

**MARCELA NASCIMENTO PINHEIRO BRAGA**

**CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE SUBSTÂNCIA  
ANTAGONISTA PRODUZIDA POR *Bacteroides fragilis* ISOLADO DE  
PACIENTE COM INFECÇÃO INTRA-ABDOMINAL**

**Departamento de Microbiologia  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais**

**Belo Horizonte**

**2016**

MARCELA NASCIMENTO PINHEIRO BRAGA

**CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE SUBSTÂNCIA  
ANTAGONISTA PRODUZIDA POR *Bacteroides fragilis* ISOLADO DE  
PACIENTE COM INFECÇÃO INTRA-ABDOMINAL**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Microbiologia.

Orientador: Luiz de Macêdo Farias

Coorientadora: Paula Prazeres Magalhães

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios  
Departamento de Microbiologia  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

2016

## COLABORAÇÃO

Prof.<sup>a</sup> Maria Auxiliadora Roque de Carvalho (Depto. de Microbiologia)

Prof.<sup>a</sup> Simone Gonçalves dos Santos (Depto. de Microbiologia)

Prof. Marcelo Matos Santoro (Depto. de Bioquímica e Imunologia)

Jamil Silvano Oliveira (Depto. de Bioquímica e Imunologia)

Dr. Marcelo Porto Bemquerer (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, DF)

Dr. Daniel Moreira dos Santos (Fundação Ezequiel Dias, BH, MG)

Dr.<sup>a</sup> Márcia Borges (Fundação Ezequiel Dias, BH, MG)

## APOIO FINANCEIRO

CNPq

FAPEMIG

CAPES

PRPq/UFMG

Aos meus pais, Dalva e Célio  
Ao meu marido, Marco Antonio  
Aos meus filhos, Maria Luiza e Marcelo Antonio

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar mais esta vitória e pela força, que veio dele pra mim.

À minha família toda, em especial ao meu marido, filhos, minha mãe, meu braço direito, esquerdo, babá, governanta, enfermeira, cozinheira, presença animada e alto astral, vovó Dalva, uma avó muito amada e muito dedicada, muito, muito, muito obrigada mãe, pela grande ajuda. Ao meu pai, motorista, acompanhante, *office boy*, ajudante de pedreiro, professor de lições da vida, um vovô divertido e dedicado, obrigada pai, meu amor e gratidão eternos a vocês.

Aos meus orientadores Luiz e Paula, pela dedicação, pela oportunidade, pela participação em todas as etapas deste trabalho, pelos ensinamentos, que contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal, pela disponibilidade sempre quando precisei conversar sobre todos os assuntos e pelo carinho. Aprendi muito com vocês, nas aulas, na administração do laboratório e no tratamento paternal conosco. Guardarei tudo que aprendi e colocarei em prática, com muito carinho.

A amiga Natália, que sempre se fez presente, desde o dia que a conheci, pessoa maravilhosa, amiga fiel, me ensina todos os dias o valor de uma verdadeira amizade, sempre disposta a ajudar, a incentivar, um ser humano incrível. Sentirei muitas saudades das nossas conversas sinceras, nossas gargalhadas, nossas receitas e nossos lanches com pão com manteiga.

Ao Jamil e ao Daniel, pela ajuda nas etapas de purificação e nas tentativas de encontrar novos meios de otimizar os experimentos.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, todos tiveram participação na minha formação. Em especial a Amanda, Cássia, Anna Gabriella, Patrícia, João, Mariana, Augusto, Silvinha, Samir, Thaysa, Jaqueline, Diego, Carol, Débora, Profª Simone, Profª Dodora, José Sérgio e Luzia (apoio técnico), por todos

os bons momentos que passamos juntos. À UFMG, ao programa de Pós-graduação em Microbiologia, professores e funcionários, pelos ensinamentos e apoio. À FAPEMIG, CNPq, CAPES, PRPq/UFMG pelo suporte financeiro concedido.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	IMPORTÂNCIA DA MICROBIOTA INDÍGENA	17
1.2	OS GÊNEROS <i>Bacteroides</i> e <i>Parabacteroides</i>	22
1.2.1	CARÁTER ANFIBIÔNTICO DE <i>Bacteroides fragilis</i>	24
1.3	ANTAGONISMO BACTERIANO: BACTERIOCINAS	28
1.3.1	BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS ANAERÓBIAS	30
1.3.2	SUBSTÂNCIAS ANTAGONISTAS PRODUZIDAS POR <i>Bacteroides</i>	33
1.3.3	A INFLUÊNCIA DOS COMPOSTOS ANTAGÔNICOS NAS RELAÇÕES INTERMICROBIANAS	35
1.3.4	APLICAÇÃO DE BACTERIOCINAS	38
2	JUSTIFICATIVA	42
3	OBJETIVOS	44
3.1	OBJETIVO GERAL	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	ORIGEM E MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS	46
4.2	PESQUISA DE ATIVIDADE ANTAGONISTA	46
4.3	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA EXPRESSÃO DE ANTAGONISMO	47
4.4	PESQUISA DE FATORES DE INTERFERÊNCIA	50
4.4.1	Bacteriófagos	50
4.4.2	Ácidos graxos e outros ácidos	50
4.4.3	Clorofórmio	51
4.4.4	Peróxido de hidrogênio	51
4.5	EXTRAÇÃO PROTEICA	51
4.5.1	Extração da fração extracelular	53
4.5.2	Extração da fração intracelular	53
4.6	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ATIVIDADE ANTAGONISTA PELOS EXTRATOS PROTEICOS	53

4.7	OBTENÇÃO DE EXTRATO CENTRIFUGADO EM AMICON 100 KDA	54
4.8	TITULAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTEICAS ATIVAS	54
4.9	DOSAGEM PROTEICA	55
4.10	CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES ATIVAS	55
4.10.1	pH	55
4.10.2	Temperatura	56
4.10.3	Enzimas proteolíticas	56
4.10.4	Solventes orgânicos	57
4.11	ESTUDO DO MODO DE AÇÃO DAS FRAÇÕES ATIVAS	57
4.11.1	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	57
4.11.2	Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	58
4.12	PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES ATIVAS POR CROMATOGRAFIA	58
4.13	SDS-PAGE	59
4.14	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	60
4.15	DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA PRIMÁRIA DA SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA	60
5	RESULTADOS	61
5.1	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ANTAGONISMO E INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO	61
5.2	FATORES DE INTERFERÊNCIA	63
5.2.1	Bacteriófagos	63
5.2.2	Ácidos graxos	64
5.2.3	Clorofórmio	64
5.2.4	Peróxido de hidrogênio	64
5.3	TESTE DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS FRAÇÕES PROTEICAS	65
5.4	CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA	66
5.4.1	Influência da Temperatura	66
5.4.2	Influência do pH	66
5.4.3	Influência de Enzimas Proteolíticas	67
5.4.4	Influência de Solventes Orgânicos	67
5.5	CIM E CBM	69



5.6	PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES C30 E C50	69
5.7	SDS-PAGE	74
5.8	DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA	75
5.9	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS	76
6	DISCUSSÃO	77
7	SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

## LISTA DE TABELAS

	P
Tabela 1 - Expressão de heteroantagonismo pelas amostras de <i>Bacteroides</i> isoladas de pacientes com infecção intra-abdominal.	61
Tabela 2 - Titulação dos extratos proteicos intracelulares ativos obtidos a partir da amostra <i>Bacteroides fragilis</i> D 111.4.	66
Tabela 3 - Caracterização das frações C30 e C50 obtidas da amostra <i>Bacteroides fragilis</i> D 111.4.	68

## LISTA DE QUADROS

	p
Quadro 1 - Amostras empregadas como reveladoras para avaliação de atividade antagonista.	48
Quadro 2 - Condições de cultivo empregadas para avaliação da expressão de antagonismo pela amostra de <i>Bacteroides fragilis</i> D 111.4.	49
Quadro 3 - Métodos de extração empregados para obtenção de extrato proteico bruto de <i>Bacteroides fragilis</i> D 111.4.	52

## LISTA DE FIGURAS

	p
Figura 1 - Classificação quanto ao tipo de relação antagonista das amostras de <i>Bacteroides</i> estudadas.	62
Figura 2 - Atividade heteroantagonista de amostras de <i>Bacteroides fragilis</i> isoladas de pacientes com infecção intra-abdominal.	63
Figura 3 - Pesquisa de fatores de interferência	64
Figura 4 - Teste de atividade das frações C30 e C50 obtidas da amostra <i>Bacteroides fragilis</i> D 111.4.	65
Figura 5 - Zonas de inibição da amostra reveladora pelas frações 1, 2, 3 e 4 resultantes da cromatografia de troca iônica de C50, extrato intracelular precipitado com 50% de sulfato de amônio.	70
Figura 6 - Perfil cromatográfico de troca iônica de C50, fração intracelular precipitada com 50% de sulfato de amônio, em coluna Mono-Q™, acoplada em sistema FPLC.	70
Figura 7 - Zonas de inibição da amostra reveladora pelas frações 2 e 3 resultantes da cromatografia de gel filtração.	71
Figura 8 - Perfil cromatográfico de gel filtração do <i>pool</i> 1 (frações 1 a 4) oriundos da cromatografia de troca iônica, utilizando coluna Superose 12 acoplada a sistema FPLC.	72
Figura 9 - Perfil cromatográfico de fase reversa do <i>pool</i> 2 (frações 2 e 3) oriundo da cromatografia de gel filtração, utilizando coluna C8 acoplada a sistema de HPLC.	73
Figura 10 - Zonas de inibição da amostra reveladora pela fração 2C resultante da cromatografia de fase reversa.	73
Figura 11 - SDS-PAGE do extrato bruto C50.	74

Figura 12 - Espectro de massa proveniente da fração 2C oriunda da cromatografia de fase reversa. 75

Figura 13 - Análise de identidade realizada no BLASTP 76

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BA	<i>Brucella Agar</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BHI-S	<i>Brain Heart Infusion</i> suplementado com extrato de levedura, hemina e menadiona
BHIA	<i>Brain Heart Infusion Agar</i>
BHIA-S	<i>Brain Heart Infusion Agar</i> suplementado com extrato de levedura, hemina e menadiona
$\alpha$ -CHCA	$\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico
C-30	Extrato proteico intracelular precipitado com sulfato de amônio na concentração de 30%
C-50	Extrato proteico intracelular precipitado com sulfato de amônio na concentração de 50%
C-80	Extrato proteico intracelular precipitado com sulfato de amônio na concentração de 80%
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
DTT	Solução de dithiothreitol
DHB	Ácido 2,5-di-hidroxibenzoico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EL	Extrato de levedura
ETBF	<i>Bacteroides fragilis</i> enterotoxigênicas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPLC	<i>Fast performance liquid chromatography</i>
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>

IL-1 $\alpha$	Interleucina 1 $\alpha$
kDa	Kilodalton
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization</i>
NaOH	Hidróxido de sódio
NTBF	<i>Bacteroides fragilis</i> não enterotoxigênicas
pH	Potencial hidrogeniônico
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
rDNA	DNA ribossomal
S30	Extrato proteico extracelular precipitado com sulfato de amônio na concentração de 30%
S50	Extrato proteico extracelular precipitado com sulfato de amônio na concentração de 50%
S80	Extrato proteico extracelular precipitado com sulfato de amônio na concentração de 80%
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis</i>
SST6	Sistema de secreção tipo VI
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
TLRs	Receptor tipo <i>Toll</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
TOF	<i>Time-of-flight</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
UA	Unidades arbitrárias de atividade antibacteriana
UFC	Unidade formadora de colônia
VAS	<i>Virulence associated secretion</i>

## RESUMO

A microbiota indígena dos seres humanos é extremamente rica e diversificada, merecendo especial destaque a microbiota intestinal. Como constituinte desta microbiota, cita-se o gênero *Bacteroides*, cujos membros são bastonetes Gram negativos, anaeróbios obrigatórios, anfíbios, associados à etiopatogenia de doenças infecciosas importantes, como, por exemplo, infecções intra-abdominais. Amostras de *Bacteroides* apresentam a habilidade de sintetizar substâncias antagonistas que desempenham função ecológica, principalmente, em *habitats* densamente colonizados, conferindo vantagem competitiva às amostras produtoras. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de síntese de substâncias antagonistas por 40 amostras de *Bacteroides* e *Parabacteroides* isoladas de pacientes com infecções intra-abdominais. A expressão de antagonismo foi avaliada pelo método de difusão em sobrecamada, empregando, como reveladoras, além das amostras teste, 42 amostras de referência de bactérias Gram negativas e Gram positivas. Posteriormente, uma amostra produtora (*Bacteroides fragilis*) foi empregada para extração, purificação e caracterização parcial da substância antimicrobiana detectada. Como reveladoras, foram empregadas, nesta etapa, amostras de *Bacteroides ovatus* e *Bacteroides caccae*. A amostra produtora foi submetida a extração proteica, detectando-se atividade do extrato intracelular precipitado com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nas concentrações de 30% (C30) e 50% (C50). Os extratos brutos C30 e C50 foram inativados por proteases e altas temperaturas e mantiveram-se ativos após exposição a solventes orgânicos e uma ampla faixa de pH. Ambas as frações apresentaram atividade antagonista de natureza bacteriostática. O extrato C50, por se mostrar mais ativo, foi submetido à cromatografia de troca iônica, gel filtração e de fase reversa, seguindo esta ordem. A fração 2C, oriunda da cromatografia de fase reversa manteve-se ativa. A espectrometria de massas, a partir da fração 2C, apresentou íons de aproximadamente 1300 Da, que geraram um sinal mais intenso. Foi realizada busca por similaridade entre fragmentos sequenciados e proteínas descritas nos bancos de dados BLASTP e *Antimicrobial Peptide Database*. A sequência do fragmento obtido por cromatografia de fase reversa resultou em identidade de 100% com uma proteína de secreção do tipo VII (BLASTP). Em conjunto, os resultados indicam a produção de substância antagonista pela amostra de *B. fragilis* em estudo. É plausível supor que as mesmas desempenhem papel relevante nas relações interbacterianas, como fator de virulência, em um ambiente complexo como o de uma infecção intra-abdominal.

Palavras-chave: *Bacteroides*, *Parabacteroides*, substâncias antagonistas, microbiota intestinal, infecção intra-abdominal.



## ABSTRACT

The indigenous microbiota is extremely rich and diverse, in special the intestinal microbiota. Among its members *Bacteroides* and *Parabacteroides* should be highlighted. These bacteria are Gram negative, obligate anaerobes, associated with the etiopathogenesis of relevant infectious diseases such as, intra-abdominal infections. *Bacteroides* and *Parabacteroides* express the ability to synthesize bacteriocins, proteinaceous substances that play an ecological function, particularly in densely colonized habitats such as the intestine, conferring a competitive advantage to the producer strains. This study aimed to evaluate the expression of bacteriocin-like substances by 40 isolates of *Bacteroides* and *Parabacteroides* recovered from patients with intra-abdominal infections. We searched for antagonism expression by employing the overlay method, using, as indicator, in addition to the test strains, 42 reference strains of Gram negative and Gram positive bacteria. After screening for antagonistic activity one producer strain was selected and employed in the subsequent steps of the study. This isolate (*Bacteroides fragilis*) was submitted to extraction, purification, and partial characterization of the antagonistic substance. *Bacteroides ovatus* and *Bacteroides caccae* were selected as indicator strains. The intracellular extracts precipitated with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  at concentrations of 30% (C30) and 50% (C50) showed activity. This extracts C30 and C50 were inactivated by proteases and high temperatures, and remained active after exposure to organic solvents and a wide range of pH. Both active fractions expressed antagonistic activity of bacteriostatic nature. The extract C50 was submitted to ion exchange chromatography, gel filtration chromatography and reversed phase chromatography, following this order. The fraction 2C remained active. Mass spectrometry of fraction 2C presented ions of approximately 1300 Da, which generated a more intense signal. A search for similarity between sequenced fragments and proteins described in the databases BLASTP and Antimicrobial Peptide Database was conducted. The sequence of a fragment obtained from reverse phase chromatography resulted in 100% identity with a type VII secretion protein (BLASTP). Taken together, the results indicate the production of antagonistic substances by the *B. fragilis* isolate under study. It is plausible to assume that they play a relevant role in interbacterial relationships as a virulence factor especially in a such complex environment as we observe in an event of an intra-abdominal infection.

Keywords: *Bacteroides*, *Parabacteroides*, antagonistic substance, intestinal microbiota, intra-abdominal infection.

### 1.1 IMPORTÂNCIA DA MICROBIOTA INDÍGENA

O ser humano nasce estéril, porém, desde o momento do parto, passa a ser colonizado gradativamente por microrganismos. Bebês que nascem por meio de parto normal começam a adquirir bactérias presentes na mãe, enquanto bebês que nascem por cesariana são colonizados, inicialmente, por bactérias presentes no ambiente hospitalar, o que pode afetar o desenvolvimento da microbiota intestinal. A colonização é iniciada nas superfícies mucosas, dentre as quais a mucosa intestinal é o principal local de interação microrganismo-hospedeiro. O período neonatal é visto como uma época crítica, na qual ocorre o processo de instalação da microbiota, que dependerá de muitos eventos complexos, resultando em uma comunidade bacteriana permanente, que irá interagir continuamente com o hospedeiro, desempenhando funções fundamentais. É evidente que a manutenção desta associação, entre a microbiota intestinal e tecidos do hospedeiro, seja estabelecida por meio de uma relação complexa entre as bactérias residentes, o epitélio do intestino e o sistema imune (DETHLEFSEN *et al.*, 2007; YU & GAO, 2015).

A microbiota intestinal de bebês é muito simples em relação aos tipos de microrganismos presentes. Enquanto são amamentados com leite materno, a microbiota é composta basicamente de *Bifidobacterium*, bactérias lácticas e poucos coliformes e *Clostridium*. O passo mais importante para o desenvolvimento da microbiota intestinal em crianças é a introdução de alimentos sólidos; a partir daí, *Bacteroides* e outras bactérias Gram negativas começam a predominar. A microbiota se estabiliza e se torna semelhante à do indivíduo adulto por volta dos dois anos de vida e tende a permanecer assim pelo resto da vida. Nesta estabilização, ela é composta por bactérias não esporuladas e anaeróbias obrigatórias, como *Fusobacterium*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium* (principal população de bactérias Gram positivas). Outros grupos de bactérias Gram positivas, como *Clostridium* e *Lactobacillus*, também são relatados. É importante

lembrar que essas populações podem variar entre indivíduos (SAAVEDRA & DATTILO, 2012).

O cólon, porção final do intestino grosso, é a região mais densamente colonizada por microrganismos, pois propicia um excelente ambiente para a proliferação de bactérias, graças à ausência de secreções digestivas e abundância de nutrientes. Por outro lado, a colonização do intestino delgado é influenciada pela presença de sais biliares, maior motilidade do intestino, pela natureza do próprio epitélio e pela presença de células dendríticas e macrófagos (SOMMER & BACKHED, 2013).

O número de microrganismos presentes na microbiota é tão grande que supera as próprias células eucarióticas. Há sim, um impacto inquestionável desta comunidade microbiana na fisiologia dos hospedeiros, onde estes microrganismos e seus genes contribuem para funções importantes que não são codificadas pelo genoma humano. Os microrganismos que compõem a microbiota humana afetam a forma de digestão dos alimentos e de desenvolvimento de várias doenças, o metabolismo e até mesmo interfere nas relações interpessoais. Apesar do ponto de vista antropocêntrico, onde se entende que seres humanos são evoluídos e autossuficientes, pesquisas com animais livres de germes mostram uma história diferente. Os seres microscópicos da microbiota são fundamentais em cada etapa da vida e, sem a microbiota, os seres humanos não sobreviveriam neste mundo (LOBO *et al.*, 2016).

O sistema imunitário apresenta mecanismos de tolerância aos organismos residentes no intestino como a secreção de uma camada de muco espesso pelas células intestinais. Tais mecanismos limitam o contato da microbiota com os tecidos do hospedeiro e a penetração das bactérias através da barreira epitelial. No entanto, a constante interação entre os membros da microbiota indígena e o epitélio é inevitável. A colonização estável pela microbiota requer contato próximo entre bactérias e superfícies mucosas (SAAVEDRA & DATTILO, 2012).

Receptores de reconhecimento padrões (PRRs), tais como receptores do tipo Toll (TLRs), são expressos por células epiteliais do intestino para monitorar especificamente os componentes microbianos no lúmen intestinal. Estes

receptores desempenham papel essencial na imunidade inata em resposta a ligantes microbianos. São moléculas da superfície celular ou intracelulares que reconhecem moléculas específicas dos microrganismos e iniciam cascatas de sinalização intracelular, o que pode levar à ativação de vários fatores de transcrição (por exemplo, NF- $\kappa$ B). Os fatores de transcrição podem ativar genes envolvidos na resposta pró-inflamatória e, conseqüentemente, induzir a inflamação (TAKEDA & AKIRA, 2005).

Os membros da microbiota desenvolveram maneiras de modular respostas imunes inatas, por exemplo, de neutrófilos. Segundo Maslowski *et al.* (2009), ácidos graxos de cadeia curta, produzidos durante a fermentação da dieta rica em fibras por microrganismos intestinais, podem interagir com receptores expressos em neutrófilos, para atenuar a inflamação durante a colite experimental, a artrite e a asma. Esta é uma descoberta interessante, pois conecta a dieta com a composição da microbiota e a resposta imune do hospedeiro. Além disso, também pode explicar a diferença entre os indivíduos quanto à sua suscetibilidade a doenças inflamatórias autoimunes em diferentes regiões geográficas.

Portanto, a colonização estável do intestino requer mecanismos reguladores para controlar as respostas inflamatórias constantes que a microbiota pode induzir em hospedeiros saudáveis. De fato, esses mecanismos estão sendo amplamente estudados e já se sabe que podem variar entre diferentes espécies bacterianas. Por exemplo, alguns membros da microbiota residente evoluíram e expressam moléculas de superfície menos imunogênicas, que os protegem do reconhecimento como antígenos por parte do sistema imunológico. Além disso, uma vez que animais *germ free* não têm um sistema imunitário totalmente funcional, tem sido proposto que bactérias do intestino podem moldar ativamente o sistema imune inato e adaptativo, promovendo a saúde do hospedeiro. Desta forma, fica entendido que o sistema imune tem função de defesa contra agentes patogênicos, mas, também, fornece uma plataforma para microrganismos residentes exercerem a sua influência durante o estabelecimento da colonização estável, promovendo a homeostase microrganismo-hospedeiro (ROUND & MAZMANIAN, 2009a; ROUND & MAZMANIAN, 2009b).

A microbiota intestinal é parte de um complexo ecossistema e as interações entre as bactérias são importantes, inclusive para o hospedeiro, pois compostos produzidos por algumas bactérias podem servir de nutrientes para outras. Algumas características dos hospedeiros são fatores relevantes para a colonização do trato digestivo. O muco produzido por células caliciformes, que tem função na digestão do hospedeiro, lubrifica e protege o epitélio digestivo da ação de bactérias. O muco é formado por polímeros de mucina, nome genérico de glicoproteínas com função de proteção de mucosas. Essas moléculas apresentam esqueletos peptídicos e porções de carboidratos que atuam tanto como alimento para as bactérias como local de ligação das mesmas. A natureza do carboidrato desempenha um papel importante na adesão de microrganismos, porque a ligação entre a célula do epitélio digestivo e a bactéria depende de carboidratos específicos presentes na superfície da célula. A capacidade dos microrganismos de aderir às células epiteliais e o longo tempo de permanência do bolo alimentar no cólon contribuem para a manutenção das comunidades bacterianas observadas no intestino. Inclusive, a colonização bacteriana inicial no intestino de recém-nascidos e crianças é dependente do repertório inato de carboidratos da criança. Essa é uma das explicações para a variação da microbiota intestinal entre os indivíduos de uma mesma espécie (DONOVAN *et al.*, 2012).

Os membros da microbiota indígena do intestino contribuem para a modulação e comunicação entre as populações residentes, por meio da produção de substâncias agonistas e antagonistas. Apesar dos avanços nos estudos que definem a composição do microbioma na saúde e na doença, pouco se sabe sobre os processos moleculares empregados por bactérias simbióticas para colonizar de forma estável e saudável o intestino. Mais estudos são necessários para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no processo (GERRITSEN *et al.*, 2011; MAZMANIAN *et al.*, 2013).

Os estudos avançados na área da filogenética e o sequenciamento do rDNA 16S fornecem conhecimento de comunidades microbianas inteiras. A análise da microbiota de diferentes hospedeiros mamíferos demonstrou que existem

diferenças na composição microbiana, no tipo e número de bactérias, devido à dieta e à fisiologia do trato gastrointestinal de cada hospedeiro (LEY *et al.*, 2008).

Os estudos que envolvem sequenciamento de microbioma estão revelando, de forma detalhada, diversas comunidades bacterianas em vários locais do corpo humano, assim como estudos associados a dietas e populações microbianas distintas entre seres humanos. Ecossistemas complexos sofreram coadaptação ao longo de milênios, entre animais e microrganismos, para criar microbiomas estáveis e espécie-específicos. Tais estudos sugerem a evolução dos mecanismos moleculares que estabelecem e mantêm a colonização microbiana simbiótica (MAZMANIAN *et al.*, 2013).

*Bacteroides* e *Parabacteroides* são dois importantes gêneros que fazem parte da microbiota indígena de seres humanos e de outros animais. Esta coleção de microrganismos que habita o corpo humano é constituída por comunidades microbianas complexas, como aquele presente no trato digestivo, em especial, na cavidade oral e no intestino. Existe uma relação entre a microbiota e o hospedeiro que o beneficia, contribuindo para o desenvolvimento da resposta imune saudável e na manutenção de muitos processos fisiológicos e nutricionais. Como membros da microbiota intestinal, *Bacteroides* e *Parabacteroides* oferecem várias vantagens para o hospedeiro, auxiliando na fisiologia e função normal do trato gastrointestinal, ajudando na digestão de polissacárides complexos e também utilizando recursos nutricionais, o que auxilia na resistência à colonização do intestino por bactérias potencialmente prejudiciais (ISHIKAWA *et al.*, 2013).

## 1.2 OS GÊNEROS *Bacteroides* e *Parabacteroides*

Os gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* são constituídos por bastonetes ou cocobacilos Gram negativos, anaeróbios obrigatórios, sacarolíticos e imóveis. Apresentam, como característica especial, a aerotolerância; apesar de serem incapazes de se multiplicar na presença de ar (21% de O<sub>2</sub>), são altamente resistentes ao estresse oxidativo e podem sobreviver por longos períodos em ambiente aeróbio. *B. fragilis* é um dos anaeróbios aerotolerantes mais conhecidos, podendo sobreviver por pelo menos três dias na presença de oxigênio atmosférico. Ao contrário, os anaeróbios sensíveis ao oxigênio sobrevivem menos de duas horas em condições atmosféricas oxigenadas. A notável resistência ao estresse oxidativo é mediada por uma grande variedade de genes que são estritamente regulados para assegurar a produção de enzimas como a superóxido dismutase e a catalase, que conferem resistência à oxidação (NDAMUKONG *et al.*, 2012; SONG *et al.*, 2004).

De acordo com Wexler (2007), estudos taxonômicos são importantes para permitir a identificação correta do microrganismo, além de auxiliar na terapia antimicrobiana e revelar a importância do patógeno isolado. O gênero *Bacteroides* foi descrito em 1898 por Veillon e Zuber. A espécie *Bacteroides fragilis* foi incluída no gênero apenas em 1919, por Castellani e Chalmers. Na primeira edição do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, publicada em 1923, *B. fragilis* foi classificado como membro do gênero *Bacteroides*, composto por bastonetes anaeróbios obrigatórios, Gram positivos e Gram negativos, não formadores de esporos. Posteriormente, em 1937, Weiss e Rettger excluíram os organismos Gram positivos do gênero.

Com base em resultados de estudos morfológicos e fisiológicos realizados por Holdeman e Moore, a edição do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* de 1974 dividiu a espécie *B. fragilis* em diversas subespécies, quais sejam *B. fragilis* subsp. *vulgatus*, *B. fragilis* subsp. *distasonis*, *B. fragilis* subsp. *ovatus*, *B. fragilis* subsp. *thethaiotaomicron*, *B. fragilis* subsp. *eggerthii* e *B. fragilis* subsp. *uniformis*.

Com o advento das técnicas de genética molecular, verificou-se que estas subespécies eram geneticamente distintas, voltando a vigorar a classificação das mesmas como espécies do gênero *Bacteroides* (CATO & JOHNSON, 1976).

Desta forma, na edição de 1984 do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, o gênero *Bacteroides* incluía as espécies *B. distasonis*, *B. eggerthii*, *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis* e *B. vulgatus*. Segundo a classificação de Holdeman *et al.* (1984), estas espécies passaram a compor o grupo *Bacteroides fragilis*. As amostras do grupo eram descritas como bastonetes Gram negativos, resistentes a bile, sacarolíticos, que apresentam os ácidos acético e succínico como principais produtos do metabolismo da glicose. Logo depois, em 1986, Johnson e Harich identificaram três novas espécies, *B. caccae*, *B. merdae* e *B. stercoris*, que foram incorporadas ao grupo.

Na 9.<sup>a</sup> edição do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, publicada em 1994, Holt *et al.* descreveram o gênero *Bacteroides* com 47 espécies, incluindo aquelas que integravam o grupo *B. fragilis*. Estudos baseados no sequenciamento do rDNA 16S levaram há modificações significativas no gênero (JOUSIMIES-SOMER & SUMMANEN, 2002; SONG *et al.*, 2004). De acordo com Song *et al.* (2004), o gênero *Bacteroides* reúne espécies com conteúdo de 40-48 mol % de G+C, altamente fermentativas, fenotípica e genotipicamente semelhantes à espécie *B. fragilis*. As novas espécies isoladas de seres humanos, incorporadas ao gênero *Bacteroides*, incluem *B. nordii*, *B. salyersae*, *B. massiliensis*, *B. plebeus*, *B. coprola*, *B. finegoldii*, *B. dorei* e *B. intestinalis* (SONG *et al.*, 2004; BAKIR *et al.*, 2006). Outras três espécies, *B. barnesiae*, *B. salanitronis* e *B. gallinarium*, foram isoladas a partir do ceco de galinhas (LAN *et al.*, 2006).

Posteriormente, as espécies *B. distasonis*, *B. merdae* e *B. goldsteinii* foram reclassificadas como membros do gênero *Parabacteroides* (SAKAMOTO & BENNO, 2006).



### 1.2.1 CARÁTER ANFIBIÔNTICO DE *Bacteroides fragilis*

As bactérias anaeróbias têm papel importante nos contextos clínico e ecológico, demonstrando grande versatilidade e expressando uma gama de habilidades que possibilitam sua sobrevivência em diversas condições. São microrganismos que podem beneficiar o hospedeiro contribuindo para seu bem estar. No entanto, em determinadas situações, podem atuar como agentes de doenças infecciosas, ou seja, são classificados como anfibiontes (DINIZ *et al.*, 2000).

Os seres humanos albergam uma microbiota intestinal complexa, que compreende bactérias que fornecem benefícios imunológicos, metabólicos e neurológicos para o hospedeiro e contribuem para o seu bem-estar. No entanto, o desequilíbrio da composição da microbiota, conhecido como disbiose, juntamente com a resposta imune do hospedeiro associada a mucosas, têm papel chave na patogênese de muitas doenças inflamatórias, incluindo doenças inflamatórias do intestino, asma, esclerose múltipla, entre outras. Além disso, fora do lúmen intestinal, bactérias da microbiota são agentes causadores de inflamação peritoneal, sepse abdominal e sepse sistêmica (LOBO *et al.*, 2016).

Amostras de *B. fragilis*, membro da microbiota intestinal, apresentam grande relevância para a área médica, devido à sua associação com doenças infecciosas oportunistas de origem endógena (DINIZ *et al.*, 2016). Esta bactéria está associada a processos como infecções intra-abdominais, infecções urogenitais, bacteremias, infecções em tecidos moles e abscessos, principalmente, em indivíduos imunocomprometidos (WICK & SEARS, 2011).

Na década de 80, *B. fragilis* foi apontado, inicialmente, como agente de doença diarreica. Estudos adicionais têm associado *B. fragilis* a doença diarreica em seres humanos e outras espécies animais, tendo sido identificadas duas variações, quais sejam, amostras não enterotoxigênicas (NTBF) e enterotoxigênicas (ETBF). As amostras simbióticas, que contribuem para o metabolismo polissacarídico e para a ativação do sistema imune do hospedeiro são caracterizadas como não enterotoxigênicas. ETBF são conhecidas por causar doença diarreica inflamatória

em crianças e adultos. A forma enterotoxigênica de *B. fragilis* resulta de estirpes produtoras de uma toxina extracelular que permanece ativa a -20 °C, mas é instável a 55 °C, sensível à proteinase k e resistente à tripsina e à quimotripsina. A toxina entérica de *B. fragilis*, também chamada de fragilisina, é classificada como uma metaloprotease de 20 kDa dependente de zinco. Caracteriza-se por hidrolisar actina, tropomiosina, miosina e gelatina, mas não hidrolisa fibronectina e albumina (FATHI & WU, 2016).

Dentre as doenças associadas aos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*, destaca-se a infecção intra-abdominal, pela sua gravidade e prevalência elevada. Como já mencionado, apesar de seu papel protetor, as bactérias que constituem a microbiota no intestino podem estar envolvidas em processos patogênicos graves. Em casos onde a barreira epitelial do intestino é violada, bactérias da microbiota indígena podem escapar do lúmen intestinal (LOBO *et al.*, 2016). Após rompimento da parede intestinal, que pode ocorrer por diferentes causas (ferida cirúrgica, malignidades, apendicites ou trauma, entre outras), a microbiota indígena invade a cavidade peritoneal, sítio normalmente estéril. Durante a fase aguda da infecção (aproximadamente 20 h), os anaeróbios facultativos, especialmente *Escherichia coli*, se estabelecem, promovendo a queda do potencial de oxirredução do ambiente. A atmosfera, agora pobre em oxigênio, permite, então, que bactérias anaeróbias obrigatórias, como os representantes dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*, colonizem e se reproduzam, passando a predominar durante a fase crônica da infecção (WEXLER, 2007; NICOLETTI *et al.*, 2008).

*Bacteroides* e *Parabacteroides*, em especial *B. fragilis*, podem expressar uma ampla variedade de habilidades de virulência, como síntese de enzimas, secreção de toxinas, substâncias antimicrobianas e bacteriocinas, o que favorece o sucesso do microrganismo na colonização e agressão ao hospedeiro (DINIZ *et al.*, 2000; WEXLER, 2007; PAPAPARASKEVAS *et al.*, 2011).

A formação de abscessos em resposta a infecções intra-abdominais causadas por *B. fragilis* é, na verdade, um produto da ativação inadequada do sistema imune do

hospedeiro, na tentativa de isolar e conter os microrganismos invasores. Os abscessos representam uma condição médica séria e uma questão clínica e financeira crítica, com os custos do tratamento estimados em US\$ 500 milhões a cada ano nos Estados Unidos. A formação do abscesso inclui várias etapas, envolvendo tanto a entrada do microrganismo na área intra-abdominal, a partir do trato intestinal, como a subsequente regulação da virulência e de fatores de sobrevivência das bactérias. Tipicamente, os microrganismos alcançam a entrada para o espaço intra-abdominal por meio de uma ruptura ou trauma abdominal (CAO *et al.*, 2014).

Após a entrada no espaço intra-abdominal, as bactérias encontram condições de estresse, devido ao aumento da pressão parcial de oxigênio no peritônio, em torno de 6%, bem como componentes da resposta imune do hospedeiro. Desta forma, a maioria dos microrganismos invasores é removida pelo sistema linfático ou fagocitadas pelos macrófagos residentes e células polimorfonucleares. No entanto, as respostas imunitárias do hospedeiro podem ser evitadas inicialmente, em parte, por uma forte aderência das bactérias ao tecido invadido, evitando a eliminação de células bacterianas de forma eficiente. Exemplos deste fenômeno, em que a capacidade de aderência está correlacionada com a sobrevivência, podem ser vistos com a cápsula polissacarídica de *B. fragilis* (KAYAMA & TAKEDA, 2014).

A formação de um abscesso intra-abdominal por *B. fragilis* depende fortemente da cápsula da bactéria. De fato, demonstrou-se que a cápsula sozinha é suficiente para induzir a formação de abscessos em modelos experimentais. Também tem sido demonstrado que a proteção contra abscessos nos animais pode ser alcançada através de injeção sistêmica da cápsula, presumivelmente, pelo desenvolvimento de anticorpos. A evidência sugere que a elevada incidência do envolvimento de *B. fragilis* em abscessos intra-abdominais pode ser devida, em parte, à capacidade de adesão da sua cápsula. Esta capacidade poderia permitir uma melhor ligação ao mesotélio peritoneal, impedindo a eliminação de *B. fragilis*, em comparação com microrganismos não encapsulados ou com cápsulas menos aderentes. Além disso, a cápsula de *B. fragilis* leva à tolerância mucosa

intestinal, por meio da indução de citocinas anti-inflamatórias de células T-reguladoras (CAO *et al.*, 2014; TELESFORD *et al.*, 2015).

Estudos têm mostrado que a cápsula de *B. fragilis* é capaz de induzir o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), que causam a produção da molécula de adesão celular ICAM-1 pelas células mesoteliais. A ICAM-1 produzida por estas células pode, então, atuar como um ligante para os PMNs (leucócitos polimorfonucleares), o que é um passo importante no desencadeamento de abscesso (KAYAMA & TAKEDA, 2014).

A resposta imune do hospedeiro desempenha, então, mais um importante papel na formação do abscesso, aumentando a liberação de substâncias vasoativas durante a infecção do peritônio, resultando em depósitos de fibrina que aprisionam as bactérias aderentes, favorecendo o desenvolvimento do abscesso. A infecção intra-abdominal também reduz a atividade fibrinolítica, aumentando o potencial de acumulação de fibrina. Além disso, o núcleo de um abscesso, constituído por restos necróticos e bactérias, está rodeado por células do sistema imunológico do hospedeiro, que, continuamente, tentam destruir os organismos infecciosos e induzem, nos mesmos, ativação e expressão de seus fatores de patogenicidade e sobrevivência. Estas circunstâncias criam um ciclo de *feedback* em que o hospedeiro tenta resolver o abscesso, mas as bactérias tentam sobreviver contra a resposta do hospedeiro. O resultado, não-intencional, mas perigoso, deste esforço para isolar e conter os microrganismos infecciosos, é o potencial para ruptura desses abscessos maduros. A ruptura de um abscesso inicia a entrada de bactérias já preparadas para lidar com as tensões de um sistema imune ativo do hospedeiro, em uma cavidade do corpo normalmente estéril, o que, muitas vezes, resulta em bacteremia, infecção disseminada e sepse (CAO *et al.*, 2014).

*B. fragilis* é capaz de persistir tanto no ambiente oxidante fora do intestino como dentro do abscesso, onde as células do sistema imunológico do hospedeiro estão produzindo espécies reativas de oxigênio e outros compostos antimicrobianos para combater a infecção. Esta capacidade requer um sistema altamente controlado e coordenado, envolvendo a regulação de vários genes, a fim de funcionar

eficazmente. *B.fragilis* possui estes mecanismos robustos de sobrevivência e virulência, sendo um ótimo representante do conceito “microrganismo anfíbio” (MAZMANIAN *et al.*, 2013).

O tratamento de pacientes com infecções associadas a bactérias anaeróbias requer terapia específica. Como, frequentemente, os quadros são de etiologia polimicrobiana, o tratamento também deve ser direcionado a outros microrganismos, em especial, anaeróbios facultativos. Amostras de *B. fragilis* podem produzir  $\beta$ -lactamases e são, frequentemente, resistentes à antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, inclusive cefalosporinas de terceira geração. O metronidazol tem uma boa atividade contra *B. fragilis* e é a terapia de escolha devido à sua excelente penetração em diferentes tecidos, como o sistema nervoso central e abscessos (JANDHYALA *et al.*, 2015; BROOK, 2016).

### 1.3 ANTAGONISMO BACTERIANO: BACTERIOCINAS

As várias espécies que compõem as comunidades microbianas são envolvidas em todas as formas de competição, seja por recursos nutricionais ou espaço. Para superar seus adversários, os microrganismos usam todos os seus recursos, incluindo metabólitos secundários, enzimas e antibióticos. As competições entre bactérias, arqueas, fungos e protozoários são, muitas vezes, resolvidas pela síntese de peptídios antimicrobianos (BERNSTEIN *et al.*, 2015).

Dentre as principais substâncias antagonistas expressas por bactérias e arqueas estão as bacteriocinas, grupo heterogêneo de compostos antibacterianos de natureza peptídica, produzidas por Bacteria e Archaea, que variam em seu espectro de atividade, modo de ação, massa molecular, determinantes genéticos e características bioquímicas. São substâncias que se ligam a receptores específicos e podem apresentar ação bactericida ou bacteriostática (DOBSON *et al.*, 2012; SONOMOTO *et al.*, 2012).

A corrida evolucionária desempenha um papel importante na formação da diversidade biológica. A produção de bacteriocinas, substâncias de espectro de

ação estreito, possibilita a eliminação de amostras relacionadas, através da formação de poros na membrana de seu alvo ou através da degradação do RNA ou DNA (MAJEED *et al.*, 2013). No trabalho realizado por Majeed *et al.* (2013), foi trabalhada a hipótese de que a produção de substâncias inibidoras poderia afetar as interações entre os produtores de tais substâncias. Os pesquisadores sugerem que exista uma concorrência entre os produtores, que seria determinada pela potência da substância produzida. Os estudos descrevem a exclusão competitiva de linhagens sensíveis a bacteriocinas pelos produtores de tais substâncias e mostram que a dinâmica entre amostras produtoras e suscetíveis é, em grande parte, desconhecida.

A produção de bacteriocinas é considerada uma característica importante na seleção de amostras probióticas, mas, até recentemente, poucos estudos demonstraram o impacto da produção de bacteriocinas como vantagem competitiva em comunidades microbianas complexas. No intestino, as bacteriocinas podem facilitar a introdução da amostra produtora em determinado *habitat*, dificultar ou impedir o estabelecimento de patógenos, modular a composição da microbiota e influenciar o sistema imune do hospedeiro (DOBSON *et al.*, 2012).

As bacteriocinas podem ser agrupadas em duas categorias, bacteriocinas proteínas e bacteriocinas peptídios. As bacteriocinas proteínas são produzidas, principalmente, por bactérias Gram negativas, em especial, por enterobactérias. Por outro lado, as bacteriocinas peptídios são mais frequentemente sintetizadas por bactérias Gram positivas, entre elas, bactérias ácido-láticas (DESRIAC *et al.*, 2010).

Dentre as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram negativas, as colicinas e as microcinas produzidas por *E. coli* são as mais estudadas. As microcinas são peptídios pequenos, enquanto as colicinas são proteínas relativamente grandes (Riley & Wertz, 2002). Os genes que codificam colicinas são plasmidiais e as amostras produtoras albergam, também, os genes responsáveis pela síntese da proteína que confere imunidade específica à colicina e da proteína envolvida na

liberação da substância pela célula. A produção de colicina é mediada pelo sistema SOS *regulon* e, por esta razão, ocorre, principalmente, em condições de estresse. A substância é de biossíntese letal. Dentre os três domínios da cadeia peptídica da colicina, um se interage especificamente ao receptor na superfície celular, determinando assim, o alvo de reconhecimento. Esta forma específica de reconhecimento propicia uma faixa filogenética relativamente estreita de antagonismo, o que, como já mencionado, é referido para as bacteriocinas (CASCALES *et al.*, 2007).

As bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram positivas mais conhecidas e investigadas são aquelas produzidas por bactérias ácido-láticas. Estas substâncias são usadas na conservação de alimentos há muitos anos. A síntese de bacteriocinas por bactérias Gram positivas não é necessariamente letal; algumas delas possuem um sistema de transporte específico e, além disto, são, em sua maioria, pequenos peptídios (SONOMOTO *et al.*, 2012).

### 1.3.1 BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS ANAERÓBICAS

Com referência a substâncias antagonistas produzidas por outras bactérias anaeróbicas, em 1965, segundo Nakamura *et al.* (1981), uma substância tipo bacteriocina, denominada melaninocina, foi extraída de uma amostra de *Prevotella melaninogenica*, por tratamento ultrassônico, e purificada. A melaninocina exibia massa molecular de cerca de 105 kDa, sensibilidade a temperaturas elevadas e a várias enzimas proteolíticas. Apresentava capacidade de inibição de microrganismos indígenas da cavidade oral como *Bacteroides*, *Actinomyces* e *Streptococcus*.

Em estudo realizado por Oliveira *et al.* (1998), um total de 167 amostras de *Fusobacterium*, sendo 70 amostras isoladas a partir da cavidade oral de pacientes com doença periodontal, 47 recuperadas da cavidade oral de seres humanos com periodonto saudável e 50 da cavidade oral de *C. penicillata*, foram testadas para avaliação da produção de bacteriocinas. Observou-se a ocorrência dos fenômenos

de autoantagonismo (quando há inibição da amostra do mesmo clone da produtora), isoantagonismo (quando há inibição de amostras da mesma espécie porém de clones diferentes) e heteroantagonismo (quando há inibição de amostras de outras espécies, mais frequentemente filogeneticamente relacionadas a produtora), o que sugere papel ecológico relevante da(s) substância(s) no ambiente oral (OLIVEIRA *et al.*, 1998).

Kaewsrichan e colaboradores (2004) conduziram estudo para avaliar a atividade antimicrobiana expressa por *Prevotella nigrescens* ATCC 25261. A purificação do composto ativo foi conseguida por precipitação com sulfato de amônio seguida por cromatografia de troca iônica e cromatografia de gel filtração. Conforme revelado por SDS-PAGE, a fração ativa mostrou uma proteína com massa molecular aproximada de 41 kDa. O composto antimicrobiano, denominado nigrescina, exibiu um modo de ação bactericida contra *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Actinomyces spp.* A nigrescina manteve-se estável após tratamento com ampla gama de pH e temperaturas elevadas. Sua atividade foi perdida após exposição à proteinase K. Mesmo elevando a concentrações muito acima da concentração inibitória mínima, a nigrescina não era tóxica para fibroblastos gengivais. Os autores descreveram a nigrescina como uma nova bacteriocina, ativa contra espécies implicadas em doenças periodontais e atóxica para fibroblastos gengivais, sugerindo a possibilidade de uso da substância no tratamento periodontal, como agente antimicrobiano.

Em 2008, Vieira detectou a produção de substância(s) antagonista(s) por *Fusobacterium necrophorum* ATCC 25286. Das 14 amostras empregadas como reveladoras da atividade antagonista testadas pela autora, *Fusobacterium nucleatum*, *P. intermedia*, *Porphyromonas gingivallis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Streptococcus mutans*, *Eubacterium lentum*, *Actinomyces israeli*, *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus aureus* foram sensíveis. *F. necrophorum* e *Streptococcus sobrinus* não demonstraram suscetibilidade em nenhuma das condições testadas, enquanto *S. sanguinis* e *Streptococcus uberis* apresentaram sensibilidade apenas em determinadas condições experimentais. Observou-se que as frações intracelulares



precipitadas com 50% (C50) e 80% (C80) de sulfato de amônio mantiveram sua atividade nos valores de pH 7,0 a 9,0 e 5,0 a 9,0, respectivamente. Em relação ao tratamento térmico, C50 mostrou-se mais instável que C80. Após o tratamento com proteases, a atividade foi perdida. A massa molecular da substância detectada foi estimada entre 37 e 50 kDa, conforme atividade *in situ* contra *P. anaerobius*.

Em 2011, estudos realizados por Valeff conseguiram demonstrar a produção de substância(s) antagonista(s) por *F. necrophorum* ativas contra bactérias de outras espécies, bem como a natureza proteica de tais substâncias. O extrato intracelular, precipitado com sulfato de amônio à saturação de 50% (C50), obtido a partir de cultura de *F. necrophorum* ATCC 25286, foi capaz de matar a amostra reveladora *P. anaerobius*. A atividade foi completamente perdida quando C50 foi submetido à temperatura igual ou superior a 45°C e quando exposto a proteases. O extrato manteve-se estável em uma ampla faixa de valores de pH (6 a 11) e quando incubado junto a solventes orgânicos, sua atividade antibacteriana foi quase completamente perdida após tratamento com EDTA e recuperada com o acréscimo de zinco. A concentração inibitória mínima de C50 para *P. anaerobius* foi 6,25 UA/mL, coincidindo com a concentração bactericida mínima. Em 30 min, todas as células bacterianas de *P. anaerobius* estavam mortas. A tentativa de purificação da substância antagonista foi realizada com fracionamento por precipitação com sulfato de amônio à saturação de 50%, cromatografia de troca iônica, seguida por exclusão e, finalmente, por fase reversa. Entretanto, a purificação não foi alcançada.

Em estudo realizado com 190 amostras de *F. nucleatum*, 159 (83,77%) amostras expressaram atividade auto-, isso- e heteroantagonista, inibindo ampla gama de amostras reveladoras. As frações intracelulares obtidas a 50% (C50) e 80% (C80) de saturação de sulfato de amônio apresentaram atividade antagonista. A atividade antagonista de C50 mostrou-se instável e o título de bacteriocina desta fração foi de 200 UA. O título de bacteriocina de C80 foi de 800 UA. A atividade foi completamente perdida após o tratamento a temperaturas superiores a 50 °C e com todas as enzimas proteolíticas testadas. Após cromatografia de gel filtração,

as frações ativas foram submetidas à cromatografia de troca iônica e a atividade foi detectada em duas frações. As frações ativas foram, individualmente, submetidas a HPLC e verificou-se atividade antagonista para as duas frações. C50, C80 e a fração ativa recolhida a partir da cromatografia de gel filtração foram submetidos a SDS-PAGE, observando-se bandas de até 150 kDa. No perfil eletroforético gerado por frações obtidas por cromatografia de troca iônica, foi visualizada uma banda mais intensa, com massa molecular entre 35 e 25 kDa. Como a concentração das frações ativas obtidas a partir de HPLC era pequena, decidiu-se não submeter estas frações a SDS-PAGE, mas sim à espectrometria de massa. A análise por espectrometria de massa revelou que a massa molecular da proteína obtida após a última etapa de purificação era de 27,296 kDa (RIBEIRO-RIBAS *et al.*, 2009).

### 1.3.2 SUBSTÂNCIAS ANTAGONISTAS PRODUZIDAS POR *Bacteroides*

*B. fragilis* é membro da microbiota intestinal de seres humanos e está envolvido em uma variedade de atividades que influenciam a saúde do hospedeiro, como digestão polissacarídica, desenvolvimento e maturação do intestino e modulação da resposta imune. Em adição ao seu papel benéfico, *B. fragilis*, como discutido anteriormente, é um anfíbio clássico, sendo agente patogênico oportunista associado a diversas doenças infecciosas que envolvem anaeróbios (WILSON *et al.*, 2015).

O estudo das moléculas de superfície celular produzidas por *B. fragilis* tem merecido destaque, porque, provavelmente, desempenham um papel importante na colonização, persistência e comunicação com outros microrganismos. Os componentes da membrana externa e o proteoma de *B. fragilis* incluem componentes, ainda não bem caracterizados, que são utilizados para o transporte de polipeptídios para o espaço extracelular (WILSON *et al.*, 2015).

Em 1965, Beerens & Baron descreveram, pela primeira vez, uma bacteriocina sintetizada por *Bacteroides*, mas, estudos mais detalhados não foram realizados. Até 1983, poucos trabalhos foram publicados, como o de Booth e colaboradores (1977), que descreveram uma bacteriocina com massa molecular superior a 300 kDa, produzida por *Bacteroides*, e o de Mossie *et al.* (1979), que purificaram uma bacteriocina produzida por *B. fragilis*, com massa molecular entre 13 e 19 kDa. Em 1981, Mossie e colaboradores descreveram a purificação e caracterização de uma outra bacteriocina produzida por *B. fragilis* e demonstraram sua capacidade de interferir na síntese de RNA bacteriano, inibindo a atividade da RNA polimerase.

Em 1983, Hayes *et al.* purificaram e caracterizaram uma bacteriocina produzida por *B. fragilis*, com atividade espécie-específica. A bacteriocina foi encontrada, na fase inicial de purificação, como um complexo com massa molecular superior a  $2 \times 10^7$  Da, contendo proteína, lipídio e carboidrato. A dissociação deste complexo permitiu a purificação da bacteriocina, com massa molecular de 5 kDa. A atividade da bacteriocina estudada não foi alterada por RNase, DNase, fosfolipase A, lipase pancreática e dextranase, mas foi perdida após tratamento com tripsina, proteinase K, calor (80°C, 30 min) e valores de pH inferior a 5 e superior a 8.

Avelar *et al.* (1999) avaliaram a capacidade de produção de bacteriocinas por amostras de *B. fragilis* isoladas de seres humanos com infecções intra-abdominais, infecções de tecidos moles, bacteremia, otite média e doença diarreica, de outros animais com diarreia, de ambientes aquáticos (água poluída) e da microbiota fecal de seres humanos. Todas as amostras isoladas de infecções intestinais exibiram capacidade de sintetizar bacteriocinas e pouca sensibilidade a substâncias produzidas por amostras de outras fontes. Por outro lado, as amostras obtidas de pacientes com infecções intra-abdominais e bacteremia não produziram bacteriocinas e eram sensíveis à maioria das substâncias produzidas pelas amostras de outras fontes.

Trabalhos sobre a produção de bacteriocinas por *Bacteroides* também vêm sendo realizados no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios. Em 1992, Farias e colaboradores relataram a habilidade de produção de substâncias tipo

bacteriocina por amostras do grupo *B. fragilis* isoladas da cavidade oral e intestino de saguis. Farias *et al.* (1994) apontaram a produção de uma ou mais substâncias de natureza proteica com atividade antagonista por amostras de *B. fragilis* recuperadas de primatas da espécie *Callithrix penicillata*. A bacteriocina apresentava atividade iso e heteroantagonista. Os extratos extracelular (S70) e intracelular (C70) apresentaram atividade contra amostras de *B. fragilis* isoladas do intestino de calitriquídeos e também contra amostras de referência de *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus pyogenes*.

Em outro estudo, conduzido por Miranda *et al.* (1993), 50 amostras do grupo *B. fragilis* foram isoladas a partir de amostras fecais e 41 delas expressaram antagonismo contra, pelo menos, uma amostra reveladora. Neste estudo, foram observados os fenômenos de iso-, auto- e heteroantagonismo. Uma nova bacteriocina produzida por amostra de *B. ovatus* isolada a partir de fezes de seres humanos foi parcialmente purificada através de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, gel filtração e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A bacteriocina apresentou estabilidade a uma faixa de pH de 3-10, a 60 °C, durante 24 h, e a -70 °C, durante 6 meses e foi inativada por enzimas proteolíticas. A massa molecular, estimada por SDS-PAGE, foi de 78 kDa (MIRANDA *et al.*, 1993).

### 1.3.3 A INFLUÊNCIA DOS COMPOSTOS ANTAGÔNICOS NAS RELAÇÕES INTERMICROBIANAS

O ecossistema microbiano do intestino de seres humanos apresenta fatores e mecanismos de antagonismo por membros predominantes e estes mecanismos estão apenas começando a ser descritos, assim como os modelos prevendo a relevância destas interações competitivas para a comunidade microbiana. Bacteroidales é a ordem mais abundante entre bactérias na microbiota do cólon humano e também a mais estável temporalmente. O fato de que numerosas espécies de *Bacteroides* colonizam, de forma estável, o intestino de seres

humanos em altas densidades levanta a questão de como estes organismos interagem para promover ou limitar os demais. Coyne *et al.* (2016) mostraram que amostras corresidentes de *Bacteroides* interagem intimamente umas com as outras, trocam grandes quantidades de DNA e também cooperam na utilização de polissacárides alimentares. Atualmente, dois tipos de sistemas antagônicos têm sido relatados em espécies de *Bacteroides* do intestino, quais sejam, as proteínas antimicrobianas e o SST6 (sistema de secreção tipo VI). No entanto, nenhum destes processos antagônicos foi totalmente elucidado para determinar como eles fornecem uma vantagem competitiva no intestino dos mamíferos (CHATZIDAKI-LIVANIS *et al.*, 2016).

A secreção de proteínas é necessária para numerosos aspectos no ciclo de vida das bactérias, como biogênese de organelas, aquisição de nutrientes e expressão de fatores de virulência como toxinas, efetores translocados e adesinas. A secreção através da membrana externa representa um problema, pois as proteínas, no espaço periplasmático, adquirem nova conformação (como pontes dissulfeto), e na membrana externa não se conhece fonte de energia ou ATP para o sistema. O SST6 foi descoberto por análises *in silico* e foi, primeiramente, denominado, em *Vibrio cholerae*, como VAS (*virulence associated secretion*). O *cluster* de genes altamente conservado entre algumas espécies bacterianas relacionado a esse sistema de secreção não apresenta homologia com os genes dos sistemas anteriormente descritos, por isso foi denominado SST6. O SST6 secreta uma ou mais proteínas diretamente no citosol da célula alvo ou da célula eucariótica, por meio do contato célula-célula. Os componentes que fazem a passagem da membrana interna, periplasma e membrana externa permanecem desconhecidos, assim como detalhes da estrutura, localização e função das proteínas que fazem parte do SST6 (COYNE *et al.*, 2016).

Dois mecanismos de concorrência são destaque em comunidades bacterianas: a concorrência por nichos, onde os membros competem por nutrientes e recursos compartilhados, e a competição por interferência, em que um membro prejudica diretamente um concorrente, muitas vezes, por meio da produção de uma substância antimicrobiana. A concorrência por nichos é, provavelmente, um dos

fatores ecológicos mais importantes para determinar quais membros colonizam o intestino de mamíferos de forma estável. Quando este tipo de competição é muito expressiva, é provável que a competição por interferência seja muito importante para proporcionar uma vantagem para um membro antagonizar o seu concorrente. Várias substâncias antimicrobianas produzidas por bactérias têm sido estudadas no ecossistema intestinal, incluindo aquelas que necessitam do contato célula-célula, tais como SST6, e aquelas que são ativamente secretadas por bactérias, tais como metabólitos inibitórios, bacteriocinas e proteínas antimicrobianas (CHATZIDAKI-LIVANIS *et al.*, 2014; CHATZIDAKI-LIVANIS *et al.*, 2016; WEXLER *et al.*, 2016).

Para sua sobrevivência e permanência, as bactérias devem desenvolver mecanismos competitivos adicionais para adquirir e defender o território. Espécies bacterianas com adaptações metabólicas semelhantes vão competir pelos mesmos microambientes favoráveis distribuídos de forma heterogênea, inibindo ou matando concorrentes, assim evitando a invasão em seus territórios, por meio da interferência bacteriana, quando produzem substâncias antagonistas que se difundem no ambiente, tais como toxinas ou antibióticos que criam zonas inóspitas para os concorrentes (STUBBENDIECK *et al.*, 2016).

Especificamente no intestino, a produção de bacteriocina pode contribuir em três diferentes mecanismos, em primeiro lugar, como peptídios de colonização, ajudando na sobrevivência das amostras produtoras, reduzindo a tensão no ambiente intestinal, em segundo lugar através da inibição direta do crescimento de patógenos e finalmente, as bacteriocinas podem agir como peptídios sinalizadores, participando do *quorum sensing* no equilíbrio da microbiota intestinal. No entanto, embora a produção de bacteriocinas é geralmente associada a um perfil probiótico, que é uma característica desejável, o verdadeiro potencial destes peptídios para a saúde do hospedeiro, principalmente influenciando na microbiota intestinal, na verdade ainda é algo desconhecido e que ainda têm de ser elucidado (COTTER *et al.*, 2016).

Estudos que visam investigar a expressão de atividade antagonista e caracterizar as substâncias envolvidas no fenômeno propiciam um melhor entendimento das relações ecológicas microbianas, bem como o surgimento de novas perspectivas quanto ao emprego de bactérias produtoras de substâncias antagonistas.

#### 1.3.4 APLICAÇÃO DE BACTERIOCINAS

Nas últimas décadas, as bacteriocinas têm sido foco de interesse científico considerável, mas são relativamente subutilizadas pela indústria alimentícia, veterinária e médica. Uma das formas de superar este problema é por meio de uma melhor compreensão de como estas proteínas funcionam, quais são seus receptores e sistemas de transporte, para que, subsequentemente, as informações possam ser aplicadas para melhorar a potência e o valor comercial das bacteriocinas. Assim, os avanços nos estudos sobre as bacteriocinas, assim como nos mecanismos de ação, podem levar a um aumento das possibilidades de aplicação das substâncias, atraindo cada vez mais o interesse da comunidade científica e empresarial (COTTER, 2014).

Atualmente, existe uma grande necessidade em se preservar os alimentos, devido tanto ao aumento da crescente demanda para prolongar a vida de prateleira como para prevenção da deterioração por microrganismos. Com o surgimento de novos agentes patogênicos, a exploração de novos caminhos para a preservação de alimentos ganhou importância. Além disso, a consciência entre os consumidores dos efeitos nocivos dos agentes químicos usados como conservantes tem aumentado. Globalmente, há um aumento crescente na demanda dos consumidores por alimentos processados sem ou com mínimo uso de produtos químicos (BALI *et al.*, 2014).

As bacteriocinas podem ser usadas como conservantes naturais dos alimentos, permitindo a preservação das características organolépticas e nutricionais dos mesmos, agindo de forma a minimizar ou impedir a multiplicação de

microrganismos que comprometam a saúde humana e reduzam a vida útil dos alimentos. Além disto, o emprego de bacteriocinas permite a redução da utilização de conservantes artificiais, que trazem inúmeros malefícios à saúde. O potencial das bacteriocinas e sua aplicação na redução de microrganismos e na preservação dos alimentos vêm sendo cada vez mais reconhecido (ABDEL-MOHSEIN *et al.*, 2010; BALI *et al.*, 2014).

Em 1928, Rogers *et al.* evidenciaram a capacidade de linhagens de *Lactococcus* inibir outras bactérias lácticas. Então, em 1947, Mattick e Hirsch conseguiram isolar uma substância antagonista produzida por uma linhagem de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* que apresentava um amplo espectro de atividade, denominada nisina. Em 1953, quando foi considerada segura para utilização em alimentos, sua comercialização na Inglaterra foi liberada. A partir daí, em 1983, na Europa, foi incluída na lista de aditivos alimentares e, em 1988, nos EUA, o FDA (*Food and Drug Administration*) autorizou seu uso em queijos processados. A nisina é atualmente considerada GRAS (*Generally Regarded as Safe*), status conferido pelo órgão norte-americano FDA. Apesar de esta bacteriocina ser extensivamente empregada na preservação de alimentos, sua atividade ainda é pobre contra vários microrganismos patogênicos, o que indica a necessidade de pesquisa de outras bacteriocinas com potencial para este tipo de aplicação (COTTER *et al.*, 2012; COTTER, 2014).

No entanto, apesar destas vantagens promissoras, nisina continua sendo a única bacteriocina considerada GRAS pelo FDA, dentre as várias que, atualmente, são usadas como conservantes de alimentos em diferentes países. As limitações para disponibilizar as bacteriocinas no mercado estão relacionadas a vários fatores, incluindo o alto custo da produção comercial, a perda da sua atividade por enzimas proteolíticas, suas interações com os alimentos, o que diminui a disponibilidade e necessita de uma enorme quantidade de peptídeo a ser adicionado, as alterações químicas e físicas destes compostos durante os vários estágios de processamento dos alimentos e o baixo rendimento devido à recuperação ineficaz pelos métodos tradicionais de purificação. Nos últimos anos, vários estudos sobre bacteriocinas demonstraram que a otimização da sua



produção e métodos de purificação e as combinações com outros agentes antimicrobianos, além do emprego de novas tecnologias para a transposição de obstáculos, pode facilitar os estudos na área, favorecendo a aplicação comercial das substâncias (WOLSKA *et al.*, 2012; SARANIYA & JEEVARATNAM, 2014; FAHIM *et al.*, 2016 ).

No que se refere à indústria farmacêutica, as bacteriocinas podem, potencialmente, substituir os antibióticos, agentes antimicrobianos clássicos, utilizados no tratamento de indivíduos com doenças infecciosas. Estas drogas possuem efeitos indesejados, como o desequilíbrio da microbiota residente, aumentando a suscetibilidade do indivíduo a doenças infecciosas, e a seleção de amostras resistentes, favorecendo a disseminação da resistência a antimicrobianos. O espectro de ação reduzido é uma das principais diferenças entre bacteriocinas e drogas antimicrobianas clássicas. Desta forma, o emprego de bacteriocinas, que, habitualmente, possuem espectro reduzido de atividade, permitiria um tratamento mais específico e aumentaria a variedade de drogas disponíveis, reduzindo o número de microrganismos resistentes (RILEY & WERTZ, 2002). Além disso, as bacteriocinas estimulam o sistema imune do hospedeiro, agindo, mais frequentemente, sobre a membrana celular bacteriana. Em contrapartida, os antimicrobianos convencionais são metabólitos secundários, não estimulam o sistema imune do hospedeiro, apresentam espectro de ação variável e, acima de tudo, apresentam toxicidade elevada (CLEVELAND *et al.*, 2001). Estudos que visem à caracterização de bacteriocinas são fundamentais para sua aplicação como novos antimicrobianos. O conhecimento adquirido pode ser explorado por “engenheiros de bacteriocinas”, que criam ou projetam novos peptídios com ação potente contra patógenos específicos (COTTER, 2014).

De acordo com Fahim e colaboradores, enquanto os cientistas estão à procura de estratégias eficientes para superar as limitações das bacteriocinas, o uso da nanotecnologia é uma potente abordagem para maximizar o uso desses peptídios e elucidar as aplicações atuais no melhoramento das propriedades e da atividade antimicrobiana das bacteriocinas. A nanotecnologia é a manipulação de materiais

e estruturas funcionais em nanoescalas (KLAESSIG *et al.*, 2011). Esta tecnologia tem aplicações em diversos campos da ciência, devido às características únicas das nanopartículas sintetizadas. A integração da nanotecnologia e da biotecnologia supera a limitação de oportunidades e abre as portas para perspectivas futuras em resolver problemas que pertencem a uma gama de produtos biológicos, como a proteção contra degradação, além de melhorar a concentração da droga disponível, potencializando as propriedades físico-químicas que podem ser alcançadas. As bacteriocinas podem se beneficiar de tal combinação. Por exemplo, a nanoencapsulação, destinada ao uso de bacteriocinas como bioconservadores, poderia proteger da degradação por enzimas proteolíticas, além de evitar interações indesejáveis com outros componentes dos alimentos e, conseqüentemente, aumentando a sua estabilidade por períodos mais longos (BRANDELLI, 2012). Além disso, alguns estudos recentes têm demonstrado que a encapsulação de bacteriocinas em nanopartículas têm melhorado a atividade destes peptídios contra microrganismos e bactérias multirresistentes em alimentos contaminados (MOSSALLAM *et al.*, 2014.). Ainda, o uso de materiais e ou métodos baseados em nanotecnologia tem, na maioria dos casos, mostrado um impacto positivo no rendimento do processo, facilitando, assim, sua produção comercial (ZACHAROF *et al.*, 2013; FAHIM *et al.*, 2016).

## 2 JUSTIFICATIVA

---

Os gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* incluem organismos anaeróbios obrigatórios, membros da microbiota indígena de seres humanos e de outros animais. São bactérias clinicamente relevantes, objetos de estudo de muitos pesquisadores. Bacteriocinas são substâncias antagonistas de natureza protéica, ativas, especialmente, contra amostras taxonomicamente relacionadas, produzidas por uma ampla gama de bactérias. A síntese de fatores antagônicos, já descrita para *Bacteroides*, vem sendo investigada em nosso Laboratório. Diversos estudos têm demonstrado a relação entre produção de substâncias antagonistas e predominância da bactéria na composição de comunidades microbianas. Acredita-se que amostras que expressam tais substâncias apresentam vantagem seletiva sobre as demais, especialmente entre microrganismos taxonomicamente afins, por possuírem características bioquímicas e fisiológicas semelhantes, quando na disputa por *habitats* e nichos ecológicos em ambientes densamente colonizados. As bacteriocinas são de grande relevância para a indústria. Na indústria alimentícia, elas exercem uma importante função na conservação natural de alimentos e, na indústria farmacêutica, podem servir como antibióticos naturais de espectro reduzido, diminuindo a seleção de microrganismos resistentes. Inúmeras publicações relatam a produção de substâncias antagonistas por bactérias anaeróbias facultativas, mas, ainda são poucos os trabalhos relacionados a bactérias anaeróbias obrigatórias. No que se refere aos gêneros *Bacteroides*, poucos estudos foram publicados sobre purificação e caracterização de substâncias antagonistas. Tais estudos são fundamentais para a identificação de novas proteínas, contribuindo para o conhecimento referente aos microrganismos, inclusive relativo à patogenicidade dos mesmos, bem como para a possibilidade de detecção de substâncias com potencial de aplicação biotecnológico. Os experimentos iniciais deste tipo de investigação devem incluir a avaliação da expressão de antagonismo (*screening*) e, posteriormente, a caracterização das substâncias antagonistas detectadas, incluindo a determinação da massa molecular e o sequenciamento destas substâncias. Assim, considerando a

relevância de *Bacteroides* e *Parabacteroides*, a escassez de estudos relativos à substâncias antagonistas sintetizadas por estes organismos e à importância crescente que tem sido atribuída a estas substâncias, conduzimos esta investigação, com a meta de contribuir para o conhecimento relativo a substâncias antagonistas, em especial produzidas por bactérias anaeróbias, bem como fornecer dados relativos às habilidades de patogenicidade de *Bacteroides* e *Parabacteroides*. Os dados gerados ajudam a esclarecer relações interbacterianas que envolvem estes grupos microbianos e a caracterizar, do ponto de vista bioquímico-molecular, uma das substâncias antagonistas detectadas, aumentando a compreensão relativa à relevância ecológica destas substâncias, avaliada em um ambiente complexo como o de uma infecção intra-abdominal.

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de antagonismo por amostras dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* isoladas de pacientes com infecções intra-abdominais e caracterizar uma das substâncias antagonistas detectadas.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar a expressão de atividade antagonista por amostras de *Bacteroides* e *Parabacteroides* isoladas de pacientes com infecção intra-abdominal contra um amplo painel de bactérias reveladoras.
- Avaliar a influência das condições de cultivo (composição do meio de cultura e condições de incubação) na expressão do antagonismo.
- Avaliar a natureza do antagonismo, investigando a possível interferência pela ação de bacteriófagos, ácidos graxos e outros ácidos, clorofórmio e peróxido de hidrogênio.
- Extrair, purificar e caracterizar a substância antagonista detectada.
- Estimar a massa molecular da(s) substância(s) antagonista(s) presente(s) no extrato bruto e em frações parcialmente purificadas por *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) e revelação *in situ*.
- Avaliar o modo de ação do extrato ativo determinando a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima da substância antagonista.
- Determinar a massa molecular da substância antimicrobiana purificada por espectrometria de massas.

- Determinar a sequência de aminoácidos da substância antimicrobiana purificada.

### 4.1 ORIGEM E MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Para avaliação da expressão de antagonismo, foram incluídas no estudo 30 amostras do gênero *Bacteroides* [*B. fragilis* (n = 11), *B. ovatus* (n = 5), *B. thetaiotaomicron* (n = 1), *B. uniformis* (n = 3), *B. vulgatus* (n = 1), *B. caccae* (n = 6), *B. capillosus* (n = 2), *B. eggherthii* (n = 1)] e 10 amostras de *Parabacteroides distasonis*, denominadas amostras teste, isoladas de pacientes com infecções intra-abdominais. Como reveladoras, foram empregadas, além das próprias amostras teste, um painel de amostras de referência de bactérias Gram positivas e Gram negativas com diferentes tipos respiratórios (QUADRO 1). Todas as amostras fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios e vêm sendo mantidas em *Brucella Broth* acrescido de glicerol 10% em freezer -80 °C.

### 4.2 PESQUISA DE ATIVIDADE ANTAGONISTA

A expressão de antagonismo foi avaliada pelo método de difusão em sobrecamada (BOOTH *et al.*, 1977). Inicialmente, as amostras teste foram inoculadas em *Brain Heart Infusion*, pH 7,2, suplementado com hemina suína 0,5%, menadiona 0,1% e extrato de levedura 0,5% (BHI-S). O cultivo foi realizado em câmara anaeróbica, com atmosfera de N<sub>2</sub> 85%, CO<sub>2</sub> 5% e H<sub>2</sub> 10%, a 37 °C. Após 48 h, as amostras foram inoculadas em *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) suplementado com hemina suína 0,5%, menadiona 0,1% e extrato de levedura 0,5% (BHIA-S), com o auxílio de replicador de Steers (STEERS *et al.*, 1959), em concentração de, aproximadamente, 10<sup>5</sup> células/spot. Após incubação nas mesmas condições descritas anteriormente, as culturas foram expostas ao vapor de clorofórmio por 30 min e, em seguida, as placas foram mantidas entreabertas, por 30 min, para evaporação do clorofórmio residual.

As amostras reveladoras foram cultivadas em meio líquido e, então, uma alíquota de 0,2 mL da cultura foi inoculada em 3,5 mL de meio semissólido (0,7% de ágar). A seguir, a mistura foi vertida sobre os *spots* da amostra teste. Após incubação a 37 °C, a leitura foi realizada, verificando-se a presença ou ausência de halos de inibição da amostra reveladora. O experimento foi realizado em duplicata. Para cada amostra reveladora a ser testada, foram empregadas condições de cultivo (meio de cultura, tempo e atmosfera de incubação) específicas (QUADRO 1).

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA EXPRESSÃO DO ANTAGONISMO

A partir deste ponto, foram selecionadas uma amostra produtora e uma amostra reveladora, para emprego nas etapas subsequentes do estudo. As amostras selecionadas foram aquelas para as quais foram observados os halos de inibição mais límpidos no teste de atividade antagonista.

Para avaliar a influência das condições de cultivo na expressão do antagonismo, os testes foram realizados como descrito no item 4.2, porém, empregando-se diferentes meios de cultura (composição e valores de pH). Quanto à composição, foram utilizados os meios BHIA, *Tryptic Soy Agar* (TSA) e *Brucella Agar* (BA) e os suplementos extrato de levedura, hemina e menadiona. Os valores de pH testados foram 5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10; 10,5; 11; 11,5 e 12. A incubação foi realizada por um período de 48 h à temperatura de 37 °C (QUADRO 2).



**QUADRO 1. Amostras empregadas como reveladoras para avaliação de atividade antagonista**

Amostras reveladoras	Condições de cultivo	
	Meios de cultivo	Condições de incubação
<p> <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 + 10<sup>a</sup>  <i>Bacteroides ovatus</i> ATCC 8483 + 4<sup>a</sup>  <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741  <i>Bacteroides uniformis</i> ATCC 8492 + 2<sup>a</sup>  <i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482  <i>Bacteroides caccae</i> ATCC 43185 + 5<sup>a</sup>  <i>Bacteroides capillosus</i> (2<sup>a</sup>)  <i>Bacteroides eggherthii</i> ATCC 27754  <i>Parabacteroides distasonis</i> ATCC 1295 + 9  <i>Aggregatibacter actinomycetencomitans</i> FDC Y4  <i>Eubacterium lentum</i> ATCC 25559  <i>Porphyromonas gingivalis</i> FDC 381  <i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611  <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337  <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919  <i>Actinomyces israeli</i> ATCC 12102  <i>Actinomyces odontoliticus</i> ATCC 17929  <i>Actinomyces georgeae</i> ATCC 49286  <i>Gemela haemoliticus</i> ATCC 14157  <i>Bifidobacterium brevis</i> ATCC 15700  <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707    <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175  <i>Streptococcus uberis</i> ATCC 9927  <i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10557  <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386  <i>Streptococcus oralis</i> ATCC 35037  <i>Streptococcus gordonii</i> ATCC 10558  <i>Streptococcus parasanguinis</i> ATCC 15912  <i>Streptococcus anginosus</i> ATCC 33397  <i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456  <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615  <i>Campylobacter gracilis</i> ATCC 3236  <i>Campylobacter rectus</i> ATCC 371  <i>Campylobacter ochracea</i> ATCC 27872  <i>Campylobacter showae</i> ATCC 51146  <i>Eikenella corrodens</i> ATCC 23834    <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433  <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29313  <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990  <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922  <i>Escherichia coli</i> K12 Row  <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853  <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933  <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium ATCC 14028  <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076  <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022  <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 49131  <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090  <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048  <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355  <i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100                 </p>	<p>                     BHIA-S/E<sup>b</sup>                          TSA-E<sup>c</sup>                          TSA                 </p>	<p>                     37 °C, 48 h, anaerobiose<sup>d</sup>                          37 °C, 24 h, microaerofilia<sup>e</sup>                          37 °C, 24 h, aerobiose                 </p>

<sup>a</sup>, número de amostras clínicas; <sup>b</sup>, Brain Heart Infusion Agar suplementado com extrato de levedura 0,5%, hemina 5 µg/mL, menadiona 1 µg/mL, sangue de cavalo 5% (v/v); <sup>c</sup>, Tryptic Soy Agar suplementado com sangue de carneiro 5%; <sup>d</sup>, jarra de anaerobiose, método mecânico (90% N<sub>2</sub> e 10% CO<sub>2</sub>); <sup>e</sup>, jarra de anaerobiose, método da vela.

QUADRO 2. Condições de cultivo empregadas para avaliação da expressão de antagonismo pela amostra de *Bacteroides fragilis* D111.4

Teste	Meio de cultura			Suplemento		
	BHI <sup>1</sup>	TSA <sup>2</sup>	BRU <sup>3</sup>	EL <sup>4</sup>	Hemina	Menadiona
1	X					
2	X			X		
3	X			X	X	X
4	X			X	X	
5	X			X		X
6	X				X	
7	X					X
8	X			X	X	X
9			X			
9			X	X		
11			X	X	X	
12			X	X		X
13			X		X	
14			X			X
15			X	X	X	X
16		X				
17		X		X		
18		X		X	X	
19		X		X		X
19		X			X	
20		X				X
21		X		X	X	X

<sup>1</sup>, Brain Heart Infusion Agar, <sup>2</sup>, Tryptic Soy Agar, <sup>3</sup>, Brucella Agar, <sup>4</sup>, extrato de levedura.

#### 4.4 PESQUISA DE FATORES DE INTERFERÊNCIA

Para avaliar se a inibição observada foi devida à produção de substâncias antagonistas ou a outros possíveis fatores, foram realizados os testes descritos a seguir.

##### 4.4.1 BACTERIÓFAGOS

Para avaliar a presença de bacteriófagos, um fragmento de ágar da zona de inibição da amostra reveladora foi retirado assepticamente. O fragmento foi macerado em solução salina pH 7,2 e, então, centrifugado a 23.400 g por 20 min. Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi transferido para 3 mL de cultura da amostra reveladora. Após incubação por 10 min, à temperatura ambiente, para permitir a adsorção viral à bactéria reveladora, uma alíquota de 200 µL foi adicionada a 3,5 mL de ágar semissólido específico para a amostra reveladora selecionada e todo o volume foi vertido sobre uma camada de meio sólido. O material foi incubado a 37 °C, nas condições adequadas para multiplicação da amostra reveladora. A presença de zonas de lise é indicativa da presença de bacteriófagos (TURNER & JORDAN, 1981).

##### 4.4.2 ÁCIDOS GRAXOS E OUTROS ÁCIDOS

A avaliação da possível inibição por ácidos graxos foi realizada empregando-se BHIA-S com e sem adição de 1% de amido solúvel (WALSTAD *et al.*, 1974). Assim, após preparação das placas de BHIA-S, o pH do meio foi medido com o auxílio de um microeletrodo. Após realização do teste, como descrito no item 4.2, o pH da zona de inibição da multiplicação da amostra reveladora foi medido. Como controle, foi incubada placa de Petri contendo apenas BHIA-S e o pH também foi medido antes e após a incubação. Os valores de pH dos meios inoculados e não inoculados foram, então, comparados (APOLÔNIO *et al.*, 2007).

#### 4.4.3 CLOROFÓRMIO

Para avaliar a possibilidade de interferência pela presença de clorofórmio residual na multiplicação da amostra reveladora, foi realizado o seguinte teste. A amostra produtora foi inoculada, em *spot*, na superfície de BHIA-S e, após incubação nas condições anteriormente estabelecidas, a amostra reveladora, previamente cultivada em meio líquido adequado, foi inoculada em torno do *spot* da amostra produtora, em forma de cruz, sem que o crescimento da amostra produtora fosse tocado. O material foi incubado nas condições específicas para a amostra reveladora e, então, foi avaliada a presença ou ausência de halo de inibição da mesma (FARIAS *et al.*, 1992).

#### 4.4.4 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi investigada pela incorporação de catalase de fígado<sup>1</sup> 0,03% p/v em BHIA-S. Como controle, foi empregado o mesmo meio sem a adição da enzima. A presença de halo de inibição da amostra reveladora apenas no meio sem adição de catalase foi considerada indicativa de que a atividade antagonista deve-se à presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (HAMADA & OOSHIMA, 1975).

#### 4.5 EXTRAÇÃO PROTEICA

Diferentes métodos de extração proteica foram empregados a fim de se obter extrato bruto ativo (QUADRO 3). Os experimentos de extração proteica foram realizados de acordo com o protocolo proposto por Green & Huges (1955), com algumas adaptações, de acordo com metodologia já padronizada no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios.

QUADRO 3. Métodos de extração empregados para obtenção de extrato proteico bruto de *Bacteroides fragilis* D111.4.

MÉTODO DE EXTRAÇÃO	RESUMO DO MÉTODO	FRAÇÃO TESTADA	REFERÊNCIA
Precipitação com sulfato de amônio	Pré-inóculo <sup>a</sup> e inóculo <sup>a</sup> , incubação a 37 °C, por 24 h, em anaerobiose. Centrifugação 1. Lise celular (sonicação: 10 ciclos, 40 s, intervalos 40 s). Centrifugação 2. Precipitação de proteínas intracelulares e extracelulares com concentrações crescentes de sulfato de amônio - SA (30, 50 e 80%).	Frações intracelulares <sup>c</sup> (C30, C50 e C80) e extracelulares <sup>c</sup> (S30, S50 e S80)	FARIAS <i>et al.</i> , 1994 <sup>e</sup>
Precipitação com sulfato de amônio	Pré-inóculo <sup>a</sup> e inóculo <sup>a</sup> , incubação a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose. Centrifugação 1. Lise celular (sonicação: 12 ciclos, 40 s, intervalos 40 s). Centrifugação 2. Precipitação de proteínas intracelulares e extracelulares (30, 50 e 80% de SA).	Frações intracelulares <sup>c</sup> (C30, C50 e C80) e extracelulares <sup>c</sup> (S30, S50 e S80)	FARIAS <i>et al.</i> , 1994 <sup>e</sup>
Precipitação com sulfato de amônio	Preparo do inóculo <sup>a</sup> a partir do cultivo em placa <sup>b</sup> . Incubação a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose. Centrifugação 1. Lise celular (sonicação: 24 ciclos, 50 s, intervalos 40 s). Centrifugação 2. Precipitação das proteínas intracelulares (30, 50 e 80% de SA).	Frações intracelulares <sup>c</sup> (C30, C50 e C75)	FARIAS <i>et al.</i> , 1994 <sup>e</sup>
Prensa francesa	Inóculo <sup>a</sup> , incubação a 37 °C, por 24 e 48 h, em anaerobiose. Lise celular (prensa francesa <sup>1</sup> ). Centrifugação. Separação do <i>pellet</i> e do sobrenadante.	Sobrenadante (concentrado e não concentrado) e <i>pellet</i> (solubilizado em tampão <sup>d</sup> )	QUINES <i>et al.</i> , 2015 <sup>e</sup>
Precipitação ácida (Lipopeptídio)	Inóculo <sup>a</sup> , incubação a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose. Centrifugação 1. Coleta do sobrenadante. Precipitação das proteínas do sobrenadante com HCl 5N. Centrifugação 2. Coleta do <i>pellet</i> e do sobrenadante.	<i>Pellet</i> (precipitado) solubilizado em água destilada e sobrenadante (concentrado e não concentrado)	COOPER <i>et al.</i> , 1981 <sup>e</sup> ; NAKANO; MARAHIEL; ZUBER, 1988 <sup>e</sup>
Estresse oxidativo	Inóculo <sup>a</sup> . Incubação a 37 °C, por 12 h, em aerobiose, sob agitação (140 rpm). Incubação a 37 °C, por 24, 48 e 72 h. Centrifugação 1. Lise celular (sonicação: 24 ciclos, 40 s, intervalos 40 s). Centrifugação 2. Precipitação de proteínas intracelulares e extracelulares (30, 50 e 80% de SA).	Frações intracelulares <sup>c</sup> (C30, C50 e C80) e extracelulares <sup>c</sup> (S30, S50 e S80)	SILVA <i>et al.</i> , 2005 <sup>e</sup>
Ultracentrifugação	Preparo do inóculo <sup>a</sup> a partir do cultivo em placa <sup>b</sup> . Incubação a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose. Centrifugação 1. Amicon 100.000 MW <sup>2</sup> . Ultracentrifugação por 4 h. Dissociação com cloridrato de guanidina.	<i>Pellet</i> solubilizado em tampão <sup>d</sup>	HAYES <i>et al.</i> , 1983 <sup>e</sup>

<sup>a</sup>, *Brain Heart Infusion* suplementado (BHI-S) com hemina suína, menadiona e extrato de levedura; <sup>b</sup>, BHI-S Agar; <sup>c</sup>, frações dialisadas em membrana de 1000 Da; <sup>d</sup>, tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8; <sup>e</sup>, com modificações. <sup>1</sup>Branson, Danbury, CT, EUA; <sup>2</sup>Merck Millipore, Dublin, Irlanda.

#### 4.5.1 EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO EXTRACELULAR

A amostra produtora foi cultivada em 1200 mL de BHI-S, por 48 h, a 37 °C, em câmara de anaerobiose. A cultura foi, então, centrifugada a 16.200 g, a 4 °C, por 30 min. O sobrenadante foi coletado e submetido à precipitação com sulfato de amônio em concentrações crescentes (0-30, 30-50 e 50-80% p/v), sob agitação constante e lenta, em banho de gelo. Os precipitados de cada fração foram coletados após centrifugação a 29.829 g, a 4 °C, por 30 min, dissolvidos em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8,0 e exaustivamente dialisados contra o mesmo tampão, durante 16 h, a 4 °C. Desta forma, foram obtidas as frações extracelulares S30, S50, S80.

#### 4.5.2 EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO INTRACELULAR

O *pellet* celular obtido após a primeira etapa de centrifugação, descrita no item 4.5.1, foi lavado duas vezes com tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0, por meio de centrifugação a 16.200 g, por 30 min. Após este procedimento, o *pellet* foi suspenso em 15 mL do mesmo tampão e, então, sonificado a 50 W, em banho de gelo, por 30 ciclos de 40 s cada, com intervalos de 40 s. A lise celular foi confirmada por exame em microscópio óptico, após coloração pelo método de Gram. A fração sonicada resultante foi, novamente, centrifugada a 29.829 g, a 4 °C, por 30 min. O sobrenadante foi coletado, submetido a precipitação com sulfato de amônio e dialisado, como descrito no item 4.5.1, para obtenção das frações intracelulares, denominadas C30, C50 e C80.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ATIVIDADE ANTAGONISTA PELOS EXTRATOS PROTEICOS

A avaliação da atividade antagonista dos extratos proteicos foi realizada pelo método de difusão em ágar, conforme previamente descrito (FARIAS *et al.*, 1994). A amostra reveladora foi cultivada em meio líquido e, então, inoculada em meio semissólido (item 4.2). A mistura foi vertida sobre camada de meio sólido previamente distribuído em

placas de Petri. A seguir, alíquotas das frações extra e intracelulares obtidas foram filtradas em membrana Millipore e, então, 20 µL foram gotejados na superfície do meio semissólido. As placas foram incubadas a 37 °C, nas condições adequadas para multiplicação da amostra reveladora. A avaliação de expressão de antagonismo pelos extratos foi realizada por meio da observação da presença de zonas de inibição da amostra reveladora.

#### 4.7 OBTENÇÃO DE EXTRATO CENTRIFUGADO EM AMICON 100 kDa

Após a avaliação da atividade antagonista, o extrato foi submetido a centrifugação em tubos Amicon de 100 kDa. O material centrifugado a 1252g resultou duas frações, que foram testadas como descrito no item 4.6. Os extratos ativos foram, posteriormente, alíquotados e conservados em *freezer* -80 °C.

#### 4.8 TITULAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTEICAS ATIVAS

Para a titulação da atividade antagonista das frações proteicas, foi utilizado o método de diluição crítica de Mayer-Harting e colaboradores (1972) e Batdorj e colaboradores (2006). As frações ativas foram diluídas sucessivamente (1:2 a 1:128). Em seguida, alíquotas de 20 µL de cada diluição foram dispensadas na superfície de meio sólido previamente inoculado com a cultura reveladora, como descrito no item 4.6. Após incubação, foi avaliada a presença de halos de inibição da amostra reveladora. O título de atividade antagonista, expresso em unidades arbitrárias (UA)/ mL, é definido como a recíproca da maior diluição que originar uma zona clara de inibição da amostra reveladora.

#### 4.9 DOSAGEM PROTEICA

A dosagem de proteínas foi realizada, de acordo com metodologia descrita por Bradford (1976). Como padrão, foi utilizada soroalbumina bovina.

#### 4.10 CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES ATIVAS

Foram avaliados os efeitos de pH, temperatura, enzimas proteolíticas e solventes orgânicos na atividade e estabilidade das frações C30 e C50.

##### 4.10.1 pH

Para avaliação da estabilidade da atividade antagonista frente a diferentes valores de pH, foi utilizada metodologia descrita por Valeff (2011). O tampão universal Britton-Robinson (BRITTON & ROBINSON, 1931), que possibilita o ajuste do pH a valores de 2 a 12, foi utilizado. O ajuste do pH foi realizado com solução de NaOH 2M e HCl 2M e os tampões foram esterilizados por filtração.

Os extratos foram diluídos na proporção de 1:1 (v/v) no tampão universal e a solução foi, então, incubada a 37 °C, em intervalos de 15 e 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h, 1, 2, 3, 6, 10, 20 e 30 dias. Como controle, foi verificada a atividade do tampão e da fração diluída em Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0, na proporção de 1:1 (v/v), incubados na mesma condição empregada para os tubos teste.



#### 4.10.2 TEMPERATURA

Para avaliação da interferência de tratamento térmico na atividade antagonista dos extratos proteicos, foi utilizada metodologia descrita por Ribeiro-Ribas e colaboradores (2009), com algumas adaptações.

Alíquotas das frações diluídas 1:1 (v/v) em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0, foram submetidas aos seguintes tratamentos térmicos: -86 °C (*freezer*), -20 °C (*freezer*), 4 °C (refrigerador), 25 °C (temperatura ambiente), 37 °C (estufa), 50 °C, 60 °C, 80 °C e 100 °C (banho-maria) e 121 °C (autoclave), por intervalos de tempo de 15 e 30 min, 1, 2, 4 e 8 h, 1, 2, 8, 20 e 30 dias, 6 e 12 meses ou até perda total da atividade antagonista. Como controle, foi utilizado o extrato diluído sem qualquer tratamento térmico.

#### 4.10.3 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

O efeito de enzimas proteolíticas nas frações ativas foi testado segundo metodologia descrita por Valeff (2011). Foram utilizadas proteinase K,  $\alpha$ -quimotripsina, tripsina, papaína e pepsina. As enzimas  $\alpha$ -quimotripsina e tripsina foram solubilizadas em Tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, a proteinase K foi diluída em Tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, a papaína em tampão fosfórico 50 mM, pH 5,0 e a pepsina em tampão citrato 100 mM, pH 3,0, todas na concentração final de 1 mg/mL. Todas as soluções foram esterilizadas por filtração.

Os testes foram realizados diluindo-se alíquotas dos extratos proteicos ativos nas soluções enzimáticas na proporção de 1:1 (v/v). O material foi incubado por 15 min, 30 min e 1 h, a 37 °C. Então, a preservação da atividade antagonista foi avaliada, como descrito no item 4.6, e os resultados expressos em UA/mL. Como controle, foram empregadas as soluções enzimáticas e os extratos diluídos 1:1 (v/v) em Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, e em Tris-HCl 20 mM, pH 7,2.

#### 4.10.4 SOLVENTES ORGÂNICOS

Para verificar o efeito de solventes orgânicos na atividade antagonista dos extratos proteicos, foi empregada metodologia descrita por Apolônio *et al.* (2008). Os solventes utilizados foram acetona, acetonitrila, álcool iso-propílico, butanol, etanol, hexano e metanol.

Soluções aquosas a 10% e 50% dos solventes orgânicos foram preparadas e, em seguida, esterilizadas por filtração. Os extratos foram diluídos na proporção 1:1 (v/v) nestas soluções e, então, incubados a 25 °C, por 1 h. Foram realizados controles, utilizando as soluções aquosas dos solventes orgânicos e o extrato diluído 1:1 (v/v) em Tris-HCl 0,01 M, pH 7,2.

#### 4.11 ESTUDO DO MODO DE AÇÃO DAS FRAÇÕES ATIVAS

##### 4.11.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A CIM é definida como a menor concentração da droga que inibe o crescimento visível de um organismo após incubação *overnight*. Este período de incubação, entretanto, é estendido em testes realizados com microrganismos anaeróbios, que necessitam de maior tempo para multiplicação (CLSI, 2012).

Para a determinação da CIM, foi utilizado o protocolo preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2012), com algumas modificações, por meio de microdiluição em caldo. O experimento foi realizado em duplicata.

Para esta avaliação, 2 µL de cultura da amostra reveladora foram adicionados em cada poço de uma microplaca, com o inóculo previamente ajustado em salina 0,85%, na escala 0,5 de McFarland, sendo que a concentração final bacteriana em cada poço foi de 10<sup>6</sup> UFC/mL. Também foram adicionados 100 µL de diferentes concentrações dos extratos ativos, além de 98 µL de BHI-S. Como controle positivo, foi empregada mistura de 198 µL de BHI-S acrescido de 2 µL de cultura da amostra reveladora e,

como controle negativo, foram adicionados 98 µL de BHI-S, 100 µL de solução de extrato e 2 µL de salina. Após 48 h de incubação, foi realizada a leitura da CIM, considerada como a menor concentração do extrato ativo, em UA/mL, que inibe visivelmente a multiplicação bacteriana da amostra reveladora (CLSI, 2012).

#### 4.11.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A CBM é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de reduzir a contagem microbiana em 99,9% (LEVISON & LEVISON, 2009).

Este experimento foi realizado a partir da microplaca empregada para determinação da CIM, também em duplicata. Alíquotas de 100 µL do controle negativo e de cada poço em que não houve crescimento bacteriano visível foram semeadas em meio sólido, com o auxílio de alça de Drigalski. O controle positivo foi diluído em caldo ( $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$ ) e 100 µL de cada diluição, também, foram semeados em ágar. As placas foram incubadas em câmara anaeróbica, a 37 °C. Após incubação, foi realizada a contagem de colônias, para estimativa do número de UFC/mL.

#### 4.12 PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES ATIVAS POR CROMATOGRAFIA

Os extratos ativos foram purificados por etapas sucessivas de cromatografia. Após cada etapa de purificação, as frações foram submetidas a teste de atividade antagonista (item 4.6).

Inicialmente, foi empregada cromatografia por troca iônica (*fast protein liquid chromatography* - FPLC), em coluna Mono-Q™ 5/50 GL Tricorn™, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, e eluída no mesmo tampão acrescido de NaCl 1 M, em gradiente linear de 0-100%. As frações obtidas foram concentradas por liofilização e diluídas em água Milli-Q® estéril. Quando necessário (frações eluídas em tampão com alta concentração de sal), o material foi dialisado contra o mesmo tampão, porém desprovido de sal, antes da liofilização.

As frações provenientes da cromatografia por troca iônica que apresentaram atividade antagonista foram submetidas à cromatografia por gel filtração (FPLC) em coluna de Superose 12 HR 10/30, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, acrescido de 0,2 M de NaCl, e eluídas no mesmo tampão. Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas em fluxo de 30 mL/h, liofilizadas e diluídas em água Milli-Q® estéril.

As frações ativas obtidas da etapa de purificação anterior foram submetidas a cromatografia de fase reversa (*high performance liquid chromatography* - HPLC) em coluna C8 (4,6 mm de diâmetro x 25 cm de comprimento) equilibrada com solução A [ácido trifluoroacético (TFA) 31 0,05% v/v em água Milli-Q®] e eluídas com solução B (acetonitrila 100% + TFA 0,05%). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 280 e 220 nm. As frações obtidas foram concentradas por liofilização e diluídas em água Milli-Q® estéril.

#### 4.13 SDS-PAGE

O extrato proteico bruto e as frações ativas provenientes das etapas de purificação foram, de acordo com a disponibilidade de material, submetidas à SDS-PAGE (12%) com e sem adição de 2-mercaptoetanol (SCHAGGER & VON JAGOW, 1987). As amostras foram aplicadas em duplicata em um mesmo gel. Uma parte do gel foi corada pela prata (TUÑON & JOHANSSON, 1984) e a outra foi lavada durante 3 h com água destilada estéril para remoção do SDS e de possíveis contaminantes microbianos, e em seguida, encaminhada para a revelação de atividade *in situ*. O gel, mantido em condições assépticas, foi depositado sobre camada de meio sólido e recoberto com uma camada de meio semissólido contendo a amostra reveladora. Após incubação, a leitura foi realizada pela observação da presença de linhas de inibição da multiplicação da amostra reveladora. A massa molecular de cada banda ativa foi estimada por comparação com padrão de proteínas pré-corado (FARIAS *et al.*, 1994).

#### 4.14 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A massa molecular da(s) proteína(s) purificada(s) ativa(s) foi avaliada utilizando espectrometria de massas. As frações foram liofilizadas, solubilizadas em TFA 0,1 % e dissolvidos em matriz de  $\alpha$ -CHCA ( $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico) e super DHB (ácido 2,5-di-hidroxibenzoico), na proporção de 1:1 (v/v). Um volume de 1  $\mu$ L/ *spot* foi transferido para uma placa de dados MALDI (MTP AnchorChips 384 x 600) e mantida em temperatura ambiente. A massa molecular foi determinada empregando-se Autoflex™ III MALDI-TOF/TOF, operado em modo linear positivo. A calibração linear foi obtida utilizando o padrão de calibração proteico (*Protein Calibration Standard I e II*) e o *software* de coleta de dados empregado foi o *Flex Control 2.4.30.0*. Para análise dos dados, foi empregado o programa *Flex Analysis 2.4*.

#### 4.15 DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA PRIMÁRIA DA SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA

A identidade dos peptídios foi verificada por meio de experimentos de MS/MS no mesmo instrumento utilizado para obtenção das massas moleculares, Autoflex™ III MALDI-TOF/TOF, mas, operado em modo LIFT. A substância foi previamente fragmentada e os fragmentos gerados foram sequenciados, rearranjados e analisados. A análise de homologia entre a sequência primária obtida e aquelas de outras substâncias foi realizada empregando-se o sistema de busca Protein Basic Local Alignment Search Tool - National Center for Biotechnology Information (NCBI-BLASTP).

### 5.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ANTAGONISMO E INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

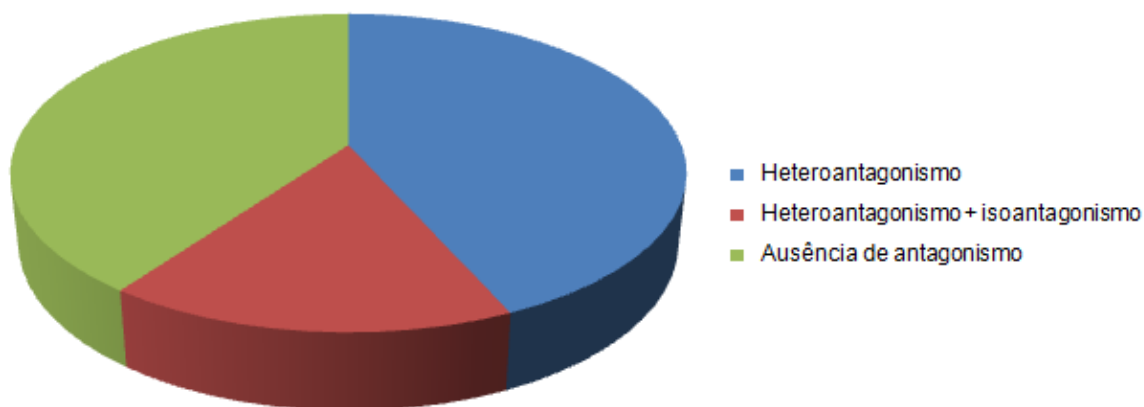
Nenhuma das amostras de *Parabacteroides distasonis* expressou antagonismo nas condições empregadas no estudo. Considerando-se apenas as amostras de *Bacteroides*, heterantagonismo foi detectado em 18 (60,0%) das 30 amostras testadas, cinco (16,7%) das quais, todas *B. fragilis*, expressaram, também, isoantagonismo. Não foi detectada a ocorrência de autoantagonismo (FIG. 1).

TABELA 1. Expressão de heteroantagonismo pelas amostras de *Bacteroides* isoladas de pacientes com infecção intra-abdominal.

Espécie bacteriana	Heteroantagonismo
<i>B. fragilis</i>	5/11 <sup>a</sup>
<i>B. ovatus</i>	1/5
<i>B. thetaiotaomicron</i>	1/1
<i>B. uniformis</i>	3/3
<i>B. vulgatus</i>	1/1
<i>B. caccae</i>	6/6
<i>B. capillosus</i>	1/2
<i>B. egghertii</i>	0/1

<sup>a</sup>, número de amostras positivas/número de amostras testadas.

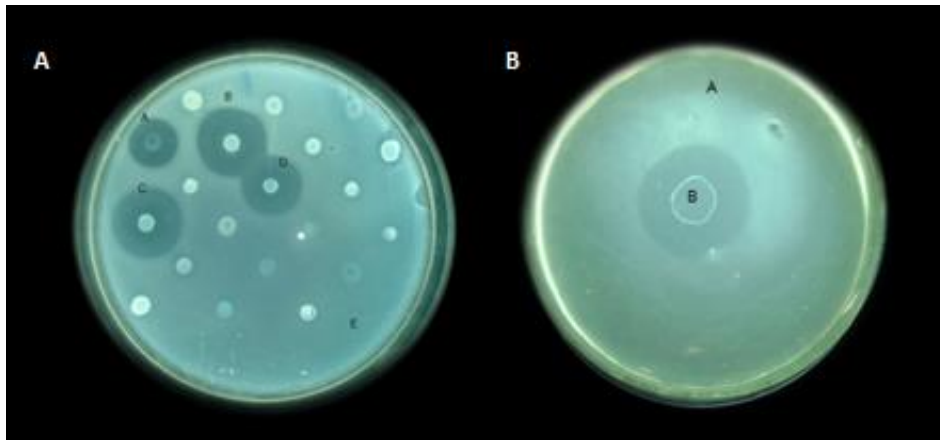
FIGURA 1. Classificação quanto ao tipo de relação antagonista das amostras de *Bacteroides* estudadas.



No que diz respeito ao espectro de ação, a atividade antagonista foi observada somente contra bactérias filogeneticamente relacionadas (FIG. 2A). Em relação à avaliação das condições de cultivo, o meio de cultura que mais favoreceu a expressão de antagonismo foi o BHIA-S, pH 6,5 (FIG. 2B).

A amostra *B. fragilis* D 111.4 foi aquela que expressou antagonismo mais frequentemente, exibiu o espectro de atividade mais amplo e gerou halos mais visíveis e límpidos. Assim, esta amostra foi selecionada para as fases subsequentes do estudo (FIG. 2B).

FIGURA 2. Atividade heteroantagonista de amostras de *Bacteroides fragilis* isoladas de pacientes com infecção intra-abdominal.



**A**, Método de sobrecamada, meio *Brain Heart Infusion Agar* suplementado com hemina suína, menadiona e extrato de levedura, pH 7,0, incubação a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose. Amostras produtoras: A, *B. fragilis* D 51; B, *B. fragilis* D 111.4; C, *B. fragilis* 57.1; e D, *B. fragilis* 34.3. Amostra reveladora: E, *Bacteroides ovatus* D 54.1. **B**, Método de sobrecamada, meio *Brain Heart Infusion Agar* suplementado com hemina suína, menadiona e extrato de levedura, pH 6,5 (condições que proporcionaram a melhor expressão de atividade antagonista), incubação a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose. A, amostra reveladora: *Bacteroides ovatus* D 54.1; B, amostra produtora: *B. fragilis* D 111.4.

## 5.2 FATORES DE INTERFERÊNCIA

### 5.2.1 BACTERIÓFAGOS

Não foram evidenciadas zonas de lise decorrentes da presença de bacteriófagos no teste realizado (FIG. 3A).



### 5.2.2 ÁCIDOS GRAXOS

A adição de amido solúvel ao meio de cultivo não impediu a expressão de antagonismo pela amostra produtora, indicando que ácidos graxos e outros ácidos não eram responsáveis pelo antagonismo (FIG. 3B).

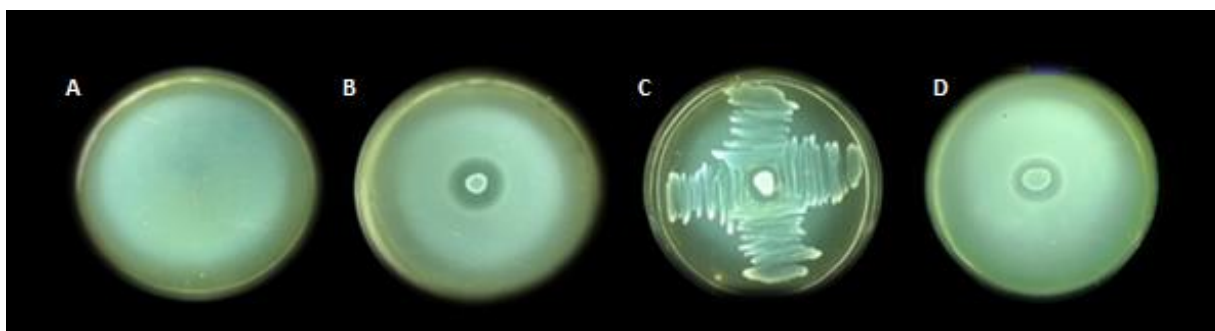
### 5.2.3 CLOROFÓRMIO

Os resultados dos testes para pesquisa de atividade antagonista com ou sem adição de clorofórmio foram similares, indicando que esta substância não é a responsável pela inibição da amostra reveladora (FIG. 3C).

### 5.2.4 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

A adição de catalase ao meio de cultivo não inibiu a expressão de antagonismo, demonstrando que a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não é responsável pela atividade (FIG. 3D).

FIGURA 3. Pesquisa de fatores de interferência.

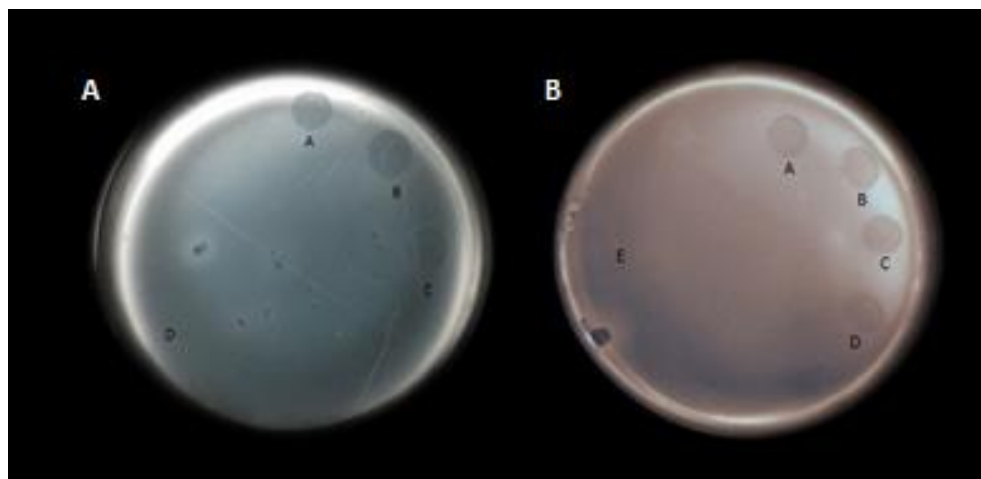


Avaliação da atividade de: A, bacteriófagos; B, ácidos graxos; C, clorofórmio; D, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Método de sobrecamada, meio *Brain Heart Infusion* Agar suplementado com hemina suína, menadiona e extrato de levedura, pH 7,0, incubação a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose. Amostra produtora: *Bacteroides fragilis* D 111.4. Amostra reveladora: *Bacteroides ovatus* D 54.1.

### 5.3 TESTE DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS FRAÇÕES PROTEICAS

Apenas as frações proteicas intracelulares obtidas da amostra *B. fragilis* D 111.4, precipitadas com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  30% (C30) e 50% (C50), apresentaram atividade antagonista contra *B. caccae* D 79.3 e *B. ovatus* D 54.1, respectivamente (FIG. 4). Os dados relativos à titulação da atividade antagonista das frações C30 e C50 estão apresentados na TAB. 2. C30 e C50 foram selecionadas para as etapas subsequentes do estudo.

FIGURA 4. Teste de atividade das frações C30 e C50 obtidas da amostra *Bacteroides fragilis* D 111.4.



**A**, a, extrato bruto; b, diluição 1:2; c, diluição 1:4; d, amostra reveladora *Bacteroides caccae* D 79.3. **B**, a, extrato bruto; b, diluição 1:2; c, diluição 1:4; d, diluição 1:8; e, amostra reveladora *Bacteroides ovatus* D 54.1.

TABELA 2. Titulação dos extratos proteicos intracelulares ativos obtidos a partir da amostra *Bacteroides fragilis* D 111.4.

Extrato proteico	Título (UA/mL)	Concentração (mg/mL)
C30 <sup>a</sup>	200	3,47
C50 <sup>b</sup>	200	4,14

<sup>a</sup>, fração intracelular precipitada com 30% de (Na<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; <sup>b</sup>, fração intracelular precipitada com 50% de (Na<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## 5.4 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA

### 5.4.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

A termolabilidade das frações C30 e C50 foi demonstrada pela perda completa da atividade em temperaturas superiores a 50 °C, sendo que, nesta temperatura, a atividade de C50 foi mantida por 20 min. As frações ainda permanecem ativas após um período de 12 meses de armazenamento em temperaturas mais baixas (-20 °C e -86 °C). A atividade antagonista de C30 foi preservada por 30 dias a 4 °C e por 7 dias a 25 °C. C50 manteve-se ativo após 30 dias a 4°C, mas, a atividade foi diminuída (TAB. 3).

### 5.4.2 INFLUÊNCIA DO pH

A atividade de C30 foi mantida, embora diminuída, por até 3 h, quando a fração foi submetida a valores de pH mais baixos (4,0 e 5,0). Já C50 foi instável nesta faixa de pH. Soluções mais alcalinas (pH 11,0 e 12,0) e mais ácidas (pH 2,0 e 3,0) inativaram C30 e C50. A atividade antagonista de C30 e C50 foi mantida em 200 UA/mL por 10 dias após tratamento com tampões com os demais valores de pH testados. Os

resultados indicam estabilidade da fração em uma ampla faixa de pH (6,0 a 10,0) (TAB. 3).

#### 5.4.3 INFLUÊNCIA DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Em relação à estabilidade frente a enzimas proteolíticas, C30 e C50 foram totalmente inativadas pelo tratamento com papaína, tripsina e  $\alpha$ -quimotripsina por 15 min. No que se refere a pepsina e proteinase K, a atividade do extrato C30 não diluído foi mantida por até 1 h de exposição; quando testado por 2 h, C30 foi totalmente inativada por estas enzimas. Os controles positivos apresentaram atividade com título de 200 UA/mL quando incubados por 15 min a 2 h (TAB. 3).

#### 5.4.4 INFLUÊNCIA DE SOLVENTES ORGÂNICOS

As frações C30 e C50 mantiveram-se ativas após exposição a todos os solventes orgânicos testados. O título de atividade antagonista foi de 200 UA/mL para todos os testes e para o controle positivo (TAB. 3).

TABELA 3. Caracterização das frações C30 e C50 obtidas da amostra *Bacteroides fragilis* D 111.4.

Tratamento	Título de atividade (UA/mL)	
	C30 <sup>a</sup>	C50 <sup>b</sup>
Temperatura		
Controle	200	200
50 °C/20 min	EB <sup>c</sup>	EB
37 °C/7 dias	EB	EB
25 °C/7 dias	200	200
4 °C/30 dias	200	EB
-20 °C e -80 °C/12 meses	200	200
pH		
Controle	200	200
2, 3, 3,5/0 min	0	0
4, 4,5, 5, 5,5 e 6/3 h	EB	0
6,5/ 10 dias	200	200
7, 7,5/7 dias	EB	EB
8, 8,5, 9, 9,5 e 10/5 dias	EB	EB
11, 11,5 e 12/ 0 min	0	0
Enzimas (1 mg/mL, 37 °C)		
Controles	200	200
Tripsina/15 min	0	0
α-quimiotripsina/15 min	0	0
Papaína/15 min	0	0
Pepsina/15 min	0	0
Pepsina/1 h	0	0
Pepsina/2 h	0	0
ProteinaseK/15 min	200	0
ProteinaseK/1 h	EB	0
ProteinaseK/ 2h	0	0
Solventes orgânicos (10% e 50%, 25°C, 2 h)		
Controle	200	200
Solventes <sup>d</sup>	200	200

Amostra reveladora <sup>a</sup>, *Bacteroides caccae* D 79.3; <sup>b</sup>, *Bacteroides ovatus* D 54.1; <sup>c</sup>, atividade apenas do extrato não diluído; <sup>d</sup>, acetona, acetonitrila, álcool isopropílico, butanol, etanol, hexano, metanol.

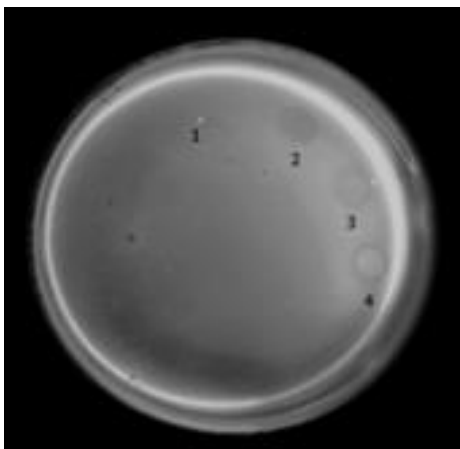
## 5.5 CIM e CBM

Os valores de CIM e CBM de C30 foram de 3,125 UA/mL e 160 UA/mL, respectivamente, o que demonstra o modo de ação bacteriostático de C30. No que se refere a C50, os valores de CIM e CBM foram de 1,56 UA/mL e 160 UA/mL, respectivamente, o que também demonstra o modo de ação bacteriostático de C50.

## 5.6 PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES C30 e C50

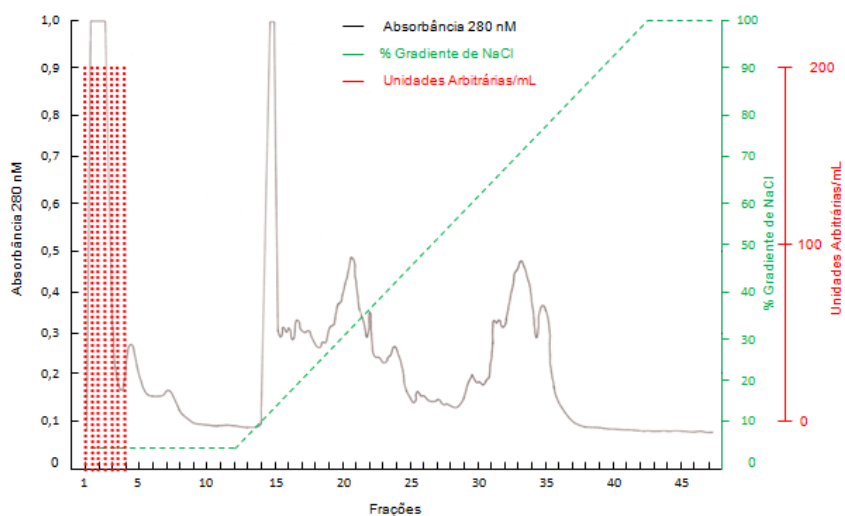
A aplicação do extrato C30 em cromatografia de troca iônica não gerou frações ativas. No que se refere ao extrato C50, 50 frações foram geradas, entre as quais, as frações 1 a 4, referentes a um único pico, não foram capazes de se ligar à coluna e apresentaram atividade antagonista (FIG. 5). O cromatograma obtido nesta etapa de purificação está apresentado na FIG.6.

FIGURA 5. Zonas de inibição da amostra reveladora pelas frações 1, 2, 3 e 4 resultantes da cromatografia de troca iônica de C50, extrato intracelular precipitado com 50% de sulfato de amônio.



Amostra produtora *Bacteroides fragilis* D 111.4; amostra reveladora: *Bacteroides ovatus* D 54.1.

FIGURA 6. Perfil cromatográfico de troca iônica de C50, fração intracelular precipitada com 50% de sulfato de amônio, em coluna Mono-Q™, acoplada em sistema FPLC.

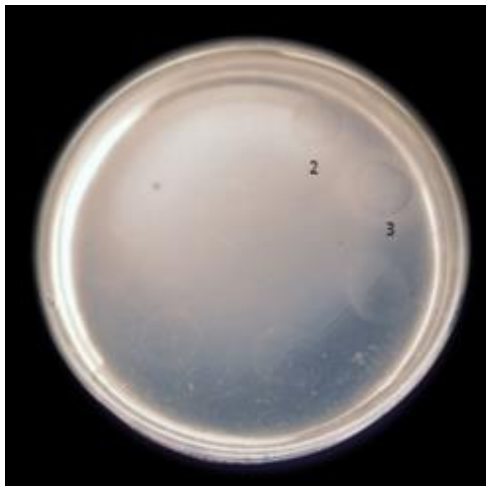


Sensibilidade 2,0, leitura a 280 nm. Volume das frações: 2,0 mL. Amostra produtora: *Bacteroides fragilis* D 111.4; amostra reveladora: *Bacteroides ovatus* D 54.1.

As frações 1 a 4, oriundas da cromatografia de troca iônica, constituíram o *pool* 1, que, aplicado em cromatografia de gel filtração, gerou 26 frações. Destas, as frações 2 e 3 foram capazes de inibir a amostra reveladora (FIG. 7). O cromatograma resultante da cromatografia de gel filtração está representado na FIG. 8.

O *pool* 2, constituído pelas frações 2 e 3 provenientes da cromatografia de gel filtração, foi submetido à cromatografia de fase reversa. Foram geradas 50 frações (FIG. 9), sendo a fração 2C, eluída com, aproximadamente, 60-65% de acetonitrila, ativa contra a amostra reveladora (FIG. 10).

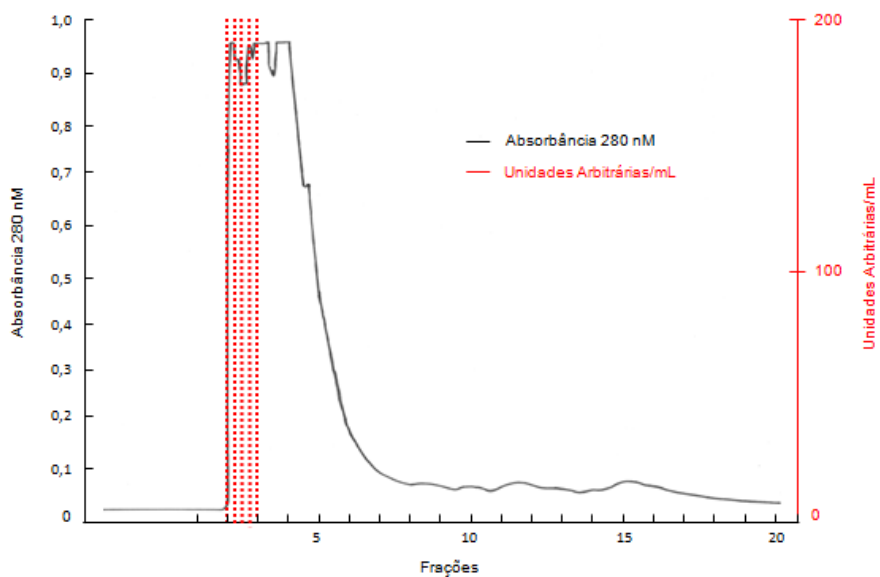
FIGURA 7. Zonas de inibição da amostra reveladora pelas frações 2 e 3 resultantes da cromatografia de gel filtração



Amostra produtora: *Bacteroides fragilis* D 111.4; amostra reveladora: *Bacteroides ovatus* D 54.1.

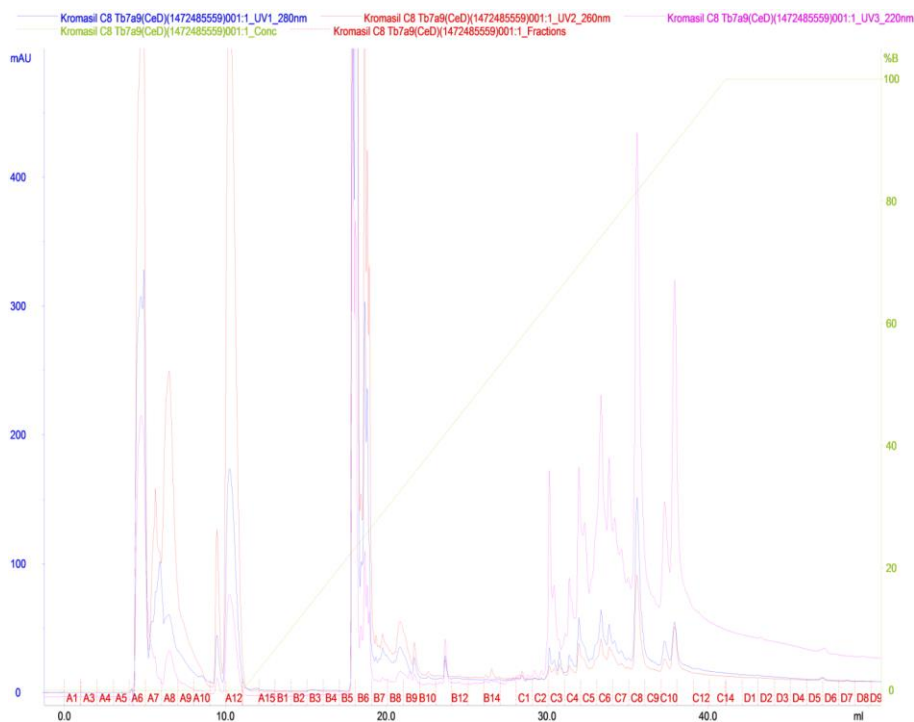


FIGURA 8. Perfil cromatográfico de gel filtração do *pool* 1 (frações 1 a 4) oriundos da cromatografia de troca iônica, utilizando coluna Superose 12 acoplada a sistema FPLC.



Sensibilidade 2,0, leitura 280 nm. Volume das frações 1,5 mL. Amostra produtora: *Bacteroides fragilis* D 111.4, amostra reveladora: *Bacteroides ovatus* D 54.1.

FIGURA 9. Perfil cromatográfico de fase reversa do *pool 2* (frações 2 e 3) oriundo da cromatografia de gel filtração, utilizando coluna C8 acoplada a sistema de HPLC.



Leitura a 280 nm. Amostra produtora: *Bacteroides fragilis* D 111.4; amostra reveladora: *Bacteroides ovatus* D 54.1.

FIGURA 10. Zonas de inibição da amostra reveladora pela fração 2C resultante da cromatografia de fase reversa

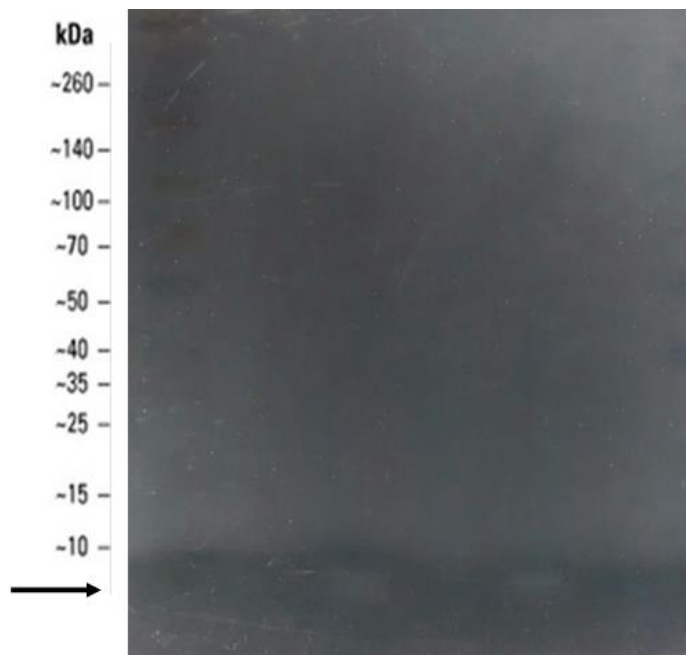


Amostra produtora: *Bacteroides fragilis* D 111.4; amostra reveladora: *Bacteroides ovatus* D 54.1.

## 5.7 SDS-PAGE

O resultado da revelação *in situ* da atividade do extrato bruto realizada posteriormente à separação por eletroforese está apresentado na FIG. 11. Verificou-se a inibição do microrganismo revelador *B. ovatus* D 54.1 por todos os extratos testados, em região correspondente a banda com massa molecular <10 kDa.

FIGURA 11. SDS-PAGE do extrato bruto C50.

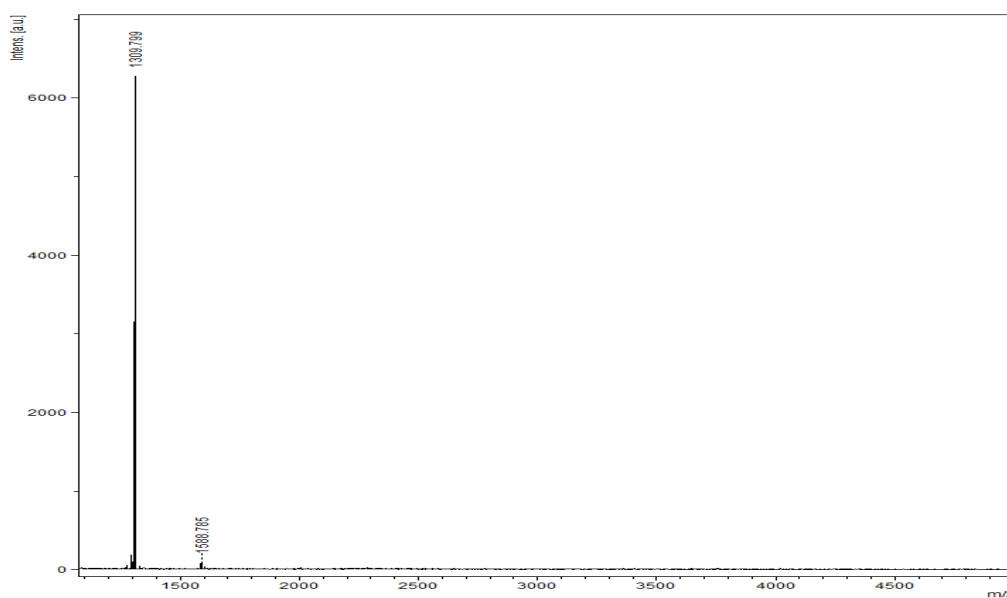


Marcador de massa molecular pré-corado 10-260 kDa (*Spectra multicolor broad range protein ladder*). Amostra reveladora: *Bacteroides ovatus* D 54.1.

## 5.8 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA

Os resultados dos experimentos realizados para verificação da pureza e determinação da massa molecular das substâncias ativas presentes na fração 2C obtida após fracionamento por cromatografia de fase reversa estão sumarizados na FIG. 12. Na fração analisada por cromatografia de fase reversa, os íons de, aproximadamente, 1300 Da geraram sinal mais intenso.

FIGURA 12. Espectro de massa proveniente da fração 2C oriunda da cromatografia de fase reversa



Intensidade relativa versus função massa sobre carga (m/z). Amostra produtora: *Bacteroides fragilis* D 111.4

## 5.9 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS

A busca realizada por similaridade entre os fragmentos sequenciados e proteínas descritas no banco de dados BLASTP, a partir de fragmentação obtida em cromatografia de fase reversa, apresentou identidade de 100% com uma proteína de secreção do tipo VII (FIG. 13). A sequência encontrada foi VTANRNQWG.

FIGURA 13. Análise de identidade realizada no BLASTP.

NCBI Blast: Protein Sequence

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Accession	Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
hypothetical protein [Collimonas funovorans]	25.7	25.7	88%	352	75%
TraO [Synthetic plasmid pMOL98]	25.7	25.7	88%	352	75%
hypothetical protein [Streptomyces sp. NRRL F-5193]	25.7	25.7	88%	352	88%
hypothetical protein WA1_32815 [Scytonema hofmannii PCC 7110]	25.7	25.7	100%	354	78%

Alignments

Download GenPept Graphics

hypothetical protein [Pelodictyon phaeoclathratiforme]  
Sequence ID: [ref|WP\\_012508614.1](#) Length: 952 Number of Matches: 1  
[See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 481 to 488 GenPept Graphics

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
27.8 bits(58)	61	7/8(88%)	8/8(100%)	0/8(0%)

Query 1 VTANRNQW 8  
Sbjct 481 VTANRNQW 488

Download GenPept Graphics

hypothetical protein [Proteiniphilum acetatigenes]  
Sequence ID: [ref|WP\\_019541049.1](#) Length: 868 Number of Matches: 1

Range 1: 781 to 789 GenPept Graphics

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
27.8 bits(58)	61	8/9(89%)	8/9(88%)	0/9(0%)

Query 1 VTANRNQWG 9  
Sbjct 781 VTANRNQWG 789

Download GenPept Graphics

type VII secretion-associated protein [Amycolatopsis taiwanensis]  
Sequence ID: [ref|WP\\_027940966.1](#) Length: 631 Number of Matches: 1

Range 1: 543 to 549 GenPept Graphics

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
27.8 bits(58)	61	7/7(100%)	7/7(100%)	0/7(0%)

Query 2 TANRNQW 8  
Sbjct 543 TANRNQW 549

A microbiota indígena exerce inúmeras funções fundamentais para o hospedeiro. Como constituinte da microbiota intestinal indígena, membros do gênero *Bacteroides* auxiliam na fisiologia e função do intestino, ou seja, podem modular diretamente as funções do órgão. Esta relação é também benéfica para as bactérias, pois a região do cólon proporciona um ambiente rico, do ponto de vista nutricional, e atmosfera anaeróbica. Embora a relação *Bacteroides*-hospedeiro seja vantajosa para ambos, existem situações em que a bactéria pode causar sérios danos. Os microrganismos incluídos no gênero *Bacteroides* são considerados patógenos oportunistas. O grupo está, muito frequentemente, associado a doenças infecciosas, principalmente, intra-abdominais e bacteremia, que requerem tratamento antimicrobiano rigoroso e intervenção cirúrgica para a resolução bem sucedida (FISHER & METHA, 2014).

O anaeróbio mais frequentemente isolado destes processos infecciosos é *B. fragilis*, envolvido no desenvolvimento de quase um terço dos abscessos intra-abdominais que ocorrem na cavidade peritoneal, embora corresponda a apenas 0,5% da microbiota do cólon humano. Enquanto as infecções intra-abdominais são tipicamente polimicrobianas e, geralmente, estejam associadas à microbiota indígena, *B. fragilis* é uma das poucas bactérias conhecidas como sendo capazes de induzir a formação de abscessos como único organismo infectante em modelos animais experimentais (CAO *et al.*, 2014).

Fisher & Metha (2014), na tentativa de identificar espécies-chave na microbiota intestinal, revelaram que *B. fragilis* tem uma influência desproporcional sobre a estrutura do microbioma intestinal, ainda que encontrados em abundância moderada. Com base neste trabalho, os autores propuseram que a presença de certas espécies-chave pode ser responsável pela individualidade do microbioma do intestino de seres humanos.

Vários estudos já documentaram bem que os microrganismos produzem uma série de substâncias inibidoras, que fazem parte de seu arsenal de defesa ou sobrevivência, em especial, em ambientes mais competitivos (ROCES *et al.*, 2012). Ácidos orgânicos,

peróxido de hidrogênio, etanol, bacteriocinas e outros compostos antibacterianos ou antimicrobianos são sintetizados por uma ampla variedade de microrganismos (YANG *et al.*, 2014). Evidências sugerem que a capacidade de uma bactéria sobreviver em um ambiente polimicrobiano, como o intestino, está relacionada à elaboração de fatores antagonistas com ação interbacteriana (HAYES *et al.*, 2014; RUSSELL *et al.*, 2014; WEXLER *et al.*, 2016).

As espécies que se desenvolvem em comunidades microbianas densas e diversificadas devem ter mecanismos para se estabelecer, persistir e frustrar os concorrentes (COYNE *et al.*, 2014). Na medida em que os microrganismos que colonizam o intestino de seres humanos evoluem de forma competitiva em ambientes onde as espécies de sucesso conseguem colonizar, a composição bacteriana neste ecossistema deve ser grandemente influenciada por fatores que promovem interferências competitivas, tais como a produção de proteínas antimicrobianas, como pequenas bacteriocinas peptídicas, como as microcinas e os lantibióticos (COTTER *et al.*, 2013) e de moléculas maiores, como as colicinas (CASCALES *et al.*, 2007) e as piocinas (MICHEL-BRIAND & BAYSSE, 2002). Estas moléculas são estrutural e funcionalmente diversificadas em sua capacidade de inibir ou matar as células por vários mecanismos, incluindo atividade de nuclease, formação de poros, inibição enzimática e destruição da parede celular.

Neste estudo, avaliou-se a expressão de antagonismo por amostras de *Bacteroides* e *Parabacteroides* isoladas de pacientes com infecções intra-abdominais. Apenas *Bacteroides* exibiu atividade antagonista nas condições experimentais empregadas. No grupo, apenas 43,33% das amostras testadas exibiram heteroantagonismo e 16,67% expressaram heteroantagonismo e isoantagonismo, exclusivamente, *B. fragilis*. Resultado semelhante foi relatado por Avelar *et al.* (1999), ao observarem que 57% das amostras de *B. fragilis*, inclusive amostras clínicas, eram produtoras de bacteriocina.

Um desafio enfrentado pelos organismos residentes do cólon é a necessidade de se adaptar a diferentes fontes nutricionais e ambientes adversos. A resistência e a adaptação são vantajosas, também, para a multiplicação em sítios extraintestinais, e

podem estar associadas ao aumento da sobrevivência e da colonização por *B. fragilis*. A propriedade parece estar relacionada ao sucesso deste microrganismo como um patógeno oportunista em relação a outras espécies de *Bacteroides* (CAO *et al.*, 2014).

Bacteriocinas produzidas por bactérias Gram negativas apresentam espectro de ação restrito quando comparadas com bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram positivas, inibindo, geralmente, amostras da mesma espécie ou de espécies filogeneticamente relacionadas (NISHIE *et al.*, 2012). Observou-se que amostras de *B. fragilis* foram capazes de inibir bactérias da mesma espécie, gênero ou de grupo filogeneticamente relacionado (*P. distasonis*).

De acordo com Majeed *et al.* (2013), as bacteriocinas agem contra amostras intimamente relacionadas a amostra produtora que, conseqüentemente, competem pelos mesmos recursos. Os resultados da investigação conduzida por Hawlena *et al.* (2012) sugerem que bacteriocinas têm um papel importante na competição intraespecífica na natureza, bem como na mediação interespecífica, ou seja, entre espécies que coexistem em comunidades naturais.

No presente estudo, atividade autoantagonista não foi observada. Diversos relatos descrevem que amostras produtoras de substâncias antagonistas sintetizam uma proteína de imunidade para sua proteção (COYNE *et al.*, 2016; LOBO *et al.*, 2016).

No entanto, num ambiente de microbiota diversificada e densa, a bacteriocina produzida não só exerce seu efeito antagonista, mas, também, pode desencadear a produção de bacteriocinas pelas células vizinhas, “armando o *concorrente* para o contra-ataque”. Alguns pesquisadores observaram que as bacteriocinas induzem a expressão de substâncias inibidoras por amostras vizinhas e que a potência de uma bacteriocina e sua capacidade de indução caminham juntas. Num ambiente de competição entre amostras antagonistas, o competidor mais “tóxico” prevalecerá (MAJEED *et al.*, 2013).

As espécies bacterianas testadas produziram halos de inibição entre 12 e 35 mm de diâmetro (dados não apresentados), o que, de acordo com Nakano *et al.* (2013), pode sugerir a produção de mais de um tipo de substância antagonista, possivelmente, com diferentes propriedades físico-químicas e biológicas.



Para possibilitar a detecção de fatores que poderiam interferir na interpretação dos resultados obtidos, foram realizados testes de exclusão, que confirmaram que a inibição não se devia à presença de ácidos graxos de cadeia longa e outros ácidos, peróxido de hidrogênio, bacteriófagos e clorofórmio, sugerindo produção de uma substância antagonista de natureza proteica. Estes testes são importantes porque, de acordo com Gillor *et al.* (2008a), existem várias substâncias antagonistas produzidas por bactérias, como ácidos, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e bacteriófagos, que podem atuar como agentes antibacterianos.

Entre as amostras de *B. fragilis* que expressaram atividade antagonista, D 111.4 foi selecionada para os passos subsequentes do estudo, que incluíram extração, caracterização e purificação da substância antagonista produzida. A escolha baseou-se no fato de que a amostra D 111.4 expressou antagonismo com espectro de ação mais amplo e halos de inibição da multiplicação das amostras reveladoras mais límpidos e visíveis.

Entre as bactérias utilizadas como reveladoras, as amostras clínicas de *B. ovatus* D 54.1 e *B. caccae* D 79.3 destacaram-se pela maior suscetibilidade e pelos halos de inibição mais nítidos. Por esta razão, foram empregadas como reveladoras nos passos subsequentes do estudo.

Dados referentes à purificação de substâncias tipo bacteriocina sintetizadas por *B. fragilis* são escassos. Neste estudo, optou-se, inicialmente, pelo emprego de extração proteica pelo método de precipitação por concentrações crescentes de sulfato de amônio (30, 50 e 80%). Foram obtidas três frações intracelulares (C30, C50 e C80) e três frações extracelulares (S30, S50 e S80). Apenas as frações intracelulares C30 e C50 apresentaram atividade contra as amostras selecionadas como reveladoras.

C30 mostrou-se ativa contra *B. caccae* D 79.3 e C50, por sua vez, contra *B. ovatus* D 54.1. O dado sugere a presença de substâncias antagonistas diferentes nos dois extratos proteicos. Avelar *et al.* (1999) relataram que amostras de *B. fragilis* que produziram bacteriocinas também demonstraram suscetibilidade e sugeriram que o resultado pode significar a produção de mais um tipo de bacteriocina pelas amostras

estudadas. A ausência de atividade das frações extracelulares pode ser explicada pela presença de enzimas proteolíticas, capazes de clivar a substância antagonista.

No decorrer do desenvolvimento desta investigação, após os testes iniciais, foram testados vários outros métodos de extração proteica, na tentativa de aumentar o rendimento do processo, visando à obtenção de quantidade suficiente da substância para a realização das diversas etapas envolvidas na caracterização da mesma. Ainda, as condições de cultivo da amostra produtora, que interferem no rendimento da síntese da substância antagonista, também foram otimizadas (DEVUYST & LEROY, 2007). Assim, a amostra *B. fragilis* D 111.4 foi cultivada por diferentes períodos de incubação e submetida a estresse oxidativo, pela exposição a oxigênio molecular. A lise celular foi promovida, além de sonicação, pelo uso da prensa francesa. As proteínas foram precipitadas por precipitação ácida. Ainda, o material foi submetido a tratamento com cloridrato de guanidina, substância dissociadora de proteínas.

No que se refere ao tempo de incubação, a ausência de expressão de antagonismo pela amostra cultivada por 24 h e a atividade observada para a cultura incubada por 48 h sugere que a produção da substância antagonista ocorre, principalmente, em uma fase mais tardia da curva de crescimento de *B. fragilis* D 111.4. O emprego de estresse oxidativo, precipitação ácida e lise em prensa francesa levou à perda total da atividade antagonista. Por outro lado, o uso de cloridrato de guanidina mostrou, inicialmente, resultados promissores. Entretanto, a impossibilidade de resultado satisfatório do processo de diálise, passo essencial para posterior purificação por cromatografia, representou um impedimento para o uso da metodologia. Esta metodologia foi empregada com sucesso por Hayes *et al.* (1983), que purificaram uma proteína com atividade antagonista a partir de amostra de *B. fragilis*.

Os extratos proteicos C30 e C50 foram submetidos a testes visando à sua caracterização. Estes testes são importantes para avaliação da atividade da substância antagonista em diferentes ambientes, por exemplo, quando desafiados por valores extremos de pH e temperatura.

No que se refere à avaliação de termotolerância, observou-se perda da atividade antibacteriana pela exposição a temperaturas superiores a 50 °C. Resultados similares

foram relatados por Farias *et al.* (1994), que também caracterizaram uma bacteriocina de *B. fragilis* que perdeu sua atividade quando o extrato foi submetido a tratamento com temperaturas acima de 60 °C. A atividade antagonista de C30 e C50 foi preservada em temperaturas mais baixas, como -20 °C e -86 °C, por até 12 meses, último período em que o teste foi realizado. A 37 °C e 25 °C, sua atividade foi mantida por 7 dias.

Observou-se manutenção da atividade antagonista frente a uma ampla faixa de valores de pH, incluindo pH levemente ácido, neutro e básico. Este resultado corrobora relatos prévios relativos a bacteriocinas produzidas por amostras de *Bacteroides* que também apresentaram estabilidade a uma ampla gama de pH e foram inativadas quando expostas a valores de pH superiores a 10 (FARIAS *et al.*, 1992; AVELAR *et al.*, 1999). A estabilidade a diversos valores de pH favorece a proposição de protocolos para cultivo, extração e purificação da substância.

A atividade dos extratos C30 e C50 foi totalmente perdida pela ação de pepsina, proteinase K, papaína, tripsina e  $\alpha$ -quimotripsina. A sensibilidade da substância antimicrobiana a proteases demonstra a natureza proteica da substância antagonista detectada. Segundo Minamikawa *et al.* (2005), as bacteriocinas são inativadas por, pelo menos, uma enzima proteolítica.

Os testes realizados com solventes orgânicos mostraram que nenhum deles foi capaz de inibir a atividade antibacteriana do extrato proteico, sugerindo que não há grupamentos lipídicos associados essenciais para a expressão de atividade antibacteriana. O resultado tem, ainda, relevância prática, indicando que este tipo de substância pode ser empregada nas etapas de purificação.

A CBM das frações intracelulares C30 e C50 foi cerca de 25 vezes superior ao valor da CIM. De acordo com a literatura, um agente é reconhecido como bactericida, habitualmente, se o valor da CBM não é superior a quatro vezes o valor da CIM (FRENCH, 2006). Portanto, estes resultados apontam para uma atividade bacteriostática de C30 e C50 contra as amostras reveladoras utilizadas. Este dado é semelhante ao descrito por Mossie *et al.* (1979 e 1981), que descrevem uma

bacteriocina produzida por *B. fragilis* com atividade de RNase, inibindo a síntese proteica, portanto, com modo de ação bacteriostático.

Para a purificação da substância antagonista presentes no extrato proteico bruto foram realizadas, neste estudo, etapas sucessivas de cromatografia. A aplicação do extrato C30 em cromatografia de troca iônica não gerou frações ativas. Em decorrência do exposto, optou-se por utilizar a fração C50 nas etapas posteriores da investigação. Extratos intracelulares já foram utilizados com sucesso por outros autores do nosso grupo (MIRANDA *et al.*, 1993; FARIAS *et al.*, 1994; RIBEIRO-RIBAS *et al.*, 2009).

Para a purificação da substância antagonista presente no extrato proteico intracelular C50, primeiramente, empregou-se cromatografia de troca iônica em coluna Mono-Q HR 5/5, que possui trocadores aniônicos e apresenta como grupo carregado -CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>). As frações 1 a 4, referentes a um único pico, que não foram capazes de se ligar à coluna, apresentaram atividade antagonista. Estas frações foram eluídas antes do início do gradiente realizado com NaCl 1 M, indicando que a substância ativa presente na fração não foi capaz de interagir com o grupo carregado da coluna. Subsequente à cromatografia de troca iônica, as frações ativas foram submetidas à cromatografia por filtração. A coluna utilizada foi a Superose 12 HR 10/30, formada por uma matriz de agarose, com faixa de separação ótima variando de 1000 Da a 300.000 Da. As frações ativas originadas (2 e 3) localizaram-se em um pico no início do cromatograma, indicando partículas com massas moleculares maiores. Na próxima etapa de purificação, empregou-se a cromatografia líquida de fase reversa em coluna C8 (HPLC), sendo coletadas 50 frações. Uma delas, a fração 2C, manteve-se ativa contra a amostra reveladora.

O resultado do experimento de espectrometria de massas, a partir da fração 2C, apresentou íons de aproximadamente 1300 Da, que geraram um sinal mais intenso. Substância antagonista com massa molecular inferior a 10 kDa também foi detectada no experimento de revelação *in situ* realizado após SDS-PAGE. Diferentemente, o teste realizado empregando-se tubos Amicon, evidenciou atividade em frações com massa molecular superior a 100 kDa. Aparentemente, a estimativa de massa molecular da substância foi superestimada. Tal fato pode ser explicado pela

possibilidade de que um extrato proteico pode conter substâncias de natureza não proteica, como carboidratos e lipídios, que podem se ligar às proteínas. Ainda, algumas proteínas podem permanecer como agregados, com massa molecular elevada, em torno de 30 a 300 kDa. Estes agregados acabam levando à determinação incorreta da massa molecular da proteína durante a cromatografia por gel filtração (HAYES *et al.*, 1983).

A busca realizada por similaridade entre um dos fragmentos sequenciados (VTANRNQWG) e proteínas descritas no banco de dados BLASTP, a partir de fragmentação obtida em cromatografia de fase reversa, resultou em identidade de 100% com uma proteína de secreção do tipo VII.

*Bacteroides* secretam proteínas antibacterianas (BSAPs), que agem em amostras filogeneticamente relacionadas. As bactérias evoluíram uma variedade notável de nanomáquinas sofisticadas para exportar vários fatores de patogenicidade através do envelope celular bacteriano. Como as bactérias usam diferentes mecanismos para competir em comunidades microbianas e a microbiota intestinal é um ecossistema extremamente denso, o contato célula-célula, que depende do SST6, se apresenta como um mecanismo antagônico muito prevalente no intestino. Apenas recentemente, SST6 foi identificado em amostras de *Bacteroides*. SST6 de *Bacteroides* não partilham sequências similares com aquelas de Proteobacteria e, portanto, não são detectáveis por métodos que dependem de comparações proteína-proteína, por exemplo BLASTP, que realizam comparações de perfis estruturais de proteínas já conhecidas. Coyne *et al.* (2016) identificaram um *locus* de SST6 em um elemento integrado conjugado (ICE). Neste estudo, os pesquisadores mostraram que este *locus* era transferido entre quatro espécies diferentes de *Bacteroides* enquanto corresidentes no intestino de seres humanos. Esta foi a primeira demonstração de um *locus* de SST6 sendo transferido entre membros de uma comunidade microbiana natural (COYNE *et al.*, 2016).

Sabe-se relativamente pouco sobre a ecologia da microbiota intestinal humana e a combinação de fatores que regulam a composição de uma comunidade microbiana intestinal. A competição por interferência bacteriana está começando a ser estudada e apreciada como importante contribuição para o entendimento da dinâmica das

populações bacterianas intestinais. De acordo com Roelofs e colaboradores (2016), Bacteroidales produz BSAPs que antagonizam amostras da mesma espécie. Em seu estudo, os pesquisadores mostraram que amostras intestinais produtoras de BSAPs apresentam atividade antagônica contra amostras sensíveis isogênicas, sugerindo que as BSAPs moldam a composição e formação de comunidades intestinais.

Em resumo, os dados demonstram a necessidade de prosseguimento dos estudos sobre produção de proteínas antagonistas por *B. fragilis*, assim como a análise de métodos de extração que permitam a otimização do protocolo de purificação. Estudos futuros são desejáveis para permitir maior entendimento sobre a influência destas proteínas nas relações ecológicas que ocorrem no trato intestinal de seres humanos e seu potencial de aplicação na inibição de amostras associadas à etiopatogenia de infecções intra-abdominais.

## 7 SÍNTESE DE RESULTADOS E CONCLUSÕES

---

- A expressão de atividade antagonista foi detectada apenas para o gênero *Bacteroides*, amostras de *Parabacteroides distasonis* não exibiram atividade antagonista.
- Atividade heteroantagonista foi observada apenas contra amostras filogeneticamente relacionadas e atividade isoantagonista foi detectada apenas para *B. fragilis*. Nenhuma amostra expressou autoantagonismo.
- A exclusão de fatores que poderiam interferir na interpretação dos resultados dos testes fenotípicos reforça a hipótese de que o antagonismo expresso é devido à produção de substância(s) de natureza proteica, possivelmente, bacteriocina(s).
- O extrato intracelular da amostra de *B. fragilis* D111.4 precipitado com sulfato de amônio à saturação de 30% (C30) e de 50% (C50) exibe atividade antagonista contra *B. ovatus* e *B. caccae*, respectivamente.
- C30 e C50 apresentaram baixa estabilidade quando submetidos a tratamentos térmicos, mantiveram-se ativos frente a diferentes valores de pH e diversos solventes orgânicos e sua natureza proteica foi confirmada pela inativação por proteases.
- Os valores de CIM e CBM de C30 e C50 demonstram que os extratos exercem ação bacteriostática.
- Não foi possível realizar a purificação de C30 por etapas de cromatografia.
- Os dados obtidos por SDS-PAGE indicam que a substância antagonista detectada em C50 tem massa molecular menor que 10 kDa e, portanto, é um peptídeo.
- A análise por espectrometria de massas, a partir da fração 2C obtida da cromatografia de fase reversa, revelou íons de aproximadamente 1300 Da, que geraram um sinal mais intenso.

- A busca realizada por similaridade com proteínas descritas no banco de dados BLASTP resultou identidade de 100% de um fragmento (VTANRNQWG) com uma proteína de secreção do tipo VII.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABDEL-MOHSEIN, H.; YAMAMOTO, N.; OTAWA, K.; TADA, C.; NAKAI, Y. Isolation of bacteriocin-like substances producing bacteria from finished cattle-manure compost and activity evaluation against some food-borne pathogenic and spoilage bacteria. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 56, p.151 - 161, 2010.

APOLÔNIO, A. C. M.; CARVALHO, M. A. R.; RIBAS, R. N. R.; SOUSA-GAIA, K. V.; SANTOS, K. V.; LANA, M. A.; NICOLI, J. R.; FARIAS, L. M. Production of antagonistic substance by *Eikenella corrodens* isolated from the oral cavity of human beings with and without periodontal disease. **Journal of Applied of Microbiology**, v. 103, p. 245 - 251, 2007.

APOLÔNIO, A. C. M.; CARVALHO, M. A. R.; BEMQUERER, M. P.; SANTORO, M. M.; PINTO, S. Q.; OLIVEIRA, J. S.; SANTOS, K. V.; FARIAS, L. M. Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by *Eikenella corrodens*. **Journal of Applied of Microbiology**, v. 104, p. 508 - 514, 2008.

AVELAR, K. E. S.; PINTO, L. J. F.; LOBO, L. A.; BASTOS, M. C. F.; DOMINGUES, R. M. C. P.; FERREIRA, M. C. Production of bacteriocin by *Bacteroides fragilis* and partial characterization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 264 - 268, 1999.

BAKIR, M. A.; SAKAMOTO, M.; KITAHARA, M.; MATSUMOTO, M.; BENNO, Y. *Bacteroides dorei* sp. nov., isolated from human faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1639 - 1643, 2006.

BALI, V.; PANESAR, P. S.; BERA, M. B.; KENNEDY, J. F. Bacteriocins: recent trends and potential applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, p. 817 - 834, 2016.

BATDORJ, B.; DALGALARRONDO, M.; CHOISSET, Y.; PEDROCHE, J.; MÉTRO, F.; PREVOST, H.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 837 - 848, 2006.

BRANDELLI, A. Nanostructures as promising tools for delivery of antimicrobial peptides. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, p.731 - 741, 2012.

BEERENS, E. L.; BARON, G. Demonstration of bacteriocins elaborated by anaerobic gram negative bacteria belonging to the *Eggerthella* genus. **Annales Institut Pasteur Paris**, v. 108, p. 255 - 256, 1965.

BERGEY, D. H.; **Bergey's Manual of Determinative bacteriology**. The Williams and Wilkins, 1923.

BOOTH, S. J.; JOHNSON, J. L.; WILKINS, T. D. Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 11, p. 718 - 724, 1977.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 - 254, 1976.

BRITTON, H. T. S.; ROBINSON, R. A. **Journal of the Chemical Society**, 1931.

BROOK, I. Spectrum and treatment of anaerobic infections. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 22, p. 1 - 13, 2016.

CANNY, G. O.; McCORMICK, B. A. Bacteria in the intestine, helpful residents or enemies from within? **Infection and immunity**, v. 76, p. 3360 - 3373, 2008.

CAO, Y.; ROCHA, E. R. ; JEFFREY, C. S. Efficient utilization of complex n-linked glycans is a selective advantage for *Bacteroides fragilis* in extraintestinal infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 12901 - 12906, 2014.

CASCALES, E.; BUCHANAN, S. K.; DUCHE, D.; KLEANTHOUS, C.; LLOUBES, R.; POSTLE, K.; RILEY, M.; SLATIN, S.; CAVARD, D. Colicin biology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, p.158 - 229, 2007.

CASTELLANI, A.; CHALMERS A. **Journal Manual of Tropical Medicine**, v. 3, 959 - 960, 1919.

CATO, E. P.; JOHNSON, J. L. Reinstatement of species rank for *Bacteroides fragilis*, *B. ovatus*, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron* and *B. vulgatus* designation of neotype strains for *Bacteroides fragilis* (Veillon and Zuber) Castellani and Chalmers and *Bacteroides thetaiotaomicron* (Distaso) Castellani and Chalmers. Intern. **Journal of Systematic Bacteriology**, v.26, p. 230 - 237, 1976.

CHATZIDAKI-LIVANIS, M.; COYNE, M. J.; COMSTOCK, L. E. An antimicrobial protein of the gut symbiont *Bacteroides fragilis* with a MACPF domain of host immune proteins. **Molecular Microbiology**, v. 94, p. 1361 - 1374, 2014.

CHATZIDAKI-LIVANIS, M.; GEVA-ZATORSKY, N.; COMSTOCK, L. E. *Bacteroides fragilis* type VI secretion systems use novel effector and immunity proteins to antagonize human gut Bacteroidales species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, p. 3627 - 3632, 2016.

CLEVELAND, J. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1 - 20, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved Standard - Seventh Edition**, v. 27 (2). CLSI document M11-A7 (ISBN 1-56238-626-3). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2012.

COOPER, D. G.; MAC DONALD, C. R.; DUFF, R. J. B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 408 - 412, 1981.

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

COTTER, P. D. Bioengineering: a Bacteriocin perspective. **Bioengineered**, v. 3:6, p. 313 - 319, 2012.

COTTER, P. D. An 'Upp'-turn in bacteriocin receptor identification. **Molecular Microbiology**, v. 92, p.1159 - 1163, 2014.

COYNE, M. J.; ROELOFS, K. G.; COMSTOCK, L. E. Type VI secretion systems of human gut Bacteroidales segregate into three genetic architectures, two of which are contained on mobile genetic elements. **BMC Genomics**, v. 17, p. 1 - 21, 2016.

DE VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. **Journal Molecular Microbiology Biotechnology**, v. 13, p. 194 - 199, 2007.

DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. **Nature**, v. 449, p. 18, 2007.

DESRIAC, F.; DEFER, D.; BOURGOUGNON, N.; BRILLET, B.; CHEVALIER, P.; FLEURY, Y. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. **Archive of Marine Drugs**, v. 8, p. 1153 - 1177, 2010.

DINIZ, C. G.; CARA, D. C.; NICOLI, J. R.; FARIAS, L. M.; DE CARVALHO, M. A. R. Effect of metronidazole on the pathogenicity of resistant *Bacteroides* strains in gnotobiotic mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2419 - 2423, 2000.

DOBSON, A.; COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocin production: a probiotic trait? **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p. 1 - 6, 2012.

DONOVAN, S. M.; WANG, M.; LI, M.; FRIEDBERG, I.; SCHWARTZ, S. L.; CHAPKIN, R. S. Host-Microbe Interactions in the Neonatal Intestine: Role of Human Milk Oligosaccharides. **Advances in Nutrition**, v. 3, p. 450 - 455, 2012.

FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; DAMASCENO, C. A. V.; CISALPINO, E.O.; VIEIRA, E. C. Bacteriocin-like Activity of *Bacteroides fragilis* group isolated from marmosets. **Research in Microbiology**, v.143, p.151 - 59, 1992.

FARIAS, L. M.; TOTOLA, A. H.; MIRANDA, C. M. S.; CARVALHO, M. A. R.; DAMASCENO, C. A. V.; TAVARES, C. A. P.; CISALPINO, E. O.; VIEIRA, E. C. Extraction, partial purification and characterization of a bacteriocin (fragilicin) produced by a strain of *Bacteroides fragilis* isolated from *Callithrix penicillata*. **Research in Microbiology**, v. 145, p. 9 - 16, 1994.

FATHI, P.; WU, S. Isolation, detection, and characterization of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in clinical samples. **The Open Microbiology Journal**, v. 10, p. 57 - 63, 2016.

FDA (**US Food and Drug Administration**). Department of Health and Human Services. Agency Response Letter GRAS Notice nº GRN000065. 2001. Available at: [http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras\\_notices/grn0065.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/grn0065.pdf). Accessed May 28, 2011.

FDA (**US Food and Drug Administration**). Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. **Federal Register**, v. 53, p. 11247 - 11251, 1988.

FISHER, C. K.; MEHTA, P. Identifying keystone species in the human gut microbiome from metagenomic time series using sparse linear regression. **PLoS ONE**, v. 9, p. 102 - 451, 2014.

FRENCH, G. L. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections: the potential role of daptomycin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 1107 - 1117, 2006.

GERRITSEN, J.; SMIDT, H.; RIJKERS, G. T.; DE VOS, W. M. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. **Genes & Nutrition**, v. 6, p. 209 - 240, 2011.

GILLOR, O.; ETZION, J. A. C.; RILEY, M. A The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 591 - 606, 2008.

GREEN, A. A.; HUGES, W. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. **Methods in Enzymology**, v.1, p. 67 - 90, 1955.

HAWLENA H.; BASHEY, F.; LIVELY, C. M.; Bacteriocin-mediated interactions within and between coexisting species. **Ecology and evolution**, v. 2, p. 2516 - 2521, 2012.

HAMADA, S.; OOSHIMA, T. Production and properties of bacteriocins (mutacins) from *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, v. 20, p. 641 - 648, 1975.

HAVLIS, J. *et al.* Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 1300 - 1306, 2003.

HAYES, T. J.; CUNDY, K. R.; FERNANDES, P. B.; HOOBER, J. K. Purification and characterization of a bacteriocin from *Bacteroides fragilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 155, p. 1171 - 1177, 1983.

HAYES, C. S.; KOSKINIEMI, S.; RUHE, Z. C.; POOLE, S. J.; LOW, D. A. Mechanisms and biological roles of contact-dependent growth inhibition systems. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, v. 4, 2014.

HEGARTY, J. W.; GUINANE, C. M.; ROSS, R. P.; HILL, C.; COTTER, P. D. Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait? **F1000 Research**, v. 5, p. 2587, 2016.

HOLDEMAN, L. V.; CATO, E. P.; MOORE, W. E. Taxonomy of anaerobes; present state of the art. **Review Infect Disease**, v. 6, p. 53 - 510, 1984.

HOLDEMAN, L. V.; MOORE, W. E. C. GENUS I. *Bacteroides*, Castellani and Chalmers 1919. In: BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E. (Ed.). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8 ed. Baltimore: The Williams and Wilkins, p. 385 - 404, 1974.

HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. Baltimore: The Williams and Wilkins, p. 5 - 18, 1994.

ISHIKAWA, E. ; MATSUKI, T.; KUBOTA, H.; MAKINO, H.; SAKAI, T.; OISHI, K.; KUSHIRO, A.; FUJIMOTO, J.; WATANABE, K.; WATANUKI, M.; TANAKA, R. Ethnic diversity of gut microbiota: species characterization of *Bacteroides fragilis* group and genus *Bifidobacterium* in healthy Belgian adults, and comparison with data from Japanese subjects. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, p. 265 - 270, 2013.

JANDHYALA, M. S.; TALUKDAR, R.; SUBRAMANYAM, C.; VUYYURU, H.; SASIKALA, M.; REDDY, D. N. Role of the normal gut microbiota. **World Journal Gastroenterology**, v. 7, p. 8787 - 8803, 2015.

JOUSIMIES-SOMER, H.; SUMMANEN, P. Recent taxonomic changes and terminology update of clinically significant anaerobic gram-negative bacteria (excluding spirochetes). **Clinical Infectious Diseases**, v. 1, p. 17 - 21, 2002

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. Polysaccharide A of *Bacteroides fragilis*: Actions on Dendritic Cells and T Cells. **Molecular Cell**, v. 54, p. 206 - 207, 2014.

KLAESSIG, F.; MARRAPESE, M.; ABE, S. Current perspectives in nanotechnology terminology and nomenclature. **Nanotechnol Standards**, v. 5, p. 21 - 52, 2011.

MASLOWSKI, K. M.; VIEIRA, A. T.; AYLWIN, N. G.; JAN KRANICH, J.; SIERRA, F.; YU, D.; SCHILTER, H. C.; ROLPH, M. S.; MACKAY, F.; ARTIS, D.; RAMNIK J.; XAVIER, R. J.; TEIXEIRA, M. R.; MACKAY, C. R. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemo attractant receptor GPR43. **Nature**, v. 461, p. 1282 - 1286, 2009.

LAN, P. T.; SAKAMOTO, M.; SAKATA, S.; BENNO, Y. *Bacteroides barnesiae* sp. nov., *Bacteroides salanitronis* sp. nov. and *Bacteroides gallinarum* sp. nov., isolated from chicken caecum. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2853 - 2859, 2006.

LEY, R. E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; TURNBAUGH, P. J.; RAMEY, R. R.; BIRCHER, J. S.; SCHLEGEL, M. L.; TUCKER, T. A.; SCHRENZEL, M. D.; KNIGHT, R. Evolution of mammals and their gut microbes. **Science**, v. 320, p. 1647 - 1651, 2008.

LEVISON, M. E.; LEVISON, J. H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, p. 791 - 815, 2009.

LIMA, F. L.; CARVALHO, M. A.; APOLÔNIO, A. C.; BEMQUERER, M. P.; SANTORO, M. M.; OLIVEIRA, J. S.; ALVIANO, C. S.; FARIAS, L. M. Actinomycetemcomitin: a new bacteriocin produced by *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p.103 - 110, 2008.

LOBO, L. A.; BENJAMIM, C. F; OLIVEIRA A. C. The interplay between microbiota and inflammation: lessons from peritonitis and sepsis. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, p. 1 - 8, 2016.

MACFARLAND, L. V. Normal flora: diversity and functions. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 12, p.193 - 207, 2000.

MAJEED, H.; LAMPERT, A.; GHAZARYAN, L.; GILLOR, O. The Weak Shall Inherit: Bacteriocin-mediated interactions in bacterial populations. **PLoS ONE**, v. 8, p. 6383 - 6387, 2013.

MASLOWSKI, K. M.; VIEIRA, A. T.; NG A.; KRANICH, J.; SIERRA, F.; YU, D.; SCHILTER, H. C.; ROLPH, M. S.; MACKAY, F.; ARTIS, D.; XAVIER, R. J.; TEIXEIRA, M. M.; MACKAY, C. R. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemo attractant receptor GPR43. **Nature**, v. 461, p.1282 - 1286, 2009.

MAYER-HARTING, A.; HEDGES, A. J.; BERKELEY, R. C. W. Methods for studying bacteriocins. **Methods in Microbiology**, v. 7, p. 315 - 422, 1972.

MAZMANIAN, S. K.; HSIAO, E. I.; MCBRIDE, S. W.; HSIEN, S.; SHARON, G.; HYDE, E. R.; MCCUE, T.; CODELLI, J. A.; CHOW, J.; REISMAN, S. E.; PETROSINO, J. F.;



PATTERSON, P. H. The microbiota modulates gut physiology and behavioral abnormalities associated with autism. **Cell**, v. 155, p.1451 - 1463, 2013.

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

MINAMIKAWA, M.; KAWAI, Y.; INOUE, N.; YAMAZAKI, K. Purification and characterization of warnericin RB4, anti-*Alicyclobacillus* bacteriocin, produced by *Staphylococcus warneri* RB4. **Current Microbiology**, v. 51, p. 22 - 26, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 29, de 22 de janeiro de 1996. Resolve aprovar a extensão de uso da nisina com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12.5 mg/kg. **Diário Oficial**, Brasília, 23 jan. 1996, Seção 1.

MIRANDA, C. M.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A.; DAMASCENO, C. A.; TOTOLA, A. H.; TAVARES, C. A.; CISALPINO, E. O.; VIEIRA, C. E. Purification and partial characterization of a bacteriocin isolated from *Bacteroides ovatus* H47. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 169 - 174, 1993.

MOSSALLAM, F.; AMER, E. I.; DIAB, R. G. Potentiated antimicrosporidial activity of *Lactobacillus acidophilus* CH1 bacteriocin using gold nanoparticles. **Experimental Parasitology**, v. 144, p. 14 - 21, 2014.

MOSSIE, K. G.; JONES, D. T.; ROBB, F. T.; WOODS, D. R. Characterization and mode of action of a bacteriocin produced by a *Bacteroides fragilis* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 16, p. 724 - 730, 1979.

MOSSIE, K. G.; JONES, D. T.; ROBB, F. T.; WOODS, D. R. Inhibition of ribonucleic acid polymerase by a bacteriocin from *Bacteroides fragilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 20, p. 437 - 442, 1981.

NAKANO, M. M.; MARAHIEL; M. A.; ZUBER, P. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. **Journal Bacteriology**, v. 170, p. 5662 - 5668, 1988.

NAKANO, V.; IGNACIO, A.; FERNANDES, M. R.; FUKUGAITI, M.H.; AVILA-CAMPOS, M. J. Intestinal *Bacteroides* and *Parabacteroides* species producing antagonistic substances. **Current Trends in Microbiology**. 2013.

NAKAMURA, T.; FUJIMURA, S.; OBATA, N.; YAMAZAKI, N. Bacteriocin-like substance (melaninocin) from oral *Bacteroides melaninogenicus*. **Infection and Immunity**, v. 31, p. 28 - 32, 1981.

NDAMUKONG, I. C.; GEE, J.; SMITH C. J. The ECF Sigma Factor EcfO, protects *Bacteroides fragilis* against oxidative stress. **Journal of Bacteriology**, v. 195, p. 145 - 155, 2012.

NICOLETTI, G.; NICOLOSI, D.; ROSSOLINI, G. M. Eziologia, epidemiologia e diagnostica microbiologica delle infezioni intraddominali. Intra-abdominal infections: etiology, epidemiology, microbiological diagnosis and antibiotic resistance issues. **Journal Le Infezioni in Medicina**, v.1, 2008.

NISHIE, M.; NAGAO, J.; SONOMOTO, K. Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. **Biocontrol Science**, v. 17, p. 1 - 16, 2012.

OLIVEIRA, A. A.; FARIAS, L. M.; NICOLI, J. R.; COSTA, J. E.; CARVALHO, M. A. Bacteriocin production by *Fusobacterium* isolates recovered from the oral cavity of human subjects with and without periodontal disease and of marmosets. **Research in Microbiology**, v. 149, p. 585-594, 1998.

PAPAPARASKEVAS, J.; KATSANDRI, A.; PANTAZATOU, A.; STEFANO, I.; AVLAMIS, A.; LEGASKIS, N. J.; TSAKRIS, A. Epidemiological characteristics of infections caused by *Bacteroides*, *Prevotella* and *Fusobacterium* species: a prospective observational study. **Anaerobe**, v. 3; p. 113 - 117, 2011.

PASTEUR, L.; JOUBERT, J. F. Charbonnet septicemia. **Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de Paris**, v. 85, p.101 - 115, 1877.

PRASAD, S.; MORRIS, P. C.; HANSEN, R.; MEADEN, P. G.; AUSTIN, B. A novel bacteriocin-like substance (BLIS) from a pathogenic strain of *Vibrio harveyi*. **Microbiology**, v. 151, p. 3051 - 3058, 2005.

QUINES, L. K. M. *et al.* Métodos de extração de poli-hidroxicanoatos a partir de biomassa bacteriana. **Quimica Nova**, p. 1 - 12, 2015.

RIBEIRO-RIBAS, R. N.; VIEIRA, M. A. R.; APOLONIO, C. A.; MAGALHAES, P. P.; OLIVEIRA, J. S.; FARIAS, L. M. Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by an oral *Fusobacterium nucleatum* isolated. **Journal of Applied Microbiology**, v. 7, p. 145 - 152, 2009.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. **Biochimie**, v. 84, p. 357 - 364, 2002.

ROCES, C.; RODRÍGUEZ, A.; MARTÍNEZ, B. Cell wall-active bacteriocins and their applications beyond antibiotic activity. **Probiotics and Antimicrobial Proteins Journal**, v. 4, p. 259 - 272, 2012.

RODRIGUES C.; SICILIANO, F. R.; ZEIGLER, R.; STRABELLI, T. M. V. *Bacteroides fragilis* endocarditis: a case report and review of literature. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, p. 100 - 104, 2012.

ROELOFS, K. G.; COYNE, M. J.; GENTYALA, R. R.; CHATZIDAKI-LIVANIS, M.; COMSTOCK, L. E. Bacteroidales secreted antimicrobial proteins target surface molecules necessary for gut colonization and mediate competition in vivo. **MBio**, v. 7, p. 1055 - 1066, 2016.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 313 - 323, 2009.

RUSSELL, A. B.; PETERSON, S. B.; MOUGOUS, J. D. Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, p. 137 - 148, 2014.

SAAVEDRA, J. M.; DATTILO, A. M. Early Development of Intestinal Microbiota: Implications for Future Health. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 41, p. 717 - 731, 2012.

SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Nat Rev Immunol Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1599 - 1605, 2006.

SARANIYA, A.; JEEVARATNAM, K. Optimization of nutritional and non nutritional factors involved for production of antimicrobial compounds from *Lactobacillus pentosus* SJ65 using response surface methodology. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 45, p. 81 - 88, 2014.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v.166, p. 368 - 379, 1987.

SILVA, V. L.; DINIZ, C. G.; SANTOS, S. G.; GOMES, R. M. F.; NICOLI, J. R.; MAGALHAES, P. P. Physiological alterations of a *Fusobacterium nucleatum* strain exposed to oxidative stress. **Journal Applied of Microbiology**, v. 103, p. 20 - 26, 2005.

SHEVCHENKO, A. *et al.* Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 850 - 858, 1996.

SONG, Y. L.; LIU, C. X.; MC TEAGUE, M.; FINEGOLD, S. M. "*Bacteroides nordii*" sp. nov, and "*Bacteroides salyersae*" sp. nov. isolated from clinical specimens of human intestinal origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5565 - 5570, 2004.

SONOMOTO, K.; NISHIE, M.; NAGAO, J. I. Antibacterial peptides “Bacteriocins”: an overview of their diverse characteristics and applications. **Biocontrol Science**, v. 17, p. 1 - 16, 2012.

SOMMER, F.; BÄCKHED, F. The gut microbiota - masters of host development and physiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, 2013.

STEERS, E.; FOLTZ, E.; GRAVES, B. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 9, p. 307 - 311, 1959.

STUBBENDIECK, R. M.; STRAIGHT, P. D. Multifaceted interfaces of bacterial competition. **Journal of Bacteriology**, v. 198, p. 2145 - 2155, 2016.

STUBBENDIECK, R. M.; VARGAS-BAUTISTA, C.; STRAIGHT, P. D. Bacterial Communities: Interactions to Scale. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1234, 2016.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, p. 1 - 14, 2005.

TELESFORD, K. M.; YAN, W.; OCHOA-REPARAZ, J.; PANT, A.; KIRCHER, C.; CHRISTY, M. A.; BEGUM-HAQUE, S.; KASPER, D. L.; KASPER, L. H. A commensal symbiotic factor derived from *Bacteroides fragilis* promotes human CD39(+)Foxp3(+) T cells and Treg function. **Gut Microbes**, v. 6, p. 234 - 242, 2015.

TUÑÓN, P.; JOHANSSON, K. E. Yet another improved silver staining method for the detection of proteins in polyacrylamide gel. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 9, p. 171 - 179, 1984.

TURNER, J. W.; JORDAN, H. V. Bacteriocin-like activity within the genus *Actinomyces*. **Journal of Dental Research**, v. 60, p. 1000 - 1007, 1981.

VALEFF, Carolina Nicolai. **Atividade antagonista de extrato intracelular obtido de *Fusobacterium necrophorum*: modo de ação e caracterização bioquímica**. 2011.

144f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

VEILLON, A.; ZUBER, A. Recherches sur quelques microbes strictement aérobie set leur role en pathologie. **Archive Medicine Experimental**, v. 10, p. 517 - 545, 1898.

VIEIRA, C. A. **Avaliação da produção, *in vitro*, de substância tipo-bacteriocina por *Fusobacterium necrophorum***. 2008. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

WALSTAD, D. L.; REITZ, R. C.; SPARLING, P. F. Growth inhibition among strains of *Neisseria gonorrhoeae* due to production of inhibitory free fatty acids and lysophosphatidylethanolamine: absence of bacteriocins. **Infection and Immunity**, v. 10, p. 481 - 488, 1974.

WEISS, J. E.; RETTGER, L. F. The Gram-negative *Bacteroides* of the intestine. **Journal of Bacteriology**, v. 33, p. 423 - 434, 1937.

WEXLER, H. M. *Bacteroides*; the good, the bad and the nitty-gritty. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 593 - 621, 2007.

WEXLER, A. G.; BAO, Y.; WHITNEY, J. C.; BOBAY, L. M.; XAVIER, J. B.; SCHOFIELD, W. B. Human symbionts inject and neutralize antibacterial toxins to persist in the gut. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2016.

WICK, E. C.; SEARS, C. L. *Bacteroides* spp. and diarrhea. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 5, p. 470 - 474, 2010.

WILSON, M. M.; ANDERSON, D. E.; BERNSTEIN, H. D. Analysis of the Outer Membrane Proteome and Secretome of *Bacteroides fragilis* Reveals a Multiplicity of Secretion Mechanisms. **PLoS ONE**, v. 10, 2015.

YANG, S. C.; LIN, C. H.; SUNG, C. T.; FANG, J. Y. Antibacterial Activities of Bacteriocins: application in Foods and Pharmaceuticals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1 - 10, 2014.

WOLSKA, K. I.; GRZES, K.; KUREK., A. Synergy between novel antimicrobials and conventional antibiotics or bacteriocins. **Polish Journal of Microbiology**, v. 61, p. 95 - 104, 2012.

YU, S.; GAO, N. Compartmentalizing intestinal epithelial cell toll-like receptors for immune surveillance. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 17, p. 3343 - 3353, 2015.

ZACHAROF, M. P.; COSS, G. M.; MANDALE, S. J.; LOVITT, R. W. Separation of Lactobacilli bacteriocins from fermented broths using membranes. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1252 - 1261, 2013.