

NATÁLIA ROCHA GUIMARÃES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ATIVIDADE ANTAGONISTA DE *Acinetobacter baumannii* CONTRA
AMOSTRAS DE *Acinetobacter* RESISTENTES A DROGAS
ANTIMICROBIANAS**

Belo Horizonte

2016

Natália Rocha Guimarães

Atividade antagonista de *Acinetobacter baumannii* contra amostras de
Acinetobacter resistentes a drogas antimicrobianas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Paula Prazeres Magalhães

Coorientador: Luiz de Macêdo Farias

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

Belo Horizonte

2016

COLABORAÇÃO

Daniel Moreira Santos
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Jade Guedes Scarpelli
Iniciação Científica

Jamil Silvano Oliveira
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Simone Gonçalves Santos
Departamento de Microbiologia

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

APOIO FINANCEIRO

CNPq
CAPES
FAPEMIG
PRPq/UFMG

À minha família, que com muita luta, permitiu que eu chegasse até aqui. Sem vocês, não conseguiria.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora Aparecida, pela ajuda incondicional, estando ao meu lado em todos os momentos, permitindo que prosseguisse e alcançasse mais este sonho.

Aos meus familiares, Jorge, Jussara e Marcos, pelo incentivo, apoio e dedicação, abdicando, muitas vezes, dos seus sonhos em função dos meus. Não conseguiria sem vocês por perto!

Ao André, pelo companheirismo e paciência, incentivando-me e ajudando-me em todos os momentos. Obrigada por aceitar e respeitar minha ausência!

Aos meus orientadores, Professora Paula e Professor Luiz, por conceder-me a oportunidade de fazer parte deste grupo tão renomado de pesquisa. Pela dedicação, apoio e assistência, dedicando parte do tempo em prol das minhas dúvidas e dificuldades. Pela ansiedade demonstrada durante a execução dos experimentos, esperando que alcançasse sempre resultados brilhantes e, claro, pelo carinho. Minha admiração será eterna, vocês são exemplos, como pessoa e profissional. Obrigada por se comportarem como verdadeiros PAIS.

À Professora Simone, sempre solícita e gentil. Obrigada por ceder as amostras para realização do estudo, sem sua contribuição, não conseguiria alcançar resultados tão importantes.

À minha filha do coração, “Jadezoca”, imprescindível para execução dos experimentos. Sem sua ajuda não conseguiria prosseguir e atingir este objetivo. Obrigada pela amizade, dedicação e disponibilidade em todos os momentos de necessidade.

Ao Jamil, pela disponibilidade, pelos ensinamentos bioquímicos e pela contribuição direta nos processos de purificação, dedicando parte do seu tempo em prol da execução deste estudo.

Ao Daniel, por sanar minhas dúvidas de purificação e por estar sempre disponível para analisar minhas amostras no espectro de massas.

Às Professoras, Vera e Regina, por sempre disporem de um tempinho para esclarecer minhas dúvidas, contribuindo de forma direta para o sucesso dos experimentos. Obrigada pelo carinho!

Ao Joaquim, pela disponibilidade, atenção e conhecimentos bioquímicos repassados.

Ao Professor Edmar Chartone de Souza, à Professora Ana Carolina Morais Apolônio e à Professora Sílvia Beleza de Moura, por terem aceitado compor a banca examinadora deste trabalho.

À Vanessa, sempre tão prestativa. Seu jeito meigo e educado de ser alegravam o ambiente. Obrigada; sinto sua falta.

À Marcela, por confiar e encaminhar-me a este mundo tão sonhado, concedendo-me a oportunidade de conhecer e participar de projetos tão interessantes e entusiasmantes. Por guiar-me nos momentos de dificuldade, incentivando-me a nunca desistir dos meus objetivos e, acima de tudo, por toda ajuda concedida durante estes dois anos de caminhada.

À Anna Gabriella e à Jaqueline, pelos constantes ensinamentos ao longo desta jornada, sanando diversas dúvidas e contribuindo para a realização dos meus objetivos. À Anna, em especial, por ajudar-me nos momentos de dificuldade, contribuindo diretamente com conhecimentos e técnicas, pelas conversas descontraídas e divertidas.

À Patrícia, minha “irmãzinha do coração”. Obrigada pela amizade e pela constante ajuda. Sem você seria difícil realizar todos os experimentos; seus ensinamentos e opiniões foram muito importantes.

À Silvinha, à Thaysa e ao Samir, pelas agradáveis conversas, pelo companheirismo e amizade. Obrigada!

Às alunas de iniciação científica, pelo ótimo convívio, pela constante ajuda nos experimentos e, claro, pelas divertidas e animadas conversas, em especial, a minha primeira filha, “Dayse”, pelo companheirismo e amizade durante o período em que passamos juntas.

Às minhas grandes companheiras de república, à “Mirnoça” e à Naty, obrigada pelo companheirismo e amizade. À Mirna, em especial, pelos ensinamentos e discussões sobre *Acinetobacter baumannii*.

À República Village São Lucas, pela amizade, pelos bons momentos e, claro, pelas deliciosas comidas do “Fabito”. A todos os amigos do Laboratório MOA, pela harmônica e animada convivência, sendo importantes “válvulas de escape” nos momentos de cansaço e desânimo.

Aos meus queridos amigos, Thaís, Gugu, Thaísa e Camilinha, pelo incentivo e amizade, vocês são essenciais em minha vida. A Thaísa, em especial, pelas diversas caronas e experiências compartilhadas.

À UFMG e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, em especial, aos mestres e aos funcionários do Departamento.

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro.

"Girassol leva tempo se preparando, cresce devagar, enfrentando mil inimigos, formigas vorazes, caracóis do mal, ventos destruidores. Depois de meses, um dia, pá! Lá está o botãozinho todo catita, parece que já vai abrir".

Caio Fernando Abreu

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 GÊNERO <i>Acinetobacter</i>	21
1.1.1 Perspectiva Histórica	21
1.1.2 Características Gerais	22
1.1.3 Taxonomia	23
1.1.4 A Espécie <i>Acinetobacter baumannii</i>	24
1.2 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs)	28
1.2.1 Bacteriocinas	29
1.2.1.1 Histórico	29
1.2.1.2 Conceito e Características	29
1.2.1.3 Bacteriocinas Sintetizadas por Bactérias Gram Negativas	31
1.2.1.4 Bacteriocinas Sintetizadas por Bastonetes Gram Negativos Não Fermentadores	33
1.2.1.5 Potencial Biotecnológico e Papel Ecológico das Bacteriocinas	34
1.2.2 Lipopeptídios	37
2 JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	42

4.1	ORIGEM E MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS TESTE	42
4.1.1	Confirmação da Identificação das Amostras Teste	42
4.2	PESQUISA DE ATIVIDADE ANTAGONISTA	44
4.3	EXCLUSÃO DE POSSÍVEIS FATORES DE INTERFERÊNCIA	47
4.3.1	Ácidos Graxos	47
4.3.2	Bacteriófagos	47
4.3.3	Clorofórmio	48
4.3.4	Peróxido de Hidrogênio	48
4.4	CURVA DE PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) EM MEIO SÓLIDO	49
4.5	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	49
4.5.1	Precipitação Ácida	52
4.6	TESTE DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DO EXTRATO BRUTO	52
4.7	TITULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DO EXTRATO BRUTO	53
4.8	ESPECTRO DE AÇÃO DO EXTRATO BRUTO	53
4.9	DOSAGEM PROTEICA	54
4.10	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO	56
4.10.1	Temperatura	56
4.10.2	Ph	56
4.10.3	Enzimas Proteolíticas	57
4.10.4	Solventes Orgânicos	58
4.11	ESTUDO DO MODO DE AÇÃO DO EXTRATO BRUTO	58
4.11.1	Determinação da CIM	58
4.11.2	Determinação da CBM	59
4.11.3	Cinética de Ação	60
4.12	PURIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO	60
4.12.1	Cromatografia em Coluna de Fase Reversa Supelcosil™	61
4.12.2	“Recromatografia” em Coluna de Fase Reversa Sephasil™ Peptide	61
4.13	SDS – PAGE	62
4.14	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	62
5	RESULTADOS	64
5.1	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS TESTE	64

5.2	PESQUISA DE ATIVIDADE ANTAGONISTA	66
5.3	EXCLUSÃO DE POSSÍVEIS FATORES DE INTERFERÊNCIA	71
5.3.1	Ácidos Graxos	71
5.3.2	Bacteriófagos	71
5.3.3	Clorofórmio	71
5.3.4	Peróxido de Hidrogênio	73
5.4	CURVA DE PRODUÇÃO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S)	73
5.5	EXTRAÇÃO PROTEICA: PRECIPITAÇÃO ÁCIDA	73
5.6	AVALIAÇÃO E TITULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DO EXTRATO BRUTO	75
5.7	AVALIAÇÃO DO ESPECTRO DE AÇÃO DO EXTRATO BRUTO	75
5.8	DOSAGEM PROTEICA	80
5.9	CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DO EXTRATO BRUTO	80
5.9.1	Influência da Temperatura	80
5.9.2	Influência do Ph	80
5.9.3	Influência de Enzimas Proteolíticas	81
5.9.4	Influência de Solventes Orgânicos	81
5.10	ESTUDO DO MODO DE AÇÃO DO EXTRATO BRUTO	81
5.10.1	Determinação da CIM	81
5.10.2	Determinação da CBM	82
5.10.3	Cinética de Ação	82
5.11	PURIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO	83
5.11.1	Cromatografia em Coluna de Fase Reversa Supelcosil™	83
5.11.2	“Recromatografia” em Coluna de Fase Reversa Sephasil™	
	Peptide	93
5.12	SDS-PAGE – TESTE DE ATIVIDADE <i>IN SITU</i>	106
5.13	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	109
6	DISCUSSÃO	112
7	SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO	124
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Métodos de extração empregados para obtenção de extrato proteico bruto de <i>Acinetobacter baumannii</i> .	50
Quadro 2	Condições de cultivo empregadas para recuperação das amostras reveladoras.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Condições de cultivo utilizadas para avaliação da expressão de antagonismo por amostras clínicas de <i>Acinetobacter baumannii</i> .	46
Tabela 2	Atividade isoantagonista da amostra de <i>Acinetobacter baumannii</i> 397, avaliada pelo método de sobrecamada, em diferentes valores de temperatura e de pH.	68
Tabela 3	Cinética de ação do extrato bruto contra a amostra de <i>A. baumannii</i> 294.	82
Tabela 4	Primeira sequência de purificação em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil™: frações ativas e <i>pools</i> correspondentes.	84
Tabela 5	Segunda sequência de purificação: frações ativas originadas da “recromatografia” em coluna de fase reversa LC-18 Sephasil™ Peptide.	94
Tabela 6	Terceira sequência de purificação: frações ativas originadas da “re-recromatografia” em coluna de fase reversa LC-18 Sephasil™ Peptide.	102

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Detecção do *bla*_{OXA51}, gene intrínseco de *Acinetobacter baumannii*, por PCR, *amplicons* de 353 pb observados em todas as amostras. 65
- Figura 2 Atividade isoantagonista da amostra de *Acinetobacter baumannii* 397. Método de sobrecamada, BHIA-S, pH 6,5 (A), 7,2 (B, C, D, E), 8 (F, G), à 37 °C, por 24 h. 67
- Figura 3 Atividade isoantagonista da amostra de *Acinetobacter baumannii* 397. Método de sobrecamada, BHIA-S suplementado com extrato de levedura, pH 7,2, 25 °C, 24 h. 69
- Figura 4 Atividade isoantagonista da amostra de *Acinetobacter baumannii* 397 contra *A. baumannii* 294. 70
- Figura 5 Teste para exclusão de possíveis fatores de interferência. Avaliação da atividade antagonista de: A, ácidos graxos; B, bacteriófagos; C, clorofórmio; D, peróxido de hidrogênio (H₂O₂). 72
- Figura 6 Avaliação da produção de substância(s) antagonista(s) ao longo da curva de crescimento da amostra *A. baumannii* 397, em meio sólido. 74
- Figura 7 Teste de atividade antagonista e titulação do extrato bruto. 76
- Figura 8 Avaliação do espectro de ação do extrato bruto. Amostra produtora, *Acinetobacter baumannii* 397, amostras reveladoras, *A. baumannii*, recuperadas de hemoculturas de pacientes internados no Hospital de Pronto-Socorro João XXIII, no período de dezembro de 2008 a junho de 2009. 77
- Figura 9 Avaliação do espectro de ação do extrato bruto. Amostra produtora, *Acinetobacter baumannii* 397, amostras reveladoras, *A. baumannii* 100A, 62, 309, 356A e 6, recuperadas de hemoculturas de pacientes internados no Hospital de Pronto-Socorro João XXIII e as demais, oriundas de pacientes colonizados e com doença infecciosa associada à bactéria, internados no Hospital das Clínicas da UFMG, no período de

	agosto de 2012 a maio de 2013.	78
Figura 10	Avaliação do espectro de ação do extrato bruto. Amostra produtora, <i>Acinetobacter baumannii</i> 397, amostras reveladoras, <i>A. baumannii</i> 16, 43, 15, 2, 3, recuperadas de pacientes colonizados e com doença infecciosa associada à bactéria, internados no Hospital das Clínicas da UFMG, no período de agosto de 2012 a maio de 2013, e <i>A. junii</i> D3 e <i>A. junii</i> B10 ⁻⁴ .1, oriundas do líquido lixiviado proveniente de resíduos potencialmente infectantes de uma instituição de assistência à saúde odontológica de Belo Horizonte, MG.	79
Figura 11	Determinação da CIM do extrato bruto, título de 80 UA/mL. Amostra produtora <i>A. baumannii</i> 397, amostra reveladora <i>A. baumannii</i> 294.	83
Figura 12	Atividade antagonista das frações C2 a C6, aqui representadas pelas corridas: A, 13; B, 17 e C, 21, obtidas por cromatografia de fase reversa, coluna LC-8 Supelcosil TM . Amostra reveladora <i>A. baumannii</i> 294.	85
Figura 13	Atividade antagonista das frações C2 a C12, aqui representadas pelas corridas: A, 24; B, 25 e 26; C, 27; D, 28.1; E e F, 28.2, obtidas por cromatografia de fase reversa, coluna LC-8 Supelcosil TM . Amostra reveladora <i>A. baumannii</i> 294.	86
Figura 14	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil TM , das corridas 13 a 16 (frações ativas C2 a C6).	87
Figura 15	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil TM , das corridas 17 a 19 (frações ativas C2 a C6).	88
Figura 16	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil TM , das corridas 20 a 23 (frações ativas C2 a C6).	89
Figura 17	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil TM , das corridas 24 a 27 (frações ativas C2 a C6).	90
Figura 18	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil TM , das corridas 28.1 a 29 (frações ativas C5 a C12).	91
Figura 19	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil TM , das corridas 31 a 32 (frações ativas C6 a C12).	92

Figura 20	Atividade antagonista das frações C6 a C9, aqui representadas pelas corridas: A, 34; B, 35 e 37, obtidas por “recromatografia” em coluna C-18 Sephasil™ Peptide.	95
Figura 21	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide, corrida 34, <i>pool 1</i> (frações ativas C7 a C8).	96
Figura 22	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide, corrida 35, <i>pool 2</i> (frações ativas C6 a C9).	97
Figura 23	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide, corrida 36, <i>pool 3</i> (frações ativas C6 a C9).	98
Figura 24	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide, corrida 37, <i>pool 4</i> (frações ativas C6 a C8).	99
Figura 25	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide, corrida 38, <i>pool 5</i> (frações ativas C6 a C9).	100
Figura 26	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide, corrida 39, <i>pool 6</i> (frações ativas C6 a C9).	101
Figura 27	Atividade antagonista das frações C5, C6 e C7 (corridas 40 e 41) obtidas por “re-recromatografia” de fase reversa, em coluna C-18 Sephasil™ Peptide.	103
Figura 28	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide, corrida 40 (frações ativas, C5 e C6). As frações C5 e C6 foram eluídas com 78 e 80% da solução B (acetonitrila - ACM 80% v/v acrescida de TFA 0,1%).	104
Figura 29	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide, corrida 41 (das frações C6 e C7). As frações C6 e C7 foram eluídas com 80 e 82,5% da solução B (acetonitrila - ACM 80% v/v acrescida de TFA 0,1%), respectivamente, e foram encaminhadas para análise em espectrometria de massas.	105
Figura 30	Revelação <i>in situ</i> da atividade antagonista do extrato bruto em diferentes volumes (15, 20 e 30 µL) contra amostra de <i>Acinetobacter baumannii</i> 294.	107
Figura 31	Revelação <i>in situ</i> da atividade antagonista das frações C2 a C6, originadas da corrida cromatográfica 21, em coluna LC-8	

	Supelcosil™, contra amostra de <i>A. baumannii</i> 294.	108
Figura 32	Espectro de massas em matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico (α -CHCA) (esquerda) e ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (DHB) (direita) da fração C5 (corrida 40).	110
Figura 33	Espectro de massas em matriz DHB da fração C6 , corrida 40 (esquerda) e α -CHCA, corrida 41 (direita).	111

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACM	Acetonitrila
AMPs	Peptídios antimicrobianos
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
α -CHCA	Matriz de α -ciano-4-hidroxicinâmico
BAL	Bactéria do ácido láctico
BHIA	<i>Brain Heart Infusion Agar</i>
BHIA-E	<i>Brain Heart Infusion Agar</i> enriquecido com 5 % de sangue de cavalo
BHIA-S	<i>Brain Heart Infusion Agar</i> suplementado com 0,5 % de extrato de levedura
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BHI-S	<i>Brain Heart Infusion</i> suplementado com 0,5 % de extrato de levedura
BSA	Soro albumina bovina
C-30	Fração intracelular precipitada com 30% de sulfato de amônio
C-50	Fração intracelular precipitada com 50% de sulfato de amônio
C-75	Fração intracelular precipitada com 75% de sulfato de amônio
C-80	Fração intracelular precipitada com 80% de sulfato de amônio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAS	Compostos ativos de superfície
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLED	<i>Agar Cystine Lactose Eletrolyte Deficient</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Complexo ABC	Complexo <i>Acinetobacter baumannii-Acinetobacter calcoaceticus</i>
Da	Dalton
DHB	Matriz de ácido 2,5-di-hidroxibenzoico
ELISA	Ensaio imunossorvente ligado à enzima
ESBL	β -lactamase de espectro estendido
GN	Bactérias Gram negativas

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IRAS	Infecções relacionadas à assistência a saúde
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodalton
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MDR	Multidroga resistente
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MH	<i>Mueller Hinton Broth</i>
MHA	<i>Mueller Hinton Agar</i>
MS	Espectrometria de massas
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
OXA	Oxacilinase
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PBP	Proteína ligadora de penicilina
RPM	Rotação por minuto
S-30	Fração extracelular precipitada com 30% de sulfato de amônio
S-50	Fração extracelular precipitada com 50% de sulfato de amônio
S-75	Fração extracelular precipitada com 75% de sulfato de amônio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TBE	Tampão Tris/borato/EDTA
TFA	Ácido trifluoroacético
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UA	UA: unidades arbitrárias
UFC	Unidade formadora de colônia
UTI	Unidade de terapia intensiva

RESUMO

A busca por novas substâncias antimicrobianas, principalmente de ocorrência natural, vêm ganhando grande destaque, sendo alvo de diversos estudos, em especial, devido à emergência de microrganismos resistentes, bem como à sua associação com a ocorrência de surtos. *Acinetobacter baumannii* é uma bactéria de grande relevância clínica, marcadamente multirresistente a antimicrobianos. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar e caracterizar a atividade antagonista de *A. baumannii*. Dentre as 19 amostras testadas, somente uma, *A. baumannii* 397, expressou antagonismo. Detectou-se atividade apenas contra amostras da mesma espécie. Avaliou-se a possibilidade de interferência de bacteriófagos, ácidos graxos, clorofórmio residual e peróxido de hidrogênio na interpretação dos dados. Visando otimizar a expressão do antagonismo, a amostra produtora foi cultivada sob diferentes condições. Quando cultivada à temperatura de 25 °C, os halos de inibição eram maiores e mais límpidos. A extração proteica da amostra *A. baumannii* 397 foi realizada por meio de precipitação ácida com HCl 5 N. A atividade antagonista foi confirmada por técnica de *spread plate* contra amostra clínica de *A. baumannii*. O extrato bruto apresentou atividade antagonista de 1280 UA/mL. O extrato foi inativado por proteases e manteve-se ativo após exposição a solventes orgânicos e uma ampla faixa de pH e temperaturas. Os valores de CIM e CBM mostraram atividade bactericida contra a amostra reveladora. O extrato bruto foi submetido a três etapas de cromatografia de fase reversa, sendo, a primeira etapa em coluna C-8 e, as demais, em coluna C-18. A última etapa cromatográfica gerou duas frações ativas, C5 e C6, eluídas com, aproximadamente, 80% de acetonitrila. Essas frações foram submetidas à MS. Cinco massas moleculares foram detectadas em C5 e, em C6, duas massas moleculares, de 6,2 kDa e 8,3 kDa. Os dados mostram a síntese de substância(s) antagonista(s) hidrofóbica(s), de natureza proteica, ativa(s) contra bactérias multirresistentes, pela amostra *A. baumannii* 397, propriedade ainda não descrita para a espécie, com potencial para aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*, substância antagonista, bacteriocina

ABSTRACT

The search for new antimicrobial substances, especially naturally occurring ones, are gaining great prominence, being the target of several studies, in particular due to the emergence of multiresistant microorganisms, as well as their association with the occurrence of outbreaks. *Acinetobacter baumannii* is a bacterium of great clinical relevance, that markedly shows multidrug resistance. The aim of this study was to evaluate and to characterize the antagonistic activity of *A. baumannii*. Among the 19 tested strains, only one, *A. baumannii* 397, expressed antagonism. Activity was observed exclusively against isolates of the same species. The interference of bacteriophages, fatty acids, residual chloroform and hydrogen peroxide in the interpretation of data was evaluated. In order to optimize antagonism expression, the producer strain was cultivated under different conditions. When grown at 25 °C, larger and clear inhibition zones were generated. Protein extraction of *A. baumannii* 397 was performed by acid precipitation with HCl 5N. The antagonistic activity was confirmed by the spread plate technique against a clinical isolate of *A. baumannii*. The crude extract showed antagonist activity of 1280 AU/mL. The extract was inactivated by proteases and remained active after exposure to organic solvents and a broad pH range and temperatures. CIM and CBM values showed bactericidal activity against the indicator strain. The crude extract was submitted to three steps of reverse-phase chromatography, the first step in a C-8 column and the others in a C-18 column. The last chromatographic step generated two active fractions, C5 and C6, eluted with approximately 80% acetonitrile. These fractions were submitted to MS. Five molecular masses were detected in C5, and in C6, two molecular masses of 6.2 kDa and 8.3 kDa. The results showed the synthesis of hydrophobic antimicrobial proteinaceous substance(s), active(s) against multidrug-resistant bacteria, by *A. baumannii* 397, property not yet described for this species, that displays biotechnological potential.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, antagonistic substance, bacteriocin.

1 INTRODUÇÃO

5 1.1 GÊNERO *Acinetobacter*

1.1.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA

10

Em 1911, ao estudar amostras isoladas de solo, Beijerinck, um microbiologista holandês, observou, pela primeira vez, uma espécie pertencente ao gênero *Acinetobacter*. A bactéria foi nomeada *Micrococcus calcoaceticus*. Anos depois, Schaub & Hauber redescobriram a espécie e a denominaram *Bacterium anitratum*. Esta espécie sofreu diversas alterações na nomenclatura, tendo sido descrita como *Moraxella lwoffii*, *Moraxella glucidolytica* e *Neisseria winogradskyi* (HENRIKSEN, 1973). Atualmente, a bactéria é classificada como *Acinetobacter calcoaceticus* (BAUMANN, 1968; EUZÉBY, 2015b).

20 O gênero *Acinetobacter* foi descrito pela primeira vez por Brisou & Prévot, em 1954, para abrigar espécies imóveis (HENRIKSEN, 1973), oxidase positivas (*Moraxella*) e negativas pertencentes ao gênero *Achromobacter* (BOUVET; GRIMONT, 1986). Em 1971, a Subcomissão de Taxonomia de *Moraxella* e Bactérias Afins reconheceu o gênero *Acinetobacter* e recomendou que o mesmo abrigasse apenas espécies imóveis e oxidase negativas (BAUMANN; 25 DOUDORFF; STANIER, 1968; BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996; VEGAS; NIEVES, 2005). Esta classificação decorreu de um estudo de taxonomia numérica realizado por Baumann e colaboradores, em 1968 (BOUVET; GRIMONT, 1986).

30 A nomenclatura do gênero *Acinetobacter* apresenta-se altamente diversificada e confusa, já tendo sido atribuídos diferentes termos para designar algumas espécies atualmente agrupadas no gênero (HENRIKSEN, 1973). Entre as denominações já empregadas, citam-se *Bacterium anitratum*, *Herella vaginicola*, *Mima polymorpha*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Neisseria*, *Micrococcus*

calcoaceticus e *Diplococcus* (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996; GILARDI, 1968).

Bouvet & Grimont (1986) dividiram o gênero em 12 grupos (genoespécies), baseando-se em hibridização DNA-DNA e características nutricionais, propondo
5 uma variedade de métodos bioquímicos para identificação fenotípica das espécies. Cada genoespécie é constituída por um determinado número de espécies. Quando necessário, as genoespécies eram diferenciadas de acordo com o padrão nutricional.

10

1.1.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS

O gênero *Acinetobacter* está, atualmente, inserido no domínio Bacteria, filo
15 Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Pseudomonadales, família Moraxellaceae (EUZÉBY, 2015a; ROSSAU *et al.*, 1991). Os representantes do gênero são cocobacilos Gram negativos, não fastidiosos, imóveis, catalase positivos e oxidase negativos. São aeróbios obrigatórios, sendo incapazes de fermentar carboidratos para obtenção de energia (CHAN *et al.*, 2012; PELEG;
20 SEIFERT; PATERSON, 2008). Utilizam diversos compostos orgânicos como fonte de carbono. O teste de oxidase permite a identificação presuntiva do gênero *Acinetobacter*, contribuindo para a diferenciação entre o grupo e outros microrganismos não fermentadores (JOSHI; LITAKE, 2013).

Morfologicamente, apresentam-se como bastonetes curtos e espessos, com
25 diâmetro de 1,0 a 1,5 µm e comprimento de 1,5 a 2,5 µm em fase exponencial de crescimento, tornando-se cocobacilares durante a fase estacionária (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996). Multiplicam-se em meios comumente empregados na rotina laboratorial, como *Tryptic Soy Agar* (TSA) e Ágar Sangue, possuindo requerimentos nutricionais simples (PELEG; SEIFERT; PATERSON,
30 2008), e toleram diferentes valores de pH (LEE; KIM; RHEE, 2010). A temperatura ótima de cultivo é de cerca de 30-35 °C, mas podem se multiplicar em uma ampla faixa de temperatura, de 20 a 44 °C (VEGAS; NIEVES, 2005).

Macroscopicamente, formam colônias lisas, branco-acinzentadas ou amarelo-pálidas, mucoides, com diâmetro de 1,5 a 3,0 mm, após 24 h de incubação a 37 °C. Algumas espécies, como *A. haemolyticus*, são hemolíticas (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

5 As espécies que compõem o gênero são ubíquas, estando amplamente distribuídas em ambientes naturais, como solo e água, sendo frequentemente encontradas colonizando a pele de seres humanos. Poucos estudos abordam a dispersão das espécies no ambiente. *A. calcoaceticus* está presente na água, no solo e em vegetais, *Acinetobacter pittii* (genoespécie 3), na água, no solo, em
10 vegetais, na pele e em fezes de seres humanos, *A. Iwoffii* e *A. radioresistens*, na pele humana e *Acinetobacter* genoespécie 11 é observado na água, no solo, em vegetais e no trato intestinal de seres humanos (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Algumas espécies são reconhecidas como importantes organismos patogênicos nosocomiais e estão associadas à resistência a diversas drogas
15 antimicrobianas (ECKER *et al.*, 2006).

1.1.3 TAXONOMIA

20 Durante os últimos 30 anos, a taxonomia do gênero *Acinetobacter* foi amplamente modificada, sofrendo sucessivas alterações (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Atualmente, o gênero abriga 41 espécies, quais sejam, *A. apis*, *A. baumannii*, *A. baylyi*, *A. beijerinckii*, *A. bereziniae*, *A. bohemicus*, *A. boissieri*, *A.*
25 *bouvetii*, *A. brisouii*, *A. calcoaceticus*, *A. gandensis*, *A. gernerii*, *A. guangdongensis*, *A. guillouiae*, *A. grimontii*, *A. gyllenbergii*, *A. haemolyticus*, *A. harbinensis*, *A. indicus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. kookii*, *A. Iwoffii*, *A. nectaris*, *A. nosocomialis*, *A. pakistanensis*, *A. parvus*, *A. pittii*, *A. puyangensis*, *A.*
30 *qingfengensis*, *A. radioresistens*, *A. rudis*, *A. schindleri*, *A. seifertii*, *A. soli*, *A. tandoii*, *A. tjernbergiae*, *A. townneri*, *A. ursingii*, *A. variabilis*, *A. venetianus* (EUZÉBY, 2015b). O grupo engloba espécies com conteúdo C+G de 39 a 47 % (JOSHI; LITAKE, 2013; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Algumas espécies incluídas no gênero *Acinetobacter* formam o Complexo *Acinetobacter baumannii* - *Acinetobacter calcoaceticus* (Complexo ABC), quais sejam, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* (genoespécie 3) e *A. nosocomialis* (genoespécie 13TU) (JOSHI; LITAKE, 2013). Esta denominação foi proposta em 1992, para espécies que eram geneticamente distintas, mas fenotipicamente semelhantes, sendo difíceis de serem distinguidas umas das outras por testes fenotípicos convencionais (BARTUAL *et al.*, 2005; CHAN *et al.*, 2012; FOURNIER; RICHET, 2006).

Dentre as espécies pertencentes ao gênero, destaca-se *A. baumannii*, que vem sendo frequentemente recuperada de espécimes clínicos, estando envolvida na colonização e infecção de diversos pacientes admitidos em instituições de assistência à saúde (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996). Entretanto, outras espécies vêm, também, sendo recuperadas de amostras clínicas, como, *A. Iwoffii*, *A. boylyi* (ROBINSON *et al.*, 2010) *A. hemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. ursingii* (JOSHI; LITAKE, 2013) e espécies pertencentes ao Complexo ABC, com exceção de *A. calcoaceticus* (BAYGLOO *et al.*, 2015).

1.1.4 A ESPÉCIE *Acinetobacter baumannii*

20

Em 1986, Bouvet e colaboradores reconheceram e descreveram novas espécies incluídas no gênero *Acinetobacter*, dentre elas, *A. baumannii* (ou genoespécie 2), assim designada em homenagem a dois bacteriologistas americanos, Paul e Linda Baumann.

Amostras de *A. baumannii* são ubíquas na natureza, tendo sido recuperadas do solo, da água, de seres humanos e de outros animais (FOURNIER; RICHET, 2006). São encontradas contaminando a superfície de objetos inanimados e colonizando a pele de indivíduos saudáveis (ABBOTT *et al.*, 2013), sendo comumente isoladas da garganta e do trato respiratório de pacientes hospitalizados (FOURNIER; RICHET, 2006).

Apresenta metabolismo altamente versátil, podendo sobreviver em ambientes com condições físicas adversas, como ambientes secos (ABBOTT *et al.*, 2013), com variações de pH, temperatura e substratos (TIWARI; ROY; TIWARI, 2015), fatores que favorecem a transmissão e dispersão do organismo, principalmente em ambiente hospitalar (CISNEROS; RODRÍGUEZ-BAÑO, 2002),

Relatos de infecções associadas ao gênero *Acinetobacter* são históricos, tendo sido descritas em civis e militares feridos em combates, decorrente do contato direto das lesões com o ambiente contaminado. Na Guerra do Vietnã, *A. baumannii* foi a bactéria Gram negativa mais frequentemente isolada de lesões traumáticas de combatentes (ECKER *et al.*, 2006). Além disto, vem sendo associada a desastres naturais, como *tsunamis* e terremotos (JOSHI; LITAKE, 2013).

Embora seu potencial patogênico tenha sido considerado baixo, atualmente, vem sendo descrito como uma das bactérias de maior relevância associada às Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) (ABBOTT *et al.*, 2013). Cerca de 80 % de todas as infecções nosocomiais associadas a *Acinetobacter* relacionam-se a *A. baumannii* (JOSHI; LITAKE, 2013).

Diversos estudos demonstram que esta bactéria é a espécie do gênero mais comumente envolvida em bacteremias (FOURNIER; RICHET, 2006; GUZEL *et al.*, 2014), infecções do trato urinário e meningites secundárias (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996), mas, sua maior predominância é como agente de pneumonia, particularmente associada à ventilação mecânica em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996; JOSHI; LITAKE, 2013).

Os fatores de risco envolvidos na aquisição de infecção por *A. baumannii* em ambientes hospitalares são internação por longos períodos tempo, doenças de base com comprometimento do sistema imunológico, procedimentos invasivos e exposição a antimicrobianos de amplo espectro. Estudos têm mostrado que pacientes hospitalizados infectados por *A. baumannii* apresentam em torno de 30% de chance de irem a óbito (TIWARI; ROY; TIWARI, 2015).

A. baumannii vem sendo associado a índices elevados de mortalidade entre pacientes com bacteremia, quando comparado com outras bactérias (ABBOTT *et*

al., 2013). O desenvolvimento de bacteremia geralmente resulta de colonização prévia por *A. baumannii*, seguida por procedimentos invasivos, tais como, uso de cateteres vasculares, ventilação mecânica, cirurgias e uso de antimicrobianos de amplo espectro. Contudo, quadros de bacteremia são mais comuns em pacientes
5 que necessitam de intervenções médicas invasivas ou longos períodos de internação em UTIs (CISNEROS; RODRÍGUEZ-BAÑO, 2002).

Um estudo realizado por Martins e colaboradores (2014) avaliou a diversidade genética de 64 amostras de *A. baumannii* oriundas de hemoculturas de diferentes hospitais do Brasil. Os autores sugeriram que grupos clonais específicos estão
10 circulando dentro dos hospitais estudados, revelando que a prevalência e os tipos de clones multidroga resistentes (MDR) podem variar entre hospitais, ressaltando a importância das medidas de controle adequadas.

A capacidade de colonização de superfícies vivas e inanimadas é o fator primordial para formação de biofilmes estáveis, sendo uma das estratégias de
15 virulência deste microrganismo. Estudos mostraram a correlação entre a formação de biofilme e a resistência a múltiplas drogas antimicrobianas. A descontaminação dessas superfícies necessita de diversas intervenções (JOSHI; LITAKE, 2013), sendo fonte de inúmeras infecções (MOHAMED; HUANG, 2007).

As amostras de *A. baumannii* podem ser identificadas por testes genotípicos,
20 como a busca por genes cromossômicos intrínsecos, como o *bla*_{OXA 51}, que codifica as oxacilinasas, enzimas que conferem resistência aos carbapenêmicos. Além da OXA-51, quatro outras famílias de OXA-carbapenemases associadas ao *A. baumannii*, OXA-23, OXA-24, OXA-58 e OXA-143, codificadas por genes adquiridos, já foram descritas (MA *et al.*, 2015).

25 As opções terapêuticas contra *A. baumannii* reduziram-se drasticamente nos últimos anos, em decorrência dos diversos mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos expressos pelo microrganismo (GUZEL *et al.*, 2014). Atualmente, as únicas drogas capazes de atuar sobre clones resistentes são aquelas que agem sobre as moléculas de lipopolissacarídeo presentes na membrana plasmática, as
30 polimixinas B e E. Os protocolos de tratamento adotados preconizam, habitualmente, a administração destas drogas em combinação com outras (ABBOTT *et al.*, 2013).

Entretanto, a suscetibilidade de *A. baumannii* a antimicrobianos varia muito entre regiões geográficas, centros médicos e, até mesmo, entre alas hospitalares. Esta diversidade pode ocasionar o uso de diferentes antimicrobianos, assim como, condições epidemiológicas distintas, gerando diferentes medidas e políticas de controle dos antimicrobianos (CISNEROS; RODRÍGUEZ-BAÑO, 2002).

Acredita-se que a aquisição de marcadores de resistência por *A. baumannii* seja remota. Entretanto, nos últimos anos, esta capacidade vem se dispersando rapidamente, devido à capacidade do organismo de responder aos desafios impostos pelos agentes antimicrobianos (FOURNIER; RICHET, 2006). Dentre os principais mecanismos de resistência, destacam-se produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), mudanças, perda ou redução das porinas de membrana, alterações nas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) (CISNEROS; RODRÍGUEZ-BAÑO, 2002) e expressão de bombas de efluxo. Geralmente, os genes responsáveis pela propriedade surgem por mutação ou recombinação, localizando-se, neste caso, em elementos genéticos “móveis”, como plasmídios, transpósons e *integrons* (FOURNIER; RICHET, 2006).

Uma característica importante de *A. baumannii* é sua aptidão para causar surtos, provavelmente, relacionada a outra aptidão da bactéria, a de aquisição de resistência a antimicrobianos, associada à resistência ambiental, principalmente à dessecação (FOURNIER; RICHET, 2006). A associação entre resistência intrínseca e adquirida a diversas drogas antimicrobianas e capacidade de tolerar fatores ambientais adversos favorecem as infecções e a dispersão de clones resistentes por todo o mundo (ABBOTT *et al.*, 2013).

As infecções causadas por *A. baumannii* são de difícil tratamento. Contudo, esforços têm sido realizados na busca por novos agentes antimicrobianos. A busca por compostos alternativos às drogas antimicrobianas clássicas, como peptídios antimicrobianos que atuem contra alvos específicos, tem sido bastante valorizada, ainda que alguns apresentem dificuldade para serem sintetizados e purificados, decorrente da complexidade e tamanho dos mesmos (GUZEL *et al.*, 2014). Porém, estudos que buscam substâncias antimicrobianas promissoras devem, certamente, ser estimulados (GILLOR; NIGRO; RILEY, 2005).

1.2 PEPTÍDIOS ANTIMICROBIANOS (AMPs)

A introdução dos primeiros antibióticos na prática clínica, em 1940, revolucionou a
5 medicina, permitindo o tratamento e a cura de diversas doenças que acometiam a
população. Entretanto, o surgimento da resistência antimicrobiana restringiu o uso
dos antibióticos convencionais, estimulando a busca por novas substâncias
antimicrobianas, principalmente de ocorrência natural (LING *et al.*, 2015).

10 Inúmeros trabalhos têm sido realizados com o objetivo de isolar e purificar
substâncias antimicrobianas de diferentes fontes, tais como, microrganismos
(BAINDARA *et al.*, 2013), plantas (TIWARI; ROY; TIWARI, 2015), animais
(anfíbios) (GOTTLER; RAMAMOORTHY, 2009), organismos marinhos (algas,
esponjas) (LAPORT *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2010) e outros, que atuem
15 contra um amplo grupo de organismos patógenos (bactérias, fungos e vírus).
Estas substâncias vêm se tornando importantes ferramentas terapêuticas,
principalmente contra microrganismos multirresistentes (BAINDARA *et al.*, 2013).

Dentre os compostos com potencial antimicrobiano produzidos por
microrganismos, destacam-se, os peptídios antimicrobianos (AMPs). Estes
compreendem um novo grupo de agentes terapêuticos, para os quais bactérias
20 podem não ser capazes de desenvolver resistência (CAMPISTANY *et al.*, 2016).
Entre estes agentes, destacam-se várias classes de bacteriocinas e compostos
ativos de superfície (CAS), como os lipopeptídios (BAINDARA *et al.*, 2013).

A comercialização de alguns compostos antimicrobianos ainda é limitada, tanto
pela carência de informações em relação à segurança do produto, como pelas
25 dificuldades inerentes aos processos de extração, purificação e produção em
escala industrial.

1.2.1 BACTERIOCINAS

1.2.1.1 HISTÓRICO

5

No final do século XIX, Pasteur e Joubert descreveram, pela primeira vez, a ocorrência de interações antagonistas entre bactérias, com base na observação de que amostras de *Escherichia coli* eram capazes de inibir a multiplicação de *Bacillus anthracis*. Entretanto, foi Gratia, em 1925, o primeiro cientista a desvendar, de forma mais detalhada, os processos envolvidos nas interações microbianas. O pesquisador descreveu que *E. coli* produzia uma substância capaz de inibir, em pequenas concentrações, outra amostra de *E. coli*. A substância foi denominada “colicina”, em referência ao microrganismo produtor. Alguns anos depois, em 1953, Jacob e colaboradores verificaram que estas substâncias não eram produzidas apenas por uma única linhagem bacteriana, propondo, então, o emprego do termo “bacteriocina” (JACK; TAGG; RAY, 1995).

A primeira bacteriocina purificada e empregada como conservante alimentar foi descrita em 1933, na Nova Zelândia. Nomeada nisina, foi isolada a partir de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Em 1953 e 1983, passou a ser comercializada na Inglaterra e Europa, respectivamente, e, em 1988, a *Food and Drug Administration* aprovou o uso da nisina como aditivo em alimentos pasteurizados e em queijos processados nos Estados Unidos (COTTER; HILL; ROSS; 2005). Atualmente, a nisina é autorizada como aditivo alimentar em 50 países, sendo empregada em uma variedade de alimentos (COTTER, 2012).

1.2.1.2 CONCEITO E CARACTERÍSTICAS

30

Em termos conceituais, bacteriocinas são definidas como um grupo diversificado de peptídios ou proteínas (AVELAR *et al.*, 1999) sintetizados em nível ribossomal (NISHIE; NAGAO; SONOMOTO, 2012). Quanto ao espectro de ação, as

bacteriocinas normalmente apresentam atividade antibacteriana restrita, limitada a bactérias taxonomicamente relacionadas à amostra produtora (BENMECHERNENE *et al.*, 2013). Porém, algumas bacteriocinas apresentam espectro de atividade mais amplo, sendo capazes de agir contra linhagens
5 filogeneticamente distantes (COTTER; ROSS; HILL, 2013; O'SHEA *et al.*, 2012).

O espectro de ação reduzido é uma das principais diferenças entre bacteriocinas e drogas antimicrobianas clássicas. Além disto, as bacteriocinas estimulam o sistema imune do hospedeiro; agem, mais frequentemente, sobre a membrana celular bacteriana; como já mencionado, são sintetizadas no nível ribossomal; e
10 sua toxicidade ainda não é bem conhecida. Em contrapartida, os antimicrobianos convencionais são metabólitos secundários; não estimulam o sistema imune do hospedeiro; apresentam espectro de ação variável; agem sobre diferentes sítios do microrganismo, afetando desde a parede celular até componentes internos dos mesmos; e, acima de tudo, apresentam toxicidade elevada (CLEVELAND *et al.*,
15 2001).

Quanto à massa molecular, as bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram negativas podem ser classificadas como microcinas, cuja massa molecular é inferior a 10 kDa, ou colicinas, com massa variando entre 29 e 90 kDa (BENMECHERNENE *et al.*, 2013). São, via de regra, sensíveis a temperaturas
20 elevadas e à ação de proteases (JACK; TAGG; RAY, 1995).

As bacteriocinas apresentam diferentes mecanismos de ação sobre a célula bacteriana, como formação de poros na membrana, levando a um desequilíbrio hidroeletrolítico, perda de diversos metabólitos, nutrientes e ATP, e interferência direta sobre DNA, RNA e metabolismo de proteínas (COTTER; ROSS; HILL,
25 2013).

A síntese de bacteriocinas tem sido relatada para várias espécies de Bacteria e algumas Archaea (DOBSON *et al.*, 2012). Acredita-se que a frequência de síntese de bacteriocinas seja subestimada devido à escassez de pesquisas na área e a dificuldades técnicas inerentes a este tipo de estudo, que dificultam o isolamento
30 e a purificação das mesmas. Estas substâncias antagonistas exibem grandes diferenças quanto ao espectro e ao mecanismo de ação, à massa molecular e a propriedades bioquímicas e genéticas (KLAENHAMMER, 1988).

1.2.1.3 BACTERIOCINAS SINTETIZADAS POR BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS

A família das bacteriocinas engloba uma diversidade de substâncias proteicas que exibem características distintas em relação a tamanho, alvo, mecanismos de ação e de imunidade. As bactérias Gram negativas são capazes de sintetizar vários tipos de bacteriocinas, nomeadas de acordo com o microrganismo produtor. Assim, citam-se as colicinas, piocinas, cloacinas, klebocinas e marcescinas, produzidas por *E. coli*, *Pseudomonas*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens*, respectivamente (RILEY; WERTZ, 2002).

As bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram negativas diferem daquelas produzidas por bactérias Gram positivas em dois parâmetros principais: geralmente são liberadas através da lise da célula produtora e são dependentes de mecanismos de regulação do tipo SOS. São, habitualmente, codificadas por genes plasmidiais (RILEY; WERTZ, 2002).

Grande parte das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram negativas apresenta espectro de ação restrito, com algumas exceções, como aquelas sintetizadas por *Pseudomonas*, que atuam sobre diferentes gêneros bacterianos (NAKAMURA *et al.*, 1981). Além disto, as bacteriocinas distinguem-se umas das outras do ponto de vista estrutural e genético. Entretanto, a estrutura e a sequência dos óperons de espécies bacterianas filogeneticamente distantes podem apresentar alguma similaridade (SNYDER; WOROBO, 2013).

As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram negativas podem ser divididas em três classes, sendo a classe I representada pelas colicinas, a classe II pelas microcinas e a classe III pelas bacteriocinas semelhantes à cauda de fagos (CHAVAN; RILEY, 2007).

As colicinas são amplamente estudadas, servindo como modelo para bacteriocinas sintetizadas por outras bactérias e para a investigação de características empregadas para classificá-las, tais quais, estrutura, função, ecologia, organização e regulação genética (GILLOR; NIGRO; RILEY, 2005;

RILEY; WERTZ, 2002). Até o momento, 30 colicinas já são conhecidas quanto a atividade antimicrobiana e imunidade específica (GILLOR; NIGRO; RILEY, 2005).

Os genes que codificam colicinas podem se localizar em plasmídios ou cromossomos, juntamente com os genes que codificam as proteínas de imunidade e de lise, sendo estes, arranjados em *clusters* (RILEY; WERTZ, 2002).
5 As colicinas, como mencionado anteriormente, apresentam massa molecular de 29 a 90 kDa e são constituídas por três domínios funcionais (BENMECHERNE *et al.*, 2013), domínio central, envolvido na interação entre a colicina e o receptor da célula microbiana suscetível; domínio N-terminal, responsável pelo transporte
10 da colicina para o interior da célula; e domínio C-terminal, com atividade antimicrobiana. A síntese de colicinas é regulada pelo sistema SOS, estando relacionada às condições de estresse na qual a amostra produtora se encontra, como escassez de nutrientes e oxigênio ou aumento da população (SNYDER; WOROBO, 2013).

15 Ao contrário das colicinas, as microcinas apresentam massa molecular inferior a 10 kDa, sendo produzidas, principalmente, por enterobactérias, e subclassificadas de acordo com a presença e localização das modificações pós-traducionais e organização dos *clusters* gênicos. Dentre as 14 microcinas já descritas, apenas sete foram caracterizadas (O'SHEA *et al.*, 2012). As microcinas apresentam
20 algumas características semelhantes àquelas exibidas por bacteriocinas expressas por bactérias Gram positivas, tais como, termoestabilidade, hidrofobicidade, resistência a algumas proteases e valores extremos de pH (GILLOR; NIGRO; RILEY, 2005).

As bacteriocinas semelhantes à cauda de fagos são complexas do ponto de vista
25 estrutural, sendo compostas por um grupo de peptídios multiméricos (CHAVAN; RILEY, 2007). Além da complexidade estrutural, estas bacteriocinas são resistentes a proteases e apresentam, como mecanismo de ação, a despolarização da membrana celular (NAKAYAMA; TAKASHIMA; ISHIHARA, 2000).

1.2.1.4 BACTERIOCINAS SINTETIZADAS POR BASTONETES GRAM NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES

- 5 Diversas bacteriocinas são objeto de estudo, mas, dentre todas aquelas expressas por bactérias Gram negativas, as colicinas e as piocinas são as mais amplamente estudadas. As piocinas são bacteriocinas produzidas por espécies do gênero *Pseudomonas* (GILLOR; NIGRO; RILEY, 2005), tendo sido descritas pela primeira vez em 1954, por Okabe (CUPPELS; HANSON; KELMAN, 1978).
- 10 Alguns autores acreditam que a imensa maioria das amostras de *P. aeruginosa*, cerca de 90%, produzem, pelo menos, um tipo de bacteriocina (GILLOR; NIGRO; RILEY, 2005; LING *et al.*, 2010).

As piocinas são codificadas exclusivamente por genes cromossômicos. Os *clusters* associados à expressão de piocinas são compostos por genes ligados à atividade antimicrobiana e à imunidade e, em alguns casos, associados à lise celular (GILLOR; NIGRO; RILEY, 2005).

Três tipos de piocinas podem ser diferenciados, tipos R, F e S (LING *et al.*, 2010). As piocinas dos tipos R e F possuem estrutura alongada, semelhante às fibras presentes na cauda dos bacteriófagos e apresentam espectro de ação amplo, sendo ativas contra bactérias Gram negativas, como *Neisseria* e *Haemophilus*. As piocinas do tipo R assemelham-se a cilindros ocos e atuam despolarizando a membrana citoplasmática das células microbianas alvo. Já as piocinas do tipo F apresentam estruturas alongadas, não contráteis, porém flexíveis. As piocinas do tipo S são similares às colicinas, solúveis, sensíveis a proteases e atuam formando poros na membrana das células alvo. Exibem espectro de ação restrito à *P. aeruginosa* (GILLOR; NIGRO; RILEY, 2005).

A atividade antibacteriana das piocinas decorre principalmente da ligação das mesmas a receptores presentes na membrana das células suscetíveis (LING *et al.*, 2010), com posterior penetração e degradação não específica do DNA da célula alvo (PARRET; MOT, 2002). Muitas espécies produtoras de piocinas são imunes às suas próprias bacteriocinas, decorrente da síntese de proteínas de imunidade (LING *et al.*, 2010).

Poucos estudos descrevem a produção de bacteriocinas por espécies do gênero *Acinetobacter*. Segundo estudo realizado por Andrews (1985), dentre as 176 amostras de *Acinetobacter* spp. identificadas e testadas, 116 de 154 amostras anteriormente designadas como *A. anitratus* e uma de 22 amostras de *A. Iwoffi* foram capazes de produzir bacteriocinas. Em relação à sensibilidade, 18 amostras de *Acinetobacter* foram sensíveis às bacteriocinas produzidas por 10 amostras de *A. Iwoffi* e oito amostras de *A. anitratus*. Além disso, o estudo associou a produção de bacteriocinas com resistência à gentamicina, ou seja, 96% das amostras resistentes à gentamicina produziram bacteriocinas.

10 Ao estudarem o potencial antimicrobiano de microrganismos isolados de zonas costeiras do Oceano Atlântico, Amraoui e colaboradores (2014) isolaram uma amostra de *A. baumannii* e observaram que a mesma expressava antagonismo contra todas as amostras bacterianas e fúngicas testadas, apresentando atividade antimicrobiana significativa frente às demais amostras recuperadas. Entretanto, o

15 isolamento e a purificação da(s) substância(s) responsável(is) pelo fenômeno não foram realizados.

1.2.1.5 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E PAPEL ECOLÓGICO DAS BACTERIOCINAS

20

A emergência de microrganismos resistentes a diversos antimicrobianos convencionais demonstra a necessidade de desenvolvimento e busca por novos agentes para utilização clínica. Várias alternativas estão sendo estudadas, desde compostos extraídos de plantas até peptídios antimicrobianos oriundos de diferentes fontes, como as bacteriocinas (COTTER; ROSS; HILL, 2013). Assim, bacteriocinas vêm sendo descritas como um dos grupos de substâncias antimicrobianas mais promissoras, sendo uma alternativa para o controle de infecções associadas a bactérias resistentes a drogas antimicrobianas (SPARO *et al.*, 2006).

25

30

Acredita-se que bacteriocinas possam ser empregadas em substituição às drogas antimicrobianas clássicas, de amplo espectro, com a vantagem de possuírem

espectro limitado de ação, ou seja, agindo contra microrganismos específicos, reduzindo a probabilidade de seleção de resistência microbiana (RILEY; WERTZ, 2002). Então, bacteriocinas de espectro restrito poderiam ser empregadas para controle de microrganismos patogênicos presentes em sítios que abrigam microbiota indígena, sem desestabilizá-la. Por outro lado, as bacteriocinas de espectro estendido podem vir a ser utilizadas para o tratamento de pacientes com infecções de etiologia desconhecida. Muitas bacteriocinas apresentam atividade contra agentes de doenças infecciosas resistentes a drogas antimicrobianas de escolha, devido a diferenças no mecanismo de ação (COTTER; ROSS; HILL, 2013).

Na indústria alimentícia, as bacteriocinas podem agir como conservantes naturais dos alimentos, preservando os nutrientes, bem como as características organolépticas, agindo de forma a impedir ou combater a multiplicação de microrganismos patogênicos que ameaçam a saúde e comprometem a qualidade dos alimentos. O emprego das bacteriocinas contribui, ainda, para a redução do uso de conservantes químicos que causam danos à saúde (GALVEZ *et al.*, 2007).

Bacteriocinas sintetizadas por bactérias do ácido láctico (BALs) são as mais estudadas e conhecidas, tanto no que se refere à estrutura, como à função e ao mecanismo de ação (COTTER; HILL; ROSS; 2005). Atualmente, o interesse por estas substâncias vem aumentando, devido à possibilidade de utilização como conservantes naturais de alimentos, como mencionado (BENMECHERNE *et al.*, 2013). A nisina é considerada a principal bacteriocina sintetizada por BAL. Apresenta atividade contra diversos organismos patogênicos, incluindo *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, entre outros. Apresenta, como mecanismos de ação, interferência na síntese da parede celular e desestabilização da membrana plasmática bacteriana através da formação de poros (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008).

Além da nisina, diversas outras bacteriocinas, principalmente extraídas de BAL, já foram caracterizadas e/ou purificadas. A pediocina PA-1 representa as bacteriocinas de classe IIa, de massa molecular baixa, que não sofrem modificação pós-traducional, sendo codificadas por plasmídios. Apresenta atividade eficiente contra vários microrganismos patogênicos relacionados com

infecção e intoxicação alimentar, principalmente *L. monocytogenes* (DEVI; HALAMI, 2011).

Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention*, anualmente, são noticiados 76 milhões de casos de doenças associadas a alimentos nos Estados Unidos, dos quais cerca de 5000 evoluem para óbito (CLEVELAND *et al.*, 2001). Estudos têm revelado a possibilidade de utilização de bacteriocinas para controle de bactérias enteropatogênicas associadas a infecções alimentares (AVELAR *et al.*, 1999; COTTER; ROSS; HILL, 2013).

A síntese de bacteriocinas vem sendo considerada um importante fator para seleção de espécies bacterianas com potencial probiótico. Os probióticos, segundo a Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO, 2002), são microrganismos vivos que, quando ingeridos em concentrações adequadas, trazem benefícios à saúde do hospedeiro. Estes exercem diversas funções benéficas, tais como complementar a barreira intestinal, modular o sistema imune do hospedeiro e sintetizar substâncias com atividade antimicrobiana, como as bacteriocinas, fornecendo proteção contra invasão por possíveis organismos patogênicos (DOBSON *et al.*, 2012).

Além do contexto industrial, as bacteriocinas estão relacionadas diretamente à ecologia do trato intestinal. O intestino caracteriza-se como um ambiente densamente colonizado por populações microbianas distintas, em contato íntimo, participando de interações antagonistas e cooperativas. A síntese de substâncias antimicrobianas neste ambiente pode conferir vantagens competitivas ao microrganismo produtor (DOBSON *et al.*, 2012), contribuir para a dominância de linhagens específicas (O'SHEA *et al.*, 2012), estimular o sistema imune, comprometer a colonização por patógenos e, assim, influenciar diretamente na composição da microbiota intestinal indígena (DOBSON *et al.*, 2012).

1.2.2 LIPOPEPTÍDIOS

Os microrganismos são capazes de sintetizar várias classes de peptídios antimicrobianos, tais como os CAS, grupo diversificado de moléculas, aqui representados por duas categorias, os biossurfactantes e os bioemulsificantes, distintos no que diz respeito à estrutura e à função. Os biossurfactantes são representados por compostos de baixo peso molecular, como os glicolipídios e lipopeptídios de cadeia curta, que são bons redutores de tensão superficial quando presentes em soluções. Já os compostos bioemulsificantes são constituídos por moléculas que apresentam pesos moleculares mais elevados, sendo representados, normalmente, por compostos poliméricos e lipopeptídios (SATPUTE *et al.*, 2010).

Os lipopeptídios são membros de um grupo particular de antibióticos, representados pelas famílias das surfactinas, iturinas e fengicinas. Em termos estruturais, os lipopeptídios apresentam-se como peptídeo cíclico, compostos por sete (surfactina e iturina) ou 10 aminoácidos (fengicina), ligados a uma cadeia de ácidos graxos. O comprimento da cadeia de ácidos graxos pode variar entre 13 e 16 (surfactinas), 14 e 17 (iturinas) ou 14 e 18 (fengicinas) carbonos. Cada família é composta por suas variantes, que diferem na sequência de aminoácidos e comprimento da cadeia de ácidos graxos (LANG, 2002).

Essas famílias de lipopeptídios são sintetizadas por espécies de *Bacillus*. A surfactina é a mais conhecida, apresentando um amplo espectro de atividade contra bactérias, vírus e micoplasma. Já a iturina e a fengicina atuam como importantes antifúngicos, sendo, a última, altamente tóxica para fungos filamentosos (ONGENA; JACQUES, 2007).

Os antibióticos lipopeptídicos mais conhecidos são as polimixinas B e E (colistina), isolados de *Bacillus polymyxa*. São constituídos por um peptídeo cíclico e uma cadeia de ácidos graxos (ZAVASCKI *et al.*, 2007). Apesar disso, alguns autores os classificam como polipeptídios (MANCHANDANI *et al.*, 2015). A polimixina foi empregada pela primeira vez em 1950, porém, seu potencial neuro e nefrotóxico restringiu seu uso. Entretanto, o aumento do número de infecções

causadas por bactérias Gram negativas MDR, principalmente, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *A. baumannii*, fez com que o interesse pelo antibiótico ressurgisse. Atualmente, é a droga de última escolha contra bactérias MDR, sendo mais eficaz quando administrada em combinação com outros
5 agentes (BERGEN *et al.*, 2015).

CAMPISTANY e colaboradores (2016) relataram a descoberta de três novos lipopeptídios antimicrobianos sintéticos (sp-34, sp-96 e sp-100) derivados da forma natural da polimixina B. Estes novos lipopeptídios são ativos contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, ao contrário da polimixina B, que atua
10 apenas contra bactérias Gram negativas. Os compostos são fortes candidatos a se tornarem novos antimicrobianos, embora seus mecanismos de ação não estejam bem elucidados.

Além das polimixinas, outro importante membro da classe dos lipopeptídios cíclicos de ocorrência natural é a daptomicina, isolada de *Streptomyces roseosporus*. Apresenta-se como um potente antibiótico, sendo capaz de atuar
15 contra um amplo espectro de bactérias Gram positivas (*Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*), incluindo organismos MDR. Esse fármaco foi liberado para uso clínico em 2003, para tratamento de infecções complexas de pele e órgãos internos, sendo administrado em dose única, por via endovenosa
20 (TRAN; MUNITA; ARIAS, 2015).

A emergência de microrganismos resistentes representa, atualmente, um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. Estima-se que, até 2050, a resistência será responsável por trezentos milhões de mortes, com perdas de, aproximadamente, trilhões de dólares para a economia global. Devido
25 a isto, estudos que abordem a busca por novos peptídios antimicrobianos com amplo espectro de ação, principalmente, contra amostras MDR, devem ser considerados (TRAN; MUNITA; ARIAS, 2015).

2 JUSTIFICATIVA

5 Nos últimos anos, algumas espécies do gênero *Acinetobacter* vêm ganhando grande destaque, sendo alvo de diversos estudos, em especial, devido à capacidade de acumular genes/mecanismos de resistência a drogas antimicrobianas e a condições ambientais adversas, bem como à sua associação com a ocorrência de surtos. Dentre elas, *A. baumannii* vem sendo frequentemente recuperada de espécimes clínicos, estando envolvida na colonização e infecção de diversos pacientes admitidos em UTIs, associada a altos índices de morbidade e mortalidade.

Desde a descoberta do primeiro antibiótico, em 1928, diversos outros antimicrobianos já foram desenvolvidos. Entretanto, as descobertas foram acompanhadas pelo advento da resistência microbiana, dificultando, assim, a abordagem terapêutica de diversas doenças infecciosas. Assim, a busca por novas substâncias antimicrobianas é fundamental, pois as mesmas podem contribuir para o controle dos microrganismos patogênicos resistentes e, conseqüentemente, das doenças associadas a eles.

20 Uma ampla gama de bactérias demonstram capacidade de sintetizar uma ou mais substâncias que atuam como mecanismos de defesa. Entre elas, se incluem as bacteriocinas, substâncias antibacterianas de natureza proteica, ativas, em especial, contra microrganismos filogeneticamente relacionados à amostra produtora. Admite-se, ainda, que a expressão de bacteriocinas confere vantagem competitiva, favorecendo, em última análise, a presença destes organismos em ambientes densamente colonizados.

Pouco se conhece sobre a síntese de substâncias antimicrobianas por *A. baumannii*, bem como sobre a influência desta capacidade na abundância da espécie no ambiente, principalmente em instituições de assistência à saúde, como agentes de diversas enfermidades. Considerando-se a relevância do tema, estudos na área são, certamente, desejáveis.

3 OBJETIVOS

5 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e caracterizar a atividade antagonista de *A. baumannii*.

10

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 15
- Pesquisar a produção de substância(s) antagonista(s) por amostras de *A. baumannii* isoladas de hemocultura de pacientes internados em hospital de pronto socorro público de alta complexidade, averiguando-se a ocorrência dos fenômenos de auto, iso e heteroantagonismo.

A partir dos resultados obtidos, selecionar uma amostra produtora e uma amostra
20 reveladora e, então:

- Avaliar a natureza do antagonismo, excluindo possíveis fatores interferentes.
- Avaliar a curva de produção de substância(s) antagonista(s) em meio sólido.

25

- Avaliar a influência das condições de cultivo (meio de cultura e condições de incubação) na expressão do antagonismo.
- Definir o melhor método de extração de substância(s) antagonista(s) sintetizada(s) pela amostra de *A. baumannii* e avaliar a atividade antagonista do extrato bruto.

30

- Titular a atividade antagonista e determinar a concentração de proteínas do extrato bruto.

- Avaliar o espectro de atividade antagonista do extrato bruto.
 - Caracterizar a(s) substância(s) antagonista(s) presente(s) no extrato bruto, avaliando o efeito de diferentes tratamentos sobre a atividade antagonista.
- 5
- Avaliar o modo de ação do extrato ativo, determinando a concentração inibitória mínima (CIM), a concentração bactericida mínima (CBM) e a cinética de ação.
 - Purificar a(s) substância(s) antagonista(s) produzida(s) por *A. baumannii*.
 - 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*.
- 10
- Determinar a massa molecular da(s) substância(s) antagonista(s) parcialmente purificada(s) por espectrometria de massas.

15

4 MATERIAL E MÉTODOS

5 4.1 ORIGEM E MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS TESTE

Para avaliar a expressão de antagonismo, foram incluídas no estudo, como teste, 19 amostras de *A. baumannii*, pertencentes à bacterioteca do Laboratório de
10 Microbiologia Oral e Anaeróbios (Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG), sendo que, destas, 18 foram recuperadas de hemoculturas de pacientes internados no Hospital e Pronto-Socorro João XXIII (FHEMIG, Belo Horizonte), no período de dezembro de 2008 a junho de 2009 e, uma amostra de referência. As amostras foram identificadas e caracterizadas quanto ao perfil de suscetibilidade
15 a antimicrobianos, durante projeto previamente conduzido pela nossa equipe (MARTINS, 2012).

Todas as amostras vêm sendo mantidas em freezer -80 °C, em *Brucella Broth*¹ acrescido de glicerol² à concentração de 10%. As amostras foram cultivadas em
20 *Tryptic Soy Agar - TSA*³, pH 7,2, em aerobiose, a 37 °C, por 24 h.

4.1.1 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS TESTE

25 A identificação das amostras teste foi confirmada, por métodos bioquímico-fisiológico e de genética molecular, empregando-se o cartão⁴ de identificação de bactérias Gram negativas (GN) do sistema automatizado VITEK 2^{®5}, de acordo com instruções do fabricante, e reação de polimerização em cadeia (PCR), respectivamente.

¹ BBL, Sparks, MD, EUA

² Sciavicco, Belo Horizonte, MG, Brasil

³ Difco, Sparks, MD, EUA

⁴ BioMérieux, Marcy-I'Étoile, França

⁵ BioMérieux, Marcy-I'Étoile, França

A extração do DNA foi realizada pelo método de lise térmica. Assim, colônias bacterianas obtidas em TSA, a 37 °C, por 24 h, foram suspensas em 200 µL de água Milli-Q^{®6} e fervidas a 100 °C, por 10 min. A suspensão foi centrifugada a 3622 x g, por 3 min, a 4 °C e o sobrenadante armazenado a - 20 °C, conforme descrito por Martins e colaboradores (2014), com algumas modificações. O DNA foi quantificado usando o espectrofotômetro NanoDrop 1000⁷.

O ensaio de PCR foi realizado para detecção de um gene intrínseco expresso pelas espécies de *Acinetobacter baumannii*, o *bla*_{OXA51}, que codifica uma carbapenemase. O par de *primers* usado, 5' - TAA TGC TTT GAT CGC CCT TG e 5' - TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG, amplifica um fragmento de 353 pb (WOODFORD *et al.*, 2006).

O volume final da reação foi de 20 µL, sendo, 2 ng/µL de DNA, 1,5 mM de MgCl₂⁸, 0,8 mM de dNTPs⁹, 0,4 mM de cada *primer*¹⁰, 2U de Taq DNA polimerase¹¹ e água Milli-Q[®] esterilizada. As condições de amplificação foram desnaturação inicial a 95 °C, por 5 min, seguida por 30 ciclos a 94 °C por 25 s, 52 °C por 40 s e 72 °C por 50 s e extensão final a 72 °C por 6 min (WOODFORD *et al.*, 2006).

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE (0,89 M de Tris base¹², 0,89 M de ácido bórico¹³, 0,02 M de EDTA¹⁴), pH 8,0. A corrida foi realizada a 100 V, por 2 h (MARTINS *et al.*, 2014).

20

⁶ Milipore, Molsheim, França

⁷ Thermo Scientific, Delaware, EUA

⁸ Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil

⁹ AbmGood, Canadá

¹⁰ Integrated DNA Technologies, Coralville, IOWA, EUA

¹¹ Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil

¹² Promega, Madison, EUA

¹³ Dinâmica: Química Contemporânea Ltda.

¹⁴ Promega, Madison, EUA

4.2 PESQUISA DE ATIVIDADE ANTAGONISTA

A expressão de antagonismo foi avaliada pelo método de sobrecamada (BOOTH; JOHNSON; WILKINS, 1977). As amostras teste foram cultivadas em *Tryptic Soy Broth* - TSB¹⁵, pH 7,2, em aerobiose, a 37 °C, por 24 h. Para uso nos experimento, alíquotas das amostras teste foram inoculadas, sob a forma de spots, em diferentes meios de cultura (composição e pH) e condições (temperatura e tempo) de incubação, com o auxílio de replicador de Steers (TAB. 1). A seguir, as culturas foram expostas a vapor de clorofórmio¹⁶, por 30 min, e, em seguida, entreabertas, por 30 min, para evaporação do clorofórmio residual (FARIAS *et al.*, 1992; SOUSA *et al.*, 2010).

Como reveladoras, foram empregadas, além do grupo teste, nove amostras bacterianas de referência, quais sejam: *E. coli* K12 Row, *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. As amostras reveladoras foram cultivadas nas mesmas condições descritas previamente para as amostras teste (item 4.1), com exceção de *S. mutans* ATCC 25175 e *S. pyogenes* ATCC 19615, que foram cultivadas em *Brain Heart Infusion Agar* - BHIA¹⁷ enriquecido com 5% de sangue de carneiro (BHIA-E) e incubadas em jarra de anaerobiose, empregando-se o método da vela, a 37 °C, por 24 h.

Para emprego nesse experimento, as amostras reveladoras foram cultivadas em meios líquidos distintos, de acordo com as necessidades nutricionais de cada uma delas, e incubadas a 37 °C, por 24 h, em atmosfera adequada a cada amostra, conforme descrito anteriormente. As amostras (5 µL para as amostras aeróbias e anaeróbias facultativas e 10 µL para as amostras microaerófilas) foram inoculadas em 3,5 mL de ágar semissólido (0,75% de ágar¹⁸) e, então, todo o

¹⁵ Difco, Sparks, MD, EUA

¹⁶ Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil

¹⁷ Difco Sparks, MD, EUA

¹⁸ Difco Sparks, MD, EUA

volume foi vertido sobre os meios sólidos contendo as amostras teste mortas pela ação do clorofórmio (FARIAS *et al.*, 1992). O material foi incubado nas condições já especificadas para cada amostra reveladora e, então, procedeu-se à leitura. Foi avaliada a presença ou ausência de halo de inibição da amostra reveladora e, quando presente, o diâmetro do halo foi mensurado, sendo os mesmos avaliados quanto à limpidez.

Com base nestes resultados, foram selecionadas uma amostra produtora e uma amostra reveladora, a serem empregadas nas etapas subsequentes do estudo.

TABELA 1

Condições de cultivo utilizadas para avaliação da expressão de antagonismo por amostras clínicas de *Acinetobacter baumannii*.

TESTES	CONDIÇÕES DE CULTIVO													
	MEIO DE CULTURA			SUPLEMENTO			pH			TEMPERATURA (°C)			TEMPO INCUBAÇÃO (h)	
	TSA ¹	BHI ²	CLED ³	EL ⁴	K ₂ HPO ₄	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	6,5	7,2	8,0	25	37	42	24	48
1	X ⁵	- ⁶	-	-	-	-	-	X	-	-	X	-	X	-
2	X	-	-	X	-	-	-	X	-	-	X	-	X	-
3	X	-	-	X	-	-	-	-	X	-	X	-	X	-
4	-	X	-	X	-	-	-	X	-	-	X	-	X	-
5	-	X	-	X	-	-	-	-	X	-	X	-	X	-
6	-	X	-	X	-	-	X	-	-	-	X	-	X	-
7	-	X	-	X	-	-	X	-	-	-	X	-	-	X
8	-	X	-	X	-	-	-	X	-	-	X	-	-	X
9	-	X	-	X	-	-	-	-	X	-	X	-	-	X
10	-	-	X	-	-	-	-	X	-	-	X	-	X	-
11	-	-	X	-	X	X	-	X	-	-	X	-	X	-
12	-	X	-	X	-	-	-	X	-	X	-	-	X	-
13	-	X	-	X	-	-	-	X	-	-	X	-	X	-

¹, Tryptic Soy Agar; ², Brain Heart Infusion Agar; ³, Agar Cystine Lactose Electrolyte Deficient; ⁴, extrato de levedura; ⁵, utilizado; ⁶, não utilizado.

4.3 EXCLUSÃO DE POSSÍVEIS FATORES DE INTERFERÊNCIA

5 Para verificar se a inibição da amostra reveladora era devida à ação de substância(s) antagonista(s) sintetizada(s) pela amostra produtora ou a outros fatores que poderiam interferir na interpretação dos resultados, foram realizados os ensaios complementares descritos a seguir. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o protocolo previamente descrito (item 4.2), a menos que especificado de outra forma.

10

4.3.1 ÁCIDOS GRAXOS

15 A avaliação da presença de ácidos graxos foi realizada utilizando-se BHIA-S acrescido de 1% de amido solúvel¹⁹. Como controle negativo, foi empregado BHIA-S (WALSTAD; REITZ; SPARLING, 1974).

20 Para execução deste teste, a amostra produtora foi inoculada, em *spots*, sobre a superfície do meio. As placas foram processadas como já descrito. A ausência de halo de inibição na placa teste e presença de halo na placa controle indicam atividade de ácidos graxos.

4.3.2 BACTERIÓFAGOS

25

30 Para avaliar a presença de bacteriófagos, uma alíquota de 0,01 mL da amostra produtora previamente cultivada em *Brain Heart Infusion Broth* - BHI²⁰ suplementado com 0,5% de extrato de levedura²¹ (BHI-S) foi inoculada em *spots* em BHIA suplementado com 0,5% de extrato de levedura (BHIA-S). As culturas

¹⁹ Reagen, Curitiba, PR, Brasil

²⁰ Difco, Sparks, MD, EUA

²¹ Difco, Sparks, MD, EUA

foram incubadas a 25 °C, por 24 h, e, em seguida, tratadas com clorofórmio, como já descrito. Então, a camada de BHIA-S foi invertida, com o auxílio de uma espátula esterilizada. A seguir, o teste foi revelado. Após incubação, foi realizada a leitura. A ausência de zona de inibição da amostra reveladora indica presença de fagos, com base no pressuposto de que estes não seriam capazes de atravessar a camada de ágar para infectar a amostra reveladora (KÉKESSY; FIGUET, 1970).

10 4.3.3 CLOROFÓRMIO

Para avaliar a possível atividade do clorofórmio contra a amostra reveladora, a amostra produtora foi cultivada em BHIA-S e, então, a amostra reveladora previamente cultivada em TSB, foi estriada ao redor do *spot* da produtora, em forma de cruz, sem tocar a amostra produtora. Após incubação, foi avaliada a presença ou ausência de halo de inibição da amostra reveladora. Resultado negativo indica que a inibição foi devida à ação do clorofórmio (APOLÔNIO *et al.*, 2007).

20

4.3.4 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

25 A produção do H₂O₂ foi avaliada por meio da incorporação de catalase de fígado bovino²² a 1 % p/v, filtrada em membrana de 0,22 µm²³, em BHIA-S fundido e resfriado. Como controle, foi utilizado BHIA-S. A presença de halo de inibição da amostra reveladora apenas no meio sem adição de catalase é indicativa de atividade de H₂O₂ (HAMADA; OOSHIMA,1975).

30

²² Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA

²³ Millipore, Bedford, MA, EUA

4.4 CURVA DE PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) EM MEIO SÓLIDO

5 A expressão do antagonismo foi avaliada ao longo da curva de crescimento da amostra produtora em meio sólido, conforme descrito por Kékessy e Piguet (1970) e Apolônio (2009), com adaptações.

A amostra produtora criopreservada foi cultivada em TSA, em aerobiose, a 37 °C, por 24 h e ajustada para 0,5 da escala de McFarland em solução salina²⁴
10 esterilizada (0,85%). Alíquotas de 10 µL do inóculo ajustado foram aplicadas, em forma de *spot*, sobre placas de BHIA-S e incubadas em aerobiose, a 25 °C. Em intervalos de 1 h, durante 6 h, e de 30 min, a partir de 6 h, durante 24 h, as placas foram expostas a vapor de clorofórmio e a atividade antagonista foi avaliada pelo método de sobrecamada (ver item 4.2). Após incubação, observou-se a presença
15 ou ausência de halo de inibição da amostra reveladora. A placa teste com o menor tempo de incubação da amostra produtora, na qual se observou halo visível de inibição da amostra reveladora, indica, aproximadamente, o momento de início da síntese de substância(s) antagonista(s).

20

4.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Diferentes métodos de extração proteica foram empregados a fim de se obter
25 extrato bruto ativo, conforme mostrado no QUADRO 1.

²⁴ Química Moderna, Barueri, SP, Brasil

QUADRO 1

Métodos de extração empregados para obtenção de extrato proteico bruto de *Acinetobacter baumannii*.

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	RESUMO DO MÉTODO	FRAÇÕES TESTADAS ^a	REFERÊNCIAS
Precipitação com sulfato de amônio	Pré-inóculo ^b e inóculo ^b incubados a 25 °C, por 24 h, centrifugação 1. Lise celular (sonicação: 9 ciclos, 40 s, intervalos 40 s), centrifugação 2. Precipitação de proteínas intracelulares com concentrações crescentes de sulfato de amônio - SA (30, 50 e 80%).	Frações intracelulares (C30, C50 e C80) ^e	FARIAS <i>et al.</i> , 1994 ^f SOUSA <i>et al.</i> , 2013 ^f
Precipitação com sulfato de amônio	Pré-inóculo ^b e inóculo ^b incubados a 25 °C, por 24 h, centrifugação 1. Lise celular (sonicação ¹ : 18 ciclos, 40 s, intervalos 40 s), centrifugação 2. Precipitação de proteínas intracelulares (30, 50 e 80% de SA) e extracelulares - sobrenadante (30, 50 e 75 % de SA).	Frações intracelulares (C30, C50 e C80) ^e Frações extracelulares (S30, S50 e S75) ^e	FARIAS <i>et al.</i> , 1994 ^f SOUSA <i>et al.</i> , 2013 ^f
Precipitação com sulfato de amônio	Preparo do inóculo ^b a partir do cultivo em placa ^c . Inóculo incubado a 25 °C, por 48 h. Centrifugação 1. Lise celular (sonicação: 30 ciclos, 35 s, intervalos 40 s), centrifugação 2. Precipitação das proteínas intracelulares com concentrações crescentes de sulfato de amônio - SA (30, 50 e 75%).	Frações intracelulares (C30, C50 e C75) ^e	FARIAS <i>et al.</i> , 1994 ^f SOUSA <i>et al.</i> , 2013 ^f
Extração de proteínas do ágar	Inoculação e revelação (método da sobrecamada, item 4.2). Corte e maceração (com água destilada esterilizada) do halo de inibição da amostra reveladora. Centrifugação e separação do sobrenadante e <i>pellet</i> (ágar).	Sobrenadante (concentrado e não concentrado) <i>Pellet</i>	Este estudo
Extração por choque térmico	Preparo do inóculo ^b a partir do cultivo em placa ^c . Inóculo incubado a 25 °C, por 48 h. Inóculo congelado em nitrogênio líquido e descongelado bruscamente a 37 °C (procedimento realizado 3 vezes). Centrifugação e coleta do sobrenadante e <i>pellet</i> .	Sobrenadante (filtrado) Sobrenadante não filtrado Sobrenadante concentrado <i>Pellet</i> (ressuspenso em tampão ^d e água)	Este estudo

Extração de proteínas intracelulares	Inóculo ^b incubado a 25 °C, por 24 e 48 h. Lise celular (Prensa Francesa). Centrifugação. Separação do <i>pellet</i> e do sobrenadante.	Sobrenadante (concentrado e não concentrado) <i>Pellet</i> (ressuspenso em tampão ^d e água destilada)	QUINES <i>et al.</i> , 2015 ^f
Precipitação ácida (Lipopeptídeo)	Inóculo ^b incubado a 25 °C, por 24, 48 e 72 h, sob agitação (125 rpm). Centrifugação 1, coleta do sobrenadante. Precipitação das proteínas do sobrenadante com HCl 5N. Centrifugação 2. Coleta do <i>pellet</i> e sobrenadante.	<i>Pellet</i> (precipitado) ressuspenso em água destilada Sobrenadante (concentrado e não concentrado)	COOPER <i>et al.</i> , 1981 ^f NAKANO; MARAHIEL; ZUBER, 1988 ^f
Extração alcoólica	Inóculo ^b incubado a 25 °C, por 24, 48 e 72 h, sob agitação (125 rpm). Extração de proteínas do sobrenadante com butanol, agitação por 2 h. Mistura transferida para um funil de separação e mantida em temperatura ambiente, <i>overnight</i> .	Fase superior bruta (orgânica) Fase inferior bruta Ambas as fases concentradas	KAWULKA <i>et al.</i> , 2004 ^f
Extração alcoólica	Inóculo ^b incubado a 25 °C, por 24, 48 e 72 h, sob agitação (125 rpm). Extração de proteínas do sobrenadante com etanol gelado (4 volumes de etanol para 1 volume de sobrenadante), agitação a 4 °C, por 24 h. Centrifugação. Coleta do sobrenadante e <i>pellet</i> .	<i>Pellet</i> (precipitado) ressuspenso em água destilada <i>Pellet</i> (ressuspenso em tampão ^d) Sobrenadante (concentrado e não concentrado)	CAMARGOS DE MORAES <i>et al.</i> , 2003 ^f
Extração ácida	Inóculo ^b incubado a 25 °C, por 24 h, sob agitação (125 rpm). A cultura foi aquecida a 70 °C, por 25 min e o pH ajustado para 5,5. Centrifugação. O <i>pellet</i> foi ressuspenso em diferentes soluções (NaCl, KCl, MgCl ₂ , CaCl ₂ , H ₂ O, etanol) com concentrações de 10 mM, pH 2. As suspensões foram incubadas por 2 h, sob agitação, a 4 e 25 °C. Centrifugação e coleta do sobrenadante.	Sobrenadante bruto Sobrenadante liofilizado (ressuspenso em água destilada estéril e tampão ^d)	YANG; JOHNSON; RAY, 1992 ^f

^a, método da sobrecamada (item 4.2); ^b, BHI-S; ^c, TSA; ^d, tampão Tris-HCl pH 8 0,01M; ^e, frações dialisadas em membrana de 1000 Da; ^f, com modificações; ¹, Branson, Danbury, CT, EUA.

4.5.1 PRECIPITAÇÃO ÁCIDA

A técnica de precipitação ácida foi realizada de acordo com COOPER *et al.* (1981) e NAKANO; MARAHIEL; ZUBER (1988), com modificações. Para padronização desta metodologia, as condições de cultivo da amostra produtora (inóculo) foram otimizadas, tendo sido empregados, como variáveis, o número de repiques a partir da amostra criopreservada para preparo do pré-inóculo (um e três), a concentração de pré-inóculo (5, 10 e 15%) e o tempo de incubação do inóculo (24 e 48 h).

A amostra de *A. baumannii* criopreservada foi submetida a três repiques sucessivos em TSA e, então, uma suspensão 15% (v/v) do pré-inóculo (sem incubação) foi inoculada em BHI-S, em aerobiose, sob agitação constante (125 rpm), a 25 °C, por 48 h.

Após incubação, a cultura foi centrifugada a 7.826 x g, por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante contendo a(s) substância(s) antagonista(s) foi coletado e submetido à precipitação com HCl²⁵ 5 N, pH 2,0. Após incubação em repouso, por 24 h, a 4 °C, o sobrenadante foi centrifugado a 7.826 x g, por 30 min, a 4 °C. O precipitado foi solubilizado em água destilada esterilizada e o pH ajustado para 7,0 com NaOH²⁶ 2 N. O extrato foi alíquotado, liofilizado e armazenado em freezer -80 °C. As alíquotas do extrato foram pesadas e o rendimento da precipitação ácida determinado.

4.6 TESTE DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DO EXTRATO BRUTO

A atividade do extrato bruto foi determinada pelo método de difusão em meio sólido, técnica de *spread plate*, conforme descrito por Mantovani (2002), com algumas adaptações.

²⁵ Quimex, São Paulo, SP, Brasil

²⁶ Química Moderna Indústria e Comércio Ltda, Barueri, SP, Brasil

A amostra reveladora foi previamente ajustada para 0,5 da escala de McFarland e semeada em *Mueller Hinton Agar*²⁷(MHA) (CLSI, 2015). O centro da placa com camada de MHA foi perfurado (diâmetro de aproximadamente 5 mm) com auxílio de um canudo esterilizado e uma alíquota de 25 µL do extrato bruto foi aplicado no poço. A placa foi incubada *overnight*, a 4 °C, para difusão da(s) substância(s) antagonista(s), sendo, em seguida, incubada em condição adequada para o crescimento da amostra reveladora (item 4.2). Após incubação, foi realizada a leitura, avaliando-se a presença de halo límpido de inibição da amostra reveladora.

10

4.7 TITULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DO EXTRATO BRUTO

15 Para titulação da atividade antagonista, o extrato bruto foi submetido a diluições seriadas em água destilada esterilizada e uma alíquota de 25 µL de cada diluição foi aplicada em MHA previamente inoculado com a amostra reveladora, conforme descrito no item 4.6.

O título foi expresso em unidades arbitrárias por mililitro (UA/mL), caracterizada como a recíproca da maior diluição que resultou na formação de halo límpido de inibição da amostra reveladora (YAMAMOTO *et al.*, 2003). O cálculo de UA/mL foi realizado empregando-se a fórmula $UA = 2^n \times 1000 \mu L \times v/\mu L$, onde, *v* corresponde ao volume do extrato aplicado em cada poço e *n* a recíproca da maior diluição (SOUSA *et al.*, 2010).

25

4.8 ESPECTRO DE AÇÃO DO EXTRATO BRUTO

30 O espectro de atividade antagonista do extrato bruto foi avaliado contra 76 amostras bacterianas, sendo 39 amostras de referência e de importância clínica e

²⁷ Difco Sparks, MD, EUA

37 amostras clínicas de *Acinetobacter* spp. (35 de *A. baumannii*, incluindo as 19 amostras produtoras, e duas de *A. junii*). As amostras pertencem à coleção do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (LMOA) e vêm sendo mantidas em freezer -80 °C, em *Brucella Broth* acrescido de 10% de glicerol. As amostras clínicas de *Acinetobacter* spp. foram gentilmente cedidas pela Professora Simone Gonçalves dos Santos, oriundas de projetos previamente desenvolvidos no LMOA.

As amostras foram recuperadas em diferentes meios de cultura e condições de cultivo (QUADRO 2). A atividade antagonista foi avaliada de acordo com o item 4.6, exceto para amostras anaeróbias obrigatórias, cultivadas em *Brucella Agar*²⁸ suplementado com hemina²⁹ (5 µg/mL), menadiona³⁰ (1 µg/mL) e sangue de cavalo (5%) e amostras microaerófilas, cultivadas em MHA enriquecido com sangue de carneiro (5%) (CLSI, 2015).

15

4.9 DOSAGEM PROTEICA

A determinação da concentração de proteínas do extrato bruto foi realizada conforme metodologia descrita por Bradford (1976), que baseia-se na ligação do corante às proteínas. Como padrão, foi utilizada solução de soroalbumina bovina³¹ (1 mg/mL) e, como corante, *Coomassie Brilliant Blue G-250*³². O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços. A curva padrão foi construída utilizando 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 µg da solução padrão. O extrato bruto foi submetido a diluições seriadas em água Milli-Q[®] e a concentração de proteínas foi determinada pela leitura de absorbância a 595 nm, realizada em leitor de Elisa (Multiskan Spectrum)³³.

²⁸ Difco Sparks, MD, EUA

²⁹ Inlab, São Paulo, SP, Brasil

³⁰ Inlab, São Paulo, SP, Brasil

³¹ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA

³² Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil

³³ Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

QUADRO 2

Condições de cultivo empregadas para recuperação das amostras reveladoras

AMOSTRAS REVELADORAS	CONDIÇÕES DE CULTIVO	
	MEIOS DE CULTIVO	CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO
<i>Bacteroides</i> spp. (3) ^a <i>Prevotella</i> spp. (2) <i>Porphyromonas</i> spp. (2) <i>Fusobacterium</i> spp. (2) <i>Clostridium</i> spp. (2) <i>Eubacterium lentum</i> <i>Lactobacillus</i> spp. (2) <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> <i>Parabacteroides distasonis</i> <i>Aggregatibacter actinomycetenumcomitans</i> <i>Bifidobacterium</i> spp. (2)	BHIA-S/E ^b	37 °C, 48 h, anaerobiose ^d
<i>Streptococcus</i> spp. (5) <i>Eikenella corrodens</i>	TSA-E ^c	37 °C, 24 h, microaerofilia ^e
<i>Acinetobacter</i> spp. (38) (37 amostras clínicas, 1 amostra ATCC 19606) <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus</i> spp. (2) <i>Escherichia coli</i> (6) (ATCC, K12 row, EHEC, EPEC, ETEC, EIEC) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium <i>Shigella flexneri</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	TSA	37 °C, 24 h, aerobiose

5 ^a, número de amostras; ^b, BHIA suplementado com 0,5% de extrato de levedura, hemina (5 µg/mL), menadiona (1 µg/mL), enriquecido com 5% (v/v) de sangue de cavalo; ^c, TSA enriquecido com 5% de sangue de carneiro; ^d, jarra de anaerobiose³⁴, método mecânico (90% N₂ e 10% CO₂); ^e, jarra de anaerobiose, método da vela.

³⁴ Forma Scientific, Marietta, OH, EUA

4.10 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO

O extrato proteico foi exposto a diferentes condições, visando avaliar a influência das mesmas sobre sua atividade. Foram testados diferentes valores de temperatura e pH, enzimas e solventes orgânicos. Para avaliar o efeito de cada tratamento, o extrato testado foi submetido a teste de atividade antagonista (item 4.6).

10

4.10.1 TEMPERATURA

A influência do tratamento térmico na atividade do extrato bruto ativo foi avaliada segundo metodologia proposta por Ribeiro-Ribas *et al.* (2009), com algumas modificações.

Alíquotas do extrato ativo foram incubadas a -80 °C (*freezer*), -20 °C (*freezer*), 4 °C (geladeira), 25 °C (temperatura ambiente), 37 °C (estufa), 50 °C e 70 °C (banho-maria) e 100 °C (fervura), em intervalos de 10, 20 e 40 min, 1, 2, 4, 6 e 8 h, 1, 2, 5, 7, 20, 30, 60 e 90 dias.

20

4.10.2 pH

25

A estabilidade do extrato ativo foi avaliada frente a diferentes valores de pH, conforme descrito por Valeff *et al.* (2011), com adaptações. O tampão universal Britton-Robinson (ácido orto-fosfórico³⁵ 0,04 M, ácido acético³⁶ 0,04 M e ácido bórico³⁷ 0,04 M) (BRITTON; ROBINSON, 1931), que possibilita o ajuste do pH a

³⁵ Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³⁶ Ecibra

³⁷ BioAgency, São Paulo, SP, Brasil

valores de 2 a 12, foi utilizado. O ajuste do pH foi feito com soluções de NaOH 2 M e HCl 2 M e os tampões foram esterilizados por filtração.

O extrato ativo foi diluído na proporção de 1:1 (v/v) no tampão universal e a solução foi, então, incubada a 4 °C, em intervalos de 15 e 30 min, 1, 2, 3, 4 e 5 h, 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Como controle, foi verificada a atividade do tampão e do extrato ativo diluído em água destilada esterilizada, na proporção de 1:1 (v/v), incubados nas mesmas condições determinadas para os tubos teste.

10 4.10.3 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

O extrato ativo foi submetido a tratamento com enzimas proteolíticas³⁸ para avaliação do efeito das mesmas na atividade antagonista. A perda de atividade indica a natureza proteica da fração (APOLÔNIO *et al.*, 2008; HAYES; CUNDY; FERNANDES, 1983).

Foram testadas as enzimas proteinase K, α -quimotripsina, tripsina e papaína. As enzimas α -quimotripsina e tripsina foram solubilizadas em tampão Tris³⁹-HCl 20 mM, pH 8,0; a proteinase K, em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,2; e a papaína em tampão fosfato⁴⁰ 50 mM, pH 5,0, todas na concentração final de 1 mg/mL. As soluções foram esterilizadas por filtração.

Para o teste, uma alíquota do extrato foi diluída na proporção de 1:1 (v/v) nas soluções enzimáticas. Os produtos resultantes foram incubados por 15 min e 30 min, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 h a 37 °C. A seguir, a preservação da atividade antagonista foi avaliada, conforme item 4.6, pela presença ou ausência de halo de inibição da amostra reveladora. Como controle da ação enzimática, foram utilizadas as soluções enzimáticas e o extrato ativo diluído 1:1 (v/v) em água destilada esterilizada, incubados nas mesmas condições descritas para o teste. Além destes, foi utilizado, ainda, um extrato proteico sabidamente ativo, previamente caracterizado (OLIVEIRA, 2013).

³⁸ Sigma-Aldrich

³⁹ Promega, Madison, WI, EUA

⁴⁰ Inlab

4.10.4 SOLVENTES ORGÂNICOS

O efeito de solventes orgânicos na atividade antagonista do extrato ativo foi
5 avaliado segundo metodologia descrita por Sousa *et al.* (2010), com adaptações.
Os solventes utilizados foram acetona⁴¹, acetonitrila⁴², álcool iso-propílico⁴³,
butanol⁴⁴, etanol⁴⁵, hexano⁴⁶ e metanol⁴⁷.

Previamente, foram preparadas soluções aquosas a 10%, 50% e 80% dos
solventes orgânicos e, em seguida, estas soluções foram filtradas. O extrato ativo
10 foi diluído na proporção de 1:1 (v/v) nestas soluções e, então, incubados a 4 °C,
por 15 e 30 min, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 h. Como controles, foram utilizadas soluções
aquosas dos solventes orgânicos e do extrato ativo, diluídos 1:1 (v/v) em água
destilada esterilizada, incubados e testados nas mesmas condições propostas
para os tubos teste.

15

4.11 ESTUDO DO MODO DE AÇÃO DO EXTRATO BRUTO

20 4.11.1 DETERMINAÇÃO DA CIM

Conceitualmente, a CIM é definida como a menor concentração da droga capaz
de inibir o crescimento visível de um organismo após incubação *overnight*
25 (FRENCH, 2006). A CIM foi determinada segundo protocolo preconizado pelo
Clinical and Laboratory Standards Institute (2003), com algumas adaptações. O
experimento foi realizado por meio de microdiluição em caldo, em triplicata.

⁴¹ Fmaia, Cotia, SP, Brasil

⁴² J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, EUA

⁴³ Vetec

⁴⁴ Ecibra

⁴⁵ Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil

⁴⁶ Ecibra

⁴⁷ J.T.Baker

O extrato bruto com título de 1280 UA/mL foi diluído em *Mueller Hinton Broth*⁴⁸ (MH), em microplaca de 96 poços, sendo aplicados 100 µL de cada diluição por poço. Em seguida, adicionaram-se 90 µL de MH e 10 µL da amostra reveladora [ajustada em escala 0,5 de McFarland], em todos os poços teste da microplaca.

5 Obteve-se, então, um volume final de 200 µL/poço. Foram empregados três controles negativos: controle de esterilidade da água utilizada para ressuspender o extrato liofilizado (190 µL de MH e 10 µL de água), controle de esterilidade do caldo (200 µL de MH) e controle de esterilidade do extrato (100 µL do extrato diluído e 100 µL de MH). Como controle positivo, foram utilizados 190 µL de MH
10 acrescido de 10 µL de cultura da amostra reveladora. A microplaca foi incubada em aerobiose, por 24 h, a 37 °C. A leitura foi realizada avaliando-se a presença ou ausência de crescimento bacteriano visível em cada poço.

15 **4.11.2 DETERMINAÇÃO DA CBM**

A CBM caracteriza-se como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de reduzir a contagem microbiana em 99,9 % (LEVISON; 2009; VALEFF *et*
20 *al.*, 2011). Este teste foi realizado a partir da microplaca empregada para determinação da CIM, também em triplicata.

Alíquotas de 100 µL dos controles negativos e de cada poço teste em que não houve crescimento bacteriano visível foram semeadas em MHA, com o auxílio de alça de Drigalski. O controle positivo foi diluído em salina (10^{-3} a 10^{-13}) e 100 µL
25 de cada diluição também foram semeados em MHA. As placas foram incubadas em aerobiose, a 37 °C, por 24 h. Após incubação, foi realizada a contagem de colônias e o resultado foi expresso em UFC/mL (OLIVEIRA, 2013).

⁴⁸ Merck, Darmstadt, Alemanha

4.11.3 CINÉTICA DE AÇÃO

Neste experimento, 20 µL de cultura da amostra reveladora (ajustada para 0,5 da
5 escala de McFarland, diluída 1:10 em solução salina 0,85%), foram adicionados a
100 µL do extrato bruto diluído em MH (até atingir a concentração de 80 UA/mL) e
80 µL de MH. Como controle positivo, foram utilizados 20 µL de suspensão da
cultura da amostra reveladora e 180 µL de MH. Como controle negativo, foi
10 empregada uma mistura contendo 80 µL de MH, 20 µL de salina e 100 µL do
extrato bruto diluído. A microplaca foi incubada a 37 °C, sendo retirada nos
intervalos de 0, 10, 40, 90, 120 e 150 min, alíquotas de 100 µL de cada poço
(testes e controles). As alíquotas teste e controle positivo coletadas foram diluídas
(10⁻¹ a 10⁻⁵) e semeadas em MHA, com o auxílio de alça de Drigalski. As culturas
foram incubadas a 37 °C e, então, a leitura foi realizada por meio da contagem de
15 colônias. O resultado foi expresso em UFC/mL (OLIVEIRA, 2013).

4.12 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO

20 O extrato bruto, sabidamente ativo, foi submetido a etapas de cromatografia de
fase reversa para purificação da(s) substância(s) ativa(s). Após cada etapa de
purificação, as frações foram submetidas a teste de atividade antagonista, como
descrito no item 4.6.

25

4.12.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SUPELCOSIL™

O extrato bruto ativo foi submetido a *High-performance liquid chromatography* (HPLC) em coluna LC-8 Supelcosil (4,6 mm x 25 cm, 5 µm)⁴⁹. A coluna foi equilibrada com solução A (ácido trifluoroacético - TFA⁵⁰ 0,1% v/v em água Milli-Q[®]) e eluída com solução B (acetonitrila - ACM 80% v/v acrescida de TFA 0,1%). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 e 280 nm. As frações foram coletadas, concentradas por liofilização, solubilizadas em 40 µL de água destilada esterilizada e testadas quanto à expressão de atividade antagonista. As frações ativas foram submetidas a “recromatografia” em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide⁵¹.

4.12.2 “RECROMATOGRAFIA” EM COLUNA DE FASE REVERSA SEPHASIL™ PEPTIDE

Os *pools* das frações ativas coletadas na etapa anterior (cromatografia em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil™) foram submetidas à “recromatografia” de fase reversa em coluna C-18 Sephasil™ Peptide (4,6 mm x 25 cm, 5 µm) sob as mesmas condições descritas no item 4.12.1. As frações obtidas foram processadas e analisadas quanto à atividade antagonista.

Os *pools* das frações ativas oriundas da “recromatografia” foram novamente “recromatografados” empregando-se a mesma coluna e as mesmas condições. As frações ativas foram analisadas por espectrometria de massas.

⁴⁹ Shimadzu, Kyoto, Japão

⁵⁰ Sigma-Aldrich

⁵¹ Sigma-Aldrich

4.13 SDS-PAGE

O extrato bruto e as frações provenientes das etapas de purificação, em coluna
5 LC-8 Supelcosil™ foram submetidos à SDS-PAGE, a 15 % (SHAGGER; VON
JAGOW, 1987). A corrida eletroforética foi realizada a 120 V, por 3 h e
encaminhado para revelação *in situ*. O gel foi fixado com 100 mL de solução de
etanol a 20% e ácido acético⁵² a 10%, por 2 h e, posteriormente, submetido a
lavagens sucessivas (15 em 15 min, por 3 h e, então, *overnight*) com água
10 destilada esterilizada para remoção do SDS e de possíveis contaminantes
microbianos (OLIVEIRA, 2013). O gel, mantido em condições assépticas, foi
depositado sobre uma camada de MHA e recoberto com uma camada de meio
semissólido (TSB) contendo uma alíquota da cultura da amostra reveladora. Após
incubação a 37 °C, em aerobiose, por 24 h, a leitura foi realizada pela observação
15 da presença de bandas de inibição da multiplicação da amostra reveladora. A
massa molecular de cada banda ativa foi estimada por comparação com padrão
de massa molecular pré-corado de 260 a 10 kDa (Spectra™ *Multicolor Broad
Range Protein Ladder*)⁵³ e 250 a 2 kDa (*Precision Plus Protein Dual Xtra
Standards*)⁵⁴ (FARIAS *et al.*, 1994).

20

4.14 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

25 As frações ativas oriundas da “re-recromatografia” de fase reversa (coluna
Sephasil™ Peptide) foram avaliadas por espectrometria de massas. As frações
foram liofilizadas, ressuspensas em solução de TFA 0,1 % e dissolvidas em
matriz de α -CHCA (α -ciano-4-hidroxicinâmico)⁵⁵ e super DHB (ácido 2,5-di-
hidroxibenzoico)⁵⁶, na proporção de 1:1 (v/v). Um volume de 1 μ L/*spot* foi

⁵² Sigma-Aldrich

⁵³ Fermentas Life Science, Burlington, Canadá

⁵⁴ Bio-Rad, EUA

⁵⁵ Sigma-Aldrich

⁵⁶ Sigma-Aldrich

transferido para uma placa de dados MALDI (MTP AnchorChips 384 x 600)⁵⁷ e mantida em temperatura ambiente. A massa molecular foi determinada empregando-se AutoflexTM[®] III MALDI-TOF/TOF⁵⁸, operado em modo linear positivo. A calibração linear foi obtida utilizando-se o padrão de calibração proteico (*Protein Calibration Standard I e II*)⁵⁹ e o software de coleta de dados *Flex Control 2.4.30.0*⁶⁰. Para análise dos dados, empregou-se o programa *Flex Analysis 2.4*⁶¹.

⁵⁷ Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA

⁵⁸ Bruker Daltonics

⁵⁹ Bruker Daltonics

⁶⁰ Bruker Daltonics

⁶¹ Bruker Daltonics

5 RESULTADOS

5 5.1 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS TESTE

As amostras teste foram identificadas como *A. baumannii*, utilizando o cartão de identificação para bactérias Gram negativas e o ensaio de PCR, confirmando a
10 identificação anterior (MARTINS, 2012).

Todas as 19 amostras teste albergavam *bla*_{OXA51} (*amplicon* de 353 pb), intrínseco à espécie *A. baumannii* (FIG. 1). O gene codifica uma oxacilinase (OXA), enzima pertencente à classe D de Ambler, (HAMMOUDI; MOUBARECK; SARKIS, 2014) capaz de hidrolisar os carbapenêmicos (TURTON *et al.*, 2006).

15

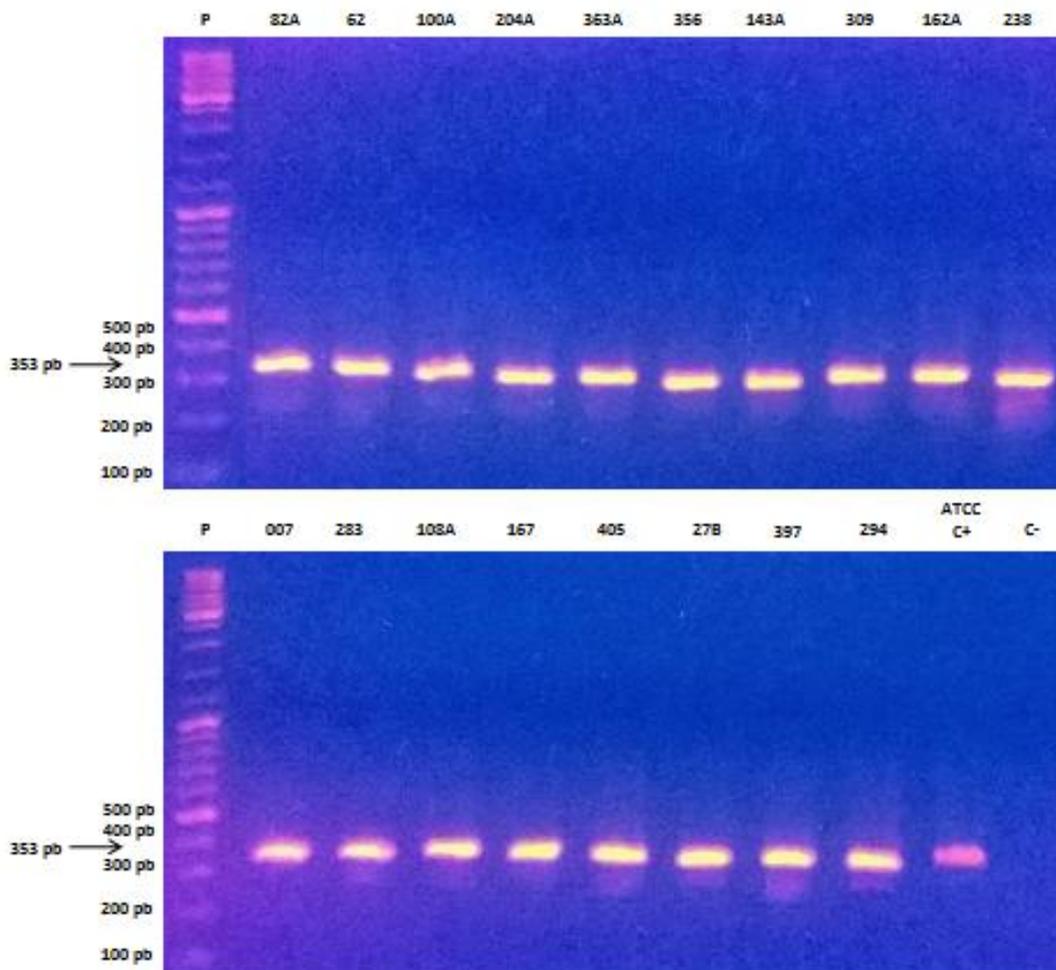


FIGURA 1

Detecção de *bla*_{OXA51}, gene intrínseco de *Acinetobacter baumannii*, por PCR; amplicons de 353 pb observados em todas as amostras. C+, controle positivo: *A. baumannii* ATCC 19606; C-, controle negativo: água. P, padrão de massa molecular (100 pb); pb, pares de bases.

5.2 PESQUISA DE ATIVIDADE ANTAGONISTA

- Neste estudo, foram realizados inúmeros testes para pesquisa de atividade antagonista, alterando-se as condições de cultivo das amostras produtoras (TAB. 1). Dentre as 19 amostras de *A. baumannii* testadas, apenas uma apresentou atividade antagonista. Quanto ao espectro de ação, observou-se apenas o fenômeno de isoantagonismo. Não se evidenciou a ocorrência de autoantagonismo e heteroantagonismo.
- 10 A amostra de *A. baumannii* ativa expressou antagonismo quando cultivada em BHIA-S, pH 6,5, 7,2 e 8,0, incubada a 37 °C, por 24 h. Nestas condições, a amostra foi ativa contra uma, quatro e duas amostras reveladoras, respectivamente (FIG.2). Observou-se a presença de halos de inibição pequenos e nublados (TAB. 2).
- 15 Visando à otimização da expressão de antagonismo, o *screening* foi repetido, empregando-se as 19 amostras reveladoras testadas anteriormente. As condições utilizadas foram meio BHIA-S, pH 7,2, incubação em aerobiose, por 24 h e temperaturas de incubação de 25 °C e 42 °C. No teste realizado a 25 °C, foram observados halos de inibição maiores e mais límpidos se comparados
- 20 àqueles observados nos demais ensaios (TAB. 2, FIG. 2 e 3).
- Com base nesses resultados, a amostra de *A. baumannii* 397 foi selecionada para as etapas subsequentes do estudo. Quanto às reveladoras, selecionou-se a amostra de *A. baumannii* 294, que apresentou maior suscetibilidade, análise realizada de acordo com o tamanho e a limpidez do halo de inibição gerado (FIG.
- 25 4).

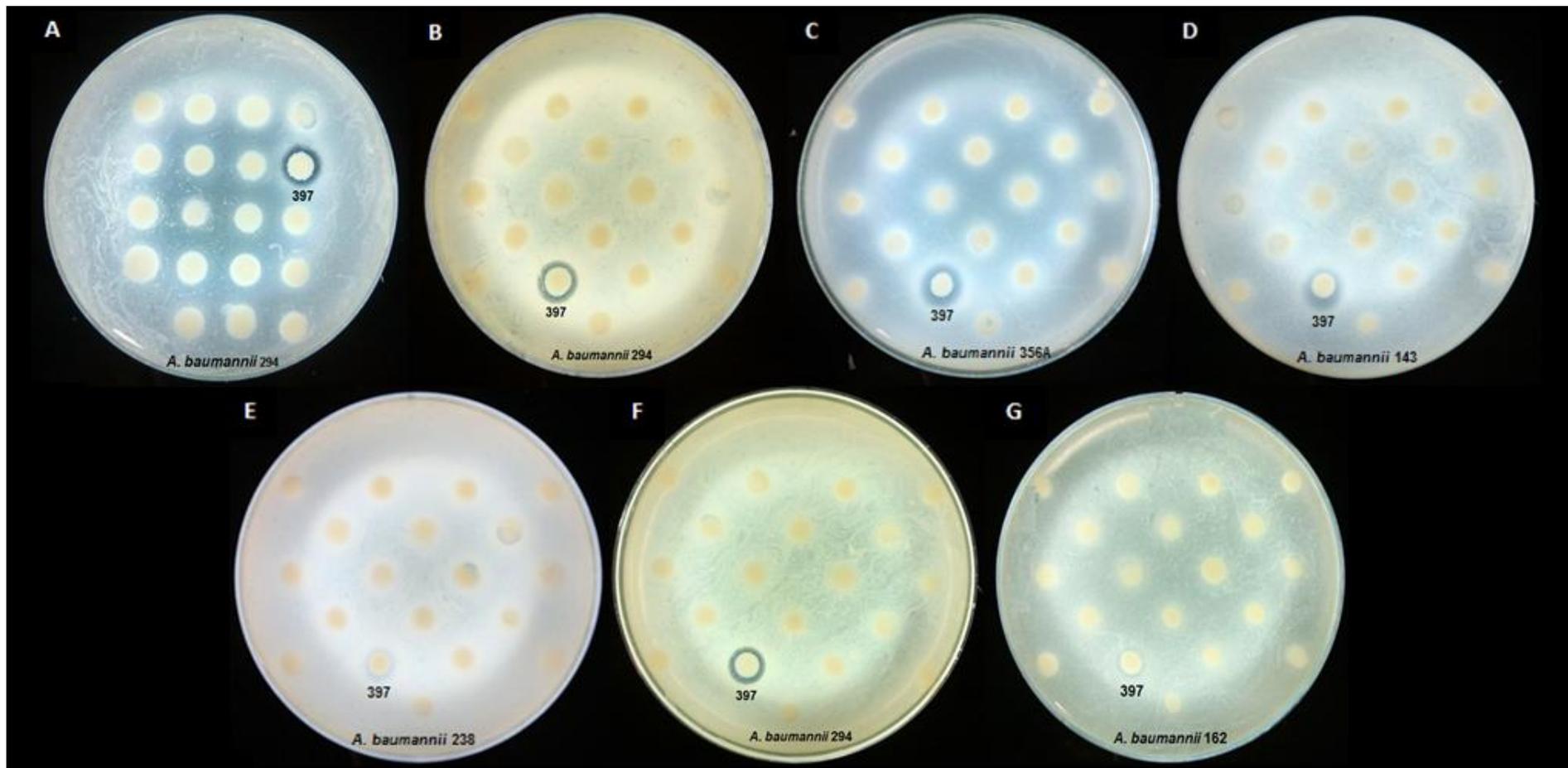


FIGURA 2

Atividade isoantagonista da amostra *Acinetobacter baumannii* 397. Método de sobrecamada, BHIA-S, pH 6,5 (A), 7,2 (B, C, D, E), 8,0 (F, G), a 37 °C, por 24h.

Amostras reveladoras: *A. baumannii* 294 (A, B e F), 356A (C), 143 (D), 238 (E) e 162 (G).

TABELA 2

Atividade isoantagonista da amostra de *Acinetobacter baumannii* 397, avaliada pelo método de sobrecamada¹, em diferentes temperaturas e valores de pH

AMOSTRAS REVELADORAS <i>A. baumannii</i>	Diâmetro do halo de inibição (mm)				
	Temperatura de incubação da amostra produtora <i>A. baumannii</i> 397				
	25 °C	37 °C		42° C	
pH 7,2	pH 6,5	pH 7,2	pH 8	pH 7,2	
<i>A. baumannii</i> 162	10,52 (HN ²)	-	-	8,42 (HN)	-
<i>A. baumannii</i> 294	13,09 (HL ³)	10,16 (HL)	10,47 (HL)	9,51 (HL)	-
<i>A. baumannii</i> 283	- ⁴	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i> 100	-	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i> 143	-	-	9,92 (HN)	-	-
<i>A. baumannii</i> 108	-	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i> 238	15,84 (HN)	-	8,64 (HN)	-	-
<i>A. baumannii</i> 356A	-	-	11,36 (HN)	-	-
<i>A. baumannii</i> 363	-	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i> 007	12,37 (HL)	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i> 82	-	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i> 62	-	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i> 309	-	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i> 204	-	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i> 27B	11,08 (HL)	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i> 405	-	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i> 397	-	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i> 167	-	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	10,07 (HL)	-	-	-	-

¹, teste realizado em BHIA-S, incubado a 25, 37 e 42 °C, por 24 h; ², halo nublado; ³, halo límpido; ⁴, ausência de atividade

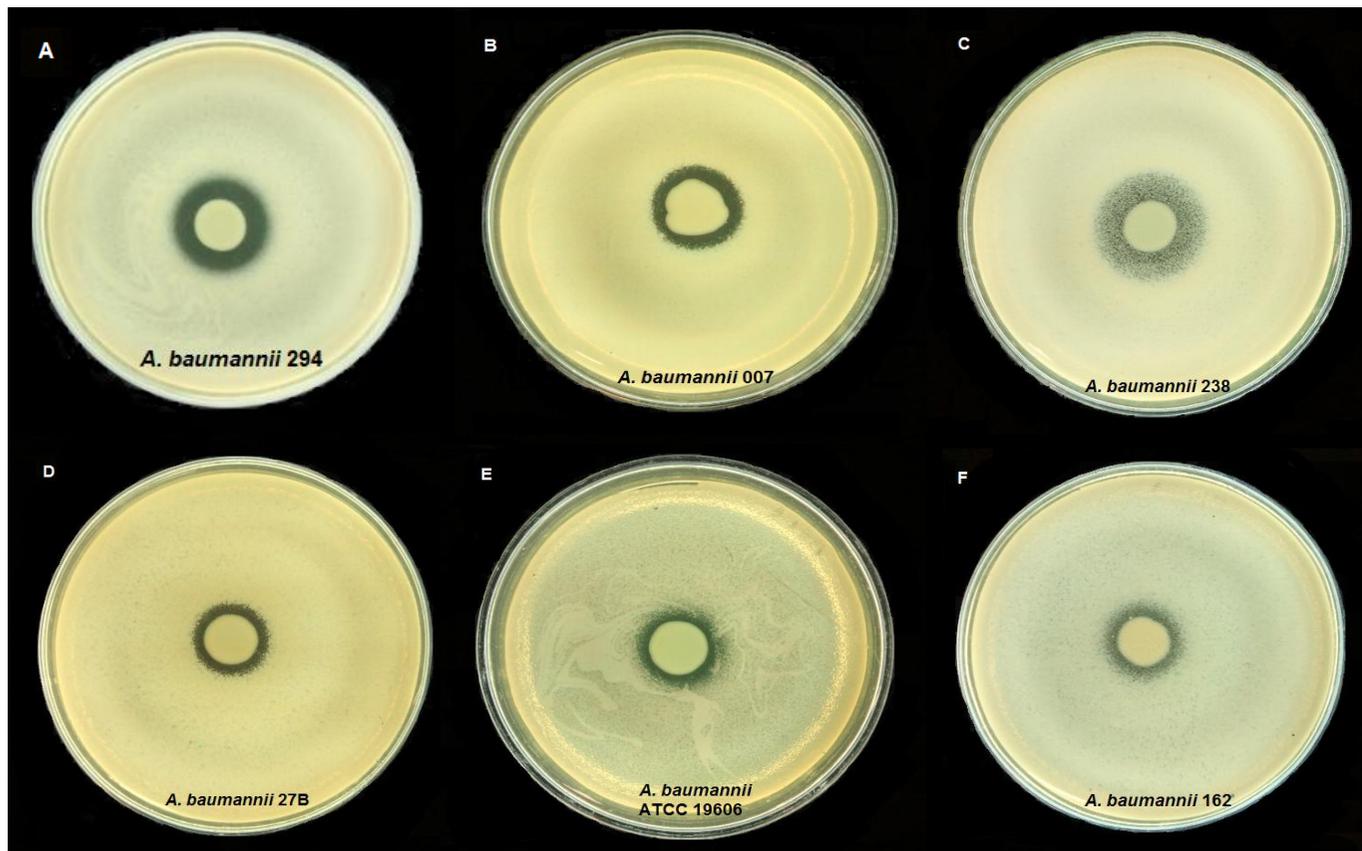


FIGURA 3

Atividade isoantagonista da amostra *Acinetobacter baumannii* 397.

Método de sobrecamada, BHIA suplementado com extrato de levedura, pH 7,2, 25 °C, 24 h.

Amostras reveladoras: *A. baumannii* A) 294, B) 007, C) 238, D) 27B, E) ATCC 19606 e F) 162.



FIGURA 4

Atividade isoantagonista da amostra de *Acinetobacter baumannii* 397 contra *A. baumannii* 294. Método de sobrecamada, BHIA-S, pH 7,2, incubação a 25 °C, por 24 h.

5 5.3 EXCLUSÃO DE POSSÍVEIS FATORES DE INTERFERÊNCIA

Os resultados dos testes realizados com o objetivo de detectar a possível atividade de fatores que poderiam interferir na interpretação dos dados gerados afastaram esta possibilidade.

5.3.1 ÁCIDOS GRAXOS

15

Em ambos os meios de cultura empregados, BHIA-S, com e sem amido, foi possível visualizar halo de inibição da amostra reveladora. Assim, a presença de amido no ágar não interferiu na expressão de antagonismo, o que evidencia que ácidos graxos não são responsáveis pela atividade observada (FIG. 5A).

20

5.3.2 BACTERIÓFAGOS

25 Observou-se presença de halo de inibição da amostra reveladora, evidenciando a ausência de bacteriófagos (FIG. 5B).

5.3.3 CLOROFÓRMIO

30

Atividade antagonista foi visualizada nos testes independente da exposição a clorofórmio, indicando, assim, que a substância não era a responsável pela inibição da amostra reveladora (FIG. 5C).

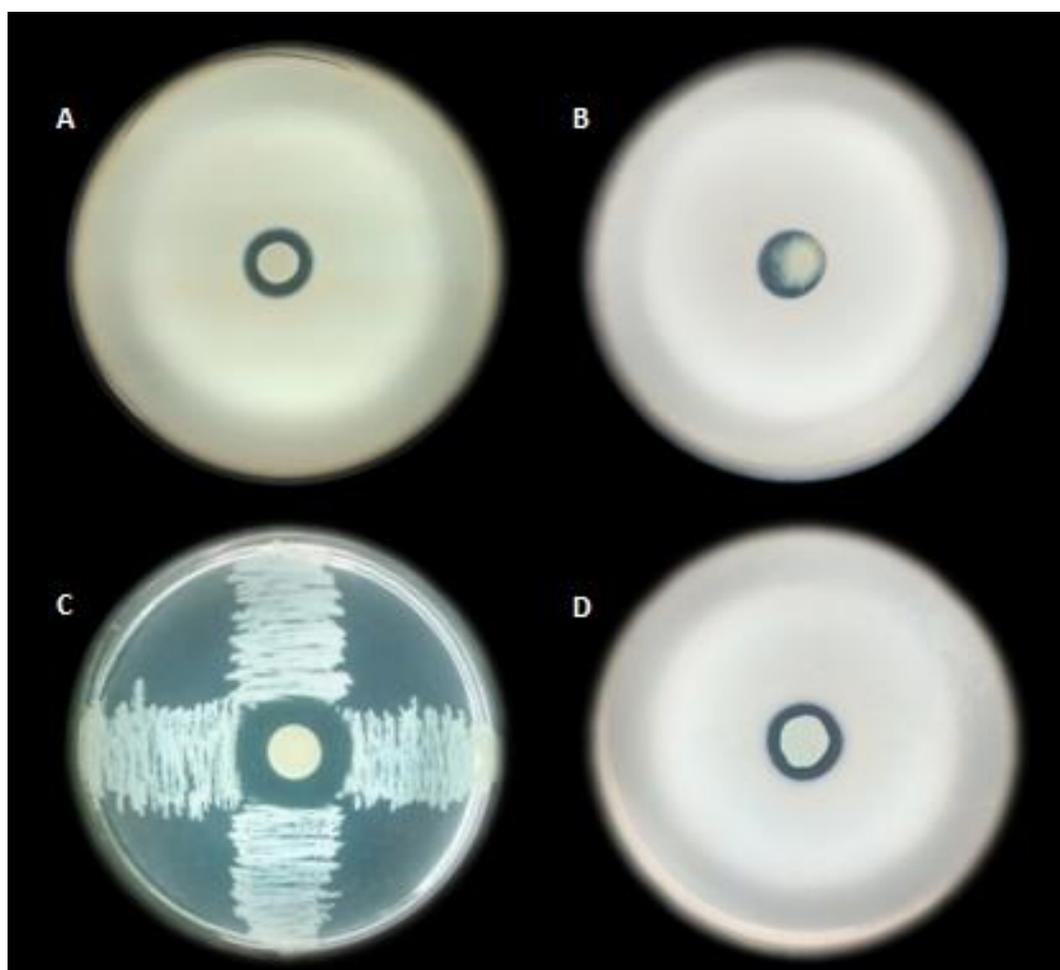


FIGURA 5

Teste para exclusão de possíveis fatores de interferência. Avaliação da atividade antagonista de: A, ácidos graxos; B, bacteriófagos; C, clorofórmio; D, peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Amostra produtora, *Acinetobacter baumannii* 397; amostra reveladora, *A. baumannii* 294. Método de sobrecamada, meio base BHIA-S, incubação a 37 °C, em aerobiose, por 24 h.

5.3.4 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Nos testes realizados em BHIA-S com e sem adição de catalase foram observados halos de inibição da amostra reveladora evidentes, revelando que H_2O_2 não foi responsável pela atividade antagonista (FIG. 5D).

5.4 CURVA DE PRODUÇÃO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S)

10

A produção da(s) substância(s) antagonista(s) iniciou-se após 11 h e 30 min de incubação da amostra produtora, em BHIA-S, a 25 °C, com pico máximo de produção às 17 h de incubação (FIG. 6).

15

5.5 EXTRAÇÃO PROTEICA: PRECIPITAÇÃO ÁCIDA

20 Inúmeras metodologias de extração proteica foram realizadas. Dentre todas, apenas a técnica de precipitação ácida, com HCl 5 N foi capaz de extrair a(s) substância(s) e mantê-la(s) ativa(s).

As condições de cultivo da amostra produtora (inóculo) foram otimizadas, melhorando o rendimento da extração e a atividade do extrato bruto (item 5.6).

25

A cada 1245 mL de inóculo, obteve-se em torno de 36 mL de extrato bruto diluído. Alíquotas de 1 mL do extrato diluído foram depositadas em microtubos⁶² de 1,5 mL e liofilizadas (36 microtubos com 8 mg de material/mL). O conteúdo de cada microtubo foi ressuspensão em 0,2 mL de água destilada esterilizada, rendendo, portanto, 7,2 mL de extrato bruto concentrado/extração, ativo até 1:32 (item 5.6).

10

15

20

25

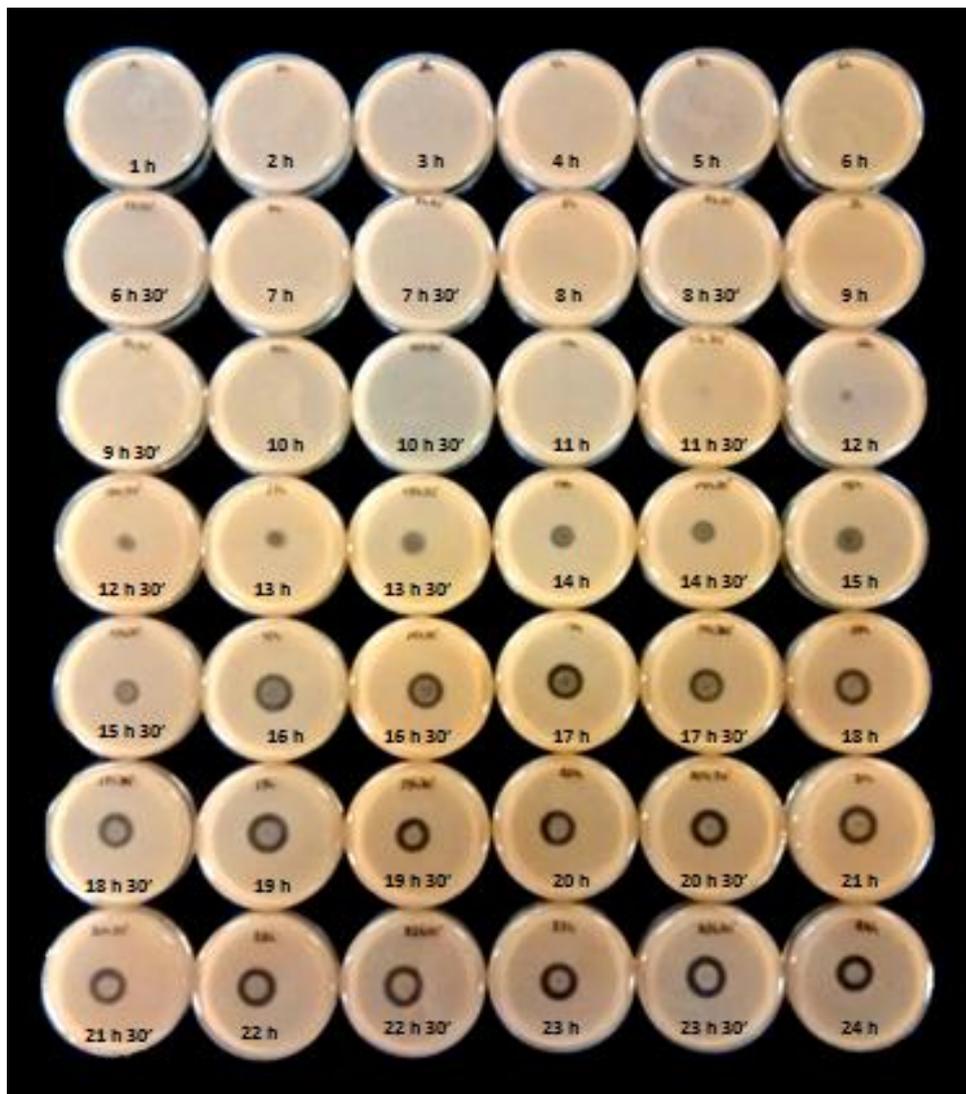


FIGURA 6

30

Avaliação da produção de substância(s) antagonista(s) ao longo da curva de crescimento da amostra *Acinetobacter baumannii* 397, em meio sólido. Método de sobrecamada, BHIA-S, pH 7,2, incubação em intervalos variados de tempo, durante 24 h, a 25 °C. Amostra reveladora, *A. baumannii* 294; incubação a 37 °C.

⁶² Sarstedt

5.6 AVALIAÇÃO E TITULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DO EXTRATO BRUTO

- 5 A otimização das condições de cultivo da amostra produtora provocou um aumento do título da atividade antagonista do extrato bruto, de 80 para 1280 UA/mL. As variáveis que influenciaram na expressão de antagonismo foram o número de repiques da amostra produtora, a concentração e o tempo de incubação do inoculo (FIG. 7).
- 10 Quando o inóculo foi preparado a partir de 15% (v/v) do pré-inoculo e incubado por 48 h, obteve-se extrato bruto com atividade antagonista até a diluição 1:32, com título de 1.280 UA/mL (UA = 32 x 1000 μ L x 1/25) (FIG. 7D).

15 5.7 AVALIAÇÃO DO ESPECTRO DE AÇÃO DO EXTRATO BRUTO

Dentre as 76 amostras reveladoras analisadas, 38 (incluindo *A. baumannii* ATCC 19606) foram suscetíveis à atividade de *A. baumannii* 397.

- 20 Todas as amostras susceptíveis pertencem ao gênero *Acinetobacter*, sendo, portanto, filogeneticamente relacionadas à amostra produtora (FIGs. 8, 9, 10). As demais amostras, de gêneros distintos (QUADRO 2), não foram suscetíveis.

Todas as amostras reveladoras sensíveis à amostra produtora também foram suscetíveis ao extrato proteico, porém, nem todas as amostras sensíveis ao
25 extrato foram suscetíveis à ação da amostra produtora.

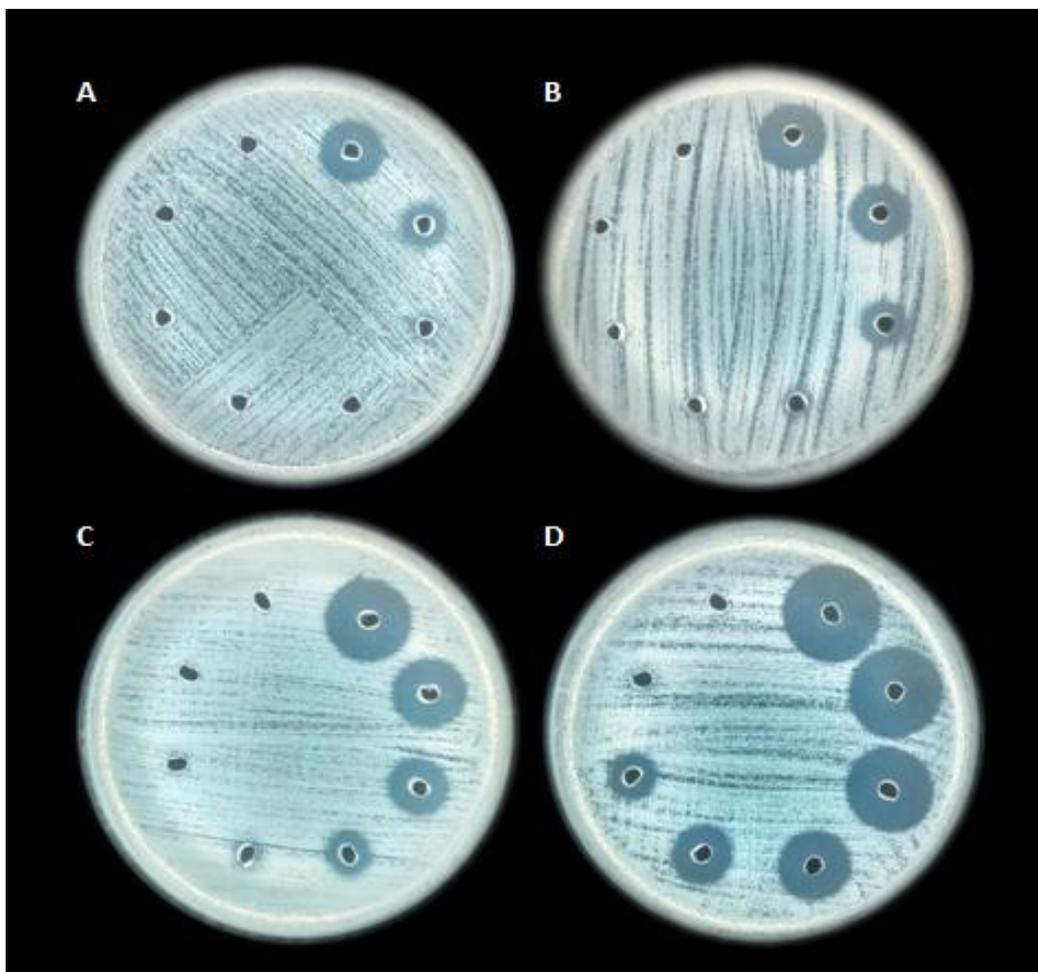


FIGURA 7

Teste de atividade antagonista e titulação do extrato bruto. Amostra produtora, *A. baumannii* 397; amostra reveladora, *A. baumannii* 294. Técnica de *spread plate*, meio base MHA, pH 7,2, incubação em aerobiose, a 37 °C, por 24 h. Extratos diluídos até 1:128, obtidos sob diferentes condições. A, inóculo de 5%, incubação por 24 h (atividade até a diluição 1:2, título de 80 UA/mL); B, inóculo de 10%, incubação por 24 h (atividade até a diluição 1:4, título de 160 UA/mL); C, inóculo de 15%, incubação por 24 h (atividade até a diluição 1:8, título de 320 UA/mL); D, inóculo de 15%, incubação por 48 h (atividade até a diluição 1:32, título de 1280 UA/mL).

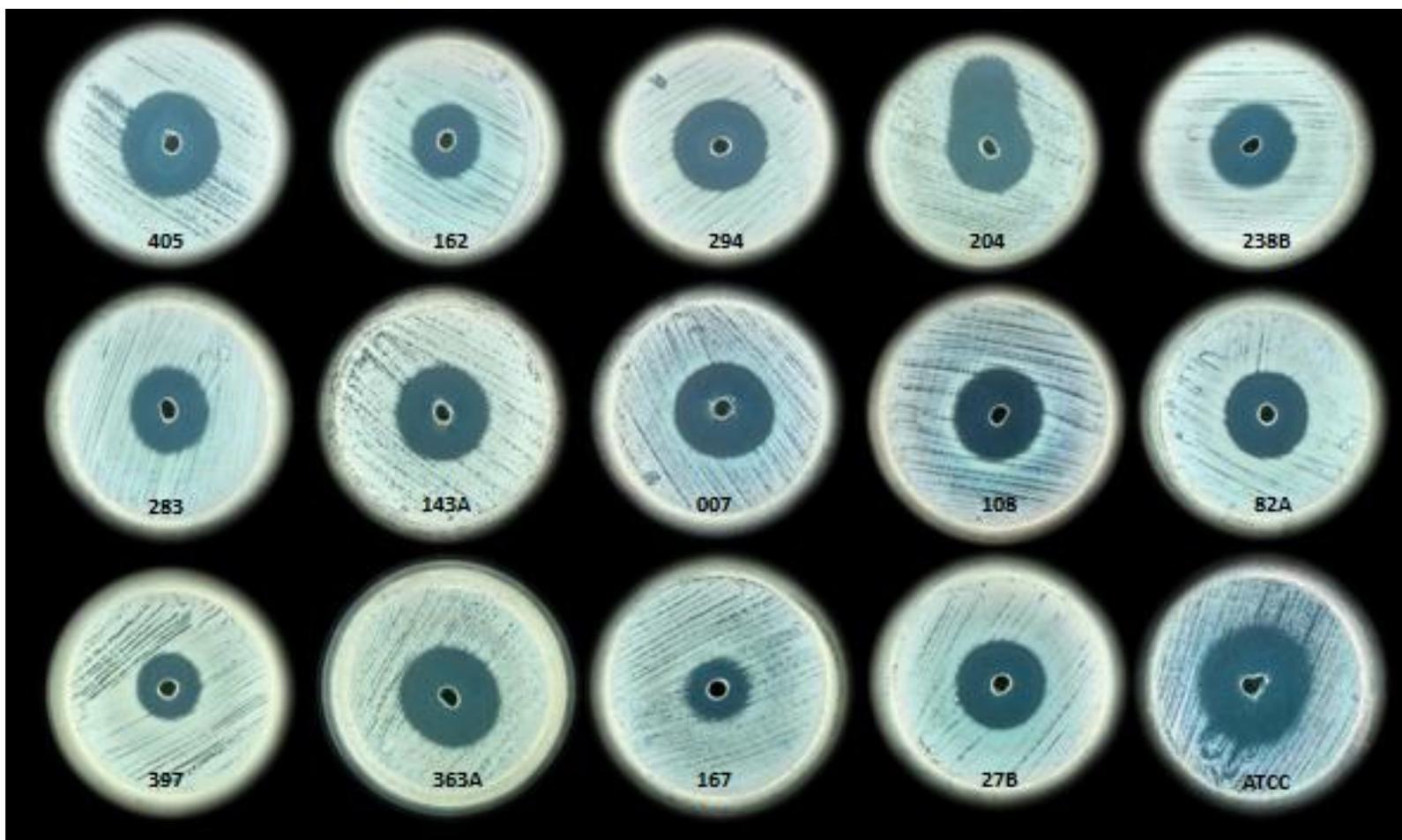


FIGURA 8

Avaliação do espectro de ação do extrato bruto. Amostra produtora, *Acinetobacter baumannii* 397; amostras reveladoras, *A. baumannii*, recuperadas de hemoculturas de pacientes internados no Hospital de Pronto-Socorro João XXIII, no período de dezembro de 2008 a junho de 2009.

Técnica de *spread plate*, meio base MHA, pH 7,2, incubação em aerobiose, a 37 °C, por 24 h

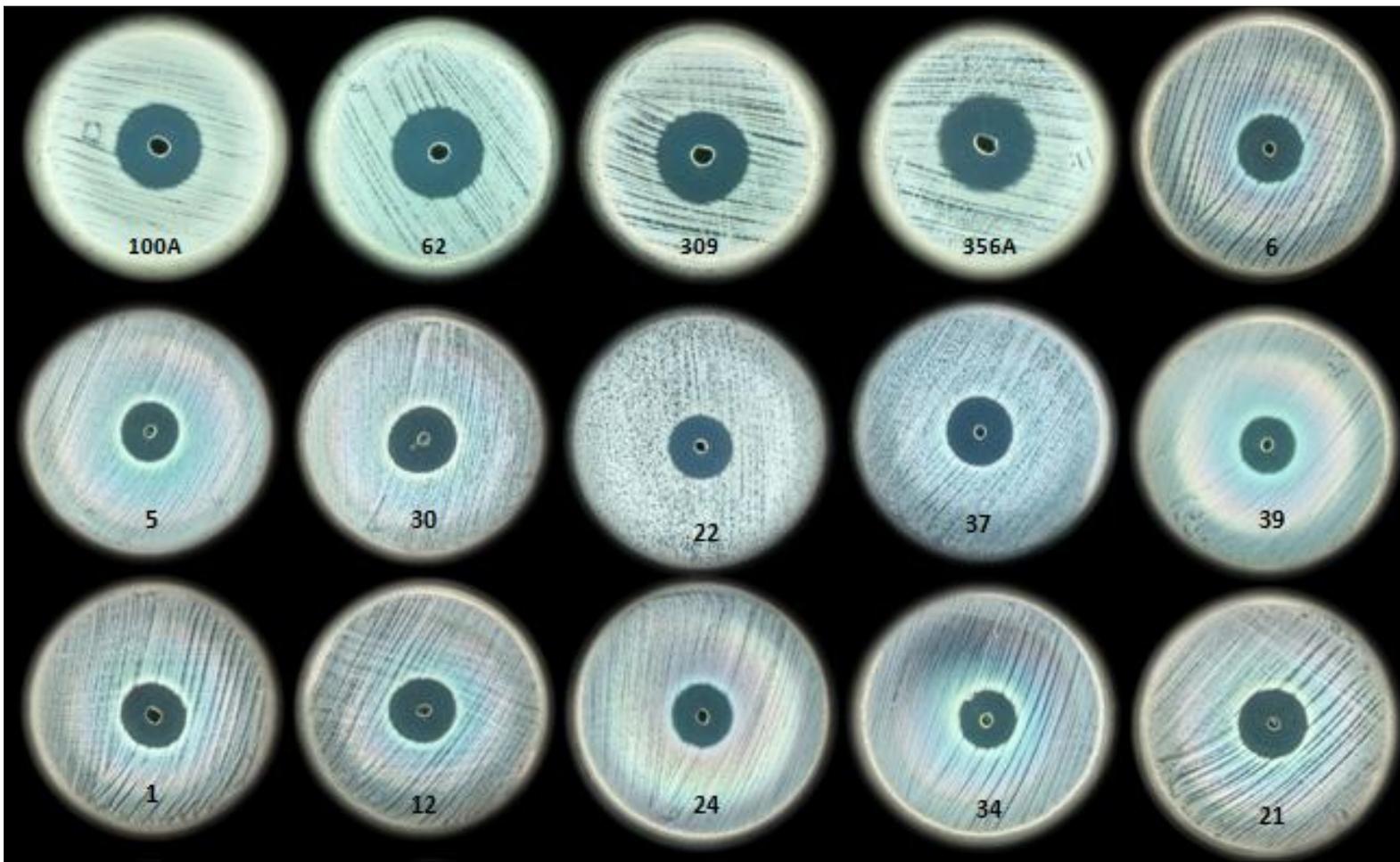


FIGURA 9

Avaliação do espectro de ação do extrato bruto. Amostra produtora, *Acinetobacter baumannii* 397; amostras reveladoras, *A. baumannii* 100A, 62, 309, 356A e 6, recuperadas de hemoculturas de pacientes internados no Hospital de Pronto-Socorro João XXIII e as demais, oriundas de pacientes colonizados e com doença infecciosa associada à bactéria, internados no Hospital das Clínicas da UFMG, no período de agosto de 2012 a maio de 2013. Técnica de *spread plate*, meio base MHA, pH 7,2, incubação em aerobiose, a 37 °C, por 24 h

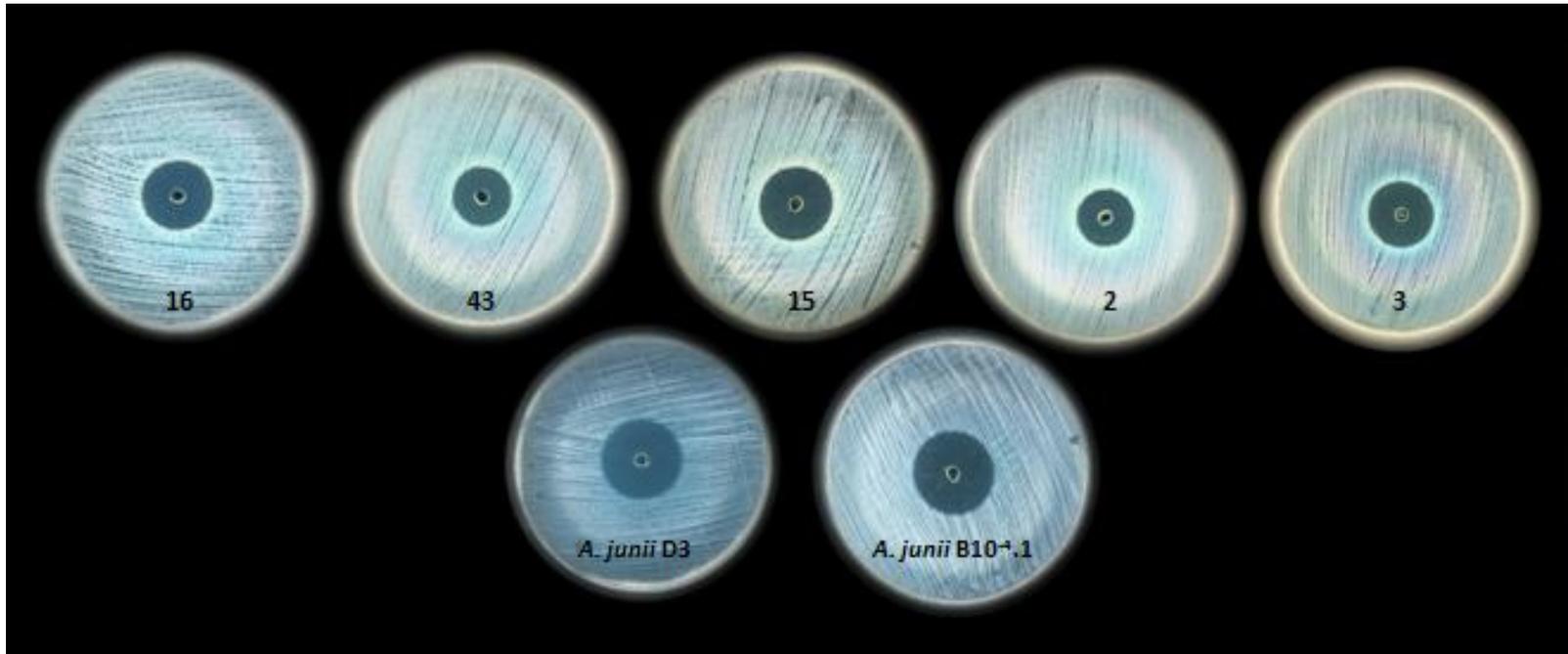


FIGURA 10

Avaliação do espectro de ação do extrato bruto. Amostra produtora, *Acinetobacter baumannii* 397; amostras reveladoras, *A. baumannii* 16, 43, 15, 2, 3, recuperadas de pacientes colonizados e com doença infecciosa associada à bactéria, internados no Hospital das Clínicas da UFMG, no período de agosto de 2012 a maio de 2013, e *A. junii* D3 e *A. junii* B10⁻⁴.1, oriundas do líquido lixiviado proveniente de resíduos potencialmente infectantes de uma instituição de assistência à saúde odontológica de Belo Horizonte, MG.

Técnica de *spread plate*, meio base MHA, pH 7,2, incubação em aerobiose, a 37 °C, por 24 h.

5.8 DOSAGEM PROTEICA

A dosagem de proteínas do extrato bruto foi de 4,34 mg/mL.

5

5.9 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DO EXTRATO BRUTO

10

5.9.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

A atividade do extrato bruto foi mantida, embora que por poucas horas, quando o extrato foi exposto a temperaturas superiores a 50 °C, sendo que, à temperatura de 70 °C, manteve-se estável por 8 h e, a 100 °C, por apenas 6 h. A estabilidade do extrato foi preservada por sete dias a 25 °C, por cinco dias a 37 °C e por 18 h a 50 °C. A atividade foi preservada após três meses de armazenamento em temperaturas mais baixas, -80 °C, -20 °C e 4 °C. Portanto, os resultados indicam termoestabilidade do extrato a diferentes temperaturas.

20

5.9.2 INFLUÊNCIA DO PH

25

A atividade do extrato ainda permanece estável após três meses de armazenamento a 4 °C em soluções de pH de 2 a 12, evidenciando, assim, estabilidade do extrato a uma ampla faixa de pH.

30

5.9.3 INFLUÊNCIA DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Quanto à avaliação da natureza química da(s) substância(s), observou-se que o extrato bruto foi inativado após tratamento com todas as enzimas proteolíticas testadas (tripsina, proteinase K, papaína e α -quimiotripsina), sugerindo, assim, a natureza proteica da(s) mesma(s).

10 5.9.4 INFLUÊNCIA DE SOLVENTES ORGÂNICOS

O extrato bruto permaneceu ativo após tratamento com todas as soluções aquosas a 10%, 50% e 80% dos solventes orgânicos. Entretanto, o butanol foi retirado do teste, pois quando presente nas concentrações de 50% e 80%, inibiu o crescimento da amostra reveladora (controle negativo de atividade do solvente orgânico).

20 5.10 ESTUDO DO MODO DE AÇÃO DO EXTRATO BRUTO

5.10.1 DETERMINAÇÃO DA CIM

25

A menor concentração do extrato bruto capaz de inibir o crescimento visível da amostra reveladora *A. baumannii* 294 foi de 80 UA/ mL (FIG. 11).

5.10.2 DETERMINAÇÃO DA CBM

A concentração bactericida mínima do extrato bruto foi de 160 UA/mL. Nesta
5 concentração, observou-se, em média $5,1 \times 10^2$ UFC da amostra reveladora, valor
correspondente à redução de mais de 99,9% da contagem de células bacterianas
do controle positivo ($2,8 \times 10^{10}$ UFC). Assim, a CBM foi 2 vezes maior que a CIM,
o que sugere o mecanismo de ação bactericida do extrato.

10

5.10.3 CINÉTICA DE AÇÃO

A cinética de ação do extrato bruto foi analisada durante intervalo de 0 a 150 min
15 (TAB. 3). No tempo zero, o número de UFC do teste é próximo àquele observado
no controle positivo. Após 150 minutos, o número de células viáveis foi reduzido
em 99,93%. Nos controles negativos, não houve a presença de células
bacterianas viáveis. Os números de UFCs presentes nos controles positivos estão
listados na TAB. 3.

20

TABELA 3

Cinética de ação do extrato bruto contra a amostra *Acinetobacter baumannii* 294.

TEMPO (min)	NÚMERO DE UFC/mL	
	CONTROLE POSITIVO	TESTE
0	$5,30 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$
10	$3,25 \times 10^5$	$5,3 \times 10^5$
40	$4,15 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$
90	$8,85 \times 10^5$	$5,5 \times 10^4$
120	$2,43 \times 10^6$	$3,0 \times 10^4$
150	$3,10 \times 10^7$	$2,0 \times 10^4$

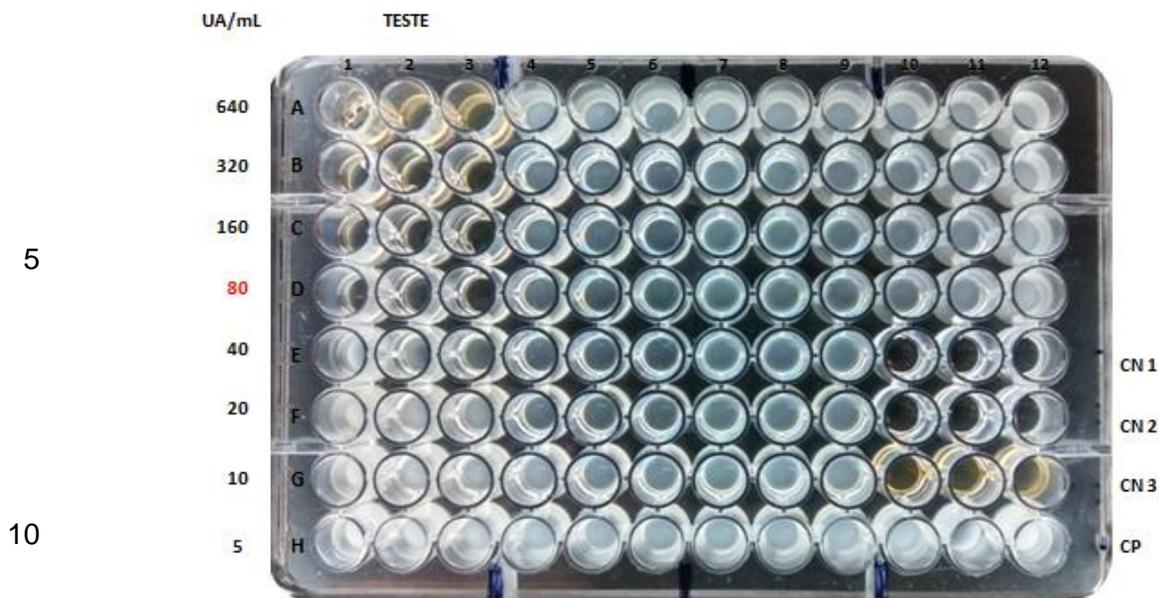


FIGURA 11

Determinação da CIM do extrato bruto, título de 80 UA/mL. Amostra produtora, *A. baumannii* 397; amostra reveladora, *A. baumannii* 294. UA/mL, unidade arbitrária por mililitro; CN 1, controle negativo da H₂O; CN 2, controle negativo do caldo MH; CN 3, controle negativo do extrato bruto; CP, controle positivo.

15

20 5.11 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO

5.11.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SUPELCOSIL™

25

O extrato bruto sabidamente ativo, com título de 1280 UA/mL, foi submetido a etapas de cromatografia de fase reversa. As corridas cromatográficas em coluna LC-8 Supelcosil™ geraram cinco frações ativas (C2 a C6) (FIG. 12), com exceção das corridas 25, 27, 28.1 e 28.2, que geraram duas (C4 e C5), uma (C5), sete (C5 a C11) e sete (C6 a C12) frações ativas (FIG.13), respectivamente (TAB. 4).

30

Os *pools* das frações ativas (TAB. 5) foram encaminhados para “recromatografia” de fase reversa, em coluna C-18 Sephasil™ Peptide. Os cromatogramas das corridas 13 a 32 (por *pools*) estão representados nas FIGs. 14 a 19.

TABELA 4

Primeira sequência de purificação em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil™:
frações ativas e *pools* correspondentes.

CORRIDAS	FRAÇÕES ORIGINADAS DA CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA COLUNA C-8	FRAÇÕES ATIVAS	POOLS GERADOS E ENCAMINHADOS PARA "RECROMATOGRAFIA" DE FASE REVERSA COLUNA C-18
13	Frações B14 a C6	C2 a C6	
14	Frações B15 a C6	C2 a C6	<i>POOL 1</i>
15	Frações B14 a C6	C2 a C6	(CORRIDA 34)
16	Frações B14 a C6	C2 a C6	
17	Frações B14 a C6	C2 a C6	
18	Frações B13 a C6	C2 a C6	<i>POOL 2</i>
19	Frações B13 a C6	C2 a C6	(CORRIDA 35)
20	Frações B13 a C6	C2 a C6	
21	Frações B13 a C6	C2 a C6	<i>POOL 3</i>
22	Frações B13 a C6	C2 a C6	(CORRIDA 36)
23	Frações B13 a C6	C2 a C6	
24	Frações B15 a C5	C2 a C6	
25	Frações B15 a C5	C4 e C5	<i>POOL 4</i>
26	Frações B15 a C5	C2 a C6	(CORRIDA 37)
27	Frações B15 a C5	C5	
28 – 1	Frações B13 a C12	C5 a C11	
28 – 2	Frações B4 a E3	C6 a C12	<i>POOL 5</i>
29	Frações B13 a C4	C6 a C12	(CORRIDA 38)
30	Frações B13 a C4	C6 a C12	
31	Frações B13 a C4	C6 a C12	<i>POOL 6</i>
32 ¹	Frações B13 a C4	C6 a C12	(CORRIDA 39)

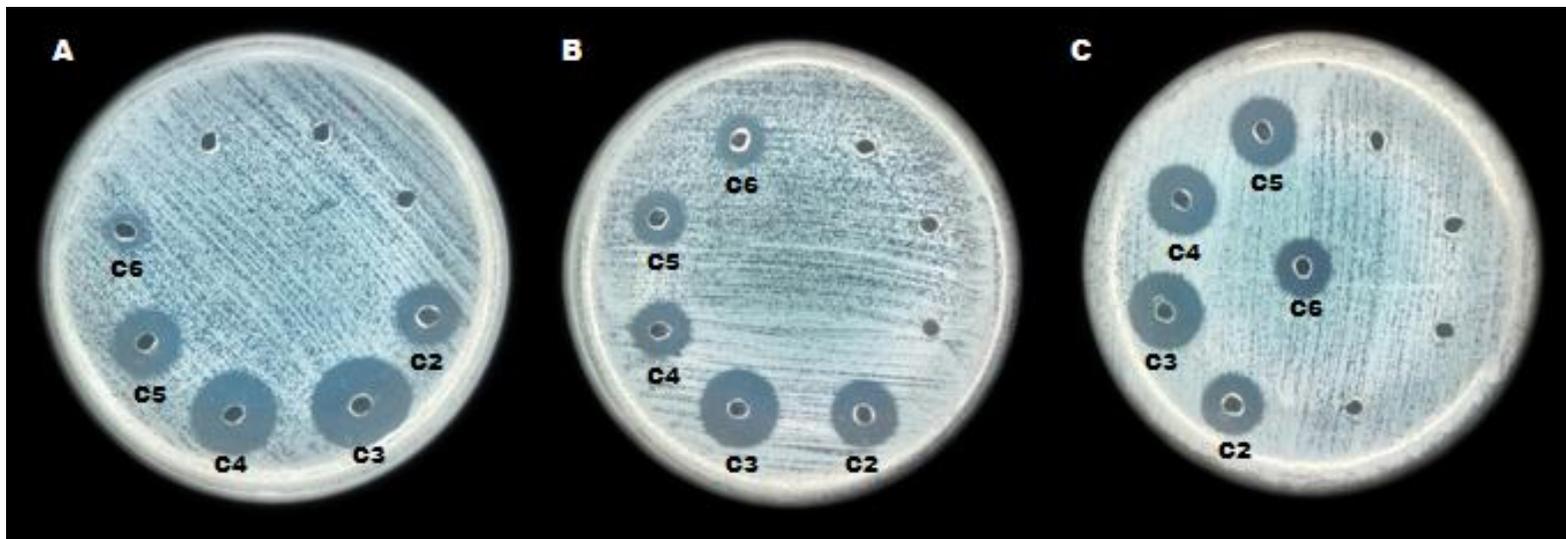


FIGURA 12

Atividade antagonista das frações C2 a C6, aqui representadas pelas corridas: A, 13; B, 17 e C, 21, obtidas por cromatografia de fase reversa, coluna LC-8 Supelcosil™. Amostra reveladora *A. baumannii* 294.

Técnica de *spread plate*, meio base MHA, pH 7,2, incubação em aerobiose, a 37 °C, por 24 h.

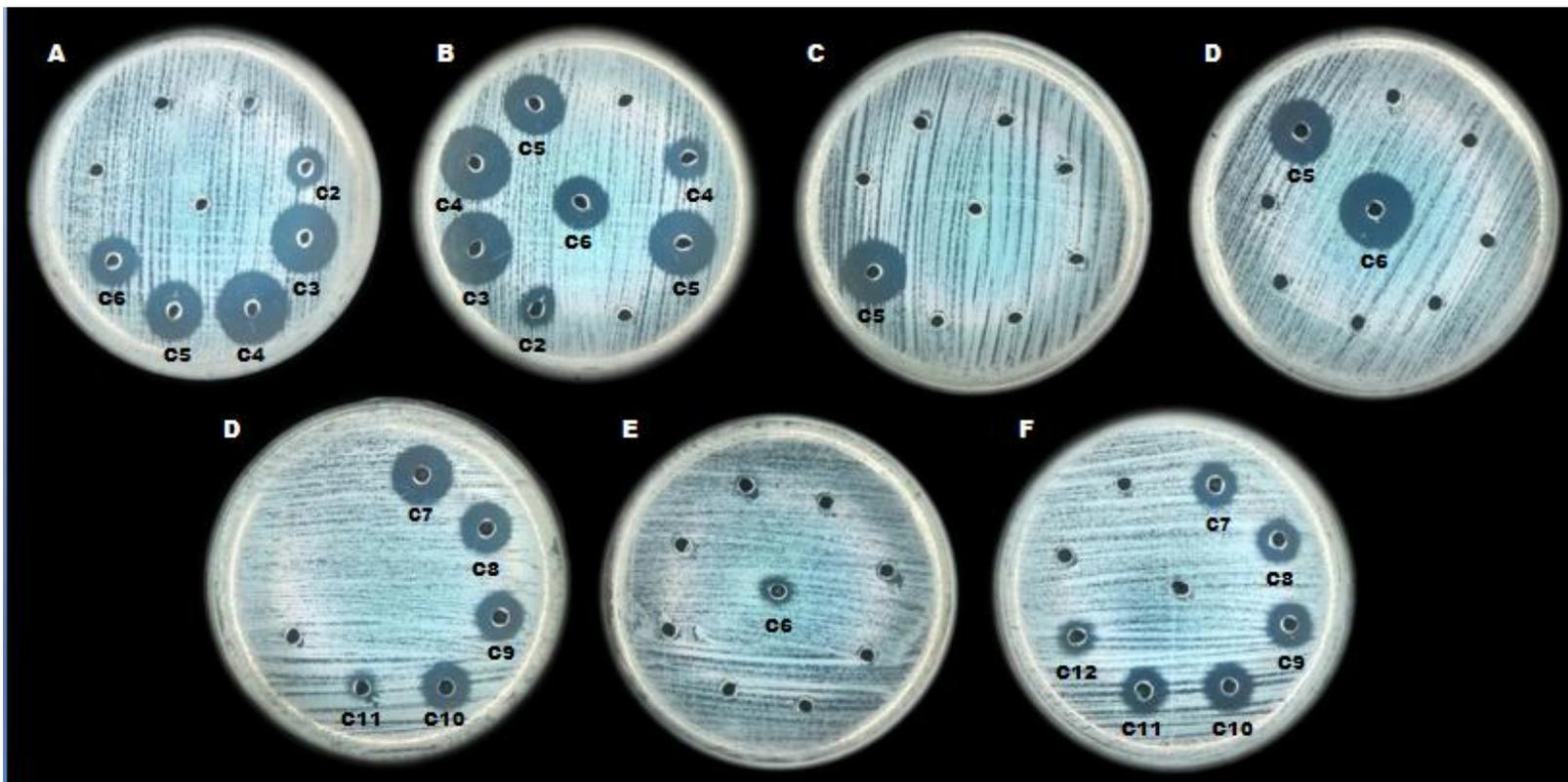


FIGURA 13

Atividade antagonista das frações C2 a C12, aqui representadas pelas corridas: A, 24; B, 25 e 26; C, 27; D, 28.1; E e F, 28.2, obtidas por cromatografia de fase reversa, coluna LC-8 Supelcosil™. Amostra reveladora *A. baumannii* 294. Técnica de *spread plate*, meio base MHA, pH 7,2, incubação em aerobiose, a 37 °C, por 24 h.

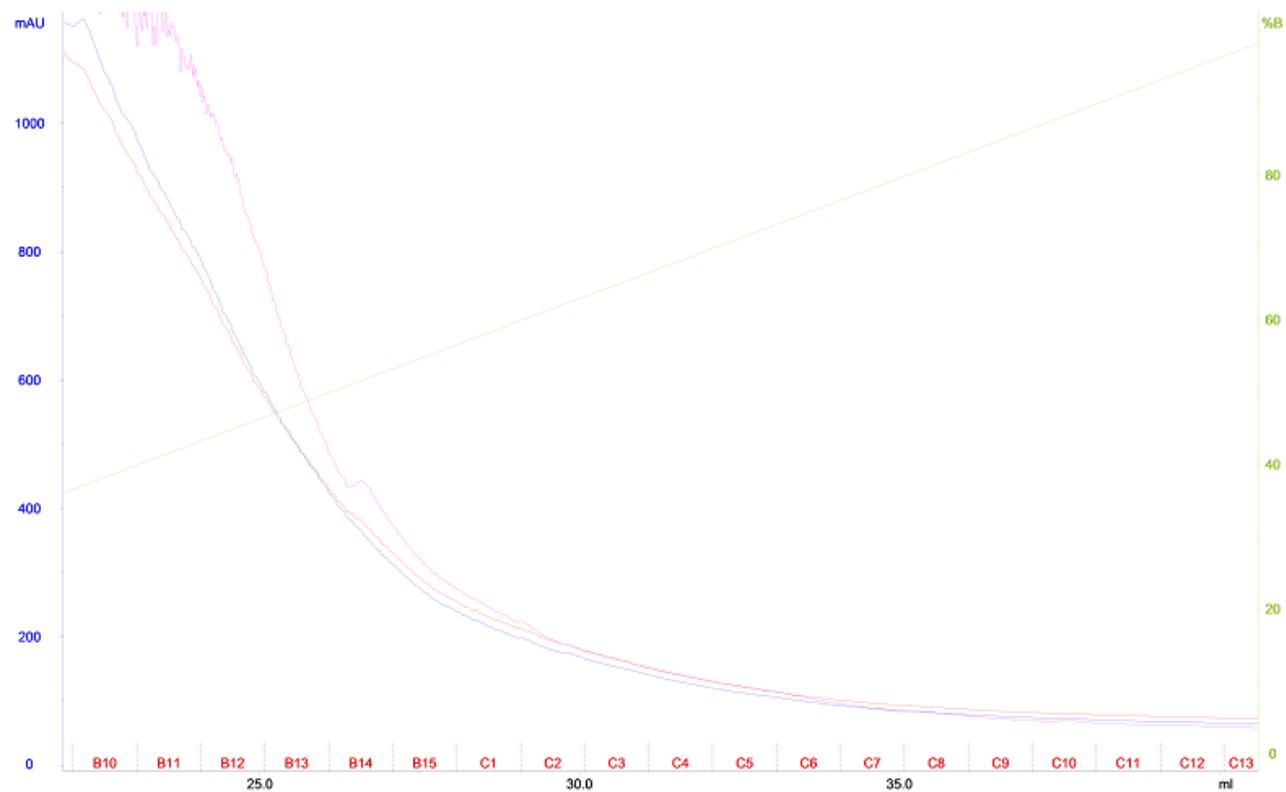


FIGURA 14

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil™ das corridas 13 a 16 (frações ativas C2 a C6), eluídas com solução B (acetonitrila - ACM 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 (rosa), 280 nm (azul) e gradiente de ACM 0 a 100% (verde), a 25 °C.

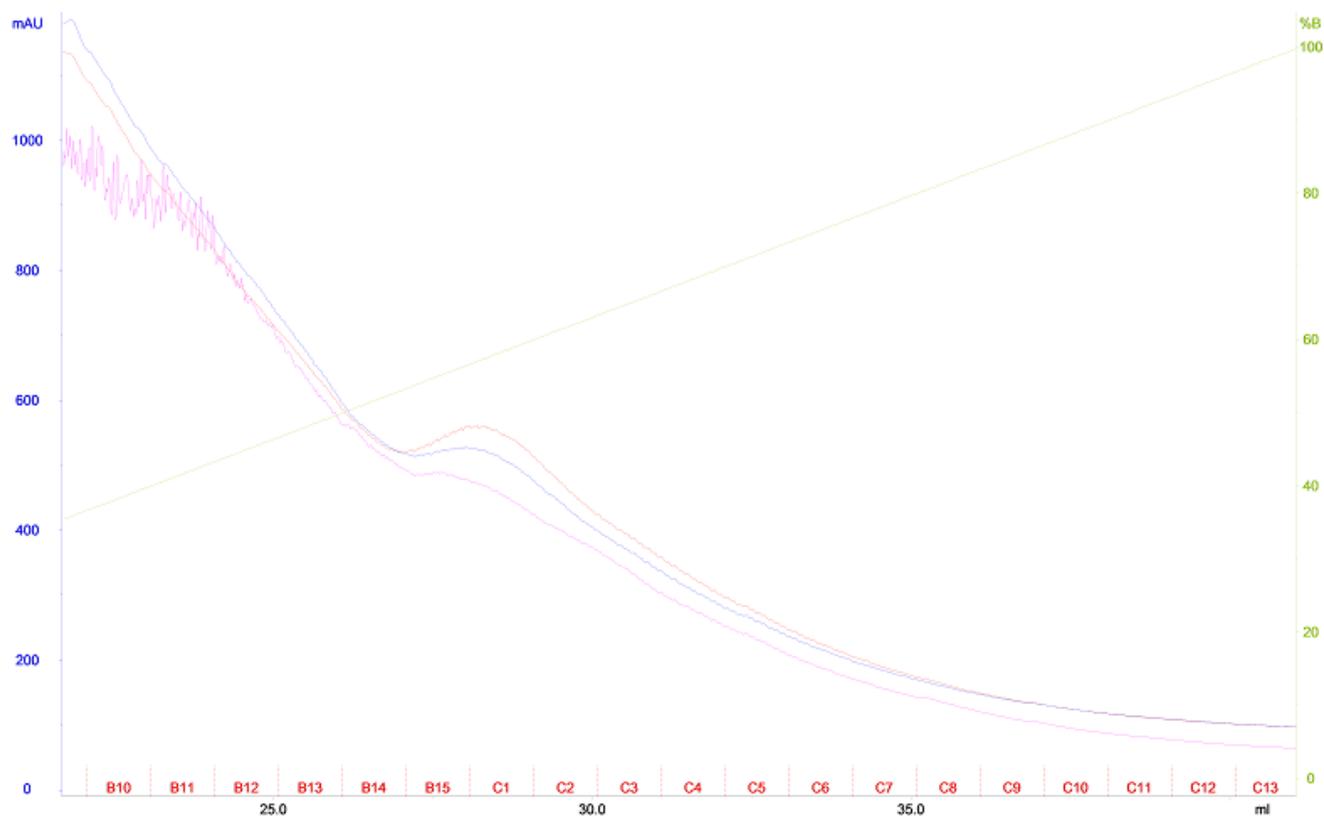


FIGURA 15

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil™ das corridas 17 a 19 (frações ativas C2 a C6), eluídas com solução B (acetonitrila - ACM 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 (rosa), 280 nm (azul) e gradiente de ACM 0 a 100% (verde), a 25 °C.

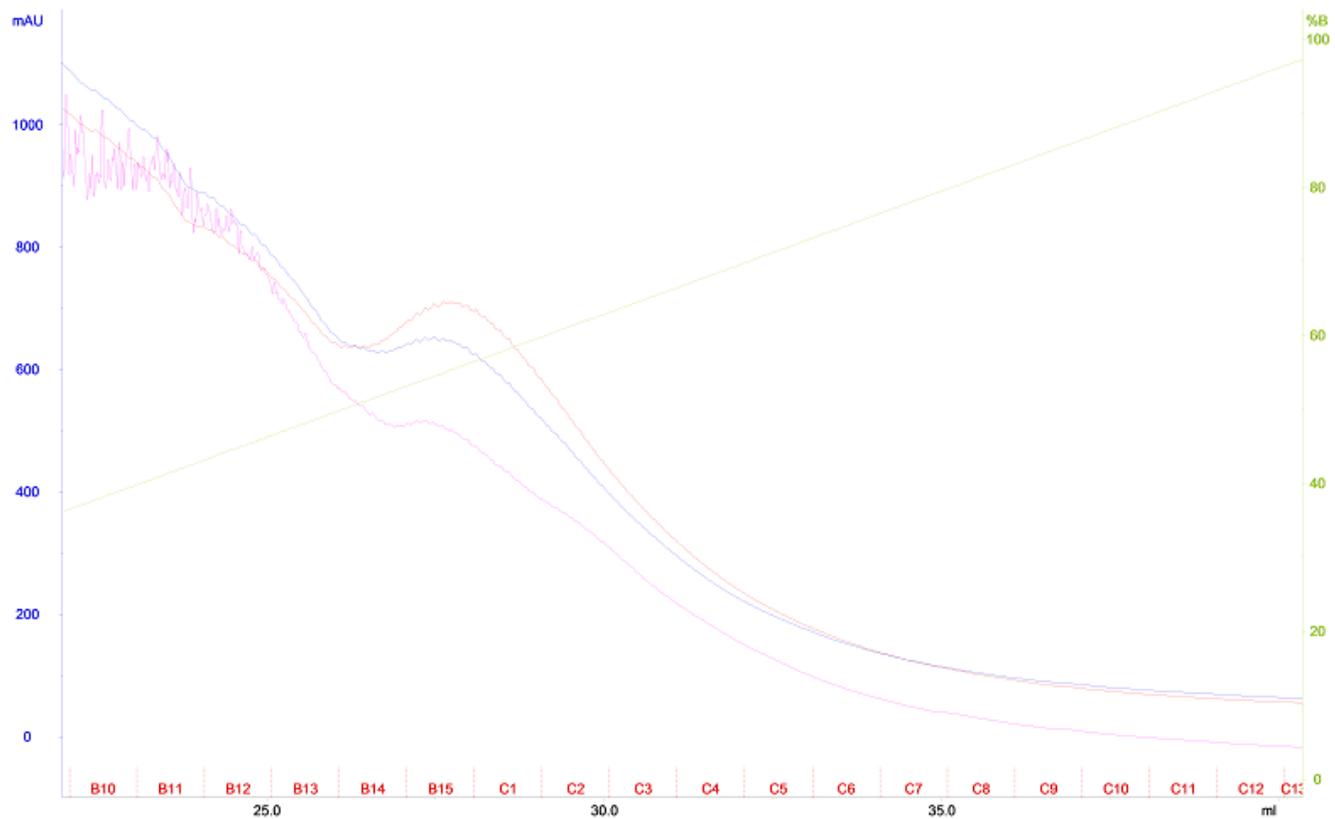


FIGURA 16

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil™ das corridas 20 a 23 (frações ativas C2 a C6), eluídas com solução B (acetoneitrila - ACM 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 (rosa), 280 nm (azul) e gradiente de ACM 0 a 100% (verde), a 25 °C.

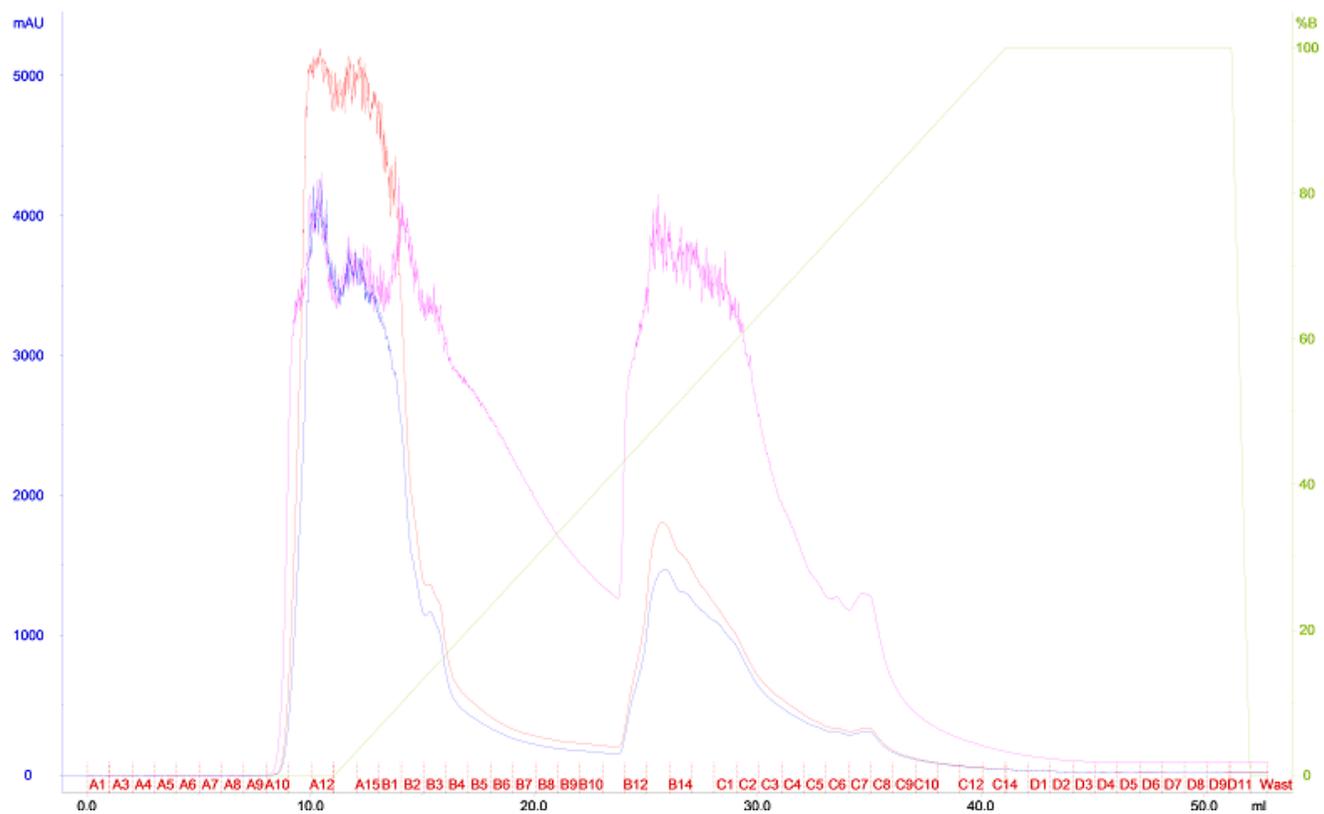


FIGURA 17

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil™ das corridas 24 a 27 (frações ativas C2 a C6), eluídas com solução B (acetonitrila - ACM 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 (rosa), 280 nm (azul) e gradiente de ACM 0 a 100% (verde), a 25 °C.

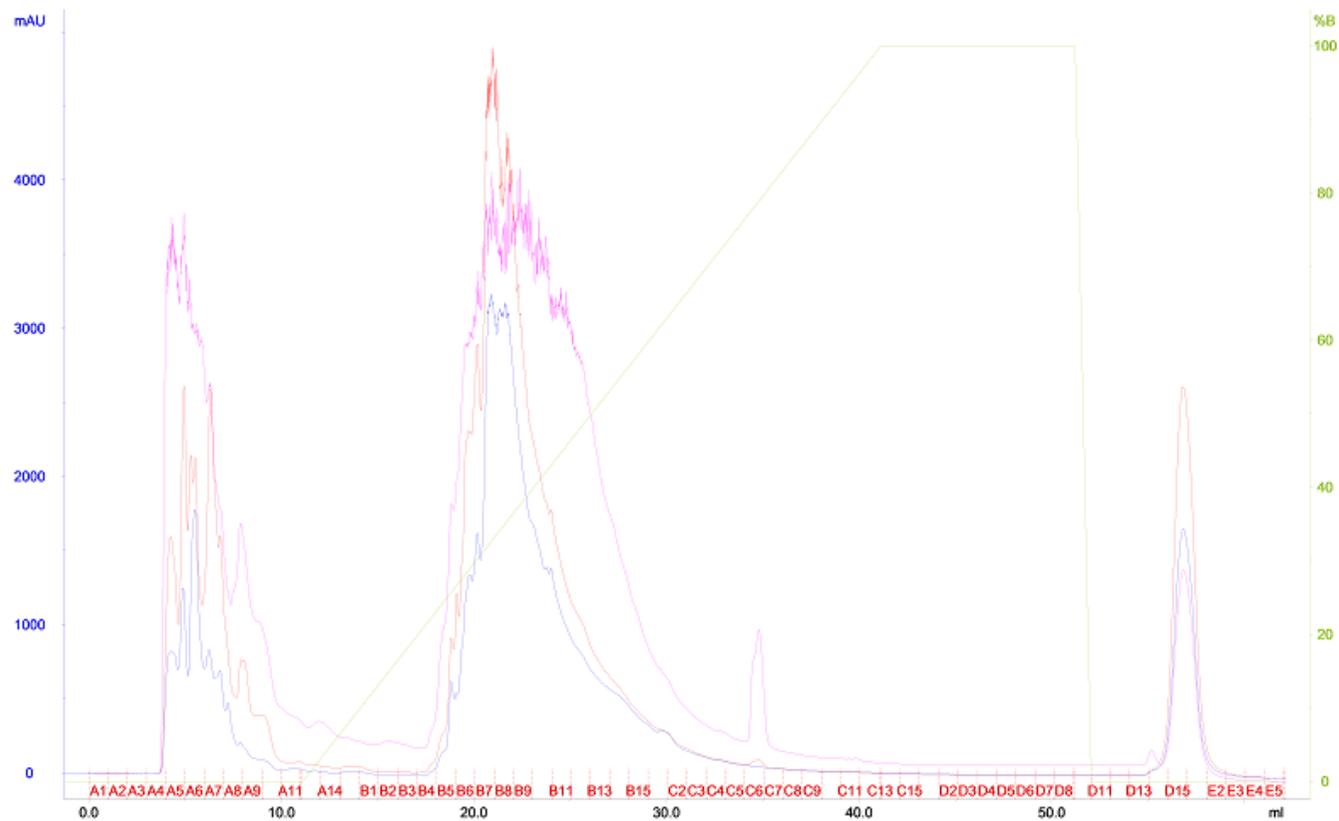


FIGURA 18

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil™ das corridas 28.1 a 29 (frações ativas C5 a C12), eluídas com solução B (acetoneitrila - ACM 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 (rosa), 280 nm (azul) e gradiente de ACM 0 a 100% (verde), a 25 °C.

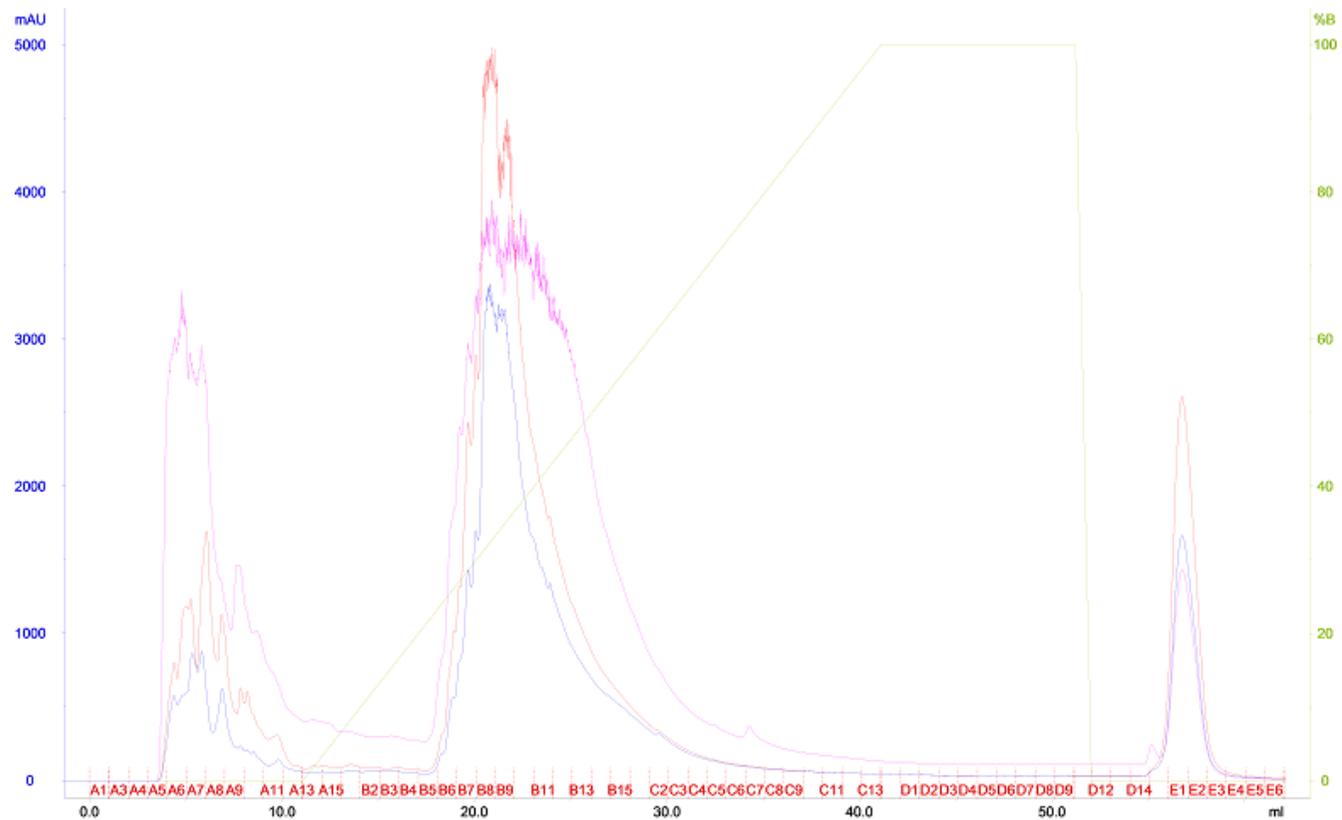


FIGURA 19

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil™ das corridas 31 a 32 (frações ativas C6 a C12), eluídas com solução B (acetonitrila - ACM 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 (rosa), 280 nm (azul) e gradiente de acetonitrila 0 a 100% (verde), a 25 °C.

5.11.2 “RECROMATOGRÁFIA” EM COLUNA DE FASE REVERSA SEPHASIL™ PEPTIDE

Os *pools* das frações ativas coletadas na etapa anterior (cromatografia em coluna de fase reversa LC-8 Supelcosil™) foram “recromatografados” em coluna C-18 Sephasil™ Peptide (corridas 34 a 39). A partir destas corridas foram recuperadas diferentes frações ativas (FIG. 20, TAB. 5). As frações originadas das corridas 36, 38 e 39 não foram testadas quanto à atividade antagonista. Os cromatogramas das corridas 34 a 39 estão ilustrados nas FIGs. 21 a 26.

Os *pools* das frações ativas C6, C7, C8 e C9 oriundas da “recromatografia” foram novamente “recromatografadas”, empregando-se a mesma coluna e condições descritas no item 4.12.2, (TAB. 6). Os *pools* das frações C7 e C8 geraram duas frações ativas cada, C5/C6 e C6/C7, respectivamente (FIG. 27, TAB. 6). Os cromatogramas dos *pools* C7 (corrida 40) e C8 (corrida 41) estão representados nas FIGs. 28 e 29.

O *pool* das frações C6 (corridas 40 e 41), novamente submetido a “recromatografia” em coluna C-18 Sephasil™ Peptide, não gerou nenhuma fração ativa. As frações C5 e C7 não apresentaram volumes suficientes para uma nova “recromatografia”.

TABELA 5

Segunda sequência de purificação: frações ativas originadas da “recromatografia” em coluna de fase reversa LC-18 Sephasil™ Peptide.

<i>POOLS/ CORRIDAS</i>	FRAÇÕES ORIGINADAS DA “RECROMATOGRAFIA” DE FASE REVERSA COLUNA C-18	FRAÇÕES ATIVAS
<i>Pool 1</i> (Corrida 34)	Frações B15 a C15	C7 e C8
<i>Pool 2</i> (Corrida 35)	Frações B15 a C15	C6 a C9
<i>Pool 3*</i> (Corrida 36)	Frações B15 a C15	-
<i>Pool 4</i> (Corrida 37)	Frações B15 a C15	C6 a C8
<i>Pool 5</i> ¹ (Corrida 38)	Frações B15 a C15	-
<i>Pool 6</i> ¹ (Corrida 39)	Frações B15 a C15	-

¹, corridas cromatográficas não testadas, as frações ativas foram definidas baseando-se nas corridas anteriores.

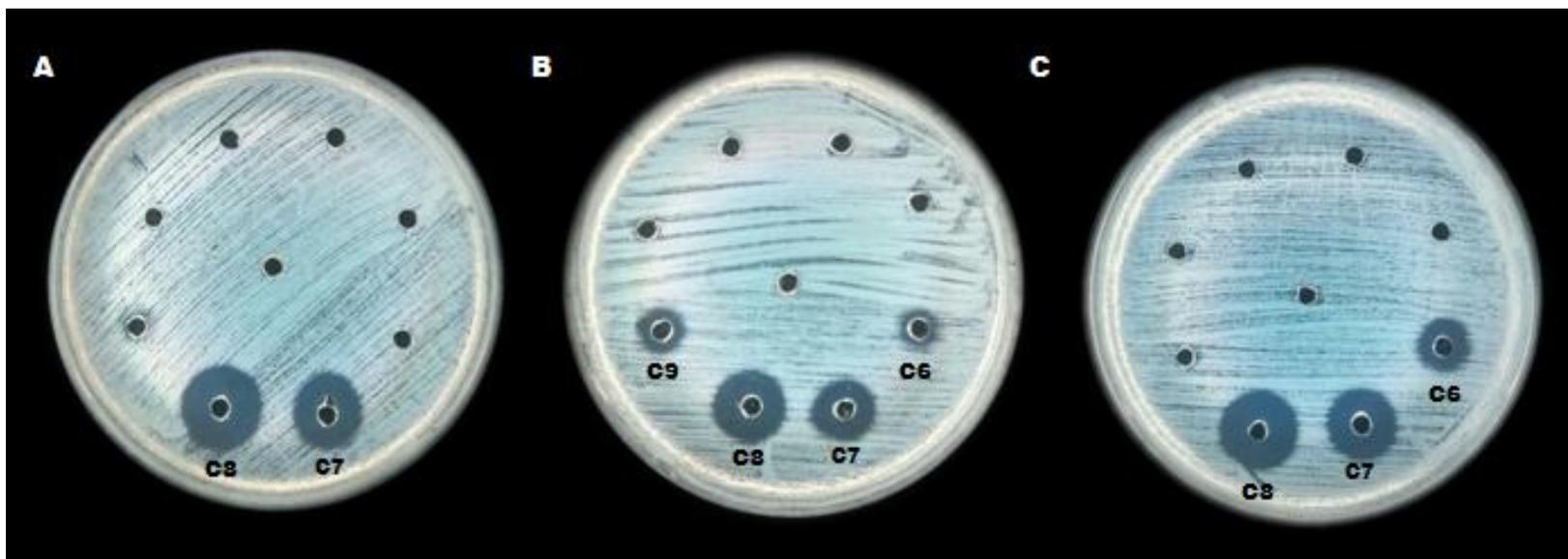


FIGURA 20

Atividade antagonista das frações C6 a C9, aqui representadas pelas corridas: A, 34; B, 35 e C, 37, obtidas por “recromatografia” em coluna C-18 Sephasil™ Peptide. Amostra reveladora *A. baumannii* 294.

Técnica de *spread plate*, meio base MHA, pH 7,2, incubação em aerobiose, a 37 °C, por 24 h.

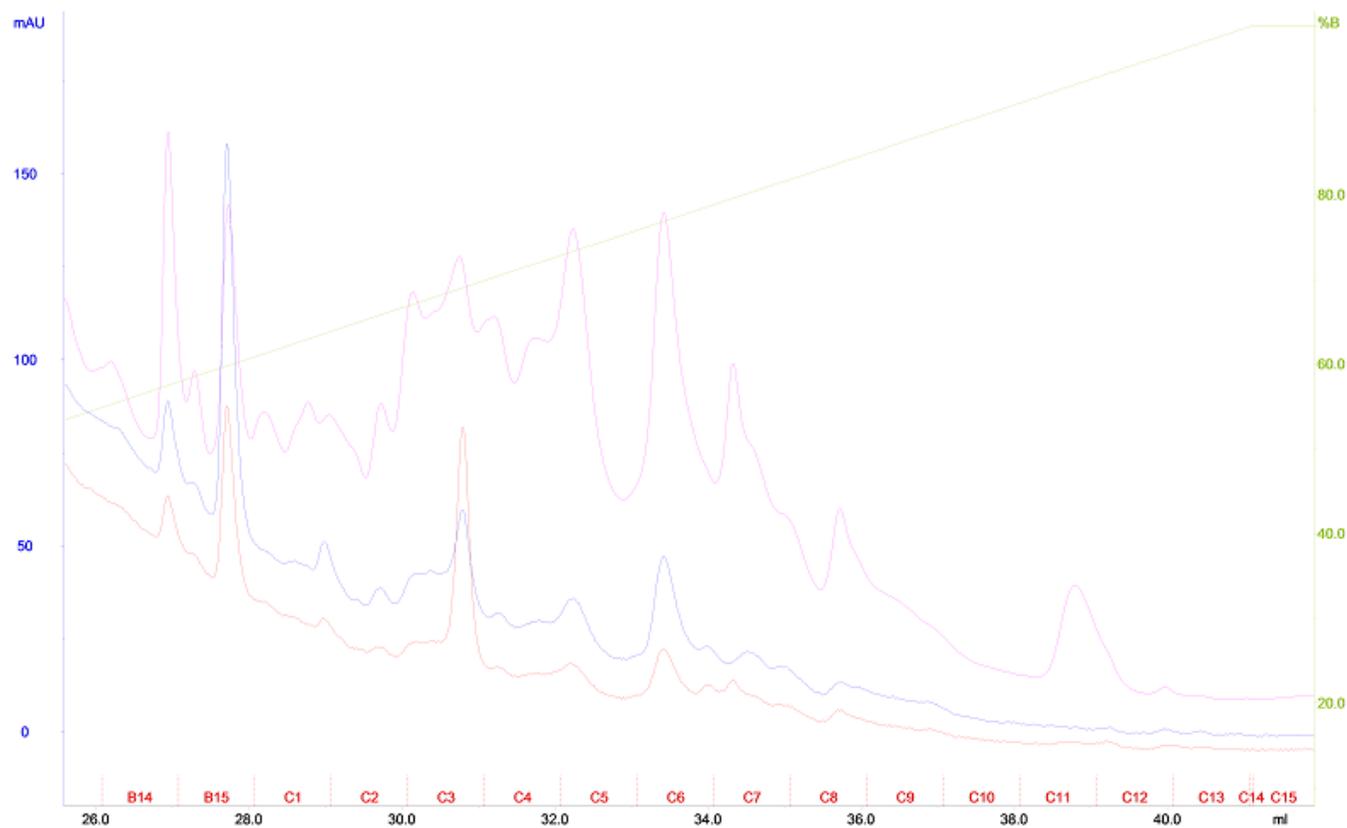


FIGURA 21

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide, corrida 34, *pool 1* (frações ativas C7 a C8), eluídas com solução B (acetonitrila - ACM 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 (rosa), 280 nm (azul) e gradiente de ACM 0 a 100% (verde), a 25 °C. As frações ativas foram encaminhadas para “recromatografia” em coluna C-18 Sephasil™ Peptide.

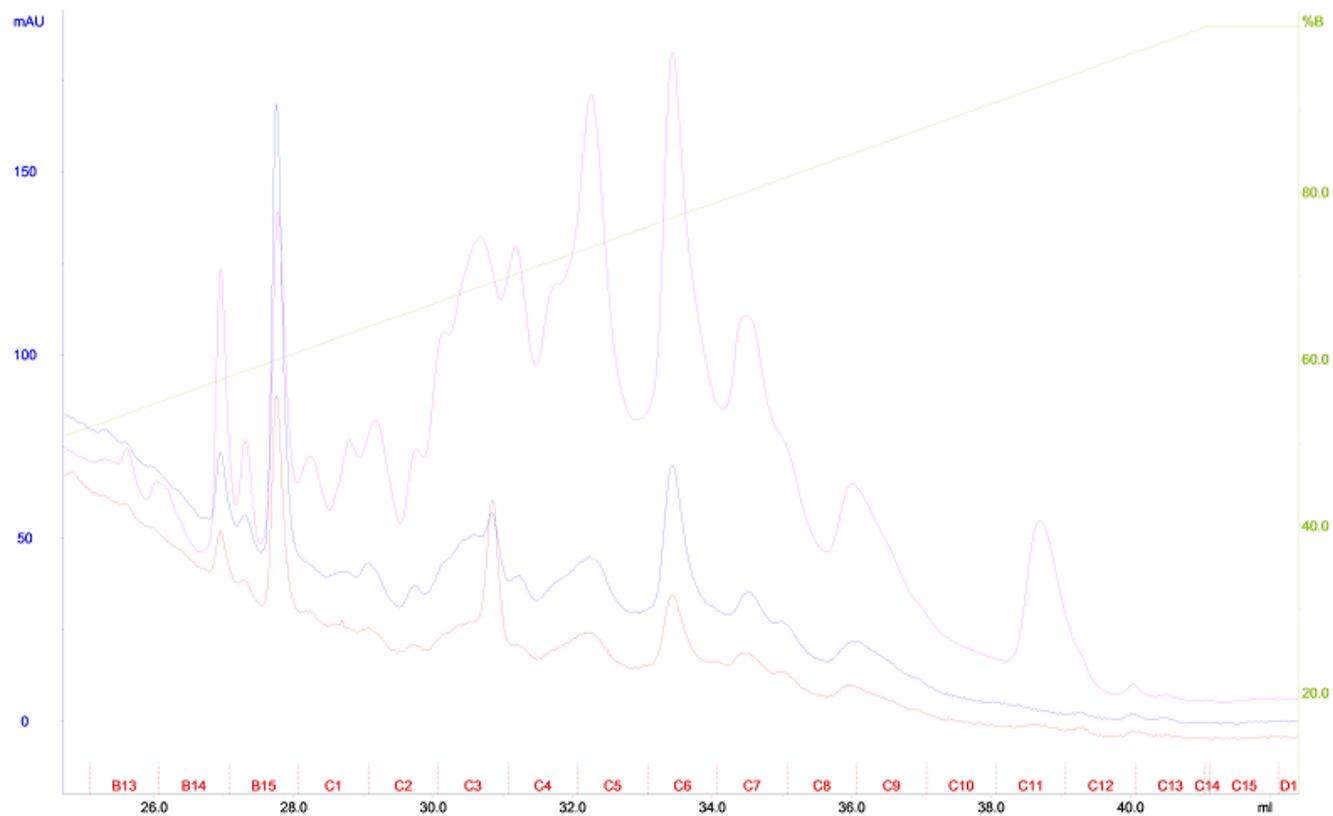


FIGURA 22

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide, corrida 35, *pool* 2 (frações ativas C6 a C9), eluídas com solução B (acetonitrila - ACM 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®).

As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 (rosa), 280 nm (azul) e gradiente de ACM 0 a 100% (verde), a 25 °C.

As frações ativas foram encaminhadas para “recromatografia” em coluna C-18 Sephasil™ Peptide.

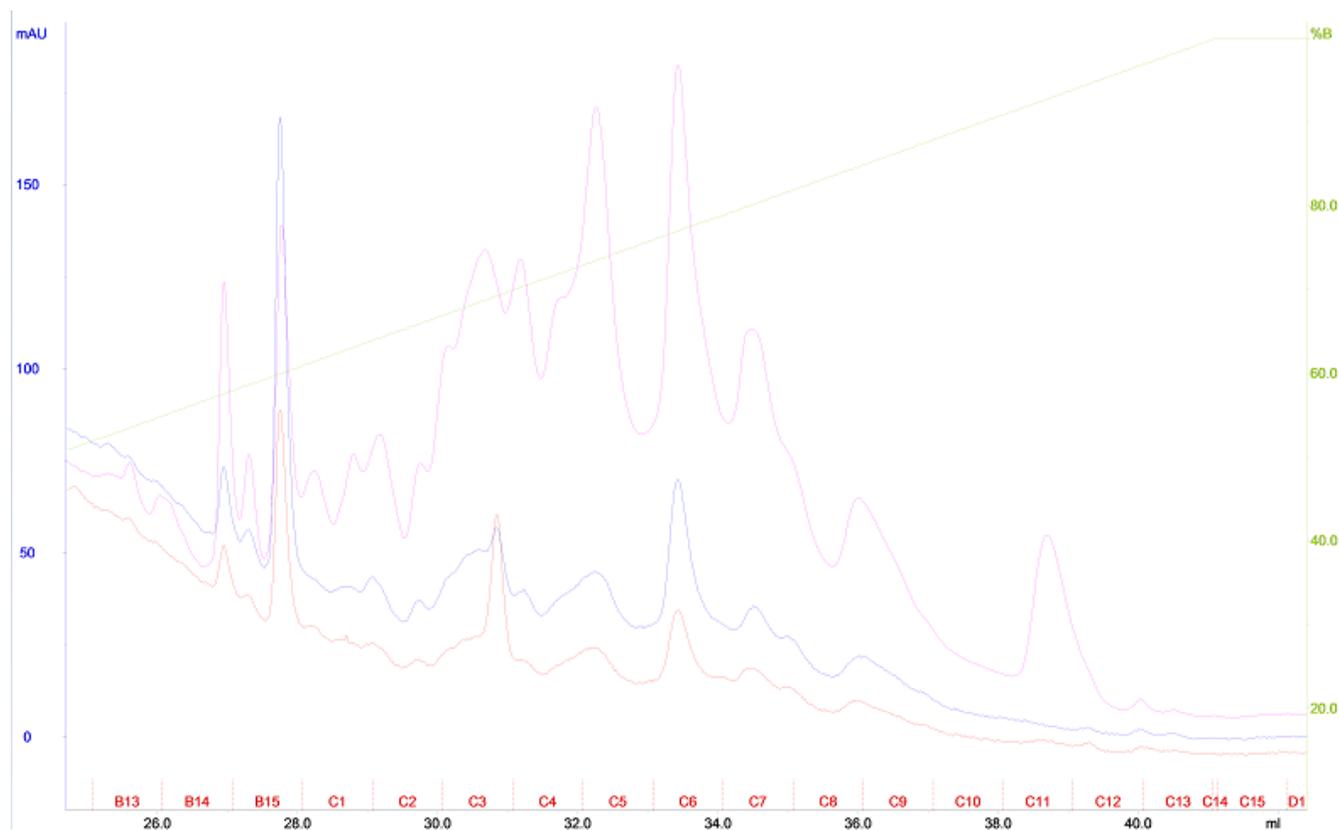


FIGURA 23

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide, corrida 36, *pool* 3 (frações ativas C6 a C9), eluídas com solução B (acetonitrila - ACM 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 (rosa), 280 nm (azul) e gradiente de ACM 0 a 100% (verde), a 25 °C. As frações ativas foram encaminhadas para “recromatografia” em coluna C-18 Sephasil™ Peptide.

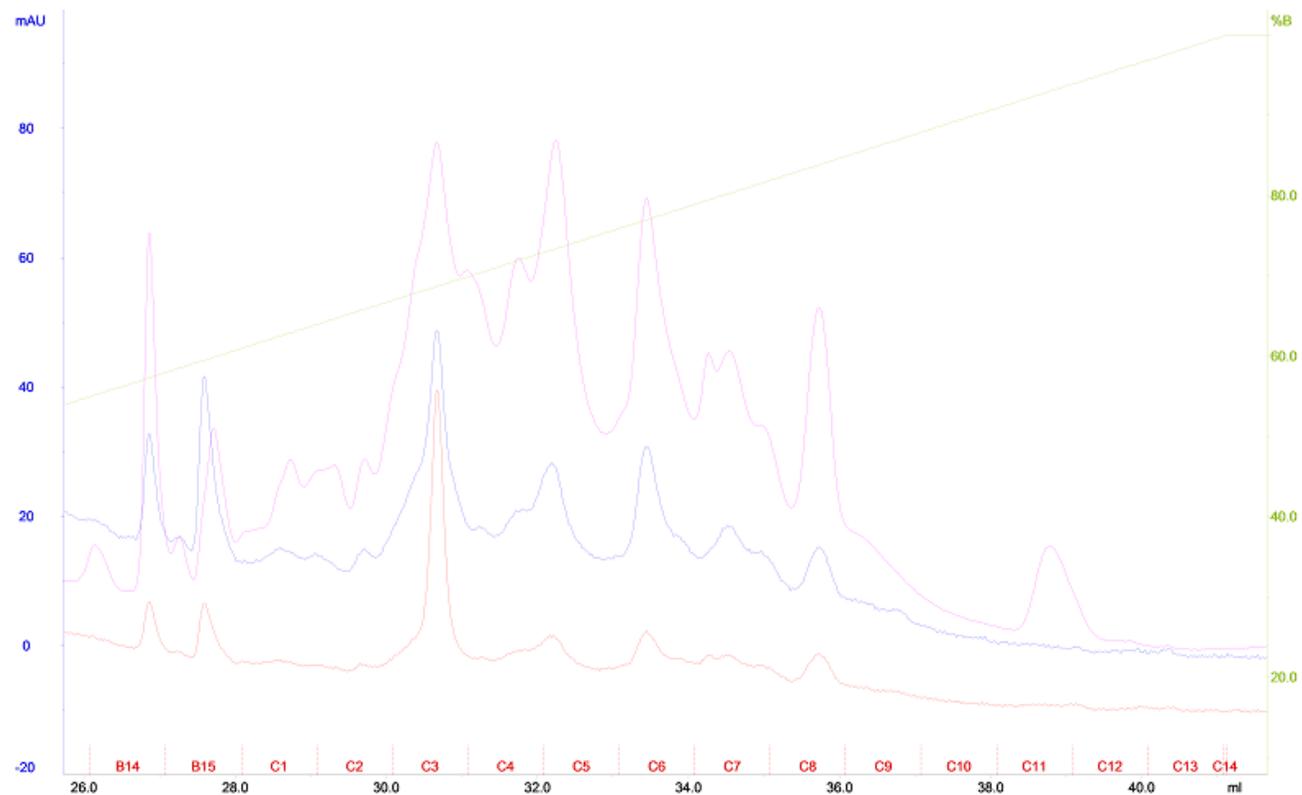


FIGURA 24

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide, corrida 37, *pool* 4 (frações ativas C6 a C8), eluídas com solução B (acetonitrila - ACM 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®).

As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 (rosa), 280 nm (azul) e gradiente de ACM 0 a 100% (verde), a 25 °C.

As frações ativas foram encaminhadas para “recromatografia” em coluna C-18 Sephasil™ Peptide.

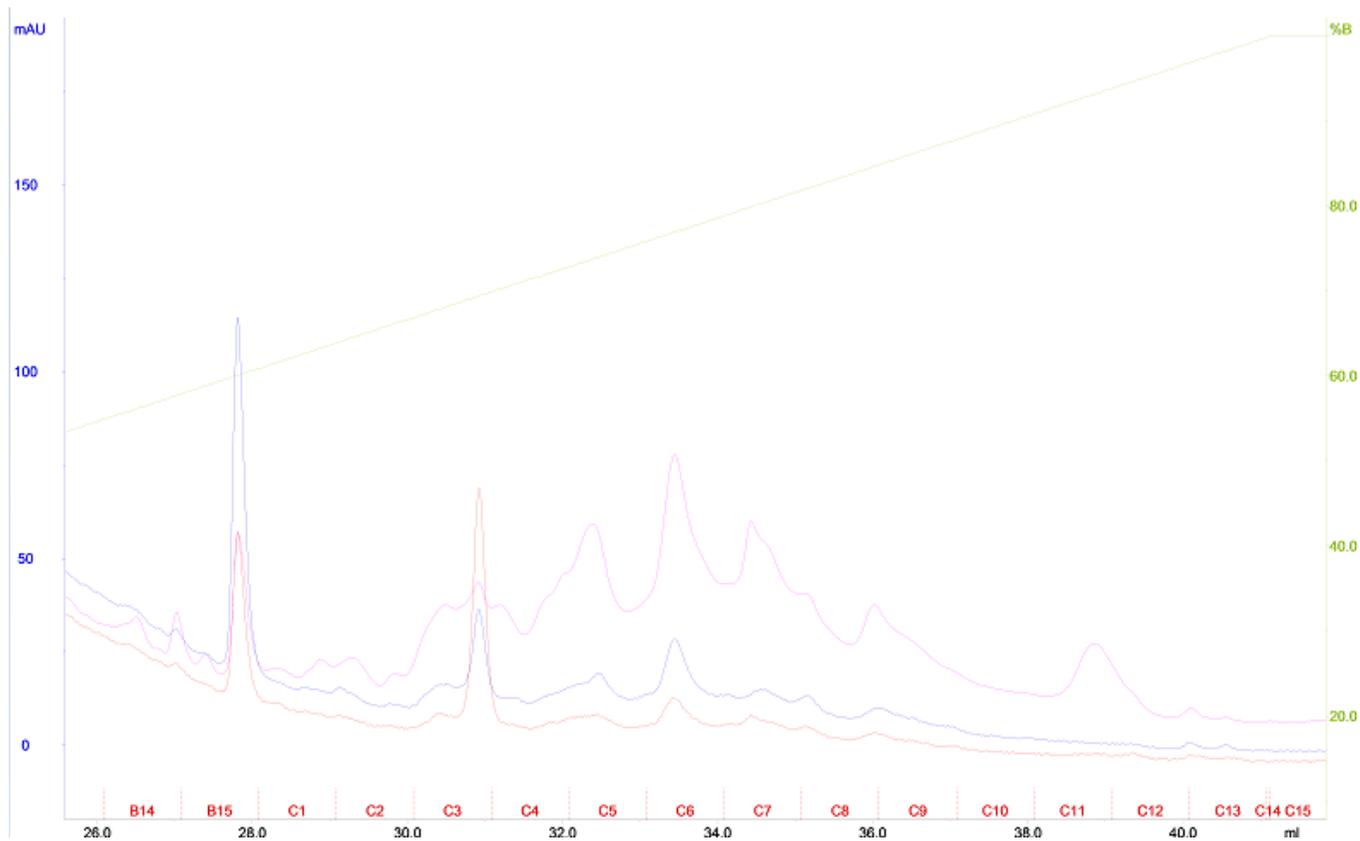


FIGURA 25

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide, corrida 38, *pool* 5 (frações ativas C6 a C9), eluídas com solução B (acetonitrila - ACM 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®).

As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 (rosa), 280 nm (azul) e gradiente de ACM 0 a 100% (verde), a 25 °C. As frações ativas foram encaminhadas para “recromatografia” em coluna C-18 Sephasil™ Peptide.

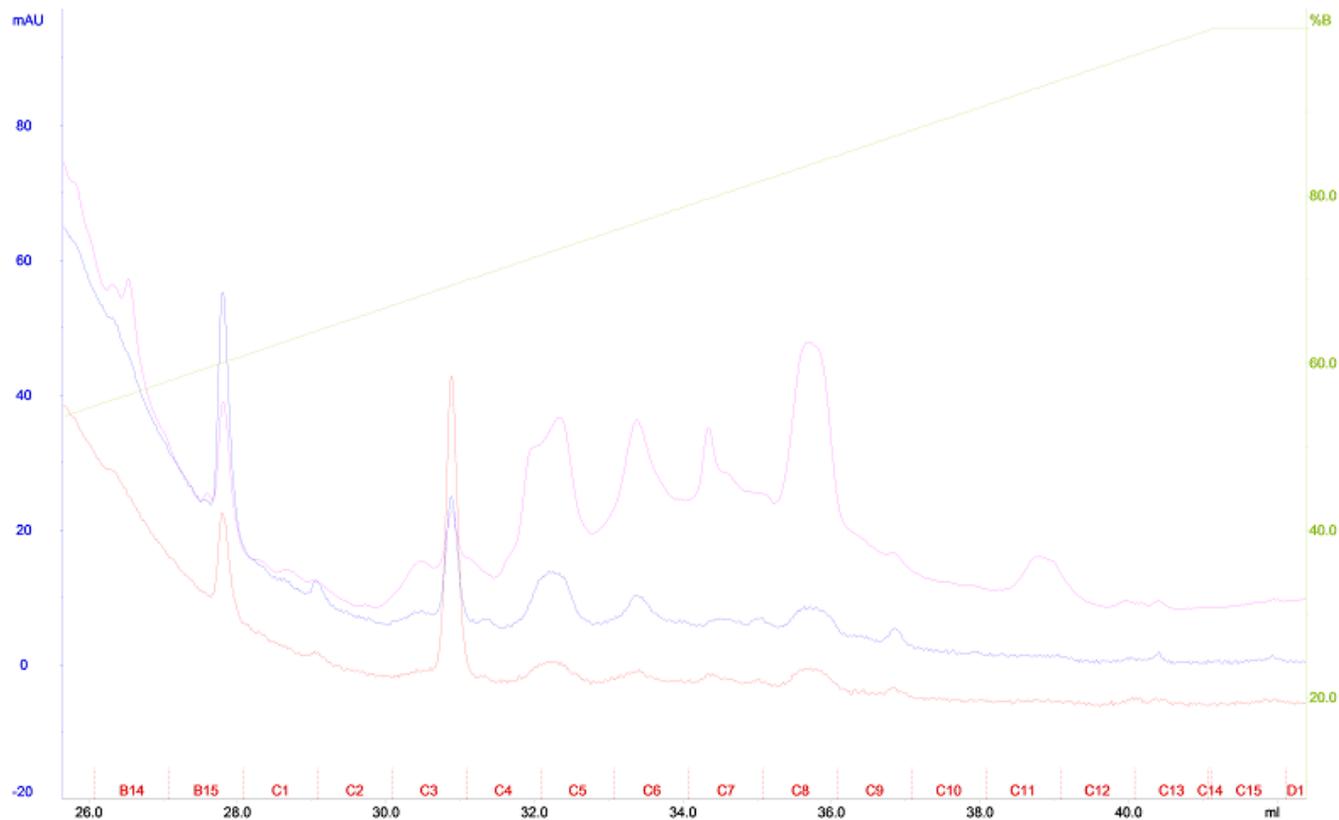


FIGURA 26

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide, corrida 39, *pool* 6 (frações ativas C6 a C9), eluídas com solução B (acetonitrila - ACM 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®).

As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 (rosa), 280 nm (azul) e gradiente de ACM 0 a 100% (verde), a 25 °C.

As frações ativas foram encaminhadas para “recromatografia” em coluna C-18 Sephasil™ Peptide.

TABELA 6

Terceira sequência de purificação: frações ativas originadas da “re-recromatografia” em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide.

POOLS/ CORRIDAS	FRAÇÕES ORIGINADAS DA RE- “RECROMATOGRÁFIA” DE FASE REVERSA COLUNA C-18	FRAÇÕES ATIVAS
<i>Pool C6</i> (Corrida 39)	Frações B1 a C15	- ¹
<i>Pool C7</i> (Corrida 40)	Frações B1 a C15	C5 e C6
<i>Pool C8</i> (Corrida 41)	Frações B1 a C15	C6 e C7
<i>Pool C9</i> (Corrida 42)	Frações B1 a C15	-

¹, frações não ativas contra a amostra reveladora de *Acinetobacter baumannii* 294.

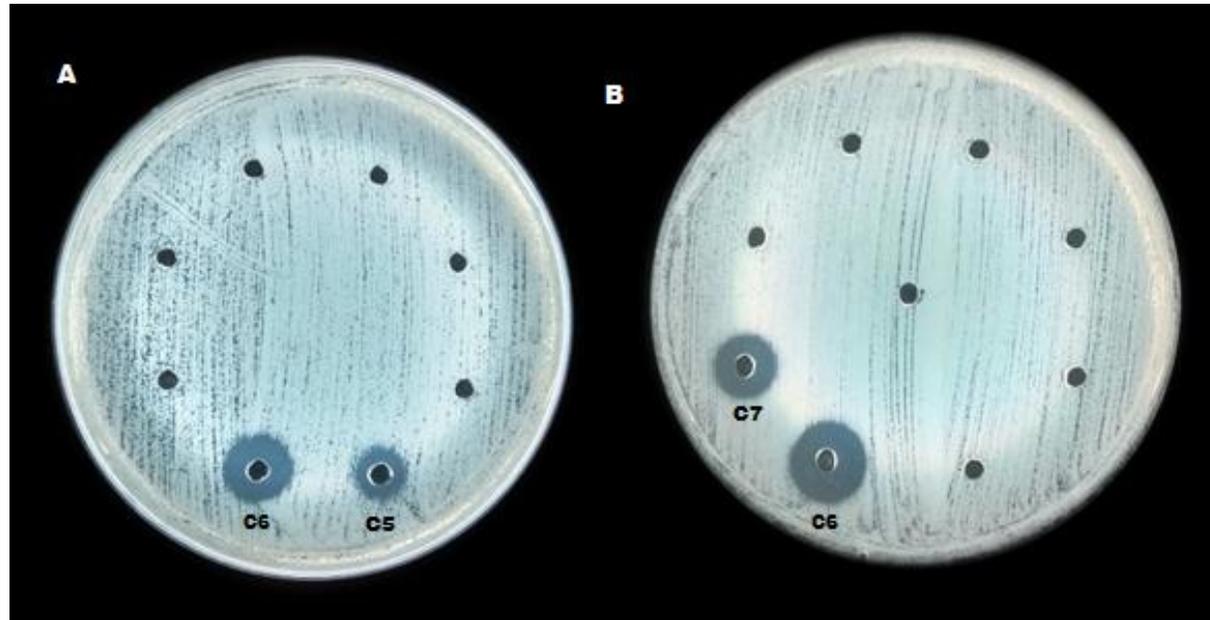


FIGURA 27

Atividade antagonista das frações C5, C6 e C7 (corridas 40 e 41) obtidas por “re-recromatografia” de fase reversa, em coluna C-18 Sephasil™ Peptide. Amostra reveladora *Acinetobacter baumannii* 294.

Técnica de *spread plate*, meio base MHA, pH 7,2, incubação em aerobiose, a 37 °C, por 24 h.

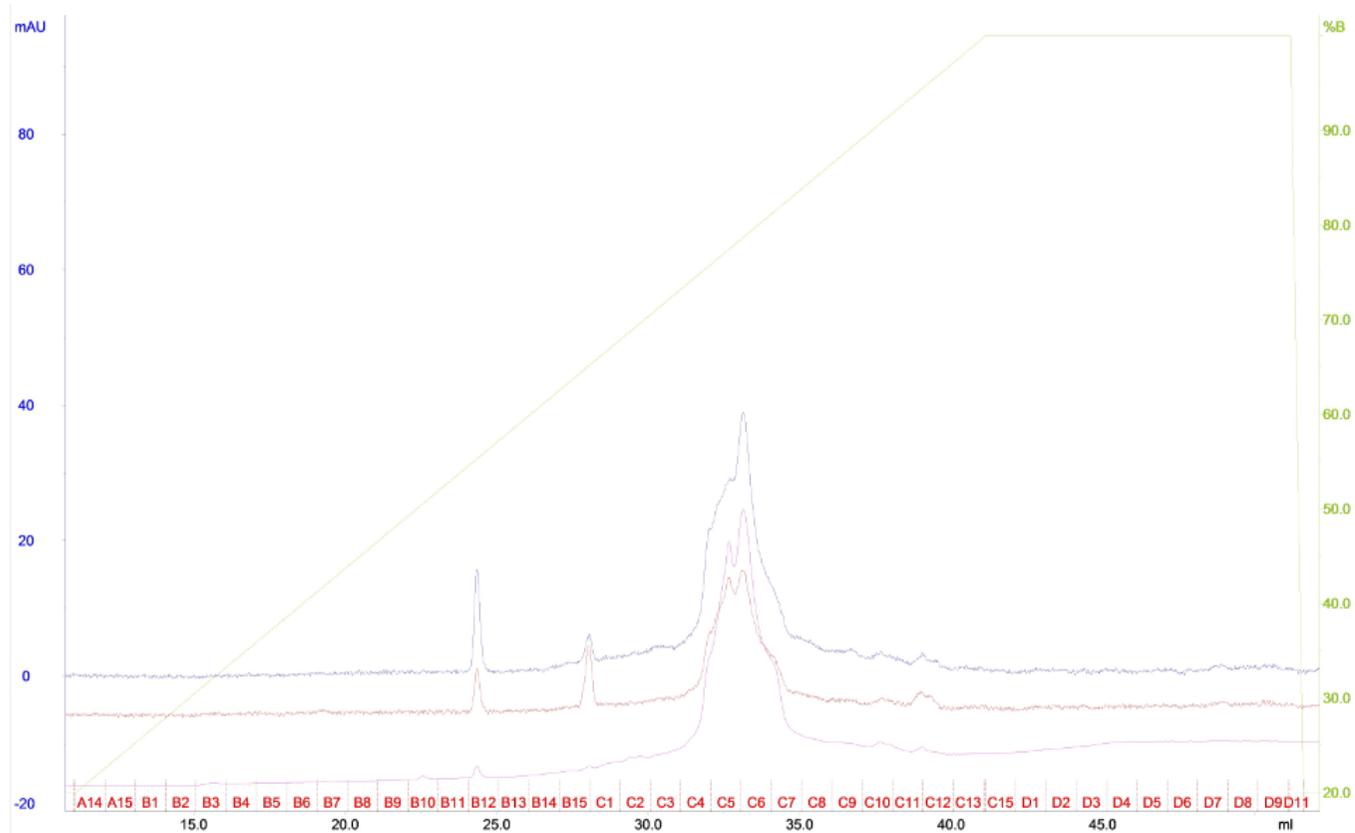


FIGURA 28

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide, corrida 40 (frações ativas, C5 e C6), eluídas com solução B (acetonitrila - ACM 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 (rosa), 280 nm (azul) e gradiente de acetonitrila 0 a 100% (verde), a 25 °C. As frações C5 e C6 foram eluídas com 78 e 80% da solução B, respectivamente, e foram encaminhadas para análise por espectrometria de massa.

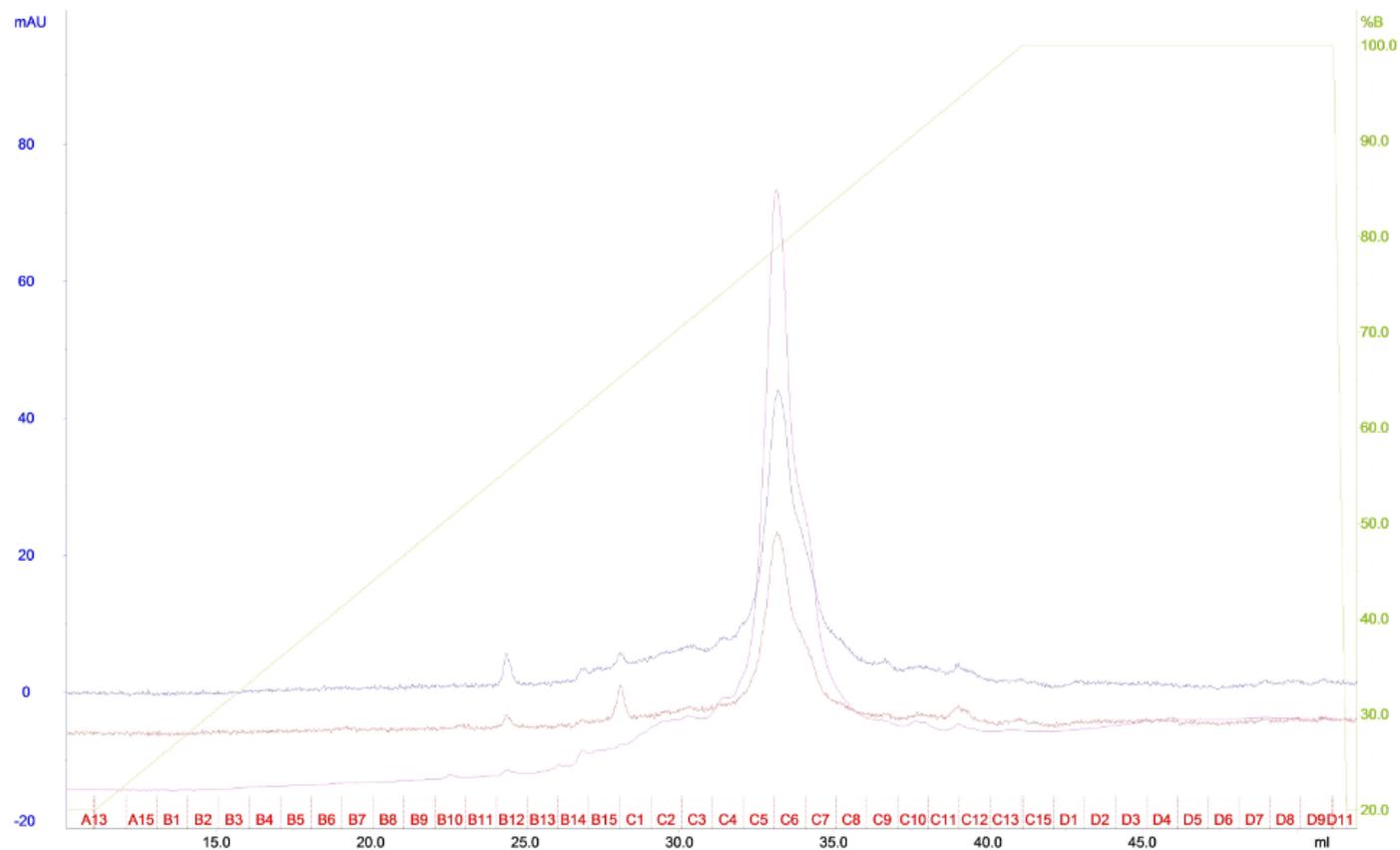


FIGURA 29

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C-18 Sephasil™ Peptide, corrida 41 (das frações C6 e C7), eluídas com solução B (acetonitrila - ACM 80% v/v acrescida de ácido trifluoroacético - TFA 0,1%) e equilibrada com solução A (TFA 0,1% v/v em água Milli-Q®). As frações eluídas foram monitoradas, empregando-se comprimento de onda de 220 (rosa), 280 nm (azul) e gradiente de ACM 0 a 100% (verde), a 25 °C. As frações C6 e C7 foram eluídas com 80 e 82,5% da solução B, respectivamente, e foram encaminhadas para análise por espectrometria de massa.

5.12 SDS-PAGE - TESTE DE ATIVIDADE *IN SITU*

Todos os volumes testados apresentaram bandas nítidas de inibição, com massa molecular de, aproximadamente, 10 kDa, quando comparado com o padrão de massa molecular pré-corado Spectra™ *Multicolor Broad Range Protein Ladder* (260 a 10 kDa), conforme ilustrado na FIG. 30.

Em relação às frações ativas (C2 a C6), observa-se a presença de pequenas bandas de inibição da amostra reveladora nas frações C2, C3, C4, C5 e C6 (pouco evidente), na mesma posição, com massa molecular de, aproximadamente, 7 kDa, quando comparado com o padrão de massa molecular pré-corado *Precision Plus Protein Dual Xtra Standards* (250 a 2 kDa) (FIG. 31).

15

20

25

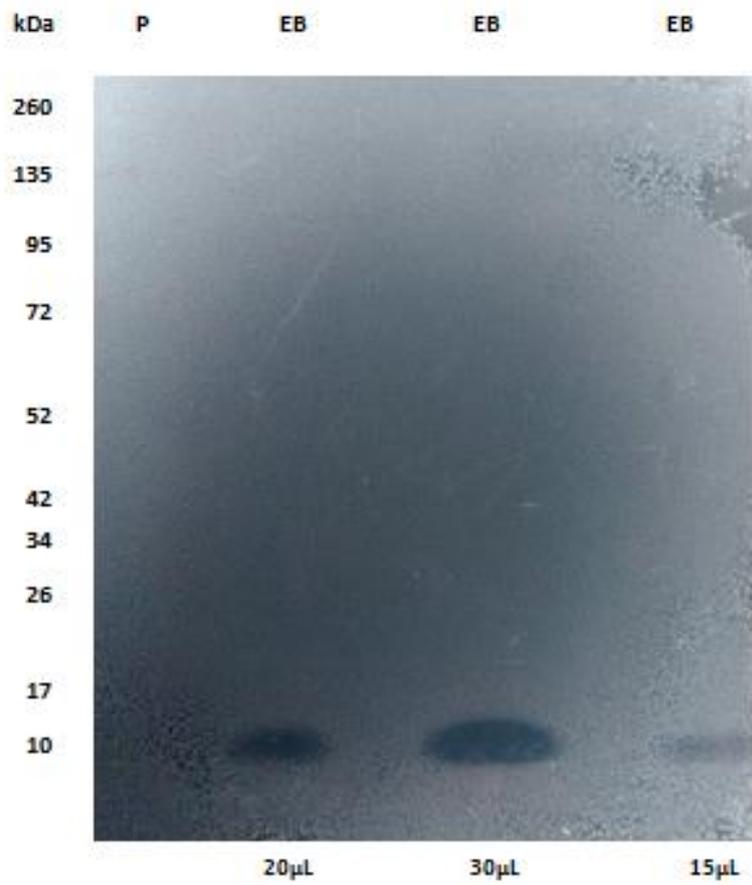


FIGURA 30

Revelação *in situ* da atividade antagonista do extrato bruto em diferentes volumes (15, 20 e 30 µL) contra amostra de *Acinetobacter baumannii* 294. P, padrão de massa molecular pré-corado (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder); EB, extrato bruto.

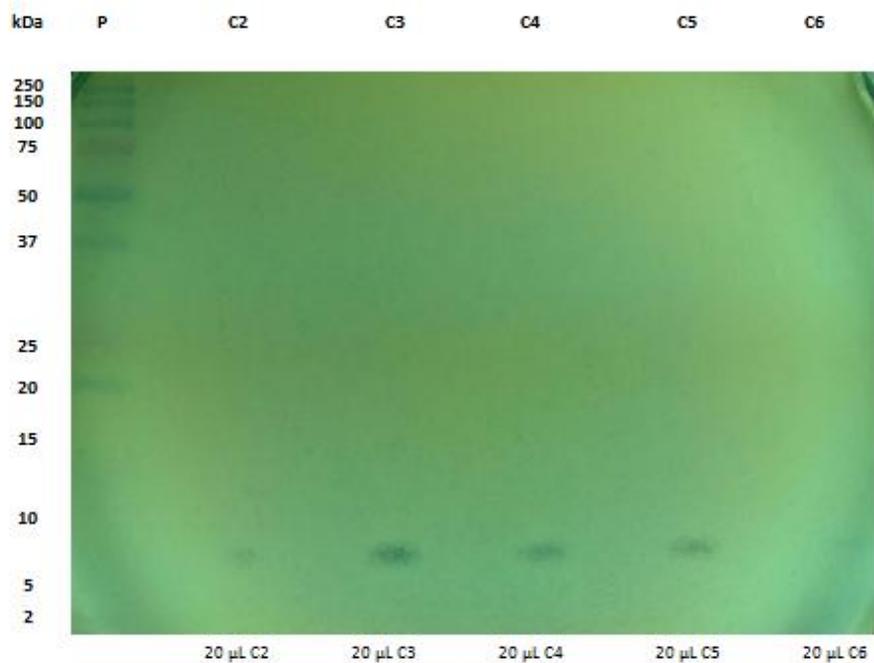


FIGURA 31

Revelação *in situ* da atividade antagonista das frações C2 a C6, originadas da corrida cromatográfica 21, em coluna LC-8 Supelcosil™, contra amostra de *A. baumannii* 294. Presença de pequenas bandas de inibição da amostra reveladora, com massa molecular de, aproximadamente, 7 kDa. P, padrão de massa molecular pré-corado (*Precision Plus Protein Dual Xtra Standards*).

5.13 ESPECTROMETRIA DE MASSA

5 A fração C5 apresentou quatro massas moleculares quando analisadas em matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico (α -CHCA), de 5.288,494; 5.811,754; 6.014,549; e 6.705,110 Da e duas em matriz de ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (DHB), 22.737,024 e 23.657,629 Da. As demais massas presentes em matriz α -CHCA são dímeros das massas 6.014,549 e 6.705,110 (FIG. 32).

10 A fração C6 da corrida 40 apresentou duas massas moleculares, de 6.231,583 e 8.379,025 Da (FIG. 33).

A fração C6 da corrida 41 também apresentou duas massas moleculares, de 6.232,067 e 8.445,047 Da (FIG. 33), semelhante às massas encontradas na fração C6 da corrida 40. Porém, o sinal de resolução deste espectrograma está melhor do que o anterior. As outras duas massas presentes no perfil do espectro da fração C6, corridas 40 e 41, também são dímeros.

15

Na fração C7 não foi detectada nenhuma massa molecular.

20

25

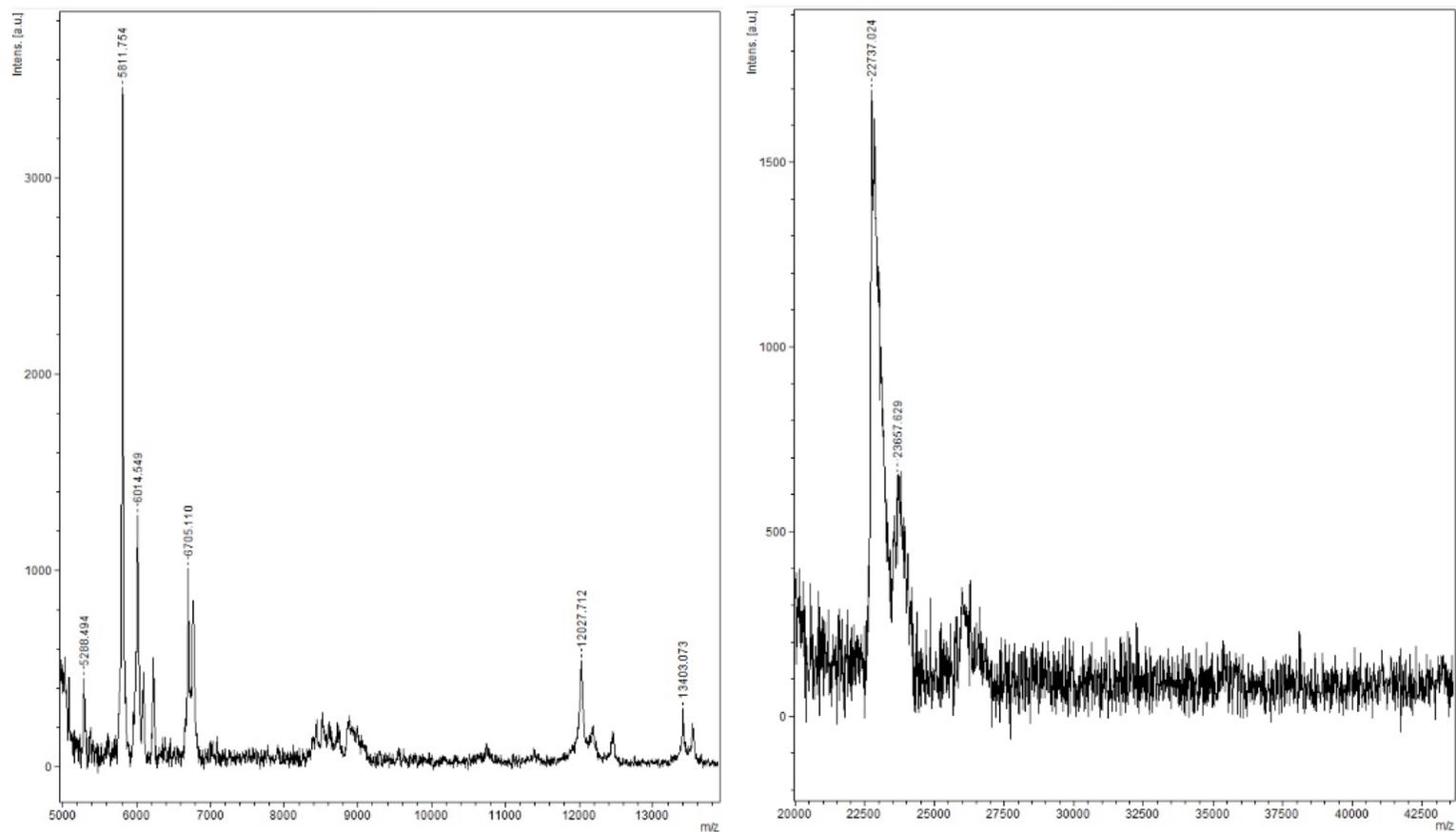


FIGURA 32

Espectro de massas em matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico (α -CHCA) (esquerda) e ácido 2,5-di-hidroxibenzoico (DHB) (direita) da fração C5 (corrida 40). Verifica-se a presença de quatro (esquerda) e duas (direita) massas moleculares de 5.288,494; 6.014,549; e 6.705,110 Da e 22.737,024 e 23.657,629 Da, respectivamente.

Intensidade relativa *versus* função massa sobre carga (m/z).

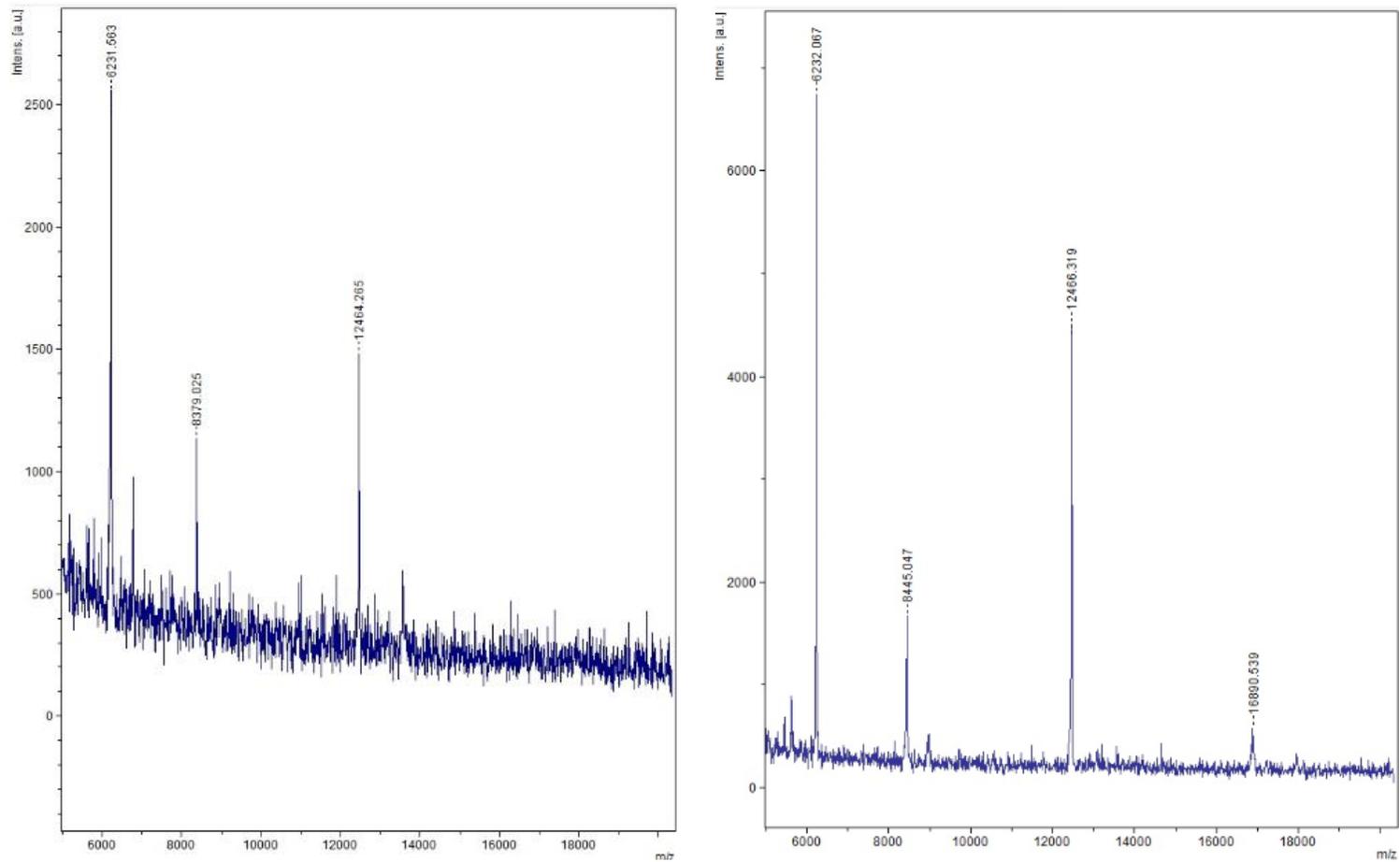


FIGURA 33

Espectro de massas em matriz DHB da fração C6, corrida 40 (esquerda) e α -CHCA, corrida 41 (direita). Observa-se a presença de duas massas moleculares em cada espectrograma, com massas semelhantes, sendo, 6.231, 583 e 8.379, 025 Da (esquerda) e 6.232,067 e 8.445, 047 Da (direita).

Intensidade relativa *versus* função massa sobre carga (m/z).

6. DISCUSSÃO

5 A busca por substâncias antimicrobianas vêm crescendo de forma marcante nos últimos anos, tanto pela possibilidade de aplicação prática (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008), como para o melhor entendimento da ecologia microbiana, visto que é plausível admitir a existência de relação entre a predominância de determinadas amostras e expressão destas substâncias (O'SHEA
10 *et al.*, 2012). A emergência de microrganismos resistentes, bem como as doenças associadas aos mesmos ressaltam ainda mais a necessidade de estudos para descoberta de novas substâncias antimicrobianas, oriundas das mais diversas fontes (AMRAOUI *et al.*, 2014).

A capacidade de sintetizar substância(s) antimicrobiana(s) parece ser uma
15 propriedade amplamente disseminada entre bactérias. Tanto membros da microbiota indígena (DOBSON *et al.*, 2012), como amostras exógenas isoladas de processos infecciosos (SOUSA *et al.*, 2010), podem expressar esta capacidade. Dentre aquelas de grande relevância terapêutica, destacam-se as bacteriocinas e os lipopeptídios.

A importância clínica de *A. baumannii* tem sido cada vez mais enfatizada, sendo, o
20 microrganismo, considerado um dos patógenos nosocomiais de maior relevância mundial. Nos últimos anos, *A. baumannii* tem sido recuperado de diversos processos infecciosos, como pneumonias, bacteremias e infecções do trato urinário. Geralmente, as amostras são resistentes a diversas classes de antimicrobianos, principalmente aos carbapenêmicos (MA *et al.*, 2015).

25 Em estudo que avaliou o perfil de resistência de amostras de *A. baumannii* recuperadas de cinco hospitais de Belo Horizonte, Martins e colaboradores (2014) relataram altos índices de resistência ao imipenem (93,75%) e à polimixina B (39,06%), sendo a polimixina B um dos antibióticos de última escolha para tratamento de pacientes infectados por amostras multirresistentes (BERGEN *et al.*,
30 2015). Essa investigação reforça ainda mais a necessidade de estudos que visem à descoberta de novos agentes antimicrobianos, principalmente, que atuem contra bactérias multirresistentes.

Ao estudarem microrganismos marinhos, Amraoui e colaboradores (2014) isolaram uma amostra de *A. baumannii* e avaliaram seu potencial farmacêutico, quanto à expressão de antagonismo. Os autores observaram que a bactéria expressava atividade antagonista contra todas as amostras reveladoras testadas, incluindo 5 bactérias e fungos, relatando a possível síntese de substância(s) antimicrobiana(s) pela bactéria. Entretanto, não foram realizados testes para avaliar a expressão de isoantagonismo, ou seja, atividade antagonista de *A. baumannii* contra amostras do mesmo gênero ou espécie.

Além deste estudo, a expressão de antagonismo pelo gênero *Acinetobacter* também 10 foi evidenciada por Andrews (1986), porém, para duas outras espécies, *A. Iwoffii* e *A. anitratum*, esta última hoje denominada de *A. calcoaceticus*.

Como mencionado, a expressão de antagonismo já foi descrita para o gênero *Acinetobacter*. Porém, estudos que abordem o isolamento, a purificação, e a caracterização das substâncias antimicrobianas ainda são bastante escassos. 15 Assim, considerando a relevância do tema, a escassez de dados relativos a substância(s) antagonista(s) sintetizada(s) por espécies do gênero *Acinetobacter* e a experiência prévia do grupo na área de “Substâncias antagonistas sintetizadas por bactérias”, desenvolveu-se este estudo.

Dezoito amostras de *A. baumannii* isoladas de hemoculturas de pacientes internados 20 no Hospital João XXIII e uma amostra de referência foram avaliadas quanto à expressão de atividade antagonista contra bactérias de referência e de importância clínica (membros da microbiota intestinal indígena, enteropatogênicas e resistentes a múltiplas drogas antimicrobianas).

A identificação das amostras teste foi previamente confirmada, empregando-se duas 25 metodologias, uma abordagem bioquímico-fisiológica automatizada (sistema Vitek2[®]) e um ensaio de genética molecular, a PCR. Alguns sistemas automatizados exibem baixo poder de distinção entre as espécies do gênero *Acinetobacter* (FRANÇA, 2014). Segundo ABBOTT e colaboradores (2013), o Vitek2[®] apresenta baixa capacidade de diferenciação de espécies do complexo *Acinetobacter* 30 *baumannii* - *Acinetobacter calcoaceticus* (ABC), podendo promover identificação equivocada das espécies. Por este motivo, a confirmação por genética molecular foi realizada.

Os resultados obtidos indicaram que uma única amostra clínica de *A. baumannii* apresentou capacidade de expressão de antagonismo. Considerando as condições experimentais testadas no *screening* inicial, a capacidade foi evidenciada quando a amostra foi cultivada em BHIA suplementado com extrato de levedura e incubada a 5 37 °C. Acredita-se que algum componente do meio tenha estimulado ou sido utilizado para a síntese da(s) substância(s) antagonista(s). Entretanto, nestas condições, os halos de inibição eram pequenos e nublados.

Inicialmente, os testes para avaliação de expressão de antagonismo foram realizados em meio de cultura com pH 6,5, 7,2 e 8,0. Em todos os valores de pH 10 testados evidenciou-se a expressão de antagonismo, porém, com espectros de atividade distintos. Em pH 7,2, observou-se um número maior de amostras reveladoras suscetíveis, o que sugere que este pode ser o pH ótimo para síntese da(s) substância(s), permitindo que a(s) mesma(s) alcance(m) concentrações suficientes para inibir diferentes amostras ou que ocorra a síntese de mais de um 15 tipo de substância antagonista.

Visando otimizar os resultados, os ensaios que originaram resultados positivos foram repetidos em temperatura de 25 e 42 °C. A 25 °C observaram-se halos de inibição das amostras reveladoras maiores e mais límpidos, se comparados com aqueles evidenciados anteriormente, sugerindo-se, assim, que ocorra uma maior expressão 20 de substância(s) antagonista(s)/célula nesta temperatura.

O gênero *Acinetobacter* foi isolado, pela primeira vez, de amostras do solo (HENRIKSEN, 1973), mantendo-se viável em temperatura ambiente, em torno de 25 °C. A competição por nutrientes e espaço, em *habitats* densamente habitados, como o solo, estimulam os microrganismos a sintetizar diversos produtos naturais, com 25 potencial antimicrobiano (LING *et al.*, 2015). Deste modo, sugere-se que a capacidade de síntese de substâncias antimicrobianas pelo gênero é ancestral.

Entretanto, com a migração de espécies do gênero para o ambiente clínico, a bactéria passou a ser exposta a pressões seletivas diversas, entre elas, pode-se citar a exposição a concentrações elevadas de drogas antimicrobianas. Assim, é 30 plausível supor que, neste “novo” ambiente, a expressão de outras propriedades tenha passado a ser mais relevante para o organismo. Mas, admite-se que a

capacidade de produção de substâncias antimicrobianas tenha sido preservada e sua expressão possa ser detectada em condições adequadas.

5 Aasen e colaboradores (2000) acreditam que diversos fatores relacionados ao cultivo do microrganismo produtor, tais como, composição do meio de cultura, atmosfera de incubação, pH e temperatura, possam influenciar a produção de substâncias antimicrobianas. Essa afirmativa coincide com o que foi demonstrado neste estudo.

Nessa busca inicial, observou-se o fenômeno de isoantagonismo, ou seja, a amostra produtora de *A. baumannii* inibiu, apenas, amostras reveladoras da mesma espécie.
10 Este resultado é similar àqueles mostrados para substâncias antagonistas tipo bacteriocina (BENMECHERNE *et al.*, 2013).

Com base nos dados gerados pelo *screening*, a amostra produtora *A. baumannii* 397 foi selecionada para as etapas subsequentes do estudo. Quanto às reveladoras, selecionou-se aquela que apresentou maior suscetibilidade, a amostra *A. baumannii*
15 294. Esta escolha foi definida de acordo com o tamanho e limpidez do halo de inibição.

O tamanho do halo de inibição da amostra reveladora não é uma variável adequada para a avaliação da expressão elevada ou reduzida de uma substância antimicrobiana, visto que pode estar diretamente relacionado ao tamanho da molécula ou até mesmo a características técnicas, como, por exemplo, espessura do
20 ágar. Ainda assim, de acordo com o *screening* realizado, a presença, o tamanho e a limpidez dos halos foram os únicos parâmetros encontrados para seleção de uma amostra reveladora. Nas etapas seguintes do estudo, os halos de inibição não foram mensurados.

25 Ao avaliar o espectro de atividade antagonista da amostra de *Shigella sonnei*, isolada de criança com diarreia aguda, Oliveira (2013) observou a formação de halos de inibição com tamanhos distintos, para diferentes reveladoras. Essa variação foi justificada com base na síntese de mais de uma substância antagonista, com perfis de atividade e difusão distintos.

30 Os microrganismos são capazes de secretar diversas categorias de substâncias com atividade antimicrobiana não específica, como, por exemplo, ácidos graxos e

peróxido de hidrogênio (DOBSON *et al.*, 2012; O'SHEA *et al.*, 2012). Além disto, compostos químicos, como clorofórmio, empregado nos testes, e agentes infecciosos, como bacteriófagos, podem inibir amostras bacterianas. Por esta razão, conduziram-se testes para exclusão destes fatores interferentes (APOLÔNIO *et al.*,
5 2007).

O teste para detecção de bacteriófagos foi realizado invertendo-se a posição do meio de cultura, de forma que a face na qual se encontravam as amostras teste não tinha contato direto com a amostra reveladora. Como se observou a presença de halos de inibição da amostra reveladora foi possível concluir que a atividade
10 antagonista era devida a substância difusível, capaz de atravessar a camada de ágar e agir sobre a amostra reveladora. Caso os bacteriófagos fossem responsáveis pelo antagonismo, não haveria formação de zona de inibição quando o teste fosse realizado segundo este protocolo, em decorrência da impossibilidade destes organismos atravessarem a camada de ágar para infectar a amostra produtora
15 (KÉKESSY & PIGUET, 1970). Se a amostra reveladora estivesse infectada, seria possível visualizar zonas líticas dispersas na placa (SOUSA *et al.*, 2010). Assim, a possível ação de bacteriófagos como responsável pela inibição foi descartada.

De forma similar, os resultados revelaram que o clorofórmio, utilizado para matar a amostra produtora antes da revelação do experimento, não foi o responsável pelo
20 antagonismo. Esta conclusão foi possível pelo emprego de protocolo que dispensava o uso de clorofórmio (FARIAS *et al.*, 1992).

Também, peróxido de hidrogênio e ácidos graxos não foram responsáveis pela atividade antagonista observada no experimento, como mostrado pelos resultados dos testes realizados em meio com catalase e amido, respectivamente. No que se
25 refere a peróxido de hidrogênio, o mesmo seria inativado pela catalase e, em relação a ácidos graxos, a formação de um complexo com o amido impediria sua ação (WALSTAD; REITZ; SPARLING, 1974).

Em conjunto, os resultados desses testes permitiu reforçar a hipótese de produção de substância(s) antagonista(s) similar(es) a bacteriocina pela amostra *A. baumannii*
30 397.

A avaliação da curva de produção da substância(s) antimicrobiana(s) em meio sólido demonstrou que a síntese inicia-se, aparentemente, após 11 h e 30 min de

incubação da amostra produtora, atingindo o pico máximo de produção a partir das 17 h, hipótese baseada na estabilidade do tamanho do halo de inibição da amostra reveladora. Entretanto, conforme observado por Apolônio (2009), não se pode afirmar que a produção da substância inicia-se, necessariamente, no momento descrito. Acredita-se que, neste ponto, a substância tenha atingido uma concentração suficiente para sua difusão no meio e inibição da amostra reveladora, permitindo a visualização do halo de inibição.

A carência de dados na literatura referentes ao isolamento e purificação de substâncias antagonistas produzidas por *A. baumannii*, estimulou a buscar por metodologias que permitissem a extração desta(s) substância(s). Em decorrência disto, inúmeras técnicas de extração foram empregadas. Dentre elas, apenas a precipitação ácida, com HCl 5 N, realizada de acordo com Cooper *et al.* (1981) e Nakano, Marahiel e Zuber (1988), mostrou-se eficaz. Esta metodologia foi a única capaz de extrair a(s) substância(s) e permitir que ela(s) se mantivesse(m) ativa(s).

Grande parte das substâncias antimicrobianas é sintetizada no citoplasma, secretada para o meio extracelular e coletada por técnicas de precipitação, seja com a utilização de sais, solventes ou ácidos (CAROLISSEN-MACKAY; ARENDSE; HASTINGS, 1997). Diversas metodologias que empregam tratamento ácido já foram propostas, das quais duas merecem destaque. São elas, a precipitação ácida com HCl, utilizada para extração de lipopeptídios, semelhante àquela que descreveu-se anteriormente (BAINDARA *et al.*, 2013), e a extração ácida de bacteriocinas de bactérias lácticas, como pediocina AcH, nisina, sakacina A e leuconocina Lcm1 (YANG; JOHNSON; RAY, 1992).

Uma observação relevante, que tem se mostrado válida para diversas bactérias com as quais o grupo trabalha, refere-se à necessidade de realização de alguns repiques consecutivos da amostra produtora antes do preparo do inóculo para extração (APOLÔNIO *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2013). Quando a amostra produtora foi reativada a partir da alíquota criopreservada e empregada diretamente nos testes, não se obtinha extrato ativo. Assim, de alguma maneira, parece que a capacidade de expressar algumas substâncias, tais como, bacteriocinas, precisa ser “ativada” após criopreservação da amostra produtora.

Além disso, as condições de cultivo foram otimizadas, favorecendo o rendimento da extração e permitindo a obtenção de um título mais elevado de atividade antagonista. Em relação à concentração do inóculo, sugere-se que, quanto maior o número de células da amostra produtora, maior a produção de substância(s) antagonista(s), explicação plausível também no que diz respeito ao tempo de incubação do inóculo. Os dados mostram que, quando a amostra foi incubada por 24 h, a produção de substância(s) antagonista(s) foi menor se comparada com o rendimento do processo quando se empregou tempo de incubação de 48 h.

Diversos autores mencionam que condições de estresse estimulam a produção de substâncias antagonistas (RILEY; WERTZ, 2002), entretanto, neste estudo, não foi realizado nenhum experimento que comprove essa afirmativa. Considerando que *A. baumannii* foi, originalmente, isolada da natureza (FOURNIER; RICHET, 2006) e o fato de que a bactéria é frequentemente encontrada no ambiente nosocomial (ABBOTT *et al.*, 2013), a incubação a 25 °C não deve ser considerada uma situação de estresse.

O método de revelação empregado para os demais testes (titulação, espectro de ação, caracterização e purificação) distinguiu-se daquele utilizado no *screening*. A técnica de *spread plate* forneceu halos mais límpidos se comparado com a técnica de sobrecamada. Sugere-se que a formação de poços no ágar favoreceu a difusão da(s) substância(s).

Em relação ao espectro de atividade do extrato bruto, as 38 amostras reveladoras de *Acinetobacter* spp. (36 amostras de *A. baumannii* e 2 amostras de *A. junii*), isoladas de três ambientes clínicos distintos, sendo dois hospitais de referência de Belo Horizonte (MARTINS, 2012; FRANÇA, 2014) e um centro odontológico, foram suscetíveis à(s) substância(s) presente(s) no extrato bruto de *A. baumannii* 397. Essas amostras apresentam perfis de resistência a antimicrobianos distintos, sendo algumas multirresistentes. Os dados obtidos são extremamente relevantes, visto os altos índices de resistência a múltiplas drogas relatados para *A. baumannii* (SHAZLY *et al.*, 2015), o que reforça o potencial de aplicação prática da substância.

Os fenômenos de isoantagonismo e autoantagonismo foram evidenciados. Sabe-se que as bactérias Gram negativas, habitualmente, sintetizam substâncias antagonistas, tipo bacteriocinas, com espectro de ação reduzido quando

comparadas com aquelas sintetizadas por bactérias Gram positivas, inibindo, geralmente, amostras filogeneticamente relacionadas à amostra produtora, seja da mesma espécie ou gênero (NISHIE; NAGAO; SONOMOTO, 2012).

5 No presente estudo, o espectro de atividade foi restrito, sendo a amostra produtora ativa apenas contra amostras do mesmo gênero, o que reforça a hipótese de síntese de substância(s) tipo bacteriocina, de acordo com a definição clássica das mesmas (KLAENHAMMER, 1988; PAPASTATHOPOULOU; BEZIRTZOGLU; LEGAKIS, 1997).

10 Com base nas características das substâncias tipo bacteriocina, a suscetibilidade da amostra produtora à ação da(s) substância(s) produzida(s) por ela mesma (CLEVELAND *et al.*, 2001; COTTER; HILL ; ROSS, 2005; COTTER, 2012) sugere um desequilíbrio entre a concentração de proteínas de imunidade específicas e de substância(s) antagonista(s) no extrato (APOLONIO *et al.*, 2007). O fenômeno de autoantagonismo é comumente relatado para bactérias Gram positivas (JACK *et al.*, 15 1995), mas, embora mais raro, o mecanismo já foi descrito para bactérias Gram negativas (APOLONIO *et al.*, 2007; FARIAS *et al.*, 1994).

Observou-se, ainda, que todas as 36 amostras reveladoras da espécie *A. baumannii* foram sensíveis à ação do extrato protéico bruto, mas, algumas se mostraram resistentes à atividade da amostra produtora. Acredita-se que a técnica de extração 20 empregada para obtenção do extrato bruto tenha aumentado a concentração da(s) substância(s) antagonista(s) ou que as condições de cultivo tenham favorecido a síntese de outra(s) substâncias(s), com espectro(s) de atividade diferente(s).

As amostras reveladoras de gêneros distintos empregadas neste estudo, incluindo amostras clínicas e de referência, não foram suscetíveis à ação da(s) substância(s) 25 produzida(s) por *A. baumannii* 397. Resultados diferentes daqueles descritos por Amraoui e colaboradores (2014), que relataram a expressão de antagonismo por amostra de *A. baumannii*, isolada de ostra, contra amostras filogeneticamente distantes, quais sejam, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 19433, *Bacillus* sp. CIP 104717, *E. coli* CIP 5102, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 e uma amostra 30 fúngica, *Candida albicans* CIP48.72. Dentre todas, *C. albicans* foi a mais suscetível à ação antagonica de *A. baumannii*, com base no tamanho do halo de inibição.

No presente estudo, o extrato bruto foi exposto a diferentes tratamentos, visando à caracterização preliminar da(s) substância(s) antimicrobiana(s) ali presente(s). Quando submetido a temperaturas elevadas, superiores a 50 °C, embora que por poucas horas, a atividade do extrato foi mantida. Além disto, a estabilidade foi preservada após incubação por 7 dias a 25 °C, por 5 dias a 37 °C e por 18 h a 50 °C. O extrato permanecia ativo em temperaturas mais baixas, -80 °C, -20 °C e 4 °C, após três meses de armazenamento, último período avaliado. Os resultados indicam termoestabilidade do extrato a diversas temperaturas. A termoestabilidade representa, certamente, uma vantagem técnica importante para estudos futuros empregando a(s) substância(s), visto que, sua atividade é preservada por longos períodos de tempo a diferentes temperaturas, principalmente a 4 °C, temperatura de geladeira.

O extrato foi submetido a tratamento com diferentes valores de pH e sua atividade vem sendo preservada em uma ampla faixa, de 2 a 12. O último ensaio foi realizado após exposição por três meses.

Os ensaios realizados com solventes orgânicos a concentrações de 10%, 50% e 80% revelaram que os mesmos não atuam na atividade do extrato bruto. O butanol, a 50% e 80%, interferiu diretamente na viabilidade da amostra reveladora, tendo sido, portanto, excluído da análise. Alguns solventes orgânicos são empregados como eluentes em etapas de cromatografia, assim como a acetonitrila e o metanol, utilizados em cromatografia de fase reversa. Por este motivo, as substâncias foram incluídas nos testes. O extrato foi exposto por apenas 3 h aos solventes, tempo mais do que suficiente para obtenção de uma corrida cromatográfica, ou seja, tempo máximo de exposição do extrato ao solvente.

A estabilidade do extrato a solventes orgânicos reduz a chance da substância expressa por *A. baumannii* apresentar um grupamento lipídico, como ocorre com os lipopeptídios, já que a porção apolar é essencial para a expressão da atividade antibacteriana (ONGENA; JACQUES, 2007) e, quando exposta a solventes, tende a ser solubilizada.

Para avaliar a natureza proteica da(s) substância(s) presentes no extrato bruto, empregou-se o tratamento com quatro enzimas proteolíticas (tripsina, proteinase K, papaína e α -quimiotripsina). A inativação da(s) substância(s) antagonista(s) por

todas as enzimas evidenciou a natureza proteica da(s) mesma(s) (AVELAR *et al.*, 1999; BOOTH; JOHNSON; WILKINS, 1977; HAYES *et al.*, 1983).

Os agentes antimicrobianos podem ser classificados, de acordo com seu modo de ação, como bacteriostáticos ou bactericidas. Os agentes bacteriostáticos, normalmente, comprometem a função ribossomal e, conseqüentemente, a síntese de proteínas. Inibem a multiplicação microbiana, mas, não são capazes de matar as células. Já os agentes bactericidas rompem a parede ou a membrana celular e/ou afetam diretamente enzimas essenciais, levando à morte das células bacterianas. Entretanto, alguns agentes podem ser bactericidas para um grupo de microrganismos e bacteriostáticos para outros (FRENCH, 2006).

Para determinar o modo de ação das substâncias antimicrobianas, os resultados de dois ensaios devem ser levados em consideração, a determinação da CIM e da CBM. Os valores obtidos devem ser comparados, sendo classificado como bactericida um agente cujo valor de CBM não seja maior que quatro vezes o valor da CIM (FRENCH, 2006).

A concentração do extrato bruto capaz de reduzir 99,9% das células reveladoras viáveis foi de 160 UA/mL, valor duas vezes maior que a CIM, 80 UA/mL. Logo, os resultados revelaram a atividade bactericida do mesmo. Entretanto, o teste foi realizado com o extrato bruto não purificado, podendo, a atividade, ser decorrente da ação de uma ou mais substâncias. Deste modo, os resultados referentes à caracterização e ao modo de ação do extrato deverão ser reavaliados após obtenção da substância purificada.

No ensaio de cinética de ação, após 150 minutos de incubação do extrato bruto com a amostra reveladora, observou-se redução de 99,93% do número de células viáveis. Este ensaio revelou que a(s) substância(s) antagonista(s) presente(s) no extrato apresenta(m) atividade bactericida contra a amostra reveladora após 2 h e 30 minutos de exposição.

Como não existe uma padronização específica para processo de purificação de proteínas “desconhecidas”, o procedimento foi realizado às escuras, de acordo com algumas características da(s) substância(s) desvendadas ao longo do processo. O método de extração da(s) substância(s) foi o primeiro parâmetro analisado. Acredita-

se que a técnica de precipitação ácida represente uma etapa preliminar de purificação, partindo-se do pressuposto que poucas substâncias resistiriam a pH 2.

5 A estabilidade da(s) substância(s) frente ao tratamento com solução de 80% de acetonitrila contribuiu para escolha do tipo de cromatografia, da coluna e das condições de purificação. Assim, a sequência de purificação empregando diferentes tipos de cromatografia não foi seguida. Como estratégia de purificação, realizou-se apenas a cromatografia líquida de fase reversa, empregando-se duas colunas distintas, a LC-8 Supelcosil™ e a C-18 Sephasil™ Peptide.

10 A purificação parcial da substância foi realizada em três etapas consecutivas de cromatografia de fase reversa, a primeira em coluna LC-8 Supelcosil™, seguida por duas outras etapas em coluna C-18 Sephasil™ Peptide. As frações geradas em cada corrida foram avaliadas quanto ao perfil cromatográfico e atividade antimicrobiana. Ao fim de cada etapa, as frações ativas foram misturadas, gerando *pools*, que, por sua vez, foram “recromatografados”. *Pools* foram gerados em
15 decorrência do baixo rendimento do processo, sendo necessária a obtenção de um volume considerável para aplicação na etapa cromatográfica subsequente.

As frações C5, C6 e C7, ativas, originárias da última etapa de cromatografia foram eluídas em, aproximadamente, 78%, 80% e 83% de acetonitrila, respectivamente, revelando o caráter hidrofóbico da(s) substância(s) presente(s) nas mesmas.

20 A massa molecular da(s) substância(s) presente(s) no extrato bruto e nas frações C2 a C6, oriundas da primeira etapa de cromatografia de fase reversa, foram estimadas pela técnica de SDS-PADE e revelação *in situ*. Observou-se a presença de bandas de inibição da amostra reveladora em uma altura próxima à banda de 10 kDa do padrão empregado, para diferentes volumes de extrato bruto. Em relação às frações
25 ativas, pequenas zonas de inibição da amostra reveladora, equivalentes a massa molecular de 7 kDa, foram verificadas em todas as frações.

As frações C5, C6 e C7, ativas, originárias da última etapa de cromatografia, foram analisadas por espectrometria de massa. Dentre elas, destaca-se a fração C6, que apresentou apenas dois íons, de, aproximadamente, 7,2 e 8,3 kDa. As massas
30 moleculares das substâncias foram compatíveis com aquelas estimadas por SDS-PAGE e teste de atividade *in situ*. Os dímeros observados no perfil do espectro não estão presentes no material *in natura*, sendo, portanto, um artefato do aparelho.

O *pool* da fração C6 (quarta “recromatografia”) não gerou frações ativas, possivelmente devido ao pequeno volume de material aplicado. Portanto, a escassez de material inviabilizou a realização de uma nova etapa de “recromatografia”, na tentativa de separar as duas moléculas.

- 5 Baseando-se nos dados obtidos no analisador de massas, conclui-se que não foi possível purificar a substância com atividade antibacteriana. Conseqüentemente, não há como afirmar qual das duas massas moleculares presentes na fração C6 representa a molécula ativa. Devido à baixa concentração do material, não foi possível fragmentar as moléculas e obter a possível sequência de aminoácidos.
- 10 Considerando o exposto, com base no conjunto de dados obtidos, acredita-se que a(s) substância(s) antimicrobiana(s) produzida(s) por *A. baumannii* assemelham-se às microcinas produzidas por bactérias Gram negativas, apesar de algumas diferenças terem sido observadas. Dentre as principais características que nos remeteram a esta conclusão, ressaltam-se, espectro restrito de ação, massa
- 15 molecular inferior a 10 kDa, termoestabilidade, hidrofobicidade e resistência a valores extremos de pH (GILLOR; NIGRO; RILEY, 2005).

7 SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

- 5 • Os resultados indicam que a amostra de *A. baumannii* 397 é capaz de produzir substância(s) antibacteriana(s), ativa(s) contra amostras filogeneticamente relacionadas, similar à definição clássica de bacteriocinas.
- A exclusão de fatores que poderiam interferir na interpretação dos resultados sugere que o antagonismo expresso por *A. baumannii* seja devido à síntese de substância(s) de natureza proteica.
- 10 • A técnica de precipitação ácida foi a única metodologia que possibilitou a extração da(s) substância(s) antibacteriana(s) sintetizada(s) pela amostra de *A. baumannii* em estudo e a manutenção da atividade da(s) mesma(s).
- A amostra de *A. baumannii* selecionada para o estudo exibiu atividade antagonista contra amostras multiressistentes da bactéria, o que demonstra
15 potencial de aplicação prática da substância.
- O extrato bruto apresentou estabilidade quando submetido a tratamentos térmicos, manteve-se ativo frente a uma ampla faixa de pH e diversos solventes orgânicos.
- O extrato bruto foi inativado por proteases, confirmando sua natureza
20 proteica.
- A comparação dos valores de CIM e CBM revelou que a(s) substância(s) antimicrobiana(s) estudada(s) desempenha(m) ação bactericida contra *A. baumannii* 294.
- Os resultados obtidos durante a etapa de purificação do extrato bruto
25 sugerem a presença de duas substâncias. Entretanto, não se pode afirmar que ambas apresentem atividade antagonista. A(s) substância(s) apresenta(m) natureza proteica e caráter hidrofóbico.
- Os dados obtidos por meio de SDS-PAGE e espectrometria de massa indicam
30 que as substâncias antibacterianas parcialmente purificadas apresentam massa molecular próxima a 7 kDa (7,2 e 8,3 kDa).

- O protocolo de purificação desenvolvido não foi eficiente para a separação da(s) substância(s) presente(s) no extrato bruto. Portanto, é necessário que o mesmo seja otimizado, para obtenção da(s) substância(s) purificada(s), ativa(s) e com melhor rendimento.
- 5
- A(s) substância(s) expressa(s) por *A. baumannii* 397 assemelham-se às microcinas produzidas pelas bactérias Gram negativas, devido a algumas características, tais como, espectro de ação restrito, massa molecular inferior a 10 kDa, termoestabilidade, hidrofobicidade e resistência a valores extremos de pH.

10

Considera-se que os dados obtidos nesta investigação sejam promissores. A perspectiva de descrição de substância com atividade antibacteriana ativa contra *A. baumannii*, bactéria de enorme relevância clínica e marcadamente multirresistente a drogas antimicrobianas é bastante atraente. Considerando a escassez de estudos

15 referentes ao assunto e a relevância do tema, dev-se dar prosseguimento à esta linha de pesquisa, visando à purificação e à caracterização mais detalhada da substância. Isso permitirá compreender melhor seu potencial de aplicação prática.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 5 AASEN, I. M. *et al.* Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 53, n. 2, p. 159-166, 2000.
- ABBOTT, I. *et al.* Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, v. 11, n. 4, 2013.
- 10 AMRAOUI, B. E. *et al.* Antifungal and antibacterial activity of marine microorganisms. *Ann. Pharm. Fr.*, v. 72, p. 107-11, 2014.
- ANDREWS, H. J. *Acinetobacter* bacteriocin typing. *J. Hosp. Infect.*, v. 7, p. 169-175, 1986.
- 15 APOLÔNIO, A. C. M. *et al.* Production of antagonistic substance by *Eikenella corrodens* isolated from the oral cavity of human beings with and without periodontal disease. *J. Appl. Microbiol.*, v. 103, n. 1, p. 245-251, 2007.
- APOLÔNIO, A. C. M. *et al.* Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by *Eikenella corrodens*. *J. Appl. Microbiol.*, v. 104, n. 2, p. 508-514, 2008.
- 20 APOLÔNIO, A. C. M. *Extração, purificação e caracterização de bacteriocina produzida por Eikenella corrodens*. 2009. 116f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
- AVELAR, K. E. S. *et al.* Production of bacteriocin by *Bacteroides fragilis* and partial characterization. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 29, p. 264-268, 1999.
- 25 BAINDARA, P. *et al.* Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample. *AMB Express*, v. 3, n. 1, 2013.
- BAUMANN, P. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J. Bacteriol.*, v. 96, n. 1, p. 39-42, 1968.

- BAUMANN, P.; DOUDOROFF, M.; STANIER, R. Y. A study of the *Moraxella* Group II. Oxidative-negative species (Genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol.*, v. 95, n. 5, p. 1520-1541, 1968.
- 5 BAYGLOO, N. S. *et al.* Identification of genomic species of *Acinetobacter* isolated from burns of ICU patients. *Arch. Iran. Med.*, v. 18, n. 10, p. 638-642, 2015.
- BARTUAL, S. G. *et al.* Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 9, p. 4382-4390, 2005.
- 10 BENMECHERNENE, Z. *et al.* Recent patents on bacteriocins: food and biomedical applications. *Recent Pat. DNA Seq.*, v. 7, n. 1, p. 66-73, 2013.
- BERGEN, P. J. *et al.* Optimizing polymyxin combinations against resistant Gram-negative bacteria. *Infect. Dis. Ther.*, v. 4, n. 4, p. 391-415, 2015.
- 15 BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 9, p. 148-165, 1996.
- BOOTH, S. J.; JOHNSON, J. L.; WILKINNS, 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. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 11, n. 4, p. 718-724, 1977.
- 20 BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter Iwoffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 36, n. 2, p. 228-240, 1986.
- 25 BRADFORD, M.M. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-54, 1976.
- BRITTON, H. T. S.; ROBINSON, R. A. *J. Chem. Soc.*, 1931.
- CAMARGOS-DE-MORAIS, M. M. *et al.* Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 19, p. 191-194, 2003.

- CAMPISTANY, A. G. *et al.* Tryptophan-containing lipopeptide antibiotics derived from polymyxin B with activity against Gram positive and Gram negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1858, n. 2, p. 333-343, 2016.
- CAROLISSEN-MACKAY, V.; ARENDSE, G.; HASTINGS, J. W. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 5 34, n. 1-16, 1997.
- CHAN, J. Z. M. *et al.* Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. *BMC Microbiol.*, v. 12, p. 2-11, 2012.
- CHAVAN, M. A.; RILEY, M. A. Molecular Evolution of Bacteriocins in Gram-Negative. Bacteria, In: RILEY, M. A.; CHAVAN, M. A. Bacteriocins: *Ecology and Evolution*. Heidelberg, Germany, 2007, p. 5-18.
- CISNEROS, J. M.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin. Microbiol. Infec.*, v. 8, n. 11, p. 687-693, 2002.
- CLEVELAND, J. *et al.* Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico: norma aprovada – sexta edição*. CLSI document M7-A6 (ISBN 20 1 – 56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Wayne. USA, v. 23, n. 2, 2003.
- COOPER, D. G. *et al.* Enhanced production of surfactin *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 42, n. 3, p. 408-412, 1981.
- COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. R. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005.
- COTTER, P. D. Bioengineering: a bacteriocin perspective. *Bioengineered*, v. 3, n. 6, p. 313-319, 2012.
- COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics?. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 11, n.2, p. 95-105, 2013.

- CUPPELS, D. A.; HANSON, R. S.; KELMAN, A. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by *Pseudomonas solanacearum*. *J. Gen. Microbiol.*, v. 109, p. 295-303, 1978.
- DEVI, S. M.; HALAMI, P. M. Detection and characterization of Pediocin PA-1/AcH like bacteriocin producing lactic acid bacteria. *Curr. Microbiol.*, v. 63, n. 2, p. 181-185, 2011.
- DOBSON, A. *et al.* Bacteriocin production: a probiotic trait?. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 78, n.1, p. 1-6, 2012.
- ECKER, J. A. *et al.* Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, n. 8, p. 2921-2932, 2006.
- EL-SHAZLY, S. *et al.* Molecular epidemiology and characterization of multiple drug-resistant (MDR) clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Infect. Dis.*, v. 41, p. 42-49, 2015.
- EUZÉBY, J. P. Classification of domains and phyla – hierarchical classification of prokaryotes. *List of prokaryotic names with standing in nomenclature: 2015a*. Disponível em: <http://www.bacterio.net/-classifphyla.html#Proteobacteria>. Acesso em: 10 de dezembro de 2015.
- _____. Genus *Acinetobacter*. *List of prokaryotic names with standing in nomenclature: 2015b*. Disponível em: <http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>. Acesso em: 17 de dezembro de 2015.
- FARIAS, L. M. *et al.* Bacteriocin-like activity of *Bacteroides fragilis* group isolated from marmosets. *Res. Microbiol.*, v. 143, n. 2, p. 151-159, 1992.
- FARIAS, L. M. *et al.* Extraction, partial purification and characterization of a bacteriocin (fragicillin) produced by a strain of *Bacteroides fragilis* isolated from *Callithrix penicillata*. *Res. Microbiol.*, v. 145, p. 9-16, 1994.
- FAO/WHO. *Report of a joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London, Ontario, Canada, 2002.
- FOURNIER, P. E.; RICHET, H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin. Infect. Dis.*, v. 42, n. 5, p.692-699, 2006.

- FRANÇA, R. O. *Fatores de virulência de amostras clínicas de Acinetobacter baumannii: caracterização fenotípica e genotípica e análise da interferência destes fatores na evolução e resolução dos processos*. 2014. 117f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
- FRENCH, G. L. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections – the potential role of daptomycin. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 58, n. 6, p. 1107-1117. 2006.
- GALVEZ, A. *et al.* Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 120, n. 1-2, p. 51-70, 2007.
- GILARDI, G. L. Morphological and biochemical differentiation of *Achromobacter* and *Moraxella* (DeBord's tribe *Mimeae*). *Appl. Microbiol.*, v. 16, n. 1, p. 33-38, 1968.
- GILLOR, O.; NIGRO, L. M.; RILEY, M. A. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Curr. Pharm. Des.*, v. 11, p. 1067-1075, 2005.
- GOTTLER, L. M.; RAMAMOORTHY, A. Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan – A highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1788, n. 8, p. 1680-1686, 2009.
- GUZEL, C. B. *et al.* Potential synergy activity of the novel ceragenin, CSA-13, against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from bacteremia patients. *Biomed. Res. Int.*, p. 1-5, 2014.
- HAMADA, S.; OOSHIMA, T. Production and properties of bacteriocins (mutacins) from *Streptococcus mutans*. *Archs. Oral Biol.*, v. 20, n. 10, p. 641-648, 1975.
- HAMMOUDI, D.; MOUBARECK, C. A.; SARKIS, D. K. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J. Microbiol. Methods*, v. 107, p. 106-118, 2014.
- HAYES, T. H.; CUNDY, K. R.; FERNANDES, P. B. Purification and Characterization of a Bacteriocin from *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.*, v. 155, p. 1171-1177, 1983.
- HENRIKSEN, S. D. *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. *Bacteriol. Rev.*, v. 37, n. 4, p. 522-561, 1973.

- JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, v. 59, n. 2, p. 171-200, 1995.
- JOSHI, S. G.; LITAKE, G, M. *Acinetobacter baumannii*: an emerging pathogenic threat to public health. *World J. Clin. Infec. Dis.*, v. 3, n. 3, p. 25-36, 2013.
- 5 KÉKESSY, D. A.; PIGUET, J.D. New method for detecting bacteriocin production. *Appl. Microbiol.*, v. 20, n. 2, p. 282-283, 1970.
- KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, v. 70, n. 3, p. 337-349, 1988.
- LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr. Opin. Coll. Inter. Sci.*, v.7, p. 12-20, 2002.
- 10 LAPORT, M. S. *et al.* Antimicrobial activity of marine sponges against coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.*, v. 155, n. 2-4, p. 362-368, 2012.
- LEE, K. H.; KIM, K. W.; RHEE, K. H. Identification of *Streptomyces* sp. KH29, which produces an antibiotic substance processing an inhibitory activity against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 20, n. 12, p. 1672-1676, 2010.
- 15 LEVISON, M. E.; LEVISON, J. H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, v. 23, n. 4, p.791-815, 2009.
- 20 LING, H. *et al.* A predicted S-type pyocin shows a bactericidal activity against clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates through membrane damage. *FEBS Lett.*, v. 584, p. 3354-3358, 2010.
- LING, L. L. *et al.* A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, v. 517, n. 22, p. 455-459, 2015.
- 25 MA, Z. *et al.* Investigations of the genomic diversity of OXA from isolated *Acinetobacter baumannii*. *Genet. Mol. Res.*, v. 14, n. 4. p. 14711-14716, 2015.
- MACHADO, F. L. S. *et al.* Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 20, n.3, p. 441-452, 2010.
- MANCHANDANI, P. *et al.* Characterization of Polymyxin B Bio-distribution and
30 Disposition in an animal model. *Antimicrob. Agents Chemother, online*, 2015.

- MANTOVANI, H. C. *et al.* Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. *Microbiology*, v. 148, p. 3347-3352, 2002.
- MARTINS, H. S. I. *Avaliação fenotípica e molecular da resistência a antimicrobianos de amostras de Acinetobacter spp e Pseudomonas aeruginosas recuperadas de hemocultura em diferentes Hospitais de Belo Horizonte, Minas Gerais.* 2012. 147f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- MARTINS, H. S. I. *et al.* Resistance markers and genetic diversity in *Acinetobacter baumannii* strains recovered from nosocomial bloodstream infections. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 11, p. 1465-1478, 2014.
- MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by *Enterococci*. *J. Med. Microbiol.*, v. 56, p. 1581-1588, 2007.
- NAKAMURA, T. *et al.* Bacteriocin-like substance (melaninocin) from oral *Bacteroides melaninogenicus*. *Infect. Immu.*, v. 31, p. 28-32, 1981.
- NAKAYAMA, K.; TAKASHIMA, K.; ISHIHARA, H. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Mol. Microbiol.*, v. 38, p. 213-231, 2000.
- NAKANO, M. M.; MARAHIEL; M. A.; ZUBER, P. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, v. 170, n.12, p. 5662-5668, 1988.
- NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. *Braz. J. Food Technol.*, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.
- NISHIE, M.; NAGAO, J.; SONOMOTO, K. Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci.*, v. 17, n. 1, p. 1-16, 2012.
- OLIVEIRA, P. L. *Caracterização de bacteriocina sintetizada por amostra de Shigella sonnei isolada de criança com diarreia aguda.* 2013. 191f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

- ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.*, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2007.
- O'SHEA, E. F. *et al.* Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. 5 *Int. J. Food Microbiol.*, v. 152, n. 3, p. 189-205, 2012.
- PAPASTATHOPOULOU, A.; BEZIRTZOGLU, E.; LEGAKIS, N. J. *Bacterioides fragilis*: Production and sensitivity to bacteriocins. *Anaerobe*, v. 3, n. 2-3, p. 203-206, 1997.
- PARRET, A. H. A.; MOT, R. Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of 10 *Pseudomonas* and other γ -proteobacteria. *Trends Microbiol.*, v. 10, n. 3, p. 107-112, 2002.
- PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 21, n. 3, p. 538-582, 2008.
- 15 QUINES, L. K. M. *et al.* Métodos de extração de poli-hidroxicanoatos a partir de biomassa bacteriana. *Quim. Nova*, p. 1-12, 2015.
- RIBEIRO-RIBAS, R. N. *et al.* Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by an oral *Fusobacterium nucleatum* isolated. *J. Appl. Microbiol.*, v.7, p. 145-152, 2009.
- 20 RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, v. 84, n. 5-6, p. 357-364, 2002.
- ROBINSON, A. *et al.* Essential biological processes of an emerging pathogen: DNA replication, transcription, and cell division in *Acinetobacter* spp. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 74, n. 2, p. 273-297, 2010.
- 25 ROSSAU, R. *et al.* Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 41, n. 2, p. 310-319, 1991.
- SATPUTE, S. K. *et al.* Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.*, v. 30, p. 127-144, 2010.

- 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. *Anal Biochem.*, v.166, p. 368-79. 1987.
- SNYDER, A. B.; WOROBO, R. W. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *J. Sci. Food Agric.*, v. 94, p. 28-44, 2013.
- SOUSA, M. A. B. *et al.* Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of children with acute diarrhoea. *APMIS*, v. 118, p. 125-135, 2010.
- SOUSA, M. A. B. *et al.* Antagonistic activity expressed by *Shigella sonnei*: identification of a putative new bacteriocin. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 6, p. 30-35, 2013.
- SPARO, M. D. *et al.* Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. *J. Appl. Microbiol.*, v. 100, n. 1, p. 123-134, 2006.
- TIWARI, V.; ROY, R.; TIWARI, M. Antimicrobial active herbal compounds against *Acinetobacter baumannii* and other pathogens. *Front. Microbiol.*, v. 6, 2015.
- TRAN, T. T.; MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of drug resistance: daptomycin resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 1354, n. 1, p. 32-53, 2015.
- TURTON, J. F. *et al.* The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbial Lett.*, v. 258, p. 72-77, 2006.
- VALEFF, CAROLINA NICOLAI. *Extração, purificação e sequenciamento de bacteriocina produzida por Fusobacterium necrophorum*. 2011. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- VEGAS, E. Z. S.; NIEVES, B. *Acinetobacter* spp.: aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, v. 25, p. 64-71, 2005.
- WALSTAD, D. L.; REITZ, R. C.; SPARLING, P. F. Growth inhibition among strains of *Neisseria gonorrhoeae* due to production of inhibitory free fatty acid and lysophosphatidylethanolamine: absence of bacteriocins. *Infect Immun.*, v. 10, n. 3, p. 481- 488, 1974.

- WOODFORD, N. *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 27, p. 351-353, 2006.
- YAMAMOTO, Y. *et al.* Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 69, n. 10, p. 5746-5753, 2003.
- 5 YANG, R.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 58, n. 10, p. 3355-3359, 1992.
- 10 ZAVASCKI, A. P. *et al.* Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 60, n. 2, p. 1206-1215, 2007.