2000).

Se compararmos a evolução das bacteriocinas, estas parecem muitas vezes ter uma natureza quimérica, resultado de trocas e recombinações entre elas, e as piocinas do tipo S parecem ter surgido como resultado dessas tantas trocas (Parret & De Mot, 2002).

2.4.8. Função fisiológica das piocinas

A exata função fisiológica das piocinas é desconhecida. As piocinas podem assegurar a predominância de dada cepa em um nicho bacteriológico: (1) contra outras bactérias da mesma espécie, mas a maior parte das *P. aeruginosa* são piocinogênicas; (2) ou contra outras espécies, mas o espectro de ação das piocinas do tipo S é limitado a cepas de *P. aeruginosa*. No entanto, piocinas do tipo R são capazes de inibir outras bactérias Gram-negativas. Em todos os casos, a produção começará quando condições adversas provocarem danos ao DNA. Sob essas condições, o efeito das piocinas é mais para preservação das bactérias piocinogênicas sobre as células sensíveis às piocinas, para então conquistar novos territórios de uma população de células sensíveis pré-existentes (Frank, 1994).

É visível que o custo biológico, que é freqüentemente invocado para explicar as desvantagens nos casos das cepas produtoras de bacteriocinas plasmidiais, não é apropriado para a *P. aeruginosa*, já que os genes das piocinas estão localizados no seu cromossomo. A função das piocinas na doença humana é difícil de ser compreendida. É sabido que as cepas piocinogênicas são mais comumente vistas em situações clínicas do que no ambiente (Govan, 1986) e que a deficiência de ferro favorece a atividade *killing* das piocinas do tipo S, o que pode ocorrer em certos locais como no pulmão de pacientes com fibrose cística (Brown et al., 1984).

2.5. Aplicações das bacteriocinas

2.5.1. Aplicação em alimentos

Isoladas ou em combinação com outros agentes antimicrobianos, as bacteriocinas atuam como ferramentas úteis na implantação de técnicas para a redução de carga de patógenos e ou bactérias deteriorantes em alimentos. Elas ainda são empregadas como recurso tecnológico na produção de alguns alimentos por serem consideradas conservantes “naturais”, permitindo o rótulo de livres de aditivos químicos e nutricionalmente mais saudáveis. O uso de bacteriocinas como biopreservativos tem sido estudado em vários alimentos, incluindo carnes, derivados do leite e produtos vegetais (Hugas, 1998; Barreto et al., 2004; Mataragas et al., 2002).

Conforme observado, as bacteriocinas podem ser utilizadas na proteção dos alimentos frente a contaminações ou na prevenção do crescimento de bactérias patogênicas. Alternativamente, bacteriocinas de espectro estreito podem ser usadas para influenciar a população microbiana em um ecossistema específico, tendo como consequência a predominância de uma linhagem específica desejada, sendo esta denominada de competição de exclusão. (Cotter et al., 2005).

As bacteriocinas podem ser introduzidas no alimento de pelo menos três diferentes formas: em alimentos fermentados, as bacteriocinas podem ser introduzidas *in situ* pelas culturas bacterianas que substituem parcialmente ou totalmente as culturas *starter*; bacteriocinas purificadas ou parcialmente purificadas (por exemplo, Nisaplin[®]) podem ser aderidas diretamente ao

alimento; ou através da adição de um ingrediente baseado no fermentado de uma cultura produtora de bacteriocina pode ser utilizado (por exemplo, ALTA 2431[®]). Apesar das bacteriocinas de amplo espectro de atividade ser normalmente as últimas opções de escolha, outros fatores, incluindo o pH ótimo, a solubilidade e a estabilidade, são muito importantes e as maiores considerações na escolha de um inibidor em particular para um determinado alimento ou alvo bacteriano (Cotter et al., 2005).

Uma ampla faixa de bacteriocinas produzidas por bactérias ácido-lácticas tem sido intensamente investigada, permitindo sua caracterização química detalhada. Muitas destas bactérias têm se mostrado capazes de inibir o crescimento de diferentes gêneros de microrganismos patogênicos ou que deterioram os alimentos. Devido a muitas bactérias ácido-lácticas serem usadas na produção de alimentos fermentados, elas são consideradas como seguras pela FDA. Isso permite seu uso na fermentação de alimentos sem uma aprovação adicional (Jack et al., 1995; O'Sullivan et al., 2002, Guiname et al., 2005).

A aplicação de bacteriocinas em alimentos tende a ser mais eficiente quando as cepas produtoras são isoladas do próprio produto em que se pretende utilizá-las. Neste sentido, vários estudos sobre a aplicação de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas em produtos cárneos vêm sendo desenvolvidos, como De Martinis & Franco (1998) que demonstram que a bactéria *Lactobacillus sakei* produtora de bacteriocinas e isolada de lingüiça frescal, apresenta atividade antilisterial em lingüiça frescal artificialmente contaminada.

A relação entre muitas infecções gastrintestinais com algumas bactérias psicrotróficas, presentes nos alimentos, provocou um desenvolvimento dos processos tecnológicos alimentares, culminando com o reconhecimento de bacteriocinas e/ou microrganismos produtores, como fontes potenciais de biopreservativos alimentares (Barreto et al., 2004).

Uma preocupação com o uso das bacteriocinas para a preservação de alimentos é a seleção de linhagens resistentes. Estudos com bactérias ácido-lácticas têm mostrado a geração de resistência à atividade de bacteriocinas depois de linhagens sensíveis terem sido expostas a 25 ciclos de crescimento sucessivo na presença da bacteriocina. O tratamento com uma combinação de bacteriocinas, por exemplo, nisina e uma bacteriocina de classe IIa, poderiam reduzir teoricamente a incidência de resistência. Um problema adicional é a resistência a uma classe de bacteriocina de bactérias ácido-lácticas poder resultar numa resistência cruzada com outra classe de bacteriocina. No entanto, a natureza química muito diversa das bacteriocinas propõe modos de ação diferentes, o que conduz a pensar que uma resistência cruzada é mais difícil de se obter. Não obstante, tem sido reportada uma resistência cruzada entre diferentes bacteriocinas dentro da classe IIa (Riley & Wertz, 2002).

Vários fatores podem contribuir para tornar uma célula resistente a certas bacteriocinas. A alteração da composição e da estrutura da parede e da(s) membrana(s) celular(es), de tal maneira que a bacteriocina é fisicamente incapaz de alcançar o alvo. Alternativamente, certos componentes celulares (receptores), que são essenciais para o aumento da ação das bacteriocinas, podem estar faltando ou mutados. Uma possibilidade também especulada é a presença de proteases inespecíficas no alvo ou próximas a ele que poderiam

reduzir a efetividade das bacteriocinas nesses casos. Finalmente, o estado fisiológico da célula-alvo pode atenuar a formação de poros na membrana (Eijsink et al., 2002).

2.5.2. Aplicação das bacteriocinas na saúde

O rápido aumento e disseminação da multi-resistência em bactérias patogênicas, tem levado a busca de métodos alternativos no combate às infecções. Uma das limitações do uso de antibióticos de amplo espectro, é que eles eliminam qualquer espécie de bactéria. Devido ao amplo espectro dos antibióticos e ao seu uso freqüente, provoca uma pressão seletiva muito forte para seleção de microrganismos resistentes aos antibióticos, tanto em bactérias comensais, quanto em patógenas. As soluções atuais para estes dilemas envolvem o desenvolvimento de métodos mais racionais para o uso dos antibióticos, que envolverão redução da prescrição de drogas para qualquer outra enfermidade que não seja infecção bacteriana, e o uso alternado de diferentes drogas em um período curto de tempo, além da educação da população sobre os antibióticos (Riley & Wertz, 2002). O potencial uso clínico dos peptídeos antimicrobianos foi sugerido nos anos 1950. Porém, o enorme impacto da era dos antibióticos restringiu muitas das pesquisas na área (Riley, 1998).

As bacteriocinas poderiam oferecer uma solução alternativa. Com seu espectro relativamente reduzido de atividade antagônica, algumas bacteriocinas podem ser consideradas “drogas desenhadas”, cujos alvos específicos seriam bactérias patogênicas. Dada a diversidade dessas

moléculas na natureza, será uma tarefa relativamente simples encontrar bacteriocinas ativas contra patógenos específicos de humanos. O desenvolvimento e o uso desses antimicrobianos de espectro reduzido, não somente aumentará o número de drogas de uso farmacêutico, como também prolongará sua vida (Riley & Wertz, 2002).

Esta característica emerge como uma droga desenhada; cada antibiótico seria usado com uma frequência baixa, o que levará a uma redução na intensidade de seleção da resistência. Do ponto de vista ecológico e evolutivo, o uso dos antimicrobianos de espectro reduzido representa um redirecionamento da abundância dos patógenos bacterianos multiresistentes. Isto permitirá uma redução da morte de microrganismos não patogênicos, como as espécies comensais, com uma troca que permitirá uma diminuição nos níveis de infecções nosocomiais. Assim, com poucas espécies de bactérias antagonizadas por cada droga, a resistência aos antibióticos evolucionará e se ampliará mais lentamente. Ainda faltando muito para investigar com relação ao uso de bacteriocinas, não se deve esquecer que a maioria das bacteriocinas são protéicas e será necessário avaliar, em cada caso, se produzem resposta imunológica em humanos (Riley & Wertz, 2002).

A elucidação do mecanismo de ação preciso de alguns lantibióticos e sua atividade frente patógenos multi-resistentes por um novo mecanismo fazem deles uma opção atrativa na possibilidade como agente terapêutico. Os lantibióticos de amplo espectro poderiam teoricamente ser usados frente a patógenos Gram-positivos humanos e animais. Como exemplo, o lantibiótico lacticin 3147 que tem atividade *in vitro* frente ao *Staphylococcus aureus* (incluindo o *S. aureus* resistente a meticilina - MRSA), *Enterococcus* spp.,

Streptococcus pneumoniae, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. mutans*, *Clostridium botulinum* e *Propionibacterium acnes*. A triagem inicial *in vivo* com modelos animais têm demonstrado o sucesso dos antibióticos no tratamento de infecções causadas pelo *S. pneumoniae*, MRSA, e na prevenção da gengivite e queda dentária (Cotter et al., 2005).

P. aeruginosa tem aumentado sua função em uma variedade de sérias infecções em pacientes hospitalizados e ela é o patógeno oportunista que tem maior incidência de infecções hospitalares em pacientes com fibrose cística. Sob essas circunstâncias, uma boa caracterização dessa bactéria é de particular importância na intenção de seguir a propagação entre os pacientes ou de ambientes úmidos ou aquáticos para os pacientes. Até a década passada, e antes da utilização dos métodos de genotipagem, a tipificação das piocinas foi considerada como um bom método para discriminar uma cepa de outra (Bruun et al., 1976; Govan, 1978; Fyfe et al., 1984; Schable et al., 1986). A técnica proposta por Govan (1978) usando treze cepas indicadoras permitiu identificar 105 tipos principais e 25 subtipos que seriam de um modelo de inibição. No entanto, a susceptibilidade das cepas pode ser suprimida pela presença de certos plasmídeos (grupos incompatíveis IncP-1 e IncP-2), ou a síntese das piocinas pode ser prejudicada em cepas abrigando algum plasmídeo IncP-2 (Jacoby, 1979).

O aumento e a rápida disseminação de patógenos multiresistentes, bem como a procura por formas de conservação de alimentos menos prejudiciais têm levado a busca de novas alternativas. A pesquisa por novas substâncias

com atividade antimicrobiana é um campo de tamanha importância que justifica este trabalho.

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 Marconi, modelo MA 830; geladeira marca Electrolux/Prosdócimo, modelo R26; geladeira Prosdócimo, modelo R 27; freezer vertical, marca Cônsul, modelo Practice 240; estufas incubadoras, marca De Leo, Biopar e J. Prolab; aparelho purificador de água, marca Honeywell Braukmann TKA; destilador de água, marca Biomatic; banho-maria, marca B.Braun Biotech International, modelo Thermomix; centrífuga refrigerada, marca Hemle, modelo Z323K; centrífuga de bancada para tubos cônicos, marca Eppendorf, modelo 5410; espectrofotômetro, marca Hitachi, modelo U-1100; espectrofotômetro, marca Shimadzu, modelo UV-mini 1240; 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; agitador de tubos “vortex”, marca Biomatic; capela de

exaustão de gases; bomba de vácuo, marca Cientec, modelo CT 613; cuba para eletroforese marca Hoefer Scientific, modelo Mighty Small, fonte de eletroforese Pharmacia LKP EPS 500/400; balança semi-analítica marca BEL Engineering; balança analítica Shimadzu, modelo AX 200; termobloco Accu Block, marca Labnet, modelo D1100; forno de microondas Samsung, modelo SMW 8400W.

3.2. Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: ágar-ágar (Vetec); caldo de cérebro e coração (Himedia), caldo nutriente (BBL Becton Dickinson), caldo Mueller Hinton (Oxoid), ágar triptona de soja (Mast Diagnostics); caldo triptona de soja (Mast Diagnostics); ágar Man Rogosa e Shape (Vetec); extrato de levedura (Biobrás); peptona bacteriológica (Oxoid); peptona de carne (Merck); ágar MacConkey (Oxoid); ágar Baird Parker (Oxoid).

3.3. Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: acetona (Quimex), ácido acético glacial (Quimex), ácido clorídrico (Merck), etanol (Nuclear), metanol (Nuclear), butanol (Merck), dimetil-sulfóxido (Merck), tolueno (Vetec), xileno (Merck), clorofórmio (Merck), octanol (Merck), n-hexano (Merck), ciclo-hexano (Riedel de Haen), β -mercaptoetanol (Riedel de Haen), N,N'-metilendiácridamida (Merck), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina – “TEMED” (Riedel de Haen), Tween

20 (Reagen), Tween 80 (Nuclear), Triton X-100 (Nuclear), deoxicalato de sódio (Merck), dodecil sulfato de sódio (Nuclear), ácido clorídrico (Merck), ácido tricloroacético (Nuclear), ácido etilenodiaminotetracético – “EDTA” (Riedel de Haen), sulfato de amônio (Vetec), fosfato de sódio (Merck), hidróxido de sódio (Nuclear), iodeto de potássio (Nuclear), citrato trissódico (Merck), cloreto de sódio (Merck), cloreto de magnésio (Merck), sulfato de magnésio (Merck), persulfato de amônio (Merck), uréia (Merck), sulfato de potássio (Merck) hidroximetilaminometano – “tris” (Sigma), carbonato de sódio anidro (Nuclear), nitrato de prata (Merck), glicina (Merck), Coomassie R250 (Merck), corantes para coloração de Gram (Bioshop), papaína solúvel (Merck), tripsina (Merck), pronase E (Sigma), Proteinase K (Invitrogen).

3.4. Microrganismo produtor

3.4.1. Seleção do microrganismo produtor de atividade antimicrobiana

Foram coletadas amostras da água dos lagos de estabilização aeróbico, anaeróbico e anaeróbico facultativo de um frigorífico, à aproximadamente 30 cm de profundidade da superfície da água, em tubos tipo “Falcon” previamente esterilizados. Imediatamente após a coleta, as amostras foram transportadas ao laboratório, semeadas em água peptonada 0,1% com diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , e incubadas aerobicamente em estufas a 37°C e 55°C, onde foram examinadas em 24 e 48 horas para observar o crescimento bacteriano.

As amostras que obtiveram crescimento foram semeadas em ágar nutriente e deixadas na estufa para isolamento de colônias. Colônias foram isoladas, enriquecidas em caldo BHI, e depois esgotadas em ágar nutriente.

A seleção da linhagem para estudo foi realizada de acordo com o microrganismo que apresentou maior espectro e halos de inibição contra os microrganismos indicadores.

3.4.2. Microrganismos indicadores utilizados na seleção do microrganismo com atividade antimicrobiana

Para os testes de sensibilidade das substâncias antimicrobianas, foram utilizadas culturas de microrganismos indicadores, selecionando espécies patogênicas para humanos e animais, como:

- *Listeria monocytogenes* ATCC 7644
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Bacillus cereus* ATCC 14579
- *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076

Foi utilizado o ágar triptona de soja (TSA) 1,5%, enriquecido com extrato de levedura a 2,5% na realização do experimento. As bactérias indicadoras foram semeadas com “swab” e então os isolados a serem identificados como produtores ou não de compostos antimicrobianos foram semeados através do método de picada sobre a mesma placa de ágar. Quando apresentaram halo de inibição, demonstraram a presença de substâncias antimicrobianas.

3.4.3. Caracterização citomorfológica, bioquímica e fisiológica do microrganismo com atividade antimicrobiana

Para a caracterização da linhagem com atividade antimicrobiana selecionada, provas bioquímicas e fisiológicas e análises citomorfológicas foram realizadas segundo Sneath et al. (1984). Após a elucidação do gênero foi realizada a análise filogenética da cultura.

3.4.4. Análise filogenética

A seqüência do 16S rDNA foi obtida após a extração do DNA genômico, reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction – PCR) para amplificação e seqüenciamento. Os *primers* utilizados para 16S rDNA bacteriano foram 63f (5' CAGGCCTAACACATGCAAGTC 3'), 907r (5' CCG-TCAATTCCTTTGAGTTT 3') e 1389r (5' ACGGGCGGTGTGTACAAG 3'), correspondendo a posição do gene 16S rDNA de *Escherichia coli* (Riffel et al., 2003). O DNA foi amplificado utilizando-se o Geneamp PCR System 2400 (Perkim Elmer, Norwalk, USA) em 25 ciclos sob as seguintes condições: 96°C por 20 seg., 55°C por 10 seg., e 60°C por 4 min. A seqüência obtida tinha 1435 pares de base (pb) de extensão. O algoritmo BLAST foi utilizado para a busca por seqüências homólogas no GenBank. Foram selecionadas seqüências nos resultados de busca para inclusão na análise filogenética. O alinhamento das seqüências foi realizado com o programa Clustal X 2.0 (Larkin et al., 2007) com os parâmetros padrão. O alinhamento foi corrigido manualmente com o programa GeneDoc (Nicholas & Nicholas 1997). A análise filogenética foi

realizada através do método de "neighbor joining" (Saitou & Nei, 1987) no programa PAUP* versão 4.0 (Swofford, 1998) para Windows. Para verificar a consistência dos agrupamentos foram realizadas 1000 replicações de "bootstrap" (Felsenstein, 1985). A seqüência da *Burkholderia cepacia* foi utilizada como grupo externo.

3.4.5. Detecção da produção de piocianina

A piocianina é um pigmento produzido exclusivamente pela espécie de *P. aeruginosa* (Sneath et al., 1984). Para a completa elucidação da espécie da bactéria produtora da substância com atividade antimicrobiana foi utilizado o meio de cultura descrito pela *Himedia Laboratories* para a detecção do pigmento piociânico.

Composição do meio de cultura em g/L:

- digestão peptídica de tecido animal: 20
- sulfato de potássio: 10
- cloreto de magnésio: 1,4
- ágar: 15

Na preparação foi acrescentado 1% de glicerol. O pH final, a 25°C, foi ajustado em $7,0 \pm 0,2$.

3.5. Microrganismos indicadores

Os microrganismos utilizados como culturas indicadoras para os testes de sensibilidade da substância antimicrobiana produzida pelo isolado 4B foram

as espécies patogênicas para humanos e animais, fitopatógenas e microrganismos deteriorantes de alimentos entre outros descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Microrganismos indicadores utilizados e condições de crescimento

Microrganismo Indicador	Meio de Cultura	Temperatura (°C)
Gram positivas		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	BHA	37
<i>Bacillus cereus</i> 8A (ambiente)	BHA	37
<i>Bacillus subtilis</i> (alimento)	BHA	37
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	BHA	37
<i>Enterococcus faecalis</i> (alimento)	BA	37
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	MRSA	30
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (alimento)	BHA	30
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	BHA	37
<i>Listeria monocytogenes</i> (alimento)	BHA	37
<i>Micrococcus luteus</i> (clínico)	BA	37
<i>Pediococcus</i> sp. (alimento)	MRSA	30
<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> (clínico)	BHA	37
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	BHA	37
<i>Staphylococcus intermedius</i> (clínico)	BHA	37
<i>Staphylococcus intermedius</i>	BHA	37
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (clínico)	BHA	37
<i>Streptococcus agalactiae</i> (clínico)	BA	37
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (clínico)	BA	37
<i>Streptococcus</i> sp. (ambiente)	BA	37
Gram negativas		
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	MHA	37
<i>Enterobacter aerogenes</i> (alimento)	BHA	37

<i>Escherichia coli</i> (alimento)	BHA	37
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	BHA	37
<i>Pasteurella haemolytica</i> (clínico)	MHA	37
<i>Proteus mirabilis</i> (clínico)	BHA	37
<i>Proteus vulgaris</i> (clínico)	BHA	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (clínico)	BHA	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (clínico)	BHA	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ambiente)	BHA	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ambiente)	BHA	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4B (ambiente)	BHA	37
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (isolado clínico)	BHA	37
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	BHA	37
<i>Salmonella</i> Gallinarium (alimento)	BHA	37
<i>Salmonella</i> sp.	BHA	37
<i>Serratia marcescens</i> (clínico)	BHA	37
<i>Serratia</i> sp.	BHA	37
<i>Xanthomonas axenopodis</i>	BHA	37
Leveduras		
<i>Candida utilis</i> CCT 3469	PA	25
<i>Candida kefir</i> (alimento)	PA	25
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	PA	25
<i>Malassezia paquidermathis</i>	PA	25

BA, ágar sangue; BHA, ágar de cérebro e coração; MHA, ágar Müller Hinton; PA, ágar batata; MRSA, ágar Man Rogosa e Sarpe;

3.6. Manutenção dos microrganismos indicadores

Os microrganismos utilizados neste trabalho, seus meios e suas temperaturas ótimas de crescimento estão relacionados na Tabela 2. Os microrganismos foram mantidos congelados a -18°C em meio de cultura contendo 20% glicerol. Para isso, 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 ágar de cérebro e coração (BHA) e a temperatura de 30°C . Posteriormente foram transferidos para tubos de microcentrífuga adicionados de glicerol estéril.

Dos congelados as culturas foram inoculadas em caldo e posteriormente em placa, sendo periodicamente renovados.

3.7. Determinação do número de células viáveis dos microrganismos

Para determinar o número de células viáveis por mililitro (UFC/mL) alíquotas de $100\ \mu\text{L}$ foram coletadas e diluídas de 10^1 a 10^7 em tubos de microcentrífuga contendo $900\ \mu\text{L}$ de solução fisiológica (NaCl 0,85%). Após homogeneização em *vortex* foram aplicadas três alíquotas de $20\ \mu\text{L}$ 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.

3.8. Obtenção do sobrenadante da cultura de *P. aeruginosa*

3.8.1. Preparação do pré-inóculo

Em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 20 mL de caldo triptona de soja (TSB) foi colocada a cultura do isolado 4B que estava contida em placas de ágar triptona de soja (TSA). 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 caldo triptona de soja (TSB). A cultura foi incubada por 108 horas em equipamento incubador com agitação (125 rpm) a 30°C. Após este período, a cultura foi centrifugada durante 15 minutos a 10.000 g. O sobrenadante foi conservado em geladeira a 4°C até a utilização.

3.9. Determinação das unidades arbitrárias por mililitro

Foi utilizado o método da diluição seriada para determinar o número de unidades arbitrárias por mL. O sobrenadante foi diluído sucessivamente em placas de microtitulação a partir da proporção 1:1 em solução salina estéril (NaCl 0,85%), tendo-se diluições de 1/2, 1/4, 1/8, 1/32, 1/64 e assim

sucessivamente. Alíquotas de 20 μ L dessas diluições foram inoculadas em discos de celulose e testadas em placas com ágar nutriente previamente inoculadas com uma solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%) contendo 10^8 UFC/mL de *Bacillus cereus* ATCC 14579. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O título designado como UA/mL foi definido como sendo a recíproca da última diluição que apresentou halo de inibição (Kimura et al., 1998).

3.10. Curva de crescimento e produção

Foi realizada uma curva de crescimento do microrganismo produtor e da produção da substância antimicrobiana a 30°C em caldo triptona de soja (TSB) para avaliar a cinética de produção da substância antimicrobiana.

3.10.1. Preparação do pré-inóculo

A bactéria produtora foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 20 mL de caldo triptona de soja (TSB) e incubada em equipamento com agitação (125 rpm) a 30°C por 24 horas. Após este período, uma alíquota foi transferida para um tubo contendo caldo triptona de soja (TSB), ajustando-se a absorbância a 600 nm em espectrofotômetro até atingir uma leitura de 0,2 unidades de absorbância no referido comprimento de onda. 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 absorvância 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 caldo triptona de soja (TSB). Este foi considerado o ponto zero da curva. Em intervalos de 4 horas foram realizados a medida da absorvância a 600 nm, a determinação das UFC/mL e das UA/mL conforme descrito nos itens 3.7 e 3.9 respectivamente.

Também foi realizado um acompanhamento do pH da cultura utilizando fita universal de pH. Os cultivos foram feitos em duplicatas.

3.11. Purificação

Diversas etapas foram executadas para purificar a substância antimicrobiana. Em cada um deles foi quantificada a atividade antimicrobiana (UA/mL) conforme item 3.9 e a quantidade de proteína pelo método de Lowry (conforme item 3.11.5) para calcular o fator de purificação e o rendimento em cada passo. A Figura 7 mostra o esquema de purificação utilizado.

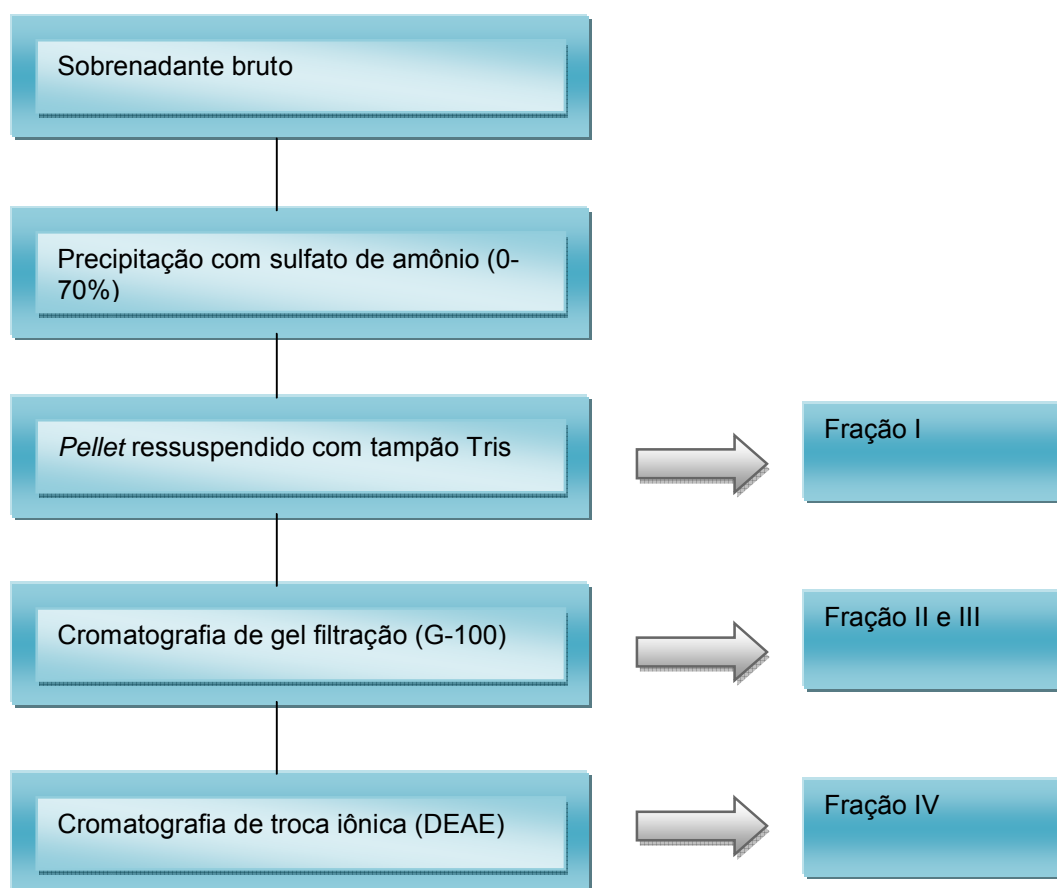


Figura 7 - Esquema de purificação da substância antimicrobiana

3.11.1. Precipitação fracionada com sulfato de amônio

Primeiramente, foi investigada a melhor faixa de saturação de sulfato de amônio para precipitação da substância antimicrobiana. Foram testados os seguintes intervalos de saturação: 0-20%; 20-40%; 40-60%; 60-80%; 80-100% de saturação.

A etapa de precipitação fracionada teve início com a adição lenta de sulfato de amônio em 50 mL do sobrenadante bruto, sob agitação, em banho de gelo, adicionando aos poucos a quantidade suficiente de sulfato de amônio para atingir uma concentração de 20% (Englard & Seifter, 1990). Após deixar sob agitação durante 15 minutos, realizou-se a centrifugação (4°C) a 10.000 g

durante 10 minutos. O *pellet* foi separado do sobrenadante e ressuspenso com 1,0 mL de tampão tris 10 mM pH 7,5. O sobrenadante foi recolocado em banho de gelo e foi adicionada a quantidade 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 3.11.5). A verificação da faixa de saturação com sulfato de amônio foi realizada três vezes em diferentes datas.

3.11.2. Cromatografia de gel filtração

Após determinar o melhor intervalo de saturação para a precipitação com sulfato de amônio, precipitou-se neste intervalo (0-70%) 50 mL do sobrenadante em banho de gelo e agitação magnética. Foi realizada a centrifugação conforme descrito no item anterior. O *pellet* obtido a partir da melhor faixa de saturação foi ressuspenso em 1,0 mL de tampão tris 10 mM pH 7,5, designada como fração I.

Uma alíquota de 1,0 mL da fração I foi aplicada numa coluna de gel filtração (0,8 x 30 cm) Sephadex G-100 pré-equilibrada com tampão tris 10 mM pH 7,5. Esta técnica baseia-se na separação pela diferença de tamanho de moléculas em uma solução através da passagem destas por uma matriz cromatográfica. O fluxo utilizado foi de aproximadamente 20 mL/h (gravidade simples). Frações de 1,0 mL foram coletadas em tubos de microcentrifuga e a

absorbância a 280 nm foi determinada em espectrofotômetro. Todas as frações foram testadas quanto à atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus* ATCC 14579 conforme item 3.12.1.

3.11.3. Cromatografia de troca iônica (DEAE Sepharose)

As alíquotas com atividade antimicrobiana obtidas no item anterior foram agrupadas e designadas como frações II e III. A fração II foi aplicada em uma coluna de troca iônica DEAE Sepharose (1 x 5 cm) equilibrada com tampão tris 10 mM pH 7,5. A coluna foi eluída com este tampão e posteriormente com um gradiente linear de NaCl (de 0 a 1M). O fluxo utilizado foi de 30 mL/h, controlado através de uma bomba peristáltica. Alíquotas de 4,0 mL foram coletadas através de um coletor sendo determinada a absorbância a 280 nm e a atividade microbiana de cada alíquota contra *Bacillus cereus* ATCC 14579 segundo item 3.12.1. Foi obtida neste passo de purificação a fração IV.

3.11.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida

O grau de purificação e a massa molecular foram estimados por eletroforese em gel de poliacrilamida, conforme descrito por Bhunia & Johnson, 1992, com algumas modificações. Alíquotas do sobrenadante bruto e das frações I, II, III e IV foram adicionadas de tampão de eletroforese e colocadas em banho-maria a 100°C por 5 min. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% e a eletroforese foi realizada utilizando um sistema *Mighty Small* com uma corrente de 25 mA por gel. Após a eletroforese o gel de

poliacrilamida 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 (Bizani et al., 2005). Sobre ele foi despejado um BHA contendo aproximadamente 10^6 UFC/mL de *Bacillus cereus* ATCC 14579. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C foi observada a presença de halos de inibição na banda correspondente à substância antimicrobiana de natureza protéica existente. A outra metade do gel (onde foram colocadas as amostras com β -mercaptoetanol) foi corada com prata para a observação das bandas de proteína (Switzer et al., 1979).

3.11.5. 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-Ciocalteu (FC). Foi realizada uma curva padrão com soro albumina bovina (BSA). A absorbância foi medida a 750 nm calculando-se as concentrações de proteína solúvel. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

3.12. Caracterização das frações II e III

As frações II e III foram caracterizadas testando-se a estabilidade frente a tratamento térmico, estabilidade frente à 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 *Pseudomonas aeruginosa* 4B.

3.12.1. Espectro de ação

A atividade antimicrobiana das frações I, II e III contra as culturas indicadoras descritas no item 3.5 foi avaliada pelo método de difusão em ágar com discos (Kimura et al., 1998).

Foram realizadas suspensões das culturas indicadoras em solução salina com 10^8 UFC/mL (0,5 na escala de MacFarland) 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 μ L das frações I, II e III. Após o período de incubação de 24-48 horas nas condições ótimas das culturas indicadoras, foi observada a formação de halos de inibição ao redor dos discos indicando a presença de substâncias inibidoras. Os halos foram medidos com régua milimetrada. O teste foi realizado em triplicata com dois sobrenadantes obtidos em diferentes datas.

3.12.2. Estabilidade térmica

Foram utilizadas alíquotas de 500 μ L das frações II e III e 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 minutos e 121°C (termobloco e autoclave) durante 15 min. Testou-se a estabilidade a 100°C durante 5, 10, 30, e 60 minutos. Após cada tratamento foi testada a atividade antimicrobiana

contra *Bacillus cereus* ATCC 14579 conforme descrito no item anterior. Foram realizados controles com uma alíquota das frações II e III sem tratamento térmico a fim de calcular a atividade antimicrobiana residual em cada caso. Cada experimento foi realizado em duplicata com três alíquotas das frações II e III obtidas em diferentes datas. A fórmula utilizada para calcular a atividade residual (AR) por porcentagem foi:

EQUAÇÃO 1

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

Sendo:

H_T = halo do sobrenadante após tratamento (mm)

H_C = halo do controle (mm)

A.R. = atividade residual

3.12.3. Estabilidade frente ao pH e ação em diferentes pHs

Alíquotas de 200 μL das frações II e III foram incubadas com 200 μL de tampão em pHs na faixa de 2 a 11 por 2 horas a 25°C, a fim de avaliar a estabilidade frente aos diversos pHs. Os tampões utilizados foram tampão HCl:KCl (pH 2,0); tampão glicina-HCl (pH 3,0); tampão citrato (pH 4,0 e 5,0); tampão fosfato (pH 6,0 a 8,0); tampão glicina-NaOH (pH 9,0 e 10,0) e tampão bicarbonato-carbonato (pH 11,0) todos em uma concentração de 0,25 M. Posteriormente, as soluções foram neutralizadas, e então foi avaliada novamente a atividade antimicrobiana frente ao *Bacillus cereus* ATCC 14579

conforme descrito no item 3.12.1. Os controles das frações II e III foram realizados colocando 200 μ L de tampão tris no lugar dos tampões com diferentes pHs. A atividade antimicrobiana residual foi calculada segundo a equação 1. Os testes foram realizados em duplicata com três alíquotas da fração II e III obtidas em diferentes datas.

3.12.4. Estabilidade frente a solventes orgânicos, detergentes e outras substâncias químicas

Foi avaliada a estabilidade das frações II e III frente a diferentes solventes orgânicos. Para isto, foram colocadas alíquotas de 200 μ L com 100 μ L de cada solvente orgânico, incubando-se (após homogeneização) durante duas horas a 37°C. Os solventes utilizados foram: acetona, metanol, etanol, 2-propanol, butanol, dimetil-sulfóxido (DMSO), tolueno, xileno e clorofórmio. Foram realizados controles das frações II e III 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 numa concentração final de 10% (v/v), Triton X-100 com concentrações de 1% e 10% (v/v) e deoxicolato de sódio (concentração final de 1 mg/mL). Alíquotas das frações II e III foram incubadas com os detergentes durante 60 min. a 37°C.

Foi avaliada também a estabilidade frente ao tratamento com EDTA (concentração final de 10 mM) e ácido tricloroacético (TCA – concentração final de 100 mg/mL). Com o TCA, as frações foram previamente incubadas por 2 h a 4°C, centrifugadas a 10.000 g por 5 min. e neutralizadas antes da realização

dos testes de atividade antimicrobiana. A estabilidade a uréia foi determinada em concentrações de 4 e 8 M durante 60 min. a 37°C.

Em todos os casos a atividade residual foi avaliada contra *Bacillus cereus* ATCC 14579 conforme descrito no item 3.12.1 e calculada a atividade residual segundo a equação 1. Os testes foram realizados em duplicata com três sobrenadantes obtidos em datas diferentes.

3.12.5. Atividade como biosurfactante

Para verificar se as frações II e III apresentavam características biosurfactantes foi determinado o índice de emulsificação com os seguintes hidrocarbonetos: xileno, tolueno, óleo de girassol, *n*-hexano, e óleo mineral. O teste foi realizado conforme Bicca, 1998, pela adição de 2 mL da fonte de hidrocarboneto em 2 mL da fração II e III e agitando em *vortex* por 2 minutos. A leitura foi realizada após 24 horas.

3.12.6. Determinação da atividade proteolítica com azocaseína

Para verificar atividade como protease, o sobrenadante bruto e todas as frações (I, II, III e IV) foram testadas para atividade proteolítica. Como substrato foi utilizada a azocaseína (Sigma Chemicals Co., St. Louis, USA) dissolvida em água destilada, na concentração de 20 g/L. A reação consistiu de 100 µL de solução de azocaseína, 200 µL de tampão tris 0,01 M, pH 7,5 e 100 µL da amostra. A mistura foi incubada em banho-maria a 50°C durante 15 min. A reação foi parada com a adição de 800 µl de ácido tricloroacético (TCA) 20%,

centrifugação por 10 min a 10.000 g. O controle da reação foi preparado através da adição de TCA 800 μL , com 100 μL da amostra e 200 μL do tampão.

Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade necessária de enzima para aumentar a absorvância em 0,01 a 400 nm.

3.13. Efeitos da substância antimicrobiana sobre o crescimento de microrganismos

3.13.1. Determinação do efeito e modo de ação do sobrenadante bruto contra *Bacillus cereus* ATCC 14579 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Este experimento buscou avaliar o efeito e modo de ação (bacteriostático ou bactericida) do sobrenadante bruto sobre duas bactérias indicadoras, *Bacillus cereus* ATCC 145798 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Foram realizados pré-inóculos das bactérias indicadoras em tubos contendo 10 mL de BHI incubado na estufa a 37°C durante 18 horas. Após esse período, as culturas foram diluídas com meio BHI até obter uma concentração de aproximadamente 10^5 UFC/ mL (através da realização prévia da 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 absorvância (600 nm) e a contagem de UFC/mL. Após 4h30min de incubação foram adicionados 4 mL do sobrenadante bruto (concentração de 1600

UA/mL). No cultivo controle, adicionou-se 4 mL de meio (BHI) no lugar do sobrenadante. Após 1:30, 3:30, 5 e 24 horas foram monitoradas as UFC/mL e a absorbância a 600 nm.

3.13.2. Determinação da concentração inibitória mínima

Na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizaram-se os métodos descritos no manual do *National Committee of Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) Tabelas M7-T2 (1998), modificado para a utilização de microplacas.

Nesta avaliação, 100 μ L de uma suspensão contendo 10^6 UFC/mL do microrganismo em BHI foram adicionados em 100 μ L de solução fisiológica estéril contendo diferentes concentrações das frações I, II e III. As concentrações utilizadas foram de 1,56 UA/mL a 1600 UA/mL (concentração final). No controle positivo foi utilizada solução fisiológica estéril no lugar das frações I, II e III em caldo BHI. Nos controles negativos foram colocados 100 μ L das diferentes concentrações das frações I, II e III. Posteriormente, as placas foram incubadas durante 24h a 37°C.

A menor diluição das frações onde não houve crescimento foi considerada como a CIM.

3.13.3. Determinação da concentração bactericida mínima

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada semeando uma alíquota de 20 μ L dos poços que não apresentavam

crescimento em poços de outra microplaca contendo 100 μ L de BHI estéril. Os controles também foram reinoculados. A microplaca foi incubada em estufa a 37°C durante 24 h. A menor diluição das frações I, II e III onde não houve crescimento foi considerada como a CBM.

3.13.4. Curva dose resposta

Uma suspensão em BHI de *Bacillus cereus* ATCC 14579 contendo 10^8 UFC/mL foi inoculada com diferentes concentrações das frações II e III (entre 6,25 UA/mL e 800 UA/mL concentração final) durante 60 minutos. Foram determinadas em cada concentração as UFC/mL finais. O experimento foi realizado em triplicata.

3.14. Avaliação da atividade da fração II em hambúrgueres bovinos artificialmente contaminados

3.14.1. Seleção e armazenamento dos hambúrgueres de carne bovina

Os hambúrgueres de carne bovina utilizados neste trabalho foram hambúrgueres crus comercializados congelados, de uma mesma marca. A composição dos hambúrgueres utilizados, conforme informação do fabricante, era de: 13,6% de gorduras totais, 15,2% de proteínas, 13,8% de carboidratos, 0,73% de fibra alimentar, 0,87% de sódio e porcentagens menores de cálcio e

ferro. Os hambúrgueres foram comprados no comércio local e imediatamente transportados para o laboratório em caixas isotérmicas e armazenados em freezer a -18°C até o momento dos experimentos.

3.14.2. Tratamento dos hambúrgueres de carne bovina

No interior de uma câmara de fluxo laminar, os hambúrgueres (56g) foram descongelados em temperatura ambiente, por 30 min. Após, 25g da carne do hambúrguer foram pesadas em placa de Petry esterilizada. Os hambúrgueres foram separados em três grupos: grupo controle negativo, onde não foi inoculado nada; grupo controle positivo, onde foi inoculado 1,0 mL de suspensão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 contendo 10^6 UFC/mL; e o grupo teste, onde foi inoculada a bactéria *S. aureus* ATCC 25923 e 1,0 mL da fração II (1600 UA/mL). Os inóculos foram misturados na massa de hambúrguer com o auxílio de uma espátula estéril. Foi separada uma amostra para quantificação dos microrganismos no tempo zero (sem armazenamento congelado) e as demais placas foram armazenadas em geladeira a 4°C , por 24 horas, e em freezer a -18°C , por 7, 14 e 21 dias.

3.14.3. Avaliação da atividade da fração II em hambúrguer de carne bovina

Para avaliar a atividade da fração II, frente à bactéria *S. aureus* ATCC 25923 em hambúrguer de carne bovina durante seu armazenamento, foram

coletadas porções dos três grupos e analisadas em 24 horas (4°C), 7,14 e 21 dias (-18°C) de armazenamento.

Cada porção de hambúrguer de 25 g foi descongelada em temperatura ambiente por 30 min., no interior de uma câmara de fluxo laminar. Estas amostras foram acondicionadas em saco plástico estéril e homogeneizadas em 225,0 mL de água peptonada 0,1% estéril, obtendo-se dessa maneira a diluição 1:10, a partir da qual foram preparadas as diluições decimais subseqüentes com água peptonada 0,1%.

As amostras de hambúrguer diluídas foram semeadas em ágar Baird Parker (Merck), adicionado de emulsão de gema de ovo e solução de telurito de potássio 1,0% (Labclin), com a técnica de semeadura de gota, segundo Miles & Misra (1938). As placas contendo o meio Baird Parker foram divididas em 6 partes iguais e em cada uma das partes foi inoculado 20 µL da diluição. Esta técnica possibilita, portanto, que sejam semeadas duas diluições em triplicata em uma única placa. As placas depois de totalmente secas foram incubadas invertidas por 48 h a 37°C. Após o período de incubação foi realizada a contagem das colônias típicas de *S. aureus* ATCC 25923 em cada uma das partes da placa. O número de UFC encontrado em cada parte foi multiplicado por 50, para obter-se o número de UFC em 1,0 mL.

4. RESULTADOS

4.1. Microrganismo produtor

4.1.1. Caracterização citomorfológica, bioquímica e fisiológica

A linhagem produtora foi submetida a estudos taxonômicos baseados na morfologia celular, morfologia da colônia, características de crescimento e diversos testes bioquímicos. Os resultados dos testes bioquímicos e morfológicos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados dos testes bioquímicos e morfológicos do microrganismo selecionado.

TESTE	RESULTADOS
Coloração (Gram)	-
Mobilidade (gota pendente)	+
Oxidase	+
Catalase	+
Indol	-
Teste de oxidação/fermentação	Oxidativo
Citrato	+
Nitrato	+
Lactose	-
Glicose	+
Maltose	-

+, positivo; -, negativo

As células bacterianas apresentaram forma de bastonetes Gram-negativos e são aeróbias estritas. As colônias bacterianas eram grandes e chatas, úmidas e lisas que se espalham pelo meio. Apresentava margens finas com bordos irregulares, um pigmento verde-azulado e também um odor característico de “grapete” (aminoacetofenona).

Os testes realizados indicaram que a bactéria pertence ao gênero *Pseudomonas*.

4.1.2. Análise filogenética

O seqüenciamento do rDNA 16S e a subsequente comparação com as espécies do gênero *Pseudomonas* indicaram que a bactéria utilizada neste

estudo era relacionada às espécies *P. aeruginosa* (98%) e *P.thermaerum* (100%). A Figura 8 mostra a árvore filogenética obtida.

Yabuuchi et al. (1992) propuseram a mudança taxonômica de algumas espécies do gênero *Pseudomonas* para o gênero *Burkholderia*, tendo como argumento as seqüências dos rDNA 16S, os valores de homologia do DNA-DNA, a composição dos ácidos graxos e lipídeos celulares e as características fenotípicas. No total, sete espécies do gênero *Pseudomonas* foram transferidas para o novo gênero, incluindo *Burkholderia cepacia*. A seqüência de rDNA 16S de *B. cepacia* foi incluída na análise filogenética, e verificou-se uma baixa homologia entre a bactéria 4B e a *B. cepacia*.

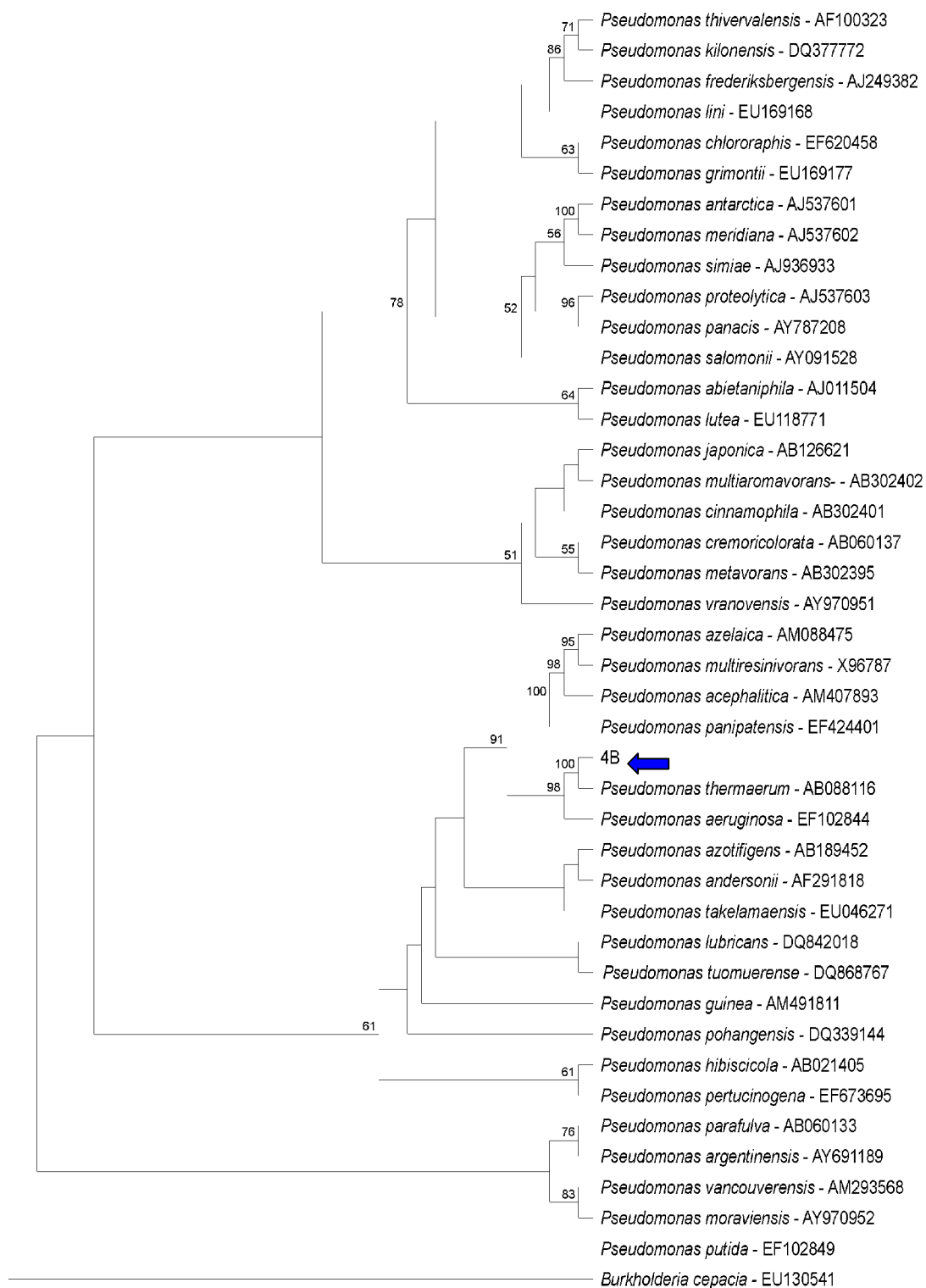


Figura 8 - Árvore filogenética indicando a posição do isolado de *Pseudomonas* sp. 4B (indicado pela seta) entre representantes do gênero *Pseudomonas*, obtida a partir da seqüência do rDNA 16S através do método de *neighbor-joining*. Os números sobre os ramos indicam os valores de *bootstrap*.

4.1.3. Detecção da produção de piocianina

A bactéria 4B apresentou produção do pigmento piocianina quando inoculada no meio, indicando ser uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 9).

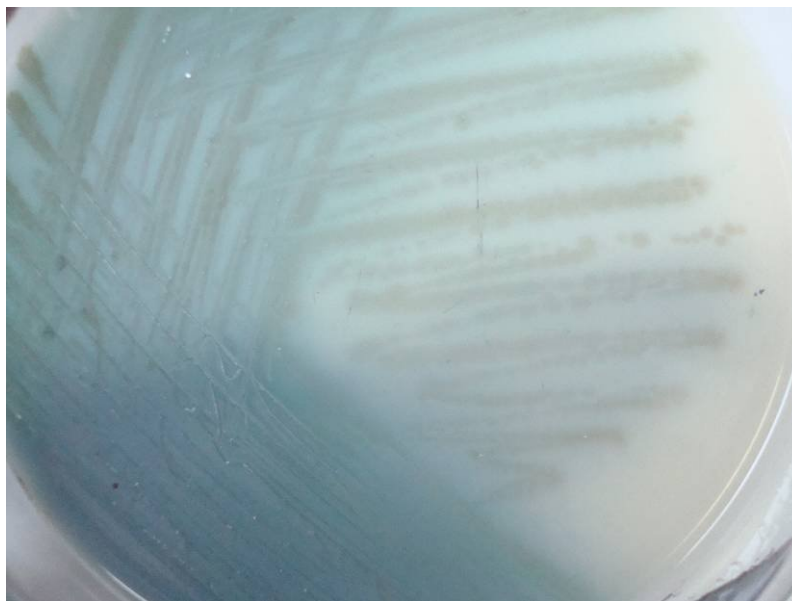


Figura 9 – Detecção de piocianina, pigmento verde-azulado em meio de cultura para detecção do pigmento piocianina.

4.2. Curva de crescimento e produção da *P. aeruginosa* 4B

A *P. aeruginosa* 4B foi incubada aerobicamente em TSB a 30°C sob agitação mecânica. A atividade antimicrobiana foi inicialmente detectada na fase de crescimento exponencial e a atividade máxima foi observada em 108 horas, durante a fase estacionária (Figura 10). O pH manteve-se entre 7,5 – 8,0 durante todo o cultivo, e também não houve inativação da atividade antimicrobiana.

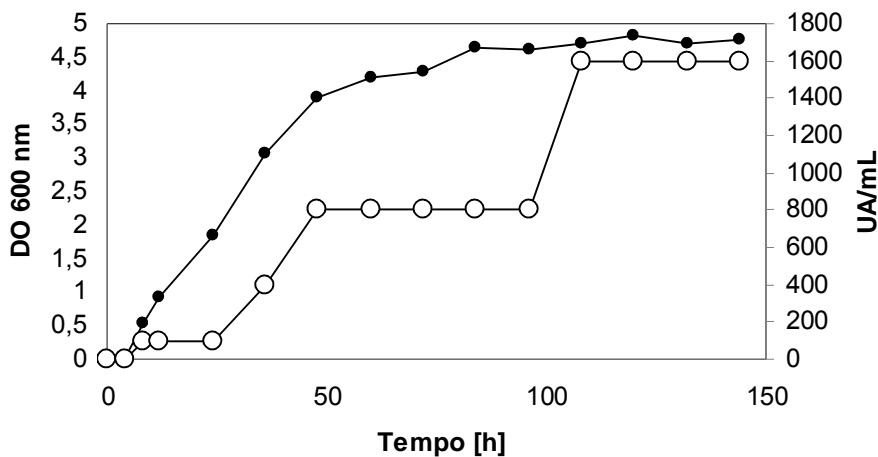


Figura 10 - Curva de crescimento e produção de atividade antimicrobiana. A densidade óptica (●), e a atividade antimicrobiana (○) foram monitoradas. ICTA-UFRGS, 2007.

4.3. Purificação parcial da substância antimicrobiana

4.3.1. Precipitação fracionada com sulfato de amônio

A precipitação fracionada com sulfato de amônio foi realizada com três sobrenadantes obtidos em diferentes datas. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para um destes sobrenadantes (os resultados para os outros dois foram similares). A Figura 11 mostra o perfil de precipitação fracionada para este caso.

Tabela 4 - Dados de purificação para as diferentes frações obtidas na precipitação fracionada com sulfato de amônio.

Fração	A (UA/mL)	V (mL)	AT (UA)	Prot. (mg/mL)	Prot. T (mg)	AE (UA/ mg proteína)	FP	Y (%)
SN bruto	1600	50	80000	6,8	341	234,6	1	100
0-20%	800	1	800	1,6	1,6	490,8	2,1	1
20-40%	3200	1	3200	4,9	4,9	647,8	2,8	4
40-60%	3200	1	3200	6,3	6,3	511,2	2,2	4
60-80%	1600	1	1600	3,9	3,9	407,1	1,7	2
80-100%	0	1	0	1,9	1,9	0	0	0
SN final	0	51	0	1,43	72,9	0	0	0

SN, sobrenadante; A, atividade (UA/mL); V, volume (mL); AT, atividade total (UA); Prot., proteína (mg/mL); Prot.T, proteína total (mg); AE, atividade específica (UA/mg proteína); FP, fator de purificação; Y, rendimento (%).

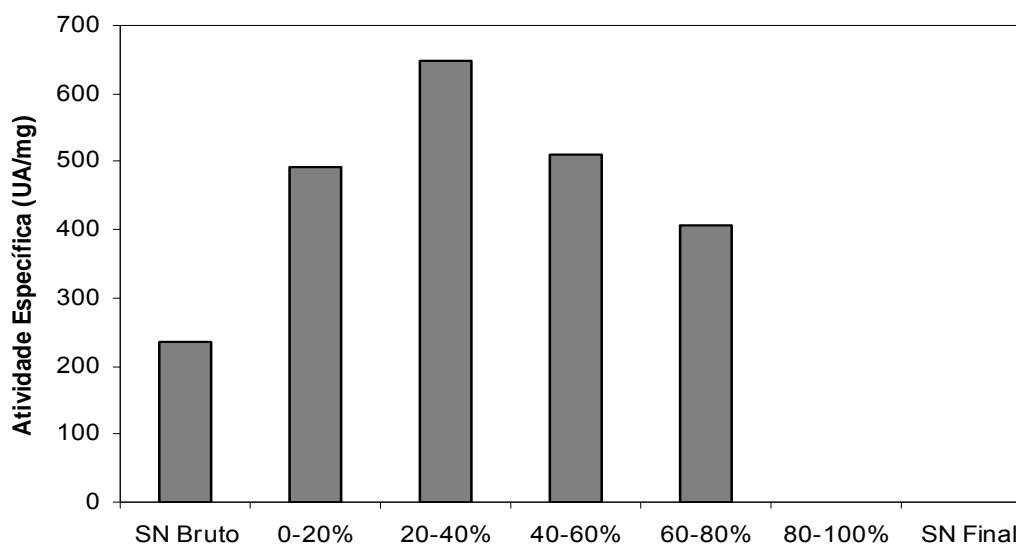


Figura 11 - Atividade específica (UA/mg) para cada uma das frações obtidas durante a saturação com sulfato de amônio. SN: sobrenadante bruto. ICTA-UFRGS, 2007.

A partir da Tabela 4, é possível observar que os maiores fatores de purificação estão nas faixas de saturação de 0-60%, com fatores de purificação acima de duas vezes. Nessas frações também foi obtido o maior rendimento.

No entanto, ainda na faixa de saturação de 60-80% observa-se uma considerável atividade. Em vista disso, foi escolhida a faixa de 0-70% de sulfato de amônio para as próximas etapas do trabalho.

4.3.2. Cromatografia líquida de gel filtração (Sephadex G-100)

A Figura 12 ilustra o perfil de eluição da amostra, obtida após a purificação por cromatografia de permeação em gel utilizando a resina Sephadex G-100, equilibrada com tampão tris 10 mM pH 7,5. As frações II e III correspondem ao primeiro e segundo pico de atividade antimicrobiana, respectivamente.

A partir do gráfico é possível observar que foram detectados dois picos de atividade antimicrobiana. A fração II apresentou maior atividade específica e atividade inibitória contra *B. cereus*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. haemolytica*, enquanto que a fração III apresentou atividade contra *B. cereus*, *S. aureus* e *S. agalactiae*.

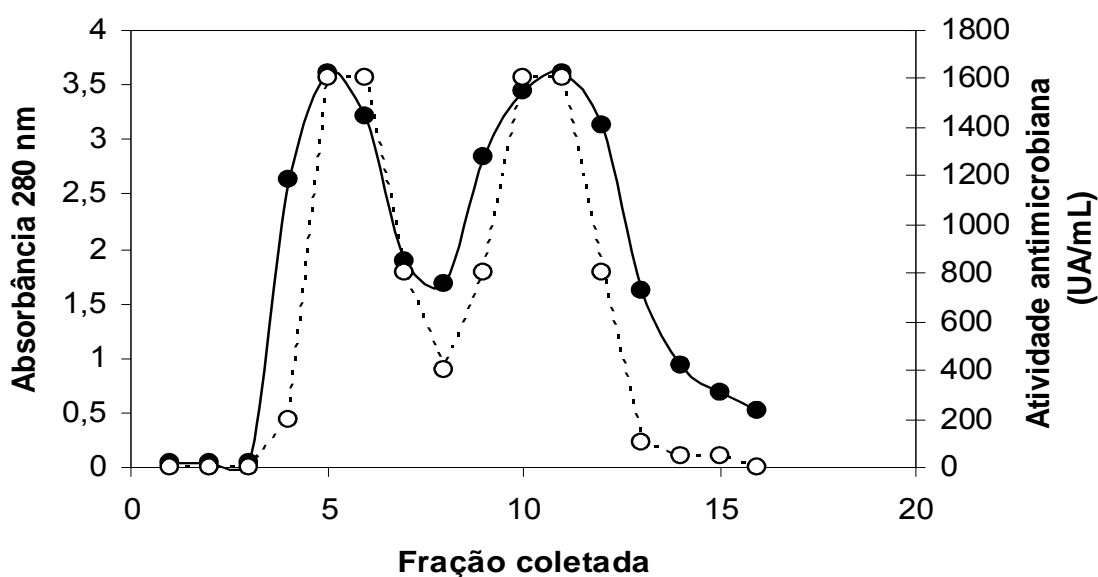


Figura 12 - Perfil de eluição do precipitado (0-70%) em coluna de gel filtração Sephadex G-100. A absorbância a 280 nm (●) e a atividade antimicrobiana em UA/mL (○) foram determinadas para cada fração coletada. ICTA-UFRGS, 2007.

4.3.3. Cromatografia de troca iônica (DEAE Sepharose)

As frações 5, 6 e 7 de duas eluições da coluna de gel filtração foram agrupadas, denominadas de fração II e aplicadas em uma coluna de troca iônica (DEAE Sepharose) equilibrada com tampão tris 10 mM pH 7,5.

A etapa de purificação utilizando a cromatografia de troca iônica consistiu da alimentação da amostra, lavagem e eluição da amostra utilizando o gradiente de NaCl (0-1M). A absorbância a 280 nm e a atividade antimicrobiana das frações coletadas (4 mL) foram determinadas. Os resultados são demonstrados na Figura 13.

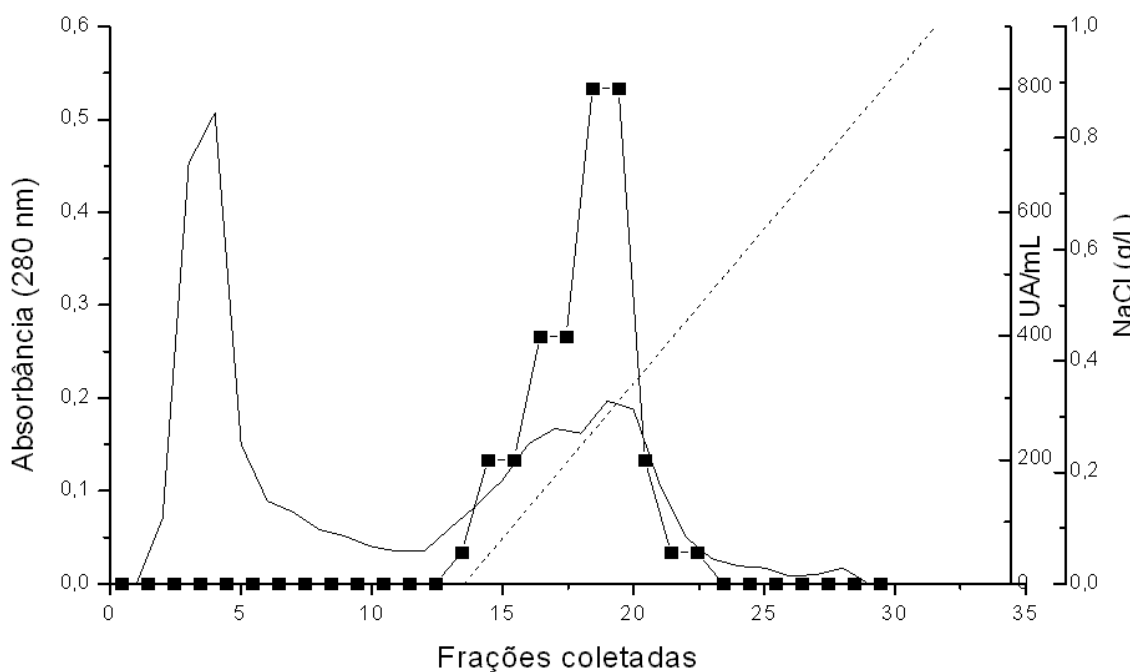


Figura 13 - Perfil de eluição da fração II em coluna de troca-iônica (DEAE Sepharose), com tampão tris 10 mM pH 7,5 até a alíquota 10. A absorbância a 280 nm e a antimicrobiana em UA/mL (■) foram determinadas para cada fração coletada. O gradiente de NaCl é apresentado através da linha tracejada. ICTA-UFRGS, 2007.

As frações 18 a 20 apresentaram atividade antimicrobiana, foram agrupadas e denominadas Fração IV.

Os resultados do processo de purificação estão sumarizados na Tabela 5. A substância antimicrobiana foi purificada cerca de 35 vezes com um rendimento de 5,4%.

Tabela 5 - Dados da purificação mostrando as frações obtidas nos diferentes passos da purificação parcial da substância antimicrobiana.

Fração	A (UA/mL)	V (mL)	AT (UA)	Prot. (mg/mL)	Prot.T (mg)	AE (UA/ mg proteína)	FP	Y (%)
SN bruto	1600	74,5	119200	3,9	291,3	409,2	1,0	100
I	3200	3	9600	3,9	11,8	812,2	1,9	8,0
II	1600	7,5	12000	0,5	4,03	2963,0	7,3	10,1
IV	1600	4	6400	0,1	0,5	14545,0	34,9	5,4

SN, sobrenadante; A, atividade (UA/mL); V, volume (mL); AT, atividade total (UA); Prot., proteína (mg/mL); Prot.T, proteína total (mg); AE. Atividade específica (UA/mg proteína); FP, fator de purificação; Y, rendimento (%).

4.3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os resultados obtidos na eletroforese estão apresentados na Figura 15. Pode-se observar que a fração IV apresenta uma banda majoritária de aproximadamente 30 kDa. No gel de atividade, ao ser aplicado o sobrenadante bruto observam-se 2 regiões de inibição, enquanto que para a fração IV a atividade inibitória corresponde do R_f (0,51) da banda majoritária (Figura 14). Estes resultados indicam que a atividade antimicrobiana produzida por *P. aeruginosa* 4B corresponde a uma substância de natureza protéica com massa molecular de aproximadamente 30 kDa.

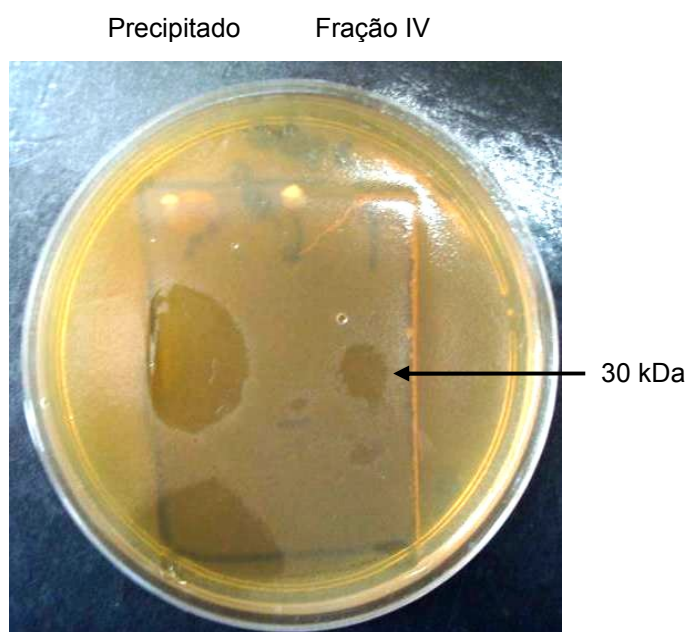


Figura 14 – Gel de atividade antimicrobiana contra *B. cereus* ATCC 14579 do precipitado e da fração IV. ICTA-UFRGS.

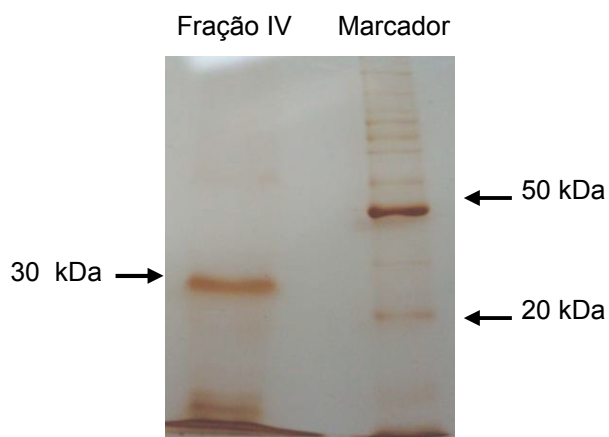


Figura 15 – Eletroforese: gel de poliacrilamida corado com prata apresentando as bandas de proteína da fração IV e do marcador molecular. ICTA-UFRGS, 2007.

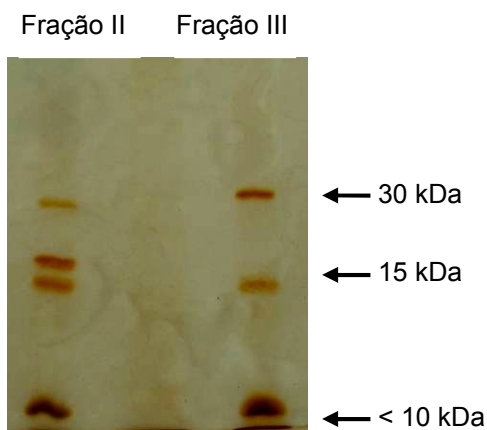


Figura 16 – Eletroforese: gel corado com prata com as bandas de proteína das frações II e III. ICTA-UFRGS, 2007.

As frações II e III apresentaram três bandas iguais, sugerindo que a fração II saia sob a forma de um aglomerado protéico diferentemente da fração III (Figura 16).

4.4. Caracterização da fração II e III

4.4.1. Espectro de ação

A atividade antimicrobiana da fração I, II e III foi testada contra diversos microrganismos, entre eles bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. Os halos de inibição obtidos quando 20 μ L das frações I, II e III foram aplicados sobre discos de celulose de 6 mm de diâmetro em placas de Petry previamente inoculadas com o microrganismo indicador estão demonstrados na Tabela 6. Foi encontrada atividade sobre microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e em leveduras. Algumas bactérias

patogênicas e deteriorantes de alimento como *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus* foram inibidas.

Tabela 6 - Espectro de ação da fração I, II e III de acordo com o halo de inibição (mm).

Microrganismo Indicador	Fração I Halo de Inibição (mm)†	Fração II Halo de Inibição (mm)†	Fração III Halo de Inibição (mm)†
Gram positivas			
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	25	15	12
<i>Bacillus cereus</i> 8A (ambiente)	23	12	10
<i>Bacillus subtilis</i> (alimento)	25	11	10
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	18	12	10
<i>Enterococcus faecalis</i> (alimento)	23	8	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	24	9	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (alimento)	13	8	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	15	13	9
<i>Listeria monocytogenes</i> (alimento)	12	8	-
<i>Micrococcus luteus</i> (clínico)	26	15	10
<i>Pediococcus</i> sp. (alimento)	25	14	9
<i>Rhodococcus</i> sp. (clínico)	30	20,5	12
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	20	17	14
<i>Staphylococcus aureus</i> (alimento)	20	15	12
<i>Staphylococcus aureus</i> (clínico)	22	16	13
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	17	13	7,5
<i>Staphylococcus intermedius</i> (clínico)	15	13	10
<i>Staphylococcus intermedius</i>	10	8	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (clínico)	17	12	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> (clínico)	20	14	12
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (clínico)	12,5	-	-
<i>Streptococcus</i> sp. (ambiente)	17,5	10	8

Gram negativas			
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (alimento)	10	-	-
<i>Escherichia coli</i> (alimento)	14	8	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-
<i>Pasteurella haemolytica</i> (clínico)	17	10	-
<i>Proteus mirabilis</i> (clínico)	10	10	-
<i>Proteus vulgaris</i> (clínico)	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (clínico)	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (clínico)	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ambiente)	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ambiente)	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4B (ambiente)	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (isolado clínico)	20	14	8
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	-	-	-
<i>Salmonella</i> Gallinarium (alimento)	8	8	-
<i>Salmonella</i> sp.	18	13	12
<i>Serratia marcescens</i> (clínico)	15	10	-
<i>Serratia</i> sp.	12	9	-
<i>Xanthomonas axenopodis</i>	-	-	-
Leveduras			
<i>Candida utilis</i> CCT 3469	14,5	10	-
<i>Candida kefir</i> (alimento)	-	-	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	11	7	-
<i>Malassezia paquidermathis</i>	-	-	-

† Diâmetro ao redor do disco; - sem inibição

4.4.2. Estabilidade térmica da substância antimicrobiana

As frações II e III foram incubadas durante 30 min. em diferentes temperaturas e os valores da atividade residual foram determinados.

A fração II mostrou-se estável a todas as temperaturas testadas, mantendo aproximadamente 100% da sua atividade, inclusive a 100°C por 60 min. Quando a fração II foi incubada a 120°C por 15 min., em termobloco, esta manteve pelo menos 90% de sua atividade, mas quando incubada a 120°C por 15 min., em autoclave, esta manteve somente 70% de sua atividade.

A fração II manteve a sua atividade em 100% mesmo quando estocada a 4°C e a -18°C por até 45 dias.

Após ser liofilizada, a fração II manteve somente 75% de sua atividade.

A fração III mostrou-se estável as temperaturas testadas, mantendo pelo menos 90% da sua atividade (Figura 17).

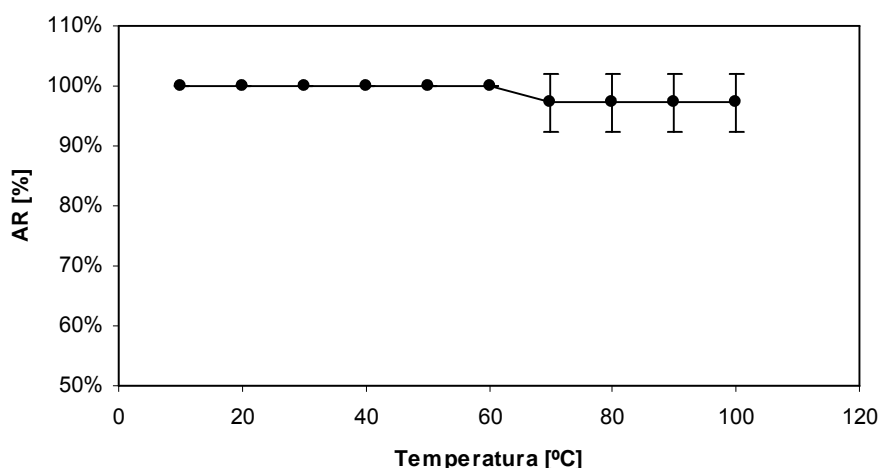


Figura 17 - Estabilidade térmica da substância antimicrobiana da fração III após incubação em diferentes temperaturas durante 30 min demonstrando sua atividade residual (AR). ICTA-UFRGS, 2007.

A atividade da fração III também foi mantida a 100% ao ser incubado a 100°C por até 60 min.

A atividade reduziu ao ser incubada a 120°C por 15 min., em termobloco, mantendo-se em 90%. No entanto, quando as frações foram incubadas a 120°, em autoclave, por 15 min., a atividade manteve-se em 52%.

A fração III também manteve a sua atividade em 100% mesmo quando estocada a 4°C e a -20°C por até 45 dias.

4.4.3. Estabilidade e atividade da substância antimicrobiana em diferentes pHs

A atividade sob diferentes pHs (de 2 a 11) e a estabilidade da atividade antimicrobiana das frações II e III foi avaliada. Os resultados são mostrados na Figura 18 e na Figura 19.

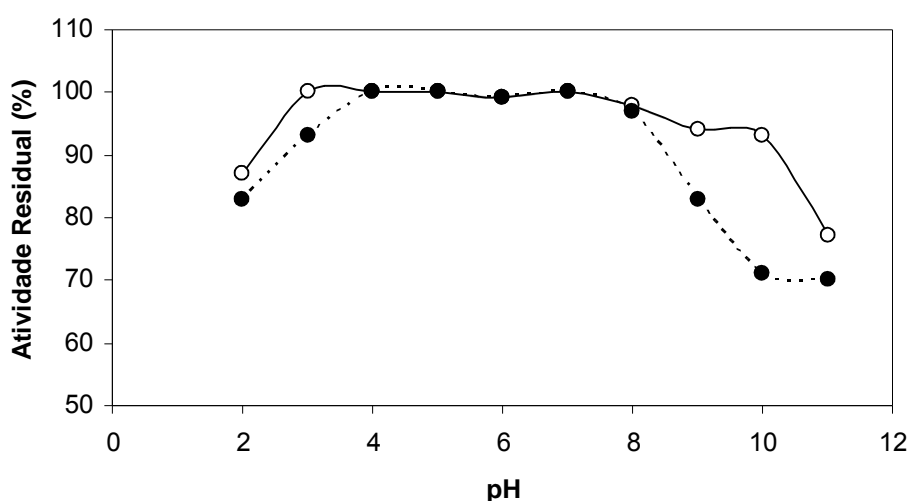


Figura 18 – Avaliação da atividade antimicrobiana da fração II (●) e fração III (○) em diferentes pHs. ICTA-UFRGS, 2007.

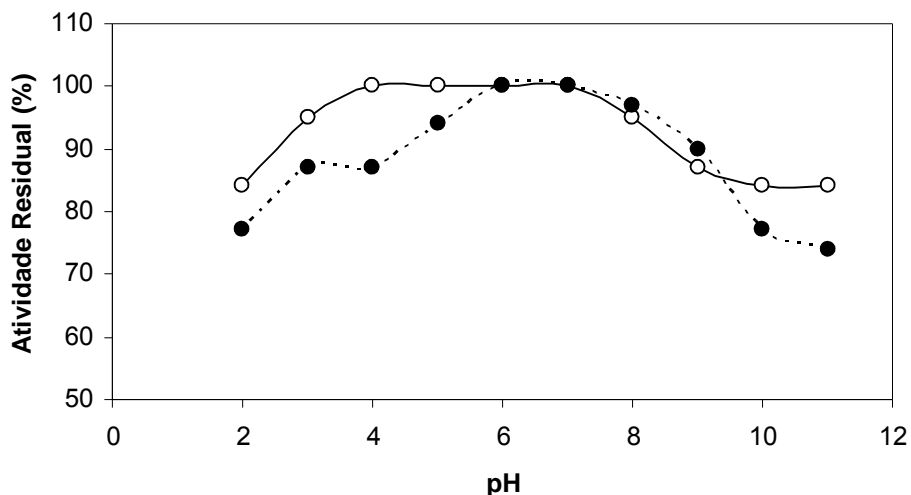


Figura 19 – Avaliação da estabilidade da substância antimicrobiana da fração II (●) e da fração III (o) em diferentes pHs. ICTA-UFRGS, 2007.

A fração II mostrou-se estável em todos os pHs testados, mantendo pelo menos 84% de sua atividade. Essa mesma fração mostrou aproximadamente a mesma atividade em pHs entre 2,0 a 10,0 (80 a 100%), sendo que 75% em pH 11,0.

A fração III mostrou-se estável a todos os pHs testados, mantendo 77% de estabilidade nos pHs 2,0 e 10,0 e 74% no pH 11,0. Sua atividade antimicrobiana se mostrou estável entre os pHs 2,0 a 9,0, sendo que nos pHs 10,0 e 11,0 essa se manteve em torno de 70%.

4.4.4. Estabilidade da substância antimicrobiana frente a enzimas proteolíticas

As frações II e III foram tratadas com papaína, tripsina, pronase E e proteinase K para avaliar o efeito de enzimas proteolíticas sobre a atividade

antimicrobiana. As frações mantiveram sua atividade ao serem tratadas com 2 e 10 mg/mL de todas as enzimas testadas (Tabela 7 e Tabela 8). A fração II apresentou maior sensibilidade a Pronase E, embora permanecendo com 77% da atividade inicial após tratamento com 10 mg/mL desta protease.

Tabela 7 - Atividade residual da fração II após o tratamento com enzimas proteolíticas.

Enzima	Concentração final (mg/mL)	Atividade residual (%)
Papaína	2	98 ± 3
	10	100 ± 0
Tripsina	2	100 ± 0
	10	100 ± 0
Proteinase K	2	92 ± 4,2
	10	94 ± 8,3
Pronase E	2	85 ± 3,3
	10	77 ± 2,9

Testes realizados em pH 7,5 e incubação a 37°C durante 1h. Posteriormente foi avaliada a atividade residual frente ao *Bacillus cereus* ATCC 14579.

Tabela 8 - Atividade residual da fração III após o tratamento com enzimas proteolíticas

Enzima	Concentração final (mg/mL)	Atividade residual (%)
Papáina	2	97 ± 5
	10	94 ± 10
Tripsina	2	94 ± 10
	10	94 ± 10
Proteinase K	2	99 ± 5,8
	10	99 ± 8,8
Pronase E	2	98 ± 3,6
	10	93 ± 3,6

Testes realizados em pH 7,5 e incubação a 37°C durante 1h. Posteriormente foi avaliada a atividade residual frente ao *Bacillus cereus* ATCC 14579.

4.4.5. Estabilidade da substância antimicrobiana frente a solventes orgânicos, detergentes e outras substâncias químicas

O efeito de diferentes substâncias químicas sobre as frações II e III foi avaliado. Os resultados estão demonstrados na Tabela 9.

Quando a estabilidade da atividade antimicrobiana foi testada com Tween 80, a fração II manteve somente 34% de sua atividade residual, e a fração III manteve 59% de sua atividade. O EDTA manteve 78% da atividade da fração II e 70% da atividade da fração III.

Tabela 9 - Efeito de diferentes substâncias químicas na atividade antimicrobiana da fração II e III

TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO	ATIVIDADE RESIDUAL (%) Fração II	ATIVIDADE RESIDUAL (%) Fração III
Acetona	50% (v/v)	83 ± 12	86 ± 17
Clorofórmio	50% (v/v)	78 ± 10	94 ± 10
Dimetil sulfoxido (DMSO)	50% (v/v)	47 ± 27	45 ± 20
Etanol	50% (v/v)	92 ± 6	83 ± 17
Metanol	50% (v/v)	98 ± 4	94 ± 10
Butanol	50% (v/v)	96 ± 7	90 ± 9
Propanol	50% (v/v)	86 ± 12	95 ± 8
Tolueno	50% (v/v)	80 ± 20	94 ± 10
Xileno	50% (v/v)	87 ± 14	61 ± 10
Ácido Tricloroacético (TCA)	100 mg/mL	68 ± 21	77 ± 13
EDTA	10 mM	71 ± 23	78 ± 19
Deoxicolato de sódio	1 mg/mL	71 ± 4	65 ± 2
Tween 20	10% (v/v)	96 ± 5	83 ± 17
Tween 80	10% (v/v)	34 ± 6	59 ± 12
Triton X 100	1% (v/v)	89 ± 9	100 ± 12
Triton X 100	10% (v/v)	124 ± 3	167 ± 57
Uréia	4 M	58	25
Uréia	8 M	58	25

Testes realizados incubando o sobrenadante tratado a 37°C durante 2 h para os solventes orgânicos e 1 h para os detergentes. Para o TCA a incubação foi realizada a 4°C durante 2h, centrifugado e neutralizado. Posteriormente foi avaliada a atividade residual em cada caso frente ao *Bacillus cereus* ATCC 14579.

4.4.6. Atividade da substância antimicrobiana como biosurfactante

As frações II e III foram testadas com diferentes hidrocarbonetos, tais como xileno, tolueno, n-hexano, óleo mineral e óleo de girassol. Em nenhum ensaio houve a formação de emulsão, ficando estabelecido que nas frações II e III a ação antimicrobiana não é decorrente da presença de um biosurfactante.

4.4.7. Determinação da atividade proteolítica da substância antimicrobiana com azocaseína

Para verificar se a produção da atividade antimicrobiana estava relacionada com a produção de atividade proteolítica, foi avaliada em cada um dos ensaios a atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato. Os valores obtidos em cada experimento são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10 - Comparação da atividade proteolítica do sobrenadante bruto e das frações I, II, III e IV.

Ensaio	Atividade Proteolítica (U/mL)
Sobrenadante	27,33
Fração I	72,24
Fração II	43,95
Fração III	7,88
Fração IV	1,04

Conforme o teste descrito no item 3.12.6, pudemos observar uma grande atividade proteolítica nas frações I e II, mas que decresce no decorrer

do processo de purificação, visível pela baixa atividade proteolítica da fração IV. O mesmo não ocorre com a atividade antimicrobiana na fração IV, sugerindo que a atividade antimicrobiana não se deve a uma atividade proteolítica.

4.4.8. Determinação do efeito do sobrenadante bruto contra *Bacillus cereus* ATCC 14579 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

O efeito do sobrenadante bruto da *P. aeruginosa* 4B sobre a cultura de *Bacillus cereus* ATCC 14579 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 está demonstrado nas Figura 20 e Figura 21, respectivamente.

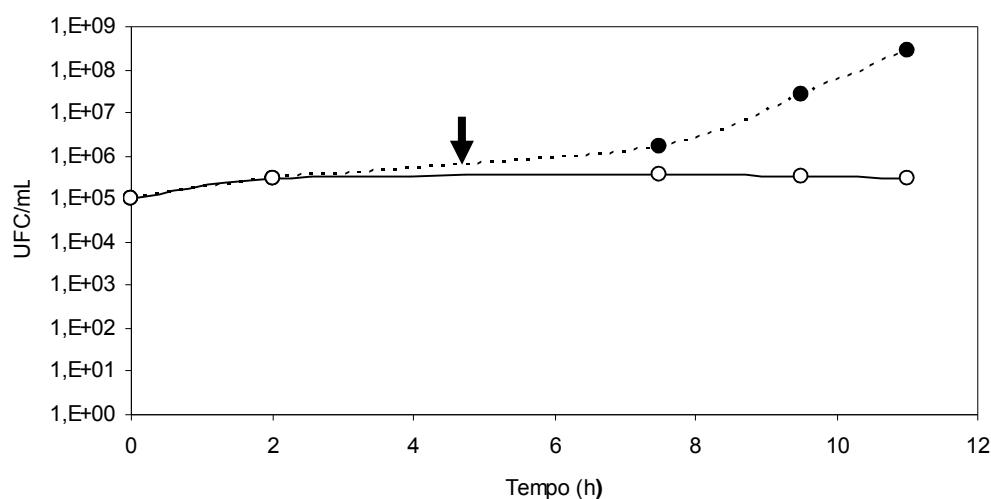


Figura 20 - Efeito do sobrenadante bruto da *P. aeruginosa* 4B sobre *Bacillus cereus* ATCC 14579. Após 4:30 min. (indicado pela seta) foi adicionado o sobrenadante com uma concentração final de 320 UA/mL. As UFC/mL foram acompanhadas no controle (●) e no tratado (○). ICTA-UFRGS, 2007.

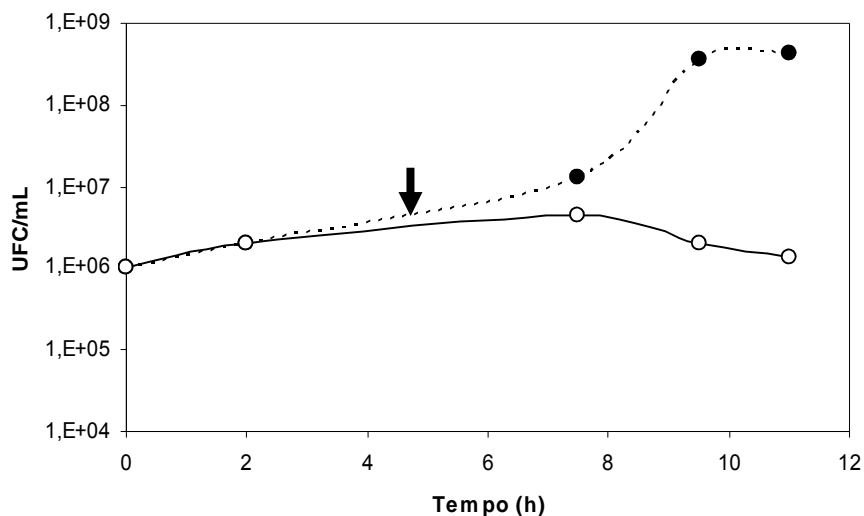


Figura 21 - Efeito do sobrenadante bruto da *P. aeruginosa* 4B sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Após 4:30 min. (indicado pela seta) foi adicionado o sobrenadante com uma concentração final de 320 UA/mL. As UFC/mL foram acompanhadas no controle (●) e no tratado (○). ICTA-UFRGS, 2007.

Em ambos os casos, a concentração de 320 UA/mL resultou em atividade bacteriostática contra as bactérias indicadoras.

4.4.9. Determinação da concentração inibitória mínima

Os resultados da determinação da concentração inibitória mínima para as duas bactérias testadas foram diferentes. Foi observado que uma concentração de 25 UA/mL é necessária para inibir o crescimento do *Bacillus cereus* ATCC 14579, e para o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 é necessária uma concentração de 100 UA/mL para inibir seu crescimento. Os resultados estão demonstrados na Tabela 11, Tabela 12 e Tabela 13.

Tabela 11 - Resultados dos testes para a determinação da CIM e CBM da fração I contra *B. cereus* ATCC 14579 e *S. aureus* ATCC 25923.

UA/mL	<i>B. cereus</i> (Fração I)		<i>S. aureus</i> (Fração I)	
	CIM	CBM	CIM	CBM
6,25	+	nt	+	nt
12,5	+	nt	+	nt
25	-	+	+	nt
50	-	+	+	nt
100	-	+	-	+
200	-	+	-	+
400	-	+	-	+
800	-	-	-	-
1600	-	-	-	-

CIM, concentração inibitória mínima; CBM, concentração bactericida mínima; +, 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 30°C durante 24h.

Tabela 12 - Resultados dos testes para a determinação da CIM e CBM da fração II contra *B. cereus* ATCC 14579 e *S. aureus* ATCC 25923.

UA/mL	<i>B. cereus</i> (Fração II)		<i>S. aureus</i> (Fração II)	
	CIM	CBM	CIM	CBM
3,13	+	nt	+	nt
6,25	+	nt	+	nt
12,5	+	nt	+	nt
25	-	+	+	nt
50	-	+	+	nt
100	-	+	-	+
200	-	+	-	+
400	-	+	-	+
800	-	-	-	-

CIM, concentração inibitória mínima; CBM, concentração bactericida mínima; +, 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 30°C durante 24h.

Tabela 13 - Resultados dos testes para a determinação da CIM e CBM da fração III contra *B. cereus* ATCC 14579 e *S. aureus* ATCC 25923.

UA/mL	<i>B. cereus</i> (Fração III)		<i>S. aureus</i> (Fração III)	
	CIM	CBM	CIM	CBM
1,56	+	nt	+	nt
3,13	+	nt	+	nt
6,25	+	nt	+	nt
12,5	+	nt	+	nt
25	-	+	+	nt
50	-	+	+	nt
100	-	+	+	nt
200	-	+	+	nt
400	-	+	-	+

CIM, concentração inibitória mínima; CBM, concentração bactericida mínima; +, 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 30°C durante 24h.

4.4.10. Determinação da concentração bactericida mínima

Os resultados da determinação da concentração bactericida mínima para as duas bactérias testadas foram os mesmos para as frações I e II. Foi observado que uma concentração de 800 UA/mL é necessária para obter um efeito bactericida (Tabela 11 e Tabela 12). Já para a fração III foi observado que uma concentração superior a 400 UA/mL é necessária para obter uma ação bactericida sobre as bactérias testadas (Tabela 13).

4.4.11. Curva dose resposta

A bactéria *B. cereus* ATCC 14579 foi utilizada no ensaio de determinação da curva dose-resposta. Diversas concentrações foram testadas, no entanto não foi possível o cálculo da EC_{50} , pois não houve uma redução de 50% nas UFC/mL com as concentrações testadas. A maior concentração final utilizada foi de 800 UA/mL para a fração II e de 400 UA/mL para a fração III. Os resultados são apresentados na Figura 22. Não foi observada atividade bactericida com 800 UA/ml, apesar do experimento anterior da CBM ser determinado como 800 UA/mL. A diferença se encontra na quantidade de células do microrganismo indicador presentes em cada experimento; neste caso tem-se um teste contra 10^8 UFC/ml e no outro são 10^6 UFC/ml, demonstrando haver uma diferença significativa. Existem trabalhos que mostram que um efeito bacteriostático ou bactericida pode ser obtido variando a quantidade e tipo de organismo indicador, quantidade e grau de purificação da bacteriocina, meio de cultivo, entre outros.

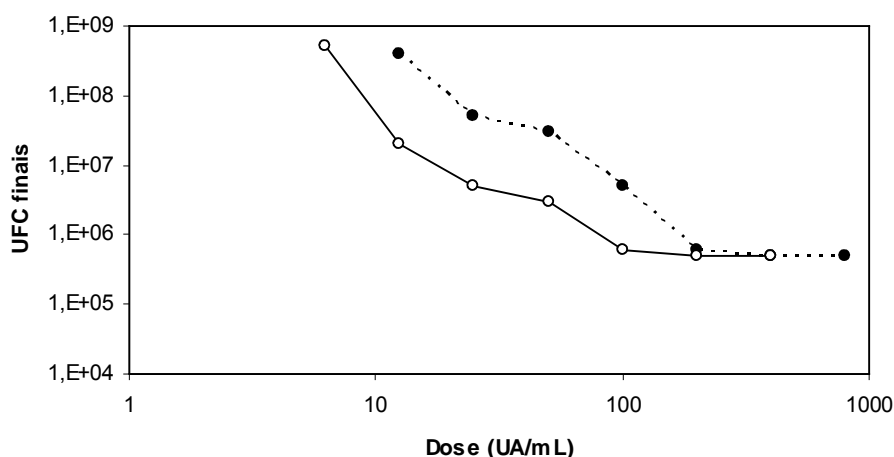


Figura 22 - Curva dose-resposta contra *Bacillus cereus* ATCC 14579 com a fração II (●) e com a fração III (○). ICTA-UFRGS, 2007.

4.5. Avaliação da atividade da fração II em hambúrgueres bovinos artificialmente contaminados

4.5.1. Avaliação da atividade da fração II em hambúrguer de carne bovina frente à bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Em decorrência do processo de congelamento e descongelamento, houve uma redução média de ± 1 unidade logarítmica (\log_{10}) no número de células artificialmente inoculadas nos hambúrgueres de carne bovina após o armazenamento a -18°C . Mesmo nas amostras armazenadas a 4°C por 24h houve uma redução média de aproximadamente $0,75 \log_{10}$ (Figura 23 e Figura 24). A população inicial de *S. aureus* ATCC 25923 (grupo controle positivo) de $6,33 \pm 0,58 \log_{10}$ UFC/mL, demonstrou uma redução média de $0,92 \log_{10}$ UFC/mL. Resultados similares foram apresentados por Teagasc (1997) que demonstrou uma redução média de $0,66 \log_{10}$ UFC/g na população inicial de *S. aureus* em carne moída congelada por 10 semanas, a qual era de aproximadamente $6,0 \log_{10}$ UFC/g. Casarin (2005) demonstrou uma redução de $0,73 \log_{10}$ UFC/g de uma população inicial de *S. aureus* de $6,5 \log_{10}$ UFC/g em hambúrgueres de frango congelados por um período de 28 dias.

As amostras do grupo de controle negativo não apresentaram, em nenhum momento, crescimento de bactérias do gênero *Staphylococcus*.

As amostras do grupo teste não apresentaram reduções significativas nas contagens de *S. aureus* em comparação com aquelas apresentadas no grupo controle positivo. Isso sugere que a atividade antimicrobiana da fração II

não apresenta efeito quando adicionada a esse produto cárneo, nas condições do experimento (Figura 24).

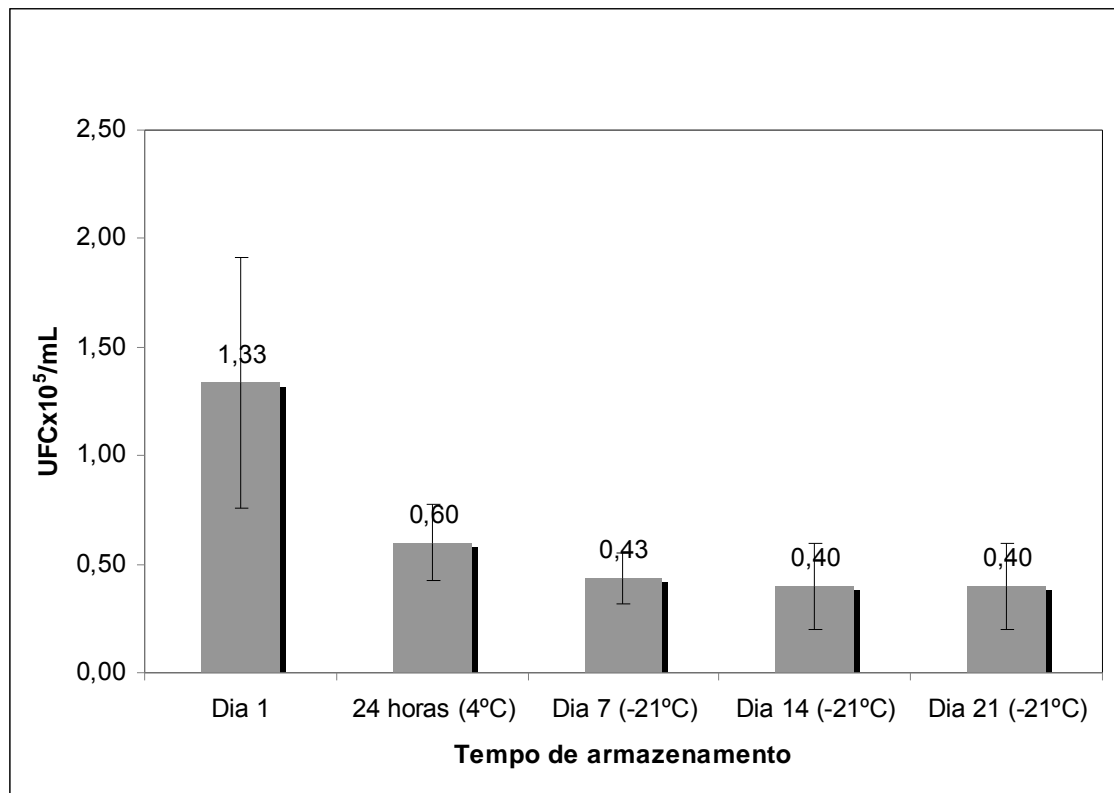


Figura 23 - Contagem das UFC/mL do grupo de controle positivo na avaliação da atividade da fração II em hambúrguer de carne bovina.

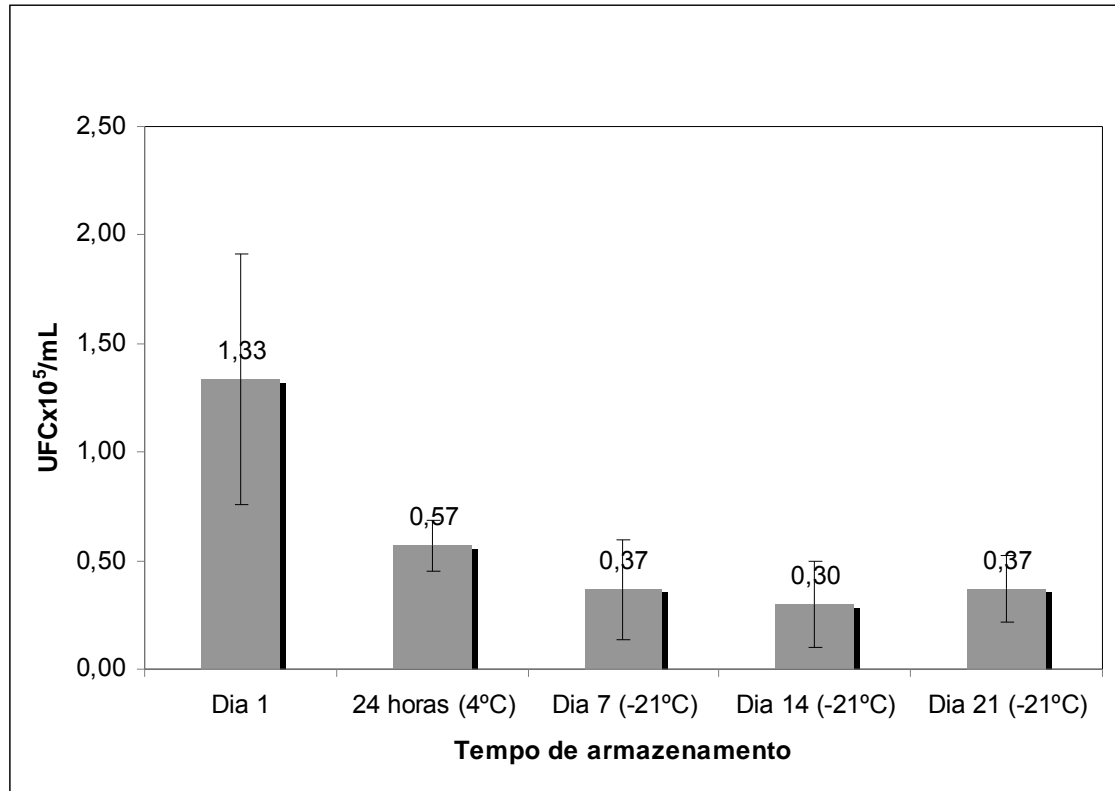


Figura 24 - Contagem das UFC/mL do grupo teste (fração II + *S. aureus*) na avaliação da atividade da fração II em hambúrguer de carne bovina.

5. DISCUSSÃO

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

O seqüenciamento do rDNA 16S indicou que a linhagem utilizada neste estudo está relacionada a *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas thermaerum*. Para verificar a consistência dos agrupamentos foram realizadas 1000 replicações de “bootstrap”. Através dessa análise, o isolado apresentou 100% de similaridade de sua seqüência com *P. thermaerum* e 98% de similaridade de sua seqüência com *P. aeruginosa*. A tentativa de realizar outra análise filogenética contendo exclusivamente cepas de *P. aeruginosa* e *P. thermaerum* rDNA 16S com a bactéria 4B não foi possível, pois no GenBank, até o momento, só consta uma seqüência de rDNA 16S para a bactéria *P. thermaerum*. No entanto, segundo Sneath et al. (1984) o pigmento piocianina, que é um pigmento de coloração verde-azulada, é característico de diagnóstico absoluto para *P. aeruginosa*, como a bactéria 4B apresentou este pigmento, ela pode ser identificada como *P. aeruginosa*.

Neste trabalho, não houve indução na produção de piocinas, como citado em estudos anteriores, como, por exemplo, a utilização de irradiação UV, mitomicina C ou emprego de meios diferenciais (Jacob, 1954; Higerd et al., 1967). Utilizamos um meio de cultura usado rotineiramente (caldo triptona de soja), sem adição de nenhum composto, para a indução da produção de bacteriocinas ou outra atividade antimicrobiana. A presença de uma substância com característica antimicrobiana foi observada na fase de crescimento exponencial da bactéria. No entanto, a atividade máxima foi observada com 108 horas de cultivo a 30°C sob agitação. Segundo Gillies & Govan (1966) uma melhor produção de piocinas ocorre a 32°C do que a 37°C.

Conforme descrito na literatura, a bactéria produtora deve ser lisada para haver a liberação significativa de piocinas. Por esta razão que a taxa de produção espontânea das piocinas é baixa, já que poucas bactérias estão envolvidas neste processo (Michel-Briand & Baysse, 2002). Neste trabalho, promoveu-se somente um *stress* ambiental nas células produtoras, através da extensão do tempo de cultivo, levando a falta de nutrientes e liberação de metabólitos no meio. Sugere-se que o aumento da atividade antimicrobiana observada a partir de 108 h de cultivo possa estar associado à liberação de substâncias antimicrobianas no meio devido à autólise das células produtoras. Obteve-se uma atividade máxima de 1600 UA/mL no sobrenadante bruto.

Higerd et al., 1967, demonstraram que uma piocina de *P. aeruginosa* era inicialmente detectada no meio após 8 horas de crescimento e esta aumentava exponencialmente. De 8 a 24 horas o título era de aproximadamente 40 a 1.200 UA/mL. Porém, se uma cultura de 3 horas fosse tratada com irradiação UV por 40 segundos ou 1 µg/mL de mitomicina C, os títulos de piocinas

passavam a ser de 40.000 a 60.000 U/mL, obtidos 60 a 120 min. após a indução.

O peptídeo antimicrobiano estudado neste trabalho foi parcialmente purificado do meio de cultivo com uma combinação de precipitação com sulfato de amônio, gel filtração e cromatografia de troca iônica. A substância se ligou ao grupo carregado dietilaminoetil da coluna DEAE Sepharose, indicando que a natureza do peptídeo é aniônica. Um fator de purificação de 34,9 foi encontrado, mas a recuperação foi de apenas 5,4%. Foi observada uma redução significativa no rendimento na purificação do sobrenadante bruto para o precipitado com sulfato de amônio (fração I). Sugere-se que este baixo rendimento esteja associado ao processo de centrifugação. Diversos protocolos descritos para purificação de bacteriocinas de *P. aeruginosa* utilizam ultracentrífuga (Higerd et al., 1967; Morse et al., 1976, 1980, 1982; Kuroda et al., 1979; Lee et al., 1999). Entretanto, devido à indisponibilidade deste equipamento, a substância antimicrobiana foi parcialmente purificada através do uso de uma centrífuga refrigerada operando a 10.000 g.

As piocinas produzidas por *P. aeruginosa* possuem um espectro de ação restrito, com atividade apenas contra espécies filogeneticamente relacionadas à espécie produtora (Jacob, 1954; Hamon, 1956; Goodwin et al., 1972). No entanto, Garcia-Quintana et al. (1988) testaram piocinas de cepas selvagens de *P. aeruginosa* contra bactérias de origem hospitalar e relataram uma alta taxa de susceptibilidade para *E. coli* (80,1%), *S. aureus* (79,1%), *P. vulgaris* (64,4%) e *P. aeruginosa* (49,3%).

Na literatura, vários autores relatam a ótima atividade das piocinas de *P. aeruginosa* na inibição de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* (Sidberry & Sadoff,

1977; Morse et al., 1980). Stein et al., 1980, relatam uma taxa de susceptibilidade as piocinas de 99% para a *N. gonorrhoeae*, 35% para a *N. meningitidis* e 47% para a *N. lactamica*. Clones da *N. gonorrhoeae* que não sofreram a ação lítica da piocina, freqüentemente tinham modificações em seus lipooligosacarídeos (Morse & Apicella, 1982; Dudas & Apicella, 1988).

O peptídeo antimicrobiano caracterizado neste estudo apresentou um espectro de ação amplo, com atividades estendendo-se a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. Bactérias patogênicas e deteriorantes foram inibidas, como *Bacillus cereus*, várias espécies de *Staphylococcus*, *Enterococcus faecalis* e *Serratia marcescens*. A bactéria *Corynebacterium fimi* NCTC 7547, que é descrita como sensível a todas bacteriocinas já testadas (Oliveira et al., 1998) também foi inibida.

Toxinfecções de origem alimentar têm um custo extremamente elevado para sistemas de saúde. Intoxicações pelas enterotoxinas de *S. aureus* levam diversos pacientes a ficarem acamados com náuseas, vômitos, diarreia e dolorosas câimbras abdominais. O *S. aureus* encontra no homem e nos animais seus principais reservatórios, tendo a cavidade nasal o principal hábitat no homem, podendo alcançar, a partir deste, a epiderme, feridas e os alimentos (Jay, 2005). Outra bactéria que é freqüentemente associado a toxinfecções é o *B. cereus*, causando duas formas distintas de gastroenterite, caracterizadas por uma síndrome diarreica ou uma síndrome emética. O *B. cereus* é amplamente distribuído na natureza, sendo o solo o seu reservatório natural, e conseqüentemente presente em muitos produtos alimentícios de origem vegetal e animal (Jay, 2005). O uso de bacteriocinas para inibir patógenos de origem alimentar já é descrito. Entretanto, somente a nisina é

comercialmente disponível, mas outras bacteriocinas como a pediocina, a bacteriocina CP5 de *Carnobacterium piscicola* no leite desnatado, enterocina-35 em frutos do mar, também apresentam ótima eficácia (Lücke, 2000; Barreto et al., 2004).

A substância antimicrobiana produzida por *Pseudomonas aeruginosa* 4B foi parcialmente purificada e algumas de suas propriedades foram determinadas. Não houve inativação térmica em nenhuma das temperaturas testadas. Quando as frações II e III foram submetidas a 120°C em termobloco, ambas mantiveram 90% da sua atividade residual. Além disso, a atividade não foi alterada a mudanças de pH (entre 3 e 10). A estabilidade a tratamentos térmicos e a clivagem por proteases é atribuída a estruturas cíclicas no esqueleto de bacteriocinas como a microcina J25 e B17 (Semenova et al., 2005; Kelleher et al., 1999).

Os resultados encontrados foram diferentes daquelas divulgados por Garcia-Quintana et al. (1979), que relataram uma piocina, provavelmente do tipo R, que apresentava resistência térmica somente até 50°C, sendo completamente inativada a 70°C. Hamon (1964) expõe em seus trabalhos dados sobre piocinas que não apresentam termo-estabilidade a 100°C. Higerd et al. (1967) em seu estudo descrevem a perda da atividade de uma piocina tipo R em temperaturas iguais e maiores que 70°C. Esta mesma piocina, quando armazenada a 4°C e a temperatura ambiente, por 15 dias, demonstrou estabilidade. No entanto, quando congelada por um longo período perdia completamente a atividade. Através da adição de 50% de glicerol, conseguiu preservar a atividade.

As frações II e III foram resistentes ao tratamento com as proteases (tripsina, papaína, pronase E e proteinase K). Resultados similares são descritos para as piocinas R e F, que são resistentes aos tratamentos com enzimas proteolíticas. Somente a piocina do tipo S apresenta sensibilidade as proteases (Michel-Briand & Baysse, 2002). Higerd et al. (1967) testou a estabilidade de uma piocina do tipo R com lipase (2 mg/mL), papaína (2 mg/mL), tripsina (2 mg/ml), e uma protease de *P. aeruginosa* (2µg/mL) durante 3 horas de incubação e descreveu não haver perda de atividade em nenhum dos casos.

A estabilidade frente a solventes orgânicos, detergentes e outras substâncias químicas foi testada nas frações II e III. Ambas as frações tiveram sua atividade residual diminuída em 50% quando testadas com dimetil sulfóxido (DMSO); elas mantiveram em torno de 70% de sua atividade residual quando testadas com ácido tricloroacético (TCA), indicando a existência de pelo menos uma porção de natureza protéica.

A atividade antimicrobiana foi diminuída pelo tratamento com Tween 80. Alguns autores como Garcia-Quintana et al. (1979) relataram não haver inativação de uma piocina, que provavelmente pertencia ao tipo R, por nenhum solvente orgânico ou detergente. Uréia na concentração de 8M foi a única solução com efeito inativante. Higerd et al. (1967) testaram o efeito de diferentes compostos inibidores na atividade da piocina R, durante 1h a 37°C. Não apresentaram efeito inibidor 10^{-3} M de cianida, 10^{-3} M de EDTA, 10^{-3} M de cisteína e 0,1 a 0,7 M de NaCl. No entanto, uréia 8M e 10^{-4} M de *p*-cloromercuribenzoato (PCMB) eliminaram toda a atividade e 10^{-4} M de cloreto de mercúrio eliminou 95% da atividade.

Diferentes experimentos foram realizados com o objetivo de estudar o modo de ação do peptídeo antimicrobiano produzido pela *P. aeruginosa* 4B. Os resultados sugeriram que esta substância apresente um efeito bacteriostático sobre *B. cereus* com uma concentração a partir de 25 UA/mL e bactericida em uma concentração em torno de 800 UA/mL. Para a linhagem de *S. aureus* testada, a concentração de 100 UA/mL resultou em efeito bacteriostático e a concentração de 800 UA/mL em efeito bactericida. Os testes com a fração III apresentaram um efeito bacteriostático de 25 UA/mL para *B. cereus* e 400 UA/mL para *S. aureus*. Com esta fração, não houve efeito bactericida, isto pode ter ocorrido devido a baixa concentração da substância na fração III utilizada no teste. O efeito da substância, entretanto, depende das condições do experimento, como a dose e o grau de pureza da substância, a cultura indicadora e a sua concentração celular (Dalmau et al., 2002).

A atividade antimicrobiana pode estar associada a outras atividades biológicas como surfactantes e enzimas (Fernandes et al., 2007; Loddi, 2001). As frações II e III também foram testadas para saber se a atividade antimicrobiana não ocorreu pela ação de um biosurfactante. Nenhuma das frações apresentou qualquer formação de emulsão, descartando a possibilidade de a ação ser em função de um surfactante. A atividade antimicrobiana também não ocorreu por uma atividade proteolítica, pois, conforme os testes realizados no item 4.4.7, a atividade antimicrobiana se mantém enquanto a atividade proteolítica diminui durante as fases de purificação.

A fração II foi adicionada em hambúrgueres de carne bovina, artificialmente contaminados com a bactéria *S. aureus*. Entretanto, a substância

antimicrobiana não resultou em diminuição do número de células viáveis no hambúrguer. Sugere-se que a substância antimicrobiana presente na fração II possa ter se associado às gorduras presentes no alimento ou se ligado às proteínas da carne. Isto poderia, de alguma forma, alterar sua atividade, o que resultou em uma redução nas contagens de *S. aureus*, quando comparado ao grupo controle. Algumas bacteriocinas mostram adsorção às proteínas da carne e interagem com os fosfolipídeos, que também podem conduzir a diminuição da atividade das bacteriocinas. O uso de bacteriocinas em carnes deve ser feito cautelosamente, pois características intrínsecas do produto podem influenciar a atividade da bacteriocina (Hugas, 1998). Tem sido demonstrado que as bacteriocinas podem ser inativadas por adsorção à carne e a partículas lipídicas (De Martinis & Franco, 1997). Além da interação com componentes do alimento, alguns autores, como Lucke (2000), propõem que certas bacteriocinas sofrem inativação na carne. A carne crua contém proteases que podem destruir as bacteriocinas. A inativação da nisina pela glutathione-S-transferase, uma enzima endógena da carne, também pode ocorrer (De Martinis et al., 2003).

Em um estudo feito com carne de porco moída crua e lacticina 3147, demonstra a perda da atividade da bacteriocina. Uma redução de 50% na atividade foi encontrada 3 dias após o armazenamento da carne (Soriano et al., 2004). Outros autores também já tiveram problemas na utilização de bacteriocinas em carnes, como Fang & Lin (1994) e Chung et al. (1989), os autores observaram a inativação da nisina depois de alguns dias da aplicação da bacteriocina na carne de porco.

No experimento de inibição de *S. aureus* em hambúrguer, pode-se observar uma queda inicial no número de células viáveis, seguido por uma estabilização. Uma das possibilidades para que isto tenha ocorrido é dada pela influência do tempo de congelamento sobre o microrganismo, como já descrito na literatura, onde a maior parte dos danos ocorre no período inicial do congelamento (Delazari, 1980). Segundo este mesmo autor, os microrganismos que sobreviveram ao período inicial podem ter sofrido um efeito protetor por componentes do hambúrguer. A composição do alimento pode aumentar ou diminuir a resistência dos microrganismos ao congelamento. Alimentos ricos em proteínas, lipídios e carboidratos apresentam microrganismos mais resistentes, pois estes constituintes exercem um efeito crioprotetor nas células microbianas (Delazari, 1980). Segundo Teagasc (1997), a bactéria *S. aureus* inoculada em carne moída com 5% de gordura apresentou menor grau de sobrevivência (redução de 0,66 log₁₀ UFC/g) ao armazenamento congelado a -35°C do que em carne moída com 50% de gordura (redução de 0,47 log₁₀ UFC/g).

Vários autores relatam o sucesso na adição de uma bacteriocina em carnes e derivados, como Fiorentine et al. (2001), que utilizaram cubos de carne imersos em solução contendo plantaricina comprovaram um aumento de vida de prateleira comparado com uma solução de ácido láctico 6%. Schillinger & Lucke (1991), observaram que a sakacina A, produzida pelo *L. sakei* Lb 706, inibia a *L. monocytogenes* em carne fresca armazenada a 8°C por até uma semana. Esses autores observaram também que em caldo MRS 99,9% da população de *L. monocytogenes* foi destruída em 24 horas. Isto mostra que a sakacina A produzida pela *L. sakei* Lb 706 tem ação bactericida em caldo, mas

na carne ela apresenta um efeito bacteriostático. Em seu trabalho Ghalfi et al. (2006), demonstraram a efetividade da bacteriocina do *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 contra *L. monocytogenes* presentes no bacon, no entanto a eficácia foi drasticamente reduzida em um período prolongado de armazenamento a 4°C.

Por causa dos inúmeros casos em que a bactéria *P. aeruginosa* está envolvida em patologias, mesmo sendo um agente oportunista, nos leva a considerar características tóxicas de metabólitos produzidos por ela. No decorrer deste trabalho não houve tempo necessário para a realização de testes complementares a toxicidade. No entanto, alguns autores realizaram testes de toxicidade com as piocinas, como foi o caso de Higerd et al., (1967) que analisaram a toxicidade de uma piocina purificada utilizando injeções intraperitoneais em ratos, com uma concentração de 28.000 a 1.400.000 unidades (5.6 a 276 µg de proteína), demonstrando não haver letalidade além de 72 horas. Também não houve letalidade com preparações com o meio de crescimento cru com igual concentração de proteínas. Em adição, não foi observada dermatonecrose com preparações purificadas em coelhos que receberam 7.200 a 36.000 unidades (1.44 a 7.2 µg de proteína) de forma subcutânea. Já os pesquisadores Merrikin & Terry (1972) utilizaram injeções de uma piocina purificada para tratar camundongos infectados com 3 diferentes cepas de *P. aeruginosa*. Testaram várias dosagens, vias e horários de administração e perceberam um efeito de proteção aos camundongos contra duas cepas de *P. aeruginosa*.

Trabalhos envolvendo a toxicidade de piocinas sobre células tumorais também foram realizados. Abdi-Ali et al. (2004) testaram uma piocina tipo S

sobre o crescimento de dois tipos de células tumorais de humanos (HepG2 e Im9). Os resultados demonstraram que a pirocina S2 parcialmente purificada exibiu substancial efeito inibitório sobre essas duas linhagens de células tumorais, enquanto que sobre uma linhagem de células normais (HFFF) não foram observados efeitos inibitórios. Resultados semelhantes já foram demonstrados por Farkas-Himsley et al. (1991, 1992, 1995) em vários trabalhos. Há várias razões que sugerem o porquê das células tumorais serem mais sensíveis às bacteriocinas, como, por exemplo, o aumento no número de receptores da transferrina; na presença de agentes quelantes de ferro, um aumento no número de receptores pode ser gerado nas células tumorais. É essa variação de antígenos na superfície de células de diferentes neoplasias que pode determinar a eventual sensibilidade de uma linhagem particular de células malignas.

6. CONCLUSÕES

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* 4B produz uma substância antimicrobiana com efeito sobre uma ampla faixa de microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos, tanto Gram-positivos como Gram-negativos. A atividade apresenta termo-estabilidade (100°C / 60 min.) e é estável em uma ampla faixa de pH (entre 3 e 10).

A substância antimicrobiana foi estável a todos os tratamentos com proteases testados neste trabalho.

A substância parcialmente purificada apresentou uma CIM de 25 UA/mL e CBM de 800 UA/mL para *B. cereus*; para a bactéria *S. aureus* a CIM foi de 100 UA/mL e a CBM 800 UA/mL.

A fração II (parcialmente purificada) não inibiu a bactéria *S. aureus* em hambúrgueres de carne bovina congelada, possivelmente pela interação da substância antimicrobiana com lipídeos e/ou proteínas da amostra.

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

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O futuro das bacteriocinas não se restringe a sua descoberta ou a engenharia de sua aplicação, como os antibióticos usados em terapia médica, mas as bacteriocinas também deverão ser consideradas e escolhidas conforme o tipo de microrganismo a ser inibido. A continuidade das pesquisas sobre bacteriocinas certamente mostrará que nem todas poderão ser usadas na indústria de alimentos; entretanto, nem por isso estes estudos terão menor valor, pois estarão contribuindo para aumentar o acervo acadêmico sobre este importante e atual tema.

Com relação a trabalhos futuros, podemos citar algumas possibilidades para novos estudos, baseando-se nos resultados deste trabalho:

- buscar um método alternativo de purificação, dando preferência a metodologias mais simples e baratas;
- complementar a purificação e a caracterização química, com a determinação da massa molecular da substância e o seqüenciamento dos aminoácidos;
- realizar testes de proteção em outros tipos de alimentos;

- realizar testes de toxicidade, citotoxicidade (tanto em células saudáveis como em células cancerígenas) e DL_{50} *in vivo* e *in vitro*.

- testar agentes mutagênicos na indução da produção de piocinas e caracterizar a substância produzida para verificar se a cepa produz piocina(s).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI-ALI, A.; WOROBEK, E.A.; DEEZAGI, A.; MALEKZADEH, F. Cytotoxic effects of pyocin S2 produced by *Pseudomonas aeruginosa* on the growth of three human cell lines. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.50, p.375-381, 2004.

BABA, T.; SCHNEEWIND, O. Instruments of microbial warfare: bacteriocin synthesis, toxicity and immunity. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.6(2), p.66-71, 1998.

BARRETO, N.S.E.; VIEIRA, R.H.S.F.; VIEIRA, G.H.F.; SILVA, M.E.C. Aplicação de bacteriocinas nos alimentos: uma revisão. **Higiene Alimentar**, Campinas, v.18(126/127), p.44-50, 2004.

BAYSSE, C.; MEYER, J.M.; PLESIAT, P.; GEOFFROY, V.; MICHEL-BRIAND, Y.; CORNELIS, P. Uptake of pyocin S3 occurs through the outer membrane ferripyoverdine type II receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.181(12), p.3849-3851, 1999.

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 hidrocarbonetos**. 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.; DOMINGUEZ, A.P.M.; BRANDELLI, A. Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. **Letters of Applied Microbiology**, v.41, p. 269-273, 2005.

BROWN, M.R.W.; ANWAR, H.; LAMBERT, P.A. Evidence that mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung grows under iron-restricted conditions. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, dv.21, p.323-331, 1984.

BRUUN, J.N.; MCGARRITY, G.J.; BLAKEMORE, W.S.; CORIEL, L.L. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections: determination by pyocin typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.3(3), p.264-271, 1976.

CAIERÃO, J.; ANTUNES, A.G.; STEFENS, M.; DE MARCO, M; D'AZEVEDO, P.A. Novos antimicrobianos: realidade e perspectiva. **NewsLab**, v.66, p.80-90, 2004.

CASARIN, L.S. **Sobrevivência de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis durante o armazenamento de hambúrguer de frango congelado**. 2005. 75f. Mestrado (Dissertação) – Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

CHANG, W.; SMALL, D.A.; TOGHROL, F.; BENTLEY, W.E. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* reveals induction of pyocin genes in response to hydrogen peroxide. **BMC Genomics**, v.6(115), 2005.

CHUNG, K.; DICKSON, J.S.; CROUSE, J.D. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p.1329-1333, 1989.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.1-20, 2001.

COTTER, P.D.; HILL, C., ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews**, v.3, p.777-788, 2005.

DALMAU, M. et al. Bacterial membrane injuries induced by lacticin F and nisin. **Internacional Microbiology**, v.5, p.73-80, 2002.

DE MARTINIS, E.C.P.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of foodborne pathogens by bacteriocin producing *Leuconostoc* sp. And *Lactobacillus sake* isolated from linguiça frescal. **Revista de Microbiologia**, v.28, p.284-287, 1998.

DE MARTINIS, E.C.P.; FREITAS, F.Z. Screening of lactic acid bacteria from brazilian meats for bacteriocin formation. **Food Control**, Surrey, v.14, p.197-200, 2003.

DE MARTINIS, E.C.P.; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G.M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, v. 18, p.191-208, 2002.

DE MARTINIS, E.C.P.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z. Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de

bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados a vácuo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23(2), p.195-199, 2003.

DE MOT, R. Novel bacteriocins with predicted tRNase and pore-forming activities in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. MicroCorrespondence. **Molecular Microbiology**, v.35(2), p.472-475, 2000.

DE SIMONE, S.G.; SOUZA, A.L.A. Peptídeos microbicidas: uma alternativa viável para a terapia antimicrobiana. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 24, p.12-16, 2002.

DE SOUZA, E.L.; SILVA, C.A.; SOUSA, C.P. Bacteriocins: molecules of fundamental impact on the microbial ecology and potential food biopreservatives. **Food Science and Technology**, v.48(4), p.559-566, 2005.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. Em: De Vuyst, L.; Vandamme, E.J. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Ed: Blackie, London, p.151-221, 1994.

DELAZARI, I. Microbiologia de alimentos congelados. Efeitos do congelamento sobre os microrganismos. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL**, v.17, p.15-30, 1980.

DENNIS, J.J.; LAFONTAINE, E.R.; SOKOL, P.A. Identification and characterization of the *tolQRA* genes of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.7059-7068, 1996.

DIEP, D.B.; NES, I.F. Ribossomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. **Current Drug Targets**, v.3, p.107-122, 2002.

DUDAS, K.C.; APICELLA, M.A. Selection and immunochemical analysis of lipooligosaccharide mutants of *Neisseria gonorrhoeae*. **Infection and Immunity**, V.56, p.499-504, 1988.

DUPORT, C. Molecular characterization of pyocin S3, a novel S-type pyocin from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.270, p.8920-8927, 1995.

DUPORT, C.; BAYSSE, C.; MICHEL-BRIAND, Y. Molecular characterization of pyocin S3, a novel S-type pyocin from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.270, p. 8920-8927, 1995.

EIJSSINK, V.G.H.; AXELSSON, L.; DIEP, D.B.; HAVARSTEIN, L.S.; HOLO, H.; NES, I.F. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.81, p.639-654, 2002.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation Techniques. **Methods in Enzymology**, New York, v. 182, p.285-296, 1990.

FANG, T.J.; LIN, L.W. Growth of *L.monocytogenes* and *P.fragi* on cooked pork in a modified atmosphere packing/nisin combination system. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, p.479-485, 1994.

FARKAS-HIMSLEY, H.; FREEDMAN, F.; READ, S.E.; ASAD, S.; KARDISH, M. Bacterial proteins cytotoxic to HIV-I infected cells. **AIDS**, v.5, p.905-907, 1991.

FARKAS-HIMSLEY, H.; ZHANG, Y.S.; MUSCLOW, C.E. Partially purified bacteriocin kills malignant cells by apoptosis. **Cellular and Molecular Biology**, v.38, p.643-651, 1992.

FARKAS-HIMSLEY, H.; HIIL, R.; ROSEN, B.; ARAB, S.; LINGWOOD, C. The bacterial colicin active against tumor cell *in vitro* and *in vivo* is verotoxin. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.92, p. 6996-7000, 1995.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p.783-791, 1985.

FIORENTINI, A.M.; SANT'ANNA, E.S.; PORTO, A.C.S.; MAZO, J.Z.; FRANCO, B.D.G.M. Influence of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* BN in the shelf-life of refrigerated bovine meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, p.42-46, 2001.

FERNANDES, P.A.V.; ARRUDA, I.R.; SANTOS, A.F.A.B. Atividade antimicrobiana de surfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* R14 frente a bactérias multi-droga resistentes. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.38(4), p.704-709, 2007.

FRANK, S.; Spatial polymorphism of bacteriocinas and other allelopathic traits. **Evolutionary Ecology**, v.8, p.369-386, 1994.

FYFE, J.A.M.; HARRIS, G.; GOVAN, J.R.W. Revised pyocin typing for *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.20(1), p.47-50, 1984.

GARCIA-QUINTANA, H. Mecanismos da la actividad antibiotica de bacteriocinas. **Revista Médica de Chile**, v.120, p.439-444, 1992.

GARCIA-QUINTANA, H.; ASENJO, S.; HERNANDEZ, A.; POLETTE, M. Determinación cualitativa de la actividad de piocinas de *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Médica de Chile**, v.107, p.471-478, 1979.

GARCIA-QUINTANA, H.; HERNANDEZ, A.; ASENJO, S.; POLETTE, M. Ultraestructura de piocinas de *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Médica de Chile**, v.107, p.479-485, 1979.

GARCIA-QUINTANA, H.; POLLETE, M.; RIOS, J. Espectro bactericida de piocinas sobre cepas colectadas em hospitales de las regiones IX y X de Chile. **Revista Médica de Chile**, v.116, p.543-548, 1988.

GHALFI, H.; KOUAKOU, P.; DUROY, M.; DAOUDI, A. ; BENKERROUM, N.; THONART, P. Antilisterial bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 as a preservative culture in bacon meat and influence of fat and nitrites on bacteriocins production and activity. **Food Science Technology Internacional**, v.12(4), P.325-333, 2006.

GILLIES , R.R.; GOVAN, J.R.W. Typing of *Pseudomonas pyocyanea* by pyocine production. **Journal of Pathology and Bacteriology**. v.91, p.339-345, 1966.

GONZÁLES-PASTOR, J.E., MILLÁN, J.L.S., CASTILLA, M.A., MORENO, F. Structure and organization of plasmid genes required to produce the translation inhibitor microcin C7. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.7131-7140, 1995.

GOODWIN, K.; LEVIN, R.E.; DOGGETT, R.G. Autosensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to its own pyocin. **Infection and Immunity**, v.6(5), p.889-892, 1972.

GOVAN, J.R.W. Studies on the pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*: morphology and mode of action on contractile pyocins. **Journal of General Microbiology**, v. 80, p.1-15, 1974.

GOVAN, J.R.W. In vivo significance of bacteriocins and bacteriocin receptors. **Scand. Journal of Infection Diseases**, v. 49, p.31-37, 1986.

GOVAN, J.R.W. Pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa*. Bergan,T, Norris J.R. (Eds.) **Methods in Microbiology**. Academic Press, London. v.10, p.61-91, 1978.

GRATIA, A. Sur un remarquable exemple d'antagénisme entre deux souches de colibacille. **C.R. Seances Soc. Biol. Fil.**, v.93, p.1040-1041, 1925.

GROISMAN, E.C. In Hacker et al (Eds) Bactericidal protein toxins. **Zent. Bl. Bacterial Suppl.** , v. 29, p.237-243,1998.

GUINAME, C.M. ; COTTER, P.D. ; HILL, C. ; ROSS, R.P. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.98, p.1316-1325, 2005.

HANCOCK, R.E.; CHAPPLE, D.S. Peptide antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.43(6), p.1317-1323, 1999.

HAMON, Y. Les bactériocines sont-elles des substances antigéniques? **C.R.Hebd. Seances Académie des Sciences**, v. 242, p. 1240-1242, 1956.

HAMON, Y. Contribution a l'étude des pyocines. **Annales de L'Institut Pasteur**, Paris, v.91, p.82-90, 1956.

HAMON, Y. Les bactériocines. **Annales de L'Institut Pasteur**, Paris, v.107, p.18-53, 1964.

HIGERD, T. In vitro and in vivo characterization of pyocin. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.93, p.1976-1986, 1967.

HIGERD, T.B.; BAECHLER, C.A.; BERK, R.S. In vitro and in vivo characterization of pyocin. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.93(6), p.1976-1986, 1967.

HIGERD, T.B.; BAECHLER, C.A.; BERK, R.S. Morphological studies on relaxed and contracted forms of purified pyocin particles. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.98 (3), p.1378-1389, 1969.

HOLLOWAY, B. Aeruginocin tolerant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. **Genetical Research**, v.22, p.239-253, 1973.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, Barking, v.49(1), p.139-150, 1998.

IKEDA, K.; EGAMI, F. Lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to pyocin R receptor activity. **Journal of General Applied Microbiology**, v.19, p.115-128, 1973

ISHII, S.I.; NISHI, Y.; EGAMI, F. The fine structure of a pyocin. **Journal of Molecular Biology**, v.13, p.428-431, 1965.

JACK, R.W.; TAGG, J.R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v.59(2), p.171-200, 1995.

JACOB, F.; SIMINIVITCH, L.; WOLLMAN, E. Sur la biosynthèse d'une colicine et sur son mode d'action. **Annales de L'Institut Pasteur**, Paris, v.83, p.295-315, 1952.

JACOB, F. Biosynthèse induite et mode d'action d'une pyocine, antibiotique de *Pseudomonas pyocyanaea*. **Annales de L'Institut Pasteur**, Paris, v.86, p.149-160, 1954.

JACOBY, G. Plasmids of *Pseudomonas aeruginosa*, em: R.G. Doggett (Ed.), ***Pseudomonas aeruginosa: Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy***, Academic Press, New York, p.271-309, 1979.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JOERGER, R.D. Alternatives to antibiotics : bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. **Poultry Science**, v.82, p.640-647, 2003.

JONES, L.F.; PINTO, B.V.; THOMAS, E.T.; FARMER III, J.J. Simplified method for producing pyocins from *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology**, v.26(1), p.120-121, 1973.

KAGEYAMA, M. Bacteriocins and bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa*. S. Mitsuhashi, H. Hashimoto (Eds.) **Microbial Drug Resistance**, Baltimore, p.291-305, 1975.

KAGEYAMA, M. Studies of a pyocin. I. Physical and chemical properties. **Journal of Biochemistry**, v.55, p.49-53, 1964.

KAGEYAMA, M., & EGAMI, F. On purification and some properties of a pyocin, a bacteriocin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Life Sciences**, v.9, p.471-476, 1962.

KAGEYAMA, M.; KOBAYASHI, M.; SANO, Y.; MASAKI, H. Construction and characterization of pyocin-colicin chimeric proteins. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178(1), p.103-110, 1996.

KAGEYAMA, M.; SHINOMIYA, T.; AIHARA, Y.; KOBAYASHI, M. Characterization of a bacteriophage related to R-type pyocins. **Journal of Virology**, v.32(3), p.951-957, 1979.

KELLEHER, N.L. Posttranslational heterocyclization of cysteine and serine residues in the antibiotic microcin B17: distributivity and directionality. **Biochemistry**, v.38, p.15623-15630, 1999.

KIMURA, H. et al. Novel bacteriocin of *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from well-aged bed of fermented rice bran. **Annals of New York Academy of Science**, New York, v.864, p.345-348, 1998.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, p.39-85, 1993

KURODA, K.; KAGEYAMA, M. Comparative study of F-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biochemistry**, v.89, p.1721-1736, 1981.

KURODA, K.; KAGIYAMA, R.; KAGEYAMA, M. Isolation and characterization of a new bacteriophage, KF1, immunologically cross-reactive with F-type pyocins. **Journal of Biochemistry**, v.93, p.61-71, 1983.

KURODA, K.; KAGEYAMA, M.; MAEDA, T.; FUJIME, S. Physicochemical properties of pyocin F1. **Journal of Biochemistry**, v.85, p.21-28, 1979.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v.23(21), p.2947-2948, 2007.

LEE, F.K.N.; DUDAS, K.C.; HANSON, J.A.; NELSON, M.B.; LOVERDE, P.T.; APICELLA, M.A. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* C is a bacteriophage tail-like particle that contains single-stranded DNA. **Infection and Immunity**, v.67(2), p.717-725, 1999.

LIANG, J.F.; KIM, S.C. Not only the nature of peptide but also the characteristics of cell membrane determine the antimicrobial mechanism of a peptide. **Journal Peptide Research**, v.53, p.518-522, 1999.

LODDI, M.M. Probioticos e prebioticos na nutrição de aves. **Revista CFMV- Suplemento Técnico n°23 mai/jun/jul/ago, 2001.**

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.

LUCKE, F.K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, Barking, v.56, p.105-115, 2000.

MATARAGAS, M.; METAXOPOULOS, J.; DROSINOS, E.H. Characterization of two bacteriocins produced by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442, isolated from dry fermented sausages. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.18, p.847-856, 2002.

MATSUI, H.; SANO, Y.; ISHIHARA, H.; SHINOMIYA, T. Regulation of pyocin genes in *Pseudomonas aeruginosa* by positive (prtN) and negative (prtN) regulatory genes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.175, p.1257-1263, 1993.

MEADOW, P.M.; WELLS, P.L. Receptor sites for R-type pyocins and bacteriophage E79 in the core part of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* PAC1. **Journal of General Microbiology**, v.108, p.339-343, 1978.

MERRIKIN, D.J.; TERRY, C.S. Use of pyocin 78-C2 in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.23, p.164-165; 1972.

MICHEL-BRIAND, Y.; BAYSSE, C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochimie**, v.84, p. 499-510, 2002.

MILLES, A.A.L.; MISRA, S.S. The estimation of bacterial prower of blood. **Journal of Hygiene**, v.38, p.732-749, 1938.

MOLL, G.N.; KONINGS, W.N.; DRIESSEN, A.J.M. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.76, p. 185-198, 1999.

MONTVILLE, T.J.; KAISER, A. Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins. Em: Hoover, D.G.; Steenson, L.R.; (Eds). **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Academic Press: New York, p.1-22, 1993.

MORSE, S.A.; APICELLA, M.A. Isolation of a lipopolysaccharide mutant of *Neisseria gonorrhoeae* using an R-type bacteriocin from *Pseudomonas aeruginosa*: an analysis of the antigenic and biologic differences. **Journal of Infection Diseases**, v.145, p.206-218, 1982.

MORSE, S.A.; JONES, B.V.; LYSKO, P.G. Pyocin Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae*: mechanism of action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.18(3), p.416-423, 1980.

MORSE, S.A.; VAUGHAN, P.; JOHSON, D.; IGLEWSKI, B.H. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by a bacteriocin from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.10(2), p.354-362, 1976.

NAKAYAMA, K.; TAKASHIMA, K.; ISHIHARA, M.; MURATA, T.; MORI, H.; HAYASHI, T. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. **Molecular Microbiology**, v.38(2), p.213-231, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**, 2nd ed. Wayne: Lancaster, 1998. Approved standards NCCLS Document M7-A2, 1998.

NICHOLAS, K.B.; NICHOLAS JR, H.B. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments, 1997.

NISSEN-MEYER, J.; NES, I.F. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. **Archives of Microbiology**, v.167, p.67-77, 1997.

OHSUMI, M.; SHINOMIYA, M.; KAGEYAMA, M. Comparative study on R-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biochemistry**, v.87, p.1119-1125, 1980

OHKAWA, I.; KAGEYAMA, M.; EGAMI, F. Purification and properties of pyocin S2. **Journal of Biochemistry**, v.73, p.281-289, 1973.

OHKAWA, I.; MARUO, B.; KAGEYAMA, M. Preferential inhibition of lipid synthesis by the bacteriocin pyocin S2. **Journal of Biochemistry**, v. 78, p. 213-223, 1975.

OLIVEIRA, S.S.; BARNES, J.; CARDOSO, M.; SORDELLI, D.; BASTOS, M.C.F. Staphylococcal strains involved in bovine mastitis are inhibited by *Staphylococcus aureus* antimicrobial peptides. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.27, p.287-291, 1998.

O'SULLIVAN, L.; ROSS, R.P.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie** v.84, p.539-604, 2002.

PARRET, A.; DE MOT, R. Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other δ -proteobacteria. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.10(3), p.107-112, 2002.

PARRET, A., & DE MOT, R. Novel bacteriocins with predicted tRNase and pore-forming activities in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Molecular Microbiology**, v.35, p.472-475, 2000.

REEVES, P. The bacteriocins. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v.29(1), p.24-45, 1965.

RIFFEL, A.; LUCAS, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.179, p.258-265, 2003.

RILEY, M.A. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. **Annual Review of Genetics**, v.32, p.255-278, 1998.

RILEY, M.A.; GORDON, D.M. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.7(3), p.129-133, 1999.

RILEY, M.A.; WERTZ, J.E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **Annual Review Microbiology**, v.56, p.117-137, 2002.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, p.945-967, 1987.

SANO, Y.; MATSUI, H.; KOBAYASHI, M.; KAGEYAMA, M. Pyocins S1 and S2, bacteriocins of *Pseudomonas aeruginosa*, in: Silver, S.; Chakraborty, A.M.; Iglewski, B.; Kaplan, S. (Eds.), **Pseudomonas, Biotransformation, Pathogenesis and Evolving Biotechnology**, ASM, Washington, DC, p. 352-358, 1990

SANO Y, KAGEYAMA, M. The sequence and function of the recA gene and its protein in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. **Molecular General Genetic**, v. 208, p.412-419, 1987.

SANO, Y.; KAGEYAMA, M. A novel transposon-like structure carries the genes for pyocin AP41, a *Pseudomonas aeruginosa* bacteriocin with DNase domain homology to E2 group colicins. **Molecular General Genetic**, v. 237, p.161-170, 1993.

SANO, Y.; KAGEYAMA, M. Purification and properties of an S-type pyocin, pyocin AP41. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.146(2), p.733-739, 1981.

SANO, Y.; KOBAYASHI, M.; KAGEYAMA, M. Functional domains of S-type pyocins deduced from chimeric molecules. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.175, p. 6179-6185, 1993.

SANO, Y.; MATSUI, H.; KOBAYASHI, M.; KAGEYAMA, M. Molecular structures and functions of pyocins S1 and S2 in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 175(10), p. 2907-2916, 1993.

SCHABLE, B.; OLSON, D.R.; SMITH, P.B. Improved, computer-generated system for pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.24(6), p.1017-1022, 1986.

SCHILLINGER, U.; LUCKE, F. Behavior of *L.monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.70, p.473-478, 1991.

SEMENOVA, E. et al. Structure-activity analysis of microcin J-25: distinct parts of the threaded lasso molecule are responsible for interaction with bacterial RNA polymerase. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.187, p.3859-3863, 2005.

SEO, Y.; GALLOWAY, D.R. Purification of the pyocin S2 complex from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: analysis of DNase activity. **Biochemical Biophys. Res. Commun.**, v. 172, p.455-461, 1990.

SHINOMIYA, T. Studies on biosynthesis and morphogenesis of R-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. II. Biosynthesis of antigenic proteins and their assembly into pyocin particles in mitomycin C-induced cells. **Journal of Biochemistry**, v.72, p.39-48, 1972.

SHINOMIYA, T. Phenotypic mixing of pyocin R2 and bacteriophage PS17 in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. **Journal of Virology**, v.49(2), p.310-314, 1984.

SHINOMIYA, T.; INA, S. Genetic comparison of bacteriophage PS17 and *Pseudomonas aeruginosa* R-type pyocin. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.171(5), p.2287-2292, 1989.

SHINOMIYA, T.; OSUMI, M.; KAGEYAMA, M. Defective pyocin particles produced by some mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v.124, p.1508-1521, 1975.

SHINOMIYA, T.; SHIGA, S.; KAGEYAMA, M. Genetics determinant of pyocin R2 in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. I. Localization of the pyocin R2 gene cluster between the *trpCD* and *trpE* genes. **Molecular and General Genetics**, v. 189, p.375-381, 1983.

SIDBERRY, H.D.; SADOFF, J.C. Pyocin sensitivity of *Neisseria gonorrhoeae* and its feasibility as an epidemiological tool. **Infection and Immunity**, v.15(2), p.628-637, 1977.

SMITH, A.W.; HIRST, P.H.; HUGHES, K.; GENSBERG, K.; GOVAN, J.R.W. The pyocin Sa receptor of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with ferripyoverdin uptake. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174(14), p.4847-4849, 1992.

SNEATH, P.H.A. et al. **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkim, 1984. v.1.

SORIANO, A.; ULMER, H.M.; SCANNELL, A.G.M.; ROSS, R.P.; HILL, C.; GARCÍA-RUIZ, A.; ARENDT, E.K. Control of food spoiling bacteria in cooked meat products with nisin, lacticin 3147, and a lacticin 3147-producing starter culture. **Europe Food Research Technology**, v.219, p.6-13, 2004.

STEIN, D.C.; HEBELER, B.H.; YOUNG, F.E. Effect of environment on sensitivity of *Neisseria gonorrhoeae* to *Pseudomonas aeruginosa* bacteriocins. **Infection and Immunity**, v.29(2), p.507-511, 1980.

SWITZER, R.C.; MERRIL, C.R.; SHIFRIN, S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.98 (1), p.231-237, 1979.

SWOFFORD, D.L. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and others methods) Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, 554 pp., 1998.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v.40(3), p.722-756, 1976.

TAKEYA, K.; MINAMISHIMA, Y.; AMAKO, K.; OHNISHI, Y. A small rod-shaped pyocin. **Virology**, v.31, p.166-168, 1967.

TEAGASC, J.J.S. The effect of freezing survival of pathogens in different meat types and the effect of varying lean fat ratios. **Hygiene Review**. 1997. Disponível em : <http://www.sofht.co.uk/isfht/irish-97.freezing.htm>.

TRIPATHI, K.D. Farmacologia Médica. Ed. Guanabara Koogan, 5ª ed., 2006.

URATANI, Y.; HOSHINO, T. Pyocin R1 inhibits active transport in *Pseudomonas aeruginosa* and depolarizes membrane potential. **Journal of Bacteriology**, v. 157, p.632-636, 1984.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAZU, H.; HOTTA, H. ; HASHIMOTO, Y. ; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen nov and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homolofy group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v.36, p.1251-1275, 1992.