

**NATÁLIA ROCHA GUIMARÃES**

**ATIVIDADE ANTAGONISTA DE *Bacteroides fragilis***

**Belo Horizonte**

**2013**

Natália Rocha Guimarães

Atividade antagonista de *Bacteroides fragilis*

Monografia 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 Especialista em Microbiologia.

Orientadora: Paula Prazeres Magalhães

Coorientador: Luiz de Macêdo Farias

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios  
Departamento de Microbiologia  
Instituto de Ciências Biológicas  
UFMG

Belo Horizonte

2013

## AGRADECIMENTOS

A Deus, 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 e dedicação, abdicando, muitas vezes, dos seus sonhos em função dos meus.

Aos meus orientadores, Professora Paula e Professor Luiz, por conceder-me a oportunidade de fazer parte deste grupo tão renomado de pesquisa e pela confiança em permitir que desenvolvesse meu próprio projeto. Além disso, gostaria de agradecer-lhes o 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. Obrigada!

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 e meio de caminhada.

À Amanda, 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.

À Patrícia, à Jaqueline e ao João Fernando, pelos constantes ensinamentos ao longo desta jornada, sanando diversas dúvidas e contribuindo para a realização dos meus objetivos. À Patrícia, em especial, por ajudar-me nos momentos de dificuldade e incertezas, incentivando-me sempre.

A todos os amigos do Laboratório MOA, pela harmônica e animada convivência, sendo importantes “válvulas de escape” nos momentos de cansaço e desânimo.

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

"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 TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
3 INTRODUÇÃO	11
1.1 Microbiota intestinal indígena	11
1.2 <i>Bacteroides</i>	14
1.3 <i>Bacteroides fragilis</i>	16
1.4 Bacteriocinas	18
1.4.1 Histórico	18
1.4.2 Conceito e características	19
1.4.3 Potencial biotecnológico e papel ecológico das bacteriocinas	20
1.4.4 Bacteriocinas sintetizadas por <i>B. fragilis</i>	22
4 JUSTIFICATIVA	24
5 OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo geral	26
5.2 Objetivos específicos	26
6 MATERIAL E MÉTODOS	27
6.1 Origem e manutenção das amostras	27
6.2 Pesquisa de atividade antagonista	28
6.3 Pesquisa de fatores de interferência	29
6.3.1 Bacteriófagos	29
6.3.2 Ácidos graxos	30
6.3.3 Clorofórmio	30
6.3.4 Peróxido de hidrogênio	30
6.4 Extração proteica	31
6.5 Avaliação e titulação da atividade antagonista das frações proteicas	32
6.6 Caracterização da fração C30 - enzima proteolítica	32

7	RESULTADOS	34
5.1	Pesquisa de atividade antagonista - <i>screening</i> e seleção das amostras produtora e reveladora para as etapas subsequentes do estudo	34
5.2	Espectro de ação antagonista da amostra <i>B. fragilis</i> D51	41
5.3	Detecção de fatores de interferência	41
5.3.1	Bacteriófagos	41
5.3.2	Ácidos graxos	43
5.3.3	Clorofórmio	43
5.3.4	Peróxido de hidrogênio	43
5.4	Teste de atividade das frações proteicas intracelulares	43
5.5	Avaliação e titulação da atividade antagonista da fração C30	48
5.6	Caracterização da fração C30 - enzima proteolítica	48
8	DISCUSSÃO	51
9	SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES	56
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Espectro de ação das amostras de <i>Bacteroides fragilis</i> , D111.4, 51 e D51 - método de sobrecamada, BHIA-S, pH 7,2.	35
Tabela 2	Atividade antagonista das amostras de <i>Bacteroides fragilis</i> , D111.4, 51 e D51 - método de sobrecamada, BHIA-S, pH 6,5.	37

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Atividade antagonista das amostras <i>Bacteroides fragilis</i> D51, 51 e D111.4, isoladas de infecções intra-abdominais, em pH 7,2.	36
Figura 2.	Atividade isoantagonista das amostras <i>Bacteroides fragilis</i> D51, 51 e D111.4, isoladas de infecções intra-abdominais, contra amostra <i>B. fragilis</i> ATCC 25285.	38
Figura 3.	Atividade antagonista das amostras <i>Bacteroides fragilis</i> D51, 51 e D111.4, isoladas de infecções intra-abdominais, em pH 6,5.	39
Figura 4.	Atividade isoantagonista da amostra <i>B. fragilis</i> D51, isolada de infecção intra-abdominal, contra a amostra <i>B. fragilis</i> ATCC 25285.	40
Figura 5.	Avaliação da presença de bacteriófagos.	42
Figura 6.	Avaliação da presença de ácidos graxos.	44
Figura 7.	Avaliação da interferência de clorofórmio.	45
Figura 8.	Avaliação da presença de peróxido de hidrogênio.	46
Figura 9.	Teste de atividade e titulação da fração C30.	47
Figura 10.	Sensibilidade do extrato C30 a proteinase K.	49
Figura 11.	Controle da atividade enzimática (proteinase K) sobre extrato proteico com atividade antibacteriana (OLIVEIRA, 2013).	50



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP: Adenosina trifosfato

BHI: *Brain Heart Infusion*

BHIA-S: *Brain Heart Infusion Agar* suplementado

BHI-S: Brain Heart Infusion suplementado

C30: Fração proteica intracelular precipitada com 30% de sulfato de amônio

C50: Fração proteica intracelular precipitada com 50% de sulfato de amônio

C80: Fração proteica intracelular precipitada com 80% de sulfato de amônio

DNA: Ácido desoxirribonucleico

MRS: *Lactobacilli MRS Agar*

rDNA: DNA ribossomal

RNA: Ácido ribonucleico

TSA: *Trypticase Soy Agar*

Tris-HCl: *Tris hycrochloride*

UA: Unidades arbitrárias

## RESUMO

O gênero *Bacteroides* é composto por bastonetes Gram negativos, anaeróbios obrigatórios, membros da microbiota indígena de seres humanos e outros animais. O grupo é frequentemente recuperado de processos infecciosos, principalmente intra-abdominais. Dentre as diversas espécies incluídas no gênero, destaca-se *Bacteroides fragilis*, espécie frequentemente recuperada de espécimes clínicos, capaz de expressar uma ampla gama de habilidades de virulência e multirresistência a drogas antimicrobianas. Diversos microrganismos são capazes de expressar substâncias antimicrobianas de natureza proteica, denominadas bacteriocinas, relevantes do ponto de vista ecológico e com grande potencial de aplicação biotecnológico. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana de *B. fragilis*, mais especificamente, pesquisar o espectro de ação antagonista e extrair uma substância proteica antagonista. A expressão de antagonismo foi avaliada pelo método de difusão em sobrecamada, empregando-se, como reveladoras, 19 amostras de bactérias membros da microbiota intestinal indígena ou enteropatogênicas. Dentre os 57 testes realizados, nove apresentaram resultados positivos, sendo observados isoantagonismo e heteroantagonismo. Dentre as três amostras produtoras testadas, selecionou-se aquela com espectro de ação mais amplo, *B. fragilis* D51, para as etapas subsequentes do estudo. A exclusão de fatores interferentes, quais sejam bacteriófagos, ácidos graxos, clorofórmio e peróxido de hidrogênio, sugeriu a síntese de substância antagonista tipo bacteriocina. A amostra produtora foi submetida a extração proteica por precipitação com concentrações crescentes de sulfato de amônio, obtendo-se as frações intracelulares C30, C50 e C80. Apenas C30 expressou antagonismo; o título de atividade foi 800 UA/mL. O extrato C30 foi inativado pelo tratamento com proteinase K, confirmando sua natureza proteica. Os resultados demonstram a expressão de substância(s) antagonista(s) de natureza proteica por *B. fragilis*. Considerando a relevância do tema e a escassez de resultados referentes a ele, a continuação do desenvolvimento do estudo parece-nos oportuna e desejável.

Palavras-chave: bacteriocinas, *Bacteroides*, *Bacteroides fragilis*, microbiota intestinal

## ABSTRACT

The genus *Bacteroides* includes Gram negative rods, obligate anaerobes, considered to be as members of the indigenous microbiota of humans and other animals. They are often recovered from infectious processes, mainly of intra-abdominal origin. Among *Bacteroides* species, *Bacteroides fragilis* should be highlighted considering that it is commonly recovered from clinical specimens, expresses several virulence abilities and frequently exhibits antimicrobial resistance. The ability to synthesize bacteriocins is widely spread among bacteria. We aimed to evaluate the expression of antibacterial activity by *B. fragilis*, including the investigation of the antagonistic activity spectrum and the extraction of a proteinaceous antagonistic substance. Antagonistic expression was evaluated by the double layer method. A total of 19 bacterial isolates, members of the intestinal microbiota or enteropathogens were included as indicator strains. Among the 57 tests conducted nine gave positive results. Isoantagonistic and heteroantagonistic activity were detected. One of the three test strains, *B. fragilis* D51, was selected for further steps of the investigation. Interfering factors were excluded suggesting the expression of a bacteriocin. The producer strain was submitted to protein extraction and among the intracellular fractions obtained only C30 expressed antagonistic activity (800 AU/mL). C30 lost its activity following treatment with proteinase K confirming its proteinaceous nature. Taken into consideration the relevance of the theme as well as the scarcity of data regarding this subject we believe that this investigation should be continued in order to allow a better understanding about *B. fragilis* virulence and bacteriocins relevance.

Key words: bacteriocins, *Bacteroides*, *Bacteroides fragilis*, gut microbiota.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MICROBIOTA INTESTINAL INDÍGENA

Ao nascer, o ser humano apresenta-se desprovido de microrganismos. Entretanto, logo após o nascimento, inicia-se a formação das comunidades microbianas indígenas (BLASER; FALKOW, 2009). Esta formação é dinâmica e influenciada por diversos fatores, principalmente pela exposição materna (tipo de parto e amamentação) e ambiental (BARBOSA; RESCIGNO, 2010; KELLY; KING; AMINOV, 2007; MSHVILDADZE; NEU, 2010). A composição desta microbiota vai sofrendo mudanças evolutivas ao longo da vida, estando relacionada diretamente com a dieta e fatores ambientais e genéticos (BLASER; FALKOW, 2009).

A microbiota indígena apresenta uma grande diversidade. Porém, apenas quatro dos cerca de 50 filos bacterianos identificados no ambiente fazem parte da microbiota indígena de seres humanos, quais sejam, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria (BIK, 2009; BLASER; FALKOW, 2009). Fazem parte da microbiota dominante da pele e das mucosas e acredita-se que esta dominância esteja relacionada à pressão seletiva advinda de anos de evolução (BLASER; FALKOW, 2009). Alguns autores incluem, ainda, o filo Verrumicrobia (SANTOS; MULLER; VOS, 2010; VRIEZE *et al.*, 2010).

Dentre os diversos sítios anatômicos que albergam microrganismos, destaca-se o trato intestinal, ambiente densamente colonizado, no qual se observa uma complexa comunidade microbiana (FLINT *et al.*, 2007). A microbiota intestinal apresenta composição microbiana diversificada (LEE; MAZMANIAN, 2010), com constituição distinta ao longo de sua extensão.

Em termos quantitativos, o intestino delgado, mais precisamente a região do duodeno, abriga em torno de  $10^1$  a  $10^5$  bactérias, o jejuno aproximadamente  $10^3$  a  $10^5$  bactérias e o íleo em torno de  $10^8$  bactérias, valores estimados por grama de conteúdo intestinal. O intestino grosso, representado pelo cólon, é a porção mais

densamente colonizada, albergando cerca de  $10^{11}$  a  $10^{12}$  bactérias/g de conteúdo intestinal (CANNY; MCCORMICK, 2008; LESER; MOLBAK, 2009). Isto deve-se, principalmente, ao tempo de trânsito intestinal elevado, que dura em torno de 10 a 20 h (SANTOS; MULLER; VOS, 2010), disponibilidade de nutrientes e valores de pH próximos ao neutro (ROBERFROID *et al.*, 2010).

Os filos Firmicutes e Bacteroidetes dominam a microbiota intestinal dos mamíferos, representando cerca de 80% dos filotipos isolados. Apesar de a microbiota intestinal incluir um número reduzido de filos, a diversidade de gêneros e espécies é imensa (LESER; MOLBAK, 2009). O intestino grosso abriga, aproximadamente, 50 gêneros conhecidos e 500 espécies distintas. Dentre as principais bactérias recuperadas do cólon, destacam-se os anaeróbios obrigatórios, em especial, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* e *Clostridium*. *Bacteroides* é o gênero dominante, representando cerca de 20 a 30% das espécies isoladas do cólon (CANNY; MCCORMICK, 2008; SALYERS; GUPTA; WANG, 2004). Destaca-se, ainda, o gênero *Lactobacillus* (CANNY; MCCORMICK, 2008).

Alguns estudos apontam a relação existente entre a dieta e as populações bacterianas presentes no intestino grosso. O tipo e a quantidade de carboidratos ingeridos promovem a redução do pH do lúmen intestinal, influenciando o metabolismo e a competição bacteriana, o que favorece algumas populações específicas (FLINT *et al.*, 2007). Além disto, a ingestão de alimentos caracteriza-se como uma das principais formas de exposição a microrganismos (LESER; MOLBAK, 2009). Porém, fatores fisiológicos relacionados ao hospedeiro também alteram este cenário (FLINT *et al.*, 2007).

A microbiota intestinal exerce inúmeras funções benéficas para o hospedeiro, fato comprovado por estudos comparativos que incluíam grupos de animais isentos de germes e convencionais. Dentre elas, destacam-se o estímulo ao desenvolvimento do sistema imune de mucosas (CANNY; MCCORMICK, 2008; LEE; MAZMANIAN, 2010), a síntese de vitaminas, como K e do complexo B (BIK, 2009), folatos e ácidos graxos de cadeia curta, o desenvolvimento epitelial e a metabolização de carboidratos não digeridos pelo organismo. Ainda, a microbiota indígena protege o hospedeiro contra microrganismos exógenos potencialmente

patogênicos (MARTÍN *et al.*, 2013), por exemplo, por meio da síntese de substâncias antimicrobianas, da interferência na adesão dos organismos à superfície da mucosa e da competição por nutrientes (BARBOSA; RESCIGNO, 2010). Em contrapartida, o hospedeiro oferece às bactérias endógenas um ambiente estável e nutrientes (MARTÍN *et al.*, 2013). A alteração da composição da microbiota indígena, inclusive intestinal, pode resultar no aparecimento de doenças (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

A mucosa intestinal permite a comunicação entre o sistema imune e o ambiente externo. A colonização microbiana desta mucosa afeta diretamente o desenvolvimento e composição do sistema imune intestinal. Dados demonstram que animais isentos de germes apresentam baixa concentração de células do sistema imune e, conseqüentemente, de anticorpos, principalmente quando comparados com animais normalmente colonizados (CHUNG; KASPER, 2010). Segundo Cerf-Bensussan & Gaboriau-Routhiau (2010), as células epiteliais do intestino exercem papel fundamental na resposta imune intestinal, pois expressam receptores envolvidos na interação microrganismo/mucosa. Estes receptores, quando ativados, desencadeiam uma série de sinalizações intracelulares, estimulando a síntese de substâncias antimicrobianas e de outros produtos. Estas substâncias controlam a densidade bacteriana na superfície da mucosa intestinal, oferecendo proteção adicional contra a invasão do epitélio (CHUNG; KASPER, 2010; HANSEN; GULATI; SARTOR, 2010).

Ainda, interações entre microrganismos, epitélio e tecido linfóide associado ao intestino estão diretamente envolvidas na modulação dos mecanismos de estímulo e desenvolvimento da memória imunológica (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

Estudos mais abrangentes têm demonstrado a associação entre desequilíbrio da microbiota intestinal e desenvolvimento de obesidade, bem como aparecimento de doenças relacionadas do estilo de vida, como diabetes e doenças cardiovasculares (CHUNG; KASPER, 2010; LESER; MOLBAK, 2009; VRIEZE *et al.*, 2010). Evidências sugerem que a microbiota intestinal afeta a obtenção de nutrientes e a regulação energética (DIBAISE *et al.*, 2008).

A obesidade está associada a uma alteração na composição e função metabólica da microbiota intestinal, porém processos patológicos e fisiológicos relacionados a esta mudança ainda não foram bem elucidados (TILG; MOSCHEN; KASER, 2009; VRIEZE *et al.*, 2010). Sabe-se que a microbiota intestinal de indivíduos obesos apresenta redução percentual de Bacteroidetes e aumento de Firmicutes se comparada com a de indivíduos incluídos na faixa de peso considerada normal (DIBAISE *et al.*, 2008; LESER; MOLBAK, 2009).

Deve ser ressaltado que a associação existente entre a mucosa intestinal e a microbiota indígena é de suma importância para a manutenção do equilíbrio intestinal e proteção contra a invasão e possíveis danos causados por patógenos (BARBOSA; RESCIGNO, 2010).

## 1.2 *Bacteroides*

O gênero *Bacteroides* está incluído no filo Bacteroidetes, classe Bacteroidetes, ordem Bacteroidales e família Bacteroidaceae (JAPANESE SOCIETY OF CHEMOTHERAPY COMMITTEE ON GUIDELINES FOR TREATMENT OF ANAEROBIC INFECTIONS; JAPANESE ASSOCIATION FOR ANAEROBIC INFECTION RESEARCH, 2011). Os representantes do gênero são bastonetes Gram negativos pleomórficos, anaeróbios obrigatórios, aerotolerantes, resistentes à bile, sacarolíticos e imóveis (SALYERS, 1984; WEXLER, 2007).

As espécies de *Bacteroides* compõem a microbiota indígena do intestino de seres humanos e de outros animais, iniciando a colonização cerca de 10 dias após o nascimento. Correspondem a, aproximadamente, 30% das bactérias presentes no cólon (SALYERS, 1984; SALYERS; GUPTA; WANG, 2004; WICK; SEARS, 2010), sendo, portanto, os microrganismos mais abundantes neste sítio (COYNE, 2008). Características como baixo teor de oxigênio e baixo potencial de oxirredução favorecem a colonização pelo microrganismo (ROCHA; SMITH, 2013).

São descritos como simbioses, pois, favorecem o estado nutricional e imunológico do hospedeiro, bem como se beneficiam do mesmo (HUANG; LEE; MAZMANIAN, 2011; WICK; SEARS, 2010). Entretanto, o caráter anfibiótico do grupo está muito bem determinado. São reconhecidos como patógenos oportunistas importantes, associados à etiopatogenia de diversos quadros, em especial quando presentes em outros sítios anatômicos do corpo, principalmente em decorrência do rompimento de barreira (WICK; SEARS, 2010). Dentre as principais doenças relacionadas a representantes do gênero *Bacteroides*, destacam-se as infecções intra-abdominais. O organismo também está frequentemente envolvido na formação de abscessos e bacteremia (GAUS *et al.*, 2012; WICK; SEARS, 2010).

O gênero *Bacteroides* vem sofrendo extensas modificações taxonômicas nos últimos anos, com a inserção e exclusão de diversas espécies. Estas alterações decorrem da análise comparativa do sequenciamento do rDNA 16S, que permite agrupar os microrganismos com base em similaridade genética (SONG *et al.*, 2004; WEXLER, 2007). Várias espécies anteriormente classificadas como *Bacteroides* foram alocadas em novos gêneros, como *Parabacteroides* (SAKAMOTO; BENNO, 2006), *Porphyromonas* e *Prevotella* (JAPANESE SOCIETY OF CHEMOTHERAPY COMMITTEE ON GUIDELINES FOR TREATMENT OF ANAEROBIC INFECTIONS; JAPANESE ASSOCIATION FOR ANAEROBIC INFECTION RESEARCH, 2011).

Atualmente, o gênero limita-se ao antigo grupo *Bacteroides fragilis*, abrigando 19 espécies, quais sejam *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides nordii*, *Bacteroides salyersiae*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides eggerthii*, *Bacteroides splanchnicus*, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides finegoldii*, *Bacteroides coprocola*, *Bacteroides dorei*, *Bacteroides intestinalis*, *Bacteroides massiliensis*, *Bacteroides plebeius*, *Bacteroides capillosus*, *Bacteroides ureolyticus*. A proposta de exclusão das espécies *B. capillosus* e *B. ureolyticus* do gênero vem sendo considerada (JAPANESE SOCIETY OF CHEMOTHERAPY COMMITTEE ON GUIDELINES FOR TREATMENT OF ANAEROBIC INFECTIONS; JAPANESE ASSOCIATION FOR ANAEROBIC INFECTION RESEARCH, 2011).



Dentre as espécies previamente incluídas no grupo *B. fragilis*, observa-se predomínio de *Bacteroides vulgatus* e *Bacteroides thetaiotaomicron* na microbiota intestinal indígena (SALYERS, 1984). Entretanto, a espécie *B. fragilis* é a que mais se destaca, sendo, frequentemente, recuperada de espécimes clínicos. Sua ocorrência como patógeno está relacionada, principalmente, à sua maior virulência (MERINO *et al.*, 2011).

### 1.3 *Bacteroides fragilis*

A espécie *B. fragilis* foi descrita por Veillon & Zuber, em 1898, e denominada, na época, *Bacillus fragilis*. Entretanto, Castellani & Chalmers, em 1919, transferiram a espécie para o gênero *Bacteroides*, visto que a mesma não apresentava colônias pigmentadas e fluorescentes (CATO; JOHNSON, 1976).

De acordo com Wexler (2007), *B. fragilis* corresponde a cerca de 0,5% dos microrganismos cultiváveis da microbiota intestinal indígena (WEXLER, 2007), mais precisamente, de espécimes obtidos do cólon e aderidos à mucosa intestinal (HUANG; LEE; MAZMANIAN, 2011). Outros autores acreditam que este percentual seja mais elevado, equivalente a aproximadamente 1 a 2% da microbiota (GAUS *et al.*, 2012).

Como membro da microbiota intestinal, os representantes da espécie *B. fragilis* auxiliam na modulação da imunidade, devido às constantes modificações dos antígenos capsulares (LIU *et al.*, 2008). O polissacarídeo A ativa a resposta imune dependente de células T, influenciando diretamente o desenvolvimento e homeostasia do sistema imune do hospedeiro (TROY; KASPER, 2011). Além disto, atua como importante fator de prevenção e cura de doenças inflamatórias intestinais (HUANG; LEE; MAZMANIAN, 2011).

A diversidade antigênica capsular parece estar relacionada ao escape imunológico e, conseqüentemente, à adaptação às defesas do hospedeiro,

permitindo, assim, a colonização e o controle da multiplicação bacteriana (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

*B. fragilis* é considerado um importante patógeno oportunista, sendo o organismo anaeróbio obrigatório mais frequentemente isolado de espécimes clínicos (WEXLER, 2007). Corresponde a cerca de 50 a 70% dos anaeróbios recuperados de processos infecciosos (ROCHA; SMITH, 2013). Além da associação frequente entre *B. fragilis* e quadros de natureza infecciosa, como infecções intra-abdominais, abscessos e bacteremia (GAUS *et al.*, 2012; WICK; SEARS, 2010), a emergência de resistência a diversas drogas antimicrobianas tem sido relatada para a bactéria (GALVÃO; MEGGERSEE; ABRATT, 2011). As infecções associadas à espécie são desencadeadas, via de regra, pela transferência do microrganismo do intestino para outros sítios, em decorrência, principalmente, de cirurgias ou traumas (NDAMUKONG; GEE; SMITH, 2013).

Algumas amostras de *B. fragilis*, denominadas enterotoxigênicas, vêm sendo descritas como produtoras de enterotoxinas (MERINO *et al.*, 2011; MYERS *et al.*, 1987). Estão relacionadas a episódios de diarreia em seres humanos e outros animais, sobretudo jovens. Foram isoladas, também, de pacientes com bacteremia, abscessos e infecção pulmonar. Segundo Merino *et al.* (2011), cerca de 5 a 20% da população mundial são portadores assintomáticos da bactéria.

*B. fragilis* expressa diversas características que contribuem para sua ação patogênica, entre elas, a resistência ao estresse oxidativo e a aerotolerância, fatores de virulência relevantes nas infecções extraintestinais (GAUS *et al.*, 2012). Estudos têm demonstrado que a espécie é capaz de manter-se viável por até três dias em ambientes aeróbios (NDAMUKONG; GEE; SMITH, 2013).

As habilidades de virulência expressas por *B. fragilis* podem ser divididas em três categorias, quais sejam, associadas à aderência aos tecidos, à proteção contra a resposta imunológica do hospedeiro e à destruição tecidual. Como mecanismos de adesão, citam-se fímbrias e aglutininas, que permitem a aderência e estabilidade da bactéria no tecido do hospedeiro. A cápsula polissacarídica, o lipopolissacarídeo e enzimas protegem a bactéria da resposta imunológica. E, no

que se refere à destruição tecidual, a síntese de enzimas hidrolíticas pode ser mencionada (WEXLER, 2007).

## 1.4 BACTERIOCINAS

### 1.4.1 HISTÓRICO

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* (JACK; TAGG; RAY, 1995). 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 alimentar em 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).

#### 1.4.2 CONCEITO E CARACTERÍSTICAS

Em termos conceituais, bacteriocinas são definidas como um grupo diversificado de peptídeos ou proteínas, associadas ou não a lipídeos e carboidratos (AVELAR *et al.*, 1999), sintetizadas no nível ribossomal (NISHIE; NAGAO; SONOMOTO, 2012). São, habitualmente, ativas contra bactérias da mesma espécie ou do mesmo gênero da amostra produtora (COTTER, 2012). As amostras produtoras de bacteriocinas sintetizam proteínas de imunidade específicas que as tornam imunes à ação de suas próprias bacteriocinas (CLEVELAND *et al.*, 2001; COTTER; HILL; ROSS, 2005; COTTER, 2012).

A síntese de bacteriocinas tem sido relatada para várias espécies de bactérias e algumas Archaea (DOBSON *et al.*, 2012). Em termos de produção, acredita-se que 99% das bactérias sintetizam pelo menos um tipo de bacteriocina e a escassez de pesquisas nesta área dificultam o isolamento e purificação das mesmas. Estas substâncias antagonistas exibem grandes diferenças quanto ao espectro e mecanismo de ação, massa molecular e propriedades bioquímicas e genéticas (KLAENHAMMER, 1988).

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 filogeneticamente distantes da amostra produtora (COTTER; ROSS; HILL, 2013; O'SHEA *et al.*, 2012).

O espectro de ação reduzido é uma das principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos clássicos. Além disto, as bacteriocinas são sintetizadas no nível ribossomal, estimulam o sistema imune do hospedeiro, normalmente agem sobre a membrana celular bacteriana e sua toxicidade ainda não é bem conhecida. Em contrapartida, os antibióticos 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 alta toxicidade (CLEVELAND *et al.*, 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 (BENMECHERNE *et al.*, 2013). São, via de regra, sensíveis a temperaturas elevadas e à ação de proteases (APOLÔNIO *et al.*, 2007; 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; interferência direta sobre DNA, RNA e metabolismo de proteínas (COTTER; ROSS; HILL, 2013).

#### **1.4.3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E PAPEL ECOLÓGICO DAS BACTERIOCINAS**

A emergência de microrganismos resistentes a diversos antimicrobianos convencionais demonstra a necessidade de desenvolvimento e/ou busca por novos agentes para aplicação clínica. Várias alternativas estão sendo estudadas, desde compostos extraídos de plantas até peptídeos 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).

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 patógenos presentes em sítios que abrigam uma 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 patógenos clínicos resistentes aos quimioterápicos 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 e vitaminas, 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 ácido-lácticas são as mais estudadas e conhecidas, tanto no que se refere a estrutura, como a função e 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 bactérias ácido-lácticas. Apresenta atividade contra diversos patógenos, incluindo *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, entre outros patógenos. Apresenta, como mecanismos de ação, interferência na síntese de 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 bactérias ácido-lácticas, 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 plasmídeos. Apresenta atividade eficiente contra vários patógenos relacionados a infecção e intoxicação alimentar, principalmente *L. monocytogenes* (DEVI; HALAMI, 2011).

Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention*, anualmente, são reportados 76 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos nos Estados Unidos, dos quais 5000 evoluem para óbito (CLEVELAND *et al.*, 2001). Estudos têm demonstrado a possibilidade de utilização de bacteriocinas para

controle de enteropatógenos associados a infecções alimentares (AVELAR *et al.*, 1999; COTTER; ROSS; HILL, 2013).

A síntese de bacteriocinas vem sendo considerado um importante fator para seleção de espécies bacterianas com potencial probiótico. Os probióticos, segundo a Organização Mundial da Saúde, 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 patógenos (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), contribuindo para a dominância de linhagens específicas (O'SHEA *et al.*, 2012), estimular o sistema imune, comprometer a colonização por patógenos e, assim, influenciar diretamente a composição da microbiota intestinal indígena (DOBSON *et al.*, 2012).

A abp118 e a microcina C7, produzidas por *Lactobacillus salivarius* UCC118 e *E. coli*, respectivamente, são exemplos de bacteriocinas sintetizadas por microrganismos oriundos do trato intestinal. Estas substâncias apresentam espectro de ação restrito, sendo ativas contra *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Shigella flexneri* (O'SHEA *et al.*, 2012).

#### **1.4.4 BACTERIOCINAS SINTETIZADAS POR *B. fragilis***

As bacteriocinas foram as primeiras substâncias antimicrobianas caracterizadas em bactérias Gram negativas, sendo as colicinas, expressas por *Escherichia coli*, as mais conhecidas e melhor caracterizadas (CLEVELAND *et al.*, 2001).

Bacteriocinas sintetizadas por *Bacteroides* foram descritas, pela primeira vez, por Beerens & Baron, em 1965. Porém, a substância não foi caracterizada (AVELAR *et al.*, 1999). Alguns anos depois, Booth e colaboradores (1977) descreveram uma bacteriocina sintetizada pelo grupo, caracterizando-a parcialmente quanto a massa molecular e estabilidade ao calor (BOOTH; JOHNSON; WILKINS, 1977).

Em 1979, Mossie e colaboradores purificaram uma bacteriocina expressa por *B. fragilis* (MOSSIE *et al.*, 1979). Posteriormente, o mesmo grupo purificou e caracterizou uma nova bacteriocina isolada da bactéria, demonstrando sua capacidade de agir diretamente sobre a síntese de RNA bacteriano, por meio da inibição da RNA polimerase (MOSSIE *et al.*, 1981). Em 1983, Hayes e colaboradores, isolaram, caracterizaram e purificaram uma bacteriocina sintetizada por *B. fragilis*. Sua natureza proteica foi comprovada pela perda de atividade após tratamento com tripsina e proteinase K.

Avelar e colaboradores (1999) avaliaram a capacidade de diversas amostras de *B. fragilis*, isoladas de diferentes ambientes, produzirem bacteriocinas. Os resultados demonstraram que amostras oriundas de infecções intestinais frequentemente produziam bacteriocinas e eram resistentes a substâncias produzidas por amostras isoladas de outras fontes. Porém, aquelas isoladas de infecções intra-abdominais e bacteremia não produziam substâncias antagonistas e eram sensíveis a substâncias produzidas por amostras de outros ambientes. Estes resultados divergem de estudos que demonstram associação entre produção de bacteriocinas e virulência.

Farias *et al.* (1992) descreveram a capacidade de amostras do grupo *B. fragilis* isoladas da cavidade oral e intestinal de saguis sintetizarem substâncias tipo bacteriocinas. Em 1993, Miranda e colaboradores purificaram e caracterizaram parcialmente uma bacteriocina produzida por amostra de *B. ovatus* isolada de fezes de seres humanos. O mesmo grupo demonstrou, ainda, a expressão de antagonismo por 41 amostras do grupo *B. fragilis*.

Além disso, em 1994, Farias e colaboradores extraíram, caracterizaram e purificaram parcialmente uma proteína tipo bacteriocina produzida por amostra de *B. fragilis* isolada de primata da espécie *Callithrix penicillata*.



## 2. JUSTIFICATIVA

O gênero *Bacteroides* inclui bactérias anaeróbias obrigatórias consideradas membros dominantes da microbiota intestinal indígena. São microrganismos simbioses, que desempenham inúmeras funções relevantes para o hospedeiro, como estímulo ao desenvolvimento do sistema imunológico e contribuição nutricional. Por outro lado, apresentam caráter anfibiótico marcante, sendo reconhecidos como importantes patógenos oportunistas. Estão associados à etiopatogenia de diversas doenças, em especial, fora do seu sítio natural de colonização. Merece destaque *B. fragilis*, espécie mais comumente recuperada de espécimes clínicos, agente de doenças muito prevalentes e relacionadas a índices elevados de morbimortalidade.

Nos últimos anos, as espécies de *Bacteroides* vêm ganhando grande destaque, sendo alvo de vários estudos, em especial, devido à variedade de mecanismos de virulência e emergência de multirresistência a drogas antimicrobianas. Sua abundância na microbiota intestinal sugere a expressão de diversas habilidades que favorecem sua presença neste ecossistema microbiano extremamente diversificado e complexo.

Uma ampla gama de bactérias demonstra capacidade de sintetizar 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 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 bacteriocinas por *Bacteroides*, bem como sobre a influência desta habilidade na abundância do gênero no ecossistema intestinal. Considerando-se a relevância do tema, estudos na área são, certamente, desejáveis. Deve-se ressaltar, ainda, a possibilidade de aplicação

prática de bacteriocinas, tanto na indústria alimentícia, como conservante alimentar natural, como na indústria farmacêutica, como agente antimicrobiano com atividade mais restrita.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a expressão de antagonismo por *B. fragilis*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar a expressão de atividade antagonista por amostras de *B. fragilis* contra bactérias da microbiota intestinal indígena e enteropatógenos.
- Avaliar a natureza do antagonismo, pesquisando a presença de fatores interferentes e a ação de proteases.
- Obter frações proteicas intracelulares de uma amostra de *B. fragilis* que expressar antagonismo.
- Selecionar uma fração proteica ativa e titular sua atividade antagonista.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ORIGEM E MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Para avaliar a expressão de antagonismo, foram incluídas no estudo, como teste, três amostras de *B. fragilis*, denominadas D51, 51 e D111.4, pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG - LMOA), isoladas de pacientes com infecções intra-abdominais, durante projeto previamente conduzido pela nossa equipe. Como reveladoras, foram utilizadas 13 amostras bacterianas de referência, de espécies consideradas membros da microbiota intestinal indígena ou enteropatogênicas, quais sejam: *B. fragilis* ATCC 25285, *B. vulgatus* ATCC 8482, *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, *Eubacterium lentum* ATCC 25559, *Clostridium perfringens* ATCC 25723, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *E. coli* ATCC 25922, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 14028, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337 e *E. coli* K12 Row. Foram testadas, ainda, seis amostras pertencentes à bacterioteca do LMOA, *Bacteroides capsillosus* D96, *B. fragilis* D51, *B. fragilis* 51 e *B. fragilis* D111.4, isoladas de pacientes com infecções intra-abdominais e *Shigella sonnei* 157.06 e *S. sonnei* 057, recuperadas de espécimes fecais de crianças com diarreia aguda.

Todas as amostras vêm sendo mantidas em freezer -80 °C, em *Brucella Broth*<sup>1</sup> acrescido de glicerol à concentração de 10%. Para uso nos experimentos, as amostras teste foram cultivadas em *Brain Heart Infusion Agar*<sup>2</sup> suplementado com 0,5% de extrato de levedura<sup>3</sup>, 0,1% de hemina<sup>4</sup> e 0,1% de menadiona<sup>5</sup> (BHIA-S), pH 7,2. Em relação às condições de incubação, as amostras foram incubadas em

---

<sup>1</sup> BBL, Sparks, MD, EUA

<sup>2</sup> Difco, Sparks, MD, EUA

<sup>3</sup> Difco

<sup>4</sup> Inlab, São Paulo, SP, Brasil

<sup>5</sup> Inlab

jarras de anaerobiose (atmosfera: 90% N<sub>2</sub> e 10% CO<sub>2</sub>, método mecânico), a 37 °C, por 48 h.

As amostras reveladoras foram cultivadas em BHIA-S, com exceção de *E. faecalis*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. flexneri* e *S. sonnei*, cultivadas em *Trypticase Soy Agar*<sup>6</sup> (TSA), e *L. acidophilus*, cultivado em *Lactobacilli MRS Agar*<sup>7</sup> (MRS). As amostras cultivadas em BHIA-S e MRS foram incubadas em jarra de anaerobiose, a 37 °C, por 48 h e aquelas cultivadas em TSA foram incubadas em aerobiose, a 37 °C, por 24 h, com exceção de *E. faecalis*, incubado em anaerobiose, a 37 °C, por 48 h.

## 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 *Brain Heart Infusion*<sup>8</sup> suplementado com 0,5% de extrato de levedura, 0,1% de hemina e 0,1% de menadiona (BHI-S), pH 7,2, em jarra de anaerobiose, a 37 °C, por 24 h. Posteriormente, alíquotas contendo, aproximadamente, 10<sup>5</sup> células foram inoculadas, sob a forma de *spots*, em BHIA-S, pH 7,2 e 6,5, com o auxílio de replicador de *Steers*. As condições de cultivo foram as mesmas descritas acima para o meio líquido, exceto pelo tempo de incubação, elevado para 48 h. A seguir, as culturas foram expostas a vapor de clorofórmio<sup>9</sup>, por 30 min, e em seguida, entreabertas, por 30 min, para evaporação do clorofórmio residual (FARIAS *et al.*, 1992).

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 ou 48 h, em atmosfera adequada a cada amostra (ver item 4.1). As amostras (0,2

---

<sup>6</sup> Difco

<sup>7</sup> Difco

<sup>8</sup> Difco

<sup>9</sup> Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil

mL para as amostras anaeróbias obrigatórias, *E. faecalis* e *L. acidophilus* e 0,01 mL para as amostras anaeróbias facultativas) foram inoculadas em 3,5 mL de ágar semissólido (0,7% de ágar) e, então, todo o volume foi vertido sobre a camada de BHIA-S 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, realizou-se a leitura. Avaliou-se a presença ou ausência de halo de inibição da amostra reveladora e, quando presentes, o diâmetro dos halos foi mensurado e os mesmos foram avaliados quanto à limpidez. Com base nestes resultados, foram selecionadas uma amostra produtora e uma amostra reveladora a serem empregadas nas etapas seguintes do estudo.

### 4.3 PESQUISA DE FATORES DE INTERFERÊNCIA

Para verificar se a inibição da amostra reveladora é devida à ação de substância antagonista sintetizada pela amostra teste 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.

#### 4.3.1 BACTERIÓFAGOS

Para avaliar a presença de bacteriófagos, uma alíquota de 0,2 mL da amostra produtora previamente cultivada em BHI-S foi inoculada em *spots* em BHIA-S. As culturas foram incubadas e, a seguir, tratadas com clorofórmio, como já descrito. Então, a camada de BHIA-S foi invertida, com o auxílio de uma espátula estéril. A seguir, procedeu-se à revelação do teste. Após incubação, realizou-se a leitura. A ausência de zona de inibição da amostra reveladora indica presença de fagos,

com base no pressuposto que estes não seriam capazes de atravessar a camada de ágar para infectar a amostra reveladora (KÉKESSY; PIGUET, 1970).

#### **4.3.2 ÁCIDOS GRAXOS**

A avaliação da presença de ácidos graxos foi realizada utilizando-se BHIA-S acrescido de 1% de amido solúvel<sup>10</sup>. Como controle negativo, foi empregado BHIA-S (WALSTAD; REITZ; SPARLING, 1974).

Para execução deste teste, a amostra produtora foi inoculada, em *spots*, sobre 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 indica atividade de ácidos graxos.

#### **4.3.3 CLOROFÓRMIO**

Para avaliar a possível atividade do clorofórmio contra a amostra reveladora, cultivou-se a amostra produtora e, então, a amostra reveladora previamente cultivada em BHI-S, foi estriada ao redor do *spot* da produtora, em forma de cruz, sem tocar a amostra produtora. Após incubação, avaliou-se a presença ou ausência de halo de inibição da amostra reveladora. Resultado negativo indica que a inibição seria devida à ação do clorofórmio (FARIAS *et al.*, 1992).

#### **4.3.4 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**

A produção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi avaliada por meio da incorporação de catalase de fígado bovino<sup>11</sup> a 1% p/v, filtrada em membrana de 0,22 µm<sup>12</sup>, em BHIA-S fundido e resfriado. Como controle, foi utilizado BHIA-S. A presença de halo de inibição da

---

<sup>10</sup> Reagen, Curitiba, PR, Brasil

<sup>11</sup> Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA

<sup>12</sup> Millipore, Bedford, MA, EUA

amostra reveladora apenas no meio sem adição de catalase é indicativa de atividade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (HAMADA; OOSHIMA,1975).

#### 4.4 EXTRAÇÃO PROTEICA

A extração das frações proteicas intracelulares foi realizada segundo protocolo padronizado no LMOA (FARIAS *et al.*, 1994). A amostra de *B. fragilis* produtora de substância antagonista foi pré-cultivada em 80 mL de BHI-S, em jarra de anaerobiose, a 37 °C, por 48 h e, então, todo o volume do pré-inóculo foi adicionado a 800 mL de BHI-S. Após incubação nas mesmas condições mencionadas, a cultura foi centrifugada a 12520 g, a 4 °C, por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi empregado para obtenção das frações intracelulares.

Após duas lavagens consecutivas com Tris<sup>13</sup>-HCl<sup>14</sup> 0,01 M, pH 8,0, empregando-se centrifugação a 12520 g, a 4 °C, por 30 min, o *pellet* foi suspenso em 15 mL do mesmo tampão. Então, o material foi submetido a sonicação<sup>15</sup> por 20 ciclos de 40 s, a 50W, com intervalos de 40 s, em banho de gelo. Para confirmação da lise celular, foi realizada coloração pelo método de Gram e análise microscópica a cada cinco ciclos. O extrato sonicado foi novamente centrifugado, a 29829 g, a 4 °C, por 30 min. Então, o sobrenadante contendo as proteínas da fração intracelular foi coletado e submetido a precipitação com sulfato de amônio (30, 50 e 80%). O material foi dialisado (Spectra/Por Membrabe 1000 MW<sup>16</sup>), obtendo-se, assim, as frações intracelulares, denominadas C30, C50 e C80.

---

<sup>13</sup> Inlab

<sup>14</sup> Quimex, São Paulo, SP, Brasil

<sup>15</sup> Branson, Danbury, CT, EUA

<sup>16</sup> Spectrum Laboratories Inc., Rancho Domingues, CA, EUA



#### 4.5 AVALIAÇÃO E TITULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS FRAÇÕES PROTEICAS

As frações proteicas foram esterilizadas por exposição a vapor de clorofórmio por 30 min e testadas quanto à atividade antagonista, conforme descrito por Farias e colaboradores (1994). A amostra de *B. fragilis* reveladora foi cultivada conforme descrito no item 4.2 e vertida sobre camada de BHIA-S contendo 10 µL das frações intracelulares diluídas em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0. Foram testadas, além do extrato proteico bruto, diluições 1:2 a 1:128 das frações. Após incubação como anteriormente descrito, procedeu-se à leitura do experimento, avaliando-se a presença de halos lípidos de inibição da amostra reveladora. O título foi expresso em unidades arbitrárias (UA) de atividade antagonista/mL, caracterizada como a recíproca da maior diluição que resultou na formação de halo lípido de inibição da amostra reveladora (YAMAMOTO *et al.*, 2003).

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO C30 - ENZIMA PROTEOLÍTICA

O extrato C30 foi submetido a tratamento com enzima proteolítica<sup>17</sup> para avaliação do efeito da mesma na atividade antagonista. A perda de atividade indicaria a natureza proteica do extrato (APOLÔNIO *et al.*, 2008; HAYES *et al.*, 1983). Empregou-se a enzima proteinase K, solubilizada (concentração final = 1 mg/mL) em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,2. A solução foi esterilizada por filtração.

Para o teste, uma alíquota do extrato foi diluída na proporção de 1:1 (v/v) na solução enzimática. As soluções foram incubadas por 1 h a 37 °C. A seguir, a preservação da atividade antagonista foi avaliada, conforme item 4.5. O resultado foi expresso em UA de atividade antagonista/mL.

---

<sup>17</sup> Sigma-Aldrich

Como controle da ação enzimática, utilizou-se extrato proteico sabidamente ativo previamente caracterizado (OLIVEIRA, 2013) e, como controle de atividade do extrato, empregou-se C30 sem tratamento com proteases.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PESQUISA DE ATIVIDADE ANTAGONISTA - SCREENING E SELEÇÃO DAS AMOSTRAS PRODUTORA E REVELADORA PARA AS ETAPAS SUBSEQUENTES DO ESTUDO

Neste estudo, foram realizados 57 testes para pesquisa de atividade antagonista, dos quais nove (15,8%) apresentaram resultado positivo (TAB. 1). Quanto ao espectro de ação, os fenômenos de isoantagonismo e heteroantagonismo foram evidenciados (FIG. 1). Não se detectou a ocorrência de autoantagonismo.

As três amostras de *B. fragilis* testadas expressaram antagonismo quando se empregou BHIA-S, pH 7,2. Os resultados dos testes realizados em BHIA-S, pH 6,5, que incluíram apenas as amostras que geraram resultados positivos em pH 7,2, demonstraram halos de inibição da amostra reveladora maiores e mais límpidos se comparados àqueles observados no ensaio anterior (TAB. 2). Nesta condição, atividade antagonista contra *L. acidophilus* não foi detectada (FIG. 2).

A amostra D51 foi selecionada para as etapas subsequentes. Quanto às reveladoras, selecionou-se a amostra *B. fragilis* ATCC 25285 (FIG. 3 e 4).

TABELA 1

Espectro de ação das amostras de *Bacteroides fragilis* D111.4, 51 e D51 - método de sobrecamada, meio BHIA-S, pH 7,2.

Amostras reveladoras		<i>Bacteroides fragilis</i>		
		D111.4	51	D51
<i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC 8482	- <sup>1</sup>	-	-
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	ATCC 29741	-	-	21,56 mm (HpN <sup>2</sup> )
<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC 15707	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 25723	AG <sup>3</sup>	AG	AG
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	-	-	-
<i>Eubacterium lentum</i>	ATCC 25559	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	-	12,16 mm (HpN)	12,96 mm (HpN)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC 27337	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285	15,56 mm (HL <sup>4</sup> )	14,09 mm (HN <sup>5</sup> )	17,21 mm (HL)
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 14028	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	157.06	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	057	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	K12 Row	-	-	-
<i>Bacteroides capillosus</i>	D96	18,47 mm (HN)	19,13 mm (HL)	24,22 mm (HpN)
<i>Bacteroides fragilis</i>	D111.4	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	51	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	D51	-	-	-

<sup>1</sup>, negativo; <sup>2</sup>, halo pouco nublado; <sup>3</sup>, agonismo; <sup>4</sup>, halo límpido; <sup>5</sup>, halo nublado.

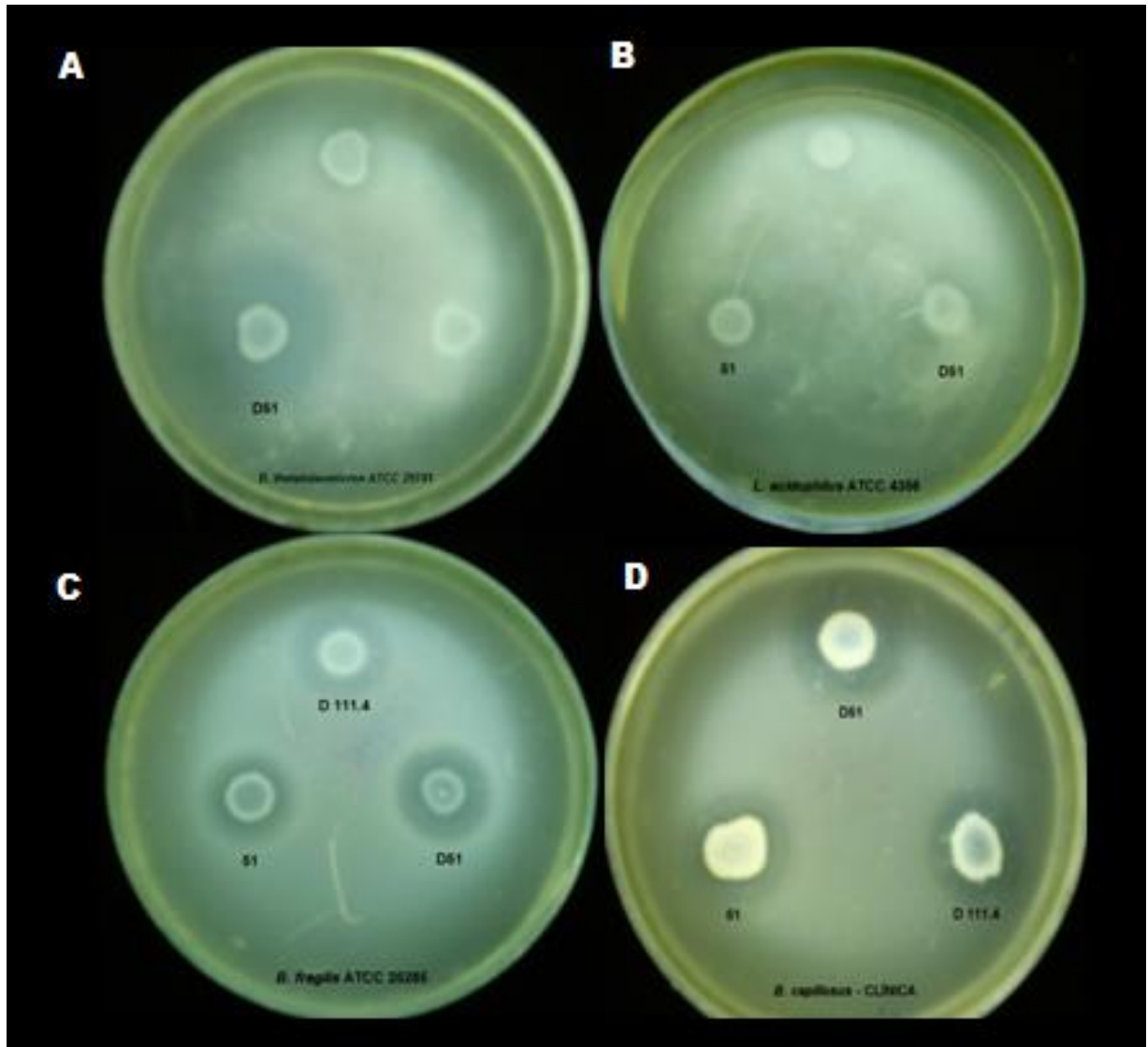


FIGURA 1

Atividade antagonista das amostras *Bacteroides fragilis* D51, 51 e D111.4, isoladas de infecções intra-abdominais, em pH 7,2.

- A) Heteroantagonismo, amostra reveladora *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741, B) Heteroantagonismo, amostra reveladora *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, C) Isoantagonismo, amostra reveladora *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, D) Heteroantagonismo, amostra reveladora *Bacteroides capillosus* D96.

Método da sobrecamada, BHIA-S, incubação em jarra de anaerobiose, a 37 °C, por 48 h.

TABELA 2

Atividade antagonista das amostras de *Bacteroides fragilis* D111.4, 51 e D51 - método de sobrecamada, meio BHIA-S, pH 6,5.

Amostras reveladoras		<i>Bacteroides fragilis</i>		
		D111.4	51	D51
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	ATCC 29741	20,95mm (HN <sup>1</sup> )	11,14mm (HL <sup>2</sup> )	16,66mm (HpN <sup>3</sup> )
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	- <sup>4</sup>	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285	21,66mm (HpN)	20,13mm (HN)	18,99mm (HL)
<i>Bacteroides capillosus</i>	D96	21,76mm(HL)	21,43mm (HL)	21,57mm(HL)

<sup>1</sup>, negativo; <sup>2</sup>, halo límpido; <sup>3</sup>, halo pouco nublado; <sup>4</sup>, negativo.

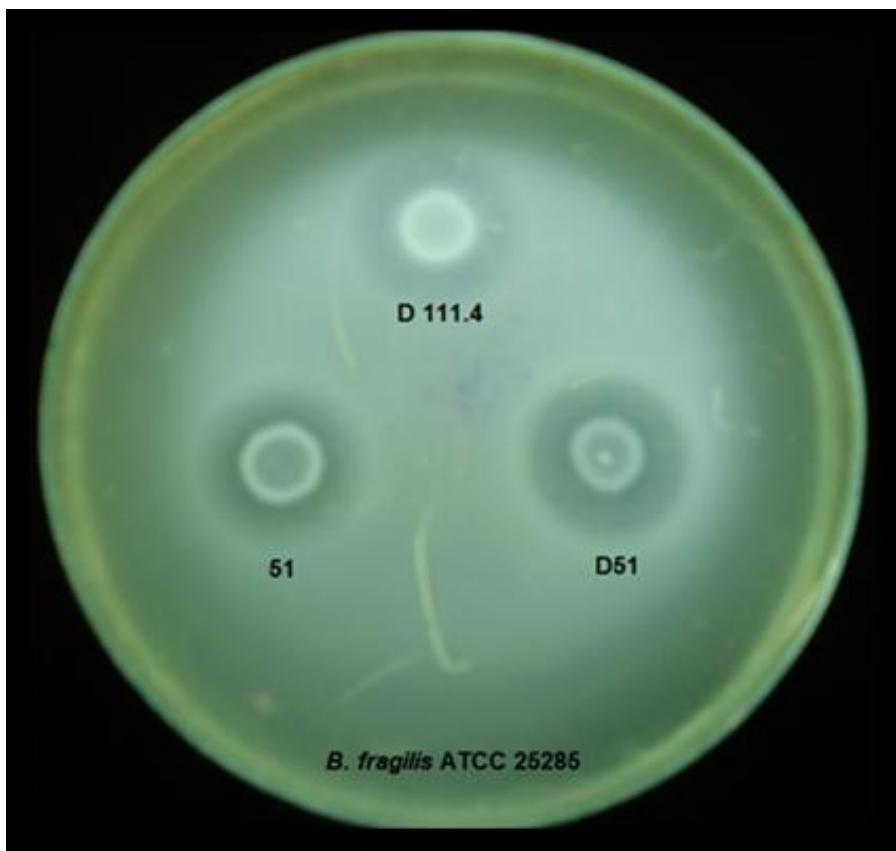


FIGURA 2

Atividade isoantagonista das amostras *Bacteroides fragilis* D51, 51 e D111.4, isoladas de infecções intra-abdominais, contra amostra *B. fragilis* ATCC 25285.

Método de sobrecamada, BHIA-S, pH 7,2, incubação em jarra de anaerobiose, a 37 °C, por 48 h.

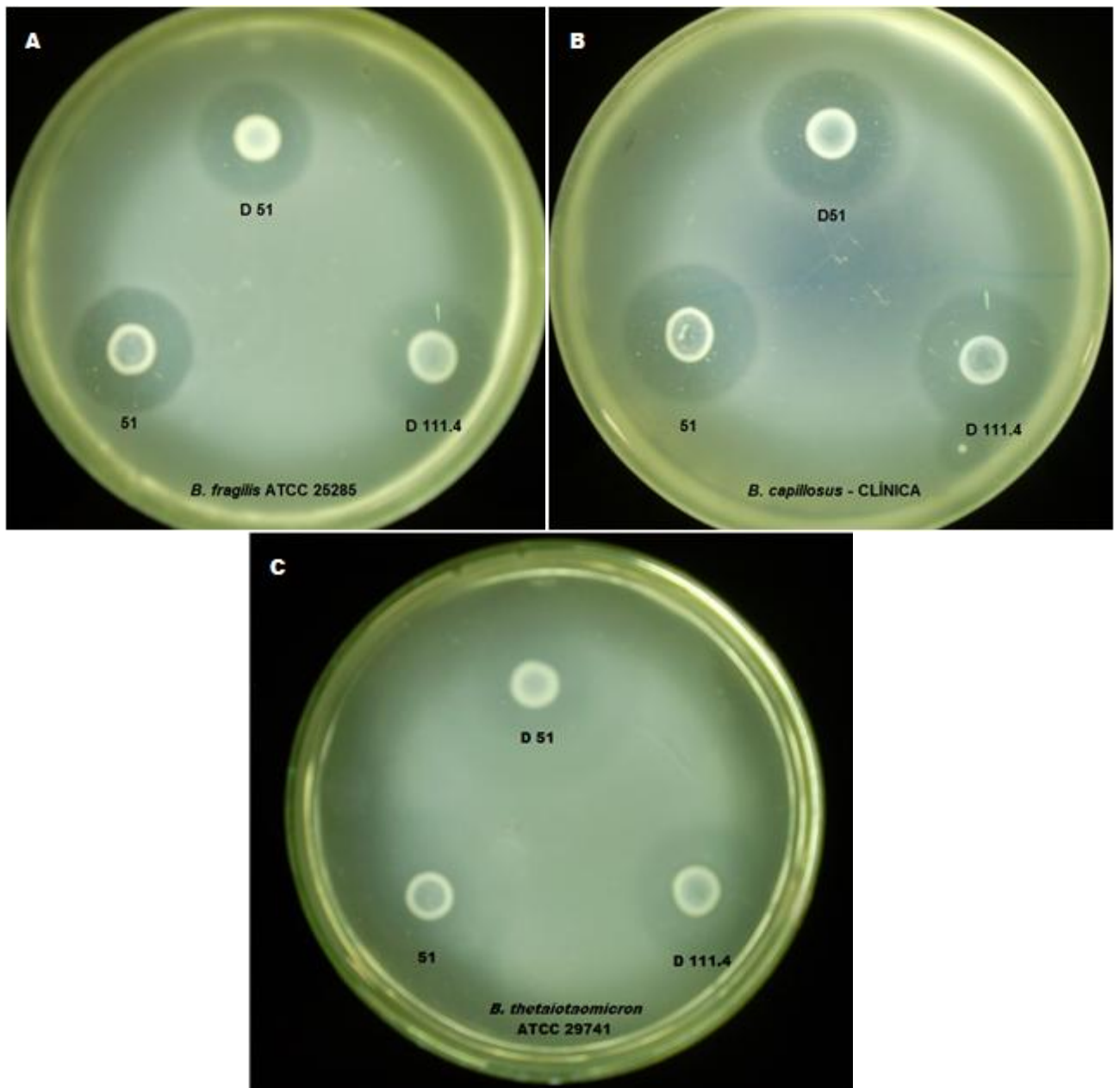


FIGURA 3

Atividade antagonista das amostras *Bacteroides fragilis* D51, 51 e D111.4, isoladas de infecções intra-abdominais, em pH 6,5.

A) Isoantagonismo, amostra reveladora *B. fragilis* ATCC 25285; B)

Heteroantagonismo, amostra reveladora *Bacteroides capillosus* D96; C)

Heteroantagonismo, amostra reveladora *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 28741.

Método de sobrecamada, BHIA-S, incubação em jarra de anaerobiose, a 37 °C, por 48 h.





FIGURA 4

Atividade isoantagonista da amostra *B. fragilis* D51, isolada de infecção intra-abdominal, contra a amostra *B. fragilis* ATCC 25285.

Método de sobrecamada, BHIA-S, pH 6,5, incubação em jarra de anaerobiose, a 37 °C, por 48 h.

## 5.2 ESPECTRO DE AÇÃO ANTAGONISTA DA AMOSTRA *B. fragilis* D51

A amostra de *B. fragilis* D51, selecionada para os testes subsequentes, apresentou atividade contra quatro amostras reveladoras em BHIA-S, pH 7,2: *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741, *B. fragilis* ATCC 25285, *L. acidophilus* ATCC 4356 e *B. capillosus* D96 (FIG. 1). Em BHIA-S, pH 6,5, atividade contra *L. acidophilus* não foi observada. Entretanto, a atividade contra as demais reveladoras foi mais evidente, visto que os halos de inibição foram maiores e mais límpidos (FIG. 3).

## 5.3 DETECÇÃO DE FATORES DE INTERFERÊNCIA

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

### 5.3.1 BACTERIÓFAGOS

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

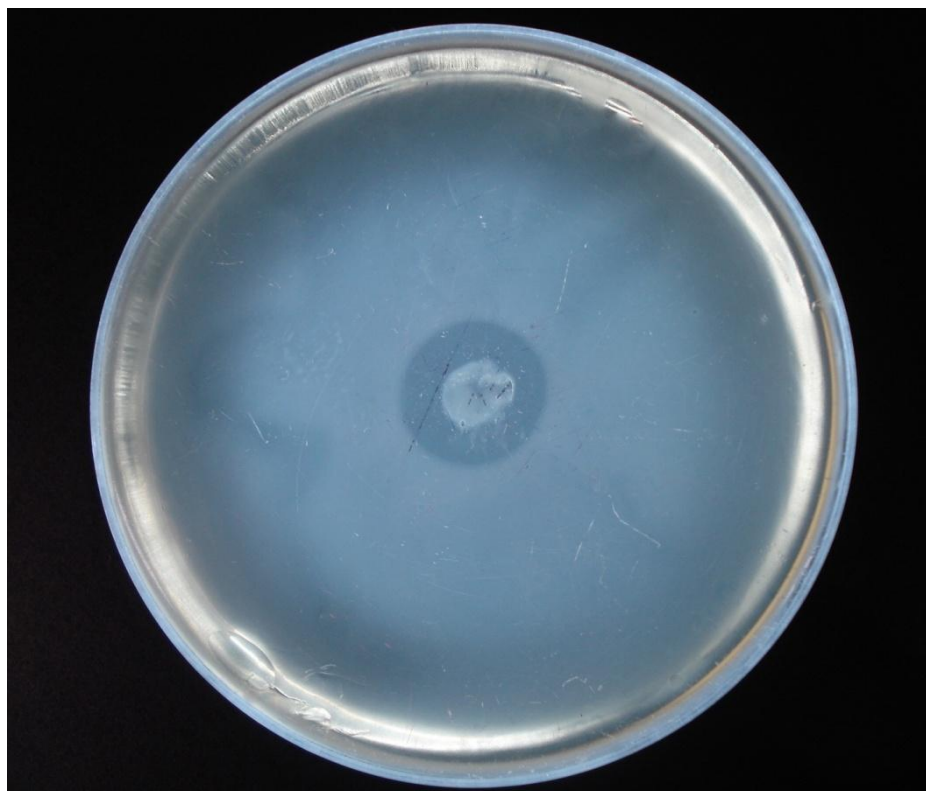


FIGURA 5

Avaliação da presença de bacteriófagos.

Amostra teste: *Bacteroides fragilis* D51, isolada de infecção intra-abdominal e  
amostra reveladora: *B. fragilis* ATCC 25285.

Método de sobrecamada sobre meio de cultura invertido, BHIA-S, pH 6,5,  
incubação em jarra de anaerobiose, a 37 °C, por 48 h.

### **5.3.2 ÁCIDOS GRAXOS**

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. 6).

### **5.3.3 CLOROFÓRMIO**

Atividade antagonista foi visualizada nos testes nos quais houve ou não exposição a clorofórmio, indicando, assim, que a substância não era a responsável pela inibição da amostra reveladora (FIG. 7).

### **5.3.4 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**

Nos testes conduzidos em BHIA-S com e sem catalase foram observados halos de inibição da amostra reveladora evidentes, demonstrando que  $H_2O_2$  não foi responsável pela atividade antagonista (FIG. 8).

## **5.4 TESTE DE ATIVIDADE DAS FRAÇÕES PROTEICAS INTRACELULARES**

Apenas a fração C30 apresentou atividade antagonista. As demais frações proteicas intracelulares testadas, C50 e C80, não demonstraram antagonismo nas condições do ensaio (FIG. 9).

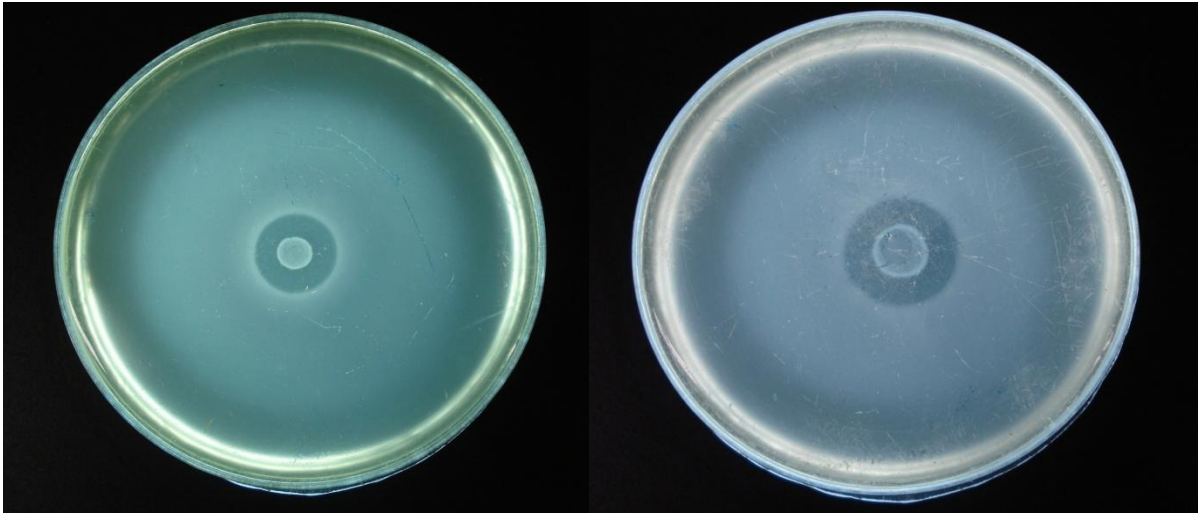


FIGURA 6

Avaliação da presença de ácidos graxos.

Presença de halo de inibição da amostra reveladora nos testes com (esquerda) e sem (direita) adição de amido.

Amostra teste: *Bacteroides fragilis* D51, isolada de infecção intra-abdominal e amostra reveladora: *B. fragilis* ATCC 25285.

Método de sobrecamada, BHIA-S, pH 6,5, incubação em jarra de anaerobiose, a 37 °C, por 48 h.

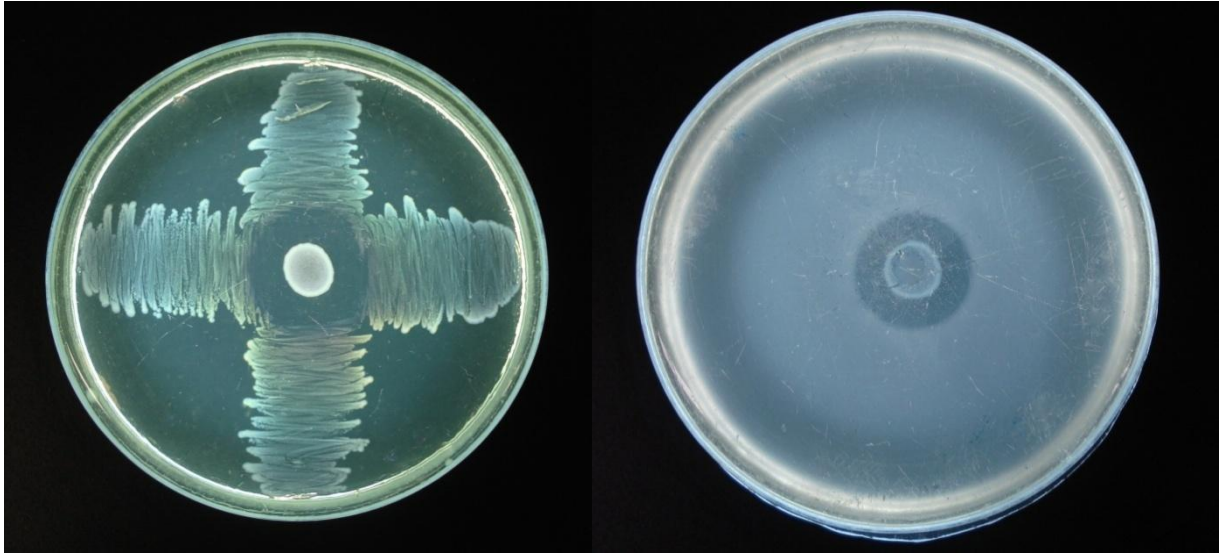


FIGURA 7

Avaliação da interferência de clorofórmio.

Presença de halo de inibição da amostra reveladora nos testes sem (esquerda) e com (direita) exposição a clorofórmio.

Amostra teste: *Bacteroides fragilis* D51, isolada de infecção intra-abdominal e amostra reveladora: *B. fragilis* ATCC 25285.

Método de sobrecamada, BHIA-S, pH 6,5, incubação em jarra de anaerobiose, a 37 °C, por 48 h.



FIGURA 8

Avaliação da presença de peróxido de hidrogênio.

Presença de halo de inibição da amostra reveladora nos testes com (esquerda) e sem (direita) adição de catalase.

Amostra teste: *Bacteroides fragilis* D51, isolada de infecção intra-abdominal e amostra reveladora: *B. fragilis* ATCC 25285.

Método de sobrecamada, BHIA-S, pH 6,5, incubação em jarra de anaerobiose, a 37 °C, por 48 h.

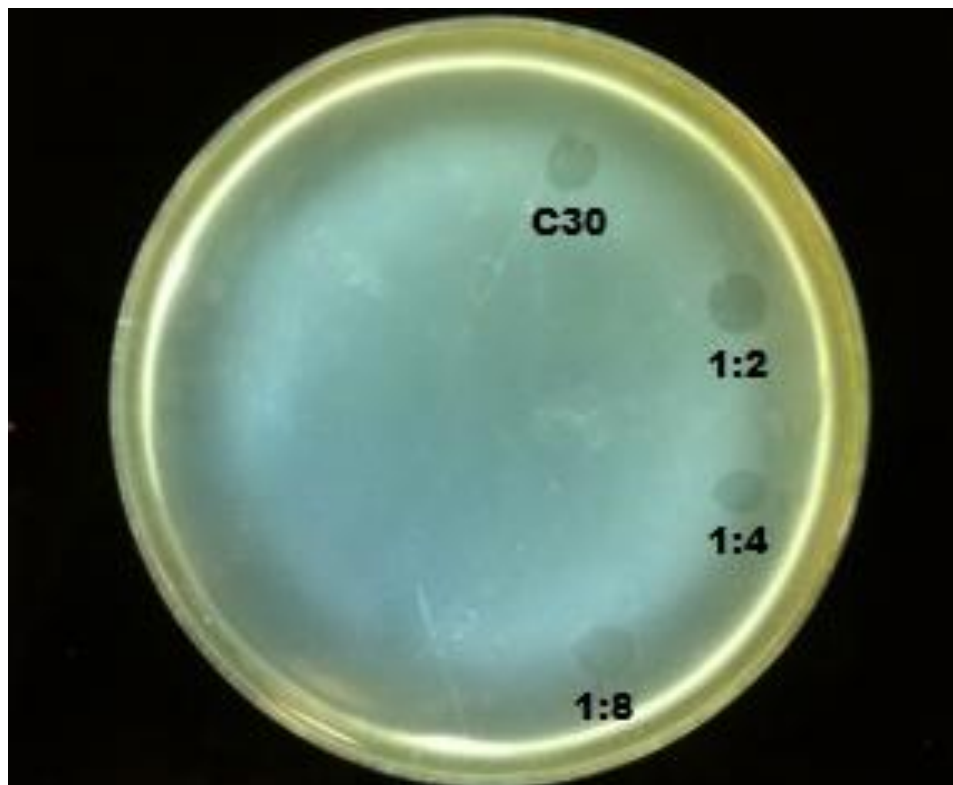


FIGURA 9

Teste de atividade e titulação da fração C30.

Amostra produtora: *Bacteroides fragilis* D51, isoladas de infecção intra-abdominal e amostra reveladora: *B. fragilis* ATCC 25285. Fração C30 diluída até 1:128, atividade até a diluição 1:8.

Método de sobrecamada, BHIA-S, pH 6,5, incubação em jarra de anaerobiose, a 37 °C, por 48 h.



## 5.5 AVALIAÇÃO E TITULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DA FRAÇÃO C30

A atividade antagonista, detectada na fração C30, só foi detectada após a amostra produtora criopreservada ter sido submetida a três repiques consecutivos antes do preparo do pré-inóculo. A fração C30 apresentou atividade até a diluição 1:8 (FIG. 9), com título de 800 UA/mL.

## 5.6 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO C30 - ENZIMA PROTEOLÍTICA

Quanto à avaliação da natureza química, observou-se que a fração C30 foi inativada após tratamento com proteinase K (FIG. 10). Em relação ao controle de atividade das enzimas, observou-se inibição da atividade do extrato caracterizado anteriormente, empregado como controle, conforme demonstrado na FIG. 11 (OLIVEIRA, 2013).

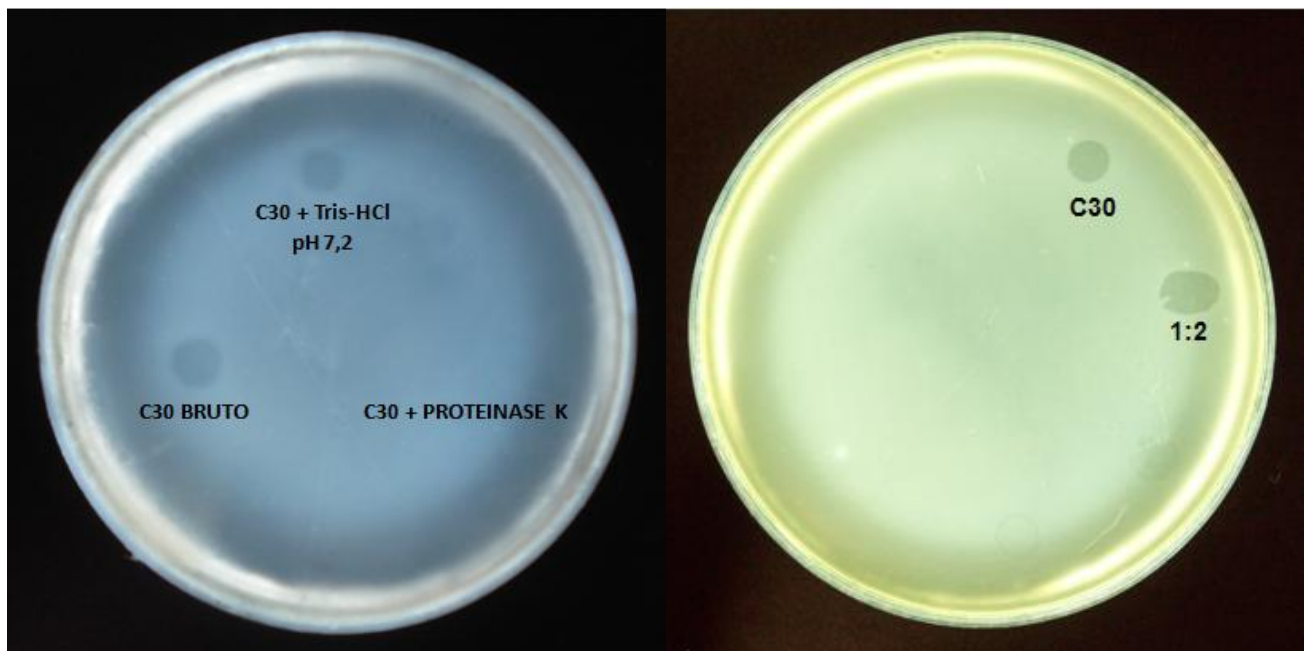


FIGURA 10

Sensibilidade do extrato C30 a proteinase K.

Teste de atividade de C30 após tratamento com proteinase K (esquerda) e controle da atividade do extrato (título = 200 UA/mL; direita).

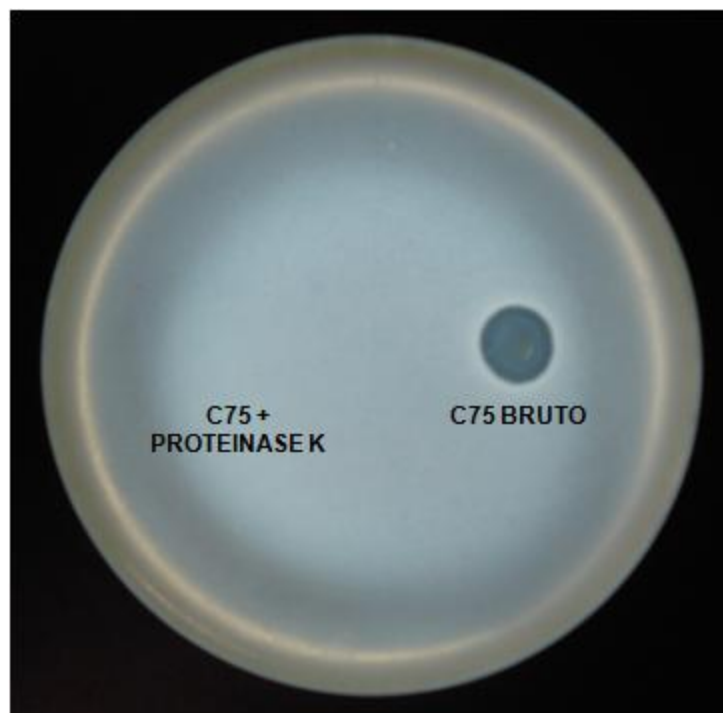


FIGURA 11

Controle da atividade enzimática (proteínase K) sobre extrato proteico com atividade antibacteriana.

## 6. DISCUSSÃO

A busca por substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, vem crescendo acentuadamente nos últimos anos, não apenas pela possibilidade de aplicação prática das mesmas (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008), mas, também, pela busca por um melhor entendimento da ecologia microbiana, visto que é plausível admitir a existência de relação entre predominância de determinadas amostras e expressão destas substâncias (O'SHEA *et al.*, 2012).

A habilidade de sintetizar bacteriocinas parece ser uma propriedade amplamente disseminada entre bactérias. Tanto membros da microbiota indígena (DOBSON *et al.*, 2012), como amostras isoladas de processos infecciosos podem expressar esta habilidade (MERCER *et al.*, 1984).

Considerando a relevância do tema, a escassez de dados relativos a bacteriocinas sintetizadas por bactérias anaeróbias obrigatórias e a experiência prévia do grupo, tanto no que se refere à área “Bacteriologia de anaeróbios” como “Substâncias antagonistas tipo bacteriocina”, desenvolvemos este estudo. Três amostras de *B. fragilis* isoladas de pacientes com infecções intra-abdominais foram avaliadas quanto à expressão de antagonismo contra bactérias da microbiota intestinal indígena ou enteropatogênicas.

Nossos dados indicaram que as três amostras demonstraram atividade antagonista. O espectro de atividade restrito contra bactérias filogeneticamente relacionadas às amostras produtoras, com exceção de *L. acidophilus*, sugere a síntese de substâncias tipo bacteriocina, de acordo com a definição clássica das mesmas (KLAENHAMMER, 1988; PAPASTATHOPOULOU; BEZIRTZOGLU; LEGAKIS, 1997). Sabe-se que bactérias Gram negativas habitualmente sintetizam substâncias com espectro de ação reduzido quando comparadas com aquelas sintetizadas por bactérias Gram positivas (NISHIE; NAGAO; SONOMOTO, 2012).

A atividade observada contra uma espécie taxonomicamente distante da amostra produtora está de acordo com o resultado relatado por Farias e colaboradores

(1992), que demonstraram que uma substância tipo-bacteriocina sintetizada por *B. fragilis* apresentava-se ativa contra outras bactérias sem proximidade filogenética. Entretanto deve-se destacar que, em virtude da pequena amostragem testada, não é prudente uma discussão mais aprofundada relativa ao espectro de ação antagonista das amostras teste. A realização de novos testes incluindo uma gama mais ampla de bactérias reveladoras é desejável para a melhor caracterização do fenômeno.

Também como esperado, não se observou o fenômeno de autoantagonismo, ou seja, suscetibilidade das amostras produtoras a ação de sua própria bacteriocina, sugerindo a expressão de proteínas de imunidade específicas (CLEVELAND *et al.*, 2001; COTTER; HILL ; ROSS, 2005; COTTER, 2012).

Inicialmente, os testes para avaliação de expressão de antagonismo foram realizados em meio de cultura com pH 7,2. Visando otimizar os resultados, os ensaios que originaram resultados positivos foram repetidos em meio de cultura com pH 6,5. Observou-se, nesta condição, halos maiores e mais límpidos, o que pode sugerir que as amostras produtoras multipliquem-se melhor em pH 6,5 e, conseqüentemente, a produção total de substância antagonista seja maior. Alternativamente, é possível que ocorra realmente uma maior produção de substância antagonista/célula neste valor de pH.

Como apenas as amostras que geraram resultado positivo em pH 7,2 foram testadas em pH 6,5, a discussão referente a este assunto fica um pouco limitada. Entretanto, vale ressaltar que atividade contra *L. acidophilus* não foi detectada em pH 6,5. O resultado pode indicar a síntese de mais de um tipo de substância antagonista.

Com base nos dados gerados pelo *screening*, a amostra produtora *B. fragilis* D51 e a amostra reveladora *B. fragilis* ATCC 25285 foram selecionadas para as etapas subsequentes do estudo. A escolha baseou-se no espectro de ação e no tamanho e na limpidez dos halos de inibição. Vale ressaltar que a expressão de antagonismo contra a amostra *B. capillosus* D96 foi mais evidente se comparada com o resultado obtido para *B. fragilis* ATCC 25285. Entretanto, nossa opção foi pela amostra *B. fragilis* ATCC 25285, por esta ser uma amostra de referência. *B.*

*capillosus* D96 é uma amostra clínica, isolada em nosso Laboratório e ainda não caracterizada.

Sabe-se que os microrganismos são capazes de sintetizar diversas categorias de substâncias com atividade antimicrobiana, como, por exemplo, ácidos graxos e peróxido de hidrogênio, além de bacteriocinas (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, conduzimos testes para exclusão destes fatores interferentes (APOLÔNIO *et al.*, 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 tinham contato direto com a amostra reveladora. Como se observou a presença de halos de inibição da amostra reveladora, foi possível concluir que a atividade antagonista era devida a substância difusível, capaz de atravessar a camada de ágar e agir sobre a amostra reveladora (KÉKESSY & PIGUET, 1970). Caso 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 infectarem a amostra produtora. Se a amostra reveladora estivesse infectada, seria possível visualizar zonas líticas dispersas na placa (APOLÔNIO *et al.*, 2007). Assim, a possível ação de bacteriófagos como responsável pela inibição foi descartada.

De forma similar, os resultados demonstraram que o clorofórmio, utilizado para matar a amostra produtora antes da revelação do experimento, não foi o responsável pelo 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 demonstrado pelos resultados dos testes realizados em meio com catalase e amido, respectivamente. No que se 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, o resultado deste grupo de testes permitiu-nos reforçar a hipótese de produção de uma substância antagonista tipo bacteriocina pela amostra *B. fragilis* D51.

Apenas os extratos proteicos intracelulares da amostra produtora selecionada foram empregados no estudo. A decisão baseou-se em dados já obtidos no Laboratório. A experiência prévia do grupo demonstra que a atividade antagonista de frações proteicas extracelulares de bactérias anaeróbias obrigatórias não apresenta estabilidade adequada. Os extratos tornam-se inativos em períodos de tempo muito curtos, o que praticamente inviabiliza estudos mais aprofundados, envolvendo a caracterização da substância.

Entre as frações C30, C50 e C80, apenas C30 apresentava atividade contra a amostra *B. fragilis* ATCC 25285. Diferentemente, a fração proteica ativa descrita por Farias e colaboradores (1994), também para *B. fragilis*, era aquela obtida pela precipitação com 50% de sulfato de amônio.

Uma observação relevante, que tem se mostrado válida para diversas bactérias com as quais nosso grupo trabalha, refere-se à necessidade de realização de alguns repiques consecutivos da amostra produtora antes do preparo do pré-inóculo para o teste de atividade. Quando a amostra produtora foi reativada a partir da alíquota criopreservada e empregada diretamente nos testes, não se obtinha extrato proteico ativo. Assim, de alguma maneira, parece que a habilidade de expressar bacteriocinas precisa ser “ativada” após manutenção da amostra produtora em temperatura baixa.

Para avaliar a natureza proteica da fração C30, empregou-se tratamento com proteinase K. A escolha baseou-se no fato de que esta enzima apresenta espectro de atividade maior, degradando uma ampla gama de proteínas (BETZEL; PAL; SAENGER, 1988; SIGMA-ALDRICH, 2013). A inativação da substância antagonista detectada demonstrou a natureza proteica da mesma (AVELAR *et al.*, 1999; BOOTH; JOHNSON; WILKINS, 1977; HAYES *et al.*, 1983). O controle de atividade do extrato C30, revelou queda do título de atividade

antagonista do extrato, de 1:8 para 1:2, demonstrando que a substância antagonista não é preservada por períodos mais longos de tempo (nove semanas), mesmo em temperatura de -80 °C. Esta representa, certamente, uma dificuldade técnica importante para estudos futuros empregando a substância.



## 7 SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

- Os dados do estudo indicam que a amostra *B. fragilis* D51 é capaz de sintetizar substância com atividade antagonista, ativa, especialmente, contra espécies taxonomicamente relacionadas. O número reduzido de amostras reveladoras empregadas limita a discussão relativa ao espectro de ação da substância. É possível que mais de uma substância antagonista, com espectros de atividade diversos, seja sintetizada pela amostra produtora.

A exclusão de fatores de interferência sugere a natureza proteica da substância antimicrobiana detectada, possivelmente, uma substância tipo bacteriocina.

- Apenas a fração intracelular obtida por precipitação com 30% de sulfato de amônio expressou atividade nas condições empregadas. A atividade de C30 foi perdida após tratamento com proteinase K, confirmando sua natureza proteica.
- Consideramos que os resultados gerados pelo estudo são promissores. Nossa intenção é aprofundar a investigação, visando uma caracterização mais detalhada da substância. A nosso ver, a relevância do tema e escassez de dados referentes ao assunto justificam nossa proposta.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AVELAR, K. E. S. *et al.* Production of bacteriocin by *Bacteroides fragilis* and partial characterization. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 29, n. 4, p. 264-268, 1999.

BARBOSA, T.; RESCIGNO, M. Host-bacteria interactions in the intestine: homeostasis to chronic inflammation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, v. 2, n.1, p. 80-97, 2010.

BENMECHERNENE, Z. *et al.* Recent patents on bacteriocins: food and biomedical applications. *Recent Pat. DNA Seq.*, v. 7, n. 1, p. 66-73, 2013.

BETZEL, C.; PAL, G. P.; SAENGER, W. Three-dimensional structure of proteinase K at 0.15-nm resolution. *Eur. J. Biochem.*, v. 178, n. 1, p. 155-171, 1988.

BIK, E. M. Composition and function of the human-associated microbiota. *Nutr. Rev.*, v. 67, n. 2, p. 164-171, 2009.

BLASER, M. J.; FALKOW, S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 7, n. 12, p. 887-894, 2009.

BOOTH, S. J.; JOHNSON, J. L.; WILKINS, T. D. Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 11, n. 4, p. 718-724, 1977.

CANNY, G. O.; McCORMICK, B. A. Bacteria in the Intestine, Helpful Residents or Enemies from Within? *Infect. Immun.*, v. 76, n. 8, p. 3360-3373, 2008.

CATO, E. P.; JOHNSON, J. L. Reinstatement of species rank for *Bacteroides fragilis*, *B. ovatus*, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron*, and *Bacteroides vulgatus*: Designation of neotype strains for *Bacteroides fragilis* (Veillon and Zuber) Castellani and Chalmers and *Bacteroides thetaiotaomicron* (Distaso) Castellani and Chalmers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 26, n. 2, p. 230-237, 1976.

CERF- BENSUSSAN, N.; GABORIAU-ROUTHIAU, V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat. Rev. Immunol.*, v. 10, n. 10, p. 735-744, 2010.

CHUNG, H.; KASPER, D. L. Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 22, n. 4, p. 455-460, 2010.

CLEVELAND, J. *et al.* Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001.

COYNE, M. J. *et al.* Role of glycan synthesis in colonization of the mammalian gut by the bacterial symbiont *Bacteroides fragilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, v. 105, n. 35, p. 13099-13104, 2008.

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.

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.

DIBAISE, J. K. *et al.* Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo. Clin. Proc.*, v. 83, n. 4, p. 460-469, 2008.

DOBSON, A. *et al.* Bacteriocin production: a probiotic trait?. *Applied Environment Microbiology*, v. 78, n.1, p. 1-6, 2012.

- 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.
- FLINT, H. J. *et al.* Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environ. Microbiol.*, v.9, n.5, p. 1101-1111, 2007.
- GALVÃO, B. P. G. V.; MEGGERSEE, R. L.; ABRATT, V. R. Antibiotic resistance and adhesion potential of *Bacteroides fragilis* clinical isolates from Cape Town, South Africa. *Anaerobe*, v. 17, n. 4, p. 142-146, 2011.
- GALVEZ, A. *et al.* Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 120, n. 1-2, p. 51-70, 2007.
- GAUSS, G. H. *et al.* Characterization of the *Bacteroides fragilis* *bfr* gene product identifies a bacterial DPS-like protein and suggests evolutionary links in the ferritin superfamily. *J. Bacteriol.*, v. 194, n. 1, p. 15-27, 2012.
- GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, v. 361, n. 9356, p. 512-519, 2003.
- HAMADA, S.; OOSHIMA, T. Production and properties of bacteriocins (mutacins) from *Streptococcus mutans*. *Archs. Oral Biol.*, v.20, n. 10, p. 641-648, 1975.
- HANSEN, J.; GULATI, A.; SARTOR, R. B. The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, v. 26, n. 6, p. 564-571, 2010.
- HAYES, T. H.; CUNDY, K. R.; FERNANDES, P. B. Purification and Characterization of a Bacteriocin from *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.*, v. 155, n. 3, p. 1171-1177, 1983.
- HUANG, J. Y.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. The human commensal *Bacteroides fragilis* binds intestinal mucin. *Anaerobe*, v. 17, n. 4, p. 137-141, 2011.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, v. 59, n. 2, p. 171-200, 1995.

JAPANESE SOCIETY OF CHEMOTHERAPY COMMITTEE ON GUIDELINES FOR TREATMENT OF ANAEROBIC INFECTIONS; JAPANESE ASSOCIATION FOR ANAEROBIC INFECTION RESEARCH. Chapter 3-1. Appendix: Latest classification and nomenclature for anaerobes. *J. Infect. Chemother.*, v. 17, n. 1 (suppl.), p. 140-158, 2011.

KELLY, D.; KING, T.; AMINOV, R. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat. Res.*, v. 622, n. 1-2, p. 58-69, 2007.

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.

LEE, Y. K.; MAZMANIAN, S. K. Has the Microbiota Played a Critical Role in the Evolution of the Adaptive Immune System? *Science*, v. 330, n. 6012, p. 1768-1773, 2010.

LESER, T. D.; MOLBAK, L. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environ. Microbiol.*, v. 11, n. 9, p. 2194-2206, 2009.

LIU, C. H. *et al.* Regulation of surface architecture by symbiotic bacteria mediates host colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 105, n.10, p. 3951-3956, 2008.

MARTÍN, R *et al.* Role of commensal and probiotic bacteria in human health: a focus on inflammatory bowel disease. *Microb. Cell Fact*, v. 12, n. 71, p. 2-11, 2013.

MERCER, A. A. *et al.* Conservation of plasmids among *Escherichia coli* K1 isolates of diverse origins. *Infect Immun.*, v. 46, n. 3, p. 649-657, 1984.

MERINO, V. R. C. *et al.* Quantitative detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* subtypes isolated from children with and without diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, v. 49, n. 1, p. 416-418, 2011.

- MIRANDA, C. M. *et al.* Purification and partial characterization of a bacteriocin isolated from *Bacteroides ovatus* H47. *Can. J. Microbiol.*, v. 39, n. 2, p. 169-174, 1993.
- MOSSIE, K. G. *et al.* Characterization and mode of action of a bacteriocin produced by a *Bacteroides fragilis* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 16, n. 6, p. 724-730, 1979.
- MOSSIE, K. G. *et al.* Inhibition of ribonucleic acid polymerase by a bacteriocin from *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 20, n. 4, p. 437-442, 1981.
- MSHVILDADZE, M.; NEU, J. The infant intestinal microbiome: Friend or foe? *Early Hum. Dev.*, v. 86, n. 1, p. 67-71, 2010.
- MYERS, L. L. *et al.* Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from humans with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, v. 25, n.12, p. 2330-2333, 1987.
- 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.
- NDAMUKONG, I. C.; GEE, J.; SMITH, C. J. The extracytoplasmic function sigma factor EcfO protects *Bacteroides fragilis* against oxidative stress. *J. Bacteriol.*, v. 195, n. 1, p. 145-155, 2013.
- 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.
- 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. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 152, n. 3, p. 189-205, 2012.

PAPASTATHOPOULOU, A.; BEZIRTZOGLU, E.; LEGAKIS, N. J. *Bacteroides fragilis*: Production and sensitivity to bacteriocins. *Anaerobe*, v. 3, n. 2-3, p. 203-206, 1997.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie.*, v. 84, n. 5-6, p. 357-364, 2002.

ROBERFROID, M. *et al.* Probiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, v. 104, n. 2, p. 3-51, 2010.

ROCHA, E. R.; SMITH, C. J. Ferritin-like family proteins in the anaerobe *Bacteroides fragilis*: when an oxygen storm is coming, take your iron to the shelter. *Biomaterials*, v. 26, n. 4, p. 577-591, 2013.

SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 56, n. 7, p. 1599-1605, 2006.

SALYERS, A. A. *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. *Annu. Ver. Microbiol.*, v. 38, p. 293-313, 1984.

SALYERS, A. A.; GUPTA, A.; WANG, Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol.*, v. 12, n. 9, p. 412-416, 2004.

SANTOS, V. M.; MÜLLER, M.; VOS, W. M. Systems biology of the gut: the interplay of food, microbiota and host at the mucosal. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 21, n.4, p. 539-550, 2010.

SIGMA-ALDRICH. Proteinase K. 2013. Disponível em: <  
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/proteinase-k.html>>. Acesso em: 13 de outubro de 2013.

SONG, Y. L. *et al.* "*Bacteroides nordii*" sp. nov. and "*Bacteroides salyersae*" sp. nov. Isolated from clinical specimens of the human intestinal origin. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, n. 12, p. 5565-5570, 2004.

- 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.
- TILG, H.; MOSCHEN, A. R.; KASER, A. Obesity and the microbiota. *Gastroenterology*, v. 136, n. 5, p. 1476-1483, 2009.
- TROY, E. B.; KASPER, D. L. Beneficial effects of *Bacteroides fragilis* polysaccharides on the immune system. *Front Biosci.*, v. 15, p. 25-34, 2011.
- VRIEZE, A. *et al.* The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*, v. 53, n. 4, p. 606-613, 2010.
- 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.
- WEXLER, H. M. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 20, n. 4, p. 593-621, 2007.
- WICK, E. C.; SEARS, C. L. *Bacteroides* spp. diarrhea. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v. 23, n.5, p. 470-474, 2010.
- YAMAMOTO, Y.; TOGAWA, Y.; SHIMOSAKA, M.; OKAZAKI, M. 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.