

JAQUELINE SILVANA MOREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CARACTERIZAÇÃO DA PRIMEIRA MICROCINA E DE OUTRAS
BACTERIOCINAS SINTETIZADAS POR *Shigella sonnei*

Belo Horizonte

2014

JACQUELINE SILVANA MOREIRA

CARACTERIZAÇÃO DA PRIMEIRA MICROCINA E DE OUTRAS
BACTERIOCINAS SINTETIZADAS POR *Shigella sonnei*

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 grau de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Paula Prazeres Magalhães

Coorientadores: Luiz de Macêdo Farias

Mireille Ângela Bernardes Sousa

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

Belo Horizonte

2014

COLABORAÇÃO

Bruna Toledo Maria - Iniciação Científica, ICB/UFMG

Daniel Moreira Santos - ICB/UFMG

Edilberto Nogueira Mendes - Faculdade de Medicina/UFMG

Jamil Silvano de Oliveira - ICB/UFMG

Marcelo Matos Santoro - ICB/UFMG

Ricardo Andrez Machado de Ávila - ICB/UFMG

APOIO FINANCEIRO

CNPq

FAPEMIG

CAPES

TWAS

PRPq/UFMG

Dedico este trabalho aos meus pais, Nerza Alves dos Santos e Afonso Moreira dos Santos, por serem sempre muito próximos e me apoiarem em todas as horas, e ao meu marido e amor da minha vida, Jamil Silvano de Oliveira, por todas as ajudas, carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

A Meu Senhor Deus, Jesus, Maria e José, eu agradeço, por me carregarem no colo em todos os momentos da minha vida e por toda misericórdia. Por me mostrarem o caminho, me darem muita luz, sabedoria e discernimento. Agradeço por tudo que sou, pela minha família e por todas as oportunidades. Agradeço por mais esta conquista que tanto almejei. Também agradeço aos Santos e anjos por todas as intercessões.

Aos meus pais, Nerza e Afonso, por serem o meu oxigênio, a minha vida e a minha alegria. Por estarem sempre muito próximos, me apoiando, me aconselhando, me dando força. À minha mãe, por todas as orações e bondade, ao meu pai, sempre do meu lado. Não sei o que seria de mim sem vocês!

Ao meu amado maridinho, Jamil, tão bonzinho, eu agradeço por todos os socorros, ensinamentos, carinho e amor. Por participar ativamente da realização deste trabalho, principalmente, nos processos de purificação. Por sempre me apoiar, me incentivar e por ter muita paciência. Por ser o meu companheiro em todas as horas. Te amo!

À minha orientadora, Professora Paula, pessoa de extrema competência, um exemplo profissional. Pessoa que eu admiro muito! Obrigada pelos ensinamentos, por me acolher, me orientar e por ser sempre tão prestativa. Obrigada pela dedicação e paciência na correção da dissertação. Eu me espelho em você!

Ao meu coorientador, Professor Luiz, obrigada por me acolher no Laboratório MOA desde 2008 e por fazer parte da realização de um sonho antigo - trabalhar com Microbiologia. Obrigada por todos os ensinamentos, dedicação e por contribuir para a minha formação profissional.

À minha coorientadora, Doutora Mireille, obrigada por todos os ensinamentos desde a minha iniciação científica no Laboratório MOA. Com você aprendi os primeiros passos da Microbiologia.

À Professora Dodora, obrigada por me acolher no Laboratório MOA, pelos ensinamentos e pela oportunidade de trabalhar com você.

À Professora Simone, sempre tão prestativa e amigável. Obrigada pelos ensinamentos e por toda a disponibilidade em me ajudar. Obrigada por ceder amostras para avaliação do espectro de ação antagonista neste estudo.

Aos meus irmãos, Lúcio e Toninho, e meus irmãos e compadres Lelei e Celso. Obrigada pela amizade, torcida, aconchego, compreensão e incentivo. Gosto muito muito muito de vocês! E sei que posso contar sempre com vocês.

À minha cunhada Maria e a minha cunhada e comadre Cristiane, sempre tão amigáveis. Obrigada pela torcida e pelas conversas tão agradáveis. Adoro quando vocês vêm a BH!

Aos meus sobrinhos Any Shirley, Carolina, Anselmo, Stephany, Larissa, Manuela e Rafaela e aos meus sobrinhos e afilhados Vitor e Luiz Afonso. Aos pequenos, obrigada pelos sorrisos e por momentos tão divertidos, e aos grandinhos, pela torcida.

À minha amiga Alícia, ao Kiko e aos meus afilhados Ana Luíza e João Victor. A vida com vocês é mais fácil. Obrigada pelo ombro amigo. Por sempre me escutarem e me aconselharem. Obrigada por fazerem parte da minha vida. Vocês são muito importantes para mim.

Ao Tio Tõe, tem coisas que nós não aprendemos em livros, artigos e nem no meio acadêmico. Eu tive a dádiva de crescer em sua companhia. Obrigada por todos os ensinamentos, principalmente aqueles nos momentos mais tristes. Você sempre será uma pessoa muito especial. “Meio dia já, tá achando o quê? Vai dormir o dia inteiro? As mamonas que tinham que arrebentar já arrebentaram todas!” (*in memoriam*)

À minha filhinha de laboratório Bruninha, obrigada por me ajudar nesta conquista, principalmente na realização dos testes para avaliação da atividade antagonista. Eram milhares de tubos... Obrigada pela amizade e companheirismo. Sucesso garota!!

À Luzia e ao José Sérgio, sempre tão gentis e prestativos. Aprendi muito com vocês, principalmente, quando fui bolsista de apoio técnico no Laboratório MOA. Obrigada por todas as conversas agradáveis na cozinha e por todos os socorros.

Tenho muito que agradecer a vocês! Eu torço muito por vocês e tenho muitas saudades!

A todos os colegas e amigos que integram o Laboratório MOA, os antigos e os mais recentes... Obrigada a todos aqueles que me acolheram quando eu entrei no Laboratório, torceram pelo meu ingresso no mestrado, me ajudaram com o inglês, me emprestaram materiais, ofereceram o ombro amigo, me ajudaram de alguma forma na parte experimental. Vocês fazem parte desta conquista! O meu muito obrigada! Sou muito grata a vocês!

À Patrícia, minha irmãzinha de laboratório, desde a iniciação científica. Tantas coisas compartilhadas... Obrigada por todas as ajudas, que não foram poucas. Obrigada pelo companheirismo e amizade.

À Carol de Paula, Rafa, Naty e Lú adorei conhecer vocês! Foram tantas conversas agradáveis na salinha dos estudantes... Obrigada por todas as ajudas!

Ao suuuuper Augusto, obrigada pelas amostras bacterianas cedidas, pelas conversas agradáveis e pela amizade.

Ao João Fernando, companheiro de disciplina e bancada. Compartilhamos momentos de descontração e estresses. Obrigada por disponibilizar as amostras bacterianas para os testes de atividade antagonista e pela amizade.

À Renata, que não é ingrata. Você faz falta no MOA. Obrigada por todas as brincadeiras e conversas.

À Alessandra, companheira de Mestrado e disciplinas, obrigada por todas as conversas agradáveis e socorros.

À Ana Paula, bibliotecária do ICB/UFMG, sempre tão gentil. Obrigada por não medir esforços em conseguir artigos tão preciosos e o livro sobre bacteriocina que eu tanto queria. Você é uma super profissional!

Aos membros da minha banca examinadora, Professores Jacques e Sílvia, obrigada por aceitarem o convite. Sei que as suas contribuições serão de extrema valia para o meu aprendizado. E ao Professor Flaviano, membro suplente desta banca, obrigada pela emissão do parecer.

Ao David Toledo. Adorei trabalhar com você na Escola de Veterinária da UFMG. Obrigada por me apresentar à IgY. Assim como as bacteriocinas, a IgY também é linda. Obrigada por todos os ensinamentos. E se não fosse o meu amor pela Microbiologia, eu dedicaria os meus estudos à IgY. (*in memoriam*)

À Wany Selena, obrigada por me acolher na Funed, por tudo que aprendi com você e por fazer parte da minha formação.

Ao Daniel Moreira e Ricardo Ávila, do Departamento de Bioquímica, obrigada por todas as ajudas na determinação das massas moleculares e sequenciamento.

Aos integrantes do Laboratório de Enzimologia e Físico-química de Proteínas (ICB/UFMG), obrigada pelas conversas agradáveis e por todos os momentos de descontração.

Ao professor Marcelo Matos Santoro, por toda ajuda neste trabalho.

Aos professores da PUC Minas, Curso de Ciências Biológicas, obrigada por participarem da minha formação profissional.

Aos professores do Curso de Especialização em Microbiologia Aplicada às Ciências da Saúde (ICB/UFMG), obrigada pela dedicação, por compartilharem tantos conhecimentos e pela amizade. Era um prazer passar as sextas à noite e as manhãs e tardes de sábados com vocês. Este curso é, sem dúvida, apaixonante.

Aos professores do Mestrado em Microbiologia (ICB/UFMG), sempre empenhados, dedicados e comprometidos com a nossa formação. Obrigada por todas as contribuições e por fazerem parte desta conquista.

À Secretaria e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, o meu muito obrigada!

À FAPEMIG, à CAPES, ao CNPq, à TWAS e à PRPq/UFMG, obrigada pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho!

“A persistência é o caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

“Jamais considere seus estudos uma obrigação, mas uma oportunidade invejável (...) para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade a qual seu futuro trabalho pertence.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE QUADRO	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xxxiv
RESUMO	xxxvii
ABSTRACT	xxxviii
1 INTRODUÇÃO	39
1.1 MICROBIOTA INTESTINAL INDÍGENA	40
1.1.1 COLONIZAÇÃO E ESTABELECIMENTO DA MICROBIOTA INTESTINAL INDÍGENA	40
1.1.2 O SER HUMANO E A SUA MICROBIOTA	41
1.1.3 RELAÇÃO MUTUALÍSTICA ENTRE A MICROBIOTA INTESTINAL INDÍGENA E O HOSPEDEIRO	43
1.1.4 EFEITOS NEGATIVOS DA MICROBIOTA INTESTINAL	45
1.2 ENTERITE INFECCIOSA AGUDA	47
1.3 <i>Shigella</i>	50
1.3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	50
1.3.2 ENTERITE INFECCIOSA AGUDA ASSOCIADA A <i>Shigella</i>	51
1.3.3 ESTRATÉGIAS DE VIRULÊNCIA DE <i>Shigella</i>	55
1.4 BACTERIOCINAS	58
1.4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	58
1.4.2 BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS	60
1.4.3 BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS	63
1.4.3.1 COLICINAS E BACTERIOCINAS TIPO COLICINAS	63
1.4.3.2 MICROCINAS	65
1.4.4 BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR ARCHAEA	67
1.5 PURIFICAÇÃO DE BACTERIOCINAS	69
1.6 APLICABILIDADE DAS BACTERIOCINAS	73
1.6.1 BACTERIOCINAS NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS	73
1.6.2 BACTERIOCINAS NA SAÚDE HUMANA E ANIMAL	75

2.	JUSTIFICATIVA	78
3.	OBJETIVOS	80
3.1	OBJETIVO GERAL	81
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	81
4.	MATERIAL E MÉTODOS	82
4.1	AMOSTRAS BACTERIANAS	83
4.2	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA FRAÇÃO INTRACELULAR	83
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA	85
4.3.1	TITULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA	85
4.3.2	AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S)	85
4.3.3	ESPECTRO DE AÇÃO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S)	87
4.4.	PURIFICAÇÃO DO EXTRATO C-75	88
4.4.1	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA	88
4.4.2	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE GEL FILTRAÇÃO	92
4.4.3	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA POROS®	92
4.4.4	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SUPELCOSIL™	93
4.4.5	RECROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SUPELCOSIL™	93
4.5	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	94
4.6	SEQUENCIAMENTO PARCIAL DA SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA PURIFICADA	94
4.7	PURIFICAÇÃO POR ULTRAFILTRAÇÃO	95
4.7.1	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA WATERS SPHERISORB®	95
4.8	DOSAGEM PROTEICA	96
4.9	SDS-PAGE	96
4.9.1	TESTE DE ATIVIDADE <i>IN SITU</i>	97
4.10	DETERMINAÇÃO DA CIM	97
4.11	DETERMINAÇÃO DA CBM	ÇDAS FR98
4.12	CINÉTICA DE AÇÃO DOS EXTRATOS C-30 E C-75 E DO POOL CONSTITUÍDO PELAS FRAÇÕES ATIVAS ORIGINADAS DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	99

5.	RESULTADOS	100
5.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA, RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO, TITULAÇÃO E DOSAGEM PROTEICA DOS EXTRATOS C-30 E C-75	101
5.1.1	AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S): C-30 e C-75	104
5.1.2	ESPECTRO DE AÇÃO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S)	105
5.2	PURIFICAÇÃO DO EXTRATO C-75	105
5.2.1	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA	105
5.2.1.1	AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) PRESENTES NAS FRAÇÕES ATIVAS	106
5.2.2	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE GEL FILTRAÇÃO	109
5.2.2.1	AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) PRESENTE(S) NAS FRAÇÕES ATIVAS	111
5.2.3	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA - POROS®	111
5.2.3.1	AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) PRESENTE(S) NAS FRAÇÕES ATIVAS	118
5.2.4	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA -SPELCOFIL™	118
5.2.4.1	AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) PRESENTE(S) NAS FRAÇÕES ATIVAS	119
5.2.5	RECROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SPELCOFIL™	119
5.2.5.1	AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) PRESENTE(S) NAS FRAÇÕES ATIVAS	120
5.3	AVALIAÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES DAS FRAÇÕES ATIVAS PURIFICADA E PARCIALMENTE PURIFICADAS	123
5.3.1	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SPELCOFIL™	123
5.3.2	RECROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SPELCOFIL™	132
5.4	SEQUENCIAMENTO DA FRAÇÃO PURIFICADA	132
5.5	PURIFICAÇÃO POR ULTRAFILTRAÇÃO	133
5.5.1	AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) PRESENTE(S) NAS FRAÇÕES ATIVAS	133
5.5.2	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SPELCOFIL™	133

5.5.2.1	AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) PRESENTE(S) NAS FRAÇÕES ATIVAS	133
5.5.3	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA WATERS SPHERISORB®	139
5.6	SDS-PAGE	139
5.6.1	TESTE DE ATIVIDADE <i>IN SITU</i>	139
5.7	DETERMINAÇÃO DA CIM	140
5.8	DETERMINAÇÃO DA CBM	140
5.9	CINÉTICA DE AÇÃO DOS EXTRATOS C-30 E C-75 E DO <i>POOL</i> CONSTITUÍDO PELAS FRAÇÕES ATIVAS ORIGINADAS DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	143
6.	DISCUSSÃO	149
7.	SÍNTESE DOS RESULTADOS, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	164
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	166
9.	ANEXOS	189
9.1	ANEXO 1: PERFIS CROMATOGRÁFICOS DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DA CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA EM COLUNA SUPELCOSIL™	190
9.2	ANEXO 2: ESPECTROS DE MASSAS DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DA CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA EM COLUNA SUPELCOSIL™	212
9.3	ANEXO 3: PERFIL CROMATOGRÁFICO E ESPECTROS DE MASSAS DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DA <i>RECROMATOGRAFIA</i> DE FASE REVERSA EM COLUNA SUPELCOSIL™	239

LISTA DE QUADRO

- | | | |
|---|--|----|
| 1 | Avaliação do espectro de atividade antagonista de <i>Shigella sonnei</i> SS9: amostras reveladoras e condições de cultivo. | 89 |
|---|--|----|

LISTA DE TABELAS

1	Rendimento da extração das frações proteicas intracelulares de <i>Shigella sonnei</i> SS9 obtidas à saturação de 30% e 75% de sulfato de amônio.	101
2	Espectro de ação antagonista de <i>Shigella sonnei</i> SS9 e dos extratos intracelulares proteicos obtidos a 30 % e 75 % de saturação de sulfato de amônio.	106
3	Título de atividade antagonista e concentração proteica dos <i>pools</i> GF1, GF2, GF3 e das frações 11 e 12 originados da cromatografia em coluna de gel filtração.	111
4	Sequência de purificação cromatográfica em colunas de gel filtração e fase reversa Poros [®] e Supelcosil TM .	112
5	Frações obtidas da cromatografia em coluna de fase reversa Poros [®] que produziram halos de inibição de <i>Shigella sonnei</i> SS12 a partir dos quais foi cultivado bastonete Gram negativo sugestivo de <i>S. sonnei</i> .	118
6	Frações ativas obtidas da cromatografia em coluna de fase reversa Supelcosil TM	120
7	Frações obtidas da cromatografia em coluna de fase reversa Supelcosil TM que produziram halos de inibição de <i>Shigella sonnei</i> SS12 a partir dos quais foi cultivado bastonete Gram negativo sugestivo de <i>S. sonnei</i> .	123
8	Resultados da espectrometria de massas das frações com até quatro massas moleculares originadas da cromatografia em coluna de fase reversa Supelcosil TM e origem das frações.	124
9	Resultados da espectrometria de massas das frações com até quatro massas moleculares originadas da <i>recromatografia</i> em coluna de fase reversa Supelcosil TM e origem das frações	134

10	Substância antagonista purificada: massa molecular, sequência e resultados da análise realizada no BLAST	137
11	Avaliação de CIM e CBM dos extratos C-30 e C-75 e do <i>pool</i> TI de <i>Shigella sonnei</i> SS9 contra <i>S. sonnei</i> SS12.	144
12	Avaliação de CIM e CBM dos <i>pools</i> GF contra <i>S. sonnei</i> SS12.	145

LISTA DE FIGURAS

- 1 Avaliação da atividade antagonista do extrato proteico intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado à concentração de 30 % de sulfato de amônio contra *S. sonnei* SS12. Título de atividade antagonista: 54.975.581.388.800 UA/mL. 102
- 2 Avaliação da atividade antagonista do extrato proteico intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado à concentração de 75 % de sulfato de amônio contra *S. sonnei* SS12. Título de atividade antagonista: 140.737.488.355.532.800 UA/mL. 103
- 3 a) Ação de sulfazotrim (SUT), ampicilina (AMP) e ciprofloxacina (CIP) contra *Shigella sonnei* SS12; b) multiplicação de bastonete Gram negativo a partir de raspado da porção central do halo de inibição gerado pelo SUT. 104
- 4 Avaliação da atividade antagonista de *Shigella sonnei* SS9, amostra de *S. sonnei* isolada de espécime fecal de criança com doença diarreica aguda; C-30 e C-75, extratos proteicos intracelulares de SS9 precipitados a concentrações de 30 % e 75 % de sulfato de amônio, respectivamente. 107
- 5 Perfil cromatográfico em coluna de troca iônica da fração intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitada a 75% de sulfato de amônio (C-75) em coluna Mono Q™ 5/50 GL Tricorn™ (GE Healthcare) equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, eluída em gradiente linear de 0 a 1,0 M de NaCl no mesmo tampão, com fluxo de 1,0 mL/min, leitura em Abs = 280 nm. Em ciano, título de atividade antagonista do *pool* TI (frações 1 a 7); amostra reveladora: *S. sonnei* SS12. 108
- 6 Atividade antagonista das frações 1 a 8 obtidas da cromatografia em coluna de troca iônica do extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio contra a amostra indicadora *S. sonnei* SS12. 109
- 7 Perfil cromatográfico em coluna de gel filtração do *pool* TI

(frações 1 a 7) obtido da cromatografia de troca iônica do extrato intracelular precipitado em 75% de sulfato de amônio da amostra de *Shigella sonnei* SS9. Em ciano, título de atividade antagonista dos *pools* GF1 (frações 2 a 4), GF2 (frações 5 e 6), GF3 (frações 7 a 9) e das frações 10 e 11; amostra reveladora: *S. sonnei* SS12.

110

8 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* GF1 (frações 2 a 4 da cromatografia de gel filtração). Coluna Poros[®] (Life Technologies) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 24 a 38 apresentaram atividade antagonista e as frações 24 (eluída com 45 % solução B) a 29 (eluída com 64 % solução B) foram encaminhadas para cromatografia em coluna SupelcosilTM.

113

9 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* GF2 (frações 5 e 6 da cromatografia de gel filtração). Coluna Poros[®] (Life Technologies) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 26 a 39 apresentaram atividade antagonista e as frações 26 (eluída com 50 % solução B) a 33 (eluída com 77 % solução B) foram encaminhadas para cromatografia em coluna SupelcosilTM.

114

10 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração). Coluna Poros[®] (Life Technologies) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h,

perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 25 a 39 apresentaram atividade antagonista e as frações 25 (eluída com 50 % solução B) a 36 (eluída com 86 % solução B) foram encaminhadas para cromatografia em coluna Supelcosil™.

115

11 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 10 da cromatografia de gel filtração. Coluna Poros® (Life Technologies) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q®). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 26 a 36 apresentaram atividade antagonista e as frações 26 (eluída com 50 % solução B) a 34 (eluída com 79 % solução B) foram encaminhadas para cromatografia em coluna Supelcosil™.

116

12 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 11 da cromatografia de gel filtração. Coluna Poros® (Life Technologies) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q®). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 25 (eluída com 50 % solução B) a 33 (eluída com 76 % solução B) apresentaram atividade antagonista e foram encaminhadas para cromatografia em coluna Supelcosil™.

117

34 Atividade antagonista das frações originadas da cromatografia em coluna de fase reversa Supelcosil™ [origem: fração 26 da cromatografia de fase reversa Poros® - origem: fração 10 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7) da

- cromatografia de troca iônica - extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio] contra a amostra indicadora *S. sonnei* SS12. 122
- 64 Perfil de fragmentação da proteína ativa com massa molecular de 7.279,134 Da. 135
- 65 Perfil de fragmentação da proteína ativa com massa molecular de 7.279,134 Da. 136
- 66 Atividade antagonista das frações com massa molecular de 3 a 10 kDa e superior a 10 kDa recuperadas do processo de ultrafiltração do extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75% de sulfato de amônio contra a amostra indicadora *S. sonnei* SS12. 138
- 67 Perfil proteico de extratos proteicos de *Shigella sonnei* SS9 - extratos C-30 e C-75 (precipitados em 30 % e 75 % de sulfato de amônio, respectivamente); *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica); *pools* GF1, GF2 e GF3, F10 e F11 (frações 2 a 4; 5 e 6; e 7 a 9, respectivamente e frações 10 e 11 da cromatografia de gel filtração). P, Padrão de massa molecular (*Page Ruler Unstained Broad Range Protein Ladder*, Thermo Scientific). 141
- 68 Teste de atividade *in situ* de extratos proteicos de *Shigella sonnei* SS9 contra *S. sonnei* SS12 - extratos C-30 e C-75, precipitados em 30 % e 75 % de sulfato de amônio, respectivamente; *pool* TI, frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica; *pools* GF1, GF2 e GF3, F10 e F11, frações 2 a 4; 5 e 6; e 7 a 9, respectivamente e frações 10 e 11 da cromatografia de gel filtração; U3-10 e U>10, frações obtidas por ultrafiltração com substâncias de massa molecular entre 3 e 10 kDa e superior a 10 kDa, respectivamente. P, Padrão de massa molecular (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*, Fermentas). 142
- 69 Avaliação da concentração inibitória mínima de *Shigella sonnei* SS9 contra *S. sonnei* SS12. a) extrato proteico intracelular precipitado à concentração de 30 % de sulfato de amônio; b) extrato proteico intracelular precipitado à concentração de 75 % de sulfato de amônio; c) *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica); d) *pool* GF1 (frações 2 a 4 da cromatografia de gel filtração); e) *pool* GF2 (frações 5 e 7 da cromatografia de gel

	filtração); f) <i>pool</i> GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração); g) fração 10 da cromatografia de gel filtração; h) fração 11 da cromatografia de gel filtração; UA/mL, unidades arbitrárias de atividade antagonista/mL; C1-, controle negativo 1; C2-, controle negativo 2; C+, controle positivo.	146
70	Cinética de ação dos extratos C-30, C-75 e <i>pool</i> TI (frações 1 a 7) da cromatografia em coluna de troca iônica. Amostra reveladora: <i>S. sonnei</i> SS12.	148
ANEXO 1	Perfis cromatográficos das frações provenientes da cromatografia de fase reversa em coluna Supelcosil™	190
13	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do <i>pool</i> FR1 (frações 25 e 26 da coluna Poros®). Coluna Supelcosil™ (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q®). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 34 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, a fração 35 apresentou duas massas moleculares.	191
14	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do <i>pool</i> FR2 (frações 27 a 29 da coluna Poros®). Coluna Supelcosil™ (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q®). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 24 e 33 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 24 e 33 apresentaram duas e as frações 37 e 38 apresentaram três massas moleculares.	192

15 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 26 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 32 a 39 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 36, 37 e 38 apresentaram quatro, duas e três massas moleculares, respectivamente.

193

16 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 27 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 33 a 39 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 38 e 39 apresentaram três e quatro massas moleculares, respectivamente.

194

17 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 28 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 33 a 39 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 37 e 38

apresentaram três e uma (7.377.969 Da) massas moleculares, respectivamente.

195

18 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* FR3 (frações 29 e 30 da coluna Poros[®]). Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 32 a 39 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 32 e 37 apresentaram três e as frações 38 e 39 duas massas moleculares.

196

19 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* FR4 (frações 31 a 33 da coluna Poros[®]). Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 33 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 33, 37 e 38 apresentaram duas, três e quatro massas moleculares, respectivamente.

197

20 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 25 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C.

As frações 33 a 39 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 33, 34, 37 e 39 apresentaram quatro, três, quatro e três massas moleculares, respectivamente.

198

21 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 26 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 30 a 40 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 30, 31, 32, 35 e 40 apresentaram duas, uma (7.235.679 Da), três, três e quatro massas moleculares, respectivamente.

199

22 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 27 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 32 a 39 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 32, 34, 35 e 39 apresentaram duas, três, quatro e duas massas moleculares, respectivamente.

200

23 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 28 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-

xxiv

50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 32 a 39 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 32, 38 e 39 apresentaram duas, três e uma (10.761.097 Da) massas moleculares, respectivamente.

201

- 24 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* FR5 (frações 29 e 30 da coluna Poros[®]). Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 32 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 32, 34, 35, 37 e 38 apresentaram uma (7.338.008 Da), quatro, quatro, quatro e três massas moleculares, respectivamente.

202

- 25 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* FR6 (frações 31 e 32 da coluna Poros[®]). Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 30 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 30, 32 e 38 apresentaram duas, uma (7.341.498 Da) e quatro massas moleculares, respectivamente.

203

- 26 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* FR7 (frações 33 a 36 da coluna Poros[®]). Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com

solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q®). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 29 a 37 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 31, 32, 33, 35 e 36 apresentaram duas, duas, três, três e quatro massas moleculares, respectivamente.

204

- 27 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 26 da coluna Poros®. Coluna Supelcosil™ (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q®). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 30 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 30, 34 e 38 apresentaram três, uma (7.279.134 Da) e quatro massas moleculares, respectivamente.

205

- 28 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 27 da coluna Poros®. Coluna Supelcosil™ (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q®). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 30 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 30, 35 e 36 apresentaram duas massas moleculares.

206

- 29 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* FR8 (frações 28 e 29 da coluna Poros®). Coluna Supelcosil™

xxvi

(Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q®). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 30 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 30, 33, 36, 37 e 38 apresentaram três, quatro, três, três e três massas moleculares, respectivamente.

207

30 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* FR9 (frações 30 a 34 da coluna Poros®). Coluna Supelcosil™ (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q®). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 30 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 30 e 32 apresentaram uma (7.877.274 Da) e duas massas moleculares, respectivamente.

208

31 Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 25 da coluna Poros®. Coluna Supelcosil™ (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q®). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 33 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 33, 34 e 35 apresentaram três, quatro e quatro massas moleculares,

xxvii

	respectivamente.	209
32	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 27 da coluna Poros [®] . Coluna Supelcosil [™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q [®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 33 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 33 e 37 apresentaram quatro e três massas moleculares, respectivamente.	210
33	Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do <i>pool</i> FR10 (frações 28 e 29 da coluna Poros [®]). Coluna Supelcosil [™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q [®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 30 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 30, 31, 33, 34 e 38 apresentaram duas, duas, quatro, três e três massas moleculares, respectivamente.	211
ANEXO 2	Espectros de massas das frações provenientes da cromatografia de fase reversa em coluna Supelcosil [™]	212
35	Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 35: massas moleculares de 10.123,861 e 24.552,340 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil [™] - <i>pool</i> FR1 (frações 25 e 26 da cromatografia de fase reversa Poros [®]) - <i>pool</i> GF1 (frações 2 a 4 da cromatografia de gel filtração - <i>pool</i> TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].	213

- 36 Espectro de massas em matriz super DHB da fração 24: massas moleculares de 6.410,649 e 9.535,329 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - *pool* FR2 (frações 27 e 29 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool* GF1 (frações 2 a 4 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica))]. 214
- 37 Espectro de massas em matrizes ácido sinapínico e super DHB, respectivamente, da fração 33: massas moleculares de 10.122,652 e 20.372,986 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - *pool* FR2 (frações 27 e 29 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool* GF1 (frações 2 a 4 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica))]. 215
- 38 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 37: massas moleculares 7.842,672 e 9.396,826 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - fração 26 da cromatografia de fase reversa Poros® - *pool* GF2 (frações 5 e 6 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica))]. 216
- 39 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 38: massa molecular 7.377,969 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - fração 28 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool* GF2 (frações 5 e 6 da cromatografia de gel filtração) - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 217
- 40 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 38: massas moleculares 7.377,502 e 7.811,587 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - *pool* FR3 (frações 29 e 30 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool* GF2 (frações 5 e 6 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica))]. 218
- 41 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 39: massas moleculares 7.378,750 e 9.243,296 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - *pool* FR3 (frações 29 e 30 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool* GF2 (frações 5 e 6 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica))]. 219

- 42 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 33: massas moleculares 6.817,719 e 10.645,063 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - *pool* FR4 (frações 31 a 33 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool* GF2 (frações 5 e 6 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 220
- 43 Espectro de massas em matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico da fração 30: massas moleculares 5.633,748 e 6.401,964 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™- fração 26 da cromatografia de fase reversa Poros® -*pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 221
- 44 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 31: massa molecular 7.235,679 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™- fração 26 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração) - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 222
- 45 Espectro de massas em matrizes ácido sinapínico e super DHB, respectivamente, da fração 32: massas moleculares 7.312,276 e 26.344,106 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™- fração 27 da cromatografia de fase reversa Poros® -*pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 223
- 46 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 32: massas moleculares 7.331,113 e 22.113,503 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™- fração 28 da cromatografia de fase reversa Poros® - *pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 224
- 47 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 39: massa molecular 10.761,097 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™- fração 28 da cromatografia de fase reversa Poros® -*pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 225

- 48 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 32: massa molecular 7.338,008 Da [origem: cromatografia de fase reversa SupelcosilTM - *pool* FR5 (frações 29 e 30 da cromatografia de fase reversa Poros[®]) - *pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 226
- 49 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 30: massas moleculares 5.938,576 e 6.423,931 Da [origem: cromatografia de fase reversa SupelcosilTM - *pool* FR6 (frações 31 e 32 da cromatografia de fase reversa Poros[®]) - *pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 227
- 50 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 32: massa molecular 7.341,498 Da [origem: cromatografia de fase reversa SupelcosilTM - *pool* FR6 (frações 31 e 32 da cromatografia de fase reversa Poros[®]) - *pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 228
- 51 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 31: massas moleculares de 7.279,485 e 7.485,706 Da [origem: cromatografia de fase reversa SupelcosilTM - *pool* FR7 (frações 33 a 36 da cromatografia de fase reversa Poros[®]) - *pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 229
- 52 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 32: massas moleculares de 7.340,294 e 7.547,522 Da [origem: cromatografia de fase reversa SupelcosilTM - *pool* FR7 (frações 33 a 36 da cromatografia de fase reversa Poros[®]) - *pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 230
- 53 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 34: massa molecular de 7.279,134 Da [origem: cromatografia de fase reversa SupelcosilTM - fração 26 da cromatografia de fase reversa Poros[®] - fração 10 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 231
- 54 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 30: massas moleculares de 6.262,065 e 7.896,821 Da [origem:

- cromatografia de fase reversa Supelcosil™ – fração 27 da cromatografia de fase reversa Poros® - fração 10 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 232
- 55 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 35: massas moleculares de 20.721,109 e 24.709,552Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ – fração 27 da cromatografia de fase reversa Poros® - fração 10 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 233
- 56 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 36: massas moleculares de 20.721,109 e 24.728,435 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ – fração 27 da cromatografia de fase reversa Poros® - fração 10 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 234
- 57 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 30: massa molecular de 7.877,274 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™-*pool* FR9 (frações 30 a 34 da cromatografia de fase reversa Poros®) - fração 10 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 235
- 58 Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 32: massas moleculares de 8.126,979 e 10.153,323 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - *pool* FR9 (frações 30 a 34 da cromatografia de fase reversa Poros®) - fração 10 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 236
- 59 Espectro de massas em matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico da fração 30: massas moleculares de 5.664,785 e 6.261,465 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - *pool* FR10 (frações 28 e 29 da cromatografia de fase reversa Poros®) - fração 11 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)]. 237
- 60 Espectro de massas em matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico da fração 31: massas moleculares de 5.663,668 e 6.615,865 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™- *pool* FR10

	(frações 28 e 29 da cromatografia de fase reversa Poros [®]) - fração 11 da cromatografia de gel filtração - <i>pool</i> TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].	238
ANEXO 3	Perfil cromatográfico e espectros de massas das frações provenientes da <i>recromatografia</i> de fase reversa em coluna Supelcosil TM	239
61	Perfil cromatográfico da <i>recromatografia</i> em coluna de fase reversa da fração 35 da coluna Supelcosil ^{TMTM} [origem: fração 25 da fase reversa Poros [®] - <i>pool</i> GF1 (frações 2 a 4) da gel filtração - <i>pool</i> TI (frações 1 a 7) da troca iônica]. Coluna Supelcosil ^{TMTM} (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q [®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. Foram coletadas 5 frações/min, v = 200 µL. Todas as subfrações obtidas a partir das frações 34, 35 e 36 (representadas na figura) apresentaram atividade antagonista, exceto a fração 36.5.	240
62	Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 34.2: massas moleculares de 24.651,918 e 30.860,792 Da [origem: <i>recromatografia</i> de fase reversa Supelcosil TM - fração 35 da cromatografia de fase reversa Supelcosil TM - fração 25 da cromatografia de fase reversa Poros [®]) - <i>pool</i> GF1 (frações 2 a 4 da cromatografia de gel filtração) - <i>pool</i> TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].	241
63	Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 34.3: massas moleculares de 24.670,801 e 30.835,656 Da [origem: <i>recromatografia</i> de fase reversa Supelcosil TM - fração 35 da cromatografia de fase reversa Supelcosil TM - fração 25 da cromatografia de fase reversa Poros [®]) - <i>pool</i> GF1 (frações 2 a 4 da cromatografia de gel filtração) - <i>pool</i> TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].	242

LISTA DE ABREVIATURAS

Arp2/3	<i>Actin-Related Proteins 2/3</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AU	Unidade arbitrária de bacteriocina
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Tool</i>
BSA	Soro albumina bovina
CBM	Concentração bactericida mínima
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
CH ₄	Metano
CIM	Concentração inibitória mínima
CO ₂	Dióxido de carbono
C-30	Extrato proteico intracelular precipitado com 30% de sulfato de amônio
C-75	Extrato proteico intracelular precipitado com 75% de sulfato de amônio
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunossorvente ligado à enzima
EPEC	<i>E.coli</i> enteropatogênica
ESI	<i>Eletrospray</i>
FAO	Organização de Alimentos e Agricultura
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FT-ICR	<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>

HCl	Ácido clorídrico
HFBA	Heptafluorbutírico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
H ₂	Hidrogênio molecular
IcsA	<i>Invasion cellular spread</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgG,	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IpaA	Antígeno plasmidial de invasão A
IpaB	Antígeno plasmidial de invasão B
IpaC	Antígeno plasmidial de invasão C
IpgD	<i>Inositol phosphate phosphatase</i>
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
Mcc	Microcina
MS/MS	Espectro de fragmentação
MRS	deMan, Rogosa e Sharpe
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
m/z	Massa/carga
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde

PCR	Reação de polimerização em cadeia
PITC	Fenil-isotiocianato
PMN	Células polimorfonucleares
PTH	Feniltiohidantoína
Rac 1	Ras-relacionada ao substrato C3 da Toxina botulínica 1
R _f	Mobilidade relativa
RhoGTPase	Proteína que participa da transdução de sinal
RNA	Ácido ribonucleico
RPC	Cromatografia de fase reversa
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
Src	Proteína quinase
SS9	<i>Shigella sonnei</i> produtora de substância antagonista
SS12	<i>Shigella sonnei</i> sensível a expressão antagonista
TFA	ácido trifluoroacético
TOF	<i>Time-of-flight</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
TTC	Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio
T3SS	Sistema de secreção tipo III
UFC	Unidade formadoras de colônia
UV	Ultravioleta
VRE	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina

RESUMO

Shigella, gênero incluído na família Enterobacteriaceae, é responsável pela disenteria bacilar ou shigelose, forma grave de doença diarreica de natureza inflamatória. O quadro acomete, principalmente, crianças com idade inferior a cinco anos que vivem em países menos desenvolvidos, em decorrência de condições de higiene e saneamento básico inadequadas. Bacteriocinas são substâncias com atividade antibacteriana, produzidas por uma gama ampla de microrganismos, inclusive *Shigella*. Uma amostra de *Shigella sonnei* (SS9) isolada de espécime fecal de criança com diarreia aguda, sabidamente produtora de substância antagonista, foi selecionada para o estudo. Frações proteicas intracelulares foram precipitadas a concentrações de 30 % (C-30) e 75 % (C-75) de sulfato de amônio. C-75 foi submetido a etapas sequenciais de cromatografia, que permitiram a obtenção de uma fração ativa purificada e outras frações parcialmente purificadas. A massa molecular da fração ativa purificada, determinada por espectrometria de massas, foi de 7,2 kDa e a comparação da sequência parcial de aminoácidos com proteínas depositadas nos bancos de dados BLAST e BACTIBASE revelou a detecção uma nova bacteriocina. A substância enquadra-se na definição de microcina, classe de bacteriocina ainda não descrita para *Shigella*. SS9 expressou atividade especialmente contra amostras filogeneticamente relacionadas. As análises por SDS-PAGE e teste de atividade *in situ* evidenciaram a produção de mais de uma substância antagonista. Os ensaios para determinação da CIM e CBM confirmaram os resultados dos testes para avaliação do modo de ação da(s) substância(s) antagonista(s), demonstrando ação bactericida de SS9. Em conjuntos, os dados sugerem a síntese de mais de uma colicina e microcina, habilidade que pode conferir à amostra de *S. sonnei* vantagem seletiva tanto contra outras bactérias diarreiogênicas como contra membros da microbiota intestinal indígena, representando, assim, um fator de virulência para o organismo.

Palavras-chave: *Shigella sonnei*, bacteriocinas, microcinas, diarreia aguda.

ABSTRACT

Shigella is the etiologic agent of shigellosis a severe type of inflammatory diarrhea. The disease is prevalent mainly among children aged up to five years that live in underdeveloped countries as a result from poor hygiene and sanitation. Bacteriocins are antibacterial proteinaceous substances synthesized by a wide range of bacteria including *Shigella*. A *Shigella sonnei* isolate (SS9) obtained from fecal specimen of a child with acute diarrhea previously tested for bacteriocin expression was selected for this study. Proteic intracellular fractions precipitated at 30 % (C-30) and 75 % (C-75) of ammonium sulfate were obtained. C-75 was submitted to sequential steps of chromatography that resulted in one purified fraction and some partially purified fractions. The molecular mass of the active fraction as determined by mass spectrometry was 7.2 kDa. The partial amino acid sequence of the substance was analyzed by using BLAST and BACTIBASE databases. The results showed that it corresponds to a new bacteriocin. The antagonistic substance corresponds to a microcin a class of bacteriocins not described for *Shigella* yet. SS9 expressed antagonistic activity mainly against taxonomically related strains. SDS-PAGE and in situ antagonistic activity test demonstrated that SS9 is able to synthesize more than one antagonistic substance. The evaluation of CIM and CBM as well as of the mode of action of the antagonistic substance(s) showed that SS9 exhibited bactericidal activity. Taken together our data suggest the expression of more than one colicin and microcin. It is reasonable to hypothesize that this ability may contribute to the virulence of *S. sonnei* helping in the competition against other enteropathogens or members of the intestinal microbiota.

Keywords: *Shigella sonnei*, bacteriocins, microcins, acute diarrhea.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MICROBIOTA INTESTINAL INDÍGENA

1.1.1 COLONIZAÇÃO E ESTABELECIMENTO DA MICROBIOTA INTESTINAL INDÍGENA

5

No interior do útero, o feto é estéril. A partir do nascimento, o recém-nascido entra em contato com uma gama ampla de microrganismos, que, então, podem colonizar o hospedeiro, por períodos de tempo curtos ou de maneira mais estável, até o estabelecimento da microbiota indígena (Doré & Corthier, 2010; Tiihonen *et al.*, 2010; Reid *et al.*, 2011). Habitualmente, a mãe é a principal fonte de microrganismos, seguida pelo ambiente, enfermeiros, médicos, familiares e alimentos. A aquisição da microbiota é influenciada por diversos fatores, entre eles, tipo de parto (normal ou cesariana), necessidade ou não de cuidados especiais, como isolamento em estufa, tipo de alimentação (amamentação ou fórmula), procedimentos de higiene e administração de drogas antimicrobianas (Nicoli & Vieira, 2004; Tsukumo *et al.*, 2009; Dominguez-Bello *et al.*, 2010; Doré & Corthier, 2010).

De maneira geral, nas primeiras 12 horas após o nascimento, bactérias anaeróbicas facultativas, como *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, são as primeiras a colonizar o intestino, atingindo um nível de dominância nas fezes de 10^9 - 10^{10} UFC/g. Logo após o terceiro dia de vida, os níveis de oxigênio no intestino diminuem e, conseqüentemente, esta comunidade bacteriana também regride, dando lugar para as bactérias anaeróbias obrigatórias, especialmente *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium* e *Clostridium*. Aos dois anos de vida, a microbiota intestinal já se assemelha àquela observada em um indivíduo adulto (Nicoli & Vieira, 2004; Brandt *et al.*, 2012), permanecendo relativamente estável até a terceira idade. Nesta fase, começa a sofrer alterações significativas, influenciada por diversos fatores, destacando-se as deficiências do sistema imunológico (Tiihonen *et al.*, 2010).

Durante a vida, a microbiota intestinal é modulada por fatores externos, como alimentação e uso de antimicrobianos. Embora muitas vezes necessária, a antibioticoterapia não é específica, atuando, também, contra a microbiota

indígena. Quando o indivíduo é tratado com dose única de uma droga antimicrobiana via oral, ela afeta a microbiota intestinal por até quatro semanas. Então, há uma tendência ao restabelecimento da sua composição qualitativa e quantitativa (Vrieze *et al.*, 2010). No entanto, o uso indiscriminado de antimicrobianos pode levar a uma perturbação profunda da microbiota, resultando, inclusive, na eliminação de alguns táxons e permitindo o estabelecimento ou aumento da densidade populacional de organismos resistentes, inclusive bactérias patogênicas. Além disto, marcadores de resistência podem ser transferidos para membros da microbiota indígena, favorecendo o processo de disseminação da resistência a antimicrobianos (Clemente *et al.*, 2012).

1.1.2 O SER HUMANO E A SUA MICROBIOTA

15

O indivíduo adulto é constituído por 10^{14} células, sendo apenas 10% destas do próprio organismo. Os 90% restantes correspondem aos microrganismos que constituem a microbiota indígena, extremamente diversificada, inclusive do ponto de vista genético. O peso desta microbiota é, em média, de 1,2 kg e sua atividade metabólica equivale à do fígado humano (Nicoli & Vieira, 2004; Foxman *et al.*, 2008; Tsukumo *et al.*, 2009).

O corpo humano é praticamente todo colonizado pela microbiota indígena e acredita-se que esta população microbiana coevoluiu com o hospedeiro. O epitélio intestinal de um indivíduo adulto mede cerca de 300 a 400 m² e é o órgão mais densamente colonizado por uma diversidade imensa de microrganismos. O contato físico entre o hospedeiro e a microbiota intestinal ocorre na superfície do epitélio, na camada espessa de muco e nas criptas epiteliais (Neish, 2009; Doré & Corthier, 2010; Garrett *et al.*, 2010; Sekirov *et al.*, 2010). A microbiota presente no lúmen intestinal difere daquela encontrada na camada de muco que, por sua vez, também difere da observada nas imediações do epitélio intestinal.

A microbiota intestinal indígena é composta, predominantemente, por bactérias. Também estão presentes Archaea, leveduras, fungos filamentosos, protozoários e vírus (Breitbart *et al.*, 2008; Foxman *et al.*, 2008; Leser & Molbak,

2009; Virgin *et al.*, 2009; Sekirovet *al.*, 2010; Reid *et al.*, 2011). A comunidade microbiana do intestino alberga pelo menos 150 vezes mais genes do que o encontrado no genoma humano, ou seja, no microbioma intestinal são observados 3,3 milhões de genes não redundantes (Shen *et al.*, 2013). O cólon é o órgão mais densamente colonizado, abrigando, em média, 70% de toda a microbiota indígena (Sekirovet *al.*, 2010).

O sequenciamento do rDNA 16S de material fecal revelou a presença de uma comunidade microbiana complexa, constituída de 100 trilhões de células bacterianas e Archaea distribuídas em mais de 1.000 espécies. A comunidade bacteriana dominante pertence aos filos Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia e, em especial (> 90 %), Firmicutes (Gram positivo) e Bacteroidetes (Gram negativo). No filo Firmicutes, merecem destaque *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium* e *Roseburia*. Já no filo Bacteroidetes, *Bacteroides*, *Prevotella* e *Xylanibacter* merecem menção. Os grupos bacterianos menos prevalentes são Cyanobacteria, Fusobacteria, Lentisphaerae e Spirochaetes. No que se refere a Archaea, há predominância do filo Euryarchaeota (Sekirov *et al.*, 2010; Tremaroli & Bäckhed, 2012).

Bactérias anaeróbicas obrigatórias são mais abundantes, seguidas pelas anaeróbias facultativas e, por último, pelas bactérias aeróbias. Isto se deve, entre outros fatores, à redução dos níveis de oxigênio no órgão (Neish, 2009; Tsukumo *et al.*, 2009; Sekirov *et al.*, 2010).

Desta maneira, a população microbiana difere qualitativamente e quantitativamente ao longo das regiões do trato gastrointestinal. O estômago apresenta pH ácido, fator que contribui para a baixa diversidade e densidade microbiana. Nesta região, a carga bacteriana é baixa (10^1 bactérias/mL de conteúdo) (Sekirov *et al.*, 2010), sendo isoladas, principalmente, bactérias Gram positivas, como *Streptococcus* e *Lactobacillus* (Dunne, 2001).

À medida que se desloca para a porção mais distal do trato gastrointestinal, observa-se elevação do pH e da carga microbiana. O intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) é constituído por tecido epitelial colunar simples com vilosidades e microvilosidades e recoberto por uma camada de muco. No duodeno, jejuno e íleo, a densidade bacteriana é de 10^3 , 10^4 e 10^7 bactérias/mL

de conteúdo, respectivamente. Predominam *Bacillus*, Streptococcaceae, Actinobacteria, Actinomycinaeae e Corynebacteriaceae. O intestino grosso (ceco, cólon, reto e canal anal) apresenta pH próximo da neutralidade. O cólon é colonizado por 10^{12} bactérias/mL de conteúdo, com predominância da classe Bacteroidetes e da família Lachnospiraceae, pertencentes ao filo Firmicutes (Leser & Molbak, 2009; Tsukumo *et al.*, 2009; Sekirov *et al.*, 2010; Tiihonen *et al.*, 2010).

As bactérias encontradas no lúmen intestinal geralmente não têm acesso à camada de muco e ao epitélio intestinal. Entretanto, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* são encontradas no lúmen, na camada de muco e nas criptas epiteliais do intestino delgado. No lúmen, estão presentes, também, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, membros da família Enterobacteriaceae e *Ruminococcus* (Sekirov *et al.*, 2010).

15

1.1.3 RELAÇÃO MUTUALÍSTICA ENTRE A MICROBIOTA INTESTINAL INDÍGENA E O HOSPEDEIRO

A microbiota indígena coevoluiu a milhões de anos com o hospedeiro, produzindo um vínculo necessário, que, na maioria das vezes, é benéfico para ambos. Em seres humanos, especialmente no intestino, estas interações são extremamente relevantes. A microbiota indígena desempenha inúmeras funções essenciais ao longo de toda a nossa vida (Doré & Corthier, 2010).

Os membros da microbiota residente desempenham papel importante na imunomodulação, tanto em nível local como sistêmico. Observa-se que, em animais isentos de germes, as estruturas linfoides locais e sistêmicas ficam comprometidas, o baço e os linfonodos são mal formados, ocorre hipoplasia de placas de Peyer e diminuição do número de linfonodos maduros, o número de células no plasma produtoras de IgA é reduzido, bem como os níveis de IgA e IgG, além de irregularidade na produção de citocinas. A inoculação de bactérias consideradas membros da microbiota indígena, como *Bacteroides fragilis* e *Lactobacillus*, reverte diversos destes efeitos. Também já foi demonstrado que a administração de peptidoglicano de bactérias Gram negativas induz a formação

de folículos linfoides. Estes dados demonstram a importância da microbiota indígena para o desenvolvimento do sistema imune (Sekirov *et al.*, 2010).

Deve-se ressaltar, entretanto, que a microbiota indígena intestinal poderia estimular uma resposta imune local e sistêmica exacerbada. Para controlar esta
5 resposta, o corpo humano conta com uma barreira física entre a massa microbiana e as células epiteliais, a modificação da porção antigênica da microbiota, que a torna menos imunogênica, e a modificação fenotípica das células do sistema imunitário residente, tornando-as mais tolerantes à microbiota residente (Sekirov *et al.*, 2010).

10 A defesa contra microrganismos exógenos potencialmente patogênicos, além de ser exercida pelos sistemas de defesa do próprio hospedeiro, também é função da microbiota indígena. No intestino, os microrganismos residentes secretam substâncias antimicrobianas (como bacteriocinas, ácidos graxos de cadeia curta, peróxido de hidrogênio, antibióticos, ácido lático e ácido acético) e
15 também estimulam o hospedeiro a secretar defensinas, que impedem ou dificultam a instalação de microrganismos exógenos, auxiliam a homeostase e o desenvolvimento intestinal. A microbiota também atua como uma barreira física, devido à enorme densidade populacional e à ligação de muitos destes microrganismos a receptores da mucosa. Para conseguir se instalar, um
20 microorganismo deve driblar esta barreira, suportar a pressão reduzida de oxigênio, resistir à ação dos compostos antimicrobianos sintetizados e competir com a microbiota por espaço e nutrientes (Cursino *et al.*, 2006; Foxman *et al.*, 2008; Barbosa & Rescigno, 2010; Sekirov *et al.*, 2010; Zimmer *et al.*, 2012).

Além de defender o hospedeiro contra possíveis organismos patogênicos,
25 a microbiota do intestino também fornece vitaminas e aminoácidos essenciais ao hospedeiro. No entanto, níveis de biomassa elevados podem levar a deficiências na absorção de nutrientes. Para controlar a população microbiana, o corpo humano apresenta uma série de mecanismos, entre eles o peristaltismo intestinal (Leser & Molbak, 2009; Walter & Ley, 2011). Naturalmente, alguns compostos
30 alimentares, como carboidratos mais complexos e polissacarídeos de plantas, não são degradados no intestino delgado, sendo encaminhados ao intestino grosso, onde são utilizados como nutrientes pela microbiota. Neste ambiente, os organismos residentes fermentam carboidratos, produzindo CO₂, H₂, CH₄ e ácidos

graxos de cadeia curta, principalmente acetato, propionato e butirato, fornecendo energia ao hospedeiro, modulando a inflamação, auxiliando na cicatrização de feridas e auxiliando na motilidade intestinal (Leser & Molbak, 2009; Tremaroli & Bäckhed, 2012).

5 Numa relação mutualística, os benefícios são mútuos. Assim, a microbiota intestinal também se beneficia, em especial, obtendo do hospedeiro nutrientes e *habitat* (Neish, 2009).

10 As contribuições da microbiota intestinal saudável não são restritas ao órgão colonizado. Ela também auxilia no desenvolvimento cardiovascular e do sistema nervoso, atua no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, influenciando o indivíduo na resposta ao estresse, interfere na regulação do humor, do comportamento e do apetite (Sekirov *et al.*, 2010).

15 1.1.4 EFEITOS NEGATIVOS DA MICROBIOTA INTESTINAL

 É importante lembrar o caráter anfibiótico da microbiota indígena. Assim, a presença de uma microbiota intestinal desequilibrada influencia negativamente a saúde do hospedeiro. Podem ser citados, por exemplo, propensão à obesidade, produção de substâncias carcinogênicas como as nitrosaminas, doenças cardiovasculares, autismo, doenças no fígado, fibromialgia, alergia, diabetes, pancreatite, doença inflamatória intestinal, esteatose hepática, febre familiar do Mediterrâneo e encefalopatia hepática mínima (Foxman *et al.*, 2008; Doré & Corthier, 2010; Sekirov *et al.*, 2010).

25 O aumento do número de pessoas acima do peso ou obesas é crescente, de forma que a obesidade é, atualmente, considerada problema de saúde pública. Nos Estados Unidos e na Europa Ocidental, respectivamente, 71 % e 65 % dos homens e 62 % e 56 % das mulheres estão acima do peso ou obesos (Donohoe *et al.*, 2014). Diversos esforços estão sendo empregados na tentativa para
30 diminuir a incidência de obesidade na população mundial e a microbiota intestinal pode ser uma aliada nesta conquista. Por outro lado, deve-se ressaltar que, em populações com baixa disponibilidade de alimentos, a ação da microbiota pode contribuir para a obtenção de energia pelo hospedeiro.

Estudos em modelos animais e dados obtidos em seres humanos demonstraram que indivíduos obesos apresentam uma maior população de bactérias do filo Firmicutes e uma menor população do filo Bacteroides (Dibaise *et al.*, 2008; Raoult., 2008; Tsukumo *et al.*, 2009; Tremaroli & Bäckhed, 2012). Desta forma, a microbiota intestinal pode atuar de maneira negativa em populações com grande disponibilidade de alimento, levando os indivíduos à obesidade.

A esteatose hepática, acúmulo de triglicerídeos nas células do fígado, também pode estar associada à microbiota indígena, como mencionado. Colina, importante componente da membrana celular, é adquirida através da ingestão de ovos e carne vermelha, além de ser sintetizada pelo hospedeiro. Ela é importante para o metabolismo de lipídios e síntese de lipopoliproteínas no fígado. Níveis baixos desta substância estão associados com desequilíbrio da ecologia microbiana e esteatose hepática em camundongos e seres humanos. Observa-se, em amostras fecais de indivíduos com esteatose hepática, menor proporção de Gammaproteobacteria e nível mais elevado de *Erysipelotrichi*. A atividade enzimática do hospedeiro e microbiana atua na transformação da colina em metilaminas tóxicas. Assim, a trimetilamina que é produzida pelos microrganismos intestinais é metabolizada no fígado, sendo transformada em N-óxido de trimetilamina. A transformação diminui a disponibilidade de colina, o que pode levar à esteatose hepática não alcoólica em camundongos. Ainda, níveis de N-óxido de trimetilamina e de seus metabólitos no plasma estão correlacionados a doenças cardiovasculares (Tremaroli & Bäckhed, 2012).

A inflamação dos tecidos adiposos está relacionada com obesidade, resistência a insulina e diabetes tipo 2. Uma dieta rica em lipídios modula a população microbiana intestinal levando à redução de bifidobactérias e elevação de bactérias Gram negativas, que, em última análise, leva ao aumento de LPS no plasma, ganho de peso corporal, aumento de triglicerídeos no fígado e diabetes. Desta forma, a microbiota intestinal pode afetar o metabolismo do hospedeiro, levando à inflamação do tecido adiposo (Cani & Delzenne, 2007; Vrieze *et al.*, 2010; Tremaroli & Bäckhed, 2012).

Ainda, a microbiota intestinal juntamente com o sistema imune inato pode levar à predisposição ao desenvolvimento de diabetes tipo 1. Crianças com elevado risco genético de desenvolver a doença apresentam diferenças na

composição da microbiota intestinal, menor diversidade microbiana ao longo do tempo e maior abundância relativa de *Bacteroides ovatus* e linhagem de Firmicutes CO19 (Clemente *et al.*, 2012).

5

1.2 ENTERITE INFECCIOSA AGUDA

10 O tecido epitelial do intestino possui capacidade de renovação celular acelerada, que, juntamente com a integridade tecidual, as bactérias residentes e a resposta imune inata, atua como barreira contra microrganismos exógenos (Ogawa *et al.*, 2008; Garrett *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010). O intestino, em condições normais, absorve, diariamente, cerca de oito a nove litros de fluidos, dos quais, aproximadamente, 100 a 200 mL são eliminados nas fezes (Hodges & Gill, 2010). Quando um microrganismo enteropatogênico é capaz de driblar as defesas do hospedeiro e colonizar o intestino, desenvolve-se o quadro denominado enterite infecciosa aguda (Ogawa *et al.*, 2008; Pawlowski *et al.*, 2009).

20 A principal manifestação clínica da doença é a diarreia, caracterizada pelo aumento do volume fecal e do número de evacuações e pela perda de consistência das fezes, que podem ou não conter sangue, muco e pus (Hodges & Gill, 2010; Ministério da Saúde, 2012). Sinais e sintomas como náusea, vômito, febre e dor abdominal podem ser observados. O curso da doença é autolimitado, durando, habitualmente, de dois a 14 dias (Ministério da Saúde, 2012).

25 A doença diarreica tem taxas de morbidade e mortalidade mais elevadas entre crianças com idade inferior a cinco anos, que vivem em países menos desenvolvidos, o que não descarta sua ocorrência em todo o mundo. Isto se dá, principalmente, devido à falta de água potável, más condições de higiene, saneamento básico precário, desnutrição e cuidados médicos ineficientes (Podewils *et al.*, 2004; Schroeder & Hilbi, 2008; Bonkougou *et al.*, 2013).
30 Indivíduos imunocomprometidos, como aqueles infectados por HIV, apresentam maior chance de instalação do quadro diarreico e de duração mais prolongada da doença (Podewils *et al.*, 2004; Pawlowski *et al.*, 2009).

A doença diarreica pode ter caráter não infeccioso ou infeccioso. A enterite infecciosa pode ser de natureza não inflamatória (aquosa) ou inflamatória. A diarreia aquosa acomete, caracteristicamente, o intestino delgado, levando ao aumento da secreção de cloretos, diminuição da absorção de sódio e aumento da permeabilização da mucosa. Os agentes etiológicos mais comumente associados ao quadro são *Escherichia coli* enterotoxigênica, *E. coli* enteropatogênica e *Vibrio cholerae*. Destacam-se, ainda, *Rotavirus*, principal agente diarreio gênico em todo o mundo e *Norovirus*, além dos protozoários *Giardia lamblia*, *Isospora belli* e *Cryptosporium parvum* (Lima, 2004; Sogayar & Guimarães, 2004; Navaneethan & Gianella, 2008; Pawlowski *et al.*, 2009; Hodges & Gill, 2010).

A diarreia inflamatória acomete, preferencialmente, o íleo e o cólon, com presença de leucócitos nas fezes, estando associada a microrganismos citotoxigênicos ou invasivos. As bactérias de maior importância na gênese do processo são *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Clostridium difficile*, *E. coli* enteroinvasora, *E. coli* enteroagregativa e o protozoário *Entamoeba histolytica* (Podewils *et al.*, 2004; Silva & Gomes, 2004; Navaneethan & Gianella, 2008; Pawlowski *et al.*, 2009; Reis & Horn, 2010).

Os agentes diarreio gênicos dispõem de uma série de mecanismos sofisticados, que constituem seu conjunto de habilidades de virulência, que favorecem a colonização e a agressão ao hospedeiro. Estes agentes devem ser capazes de contornar as defesas não específicas do hospedeiro, resistindo à acidez estomacal, ao peristaltismo intestinal, ao ambiente anaeróbio, à descamação das células mucosas, ao muco intestinal e à ação de substâncias antibacterianas, como bacteriocinas. Eles devem, ainda, possuir receptores específicos que possibilitem a adesão às células epiteliais do intestino, além da capacidade de colonizar a célula alvo. Esta colonização pode ser invasiva ou não, dependendo das características de cada agente (Reis & Horn, 2010).

Pacientes com formas mais graves de doença diarreica devem ser encaminhados a centros de saúde e hospitais, para diagnóstico do agente etiológico da doença e tratamento. O profissional deve realizar uma anamnese detalhada, obtendo, entre outras, informações relativas a idade do paciente, duração do episódio de diarreia, características das fezes, frequência e volume das evacuações, associação com outras manifestações clínicas, local e condições

de residência, viagens recentes a locais endêmicos, utilização de medicamentos, histórico de outras doenças relacionadas ou que possam interferir no curso da doença diarreica, alergia alimentar, hipertensão arterial sistêmica, doenças cardíacas e hepáticas e desidratação (Ministério da Saúde, 2009). Após
5 avaliação, a amostra fecal do paciente é coletada e encaminhada adequadamente ao laboratório, com vistas ao diagnóstico etiológico do processo.

O diagnóstico das doenças entéricas de origem bacteriana é baseado na observação macro e microscópica das colônias cultivadas em meio de cultura seletivo e diferencial, somado a ensaios bioquímicos e sorológicos, os últimos,
10 atualmente, pouco relevantes, investigação da suscetibilidade da bactéria a drogas antimicrobianas e investigação de fatores de virulência ou toxinas quando há presença de surtos. Embora pouco utilizados na rotina, PCR também pode contribuir de forma importante na determinação do agente etiológico (Niyogi, 2005; Pawlowski *et al.*, 2009).

15 A investigação etiológica de quadros associados a parasitas baseia-se na observação microscópica do agente etiológico e de ovos do parasita. ELISA também pode ser empregado, como na investigação de *Giardia* e *Cryptosporidium*, além da análise utilizando PCR, que é uma técnica sensível, porém raramente empregada na rotina clínica (Pawlowski *et al.*, 2009).

20 A identificação de vírus entéricos, como *Rotavirus*, pode ser conduzida por ELISA e aglutinação de látex. Entretanto, quando há ocorrência de surtos envolvendo, por exemplo, *Norovirus*, técnicas de genética molecular podem ser empregadas (Pawlowski *et al.*, 2009).

Para o tratamento de pacientes com doença diarreica aguda, é
25 necessário observar se o paciente apresenta sinais de desidratação e desequilíbrio eletrolítico, manifestações que podem levar ao óbito. A terapia de reidratação varia de acordo com a gravidade da doença. É recomendada, na maioria dos casos, a administração de chá, suco, solução de sais de reidratação oral e soro caseiro. Para lactantes, utiliza-se o leite materno e, para pacientes
30 com formas mais graves da doença, indica-se reidratação venosa. Antibioticoterapia é recomendada apenas em casos específicos (Niyogi, 2005; Ministério da Saúde, 2009).

Como mencionado, a doença diarreica aguda relaciona-se a condições socioeconômicas e culturais precárias. Fatores como falta de água potável e tratamento inadequado de esgoto são determinantes para a maior prevalência do quadro nas regiões menos favorecidas do planeta. Assim, estratégias efetivas para prevenção da doença incluem medidas socioeducativas que orientem procedimentos de higiene adequados, bem como ressaltem a importância da amamentação de crianças com idade inferior a dois anos (Niyogi, 2005).

10 1.3 *Shigella*

1.3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

15 Em 1897, Kiyoshi Shiga trabalhou em um surto de disenteria no Japão. Ele estudou amostras fecais de 36 pacientes, isolando, a partir das mesmas, um bastonete Gram negativo, capaz de fermentar a dextrose, indol e manitol negativo (Niyogi, 2005; Sasakawa, 2010). O pesquisador demonstrou que o microrganismo era inativado pelo soro dos pacientes que apresentaram quadro de diarreia e que
20 era capaz de produzir toxina, posteriormente denominada toxina Shiga (Niyogi, 2005). Nos anos seguintes, os pesquisadores Flexner, Boyd e Sonne observaram bactérias similares e, na edição de 1930 do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, o gênero foi nomeado *Shigella* (Niyogi, 2005; Sasakawa, 2010). Em 1940, foi proposta a classificação das amostras de *Shigella* em quatro espécies,
25 *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei* (Beld & Reubsat et al., 2011).

Membro do filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Enterobacteriales, família Enterobacteriaceae, o gênero *Shigella* é constituído por bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos, imóveis, não capsulados e incapazes de fermentar a lactose (World Health Organization, 1999; Jennison &
30 Verma; 2004; Niyogi, 2005; Phalipon & Sansonetti, 2007; Vinh et al., 2009; Marteyn et al., 2012). Não expressam adesinas conhecidas e não formam biofilme (Carayol & Nhieu, 2013). As espécies podem ser distinguidas com base em provas bioquímicas e sorológicas. *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae* e *S.*

boydii são também conhecidas como sorogrupos A, B, C e D e incluem 1, 14, 15 e 20 sorotipos, respectivamente (Marteyn *et al.*, 2012). Os sorotipos são identificados com base em variações do antígeno O, que é componente do lipopolissacarídeo presente na membrana externa da bactéria. *S. sonnei* apresenta reação positiva para β -D-galactosidase e ornitina descarboxilase, o que a difere das demais espécies do gênero (World Health Organization, 1999; Niyogi, 2005; Phalipon & Sansonetti, 2007; Vinh *et al.*, 2009; Marteyn *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2014).

10

1.3.2 ENTERITE INFECCIOSA AGUDA ASSOCIADA A *Shigella*

Shigella é agente da disenteria bacilar ou shigelose, um importante problema de saúde pública, principalmente em países menos desenvolvidos. Anualmente, a doença acomete cerca de 165 milhões de indivíduos em todo o mundo, com uma taxa de 14.000 óbitos, a maioria, de crianças (Parsot, 2005; Sousa *et al.*, 2010; Dickenson *et al.*, 2013; Joh *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2014). Acredita-se que a estimativa pode estar subestimada, uma vez que, muitas vezes, o paciente não procura ou não consegue atendimento médico, especialmente, em países menos desenvolvidos, e ainda que atendido, com frequência a investigação etiológica não é realizada (Joh *et al.*, 2013).

20

A dose infectante do organismo é baixa, sendo necessários apenas 10 a 100 células bacterianas para o estabelecimento da doença, que acomete, exclusivamente, seres humanos e primatas não humanos, únicos reservatórios conhecidos do microrganismo (Jennison & Verma, 2004; Niyogi, 2005; Shim *et al.*, 2007; Sasakawa, 2010; Mokhtari *et al.*, 2012; Carayol & Nhieu, 2013; Kim *et al.*, 2013). A transmissão ocorre principalmente pela rota fecal-oral, via ingestão de água e alimentos contaminados. Também pode ocorrer transmissão pessoa-pessoa. A aglomeração, como aquela observada em creches, asilos e penitenciárias, favorece a disseminação da doença. Ainda, a mosca *Musca domestica* é considerada vetor do microrganismo (Jennison & Verma, 2004; Niyogi, 2005; Mokhtari *et al.*, 2012; Nygren *et al.*, 2012; Barry *et al.*, 2013; Joh *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2014).

30

Crianças com idade inferior a cinco anos são mais suscetíveis à shigelose (Carayol & Nhieu, 2013; Kim *et al.*, 2013). Nunes *et al.* (2012) observaram que, em áreas endêmicas, a prevalência da doença era maior em crianças com faixa etária de 6 a 24 meses, provavelmente, porque nesta faixa etária a microbiota
5 esta sendo implantada e, portanto, não atua de forma efetiva na proteção contra o patógeno. E ainda, nos primeiros seis meses de vida, a criança recebe leite materno, fator protetor, além de ficar mais confinada ao lar. Após esta idade, a criança, com o sistema imunológico ainda imaturo, passa a ter maior contato com o organismo. Conseqüentemente, desenvolve a doença mais comumente, até
10 obter imunidade contra o microrganismo enteropatogênico que circula na região.

Quando infectado por *Shigella*, o indivíduo pode apresentar desde diarreia aquosa leve, que dura cerca de 5 a 7 dias, até um quadro grave de diarreia inflamatória, com abscessos e ulcerações na mucosa, caracterizado por cólicas abdominais, anorexia, vômitos, febre e fezes mucossanguinolentas contendo
15 eritrócitos e células polimorfonucleares (Niyogi 2005; Phalipon & Sansonetti, 2007; Nygren *et al.*, 2012; Marteyn *et al.*, 2012; Carayol & Nhieu, 2013). Nos casos de diarreia aquosa causada por *Shigella*, observa-se a atuação de enterotoxinas no jejuno. Já a diarreia mucossanguinolenta é resultante da capacidade do microrganismo de invadir e se multiplicar no epitélio do cólon e
20 reto, provocando uma resposta inflamatória importante. Existem relatos de pacientes que para os quais foram observados mais de 20 episódios evacuatórios por dia (Barry *et al.*, 2013).

Crianças desnutridas estão mais sujeitas a reinfecção, o que pode comprometer seu desenvolvimento. Indivíduos imunocomprometidos, como
25 pacientes HIV positivos, tendem a apresentar quadros mais graves, diarreia recorrente ou persistente e, inclusive, bacteremia (Niyogi, 2005; Parsot, 2005; Phalipon & Sansonetti, 2007; Sasakawa, 2010; Nygren *et al.*, 2012). Podem haver complicações como perfurações intestinais, síndrome hemolítico-urêmica, pneumonia, convulsões, encefalopatias e septicemia (Jennison & Verma, 2004;
30 Marteyn *et al.*, 2012; Barry *et al.*, 2013).

S. flexneri, *S. sonnei* e *S. dysenteriae* tipo 1 são os principais agentes da shigelose, enquanto que a ocorrência de *S. boydii* não é relatada com frequência e restringe-se ao subcontinente indiano. *S. dysenteriae* tipo 1 é mais comum no

sul da Ásia e no sul do Saara, sendo produtora da citotoxina denominada shiga, relacionada à evolução para síndrome hemolítico-urêmica, complicação grave da doença diarreica. Historicamente, *S. sonnei* é predominantemente encontrada em países industrializados e *S. flexneri*, observada mais comumente em regiões
5 menos desenvolvidas (Podewils *et al.*, 2004; Sur *et al.*, 2004; Niyogi, 2005; Phalipon & Sansonetti, 2007; Nunes *et al.*, 2012; Nygren *et al.*, 2012; Barry *et al.*, 2013). Atualmente, *S. sonnei* emergiu como um problema em todo o mundo, sendo responsável por muitos casos de shigelose em países menos desenvolvidos, provavelmente devido à melhoria da qualidade de vida destas
10 populações (Holt *et al.*, 2012).

As razões para o predomínio de *S. sonnei* e *S. flexneri* em regiões mais e menos desenvolvidas, respectivamente, ainda não são completamente esclarecidas. Uma possível explicação para a baixa frequência de diarreia associada a *S. sonnei* em regiões menos desenvolvidas é a possibilidade de o
15 LPS de *Plesiomonas shigelloides* sorotipo 17, idêntico ao de *S. sonnei*, conferir imunização cruzada contra *S. sonnei*. *P. shigelloides* também é uma enterobactéria, encontrada, principalmente, em águas não tratadas de ambientes tropicais. Como em países menos desenvolvidos, o consumo de água não tratada é relativamente comum, a ingestão de *P. shigelloides* poderia conferir proteção
20 contra infecção por *S. sonnei*. De fato, em um estudo realizado em águas naturais em Bangladesh, evidenciou-se a presença de 100 UFC/mL de *P. shigelloides* durante todo o ano. Assim, se um indivíduo consome 1 L desta água por dia, a carga microbiana seria de 10^5 UFC, suficiente para atuar como uma vacina natural, imunizando o indivíduo contra *S. sonnei*. Como o desenvolvimento
25 econômico envolve a melhoria da qualidade da água, permitindo o acesso da população a água tratada, a ingestão de *P. shigelloides* seria interrompida e, conseqüentemente, a população voltaria a ser suscetível a *S. sonnei* (Sayeed *et al.*, 1992; Sack *et al.*, 1994).

Ainda, alguns estudos demonstram que *S. sonnei* surgiu na Europa, a
30 partir de um ancestral comum, há cerca de 500 anos. A partir daí, teria se disseminado entre os continentes a poucas décadas. O fato pode, também, explicar a predominância da bactéria em alguns países (Holt *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2013).

Nos Estados Unidos, estudos demonstram que *S. sonnei* é o agente de mais de 70 % dos casos de shigelose. Há padrão sazonal, com maior número de casos de junho a outubro (verão-outono) e menor número de dezembro a janeiro (inverno) (Joh *et al.*, 2013). Na Coreia, a frequência da espécie é de 65 % e o período de maior incidência é o verão (Kim *et al.*, 2013). No Brasil, há maior prevalência de *S. sonnei* nas regiões mais desenvolvidas, como no Sudeste, enquanto *S. flexneri* é mais frequente nas regiões menos favorecidas economicamente, como no Nordeste do País (Sousa *et al.*, 2010).

Em Belo Horizonte, Minas Gerais, *S. sonnei* é responsável por quase 90 % dos casos da doença, observada, principalmente, no verão e no outono. Em Teresina, Piauí, o agente etiológico predominante é *S. flexneri* (cerca de 80 %), com maior prevalência nos meses chuvosos. O aumento do número de casos de shigelose nestes períodos sazonais pode ser explicado pela prática recreativa em águas contaminadas com o patógeno ou pelo contato com água contaminada devido ao período chuvoso (Nunes *et al.*; 2012; Sousa *et al.*, 2013 b).

Casos menos graves de shigelose podem ser tratados com hidratação por via oral e alimentação balanceada. Entretanto, sugere-se antibioticoterapia com o intuito de se reduzir a duração e a gravidade do quadro, além de limitar a disseminação da bactéria (Nunes *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2014).

Resistência a drogas antimicrobianas, inclusive perfil de resistência múltipla, vem sendo descrito para *Shigella*. A característica está relacionada a hábitos da população em relação ao consumo abusivo do medicamento e à localização geográfica, e pode dificultar a abordagem terapêutica em determinadas situações. Taxas de resistência a drogas mais elevadas são, usualmente, descritas para países em desenvolvimento. Na Ásia, por exemplo, são observadas taxas elevadas de resistência a ciprofloxacina, considerada droga de escolha para tratamento de pacientes com shigelose. No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza a utilização do sulfametoxazol-trimetoprim como droga de escolha. Entretanto, em diferentes regiões do País, a elevação das taxas de resistência ao antimicrobiano tem sido relatada. Como segunda opção terapêutica, recomenda-se o emprego de quinolonas, contraindicada para gestantes e crianças (Marteyn *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2012; Sousa *et al.*; 2012; Barry *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2014).

A Organização Mundial de Saúde estimula o desenvolvimento de vacina contra a shigelose. Entretanto, esta é uma tarefa difícil, inclusive pela falta de um modelo animal que simule a doença diarreica que acomete o ser humano. Modelos alternativos, como pneumonia por inoculação intranasal em camundongos e ceratoconjutivite por infecção ocular em cobaias têm sido propostos. Apenas em macacos, é possível o desenvolvimento experimental da disenteria bacilar típica (Shim *et al.*, 2007).

Em razão da discussão relativa à similaridade entre o LPS de *S. sonnei* e *P. shigelloides*, o organismo tem sido considerado candidato a vacina. Alguns resultados já obtidos reforçam esta possibilidade (Sayeed *et al.*, 1992). Outras pesquisas utilizaram linhagens vivas atenuadas de *Shigella* e moléculas glicoconjugadas. Ainda, o *The Global Enteric Multicenter Study* (GEMS) e dados da literatura sugerem o desenvolvimento de vacina quadrivalente para o gênero, contendo a linhagem atenuada ou antígenos de *S. sonnei* e *S. flexneri* 2a, 3a e 6, que atuaria contra cerca de 65% das linhagens circulantes. Há, também, a sugestão de inclusão de *S. dysenteriae* tipo 1, com o intuito de prevenir uma possível pandemia no futuro (Barry *et al.*, 2013).

20 1.3.3 ESTRATÉGIAS DE VIRULÊNCIA DE *Shigella*

A biologia de *Shigella*, incluindo sua forma de sobrevivência no ambiente, ainda não está completamente esclarecida. Para conseguir estabelecer a infecção, a bactéria deve ser capaz de sobreviver a condições variadas de temperatura, osmolaridade, pH e tensão de oxigênio. Para isto, ela dispõe de um grande plasmídio de virulência, que a auxilia na adaptação fisiológica, no processo de invasão e na disseminação (Porter & Dorman, 1994; Marteyn *et al.*, 2012; Carayol & Nhieu, 2013). A expressão dos genes de virulência depende de diversos estímulos. Assim, os genes são ativados quando seus produtos são necessários e permanecem reprimidos quando eles não serão utilizados. O mesmo ocorre com o gene associado a invasão, expresso apenas no interior do hospedeiro (Porter & Dorman, 1994).

No ambiente, em temperatura em torno de 25 a 30 °C, os genes de virulência não são expressos; o repressor H-NS inibe o regulador transcricional VirF que, por sua vez, inibe VirB, que controla a expressão do óperon que codifica os genes de virulência. Em contrapartida, em temperatura corpórea, o repressor H-NS é incapaz de inibir VirF, permitindo a expressão de um conjunto de genes de virulência (Marteyn *et al.*, 2012). Também a osmolaridade controla a expressão da virulência de *Shigella*. Por exemplo, em ambientes com baixa osmolaridade (água doce, por exemplo), o gene de virulência permanece reprimido. Em ambiente de alta osmolaridade, o repressor H-NS não inibe VirF que, por sua vez, ativa a expressão dos genes de virulência *ipaS*, *icsA* e *mxiC* (Porter & Dorman, 1994; Marteyn *et al.*, 2012; Carayol & Nhieu, 2013).

Shigella tem acesso ao hospedeiro via ingestão de alimentos ou água contaminados. A bactéria atravessa o tubo digestivo, deslocando-se em direção às células M das placas de Peyer do cólon, pelas quais o organismo tem tropismo (Corr *et al.*, 2007). Durante o trajeto, resiste ao pH extremamente ácido do estômago, pela ativação de RpoS (fator sigma S da RNA polimerase), que controla a expressão de *hdeAB*. Este codifica as proteínas tipo chaperonas HDEA e HDEB, que medeiam a resistência bacterina a valores baixos de pH (Marteyn *et al.*, 2012; Carayol & Nhieu, 2013). A seguir, o pH atinge valores próximos à neutralidade no intestino delgado, chegando a levemente alcalino no intestino grosso. O potencial redox sobe de -150 mV para -250 mV nos sítios mencionados (Marteyn *et al.*, 2012; Zimmer *et al.*, 2012).

No que se refere à resistência a concentrações baixas de oxigênio, como observado no intestino, uma das estratégias utilizadas por *Shigella* é a ativação do regulador transcricional RNF, que controla as mudanças metabólicas necessárias para a sobrevivência da bactéria em condições anaeróbias (Marteyn *et al.*, 2012; Carayol & Nhieu, 2013).

Shigella coloniza o órgão alvo e atravessa a espessa camada de muco. O mecanismo ainda não está bem elucidado, mas, propõe-se que a bactéria tem a capacidade de desorganizar e romper esta camada. Os processos de adesão e invasão da célula M são iniciados através da síntese de algumas proteínas estruturais e efetoras. O sistema de secreção tipo III, que possui um formato tipo seringa, é codificado por um grande *óperon*, de cerca de 20 a 40 kb, inserido em

uma ilha de patogenicidade presente no plasmídeo de virulência (Farfán *et al.*, 2011; Marteyn *et al.*, 2012). O regulador transcricional MxiE ativa especificamente a expressão de um conjunto de efetores (*ospB*, *ospC1*, *ospE2*, *ospF*, *virA* e *ipaH*) que, por sua vez, ativa o T3SS. Assim, ocorre o contato direto entre *Shigella* e a
5 célula M do hospedeiro (Reis & Horn; 2010; Marteyn *et al.*, 2012; Dickenson *et al.*, 2013).

T3SS secreta as proteínas IpaB e IpaC que interagem com a membrana celular do hospedeiro, formando poros (Reis & Horn; 2010; Dickenson *et al.*; 2013). IpaC ativa Cdc42 que, por sua vez, ativa Rac 1, que induz a alongação de
10 filopódio e lamelopódio. IpaC também ativa RhoGTPase e, juntamente com a tirosina kinase Src, ativa cortactina, o que leva à reorganização dos filamentos de actina do hospedeiro. A despolimerização dos microtubulos é ativada por VirA, que atua em RhoGTPase. IpaA interage com a proteína de adesão vinculina, induzindo a despolimerização de actina. IpgD, secretado por T3SS, desacopla a
15 membrana plasmática do citoesqueleto de actina, levando a extensão da membrana. Ocorre, então, rearranjo dos microtúbulos, levando à indução da macropinocitose bacterina pela membrana apical da célula M (Reis & Horn; 2010).

Em seguida, *Shigella* é exocitada pela membrana basal da célula M para os macrófagos residentes, que sintetizam moléculas antimicrobianas. Para
20 escapar destas substâncias, *Shigella* utiliza o magnésio para ativar PhoP/PhoQ, que ativa a transcrição de genes de virulência, impedido a atuação das substâncias antimicrobianas contra *Shigella* (Moss *et al.*; 2000; Marteyn *et al.*; 2012).

A apoptose do macrófago é induzida pela ativação da caspase I, que ativa
25 a maturação e liberação das interleucinas IL-1, IL-1 β e IL18, levando à indução da resposta inflamatória e o recrutamento das células polimorfonucleares para o local da infecção. O processo de morte dos macrófagos ocorre, em média, quatro horas após a infecção. Com a apoptose dos macrófagos, o microrganismo consegue escapar e induz a liberação de IL-8 nas células epiteliais, o que
30 desencadeia uma intensa resposta inflamatória e recruta células polimorfonucleares (PMN) para as áreas subepiteliais. As PMN migram para o revestimento epitelial, indo ao encontro do patógeno no lúmen. O influxo das PMN rompe as junções intracelulares, comprometendo a integridade do epitélio celular

e, assim, favorecendo a entrada de *Shigella* do lúmen para a submucosa e vice-versa. Este mecanismo independente de Célula M leva a disseminação local do microrganismo (Jennison & Verma, 2004; Shim *et al.*, 2007; Schroeder & Hilbi, 2008; Ogawa *et al.*, 2008; Sasakawa, 2010).

5 Outro mecanismo de disseminação de *Shigella* após a apoptose do macrófago ocorre pela adesão da bactéria à porção basolateral das células epiteliais e secreção de proteínas através de T3SS. IpaC polimeriza actina da célula epitelial, IpgD dissocia a membrana plasmática do citoesqueleto de actina, VirA desestabiliza os microtúbulos e IpaA, juntamente com a vinculina,
10 despolimeriza a actina. *Shigella*, então, é engolfada pelas projeções celulares. Dentro do vacúolo, a bactéria secreta IpaB e IpaC, que promovem a lise e liberação da bactéria no citoplasma, onde ela se multiplica. A proteína IcsA, também conhecida como VirG, ativa a proteína do hospedeiro N-WASP e o complexo Arp2/3, que se acumulam em um dos polos da célula, promovendo a
15 polimerização de um filamento de actina na extremidade bacteriana. A cauda de actina fornece propulsão à bactéria através do citoplasma. Quando *Shigella* encontra a membrana plasmática, ocorre aumento da força de contato. As membranas são lisadas pelas interações das proteínas IpaB e IpaC, liberando *Shigella* para o interior da célula adjacente. Assim, o patógeno dissemina-se
20 lateralmente e, também, fica protegido das defesas extracelulares do hospedeiro, mostrando que a disseminação lateral é um importante mecanismo de patogênese da bactéria (Jennison & Verma, 2004; Shim *et al.*, 2007; Schroeder & Hilbi, 2008; Ogawa *et al.*, 2008; Sasakawa, 2010; Ireton, 2013).

25

1.4 BACTERIOCINAS

1.4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

30

O primeiro relato da inibição bacteriana por uma substância antagonista produzida por bactéria foi feito em 1877 por Pasteur e Joubert. Os pesquisadores

observaram a inibição de *Bacillus anthracis* por uma amostra de *E. coli* isolada da urina (Rea *et al.*, 2011). Mais tarde, Gratia, em 1925, identificou uma substância termolábil em cultura de *E. coli* V, capaz de atuar contra *E. coli* S, a qual denominou colicina V e, hoje, é conhecida como microcina V (Gillor *et al.*, 2009).

5 Posteriormente, outras substâncias aparentemente similares foram descritas para várias espécies bacterianas, tanto incluídas na família Enterobacteriaceae, como em outros grupos. Então, Jacob *et al.* (1952) propuseram o termo bacteriocina, que passou a ser utilizado com mais frequência a partir dos estudos de Tagg *et al.* (1976) e Klaenhammer (1988). Os autores
10 pesquisaram, em especial, substâncias proteicas com atividade biológica principalmente contra amostras filogeneticamente relacionadas (Daw & Falkiner, 1996; Rea *et al.*, 2011; Rebuffat, 2011a).

 Algumas diferenças entre os antibióticos clássicos e as bacteriocinas podem ser relatadas. As bacteriocinas são sintetizadas pela maquinaria
15 ribossomal, apresentam espectro de ação mais limitado, atuando, mais frequentemente, contra espécies geneticamente próximas à linhagem produtora, e são ativas em concentrações muito baixas, na faixa de nanomolar. Já os antibióticos clássicos são sintetizados por enzimas, atuam, habitualmente, contra uma gama mais ampla de bactérias, demonstrando extenso espectro de ação, e
20 são ativas em concentrações superiores, em geral, concentrações micromolares (Nes, 2011; Rebuffat, 2011a; Rebuffat, 2012).

 A síntese de bacteriocinas é uma habilidade bastante disseminada entre Eubacteria e Archaeobacteria. É comum a expressão de mais de uma bacteriocina, já tendo sido relatada a síntese de dezenas ou até mesmo centenas de tipos
25 diferentes deste agente antagonista por uma mesma espécie (Riley, 2011).

 Sabe-se que estas proteínas bioativas constituem um grupo bastante diversificado no que se refere a massa molecular, alvo microbiano, modo de ação, liberação e mecanismos de imunidade. Elas são capazes de reconhecer e interagir com receptores específicos presentes na superfície da célula alvo,
30 possibilitando a penetração para o meio intracelular. Então, as bacteriocinas interferem na estrutura e biossíntese da parede celular, provocam a degradação inespecífica do DNA, inibem a síntese proteica ou levam à formação de poros e à permeabilização da membrana celular (Gillor *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2010;

Majeed *et al.*, 2011; Rebuffat, 2011b; Reid *et al.*, 2011; Riley, 2011; Bakkal *et al.*, 2012).

As bacteriocinas exercem papel relevante nas relações inter e intraespecíficas, influenciando a diversidade microbiana, e podem representar
5 fator de virulência importante para a bactéria produtora (Gillor *et al.*, 2009; Šmajš
et al., 2010; Majeed *et al.*, 2011; Rebuffat, 2011b; Bakkal *et al.*, 2012; Šmajš *et al.*,
2012). Em estudo que investigou 411 amostras de *E. coli* isoladas de pacientes
com infecção intestinal, observou-se que 55% delas produziam bacteriocinas,
sugerindo que a característica facilitaria a colonização deste ambiente. Em
10 contrapartida, a substância pode atuar como arma de defesa de bactérias
endógenas, protegendo o hospedeiro contra o estabelecimento de amostras
exógenas potencialmente patogênicas (Šmajš *et al.*, 2010; Šmajš *et al.*, 2012).

Por razões históricas ou econômicas, colicinas produzidas por
enterobactérias e bacteriocinas sintetizadas por bactérias do ácido lático são as
15 mais bem estudadas (Rebuffat, 2011a). Para contribuir para o melhor
conhecimento destas substâncias, um banco de dados *online*
(<http://bactibase.pfba-lab-tun.org>), denominado BACTIBASE, foi criado. Entre
outras, estão disponíveis informações relativas a características físico-químicas,
estruturais e microbiológicas das mesmas (Nishie *et al.*, 2012; Hammami *et al.*,
20 2013).

1.4.2 BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS

Bactérias Gram positivas sintetizam bacteriocinas semelhantes aos
25 peptídeos antimicrobianos produzidos pelos eucariotos. As substâncias
apresentam caráter catiônico e anfifílico. São muito abundantes e diversificadas,
codificadas, mais comumente, por genes plasmidiais, podendo também ser
codificadas por genes localizados em cromossomos e transpósons (Riley &
30 Wertz, 2002; Gillor *et al.*, 2009; Bakkal *et al.*, 2012). Apresentam um amplo
espectro de ação. Por exemplo, bacteriocinas produzidas por *Enterococcus*, são
ativas contra bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus*, e bactérias Gram
negativas, como *Campylobacter* e *Salmonella* (Belguesmia *et al.*, 2010).

Diferentemente das colicinas, a síntese de bacteriocinas não é um evento letal para as bactérias Gram positivas. Isto se deve aos mecanismos de transporte utilizados para liberação das substâncias. Algumas células apresentam um sistema de transporte específico para bacteriocinas enquanto outras possuem a via de exportação sec-dependente (Riley & Wertz, 2002).

As bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram positivas podem ser divididas em quatro grupos. A classe I inclui os lantibióticos, grupo bastante estudado. Algumas características relevantes deste grupo podem ser citadas. Os lantibióticos apresentam massa molecular inferior a 5 kDa, possuem aproximadamente 19 a 38 aminoácidos, são sintetizados a nível ribossomal, sofrem modificações pós-traducionais e apresentam os aminoácidos lantionina e β-metil lantionina, os quais formam múltiplas estruturas em anéis, contribuindo para a resistência ao calor, à ação proteolítica, a uma ampla faixa de pH e à oxidação (Nishie *et al.*, 2012).

Os lantibióticos apresentam amplo espectro de ação contra bactérias Gram positivas e podem ser divididos em subgrupos. Os lantibióticos tipo A, como a nisina, são moléculas carregadas positivamente, que atuam formando poros nas células sensíveis e impedindo a síntese correta do peptidoglicano. Os lantibióticos do tipo B, como a mersacidina, atuam na síntese da parede celular. Uma terceira subclasse é composta por dois peptídeos lantibióticos, um que se assemelha ao lantibiótico do tipo B e outro ao do tipo A, atuando tanto na formação de poros na célula alvo, como na desorganização da síntese do peptidoglicano (Garneau *et al.*, 2002; Gillor *et al.*, 2009; Lohans & Vederas; 2012; Nishie *et al.*, 2012; Balciunas *et al.*, 2013)

Na classe II, estão incluídas bacteriocinas estáveis ao calor, com massa molecular inferior a 10 kDa, formadas por aminoácidos não modificados, sintetizadas, principalmente, por bactérias do ácido láctico. Atuam na permeabilização da membrana citoplasmática, o que acarreta extravasamento do conteúdo celular. Esta classe divide-se em três subclasses, IIa, IIb e IIc. As bacteriocinas da subclasse IIa contêm aminoácidos modificados próximo à região N-terminal e agem formando poros na membrana. Apresentam grande atividade contra *Listeria monocytogenes*. Os principais representantes são a pediocina, a sakacina A e a leucocina A. A subclasse IIb inclui bacteriocinas formadas por dois

peptídeos ativos que, separadamente, são inativos. Representantes desta subclasse são a plantaricina e a lactacina F. Bacteriocinas que apresentam uma ligação covalente entre a porção N-terminal e C-terminal, resultando em uma estrutura cíclica, são agrupadas na subclasse IIc. São produzidas por células com secreção sec-dependente; um exemplo é a lactococcina (Garneau *et al.*, 2002; Rea *et al.*, 2011; Nishie *et al.*, 2012; Balciunas *et al.*, 2013).

Na classe III, enquadram-se bacteriocinas com massa molecular superior a 30 kDa, sensíveis ao calor, que promovem a lise da parede celular da bactéria alvo. A porção N-terminal é homologa a um endopeptídeo envolvido na síntese da parede celular e a porção C-terminal reconhece a célula alvo. Como exemplos, citam-se a helveticina J e a millericina B. A classe IV agrupa bacteriocinas complexas, compostas por uma associação de proteínas com lipídios ou carboidratos (Garneau *et al.*, 2002; Rea *et al.*, 2011; Lohans & Vederas; 2012; Nishie *et al.*, 2012; Balciunas *et al.*, 2013). Entretanto, alguns pesquisadores sugerem que estas moléculas presentes nas bacteriocinas da classe IV seriam apenas artefatos de purificação e a classe IV não representaria uma classe diferente de bacteriocina (Cleveland *et al.*, 2001; Balciunas *et al.*, 2013).

As bacteriocinas características de bactérias Gram positivas são sintetizadas como um pré-peptídeo inativo, que é transportado pela superfície da célula produtora durante a fase de crescimento exponencial, sendo clivado enzimaticamente para tornar-se ativo (Balciunas *et al.*, 2013).

Assim, as bacteriocinas de classe I são codificadas por um conjunto de genes, quais sejam, o gene estrutural, que codifica uma pré-bacteriocina; um gene que codifica uma proteína acessória responsável pelo processamento proteolítico do peptídeo líder; um gene que codifica as proteínas do sistema de transporte ABC; um gene associado à regulação e um gene responsável pela imunidade, que protege a célula produtora contra a sua própria bacteriocina. A pré-bacteriocina inativa contém uma extremidade N-terminal ou peptídeo líder acoplado a uma porção C-terminal do pró-peptídeo. O pró-peptídeo é modificado, iniciando a maturação do peptídeo ativo. O peptídeo líder é clivado pela protease antes ou após a translocação pelo sistema ABC. Por fim, a bacteriocina ativa é liberada (Dicks *et al.*, 2011).

No que se refere a bacteriocinas de classe II, o conjunto de genes relacionados à expressão de bacteriocinas é semelhante ao descrito para a classe I. Observa-se um gene estrutural, um gene de imunidade, um gene que codifica as proteínas acessórias e um gene para a produção das proteínas do sistema de transporte ABC. O pré-peptídeo codificado pelo gene estrutural contém um peptídeo líder que é clivado pela protease, tornando-o ativo (Dicks *et al.*, 2011).

Foi demonstrado que algumas bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas agem como moléculas autoindutoras, capazes de regular a sua própria expressão, atuando como mediadores de *quorum sensing*. Este comportamento influencia na simbiose, virulência, formação de biofilmes e competição (Majeed *et al.*, 2011; Rebuffat, 2011b).

1.4.3 BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS

As bactérias Gram negativas são capazes de produzir bacteriocinas com atividade bactericida ou bacteriostática. Merecem destaque as bacteriocinas sintetizadas por membros da família Enterobacteriaceae, as mais bem estudadas do grupo, em especial, bacteriocinas produzidas por *E. coli*, as primeiras a serem investigadas. As bacteriocinas expressas por Enterobacteriaceae são denominadas colicinas e microcinas. Alguns autores empregam o termo bacteriocinas tipo colicina para as substâncias proteicas com espectro de ação restrito, como piocinas, pesticinas e klebocinas, que são sintetizadas por outras bactérias Gram negativas como *Pseudomonas*, *Yersinia pestis* e *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente (Rebuffat, 2011a; Bakkal *et al.*, 2012).

1.4.3.1 COLICINAS E BACTERIOCINAS TIPO COLICINAS

Colicinas são bacteriocinas produzidas por enterobactérias que possuem massa molecular de 25 a 80 kDa, podendo ser codificadas por plasmídeos e cromossomos (Riley 2009). O gene que codifica a síntese de colicinas está localizado em um óperon, que contém mais dois genes, associados à expressão

da proteína de imunidade, que protege a célula produtora da sua própria colicina, e à promoção da lise celular, para liberação da colicina no ambiente. (Riley 2009; Rebuffat, 2011a)

5 A produção de colicinas é mediada pelo sistema SOS, ativado, principalmente, em momentos de estresse celular (Riley & Wertz, 2002; Rebuffat, 2011a; Riley, 2011; Grinter *et al.*, 2012). O sistema SOS é composto pelas proteínas RecA e Lex A. Lex A é um repressor transcricional, que impede a síntese da bacteriocina. Em condições de estresse, como na escassez de nutrientes ou em densidades populacionais elevadas, *rec A* é ativado, levando à
10 expressão de Rec A. Este, por sua vez, liga-se a Lex A, promovendo, assim, a produção da colicina (Bakkal *et al.*, 2012).

As colicinas são classificadas de acordo com seu alvo/mecanismo de ação. O primeiro grupo age no DNA e RNA, atuando como nuclease, o segundo desestabiliza a membrana citoplasmática, por meio da formação de poros, e o
15 terceiro age sobre o peptidoglicano (Corsini *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2010; Rebuffat, 2011a). Como exemplos, as colicinas E2, E7, E8 e E9 e as piocinas S1, S2 e S3 possuem atividade de DNase; as colicinas E5 e D, a klebicina D e a piocina S4 atuam como tRNases; as colicinas E3, E4 e E6, a cloacina DF13 e a klebicina C agem como rRNases; as colicinas A, B, Ia, Ib, K, N, U, S4, E1, 5 e 10,
20 as alveicinas A e B, a marcescina 28b e a piocina S5 atuam na formação de poros; e a colicina M inibe a biossíntese de mureina (Rebuffat, 2011a; Braun & Patzer, 2013).

Para atuar no alvo bacteriano, as colicinas precisam reconhecer e se ligar de forma específica aos receptores celulares, os quais são responsáveis pela
25 captação de nutrientes essenciais, como o receptor BtuB para vitamina B12, os receptores para sideróforo FhuA, FepA, Cir e Fiu, o receptor para nucleosídeo Tsx e os canais de porinas. O processo de translocação pode variar entre as bacteriocinas. Os receptores utilizados para o reconhecimento celular estão acoplados aos sistemas de membranas Tol e Ton presentes na membrana
30 interna, fornecendo energia para o processo (Rebuffat, 2011a; Zamaroczy & Chauleau 2011; Braun & Patzer, 2013). Colicinas do grupo A utilizam o sistema de membrana Tol (proteínas TolA, TolQ, TolR e TolB) e colicinas do grupo B

fazem uso do sistema de transporte Ton (proteínas TonB, ExbB e ExbD) (Braun & Patzer, 2013).

Colicinas e bacteriocinas tipo colicinas são proteínas não modificadas, sensíveis a proteases, que apresentam três domínios funcionais, quais sejam: um
5 domínio central, responsável pelo reconhecimento dos receptores específicos na superfície da célula alvo, uma porção N-terminal, responsável pela translocação da proteína através da membrana citoplasmática e da parede celular, direcionado-
a seu alvo de ação, e uma porção C-terminal, que atua no alvo celular, sendo responsável pela região de imunidade (Cascales *et al.*, 2007; Gillor *et al.*, 2009;
10 Rebuffat, 2011b), os quais não são observados nas bacteriocinas das bactérias do ácido lático e nas microcinas (Rebuffat, 2011b; Zamaroczy & Chauleau 2011).

1.4.3.2 MICROCINAS

15 Microcinas, termo cunhado por Asensio *et al.* (1976), são substâncias antagonistas de baixa massa molecular (< 10 kDa), resistentes a proteases, sintetizadas principalmente por *E. coli* (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat, 2011a; Rebuffat, 2012; Severinov & Nair; 2012). Embora tenham sido descritas a mais de
três décadas, as substâncias ainda são pouco estudadas. Até o momento, apenas
20 15 microcinas foram descritas, das quais oito foram isoladas e caracterizadas do ponto de vista estrutural (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat, 2012; Zschuttig *et al.*, 2012).

As microcinas são produzidas, preferencialmente, na fase estacionária do crescimento bacteriano, são solúveis em solventes orgânicos, resistentes a uma
25 ampla faixa de pH e temperatura e a algumas proteases e não são induzidas pelo sistema SOS (Duquesne *et al.*, 2007; Corsini *et al.*, 2010).

Além disso, elas têm sua produção estimulada por condições de estresse, como carência de nutrientes e oxigênio, atuam como potentes agentes antibacterianos mesmo em doses muito baixas e não agem sobre a linhagem
30 produtora. Esta resistência da linhagem produtora parece ser observada durante a fase exponencial de crescimento bacteriano, sendo expressa independentemente da produção da microcina (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat, 2011a; Rebuffat, 2011b; Severinov *et al.*, 2011).

Estas substâncias bioativas são codificadas por um conjunto de genes, geralmente, quatro, carregados por plasmídios ou cromossomos. Um gene estrutural que codifica os precursores das microcinas, um gene adjacente que codifica os fatores de imunidade e dois genes responsáveis pela secreção das proteínas (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat, 2011b).

A classificação das microcinas leva em consideração três critérios: presença, natureza e localização das modificações pós-traducionais, organização do conjunto de genes e sequência do peptídeo líder (Rebuffat, 2011a). A classe I (microcinas B17, C7-C51 e J 25) abriga substâncias com massa molecular inferior a 5kDa, que passam por drásticas modificações pós-traducionais, levando a estruturas tais como tiazol e anéis azólicos. A classe II é representada por peptídeos com massa molecular de 5 a 10 kDa, agrupados em duas subclasses. Na subclasse IIa, são incluídas microcinas codificadas por plasmídios, que não sofrem modificações pós-traducionais, exceto adição de uma ligação dissulfeto. Nesta subclasse, citam-se as microcinas L e V. A subclasse IIb é constituída pelas microcinas lineares codificadas por cromossomos, que não possuem ligações dissulfeto, apresentam uma região C-terminal conservada rica em serina e carregam partes tipo sideróforo. São incluídas nesta subclasse as microcinas E492, M, H47 e I47 (Desriac *et al.*, 2010; Rebuffat, 2011a; Severinov *et al.*, 2011; Vassiliadis *et al.*, 2011; Rebuffat; 2012).

Assim como as colicinas, as microcinas utilizam receptores celulares ou porinas para interagir com a célula alvo. Os receptores são responsáveis pela aquisição de nutrientes essenciais para a bactéria, tal como, os receptores sideróforos (FhuA, FepA, Cir e Fiu) utilizados para a aquisição de ferro, sequestrados pelas microcinas J25, L, V, E492, M, H47 e I47, ou a porina OmpF, utilizada pelas microcinas B17 e C7-C51. Geralmente, o processo de translocação da microcina envolve o complexo TonB-ExbB-ExbD. O sistema utiliza a força próton motiva da membrana citoplasmática para a transdução de energia para a membrana externa e receptores, fornecendo, assim, energia necessária para a internalização da microcina. As microcinas B17 e J25 também utilizam a proteína SbmA e a microcina C7-C51 requer o sistema de transporte ABC, ambos presentes na membrana citoplasmática (Rebuffat, 2011a ; Severinov *et al.*, 2011; Rebuffat; 2012).

No interior celular, as microcinas atuam em regiões importantes da célula bacteriana. Assim, as microcinas B17 inibe a DNA girase, a microcina C7-C51 atua inibindo a síntese de Asp-tRNA, bloqueando a síntese proteica no momento da tradução, e a microcina J25 atua na cadeia respiratória e inibe a RNA polimerase. As microcinas de classe II atuam na membrana citoplasmática ou em seus compostos, como a microcina H47, que atua no canal de prótons da ATP sintetase, e as microcinas E492 e V, que promovem a permeabilidade da membrana citoplasmática (Rebuffat, 2011a; Rebuffat, 2012; Cotter *et al.*, 2013).

Ao contrário das células que sintetizam colicinas, as células produtoras de microcinas são capazes de produzir a toxina continuamente, sem a perda da viabilidade celular, o que se deve ao sistema de transporte da substância através das membranas da célula produtora (Severinov *et al.*, 2011).

Apesar de pertencerem a grupos diferentes, as microcinas e as bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico apresentam algumas características em comum, como massa molecular inferior a 10 kDa, estabilidade em altas temperaturas e pH extremos, resistência a algumas proteases, caráter hidrofóbico, presença de modificações pós-traducionais e estrutura tridimensional compacta (Duquesque *et al.*, 2007; Rebuffat, 2011b). Ainda, ambos os grupos são sintetizados como um peptídeo precursor inativado, um peptídeo líder que é clivado na ligação glicina-glicina ou glicina-alanina pelo sistema de transporte ABC, levando à maturação e exportação da substância antagonista, com exceção da microcina C7-C51, que utiliza bombas de efluxo para secreção (Rebuffat, 2011b). Alguns autores relataram a possibilidade de que microcinas ativas contenham o peptídeo líder (Gilson *et al.*, 1987; Gaggero *et al.*, 1993; Pons *et al.*, 2004).

1.4.4 BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR ARCHAEA

Archaea compõem o terceiro domínio dos seres vivos. Elas se caracterizam por habitarem ambientes extremos. Membros deste grupo são capazes de produzir substâncias proteicas tipo bacteriocinas denominadas

arqueocinas. Estas inibem outros microrganismos filogeneticamente relacionados, mas, também, há relatos de atividade contra eubactérias (Ellen *et al.*, 2011).

Francisco Rodriguez-Valera, em 1982, foi o primeiro a descrever uma substância tipo bacteriocina produzida por Archaea. A amostra era halofílica e, então, a substância foi denominada halocina S8 (Price & Shand, 2000; Riley & Wertz, 2002; Mei *et al.*, 2008; Ellen *et al.*, 2011). As halocinas são sintetizadas no nível de ribossomos, principalmente, no final da fase exponencial e na fase estacionária. A habilidade confere vantagem seletiva à amostra produtora, importante em situações de estresse, como na escassez de nutrientes (Riley & Wertz, 2002).

Algumas halocinas são originadas de grandes proteínas precursoras, que são processadas formando polipeptídeos biologicamente ativos (Mei *et al.*, 2008; Ellen *et al.*, 2011). Sua massa molecular varia de 4 a 35 kDa. Como as microcinas, as halocinas com massas moleculares menores são denominadas microhalocinas, como é o caso da S8 (Price & Shand., 2000; Ellen *et al.*, 2011). As halocinas são codificadas por um plasmídeo grande e apresentam alta resistência, podendo ser dessalinizadas, submetidas à fervura e solventes orgânicos e armazenadas a 4 °C por períodos prolongados (Riley & Wertz, 2002; Riley, 2009). O espectro de ação varia entre diferentes halocinas. Por exemplo, a halocina H4 possui um estreito espectro de ação, enquanto a halocina A4 podendo atuar contra amostras termoacidófilas, como *Crenarchaea* (Ellen *et al.*, 2011).

Membros do gênero *Sulfolobus* multiplicam-se em temperaturas de 65 a 85 °C e pH de 2 a 4. Algumas linhagens de *Sulfolobus islandicus* produzem uma arqueocina denominada sulfolobocina, com massa molecular de 20 kDa, ativa contra amostras relacionados (Ellen *et al.*, 2011). Esta atividade esta associada à membrana, o que indica que a substância antagonista não é liberada da célula produtora (Bakkal, *et al.*, 2012).

1.5 PURIFICAÇÃO DE BACTERIOCINAS

A purificação de bacteriocinas não é uma tarefa fácil e nem de baixo custo. No entanto, o uso biotecnológico das substâncias motiva os pesquisadores a investigar tais compostos. As bacteriocinas sintetizadas por bactérias produtoras de ácido láctico são as mais bem estudadas, devido à aplicabilidade das mesmas na conservação de alimentos, uma vez que o uso de drogas antimicrobianas convencionais nestes produtos não é permitido. O uso de bacteriocinas na conservação de alimentos pode ser feito pela inoculação da bactéria produtora no alimento ou pela adição da bacteriocina purificada ou sintética (Saavedra & Sesma, 2011).

Várias estratégias têm sido empregadas para a purificação destas substâncias com propriedades antagonistas. Habitualmente, a extração proteica de bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas é realizada a partir do sobrenadante da cultura da célula bacteriana, enquanto a extração proteica de colicinas e microcinas é frequentemente, feita empregando-se o meio intracelular, após a lise bacteriana, e o meio extracelular. Para a extração do peptídeo ou proteína, são empregadas diversas metodologias, como precipitação com sulfato de amônio, extração ácida, extração com solvente orgânico, como etanol ou acetona, e concentração a vácuo por ultrafiltração (Herschman & Helinski, 1967; Muriana & Klaenhammer, 1991; Farias *et al.*, 1994; Fath *et al.*, 1994; Pingitore *et al.*, 2007; Mercato *et al.*, 2008; Ribeiro-Ribas *et al.*, 2009; Moreira, 2011; Saavedra & Sesma, 2011; Oliveira, 2013; Sousa *et al.*, 2013).

A próxima etapa para a obtenção da substância purificada, habitualmente, é feita pelo emprego de técnicas cromatográficas, podendo ser utilizadas as cromatografias de troca iônica, gel filtração e fase reversa (Saavedra & Sesma, 2011). A escolha do método cromatográfico, incluindo o tipo de estratégia de separação e as características da coluna, depende das propriedades do material a ser cromatografado.

De uma maneira geral, a cromatografia líquida é baseada na distribuição diferenciada de solutos entre a fase móvel, constituída por um eluente, e a fase estacionária, composta por resina ou sílica, que preenche a coluna. As

substâncias separadas pelos processos cromatográficos são detectadas por detectores (UV, amperométrico e outros) localizados logo após o final da coluna, e são registradas em forma de picos pelo sistema de registro (Silva Jr., 2004a).

5 A cromatografia em coluna de troca iônica tem como princípio a separação das substâncias pela interação da carga de um trocador iônico com a carga superficial líquida da proteína ou peptídeo contido no *pool*. A eluição das substâncias pode ficar a cargo de um gradiente linear salino, tal como o NaCl. Estes íons competem com a proteína por sítios de ligação na fase estacionária. Assim, o material que possui carga líquida igual a da fase estacionária (trocador
10 iônico) ou carga líquida neutra não será capaz de interagir com o trocador, sendo eluído antes do gradiente salino. O material que interagiu fracamente com a fase estacionária será eluído com uma concentração salina menor, se comparada ao material fortemente ligado a ela. Há dois tipos de trocadores iônicos, o trocador catiônico, que troca cationes, e o trocador aniônico, que troca aníons (Silva Jr.,
15 2004b).

A cromatografia de gel filtração também é conhecida como cromatografia por exclusão, por peneiração molecular, permeação em gel e filtração molecular. Esta técnica é fundamentada na separação das substâncias pela sua massa molecular. A coluna é constituída por um gel composto de macromoléculas
20 porosas, não carregadas, que apresentam ligações cruzadas com afinidade pelo eluente, mas incapaz de se solubilizar nele. O eluente ocupa o espaço interno dos poros e externo das macromoléculas e carrega as substâncias a serem separadas. Proteínas com massas moleculares maiores são eluídas primeiro, por percorrer um caminho menor, devido à sua incapacidade de entrar nos poros das
25 macromoléculas. Por outro lado, proteínas com massas moleculares menores ou peptídeos serão eluídos por último, por serem capazes de penetrar nos poros das macromoléculas. São disponíveis no mercado diversas colunas com diferentes faixas de fracionamento proteico. Assim, variando a matriz do gel é possível separar substâncias com massas moleculares inferiores a 1 kDa até substâncias
30 com massas moleculares muito elevadas (Silva Jr., 2004b; Rothschild, 2006).

A cromatografia de fase reversa (RPC) tem como princípio a separação pela adsorção diferenciada de peptídeos ou proteínas à fase estacionária e a dissorção seletiva pela fase móvel. A fase estacionária preenche a coluna e é

constituída por sílica ou resina orgânica contendo grupamentos apolares como fenil, butil, octanoil ou octadecil. A fase móvel elui as substâncias por possuir um gradiente crescente de concentração de um solvente orgânico como acetonitrila, isopropanol, metanol e outros. Assim, as proteínas ou peptídeos polares serão eluídos com uma menor concentração de solvente orgânico, enquanto as substâncias mais apolares serão eluídas com uma maior concentração de tal solvente. Habitualmente, utiliza-se a acetonitrila como fase móvel, uma vez que ela é mais hidrofóbica do que os grupamentos amino e carboxila encontrados no material proteico. Frequentemente, são adicionados aos eluentes ácidos orgânicos, tais como ácido trifluoacético (TFA) ou heptafluorbutírico (HFBA), que conduzem as proteínas para um pH que neutraliza a ionização de suas carboxilas, neutraliza a carga positiva dos grupamentos básicos das proteínas tipo amino, guanidino e imidazol, ou evita a ionização de grupamentos silanois livre da matriz (Silva Jr., 2004b).

Após a obtenção da proteína ou peptídeo purificado pelos processos cromatográficos, estes podem ser analisados por espectrometria de massas. A técnica permite a detecção de pequenas quantidades de analito, distingue substâncias diferentes com o mesmo tempo de retenção, identifica a massa molecular da substância purificada e determina a sua sequência de aminoácidos (Harris, 2005).

A identificação da massa molecular e a sequência de aminoácidos de uma proteína purificada podem ser facilitadas após a digestão enzimática pela clivagem em pontos específicos da proteína resultando em um conjunto de peptídeos que são analisados por espectrometria de massas. Os espectrômetros de massas são mais eficientes para obter informações estruturais de peptídeos contendo até 20 aminoácidos. No entanto, alguns equipamentos, como o FT-ICR (*Fourier-transform ion cyclotron resonance*, são capazes de identificar a massa molecular e a sequência primária parcial da proteína analisada sem a clivagem proteolítica (Cantú *et al.*, 2008).

O espectrômetro de massas é composto por uma fonte de íons como o *Eletrospray* (ESI) ou *Matrix-Assisted Desportion Ionization* (MALDI), um analisador de massas como os *ions-traps* (tridimensionais e lineares), *time-of-flight* (TOF), *Fourier-transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR) e *orbitrap*; um

detector e um sistema de aquisição de dados. Inicialmente, a amostra é encaminhada para a fonte de íons que é capaz de ionizar a substância, transferindo-a para o estado gasoso sem a perda da estrutura polipeptídica. Os íons são acelerados por um campo elétrico e direcionados para o analisador de
5 massa que contém um campo magnético e separa os íons de acordo com a sua relação massa-carga (m/z). Os íons são encaminhados ao detector que transforma a corrente de íons em uma cascata de elétrons, que são, então, encaminhados ao sistema de aquisição de dados, gerando um espectro contendo a massa molecular da substância purificada (Harris, 2005; Cantú *et al.*, 2008).

10 Várias estratégias têm sido desenvolvidas para o sequenciamento de aminoácidos de uma proteína ou peptídeo, como o sequenciamento por espectrometria de massas e a degradação de Edman. No primeiro, habitualmente, são utilizados os equipamentos conjugados, como o ESI com triplo quadripolo ou com quadripolo e um analisador TOF (Q-TOF) ou equipamentos
15 com fonte de ionização MALDI contendo dois analisadores de massas TOF TOF (MALDI-TOF-TOF). A análise ocorre pela introdução do peptídeo purificado ou dos peptídeos obtidos por digestão enzimática da proteína purificada no aparelho. Cada peptídeo é acelerado em uma câmara de colisão contendo gás inerte como argônio, nitrogênio ou hélio. Colisões entre o gás inerte e as moléculas de íon
20 peptídico resultam na fragmentação da cadeia polipeptídica, que é interpretada pelo espectrômetro de massa, gerando um espectro de fragmentação ou MS/MS (Cunha *et al.*, 2006; Cantú *et al.*, 2008).

O segundo método, denominado degradação de Edman, é realizado em um sequenciador. A degradação de Edman permite a identificação de até 50
25 resíduos de aminoácidos de um peptídeo. Assim, para proteínas ou peptídeos contendo mais de 50 resíduos, é necessária a realização do rompimento das ligações dissulfeto seguida da clivagem proteolítica específica, utilizando métodos físicos ou químicos, como a utilização da enzima tripsina, que catalisa a hidrólise de ligações peptídicas contendo o grupo carboxila de uma lisina ou arginina
30 (Lehninger *et al.*, 1995).

Os fragmentos obtidos da tripsinólise ou os peptídeos contendo até 50 resíduos de aminoácidos são encaminhados para o sequenciador. A degradação de Edman ocorre no resíduo aminoterminal do peptídeo, não afetando as outras

ligações peptídicas. O reagente fenil-isotiocianato (PITC) se liga ao resíduo aminoterminal do aminoácido 1, levando à formação de um derivado cíclico do feniltiocarbamoil que, sob ambiente ácido, é clivado, formando um derivado tiazolinona. Utilizando um solvente orgânico, o aminoácido derivado de tiazolinona é removido e tratado com ácido, resultando no feniltiohidantoína (PTH), que pode, então, ser identificado por métodos cromatográficos ou eletroforéticos. Assim, o resíduo aminoterminal do aminoácido 2 fica exposto e disponível para a mesma sequência de reações apresentadas para o aminoácido 1 (Edman, 1950; Niall, 1973; Lehninger *et al.*, 1995).

10

1.6 APLICABILIDADE DAS BACTERIOCINAS

15 Existe um campo amplo para a aplicação de bacteriocinas. Destacam-se seu emprego na indústria alimentícia e na área de saúde humana e animal.

1.6.1 BACTERIOCINAS NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

20

Indústrias alimentícias vêm estas substâncias como uma aliada na conservação de alimentos, devido à sua capacidade de aumentar a vida de prateleira, reduzindo, assim, a utilização de conservantes químicos e métodos físicos de controle microbiano. Desta forma, elas são empregadas na conservação de carnes, laticínios, produtos a base de ovos, saladas, legumes fermentados e produtos de panificação de alta umidade (Abdel-Mohseinet *et al.*, 2010; Lohans & Vederas, 2012).

Diversos fatores devem ser considerados na avaliação de uma bacteriocina como candidata a conservante alimentar. Merecem menção a ausência de alteração da carga eletrostática, a solubilidade da bacteriocina quando em contato com os alimentos e a incapacidade de ligação aos componentes alimentares (Schulz *et al.*, 2003).

30

Assim, bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico são empregadas na conservação de alimentos, uma vez que elas não interferem nas características sensoriais do alimento como odor e sabor, são estáveis ao calor e são atóxicas para o consumidor. Nisina e pediocina PA1 são amplamente utilizadas, podendo ser encontradas comercialmente como nisaplin e ALTA 2341, respectivamente (Nishie *et al.*, 2012).

Nisina é uma bacteriocina produzida por linhagens de *Lactococcus lactis*, ativa contra bactérias Gram positivas. Em 1969, a Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS) liberou seu uso como um aditivo alimentar. Seu consumo pode chegar a 33.000 unidades internacionais/kg de peso corpóreo. Ela pode ser empregada na conservação de leite, queijo, produtos lácteos, tomates, vegetais enlatados, sopas enlatadas, maionese e alimentos infantis. O Brasil é pioneiro na utilização desta substância na conservação de produtos cárneos como salsichas (Schulz *et al.*, 2003). Por exemplo, a microcina MccV, que, ao contrário da nisina, também atua contra bactérias Gram negativas, vem sendo empregada (Riley & Wertz., 2002; Duquesne *et al.*, 2007).

Além disso, nisina é utilizada na conservação de salmão para consumo humano. Esta bacteriocina dificulta a multiplicação de *L. monocytogenes* no peixe e, na presença de uma atmosfera rica em CO₂ no produto embalado, observa-se a inibição da bactéria. A bacteriocina V41, produzida por *Carnobacterium divergens*, também foi utilizada para este fim (Bakkal *et al.*, 2012).

A bacteriocina lacticina 3147 inativou rapidamente *L. monocytogenes* e reduziu o número de células viáveis de *S. aureus* em formulação infantil a base de leite. A substância também foi altamente eficiente contra *L. monocytogenes* em iogurte natural e queijo cottage (Galvéz *et al.*, 2011).

Espécies produtoras de bacteriocinas isoladas de vinho, tal como, *Lactobacillus plantarum*, *Oenococcus oeni* e *Pediococcus pentosaceus* podem ser úteis contra bactérias do ácido láctico produtoras de histamina durante a vinificação, auxiliando no controle da fermentação maloláctica (Galvéz *et al.*, 2011). Também já foi relatada a associação de bacteriocinas, como nisina e pediocina, com outros métodos tal como uso de campo elétrico pulsado, ácidos

orgânicos e alta pressão hidrostática para potencializar a eficácia do tratamento, principalmente contra bactérias Gram negativas (Nishie *et al.*, 2012).

5 1.6.2 BACTERIOCINAS NA SAÚDE HUMANA E ANIMAL

Muito se tem discutido sobre a resistência bacteriana a drogas antimicrobianas e a capacidade de disseminação destas amostras resistentes. A propriedade é, muitas vezes, associada à utilização indiscriminada de antimicrobianos de amplo espectro, em decorrência da pressão seletiva gerada. Assim, é fundamental o uso racional destas substâncias e é altamente desejável a pesquisa de outras drogas, com espectro de ação mais limitado, proporcionando a atuação apenas sobre o alvo. Neste contexto, destacam-se as bacteriocinas, frequentemente, com espectro de ação limitado e muito diversificado, diminuindo a pressão seletiva indesejável (Riley & Wertz., 2002; Riley *et al.*, 2012).

Diversos estudos demonstram a utilização de bacteriocinas capazes de inibir organismos patogênicos de grande interesse clínico. Por exemplo, o lantibiótico 3147 apresenta importante ação antibacteriana contra linhagens virulentas de interesse médico como MRSA e VRE (Sit & Vederas, 2008; Nes, *et al.*, 2011; Hammami *et al.*, 2013). Quando a ação do lantibiótico haloduracina, produzido por *Bacillus halodurans*, contra VRE foi avaliada, observou-se melhor atividade do que a demonstrada para nisina. Além disto, a haloduracina mostrou-se mais estável ao pH fisiológico, o que eleva o potencial de aplicação terapêutica (Hammami *et al.*, 2013).

Salmonella enterica é um agente importante de enterite aguda, bacteremia e febre entérica e, atualmente, a resistência a drogas antimicrobianas é uma característica observada com relativa frequência no grupo. A microcina J25 foi avaliada em modelo murino contra linhagens da bactéria e observou-se redução marcante do número de organismos viáveis no baço e no fígado em relação ao grupo controle (Cotter *et al.*, 2013, Hammami *et al.*, 2013).

A administração de microcina 24 produzidas por *E. coli* favoreceu a diminuição de *Salmonella* Typhimurium em frangos adultos. Também, a enterocina A, produzida por *Enterococcus faecium*, foi capaz de agir contra

Salmonella em modelo animal de codornas japonesas gnotobióticas (Gillor *et al.*, 2009; Rebuffat., 2011b).

Podem ser citados também os lantibióticos salivaricina tipo A e tipo B, utilizados no tratamento de infecções do trato respiratório superior associadas a *Streptococcus*, bem como da cárie dentária relacionada a *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans*. A halitose, causada por *Prevotella*, *Eubacterium saburreum* e *Micromonas micros* são combatidas através de uma goma de mascar que possui, em sua composição, a bacteriocina salivaricina tipo B, que ajuda a restabelecer a microbiota residente da cavidade oral (Gillor *et al.*, 2009).

Na vaginose, a microbiota indígena está alterada pelo aumento ou aparecimento de alguns microrganismos, tais como *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Mobiluncus*, *Bacteroides* e pela diminuição drástica de *Lactobacillus*. Este grupo é capaz de produzir bacteriocinas que inibem a multiplicação de *G. vaginalis*. Também foi demonstrado que bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus jensenii* 5L08 inibiram a multiplicação de *Candida albicans* (Gillor *et al.*, 2009).

Infecções do trato urinário acometem cerca de 150 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente mulheres. Um estudo avaliou a atuação de bacteriocinas sobre linhagens uropatogênicas de *E. coli*, mostrando a inibição e eliminação de biofilmes pré-existentes em catéter (Riley *et al.*, 2012).

O ganho de peso é um problema crescente nos últimos anos para pessoas que vivem em países com alta disponibilidade de alimentos. Pesquisadores avaliaram a utilização da bacteriocina ABP118 produzida por *Lactobacillus salivarius* UCC118 em camundongos alimentados com uma dieta rica em lipídios. No estudo, foi observado ganho de peso no grupo controle o qual não fez uso da bacteriocina. Entretanto, o efeito foi transitório, uma vez que houve uma redução na diferença de peso dos dois grupos. Assim, é necessária a investigação de uma linhagem probiótica combinada com a bacteriocina, que possa favorecer o controle de peso (Cotter *et al.*, 2013).

Estudos recentes mostram que o gene WCFS1 envolvido na produção e liberação de bacteriocina em linhagens *L. plantarum* também parece atuar nas

células dendríticas e nas células mononucleares do sangue periférico, influenciando a atuação do sistema imune (Cotter *et al.*, 2013).

5 *S. flexneri*, importante agente diarreiogênico foi inibido pela produção da microcina Mcc7/C51, produzida pela linhagem de *E. coli* H22. Outra amostra de *E. coli*, produtora da microcina Mcc24, inibiu o crescimento de *S. enterica* e *E. coli* O157:H7 presentes no trato intestinal de galinhas. Estudos adicionais ainda se fazem necessários para definir como as microcinas contribuem para a prevenção das infecções intestinais (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat, 2011b; Hammami *et al.*, 2013).

10 A microcina S produzida pela linhagem de *E. coli* G3/10 (uma das seis linhagens presente no probiótico Simbioflor 2) foi capaz de inibir a aderência de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) em células epiteliais. Entretanto, o efeito não foi observado para linhagens de EPEC que expressam o gene de imunidade para a microcina S (Cotter *et al.*, 2013).

15 Além da ação direta contra outras bactérias, as bacteriocinas podem ser responsáveis por outras ações. Em estudo de um modelo contraceptivo, nisina e subtilosina, uma bacteriocina produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*, desempenharam atividade espermicida em alguns modelos animais (Dicks *et al.*, 2011). A microcina Mcc492 apresentou atividade na indução de apoptose por
20 induzir alterações morfológicas e bioquímicas em células eucarióticas, o que desperta grande interesse para a possibilidade de aplicação da substância como agente antitumoral (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat., 2011b; Cotter *et al.*, 2013). Além disso, foi observado que bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram
25 positivas da classe IIa apresentam atividade antineoplásica e antiviral (Lohans & Vederas; 2012).

2 JUSTIFICATIVA

A doença diarreica aguda é um problema de saúde pública, que acomete principalmente crianças com idade inferior a cinco anos que vivem em países em desenvolvimento, associada a taxas elevadas de morbidade e mortalidade. Entre os agentes diarreiogênicos, destaca-se o gênero *Shigella*, em decorrência da prevalência e da gravidade do quadro clínico associado. Em Belo Horizonte, observa-se grande predomínio da espécie *S. sonnei*, responsável por cerca de 10% dos casos da doença.

A capacidade de expressão de bacteriocinas, substâncias antagonistas de natureza proteica ativas principalmente contra espécies filogeneticamente relacionadas, é uma característica bastante disseminada entre bactérias. Membros da família Enterobacteriaceae podem produzir dois tipos de bacteriocinas, colicinas, com massa molecular variando de 80 a 25 kDa, e microcinas, com massa molecular inferior a 10 kDa. A produção de colicinas já foi descrita para *S. sonnei*. Acredita-se que bacteriocinas possam conferir vantagem competitiva, atuando como uma habilidade de virulência da amostra produtora.

Considerando a relevância da doença diarreica, de *S. sonnei* como agente da doença e do papel das bacteriocinas, inclusive como fator de virulência, a escassez de dados relativos à caracterização de colicinas produzidas por *S. sonnei* e a ausência de informações referentes à síntese de microcinas pela bactéria, desenvolvemos esta investigação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

5 Caracterizar substâncias antagonistas produzidas por amostra de *S. sonnei* isolada de espécime fecal de criança com enterite aguda.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

10

- Extrair as proteínas intracelulares produzidas por *S. sonnei*.
- Avaliar o espectro de ação de *S. sonnei* e dos extratos intracelulares obtidos contra um amplo painel de bactérias.
- Purificar substâncias antagonistas sintetizadas por *S. sonnei*.

15

- Determinar a CIM e a CBM dos extratos proteicos intracelulares e de frações ativas obtidas de processos cromatográficos.
- Determinar a cinética de ação dos extratos intracelulares e de frações recuperadas de cromatografia de troca iônica.

20

- Avaliar o perfil proteico dos extratos intracelulares e de frações originadas dos processos cromatográficos por meio de SDS-PAGE e a expressão de atividade antagonista *in situ*.
- Determinar a massa molecular da substância antagonista purificada.
- Sequenciar parcialmente a substância ativa purificada e comparar a sequência com aquelas depositadas em bancos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo faz parte de um projeto amplo, que vem sendo desenvolvido pelo nosso grupo, cujo objetivo é investigar, de forma mais abrangente, a capacidade antagonista de *S. sonnei*.

5

4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

10 Duas amostras de *S. sonnei*, denominadas SS9 e SS12, isoladas de espécimes fecais de crianças com doença diarreica aguda, atendidas no Hospital Infantil João Paulo II/FHEMIG, durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado “Etiologia da diarreia infecciosa aguda em Belo Horizonte/MG e em Teresina/ PI: estudo clínico e laboratorial”, foram empregadas como produtora de substância antagonista e reveladora da expressão do antagonismo, 15 respectivamente. As amostras pertencem à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (MOA) do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e vêm sendo mantidas em Brucella Broth¹ acrescido de glicerol 10% em freezer -80 °C.

20 A amostra SS9 foi selecionada entre 10 amostras da espécie que expressaram antagonismo por produzirem halos de inibição das amostras reveladoras maiores e mais límpidos. SS12 foi escolhida aleatoriamente entre sete amostras de *S. sonnei* que apresentaram sensibilidade à atividade antagonista expressa pela amostra produtora (Sousa *et al.*, 2010).

25

4.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA FRAÇÃO INTRACELULAR

30 As amostras SS9 e SS12 criopreservadas foram submetidas a três repiques sucessivos em TSA² e as culturas foram incubadas a 37 °C, em

¹ BBL, Sparks, MD, EUA

² Difco, Sparks, MD, EUA

atmosfera de aerobiose, por 24 h. Então, SS9 foi cultivada em 20 mL de TSB³ e, após incubação nas mesmas condições descritas anteriormente, a cultura bacteriana foi vertida em 580 mL de TSB. O cultivo foi realizado em triplicata. Após 12 h de incubação, o material foi centrifugado a 16.200 x g, por 30 min, a 4
5 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes em tampão Tris-HCl⁴ 0,01 M, pH 7,2, centrifugado e solubilizado em 15 mL do mesmo tampão. A suspensão foi sonicada a 50 W, por 12 ciclos de 1 min, com intervalos de 30 s, em banho de gelo. Para comprovação da lise celular, uma alíquota da suspensão sonicada foi submetida à coloração pelo método de Gram e o
10 esfregaço foi examinado em microscópio óptico. A suspensão foi centrifugada a 16.200 x g, por 30 min, a 4 °C e o sobrenadante foi mantido em banho de gelo e submetido à precipitação proteica por meio de adição lenta e constante de sulfato de amônio⁵, em duas concentrações, 0-30 e 30-75% p/v, sob leve agitação. Após centrifugação a 29.829 x g, por 30 min, a 4 °C, os precipitados foram solubilizados
15 em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,2. Desta forma, foram obtidos os extratos intracelulares C-30 e C-75.

Os extratos C-30 e C-75 foram transferidos para membranas com limite de exclusão de 12-16 kDa⁶ e submetidos a diálise contra dois litros de tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,2, em câmara fria (4 °C), por 24 h, realizando três trocas de
20 tampão neste intervalo de tempo. O volume dos extratos foram medidos e, em seguida, os mesmos foram filtrados em membrana com poro de 0,45 µm⁷, aliquotados em microtubos e armazenados a -80 °C.

³Difco

⁴Promega, Madison, WI, EUA

⁵Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil

⁶Viskase, Darien, IL, EUA

⁷Corning, Lowell, MA, EUA

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA

Alíquotas de 10 µL dos extratos C-30 e C-75 foram gotejadas sobre a superfície de placas contendo TSA. Após exposição a vapor de clorofórmio⁸ por 30 min e evaporação do clorofórmio residual, a camada de meio foi recoberta com 3,5 mL de TSA semissólido (TSB + 0,7 % de ágar⁹) acrescido de 10 µL de cultura da amostra reveladora em TSB. Após incubação a 37 °C, por 24 h, em atmosfera de aerobiose, as leituras foram realizadas pela verificação da presença ou ausência de halos de inibição da amostra reveladora. Como controle, foi empregada água Milli Q^{®10} estéril (Booth *et al.*, 1977).

4.3.1 TITULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA

15

Os extratos C-30 e C-75 foram submetidos a diluições seriadas em água Milli-Q[®] estéril e 10 µL de cada diluição foram depositados sobre placas contendo TSA. Após exposição ao vapor de clorofórmio e evaporação do clorofórmio residual, testes de antagonismo foram realizados conforme descrito em 4.3. O título, definido como a recíproca da maior diluição que resulta em um halo límpido de inibição da amostra reveladora, foi determinado. Em seguida, a atividade antibacteriana foi calculada e expressa em UA/mL, empregando-se a fórmula “UA = título x 1000 µL x v⁻¹ (µL)”, sendo v o volume do extrato utilizado no ensaio (Batdorj *et al.*, 2006).

25

4.3.2 AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S)

30

Após leitura do teste de atividade, realizada em condições assépticas, as placas nas quais foram observados halo de inibição da amostra reveladora foram

⁸ Synth, Diadema, SP, Brasil

⁹ Difco

¹⁰ Direct-Q 3; Millipore, Molsheim, França

cuidadosamente analisadas para a verificação da presença/ausência de colônias resistentes no interior dos halos. Aqueles halos de inibição que não continham colônias resistentes foram submetidos à raspagem da porção mais interna, com o auxílio de alça bacteriológica. O material assim obtido foi inoculado, em estrias, em TSA. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 h, em atmosfera de aerobiose e, então, avaliada para verificação da presença/ausência de multiplicação bacteriana. Em caso de resultado positivo, as colônias foram analisadas macroscópica e microscopicamente. A presença de bastonete Gram negativo sugestivo de *Shigella* indicava a presença de substância(s) bacteriostática(s). Por outro lado, a ausência de clonagem bacteriana apontava a expressão de substância(s) com ação bactericida.

Como controle, a amostra SS12 foi cultivada como descrito anteriormente, a concentração foi ajustada em escala de McFarland 0,5, e a bactéria foi semeada, com o auxílio de *swab*, em *Mueller Hinton Agar*¹¹ e TSA. Discos de drogas antimicrobianas¹² sulfazotrim (bacteriostático para *Shigella*), ampicilina e ciprofloxacina (bactericida para *Shigella*) foram dispostos sobre o inóculo e as placas foram incubadas nas mesmas condições mencionadas. A presença de halos de inibição foi avaliada, o diâmetro dos halos foi determinado, os halos foram raspados na porção proximal em relação aos discos de antimicrobianos e o material foi semeado em TSA. As culturas foram incubadas e processadas como descrito para as placas teste, contendo os extratos proteicos.

Este ensaio foi realizado, também, com as frações ativas obtidas após cada etapa de purificação por cromatografia e ultrafiltração (ver item 4.4 e 4.7). Os experimentos foram realizados por duas pessoas, às cegas, e os dados só foram analisados no final do desenvolvimento deste estudo, para evitar qualquer avaliação tendenciosa.

¹¹ Difco

¹² Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil

4.3.3 ESPECTRO DE AÇÃO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S)

Para avaliação do espectro de ação da(s) substância(s) antagonista(s) foram testados tanto a amostra produtora como os extratos proteicos C-30 e C-75. A amostra SS9 foi cultivada em TSB, a 37 °C, por 24 h, em atmosfera de aerobiose e, então, alíquotas de 10 µL da cultura foram gotejadas em TSA. Após secagem, as placas foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente. No que se refere aos extratos, 10 µL de C-30 e C-75 foram gotejados sobre a superfície de TSA e o material foi mantido sobre a bancada para secagem. A seguir, todas as placas (com as culturas de SS9 e com os extratos C-30 e C-75) foram expostas a vapor de clorofórmio, por 30 min, mantidas entreabertas, também por 30 min, para evaporação do clorofórmio residual e, então, a camada de TSA foi recoberta com as culturas das bactérias reveladoras.

Foi empregado, para avaliação do espectro de atividade antagonista, um amplo painel de bactérias (626 amostras), em especial, pertencentes à microbiota indígena de seres humanos e organismos enteropatogênicos (QUADRO 1). As amostras, pertencentes à bacterioteca do MOA, mantidas em *freezer* -80 °C, foram cultivadas em meio sólido e submetidas à coloração pelo método de Gram. Após confirmação da pureza, foram cultivadas em caldo, inoculadas (0,01 mL das amostras cultivadas em aerobiose e 0,2 mL das amostras cultivadas em anaerobiose e microaerofilia) em 2,5 mL de meio de cultura semissólido e, então, vertidas sobre a camada de TSA contendo os *spots* de SS9, C-30 e C-75. Os meios de cultura empregados (sólidos, semissólidos e líquidos) e as condições de cultivo foram selecionados de acordo com as características de cada amostra reveladora (QUADRO 1). Após incubação, avaliou-se a presença ou ausência de halo de inibição da amostra reveladora.

4.4 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO C-75

Com base em resultados obtidos previamente pelo nosso grupo (Sousa, 2010; Moreira, 2011), o extrato C-75 foi escolhido para as etapas posteriores do estudo. C-75 foi submetido à purificação por meio de etapas sequenciais de cromatografia líquida, conforme protocolo do MOA e do Laboratório de Enzimologia e Físico-química de Proteínas do Departamento de Bioquímica do ICB/UFMG. As frações obtidas após cada etapa de purificação foram testadas quanto à expressão de antagonismo (4.3) e ao modo de ação da substância (4.3.2) e frações ativas foram selecionadas para as etapas subsequentes do trabalho, de acordo com o perfil cromatográfico (Moreira, 2011).

4.4.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA

C-75 foi submetido a cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q™ 5/50 GL Tricorn™¹³ acoplada a sistema FPLC. Todo o processo cromatográfico foi realizado em temperatura de, aproximadamente, 25 °C. A coluna foi previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, com um fluxo de 60 mL/h. Para eluição da amostra, foi utilizado o mesmo tampão acrescido de NaCl¹⁴ 1 M, em gradiente linear de 0-100%. Frações de 1,5 mL foram coletadas, monitoradas a 280 nm, liofilizadas (Everse & Stolzenbach, 1971), solubilizadas em água Milli-Q® estéril e o *pool* das frações ativas selecionadas foi encaminhado para cromatografia em coluna de gel filtração (item 4.4.2) e submetido a titulação, dosagem proteica, eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), teste de atividade *in situ* (eletroforese em gel de poliacrilamida), e avaliação da CIM, CBM e cinética de ação, conforme descrito nos itens 4.3.1 e 4.8 a 4.10.2.

¹³ GE Healthcare, Uppsala, Suécia

¹⁴ Synth

Quadro 1

Avaliação do espectro de atividade antagonista de *Shigella sonnei* SS9: amostras reveladoras e condições de cultivo.

Amostras reveladoras	Meios de cultura (sólido, líquido e semissólido ^a)	Condições de incubação
<i>Acinetobacter baumannii</i> (5) ^b		
<i>Kocuria kristinae</i> (1)		
<i>Kocuria rosea</i> (1)		
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (2)	<i>Tryptic Soy Agar</i> (TSA) e	37 °C, 24 h, aerobiose
<i>Staphylococcus</i> sp. (1)	<i>Tryptic Soy Broth</i> (TSB)	
<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	(pH 7,0)	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (4)		
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (2)		
<i>Staphylococcus warneri</i> (1)		
<i>Citrobacter freundii</i> (54)		
<i>Citrobacter koseri</i> (38)		
<i>Escherichia coli</i> (89)		
<i>Enterobacter aerogenes</i> (24)		
<i>Enterobacter cloacae</i> (25)		
<i>Hafnia alvei</i> (1)		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (53)	TSA e TSB	37 °C, 24 h, aerobiose
<i>Morganella morganii</i> (67)	(pH 7,0)	
<i>Proteus mirabilis</i> (56)		
<i>Providencia</i> (11)		
<i>Providencia rettgeri</i> (1)		
<i>Providencia stuartii</i> (2)		
<i>Salmonella</i> Typhimurium (1)		
<i>Shigella</i> (29)		

<i>Bifidobacterium</i> (35)	<i>Lactobacilli MRS Agar</i> ¹⁵ e <i>Lactobacilli MRS Broth</i> ¹⁶ pH 6,5	37 °C, 48 h, anaerobiose
<i>Bacteroides</i> (33) <i>Bacteroides fragilis</i> (6) <i>Bacteroides ovatus</i> (2) <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (1) <i>Bacteroides ureolyticus</i> (1) <i>Bacteroides vulgatus</i> (1) <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (1) <i>Peptostreptococcus micros</i> (4)	<i>Brain Heart Infusion Agar</i> ¹⁷ suplementado ^c e <i>Brain Heart Infusion</i> ¹⁸ suplementado ^d (pH 7,2)	37 °C, 48 h, anaerobiose
<i>Fusobacterium</i> (10) <i>Porphyromonas asaccharolytica</i> (2) <i>Propionibacterium acnes</i> (2) <i>Prevotella bivia</i> (2) <i>Prevotella corporis</i> (4) <i>Prevotella disiens</i> (1) <i>Prevotella melaninogenica</i> (1)	<i>Brain Heart Infusion Agar</i> suplementado ^e e <i>Brain Heart Infusion</i> suplementado ^{f,9} (pH 7,2)	37 °C, 48 h, anaerobiose
<i>Actinomyces turicensis</i> (1) <i>Centruroides gracilis</i> (2) <i>Clostridium difficile</i> (1) <i>Clostridium hastiforme</i> (2) <i>Clostridium perfringens</i> (1) <i>Gemella</i> sp. (2) <i>Tissierella praeacuta</i> (2) <i>Wolinella</i> sp. (3)	<i>Brucella Agar</i> ¹⁹ suplementado ⁸ e <i>Brucella Broth</i> ²⁰ (pH 7,2)	37 °C, 48 h, anaerobiose

¹⁵ Difco

¹⁶ Difco

¹⁷ Difco

¹⁸ Difco

¹⁹ BD

²⁰ BD

<i>Enterococcus faecalis</i> (6)		
<i>Enterococcus faecium</i> (1)	<i>Brain Heart Infusion Agar</i>	
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (5)	suplementado ^c e <i>Brain</i>	37 °C, 24 h,
<i>Streptococcus constellatus</i> (2)	<i>Heart Infusion</i>	microaerofilia
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (1)	suplementado ^d	
<i>Streptococcus pluranimalium</i> (3)	(pH 7,2)	
<i>Streptococcus sanguinosus</i> (5)		

Amostras de referência

<i>E. coli</i> enterohemorrágica CDC EDL 933		
<i>E. coli</i> enterotoxigênica H10407		
<i>E. coli</i> enteropatogênica CDC 0126	TSA e TSB	37 °C, 24 h,
<i>E. coli</i> ATCC 25925	(pH 7,0)	aerobiose
<i>S. Typhimurium</i> ATCC14028		
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022		
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285		
<i>B. fragilis</i> ATCC 29741	<i>Brain Heart Infusion Agar</i>	
<i>B. ovatus</i> ATCC 8483	suplementado ^e e <i>Brain</i>	37°C, 48h,
<i>B. thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	<i>Heart Infusion</i>	anaerobiose
<i>B. vulgatus</i> ATCC 8482	suplementado ^{f,g}	
<i>P. asaccharolytica</i> ATCC 25260	(pH 7,2)	
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611		

5 ^a, meio líquido + 0,7 % de ágar; ^b, número de amostras, ^c, hemina²¹ 5 mg/mL, menadiona²² 1 mg/mL, extrato de levedura²³ 0,5 %, sangue de cavalo 5 %; ^d, hemina 5 mg/mL, menadiona 1 mg/mL, extrato de levedura 0,5 %; ^e, hemina 5 mg/mL, menadiona 1 mg/mL, extrato de levedura 0,5 %, sangue de cavalo 5 %, L- cistina²⁴ 0,75 %; ^f, hemina 5 mg/mL, menadiona 1 mg/mL, extrato de levedura 0,5 %, L- cisteína²⁵ 0,5 %; ^g, no meio semissólido, L-cistina em substituição à L-cisteína.

²¹ Inlab, São Paulo, SP, Brasil

²² Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA

²³ BD

²⁴ Inlab

²⁵ Inlab

4.4.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE GEL FILTRAÇÃO

O *pool* das frações ativas selecionadas obtidas na cromatografia de troca iônica foi submetido a cromatografia em coluna de gel filtração Superose 12HR 10/30²⁶ acoplada a sistema FPLC. Como fase móvel, foi utilizado o tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, com fluxo de 30 mL/h, sendo coletadas frações de 1,5 mL, as quais foram monitoradas a 280 nm. Todo o ensaio cromatográfico foi realizado à temperatura de, aproximadamente, 25 °C. As frações foram liofilizadas, solubilizadas em 50 µL água Milli-Q[®] estéril e testadas quanto à expressão de antagonismo. Após confirmação da atividade antagonista e com base no perfil cromatográfico, algumas das frações selecionadas foram empregadas para a confecção de *pools*. As frações e os *pools* foram encaminhados para cromatografia de fase reversa e submetidos a titulação, dosagem proteica, eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), teste de atividade *in situ* e avaliação da CIM e CBM (itens 4.3.1 e 4.8 a 4.10.1).

4.4.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA POROS[®]

As frações e os *pools* oriundos da etapa anterior de cromatografia foram analisados em coluna de fase reversa Poros[®] (4.6 mm x 10 cm)²⁷ acoplada a sistema HPLC. A coluna foi previamente eluída com solução B (acetonitrila²⁸ 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético²⁹ (TFA) 0,05%) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). As frações foram eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100%, utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 e 280 nm, com temperatura aproximada de 25 °C. As frações foram coletadas em volume de 1 mL, liofilizadas e solubilizadas em 20 µL de água

²⁶ Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA

²⁷ Life Technologies, Foster City, CA, EUA

²⁸ Merck, Darmstadt, Alemanha

²⁹ Sigma-Aldrich

Milli-Q[®]. Frações ativas foram selecionadas para a análise por cromatografia em coluna de fase reversa, respeitando-se o perfil cromatográfico obtido.

5 4.4.4 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SUPELCOSIL[™]

As frações ativas selecionadas após a fase anterior de purificação foram submetidas a outra etapa de cromatografia de fase reversa. Foi empregada coluna LC-18 Supelcosil[™] (4,5 mm x 25 cm 5 µm)³⁰ acoplada a sistema HPLC, seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.4.3. As frações obtidas foram processadas também como descrito anteriormente (4.4.3) e, então, frações ativas e com perfil cromatográfico favorável foram encaminhadas para análise por espectrometria de massas. Visando a uma melhor purificação de uma das frações ativas originadas desta etapa de purificação, a mesma foi submetida a *recromatografia* em coluna de fase reversa Supelcosil[™].

4.4.5 RECROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SUPELCOSIL[™]

A fração selecionada da etapa anterior (cromatografia em coluna de fase reversa Supelcosil[™]) foi submetida a *recromatografia* empregando-se a mesma coluna e condições descritas nos itens 4.4.3 e 4.4.4. As frações obtidas foram coletadas em volume de 200 µL, liofilizadas e ressuspendidas em 20 µL de água Milli-Q[®]. Frações ativas e com perfil cromatográfico favorável foram encaminhadas para análise por espectrometria de massas.

³⁰ Sigma-Aldrich

4.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As frações selecionadas provenientes da etapa de cromatografia de fase reversa (coluna Supelcosil™) foram encaminhadas para espectrometria de massas, para avaliação da massa molecular das mesmas. Assim, as frações foram liofilizadas, solubilizadas em solução de TFA 0,1% e adicionadas em matriz de α -ciano-4-hidroxicinâmico, ácido sinapínico e super DHB na proporção de 1:1. Um volume de 1 μ L/spot foi depositado em placa de aquisição de dados do MALDI (MTP AnchorChips 384 x 600)³¹, a qual foi mantida à temperatura ambiente. Para determinação da massa molecular, foi empregado o Autoflex® III MALDI-TOF/TOF³² operado no modo linear positivo. Para a calibração linear, foi utilizado o *kit* de calibração *Protein Calibration Standard II*³³ e, para a análise dos dados, foi empregado o programa *Flex Analysis*³⁴. Esta etapa do estudo foi realizada no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG.

4.6 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DA SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA PURIFICADA

A substância antagonista ativa purificada proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna Supelcosil™ foi sequenciada por meio de fragmentação por laser em espectrômetro de massa. A sequência obtida foi analisada no *web software* BLAST, subaplicação Protein BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), para verificação da identidade e similaridade com outras proteínas. A sequência também foi comparada com a de bacteriocinas

³¹Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA

³²Bruker Daltonics

³³Bruker Daltonics

³⁴Bruker Daltonics

depositadas no banco de dados BACTIBASE (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org/main.php>).

5 4.7 PURIFICAÇÃO POR ULTRAFILTRAÇÃO

Uma alíquota de C-75 foi transferida para um dispositivo de ultracentrifugação Amicon Ultra-15, MWCO 10 kDa³⁵ e submetido a centrifugação por 5.000 x g, por 30 min, a 4 °C. Ambas as frações, com massa molecular inferior ou igual e superior a 10 kDa foram submetidas à avaliação de expressão de antagonismo e do modo de ação da substância antagonista. O material com massa molecular igual ou inferior a 10 kDa foi depositado em um dispositivo de ultracentrifugação Amicon Ultra 0,5 mL, MWCO 3 kDa³⁶ e centrifugado nas mesmas condições descritas acima. A atividade inibitória das frações obtidas foi avaliada (item 4.3), bem como o modo de ação (item 4.3.2) e teste de atividade *in situ* (item 4.9.1). A fração com massa molecular de 3 a 10 kDa foi submetida a cromatografia em coluna de fase reversa SupelcosilTM (item 4.4.4) e Waters Spherisorb (item 4.7.1).

20

4.7.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA WATERS SPHERISORB[®]

25 As frações ativas originadas da cromatografia de fase reversa SupelcosilTM previamente ultracentrifugadas em filtros Amicon foram submetidas a cromatografia em coluna de fase reversa Waters Spherisorb[®] C18 ODS2 (4,6 mm x 25 cm, 5 µm)³⁷ acoplada a sistema HPLC. A coluna foi lavada, equilibrada e as frações foram eluídas seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.4.3. As
30 frações coletadas foram liofilizadas, ressuspendidas em água Milli-Q[®] e avaliadas

³⁵ Millipore, Bilerica, MA, USA

³⁶ Millipore

³⁷ Sigma-Aldrich

quanto a sua capacidade de inibição de SS12 e modo de ação, como previamente descrito nos itens 4.3 e 4.3.2.

5 4.8 DOSAGEM PROTEICA

A dosagem proteica dos extratos intracelulares C-30 e C-75 e das frações e dos *pools* originados das cromatografias de troca iônica e gel filtração foi realizada segundo metodologia descrita por Bradford (1976), que utiliza o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*³⁸. O ensaio foi realizado em placa de poliestireno contendo 96 poços. Construiu-se uma curva padrão empregando-se 1 µg, 5 µg, 10 µg, 15 µg e 20 µg de soroalbumina bovina³⁹. As amostras diluídas 1:10 foram depositadas na placa e, então, submetidas a diluições seriadas. Após adição do reativo de Bradford, a leitura foi realizada em absorbância de 595 nm e a concentração proteica foi calculada.

4.9 SDS-PAGE

C-30, C-75 e as frações e os *pools* das frações oriundos das cromatografias de troca iônica e gel filtração foram submetidos a SDS-PAGE, em gradiente de 15 a 20%. Como padrão de massa molecular foi empregado o *Page Ruler Unstained Broad Range Protein Ladder*⁴⁰. A corrida foi realizada em temperatura ambiente, a 120 V e o gel foi corado pela prata (Tunon & Johansson, 1984; Rosenberg, 1996; Alfnas & Brune, 1998). Para a estimativa das massas moleculares das bandas proteicas, calculou-se o R_f e \log_{10} de cada banda do padrão de massa molecular. Com estes dados, foi determinada a equação da reta obtida na curva padrão. Em seguida, foi calculado o R_f de cada banda obtida e,

³⁸ Vetec

³⁹ Sigma

⁴⁰ Thermo Scientific, West Palm Beach, FL, EUA

assim, estabelecida a equação da reta, obtendo-se o logaritmo da massa molecular seguido do anti-logaritmo destas bandas (Rosenberg, 1996).

5 4.9.1 TESTE DE ATIVIDADE *IN SITU*

C-30, C-75 e as frações e os *pools* gerados a partir das cromatografias de troca iônica e gel filtração e as frações obtidas por ultrafiltração foram submetidas a eletroforese, para teste de atividade *in situ*. Empregou-se gel de poliacrilamida com gradiente 15 a 20% e a corrida foi realizada à temperatura ambiente, a 120 V. Após a corrida, o gel foi tratado com uma solução de isopropanol⁴¹ 20% e ácido acético⁴² 10%, sob agitação, por 2 h e, a seguir, lavado seis vezes (30 min/vez) com água destilada estéril. O gel foi depositado, sob condições assépticas, em uma placa de Petri, sobre uma camada de TSA e, então, recoberto com 20 mL de TSA semissólido acrescido de 60 µL de cultura de *S. sonnei* SS12. A placa foi incubada a 37 °C, por 24 h, em aerobiose e a leitura foi realizada pela avaliação da presença de linhas de inibição da amostra reveladora. As massas moleculares das bandas proteicas com atividade antibacteriana foram determinadas por comparação com o padrão pré-corado *Spectra*TM *Multicolor Broad Range Protein Ladder*⁴³ (Farias *et al.*, 1994; Alfenas & Brune, 1998).

4.10 DETERMINAÇÃO DA CIM

Para determinação da CIM, foram testados os extratos C-30 e C-75 e as frações e os *pools* obtidas das cromatografias de troca iônica (diluídos 1:10) e gel filtração. Todas as amostras foram esterilizadas por filtração (poro 0,22 µm)⁴⁴ e transferidas para poços de placa de poliestireno (96 poços). Os testes foram realizados em triplicata, exceto para as frações e os *pools* obtidos da

⁴¹ Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴² Vetec

⁴³ Fermentas Life Science, Burlington, Ontario, Canadá

⁴⁴ Millex, Bedford, MA, EUA

cromatografia de gel filtração, que foram avaliados em duplicata. Foram realizadas diluições seriadas em *Mueller Hinton Broth*, obtendo-se, em cada poço, um volume final de 200 µL. A concentração da cultura da amostra indicadora SS12 foi determinada em espectrofotômetro, em absorbância de 625 nm, e diluída 1:10 em solução salina estéril, para obtenção da concentração de 2×10^5 UFC/mL. Em outra placa de poliestireno, foram adicionados 90 µL de *Mueller Hinton Broth* nos poços teste e, a cada poço, foram adicionados 100 µL de cada diluição das amostras e 10 µL da cultura de SS12. Nos poços controle positivo foram depositados 190 µL meio e 10 µL de SS12 e nos poços controle negativo foram adicionados 100 µL da amostra teste, 90 µL de meio e 10 µL de solução salina estéril ou 190 µL de *Mueller Hinton Broth* e 10 µL de solução salina estéril. A placa foi incubada a 37 °C, por 24 h, em aerobiose e a leitura foi realizada pela observação da presença ou ausência de turvação do meio de cultura. A CIM foi definida como a menor concentração de bacteriocina capaz de inibir visivelmente a multiplicação de SS12. Para auxiliar a leitura do teste, adicionou-se a cada poço 10 µL de TTC⁴⁵ 0,5 % p/v (Sant'ana, *et al.*, 2002; CLSI, 2003; Valeff, 2011; Oliveira, 2013).

20 4.11 DETERMINAÇÃO DA CBM

Alíquotas de 100 µL dos controles negativos e de todas as amostras teste que não apresentaram crescimento bacteriano visível foram transferidas para placas contendo *Mueller Hinton Agar*. O inóculo foi realizado com o auxílio de alças de vidro em L. O controle positivo foi diluído 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} em *Mueller Hinton Broth* e 100 µL de cada diluição foram inoculados como descrito acima. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 h, em anaerobiose e, então, procedeu-se a leitura, pela contagem de colônias para estimativa do número de UFC/mL (CLSI, 2003; Valeff, 2011; Oliveira, 2013).

⁴⁵Merck, Darmstadt, Alemanha

4.12 CINÉTICA DE AÇÃO DOS EXTRATOS C-30 E C-75 E DO *POOL* CONSTITUÍDO PELAS FRAÇÕES ATIVAS ORIGINADAS DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

5

Para avaliação da cinética de ação, foram utilizados os extratos C-30, C-75 e o *pool* obtido da cromatografia de troca iônica. O material foi diluído 1:10 em *Mueller Hinton Broth*, esterilizado por filtração e diluído no mesmo caldo a uma concentração 4 vezes inferior ao MIC. A concentração da amostra indicadora da expressão antagonista SS12 foi ajustada, no momento de uso, em espectrofotômetro (absorbância de 625 nm) e diluída 1:10. Cada amostra foi testada em uma placa de poliestireno estéril. Nos poços teste e controle negativo foram depositados 100 µL da amostra teste diluída, 90 µL de *Mueller Hinton Broth* e 10 µL da amostra reveladora (poços teste) ou 10 µL de solução salina estéril (poços controle). Os poços controles positivos continham 190 µL de caldo e 10 µL da amostra indicadora. As placas foram incubadas a 37 °C, em aerobiose. Nos tempos de 0 a 40, de 70 a 110 minutos com intervalos de 10 minutos e de 125 a 245 minutos com intervalos de 15 minutos, alíquotas de 100 µL foram retiradas e semeadas em *Mueller Hinton Agar*. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 h, em aerobiose e a leitura foi realizada pela estimativa do número de UFC/mL (CLSI, 2003; Valeff, 2011; Oliveira, 2013).

10

15

20

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA, RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO, TITULAÇÃO E DOSAGEM PROTEICA DOS EXTRATOS C-30 E C-75

5

C-30 e C-75 exibiram atividade inibitória contra a amostra reveladora *S. sonnei* SS12 (FIG. 1 e FIG. 2). Os volumes obtidos após diálise, os títulos de atividade antagonista e a dosagem proteica dos extratos C-30 e C-75 estão apresentados na Tabela 1. O extrato C-75 apresentou resultados mais favoráveis para todos os parâmetros avaliados. Os dados corroboram aqueles relatados por Moreira, 2011; Sousa *et al.*, 2013a).

15

Tabela 1

Rendimento da extração das frações proteicas intracelulares de *Shigella sonnei* SS9 obtidas à saturação de 30% e 75% de sulfato de amônio.

Parâmetro	C-30	C-75
Volume	15,200 mL	24,550 mL
Título de atividade antagonista	5,49 x10 ¹³ UA/mL ^a	1,40 x 10 ¹⁶ UA/mL
Concentração proteica	64,3 mg/mL	112,3 mg/mL

^a, unidades arbitrárias de atividade antibacteriana/mL.

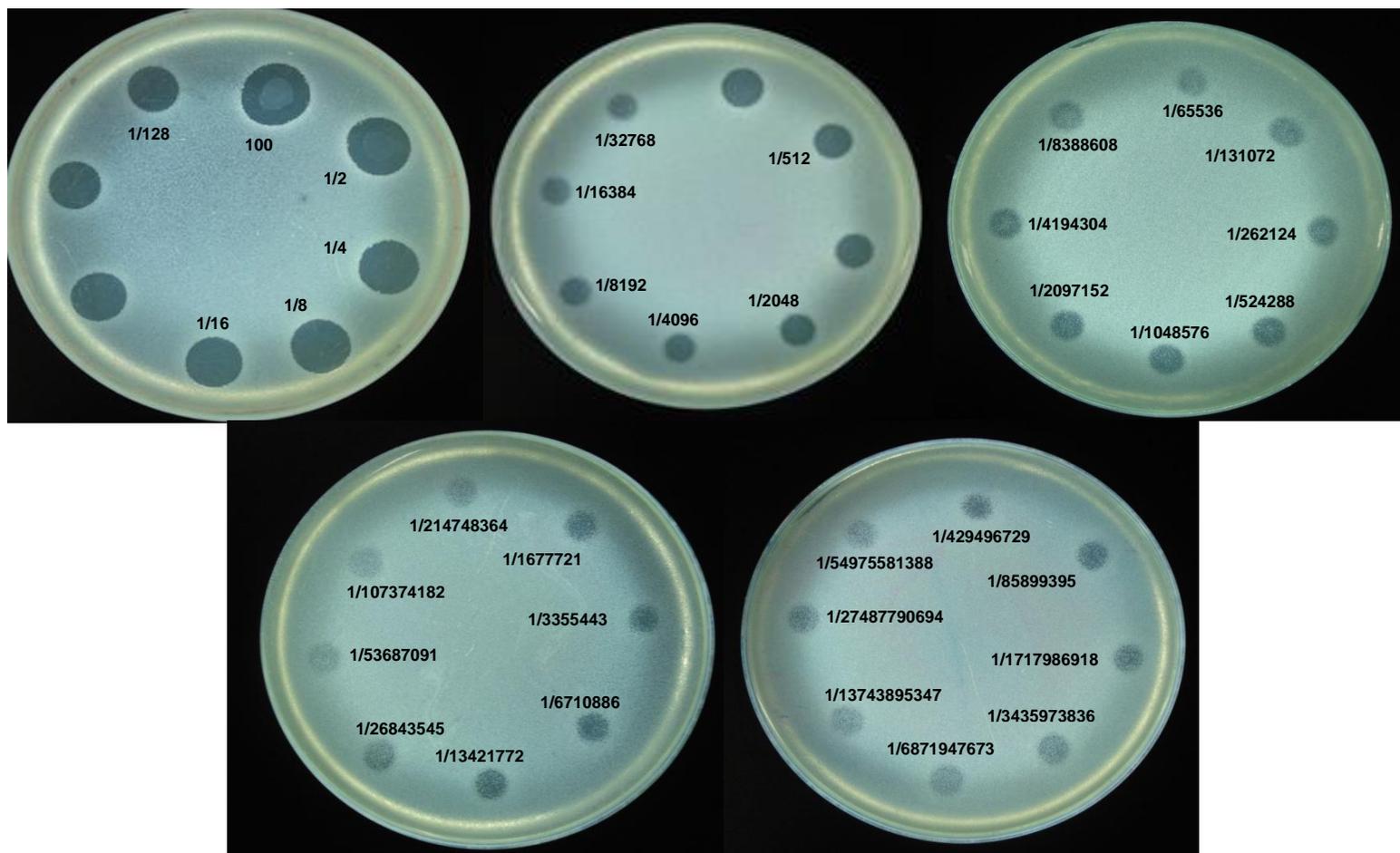


Figura 1

Avaliação da atividade antagonista do extrato proteico intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado à concentração de 30 % de sulfato de amônio contra *S. sonnei* SS12. Título de atividade antagonista: 54.975.581.388.800 UA/mL.

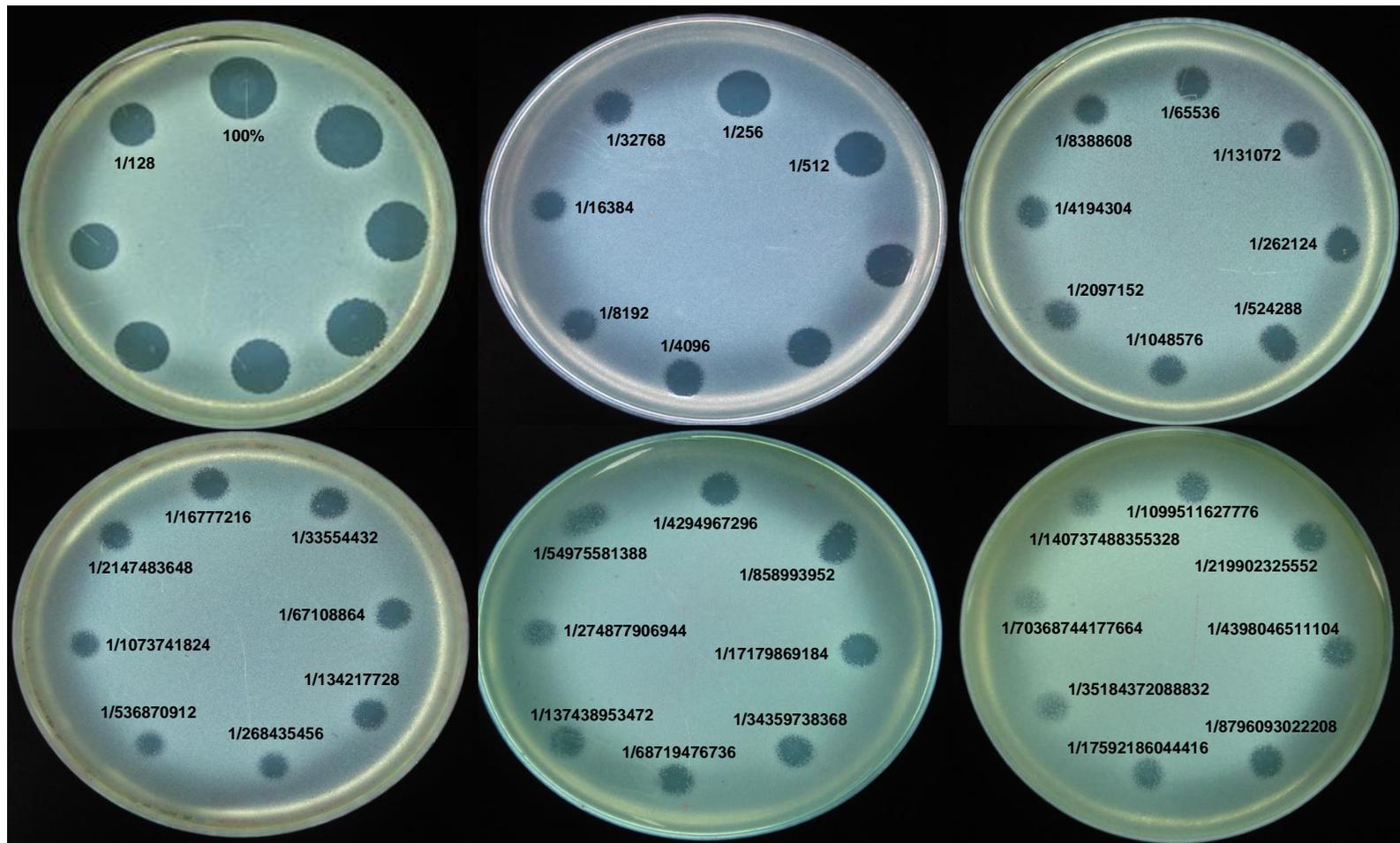


Figura 2

Avaliação da atividade antagonista do extrato proteico intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado à concentração de 75 % de sulfato de amônio contra *S. sonnei* SS12. Título de atividade antagonista: 140.737.488.355.532.800 UA/mL

5.1.1 AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S): C-30 e C-75

- 5 Não houve multiplicação bacteriana a partir do inóculo do material raspado dos halos de inibição da amostra reveladora gerados pela ação de C-30 e C-75. *S. sonnei* SS12 mostrou-se suscetível aos três antimicrobianos testados, sendo observados halos de inibição com os seguintes diâmetros: sulfazotrim, 19 mm; ampicilina, 26 mm; e ciprofloxacina, 34 mm (CLSI, 2013). A partir do raspado
- 10 do halo de inibição gerado pelo sulfazotrim, foi possível cultivar um bastonete Gram negativo com morfologia compatível com *S. sonnei*. Para os demais antimicrobianos, não foi observada multiplicação bacteriana (FIG. 3).

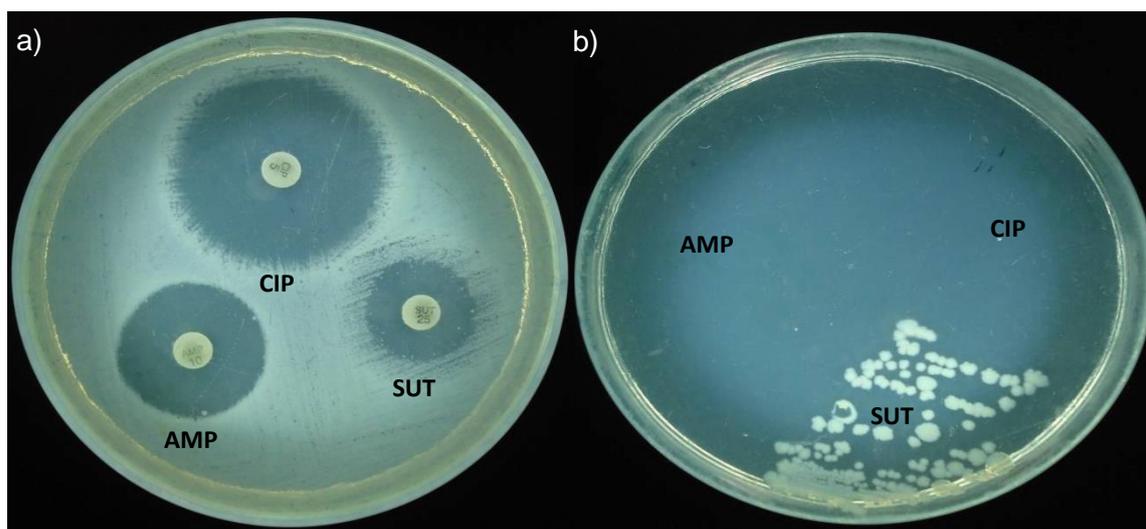


Figura 3

- 15 a) Ação de sulfazotrim (SUT), ampicilina (AMP) e ciprofloxacina (CIP) contra *Shigella sonnei* SS12; b) multiplicação de bastonete Gram negativo a partir de raspado da porção central do halo de inibição gerado pelo SUT.

5.1.2 ESPECTRO DE AÇÃO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S)

Das 626 amostras reveladoras analisadas, 67 (10,7 %) mostraram-se suscetíveis à(s) substância(s) antagonista(s) produzida(s) por SS9. C-30 e C-75 expressaram atividade contra 34 (5,4 %) e 43 (6,9 %) das 67 amostras, respectivamente. Todas as amostras suscetíveis à ação de C-30 também demonstraram suscetibilidade a C-75.

As 67 amostras suscetíveis pertencem a seis gêneros, três deles incluídos na família Enterobacteriaceae. Considerando-se apenas os grupos bacterianos para os quais um grande número de amostras foi testado, os maiores percentuais de suscetibilidade foram observados para *Shigella* e *E. coli*. Das 93 amostras de *E. coli*, 30 (32,3 %), incluindo a amostra *E. coli* enterotoxigênica, demonstraram suscetibilidade à(s) substância(s) antagonista(s) sintetizadas por SS9. No que se refere a *Shigella*, 24 das 30 (80,0 %) amostras avaliadas, incluindo *S. flexneri*, foram suscetíveis à ação antagonista de SS9 (TAB. 2 e FIG. 4).

5.2 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO C-75

20

5.2.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA

A partir da cromatografia em coluna aniônica Mono Q™, foram geradas 40 frações ativas. As frações 1 a 7, que não interagiram com a coluna, geraram halos de inibição maiores e límpidos (FIG. 5 e FIG. 6). As frações foram empregadas para constituição de um *pool* (*pool* TI) que, após liofilização e ressuspensão em água Milli-Q® (volume total 1,4 mL) apresentou concentração proteica de 6,51 mg/mL e titulação superior a $1,40 \times 10^{16}$ UA/mL (FIG. 5). O *pool* foi encaminhado para cromatografia de gel filtração.

30

Tabela 2

Espectro de ação antagonista de *Shigella sonnei* SS9 e dos extratos intracelulares proteicos obtidos a 30 % e 75 % de saturação de sulfato de amônio.

Amostras suscetíveis	SS9	C-30	C-75
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3/12,5 %	2	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	1/4,0 %	1	1
<i>Escherichia coli</i>	30/32,3 %	15	20
<i>Shigella</i>	24/80,0 %	16	19
<i>Bacteroides</i>	2/6,1 %	0	0
<i>Bacteroides fragillis</i>	1/12,5 %	0	0
<i>Bacteroides ovatus</i>	1/33,3 %	0	0
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	1/50,0 %	0	0
<i>Bacteroides vulgatus</i>	1/50,0 %	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	2/5,7 %	0	0
<i>Prevotella bivia</i>	1/50,0 %	0	0

5

5.2.1.1 AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) PRESENTE(S) NAS FRAÇÕES ATIVAS

Não houve multiplicação bacteriana a partir do inóculo do material raspado dos halos de inibição da amostra reveladora gerados pela ação das frações 1 a 7 originadas da cromatografia em coluna de troca iônica.

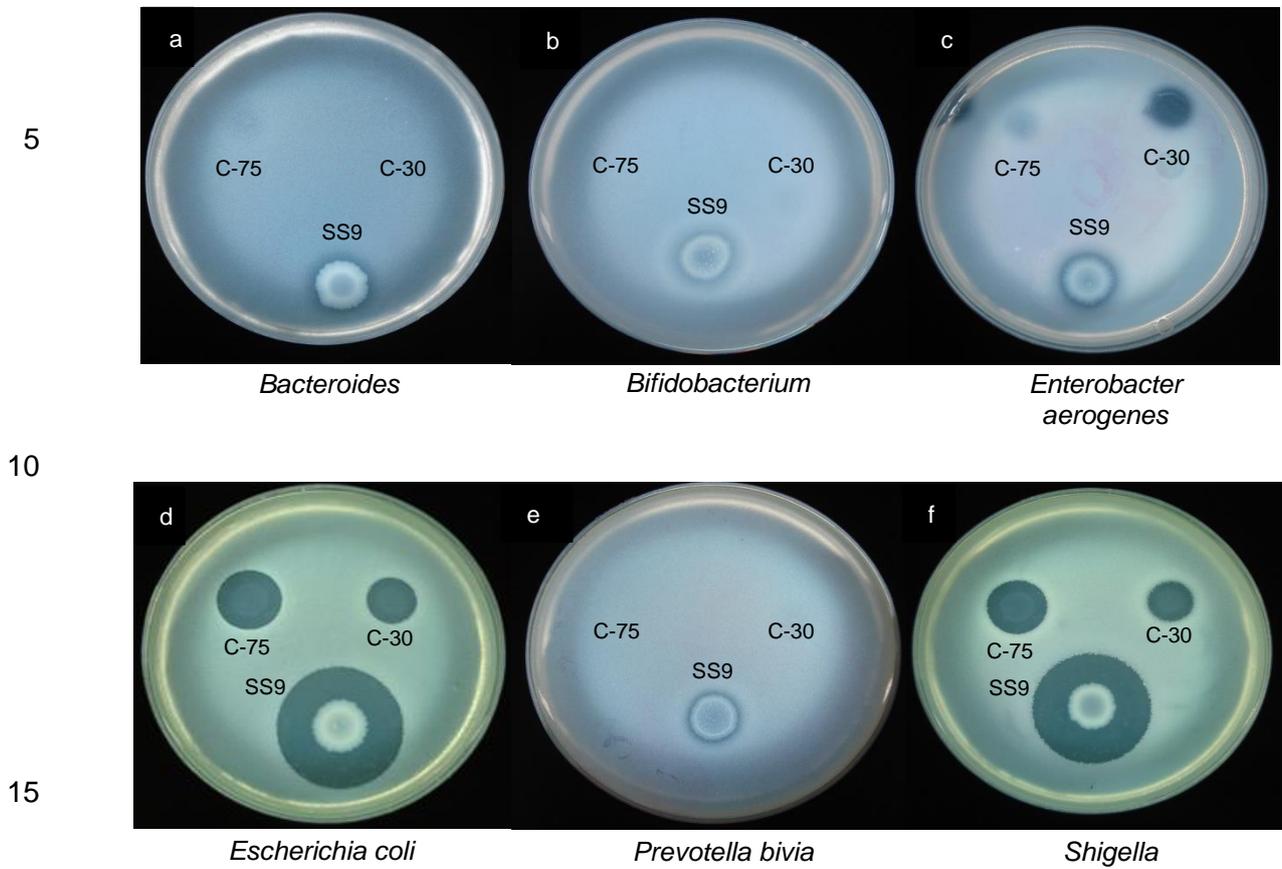


Figura 4

Avaliação da atividade antagonista de *Shigella sonnei*

20 SS9, amostra de *S. sonnei* isolada de espécime fecal de criança com doença
 diarreica aguda; C-30 e C-75, extratos proteicos intracelulares de SS9
 precipitados a concentrações de 30 % e 75 % de sulfato de amônio,
 respectivamente.

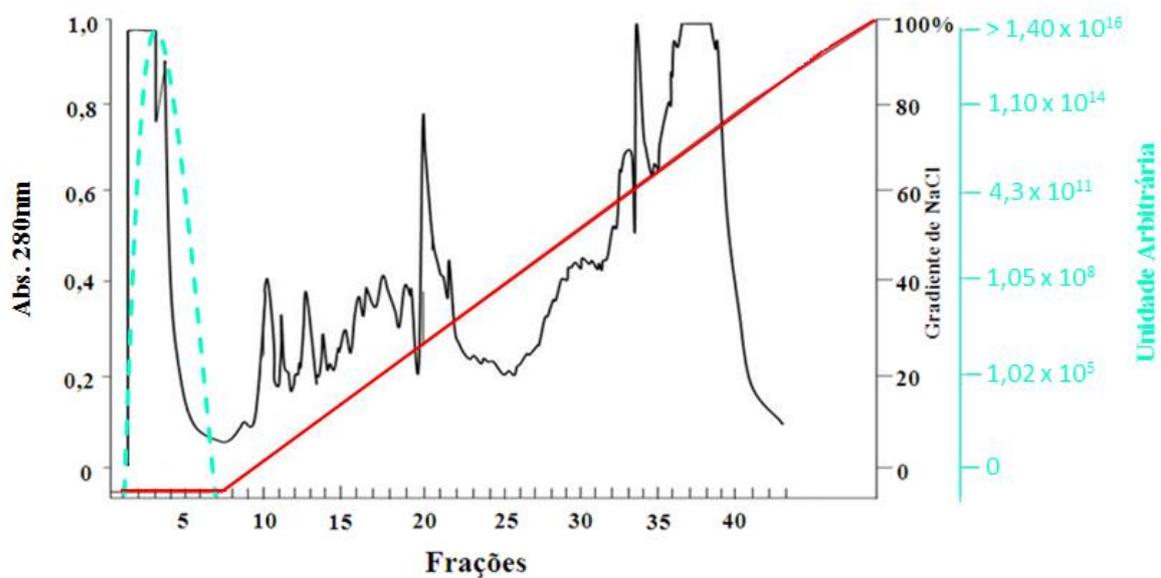


Figura 5

5 Perfil cromatográfico em coluna de troca iônica da fração intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitada a 75% de sulfato de amônio (C-75) em coluna Mono Q™ 5/50 GL Tricorn™ (GE Healthcare) equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, eluída em gradiente linear de 0 a 1,0 M de NaCl no mesmo tampão, com fluxo de 1,0 mL/min, leitura em Abs = 280 nm. Em ciano, título de atividade antagonista do *pool*/TI (frações 1 a 7); amostra reveladora: *S. sonnei* SS12.

10

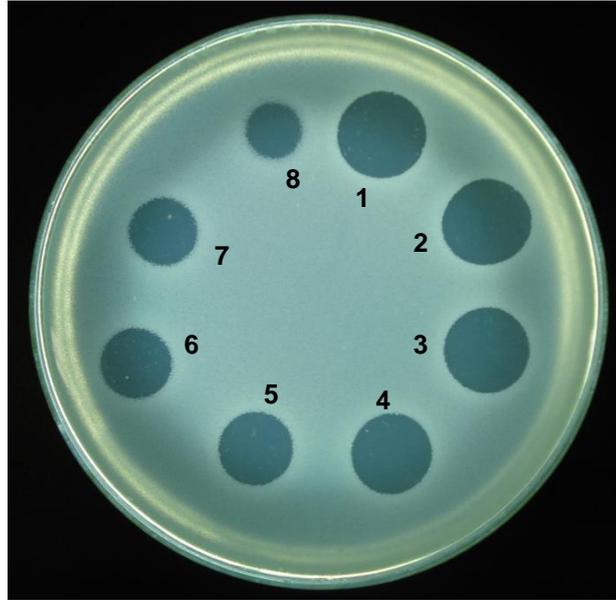


Figura 6

Atividade antagonista das frações 1 a 8 obtidas da cromatografia em coluna de troca iônica do extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75 % de sulfato de amônio contra a amostra indicadora *S. sonnei* SS12.

5.2.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE GEL FILTRAÇÃO

A cromatografia em coluna de gel filtração do *pool* TI gerou 25 frações (FIG. 7). As frações 2 a 15 apresentaram atividade e, entre elas, as frações 2 a 11 foram selecionadas para o próximo passo de purificação. Algumas frações foram agrupadas em *pools*, respeitando-se o perfil cromatográfico obtido. A concentração proteica e o título de atividade antagonista das frações 10 e 11 e dos *pools* das frações 2 a 4 (*pool* GF1), 5 e 6 (*pool* GF2) e 7 a 9 (*pool* GF3) estão apresentados na TAB. 3.

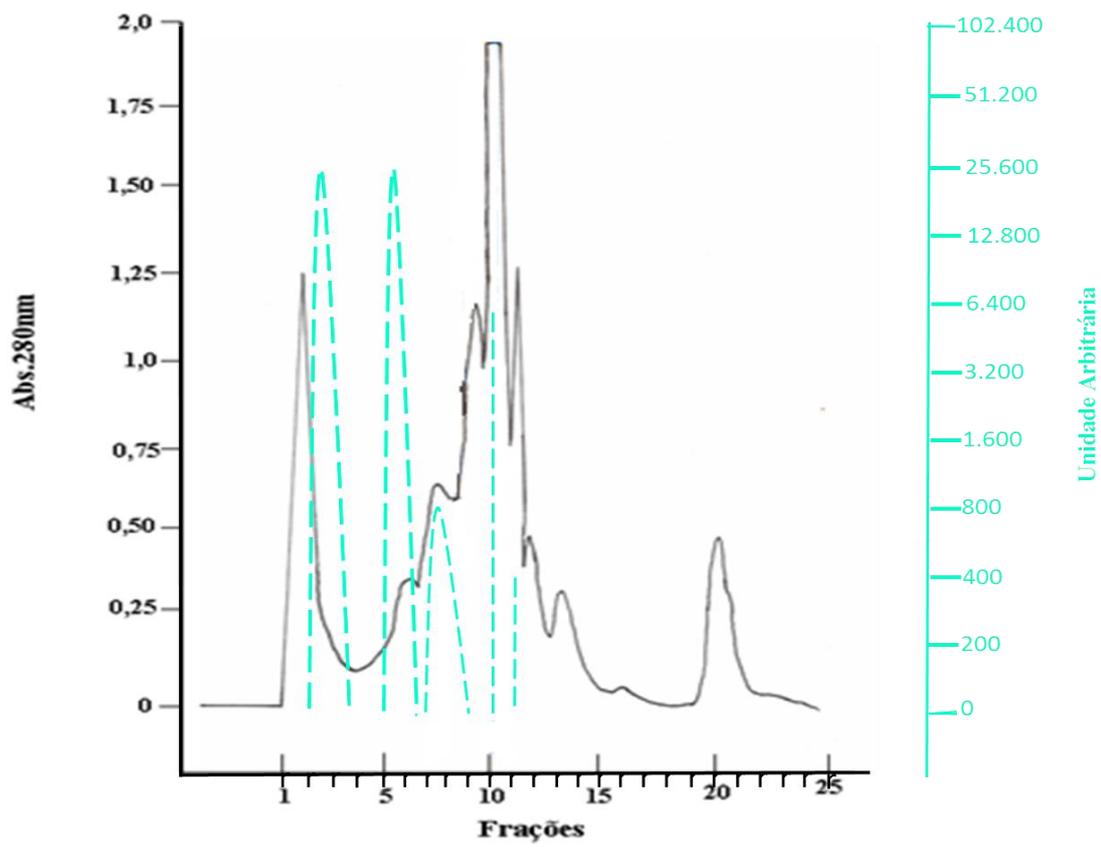


Figura 7

5 Perfil cromatográfico em coluna de gel filtração do *pool* TI (frações 1 a 7) obtido da cromatografia de troca iônica do extrato intracelular precipitado em 75% de sulfato de amônio da amostra de *Shigella sonnei* SS9. Em ciano, título de atividade antagonista dos *pools* GF1 (frações 2 a 4), GF2 (frações 5 e 6), GF3 (frações 7 a 9) e das frações 10 e 11; amostra reveladora: *S. sonnei* SS12.

Tabela 3

Título de atividade antagonista e concentração proteica dos *pools* GF1, GF2, GF3 e das frações 11 e 12 originados da cromatografia em coluna de gel filtração^a.

Parâmetro	<i>Pool</i> GF1 (frações 2 a 4)	<i>Pool</i> GF2 (frações 5 e 6)	<i>Pool</i> GF3 (frações 7 a 9)	Fração 10	Fração 11
Título de atividade antagonista (UA/mL ^b)	25.600	25.600	800	6.400	400
Concentração proteica (mg/mL)	14,836	3,1272	0,876	2,2036	0,0868

^a, corrida cromatográfica empregando o *pool* constituído pelas frações 1 a 7 recuperadas da cromatografia de troca iônica da fração intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitada a 75 % de sulfato de amônio; ^b, unidades arbitrárias de atividade antibacteriana/mL.

5.2.2.1 AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) PRESENTE(S) NAS FRAÇÕES ATIVAS

Observou-se multiplicação bacteriana a partir do inóculo do material raspado dos halos de inibição da amostra reveladora gerados pela ação das frações 3 e 9 originadas da cromatografia em coluna de gel filtração. O exame microscópico após coloração pelo método de Gram evidenciou bastonetes Gram negativos sugestivos de *S. sonnei*, o que indica que a(s) substância(s) antagonista(s) presente(s) nestas frações possui(em) efeito bacteriostático.

5.2.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA POROS[®]

Cada uma das corridas cromatográficas em coluna de fase reversa Poros[®] referentes aos *pools* GF1, GF2 e GF3 e às frações 10 e 11 originadas da cromatografia da coluna de gel filtração gerou 50 frações (FIG. 8 a 12). Os resultados dos testes de avaliação de atividade antagonista e as frações

encaminhadas para a cromatografia em coluna de fase reversa Supelcosil™ estão discriminados na TAB. 4. Os ensaios de titulação, dosagem proteica, eletroforese em gel de poliacrilamida, avaliação da CIM, CBM e cinética de ação não foram realizados devido à quantidade pequena de material disponível. Merece destaque a fração 26 recuperada da corrida cromatográfica em coluna de fase reversa Poros® da fração 10 obtida da cromatografia de gel filtração.

10

Tabela 4

Sequência de purificação cromatográfica em colunas de gel filtração e fase reversa Poros® e Supelcosil™.

Frações/ <i>pool</i> ativos originados da cromatografia de gel filtração	Frações ativas originadas da cromatografia de fase reversa Poros®	Frações encaminhadas para cromatografia de fase reversa Supelcosil™
<i>Pool</i> GF1 (frações 2 a 4)	Frações 24 a 38	Fração 24, <i>pools</i> FR1 (frações 25 e 26) e FR2 (frações 27 a 29)
<i>Pool</i> GF2 (frações 5 e 6)	Frações 26 a 39	Frações 26, 27 e 28, <i>pools</i> FR3 (frações 29 e 30) e FR4 (frações 31 a 33)
<i>Pool</i> GF3 (frações 7 a 9)	Frações 25 a 39	Frações 25, 26, 27, 28, <i>pools</i> FR5 (frações 29 e 30), FR6 (frações 31 e 32) e FR7 (frações 33 a 36)
Fração 10	Frações 26 a 36	Frações 26 e 27, <i>pools</i> FR8 (frações 28 e 29) e FR9 (frações 30 a 34)
Fração 11	Frações 25 a 33	Frações 25 e 27, <i>pools</i> FR10 (frações 28 e 29), FR11 (frações 30 e 31) e FR12 (frações 32 e 33)

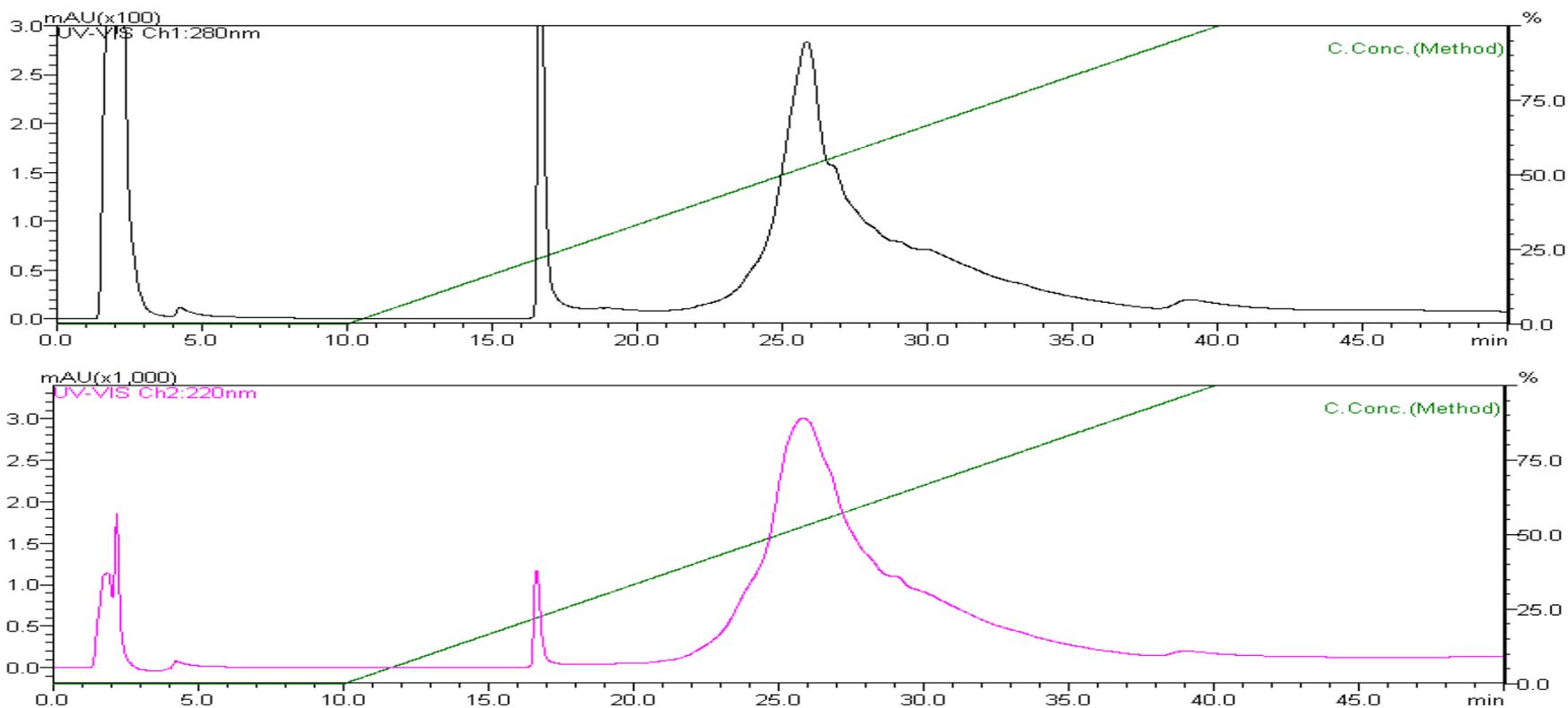


Figura 8

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* GF1 (frações 2 a 4 da cromatografia de gel filtração). Coluna Poros® (Life Technologies) eluída com solução B (acetonitrila 100% v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05%) e equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q®). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100% (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100% da solução A, 10-40 min 0-100% da solução B e 40-50 min 100% da solução B. A corrida foi monitorada a 220nm (rosa) e 280nm (preto), com temperatura aproximada de 25°C. As frações 24 a 38 apresentaram atividade antagonista e as frações 24 (eluída com 45% solução B) a 29 (eluída com 64% solução B) foram encaminhadas para cromatografia em coluna Supelcosil™.

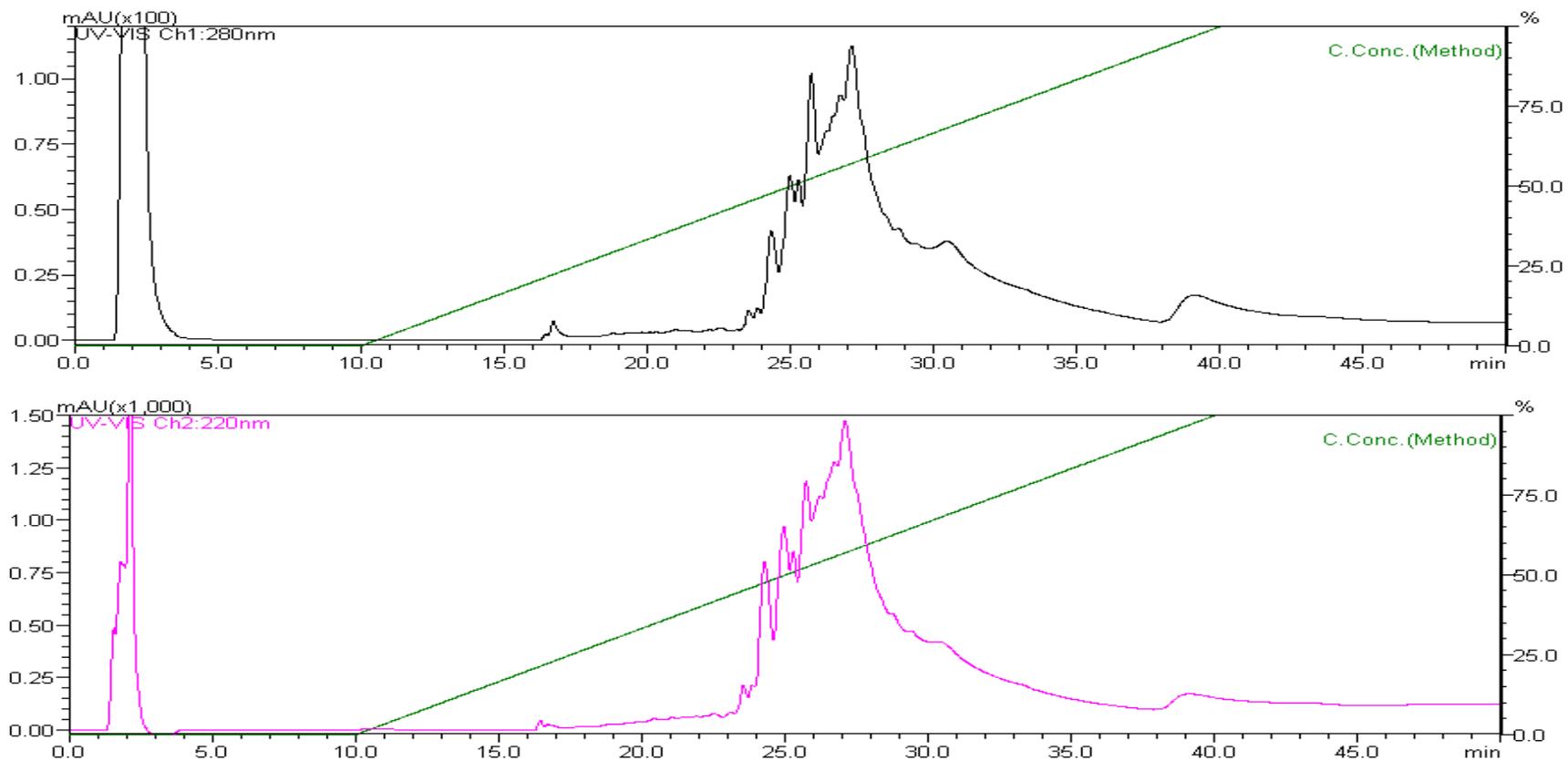


Figura 9

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* GF2 (frações 5 e 6 da cromatografia de gel filtração). Coluna Poros® (Life Technologies) eluída com solução B (acetonitrila 100% v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05%) e equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q®). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100% (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100% da solução A, 10-40 min 0-100% da solução B e 40-50 min 100% da solução B. A corrida foi monitorada a 220nm (rosa) e 280nm (preto), com temperatura aproximada de 25°C. As frações 26 a 39 apresentaram atividade antagonista e as frações 26 (eluída com 50% solução B) a 33 (eluída com 77% solução B) foram encaminhadas para cromatografia em coluna Supelcosil™.

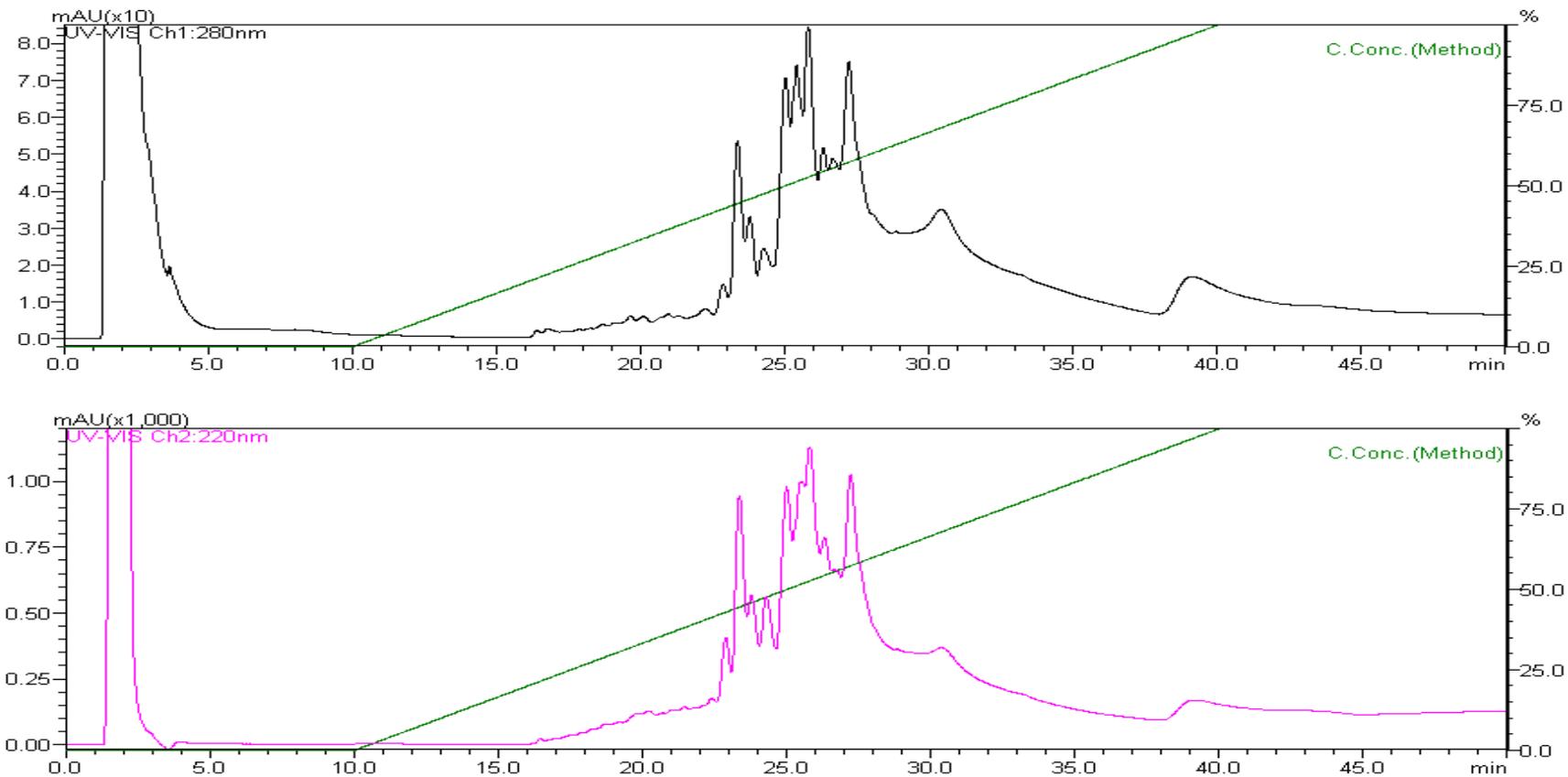


Figura 10

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração). Coluna Poros[®] (Life Technologies) eluída com solução B (acetonitrila 100% v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05%) e equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100% (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100% da solução A, 10-40 min 0-100% da solução B e 40-50 min 100% da solução B. A corrida foi monitorada a 220nm (rosa) e 280nm (preto), com temperatura aproximada de 25°C. As frações 25 a 39 apresentaram atividade antagonista e as frações 25 (eluída com 50% solução B) a 36 (eluída com 86 % solução B) foram encaminhadas para cromatografia em coluna Supelcosil[™].

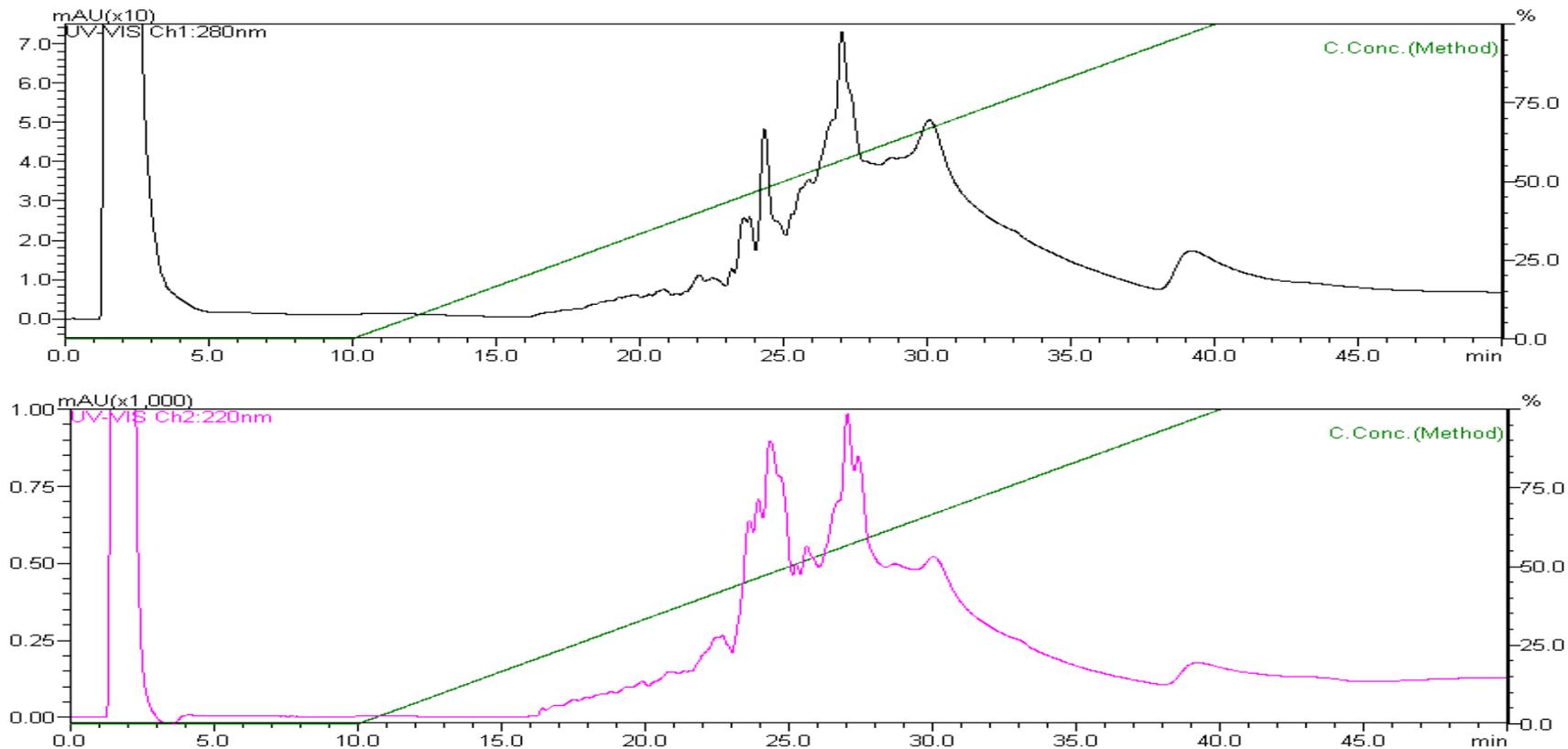


Figura 11

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 10 da cromatografia de gel filtração. Coluna Poros® (Life Technologies) eluída com solução B (acetonitrila 100% v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05%) e equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q®). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100% (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100% da solução A, 10-40 min 0-100% da solução B e 40-50 min 100% da solução B. A corrida foi monitorada a 220nm (rosa) e 280nm (preto), com temperatura aproximada de 25°C. As frações 26 a 36 apresentaram atividade antagonista e as frações 26 (eluída com 50% solução B) a 34 (eluída com 79 % solução B) foram encaminhadas para cromatografia em coluna Supelcosil™.

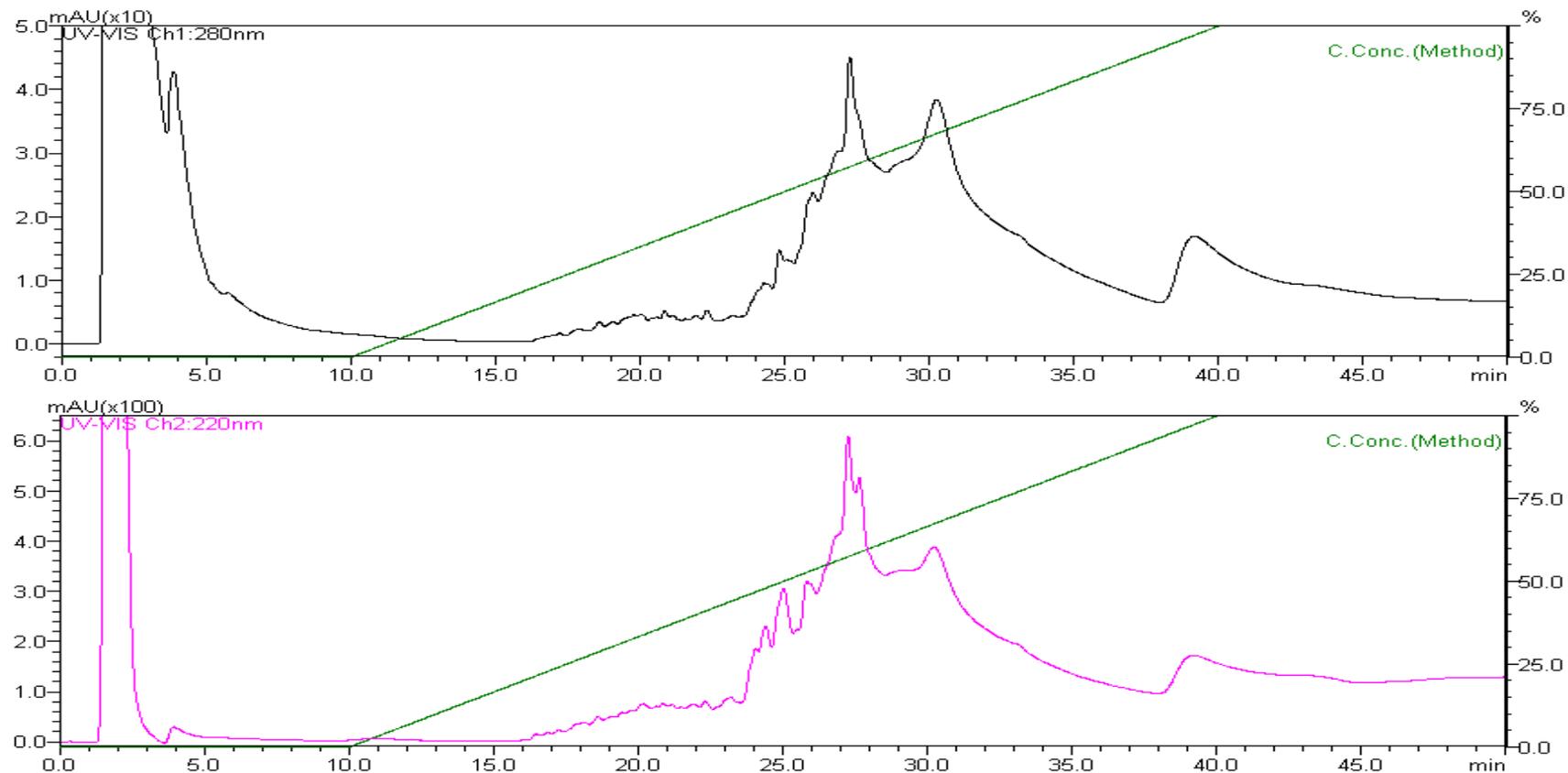


Figura 12

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 11 da cromatografia de gel filtração. Coluna Poros[®] (Life Technologies) eluída com solução B (acetonitrila 100% v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05%) e equilibrada com solução A (TFA 0,05% v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100% (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100% da solução A, 10-40 min 0-100% da solução B e 40-50 min 100% da solução B. A corrida foi monitorada a 220nm (rosa) e 280nm (preto), com temperatura aproximada de 25°C. As frações 25 (eluída com 50% solução B) a 33 (eluída com 76 % solução B) apresentaram atividade antagonista e foram encaminhadas para cromatografia em coluna SupelcosilTM.

5.2.3.1 AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) PRESENTE(S) NAS FRAÇÕES ATIVAS

Na TAB. 5 são apresentados os resultados relativos à multiplicação bacteriana a partir do inóculo do material raspado dos halos de inibição da amostra reveladora originados pelas frações obtidas da cromatografia em coluna de fase reversa Poros[®]. O exame microscópico após coloração pelo método de Gram evidenciou bastonetes Gram negativos sugestivos de *S. sonnei*. O resultado obtido para a fração 28 da cromatografia de fase reversa em coluna Poros[®] obtida do *pool* GF1 (frações 2 a 4 da cromatografia de gel filtração) repetiu-se na maioria das extrações proteicas.

Tabela 5

Frações obtidas da cromatografia em coluna de fase reversa Poros[®] que produziram halos de inibição de *Shigella sonnei* SS12 a partir dos quais foi cultivado bastonete Gram negativo sugestivo de *S. sonnei*.

Fração	Origem da fração: cromatografia de gel filtração
28	<i>Pool</i> GF1 (frações 2 a 4)
26 e 27	<i>Pool</i> GF2 (frações 5 e 6)
27, 28, 30 e 32	<i>Pool</i> GF3 (frações 7 a 9)
27, 29 e 30	Fração 10
27 e 30	Fração 11

5.2.4 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SUPELCOSIL[™]

Cada uma das corridas cromatográficas em coluna Supelcosil[™] gerou 45 frações. O resultado dos testes de atividade das frações recuperadas destas corridas está apresentado na TAB. 6. A atividade antagonista foi observada entre as frações 30 a 40, com exceção da fração 24 obtida do *pool* FR2 (frações 27 a

29 da cromatografia em coluna de fase reversa Poros[®]). Dosagem proteica, titulação, análise em gel de poliacrilamida e determinação de CIM, CBM e cinética de ação não foram realizadas uma vez que a quantidade de material era insuficiente.

5 Os cromatogramas referentes à fração purificada e as frações parcialmente purificadas, contendo até quatro massas, estão apresentados nas FIG. 13 a 33 (Anexo 1). A atividade antagonista das frações 30 a 38 recuperadas da cromatografia em coluna de fase reversa Supelcosil[™] [origem: fração 26 da cromatografia de fase reversa coluna Poros[®] - fração 10 da cromatografia de gel
10 filtração - *pool* TI (frações 1 a 7) da cromatografia de troca iônica] está ilustrada na FIG. 34. Destaque para a fração 34, que foi purificada.

5.2.4.1 AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) PRESENTE(S) NAS FRAÇÕES ATIVAS

15

As frações obtidas da cromatografia de fase reversa Supelcosil[™] que geraram halos de inibição da amostra reveladora a partir dos quais bastonetes Gram negativos sugestivos de *S. sonnei* foram cultivados estão listadas na TAB. 7. O resultado obtido para a fração 33 [origem: fração 27 da cromatografia fase reversa Poros[®] - *pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração) - *pool*
20 TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)] repetiu-se em diversos ensaios.

25 5.2.5 RECROMATOGRÁFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SUPELCOSIL[™]

Na tentativa de uma melhor purificação a fração 35 originada da cromatografia em coluna de fase reversa Supelcosil[™] [origem: fração 25 da
30 cromatografia de fase reversa Poros[®] - *pool* GF1 (frações 2 a 4 da cromatografia de gel filtração) - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)] foi selecionada e submetida a uma segunda corrida cromatográfica empregando-se

a mesma coluna. Foram originadas as frações 34.1 a 34.5, 35.1 a 35.5 e 36.1 a 36.4, ativas contra a amostra indicadora SS12.

5 5.2.5.1 AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) PRESENTE(S) NAS FRAÇÕES ATIVAS

10 Não houve multiplicação bacteriana a partir do inóculo do material raspado dos halos de inibição da amostra reveladora gerados pela ação de nenhuma das frações originadas da *recromatografia* em coluna de fase reversa Supelcosil™.

Tabela 6

15 Frações ativas obtidas da cromatografia em coluna de fase reversa Supelcosil™.

Frações/ <i>pool</i> originados da cromatografia de gel filtração	Frações/ <i>pool</i> originados da cromatografia de fase reversa Poros®	Frações ativas obtidas da cromatografia de fase reversa Supelcosil™
<i>Pool</i> GF1 (frações 2 a 4)	Fração 24 <i>Pool</i> FR1 (frações 25 e 26)	- Frações 34 a 38
	<i>Pool</i> FR2 (frações 27 a 29)	Frações 24, 33 a 38
<i>Pool</i> GF2 (frações 5 e 6)	Fração 26	Frações 32 a 39
	Fração 27	Frações 33 a 39
	Fração 28 <i>Pool</i> FR3 (frações 29 e 30)	Frações 33 a 39 Frações 32 a 39
	<i>Pool</i> FR4 (frações 31 a 33)	Frações 33 a 38

<i>Pool GF3</i> (frações 7 a 9)	Fração 25	Frações 33 a 39
	Fração 26	Frações 30 a 40
	Fração 27	Frações 32 a 39
	Fração 28	Frações 32 a 39
	<i>Pool FR5</i> (frações 29 e 30)	Frações 32 a 38
	<i>Pool FR6</i> (frações 31 e 32)	Frações 30 a 38
	<i>Pool FR7</i> (frações 33 a 36)	Frações 29 a 37
Fração 10	Fração 26	Frações 30 a 38
	Fração 27	Frações 30 a 38
	<i>Pool FR8</i> (frações 28 e 29)	Frações 30 a 38
	<i>Pool FR9</i> (frações 30 a 34)	Frações 30 a 38
Fração 11	Fração 25	Frações 33 a 38
	Fração 27	Frações 33 a 38
	<i>Pool FR10</i> (frações 28 e 29)	Frações 30 a 38
	<i>Pool FR11</i> (frações 30 e 31)	Frações 35 a 37
	<i>Pool FR12</i> (frações 32 e 33)	Frações 34 a 38

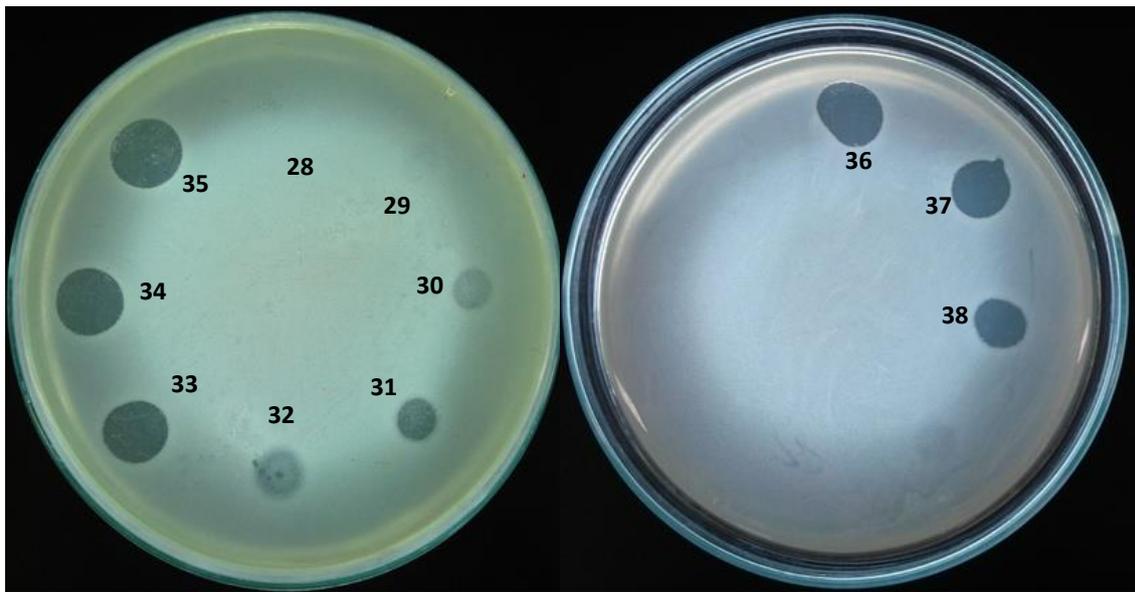


Figura 34

Atividade antagonista das frações originadas da cromatografia em coluna de fase reversa Supelcosil™ [origem: fração 26 da cromatografia de fase reversa Poros® -
5 origem: fração 10 da cromatografia de gel filtração - pool TI (frações 1 a 7)
da cromatografia de troca iônica - extrato intracelular de
Shigella sonnei SS9 precipitado a 75 % de sulfato de amônio] contra
a amostra indicadora *S. sonnei* SS12.

Tabela 7

Frações obtidas da cromatografia em coluna de fase reversa Supelcosil™ que produziram halos de inibição de *Shigella sonnei* SS12 a partir dos quais foi cultivado bastonete Gram negativo sugestivo de *S. sonnei*.

Fração	Origem da fração: fase reversa Poros® - gel filtração
36	28 - <i>pool</i> GF2
33	27 - <i>pool</i> GF3
33	28 - <i>pool</i> GF3
31, 32, 35 e 38	27 - fração 10
33 e 37	<i>Pool</i> FR9 (frações 30 a 34) - fração 10
33 e 37	<i>Pool</i> FR10 (frações 28 e 29) - fração 11

5

5.3 AVALIAÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES DAS FRAÇÕES ATIVAS PURIFICADA E PARCIALMENTE PURIFICADAS

10

5.3.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SUPELCOSIL™

Os resultados relativos à espectrometria de massas das frações ativas obtidas da cromatografia de fase reversa em coluna Supelcosil™ parcialmente purificadas e purificada estão listados na TAB. 8. Dados referentes às frações contendo até quatro massas moleculares foram apresentados. Uma das frações, com massa molecular de 7.279,134 Da, foi purificada.

Os perfis dos espectros de massa contendo até duas massas moleculares estão apresentados como Anexo 2 (FIG. 35 a FIG. 60). As frações 38 (FIG. 39), 31(FIG. 44), 39 (FIG. 47), 32 (FIG. 48), 32 (FIG. 50) e 30 (FIG. 57) apresentaram apenas uma massa molecular, quais sejam 7.377,969 Da, 7.235,679 Da, 10.761,097 Da, 7.338,008 Da, 7.341,498 Da e 7.877,274 Da, respectivamente.

Tabela 8

Resultados da espectrometria de massas das frações com até quatro massas moleculares originadas da cromatografia em coluna de fase reversa Supelcosil™ e origem das frações^a.

5

Massa molecular (Da)	Cromatografia		
	Fase reversa		Gel filtração
	Supelcosil™	Poros®	
10.123,881 24.552,340	35	<i>Pool</i> FR1 (frações 25 e 26)	
6.410,649 9.535,329	24		
10.122,652 20.372,986	33		<i>Pool</i> GF1 (frações 2 a 4)
7.388,035 9.215,479 24.669,372	37	<i>Pool</i> FR2 (frações 27 a 29)	
9.214,614 9.394,206 20.397,587	38		

6.563,857		
8.995,100		
9.396,267	36	
26.679,268		
7.842,672		Fração 26
9.396,826	37	
7.385,905		
9.214,176	38	
10.900,831		
7.393,103		
9.216,335	38	
18.563,100		
7.407,937		Fração 27
9.272,358		
10.736,564	39	
18.558,191		
7.380,400		
8.171,333	37	Fração 28
9.368,083		
7.377,969	38	

7.296,753			
10.092,995	32		
26.358,138			
7.374,512			
7.811,138	37	<i>Pool FR3</i>	
9.370,049		(frações 29 e 30)	
7.377.502			
7.811,587	38		
7.378,750			
9.243,296	39		<i>Pool GF2</i>
6.817,719			(continuação)
10.645,063	33		
7.386,828			
7.820,264	37	<i>Pool FR4</i>	
9.250,963		(frações 31 a 33)	
6.174,081			
7.397,701			
7.821,927	38		
9.256,579			

7.237,307			
12.534,376			
18.022,094	33		
25.124,721			
7.235,343			
9.145,786	34		
25.038,362			
1.068,486			Fração 25
4.340,049			
6.991,249	37		
7.812,691			
5.346,583			
7.816,517	39		
10.706,136			
5.633,748			<i>Pool GF3</i>
6.401,964	30		(frações 7 a 9)
7.235,679	31		
7.296,251			
20.866,140	32		
26.360,694			
9.094,784			Fração 26
18.182,508	35		
20.647,021			
5.347,669			
9.184,995			
10.646,511	40		
21.611,674			

7.312,276			
26.344,106	32		
10.286,362			
20.747,279	34		
41.303,497			
10.286,362			
15.254,986			Fração 27
20.764,560	35		
41.386,433			
9.233,731			
10.706,998	39		
10.976,160			
7.331,113			
22.113,503	32		
7.423,219			
7.856,869	38		Fração 28
20.758,080			
10.761,097	39		
7.338,008	32		
7.276,260			
9.577,549			
20.758,080	34		
25.052,665			
7.276,402			
9.008,965			
20.758,080	35		Pool FR5
20.290,184			(frações 29 e 30)
7.276,737			
7.856,414			
9.012,172	37		
20.780,880			
7.277,150			
7.860,562	38		
8.193,741			

Pool GF3
(continuação)

5.938,576			
6.423,931	30		
7.341,498	32		
7.424,074		<i>Pool FR6</i> (frações 31 e 32)	
7.863,417			
9.294,768	38		
18.570,550			
7.279,485	31		
7.485,706			
7.340,294	32		<i>Pool GF3</i> (continuação)
7.547,522			
7.281,695		<i>Pool FR7</i> (frações 33 a 36)	
9.842,931	33		
10.744,434			
7.280,554			
9.547,551	35		
11.585,393			
7.424,774			
9.021,102			
20.744.090	36		
25.063,226			

6.261,017		
6.932,622	30	
7.877,964		
7.279,134	34	Fração 26
7.277,154		
8.031,282		
8.449,314	38	
9.051,209		
6.262,065		
7.896,821	30	
20.721,109		
24.709,552	35	Fração 27
20.721,109		
24.728,435	36	
6.257,573		
6.973,776	30	
7.874,268		Fração 10
6.415,827		
10.149,942		
10.711,109	33	
20.598,995		
5.780,091		
9.232,252	36	Pool FR8 (frações 28 e 29)
24.668,974		
5.780,973		
9.232,998	37	
24.670,785		
5.782,259		
7.416,072	38	
9.237,049		
7.877,274	30	
8.126,979		
10.153,323	32	Pool FR9 (frações 30 a 34)

6.418,160		
10.703,747	33	
21.398,493		
7.282,824		
9.203,435	34	Fração 25
9.5743,717		
21.398,493		
9.199,738		
9.743,717	35	
24.214,955		
28.587,628		
6.417,316		
9.584,671	33	Fração 27
10.702,779		
20.364,228		
7.425,826		
9.296,919	37	Fração 11
20.664,912		
5.664,785		
6.261,465	30	
5.663,668		
6.615,865	31	
6.420,252		
10.152,710	33	<i>Pool</i> FR10
10.697,560		(frações 28 e 29)
20.363,615		
6.421,604		
9.590,283	34	
20.685,630		
7.428,222		
7.863,336	38	
9.298,750		

^a, todas as frações encaminhadas para cromatografia em coluna de gel filtração originaram-se do *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica).

5.3.2 RECROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SUPELCOSIL™

A partir da *recromatografia* da fração 35 da cromatografia de fase reversa Supelcosil™ [(origem: cromatografia de fase reversa Poros® 25 - *pool* GF1 (frações 2 a 4 da cromatografia de gel filtração) - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)] foram obtidas 14 frações ativas, denominadas 34.1 a 34.5, 35.1 a 35.5 e 36.1 a 36.4. As frações 34.1 a 36.1 apresentaram massas distintas e foram consideradas parcialmente purificadas. Aquelas com até quatro massas moleculares estão listadas na TAB. 9. As frações 34.2, 34.3, 34.4 e 34.5 apresentaram massas moleculares de 24,6 a 30,8 kDa, sugerindo que a expressão antagonista deve-se à síntese de colicina(s). O perfil cromatográfico e os espectros de massas contendo 2 massas moleculares estão apresentados nas FIG. 61 a 63 (Anexo 3).

15

5.4 SEQUENCIAMENTO DA FRAÇÃO PURIFICADA

A sequência parcial da substância ativa purificada, fração 34 da cromatografia de fase reversa Supelcosil™ [origem: fração 26 da cromatografia de fase reversa Poros® - fração 10 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica); TAB. 8], massa molecular de 7.279,134 Da, é SVEELNTELNLNRKEF. O perfil de fragmentação da proteína ativa pode ser observado nas FIG. 64 e 65.

A análise da sequência obtida no BLAST apresentou identidade de 83 % com a proteína ribossomal L29 de *E. coli* e com a proteína ribossomal (50S) de *Edwardsiella ictaluri*. Ainda, apresentou identidade de 78 % com proteínas ribossomais (50S) de diversas outras bactérias (TAB. 10). No BACTIBASE, nenhuma sequência similar foi detectada.

30

5.5 PURIFICAÇÃO POR ULTRAFILTRAÇÃO

O procedimento de ultrafiltração resultou no fracionamento de C-75 em
5 três frações com massas moleculares igual ou inferior a 3 kDa, de 3 a 10 kDa e superior a 10 kDa. As frações com substâncias de massa molecular de 3 a 10 kDa e superior a 10 kDa expressaram atividade contra SS12 (FIG. 66).

10 5.5.1 AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) PRESENTE(S) NAS FRAÇÕES ATIVAS

Não houve multiplicação bacteriana a partir do inóculo do material
15 raspado dos halos de inibição da amostra reveladora gerados pela ação das frações ativas obtidas por ultrafiltração.

20 5.5.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA SUPELCOSIL™

A corrida cromatográfica em coluna de fase reversa Supelcosil™ da
fração proteica com massa molecular de 3 a 10 kDa originada do processo de ultrafiltração gerou seis frações - 29 a 34 - que expressaram antagonismo contra
SS12.

25

5.5.2.1 AVALIAÇÃO DO MODO DE AÇÃO OU BACTERIOSTÁTICO DA(S) SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) PRESENTE(S) NAS FRAÇÕES ATIVAS

Não foram detectadas bactérias viáveis no material obtido dos halos de
30 inibição da amostra reveladora gerados pela ação das frações ativas oriundas da cromatografia de fase reversa em coluna Supelcosil™.

Tabela 9

Resultados da espectrometria de massas das frações com até quatro massas moleculares originadas da *recromatografia* em coluna de fase reversa Supelcosil™ e origem das frações^a.

Massa molecular (Da)	<i>Recromatografia</i> de fase reversa Supelcosil™
5.676,559	
7.705,022	
11.352,007	34.1
15.401,935	
24.651,918	
30.860,792	34.2
24.670,801	
30.835,656	34.3
24.684,538	
26.828,681	34.4
30.856,620	
24.684,997	
26.695,795	34.5
30.848,190	
8.766,000	
12.299,803	36.1
17.513,711	

^a, todas as frações originaram-se da fração 35/cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - fração 25/cromatografia de fase reversa Poros® - *pool* GF1 (frações 2 a 4/cromatografia de gel filtração - *pool* T11 (frações 1 a 7)/cromatografia de troca iônica.

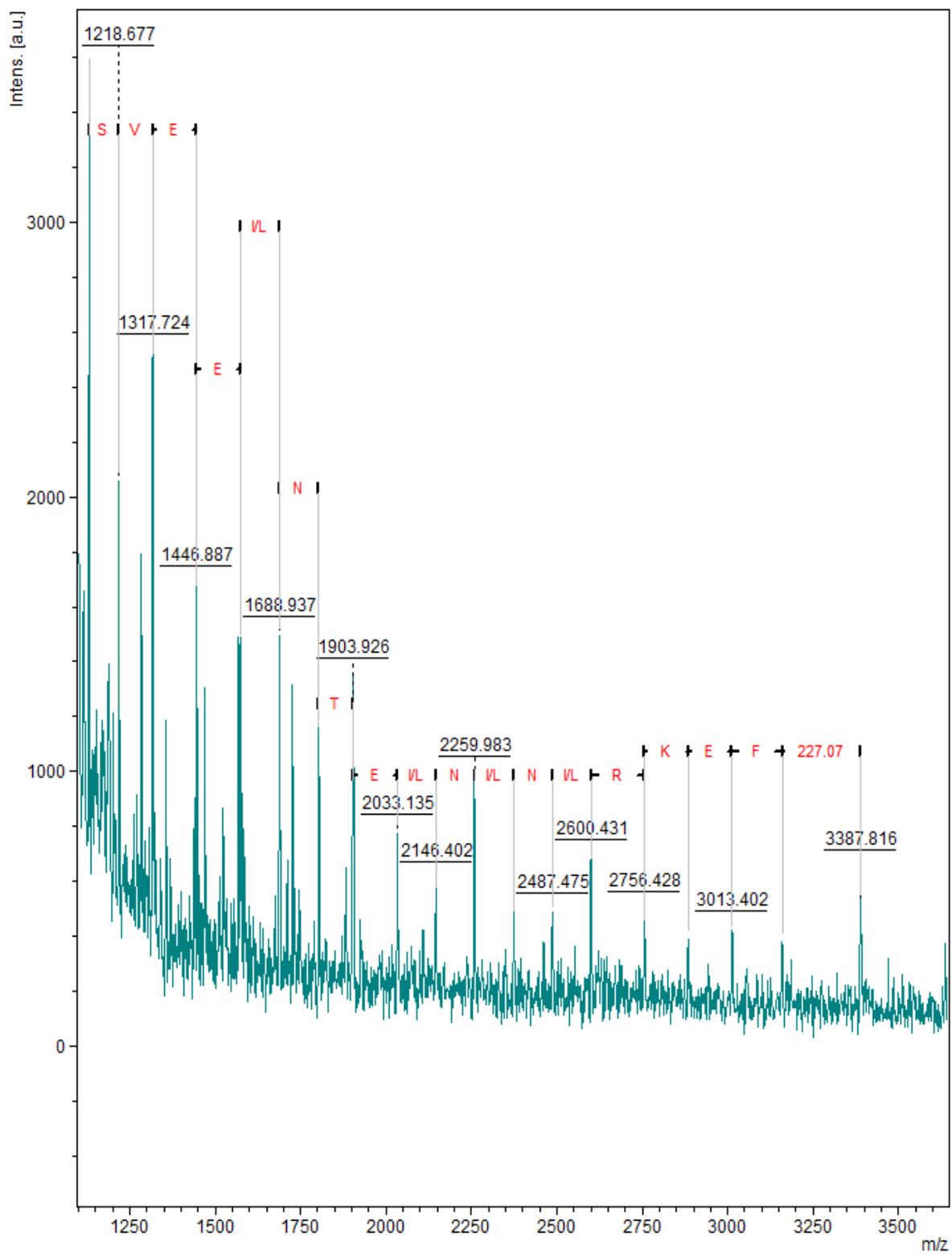


Figura 64

Perfil de fragmentação da proteína ativa com massa molecular de 7.279,134 Da.

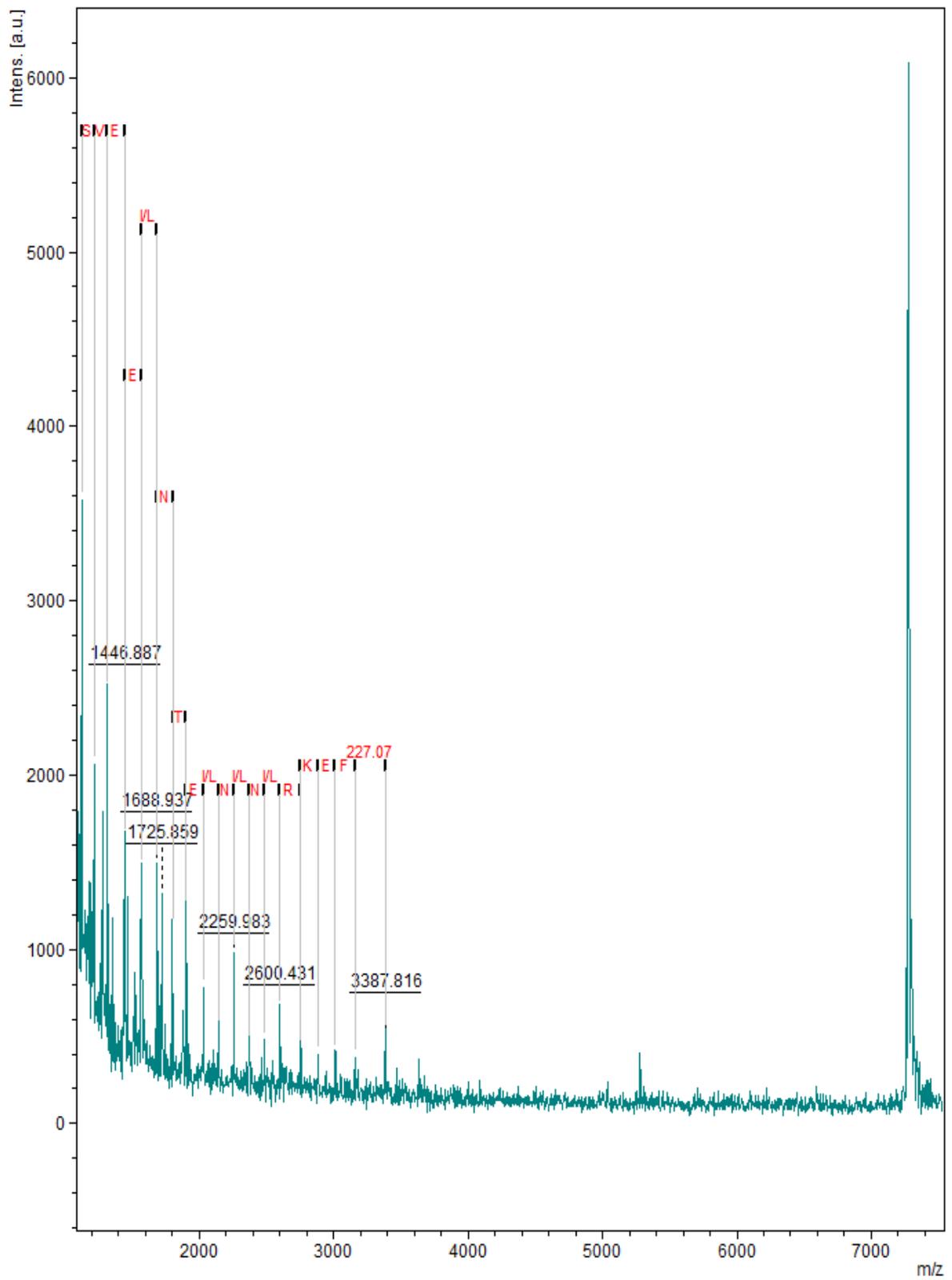


Figura 65

Perfil de fragmentação da proteína ativa com massa molecular de 7.279,134 Da.

Tabela10

Substância antagonista purificada: massa molecular, sequência e resultados da análise realizada no BLAST.

Massa molecular (Da)	Sequência de aminoácidos	Descrição	Identidade	Score	E-value	Acesso BLAST
		Proteína ribossomal L29 de <i>Escherichia coli</i>	83 %	42.6	0.001	WP_023146509.1
		Proteína ribossomal 50S L29 <i>Edwardsiella ictaluri</i> 93-146	83 %	40.9	0.004	YP_002934949.1
		Proteína ribossomal 50S L29 de <i>Salmonella enterica</i>	78 %	38.0	0.014	WP_001699633.1
		Proteína ribossomal 50S L29 de <i>Pantoea dispersa</i>	78 %	38.0	0.039	WP_021508217.1
		Proteína ribossomal 50S L29 de <i>Pantoea</i>	78 %	38.0	0.039	WP_007891662.1
		Proteína ribossomal 50S L29 de <i>Serratia fonticola</i> RB-25	78 %	38.0	0.039	AHG_19912.1
		Proteína ribossomal 50S L29 de <i>Photorhabdus temperata</i>	78 %	38.0	0.039	WP_021322794.1
		Proteína ribossomal 50S L29 de <i>gammaproteobacterium</i> WG36	78 %	38.0	0.039	WP_017493967.1
7.279.134	SVEELNTELNKELNLR	Proteína ribossomal 50S L29 de LSU L29P <i>Serratia marcescens</i> FGI94	78 %	38.0	0.039	YP_007346624.1
		Proteína ribossomal 50S L29 de <i>Shigella dysenteriae</i> Sd197	78 %	38.0	0.039	YP_404957.1
		Proteína ribossomal 50S L29 de <i>Rahnellasp.</i> Y9602	78 %	38.0	0.039	YP_004211107.1
		Proteína ribossomal 50S L29 de <i>Erwinia amylovora</i> ATCC BAA-2158	78 %	38.0	0.039	CBX_82276.1
		Proteína ribossomal 50S L29 de <i>Enterobacter lignolyticus</i> SCF1	78 %	38.0	0.039	YP_003939964.1
		Proteína ribossomal 50S L29 de <i>Pantoea vagans</i> C9-1	78 %	38.0	0.039	YP_003932480.1
		Proteína ribossomal 50S L29 de <i>Xenorhabdus nematophila</i> ATCC 19061	78 %	38.0	0.039	YP_003710645.1
		Proteína ribossomal 50S L29 de <i>Serratia odorifera</i>	78 %	38.0	0.039	WP_004956182.1
		Proteína ribossomal 50S L29 de <i>Proteus mirabilis</i> HI4320	78 %	38.0	0.039	YP_00215948.1

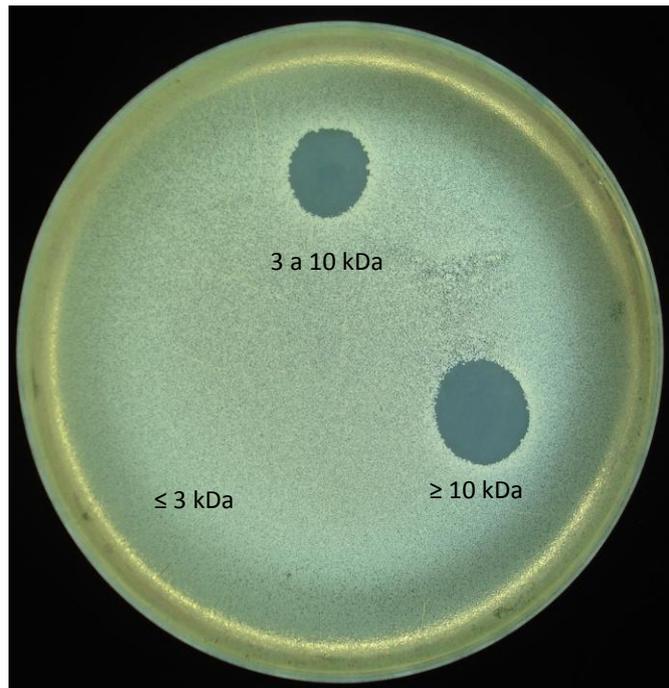


Figura 66

Atividade antagonista das frações com massa molecular de 3 a 10 kDa e superior a 10 kDa recuperadas do processo de ultrafiltração do extrato intracelular de *Shigella sonnei* SS9 precipitado a 75 % de sulfato de amônio contra a amostra indicadora *S. sonnei* SS12.

5.5.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE FASE REVERSA WATERS SPHERISORB®

As frações recuperadas da cromatografia em coluna de fase reversa
5 Supelcosil™ submetidas a corrida cromatográfica em coluna de fase reversa
Waters Spherisorb® não geraram nenhuma fração ativa.

5.6 SDS-PAGE

10

O perfil eletroforético dos extratos proteicos intracelulares de SS9 e dos
pools e frações ativos originados das cromatografias de troca iônica e de gel
filtração está ilustrado na FIG. 67. O processo de purificação pode ser
15 acompanhado pela redução do número de bandas observadas. Foram
observadas três bandas proteicas com massas moleculares estimadas de 7,2
kDa, 57,7 kDa e 66,3 kDa bandas 1, 2 e 3, respectivamente (Rosenberg, 1996).
Uma banda adicional (banda 4), cuja massa molecular não pôde ser calculada
com precisão, também foi detectada. Possivelmente, esta banda possui massa
20 molecular superior a 250 kDa, considerando-se que a mesma não migrou pela
malha do gel de poliacrilamida. As quatro bandas foram observadas na maior
parte das amostras analisadas. A avaliação das frações 10 e 11 foi dificultada
pela baixa concentração proteica das mesmas.

25 5.6.1 TESTE DE ATIVIDADE *IN SITU*

Os resultados do teste de atividade *in situ* dos extratos proteicos
intracelulares de SS9, dos *pools* e frações ativos originados das cromatografias
de troca iônica e de gel filtração e das frações ativas obtidas por ultrafiltração
30 estão apresentados na FIG. 68. Com exceção da fração com substâncias de
massa molecular de 3 a 10 kDa, foram observadas duas bandas protéicas ativas
nas amostras, de 57,7 kDa e de 66,3 kDa (bandas 2 e 3, respectivamente). A
fração com substâncias de massa molecular superior a 10 kDa e o extrato C-30

originaram bandas de inibição mais espessas. Além destas, nestas frações foi detectada uma banda com atividade expressiva, com massa molecular igual ou superior a 260 kDa (banda 4). A banda 1 (7,2 kDa) não exibiu atividade contra SS12.

5

5.7 DETERMINAÇÃO DA CIM

10 O menor valor de CIM, 1,25 UA/mL, foi observado para o *pool*/ TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica). Os valores de CIM de cada uma das amostras testadas estão apresentados nas TAB. 11 e 12 e na FIG. 69.

15 5.8 DETERMINAÇÃO DA CBM

Os valores de CBM coincidem com os valores de CIM para todas as amostras analisadas (TAB. 11 e 12).

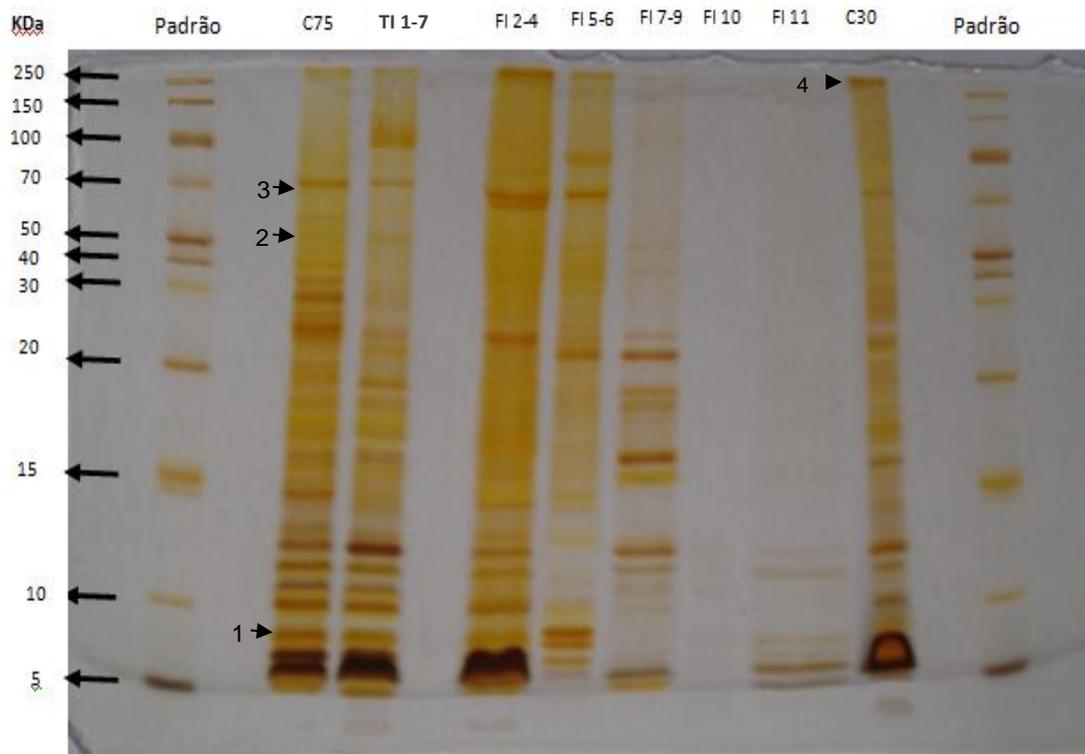


Figura 67

Perfil proteico de extratos proteicos de *Shigella sonnei* SS9 - extratos C-30 e C-75 (precipitados em 30 % e 75 % de sulfato de amônio, respectivamente); *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica); *pools* GF1, GF2 e GF3, F10 e F11 (frações 2 a 4; 5 e 6; e 7 a 9, respectivamente e frações 10 e 11 da cromatografia de gel filtração). P, Padrão de massa molecular (*Page Ruler Unstained Broad Range Protein Ladder*, Thermo Scientific).

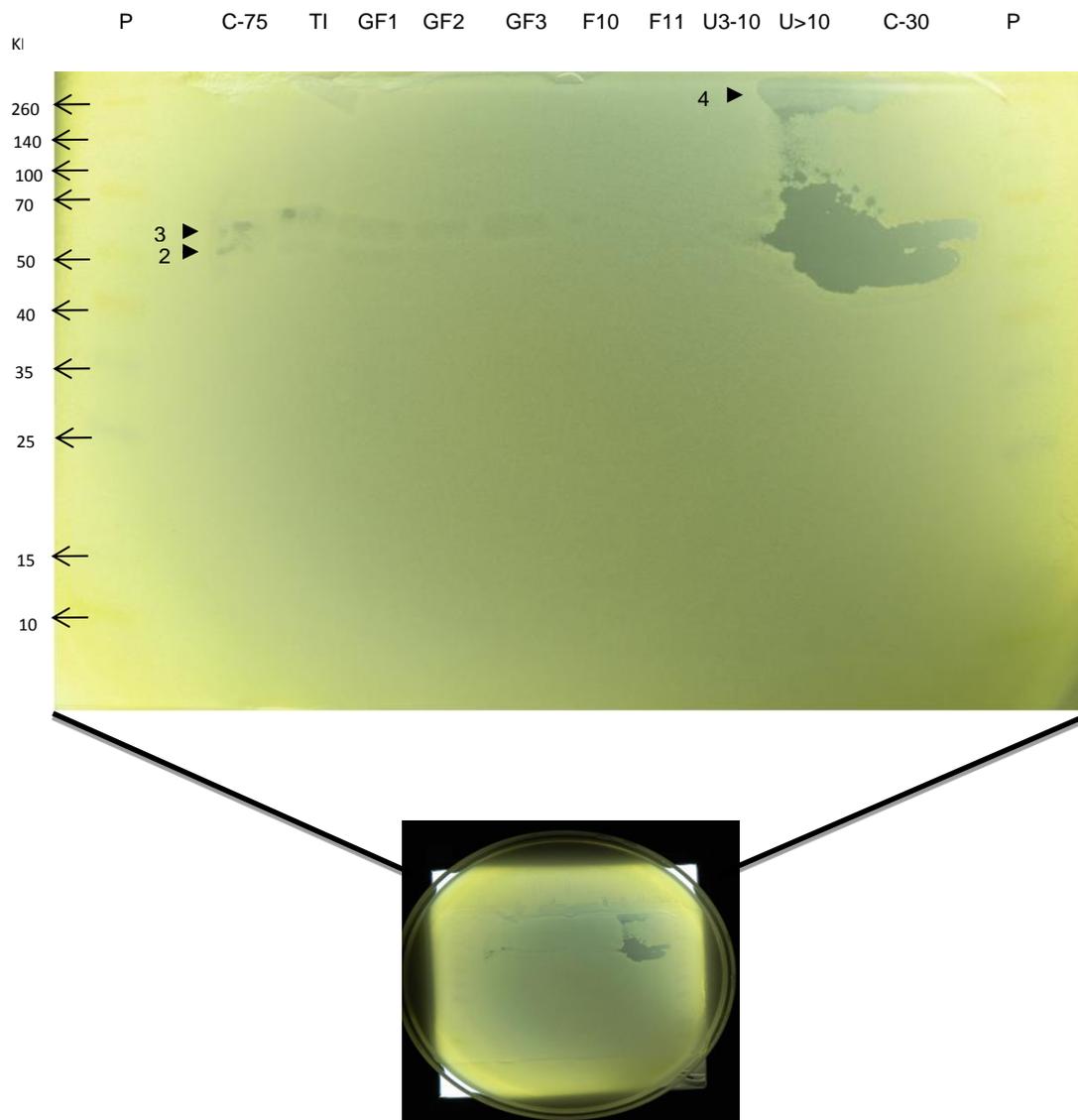


Figura 68

Teste de atividade *in situ* de extratos proteicos de *Shigella sonnei* SS9 contra *S. sonnei* SS12 - extratos C-30 e C-75, precipitados em 30 % e 75 % de sulfato de amônio, respectivamente; *pool* TI, frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica; *pools* GF1, GF2 e GF3, F10 e F11, frações 2 a 4; 5 e 6; e 7 a 9, respectivamente e frações 10 e 11 da cromatografia de gel filtração; U3-10 e U>10, frações obtidas por ultrafiltração com substâncias de massa molecular entre 3 e 10 kDa e superior a 10 kDa, respectivamente. P, Padrão de massa molecular (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*, Fermentas).

5.9 CINÉTICA DE AÇÃO DOS EXTRATOS C-30 E C-75 E DO *POOL* CONSTITUÍDO PELAS FRAÇÕES ATIVAS ORIGINADAS DA CROMATOLOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

A cinética de ação dos extratos proteicos e do *pool* TI estão apresentados na FIG. 70. O intervalo de tempo para as três amostras foi de 0 a 245 min. Em tempo zero, o número de UFC detectado foi elevado, não sendo possível estimar de maneira acurada. No extrato C-30, após 20 min, observou-se redução bacteriana importante. Neste ponto do ciclo de vida do organismo, o número médio de bactérias era de $2,51 \times 10^4$ UFC/mL. Após 100 min, todas as células haviam perdido a viabilidade. No que se refere ao extrato C-75, no tempo de 80 min, a média era de $2,55 \times 10^4$ UFC/mL e, após 200 min, não foram detectadas células viáveis. Relativo ao *pool* TI originado da cromatografia de troca iônica, a população foi reduzida para $2,69 \times 10^4$ UFC/mL em 100 minutos e, em 245 min, a perda de viabilidade foi total. Os controles negativos não apresentaram células viáveis e os controles positivos apresentaram quantidade incontável de células.

Tabela 11

Avaliação de CIM e CBM dos extratos C-30 e C-75 e do *pool* TI de *Shigella sonnei* SS9 contra *S. sonnei* SS12.

Diluição	C-30 ^a			C-75 ^b			<i>Pool</i> TI ^c		
	UA/mL ^d	CIM ^e	CBM ^f	UA/mL	CIM	CBM	UA/mL	CIM	CBM
100 %	160,0	- ^g	-	1280,0	-	-	640,0	-	-
1:2	80,0	-	-	640,0	-	-	320,0	-	-
1:4	40,0	-	-	320,0	-	-	160,0	-	-
1:8	160,0	-	-	1280,0	-	-	640,0	-	-
1:16	10,0	-	-	80,0	-	-	40,0	-	-
1:32	5,0	-	-	40,0	-	-	20,0	-	-
1:64	2,5	-	-	20,0	-	-	10,0	-	-
1:128	1,25	+ ^h	NT ⁱ	10,0	-	-	5,0	-	-
1:256	0,625	+	NT	5,0	-	-	2,5	-	-
1:512	0,3125	+	NT	2,5	-	-	1,25	-	-
1:1024	0,15625	+	NT	1,25	+	NT	0,625	+	NT

^a e ^b, extratos proteicos intracelulares de *S. sonnei* SS9 precipitados às concentrações de 30 % e 75 % de sulfato de amônio, respectivamente; ^c, *pool* constituído pelas frações 1 a 7 recuperadas da corrida cromatográfica em coluna de troca iônica do extrato C-75; ^d, unidades arbitrárias de atividade antagonista/mL; ^e, concentração inibitória mínima; ^f, concentração bactericida mínima; ^g, ausência de multiplicação bacteriana; ^h, presença de multiplicação bacteriana; ⁱ, não testado.

Tabela 12
Avaliação de CIM e CBM dos *pools* GF e frações de GF contra *S. sonnei* SS12.

Diluição	<i>Pool</i> GF1 ^a			<i>Pool</i> GF2 ^b			<i>Pool</i> GF3 ^c			Fração 10 ^d			Fração 11 ^e		
	UA/mL ^f	CIM ^g	CBM ^h	UA/mL	CIM	CBM	UA/mL	CIM	CBM	UA/mL	CIM	CBM	UA/mL	CIM	CBM
100%	25600	- ⁱ	-	25600	-	-	800	-	-	6400	-	-	400	-	-
1:2	12800	-	-	12800	-	-	400	-	-	3200	-	-	200	-	-
1:4	6400	-	-	6400	-	-	200	-	-	1600	-	-	100	-	-
1:8	3200	-	-	3200	-	-	100	-	-	800	-	-	50	-	-
1:16	1600	-	-	1600	-	-	50	-	-	400	-	-	25	-	-
1:32	800	-	-	800	-	-	25	-	-	200	-	-	12,5	-	-
1:64	400	-	-	400	-	-	12,5	-	-	100	-	-	6,25	+	NT
1:128	200	-	-	200	-	-	6,25	-	-	50	-	-	3,125	+	NT
1:256	100	-	-	100	-	-	3,125	+	NT	25	-	-	1,562	+	NT
1:512	50	+ ^j	NT ^k	50	-	-	1,562	+	NT	12,5	-	-	0,781	+	NT
1:1024	25	+	NT	25	-	-	0,781	+	NT	6,25	+	NT	0,390	+	NT

^a a ^c, *pools* constituídos, respectivamente, pelas frações 2 a 4, 5 e 6, e 7 a 9 recuperadas da corrida cromatográfica em coluna de gel filtração [origem: *pool* TI (frações 1 a 7) da troca iônica - extrato proteico intracelular de *S. sonnei* SS9 precipitado à concentração de 75 % de sulfato de amônio; ^d, e ^e, frações 10 e 11 recuperadas da corrida cromatográfica em coluna de gel filtração, mesma origem dos *pools* GF; ^f, unidades arbitrárias de atividade antagonista/mL; ^g, concentração inibitória mínima; ^h, concentração bactericida mínima; ⁱ, ausência de multiplicação bacteriana; ^j, presença de multiplicação bacteriana; ^k, não testado.

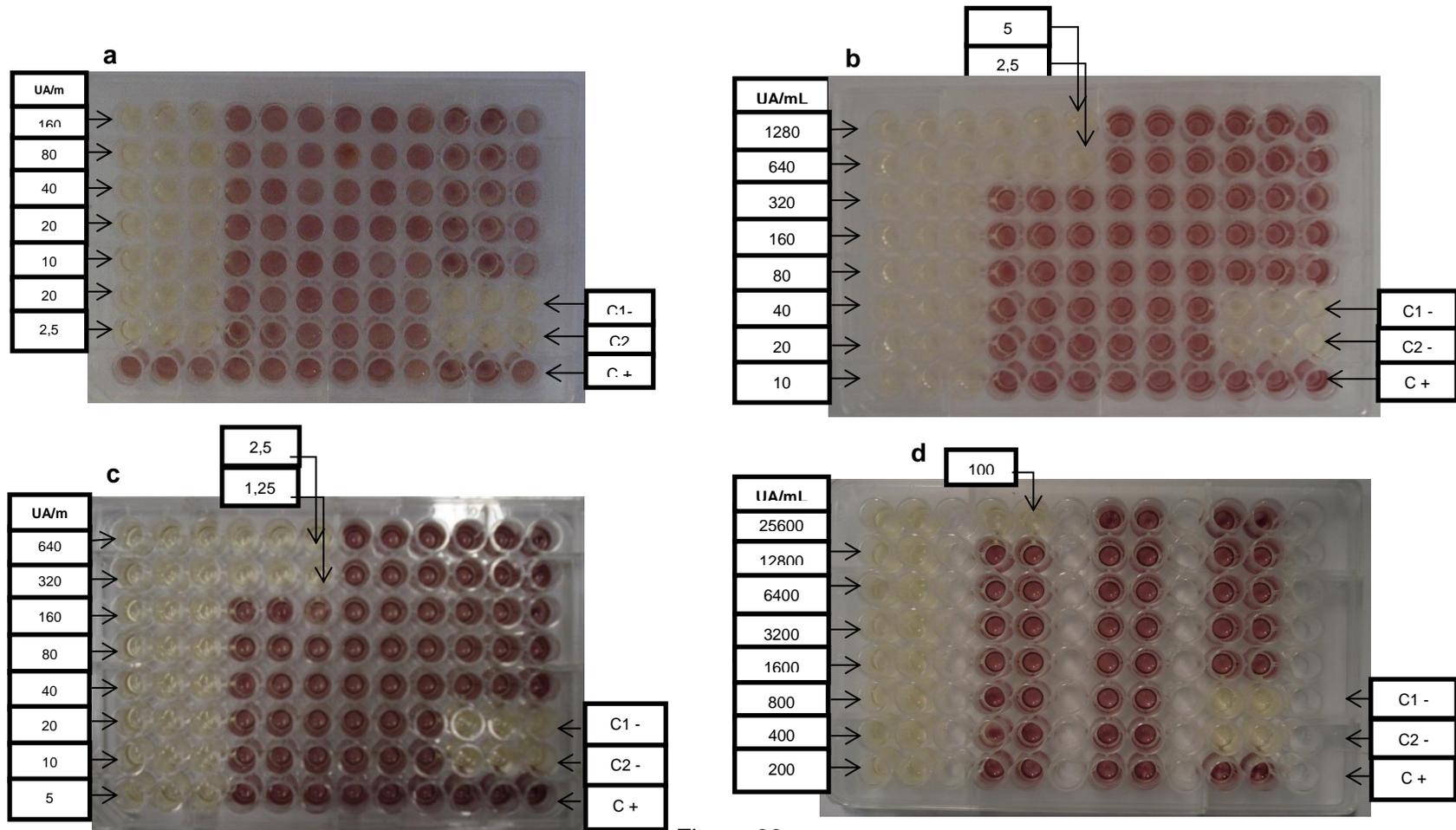


Figura 69

Avaliação da concentração inibitória mínima de *Shigella sonnei* SS9 contra *S. sonnei* SS12. a) extrato proteico intracelular precipitado à concentração de 30 % de sulfato de amônio; b) extrato proteico intracelular precipitado à concentração de 75 % de sulfato de amônio; c) *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica); d) *pool* GF1 (frações 2 a 4 da cromatografia de gel filtração; UA/mL, unidades arbitrárias de atividade antagonista/mL; C1-, controle negativo 1; C2-, controle negativo 2; C+, controle positivo.

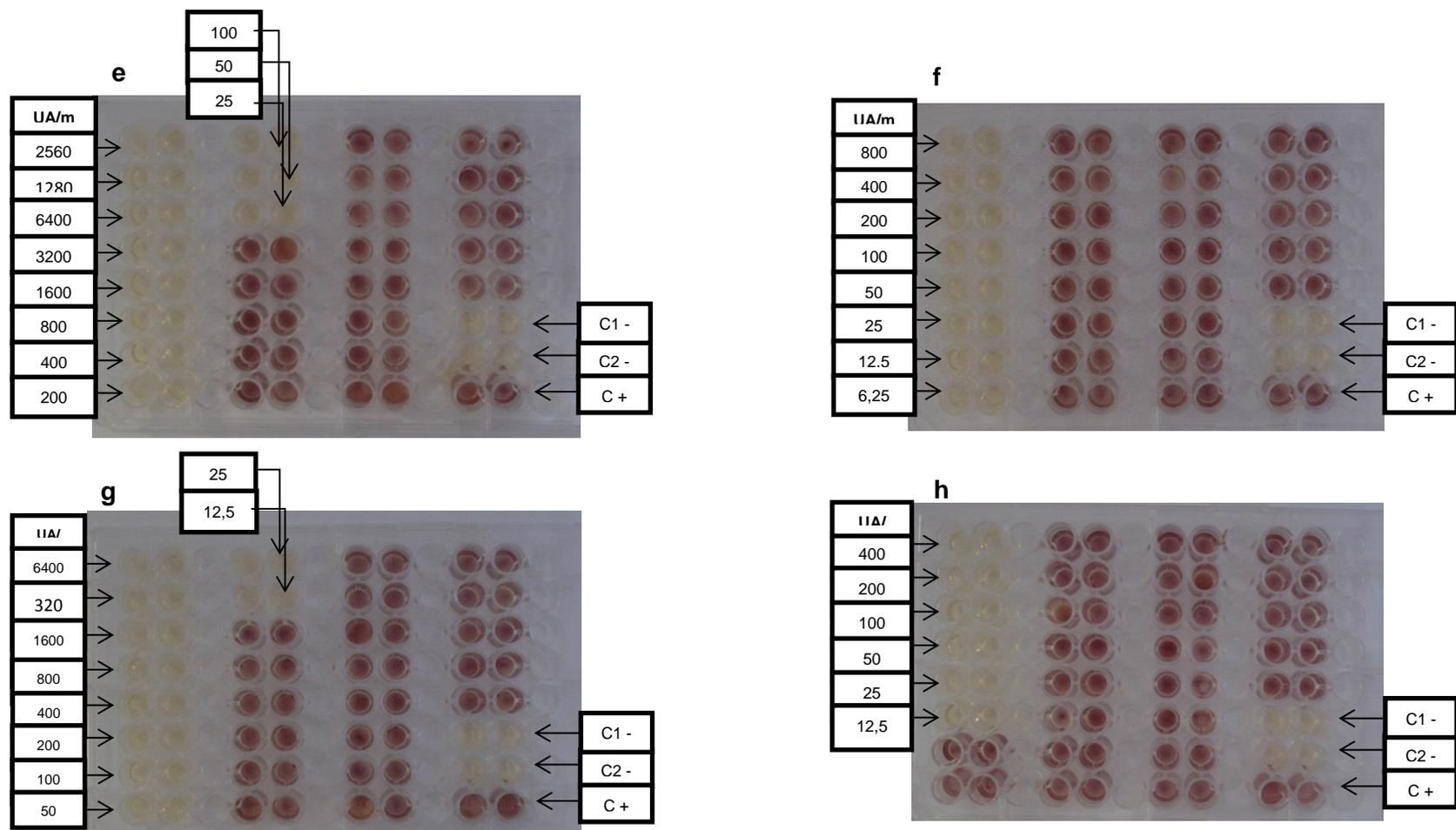


Figura 69 (continuação)

Avaliação da concentração inibitória mínima de *Shigella sonnei* SS9 contra *S. sonnei* SS12. e) *pool* GF2 (frações 5 e 7 da cromatografia de gel filtração); f) *pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração); g) fração 10 da cromatografia de gel filtração; h) fração 11 da cromatografia de gel filtração; UA/mL, unidades arbitrárias de atividade antagonista/mL; C1-, controle negativo 1; C2-, controle negativo 2; C+, controle positivo.

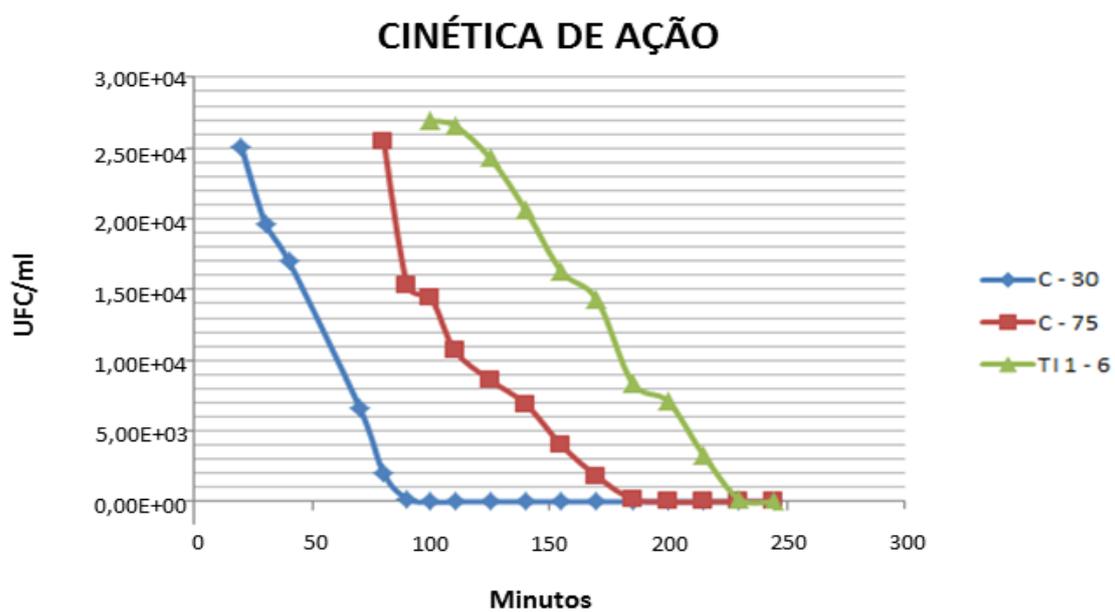


Figura 70

Cinética de ação dos extratos C-30, C-75 e *pool* TI (frações 1 a 7) da cromatografia em coluna de troca iônica. Amostra reveladora: *S. sonnei* SS12

6 DISCUSSÃO

O enteropatógeno invasivo *Shigella* é agente da shigelose, doença endêmica em todo mundo, que acomete, principalmente, crianças com idade inferior a 5 anos, podendo levar ao óbito, mais frequentemente observado em países menos desenvolvidos. O gênero inclui quatro espécies, quais sejam *S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. boydii* e *S. sonnei*. A shigelose é uma forma grave de enterite aguda, caracterizada, habitualmente, por febre, dor abdominal, náuseas, tenesmo, vômitos e eliminação de fezes com muco, sangue e pus. A duração média da doença é de 5 dias (Svensson *et al.*, 2004, Joh *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013). Reidratação oral é empregada para tratamento de indivíduos acometidos pela doença e antibioticoterapia pode ser necessária em muitos casos. Entretanto, taxas crescentes de resistência a drogas antimicrobianas vêm sendo relatadas, principalmente nas duas últimas décadas, o que é preocupante, considerando-se a gravidade da doença (Khan *et al.*, 2014).

Diversos grupos bacterianos são capazes de produzir bacteriocinas, inclusive *Shigella*. Bacteriocinas são substâncias de natureza proteica que expressam ação antagonista principalmente contra amostras filogeneticamente relacionadas à bactéria produtora. Entre as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram negativas, destacam-se aquelas sintetizadas por Enterobacteriaceae. Esta família bacteriana expressa dois grandes grupos de bacteriocinas, as colicinas, cuja massa molecular varia entre 25 e 80 kDa, e as microcinas, com massa molecular inferior a 10 kDa (Rebuffat, 2011a; Bakkal *et al.*, 2012). As colicinas são bastante estudadas e muitas delas já foram bem caracterizadas. A síntese destas substâncias é bastante disseminada entre enterobactérias. Por outro lado, a distribuição da habilidade de produzir microcinas é bem mais restrita. *Shigella* expressa colicinas, mas, na literatura disponível, não há relatos da expressão de microcinas pela bactéria (Sousa *et al.*, 2013).

Bacteriocinas são substâncias de interesse para a pesquisa básica e aplicada. Desempenham papel relevante nas relações ecológicas interbacterianas, podem ser utilizadas na conservação de alimentos, como probióticos, como possíveis aliados ou substitutos aos antimicrobianos clássicos e como fármacos, pois apresentam ação antitumoral, antineoplásica e espermicida (Dicks *et al.*, 2011; Moreira, 2011; Rebuffat., 2011b).

Várias abordagens têm sido empregadas para a purificação analítica de bacteriocinas, principalmente daquelas produzidas por bactérias Gram positivas, mais comumente estudadas. O primeiro passo do processo de purificação envolve, habitualmente, a centrifugação da cultura bacteriana seguida pela precipitação do sobrenadante com concentrações crescentes de um sal, como o sulfato de amônio. Esta foi nossa opção para este projeto. Outros processos iniciais para a purificação de bacteriocinas, como ultrafiltração ou extração pela adição de solventes orgânicos, como etanol ou acetona, podem ser empregados (Muriana *et al.*, 1991; Pingitore *et al.*, 2007; Saavedra & Sesma, 2011).

Autores sugerem que, assim como as bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico, as microcinas são sintetizadas como peptídeos precursores inativados. A clivagem do peptídeo líder, ligado à porção N-terminal deste precursor, seria um passo fundamental para a maturação da molécula. Estudos demonstram que esta seria uma função do sistema de transporte ABC, localizado na membrana celular (Rebuffat, 2011b; Vassiliadis *et al.*, 2011). Entretanto, outros autores sustentam a possibilidade da presença de algumas microcinas ativas no meio intracelular (Gilson *et al.*, 1987; Gaggero *et al.*, 1993; Pons *et al.*, 2004).

Tomando-se como base estes conhecimentos e o modo de obtenção da microcina purificada nesta oportunidade, através da lise da célula produtora por sonicação, parece plausível supor que a substância não necessite deste processo de clivagem do peptídeo líder para se tornar ativa, uma vez que ela é encontrada ativa no meio intracelular.

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando, há cerca de 25 anos, com bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram negativas, em especial, anaeróbios, membros da microbiota oral e enterobactérias. Tradicionalmente, vimos optando pela utilização de extratos proteicos intracelulares, quando os mesmos expressam atividade, em oposição a extratos extracelulares. Embora o procedimento de purificação possa ser mais complicado quando extratos intracelulares são empregados, em virtude da possibilidade de uma maior contaminação com outras substâncias que não são de interesse, temos detectado atividade superior, provavelmente pelo acúmulo de colicinas no meio intracelular, bem como

estabilidade superior da substância ativa (Farias *et al.*, 1994; Ribeiro-Ribas *et al.*, 2009; Oliveira, 2013; Sousa *et al.*, 2013).

O segundo passo no processo de purificação geralmente é feito por processos cromatográficos. Diferentes colunas são empregadas e a ordem em que elas são utilizadas varia de acordo com as características do material (Pingitore *et al.*, 2007; Saavedra & Sesma, 2011). No nosso grupo, após dessalinização dos extratos proteicos precipitados com sulfato de amônio, realizamos, habitualmente, etapas sucessivas de cromatografia de troca iônica, gel filtração e fase reversa.

Sousa (2008), estudando a amostra *S. sonnei* produtora de substância antagonista SS9, a mesma empregada nesta investigação, observou que maiores quantidades de substância antagonista eram observadas na fase estacionária. É descrito na literatura que a produção de microcinas é estimulada por condições de estresse, tais como escassez de oxigênio e de nutrientes, característica da fase estacionária de crescimento (Rubuffat, 2011 b).

A fração selecionada para emprego nas etapas subsequentes do estudo foi o extrato intracelular precipitado com 75% de sulfato de amônio, em decorrência da presença de halo límpido de inibição da amostra reveladora (*S. sonnei* SS12) e do título elevado de atividade antagonista. Dados da literatura indicam que altas concentrações de sal podem inativar bacteriocinas. No entanto, concentrações de até 80 % de sulfato de amônio, frequentemente, não interferem na atividade antagonista de muitas destas substâncias (Saavedra & Sesma, 2011).

O sulfato de amônio é capaz de auxiliar na purificação de bacteriocinas pela precipitação proteica. Em meio aquoso, as proteínas formam pontes de hidrogênio com a água através da sua porção polar. Com a adição do sulfato de amônio, ocorre dissociação, levando a uma maior interação da água com os íons dissociados do que com as proteínas. Conseqüentemente, há uma diminuição da interação proteína-água, culminando com a precipitação proteica. Este processo é denominado precipitação por salificação (*salting-out*) (Kent, 1999; Grodzki & Berenstein, 2010).

Dados obtidos no desenvolvimento da minha monografia intitulada “Extração, purificação e caracterização de substância antagonista produzida por

Shigella sonnei”, apresentada ao curso de Especialização em Microbiologia Aplicada à Ciência da Saúde, apresentam a purificação parcial de uma substância antagonista com massa molecular inferior a 10 kDa obtida do extrato intracelular C-75 de *S. sonnei* SS9 (Moreira, 2011).

5 Para a presente investigação, que dá continuidade a este estudo anterior, foram selecionadas as mesmas amostras produtora e reveladora, *S. sonnei* SS9 e SS12, e os mesmos protocolos de cultivo e extração proteica. C-75 apresentou título de atividade antagonista de $1,40 \times 10^{16}$ UA/mL, superior ao observado para o extrato C-30, $5,49 \times 10^{13}$ UA/mL. Os dados corroboram o estudo anteriormente desenvolvido (Moreira, 2011) e os resultados obtidos por Sousa e colaboradores, 10 que investigaram também as mesmas amostras (Sousa, 2010; Sousa *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2013), demonstrando que a fração C-75 possui maior atividade inibitória contra SS12. Esta rentabilidade inicial elevada é crucial para o processo de purificação, visto que nas etapas sucessivas de cromatografia, há perda de 15 quantidades importantes de material. Desta forma, o extrato C-75 foi o escolhido para os próximos ensaios.

A expressão de atividade antagonista por SS9 contra 626 amostras bacterianas foi avaliada. Foram selecionadas como reveladores, predominantemente, organismos da microbiota indígena do ser humano, inclusive 20 da microbiota intestinal, e bactérias enteropatogênicas. Das amostras testadas, 10,7 % foram suscetíveis à ação de SS9. Quanto aos dados obtidos para os extratos C-30 e C-75, 5,3 % e 6,9 % das bactérias indicadoras demonstraram suscetibilidade. Os percentuais de amostras suscetíveis são baixos, mas, para uma análise mais adequada destes valores, é importante lembrar a grande 25 heterogeneidade do grupo de bactérias reveladoras empregado. Partindo-se do princípio que bacteriocinas agem, especialmente, contra amostras filogeneticamente relacionadas à produtora (Sousa *et al.*; 2010; Nes, 2011; Rebuffat, 2011a; Rebuffat, 2012), o resultado obtido concorda com o esperado. Quando apenas amostras de *Shigella* são incluídas na análise, a porcentagem de 30 suscetibilidade eleva-se para cerca de 80 % e, quando amostras de *E. coli* são avaliadas, o valor é próximo de 30 %.

O tamanho do halo de inibição da amostra reveladora é um dado que precisa ser avaliado com cuidado. Isto se deve ao fato de que moléculas menores

e apolares têm um poder de difusão maior. Assim, o tamanho do halo não é um indicador preciso de maior ou menor expressão de atividade antagonista. Nesta investigação, optamos por fazer uma avaliação qualitativa do tamanho dos halos de inibição (dados não apresentados), apenas para verificarmos se alguma
5 informação relevante poderia ser originada desta análise.

É importante lembrar que SS9, C-30 e C-75 apresentam mais de uma substância antagonista com características diferentes. Assim, Sousa e colaboradores (2013) purificaram uma bacteriocina de 18,5 kDa e, no presente estudo, uma microcina de 7,2 kDa foi purificada e caracterizada parcialmente.
10 Ainda, outras substâncias ativas presentes no extrato C-75 forma pré-purificadas.

Quando o tamanho e limpidez dos halos de inibição produzidos por SS9, C-30 e C-75 contra as diversas amostras reveladoras foram avaliados, observou-se que os halos maiores e mais límpidos eram resultantes da inibição de *Shigella* e *E. coli*. A nosso ver, isto parece indicar maior eficácia de atividade antagonista
15 contra grupos taxonomicamente próximos, como deve ser esperado (Sousa *et al.*; 2010; Nes, 2011; Rebuffat, 2011a; Rebuffat, 2012). *E. coli* é uma espécie bastante próxima de *Shigella*, semelhantes o suficiente para que alguns autores já tenham sugerido que os organismos deveriam ser incluídos em um mesmo gênero (Pavlovic *et al.*, 2011; Beld & Reubsæet, 2012).

SS9 foi capaz de inibir amostras bacterianas pertencentes à microbiota intestinal indígena, como *Bacteroides*, *Bifidobacterium* e *Prevotella*, além da própria *E. coli*. Os três primeiros grupos são filogeneticamente distantes de *Shigella*. A inibição foi observada apenas para o teste de atividade que empregou a bactéria produtora e não para aqueles que utilizaram os extratos proteicos
25 intracelulares obtidos da mesma. Os resultados discordam das observações feitas por Sousa e colaboradores (2010). Os autores avaliaram oito amostras pertencentes à microbiota intestinal indígena e nenhuma delas foi suscetível à ação de SS9. Deve-se ressaltar, entretanto que o painel microbiano avaliado por Sousa e colaboradores (2010) é bastante reduzido se comparado à comunidade
30 que coloniza o trato intestinal e bem menor que aquele empregado nesta investigação.

No que se refere a outros organismos enteropatogênicos, observou-se, como já mencionado, atividade contra *Shigella*, tanto *S. sonnei* como *S. flexneri*,

além de *E. coli* enteropatogênica. Estes dados corroboram os relatados por Sousa *et al.*, 2010.

Os dados corroboram o relato de Padilla e colaboradores (2004), que observaram a capacidade antagonista de *S. flexneri* contra *E. coli* e *B. fragilis*.
5 Analisados em conjunto, nossos resultados sugerem que a expressão de atividade antagonista por meio da síntese de bacteriocinas pode contribuir para o sucesso de *Shigella* como agente diarreiogênico, tanto na competição com outros organismo enteropatogênicos, em um momento anterior à colonização do hospedeiro, como no órgão alvo, na competição com membros da microbiota
10 indígena. Ambos os ambientes devem ser considerados densamente colonizados/contaminados e altamente competitivos. No intestino grosso, órgão alvo de *Shigella*, a microbiota indígena atinge níveis extremamente elevados, de cerca de 10^{12} bactérias/mg no cólon. No meio externo, bactérias enteropatogênicas são encontradas em locais onde as condições de higiene e
15 saneamento básico são precárias, o que, a princípio, pode favorecer a presença de inúmeros outros grupos de microrganismos, diarreiogênicos ou não, incluindo-se, entre eles, membros da própria microbiota intestinal indígena (Sousa, 2008; Rebuffat, 2011a).

A purificação da substância antagonista é um passo fundamental para
20 sua caracterização, que deve preceder a avaliação de qualquer possibilidade de aplicação futura. A partir dos dados obtidos por Moreira (2011), o extrato intracelular C-75 foi submetido, inicialmente, à cromatografado em coluna de troca iônica acoplada a sistema FPLC. Esta técnica baseia-se na separação de proteínas com base na sua carga. Os trocadores aniônicos, como o próprio nome
25 indica, trocam ânions e apresentam, portanto, grupos iônicos positivos ligados à matriz. A coluna Mono Q™ 5/50 GL Tricorn™ possui caráter aniônico, por apresentar o grupo funcional $\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$ ligado covalentemente à resina, constituída por partículas amorfas de matéria orgânica. O conjunto grupo funcional/resina é denominado fase estacionária. Íons de cargas opostas à da
30 fase estacionária são atraídos e ligados a ela através da força eletrostática, sendo, posteriormente, eluídos pela fase móvel, que contém íons (habitualmente, uma solução tamponada contendo NaCl), com maior força de interação com a fase estacionária. Esta eluição das substâncias é dada pela dissociação do NaCl.

Assim substâncias que interagiram fracamente com a fase estacionária serão eluídas primeiro, com uma menor concentração de NaCl dissociado, quando comparadas a aquelas com maior afinidade pela matriz (Spadaro, 2006).

5 As frações 1 a 7 originadas da cromatografia de troca iônica não interagiram com a coluna, o que indica carga líquida positiva ou neutra. Estas frações estavam incluídas entre aquelas que apresentaram atividade antagonista e então, com base no perfil cromatográfico favorável, foram selecionadas para os ensaios subsequentes de purificação. As frações foram, então, combinadas em um *pool* (*pool* TI), com concentração proteica de 6,51 mg/mL e titulação superior
10 a $1,4 \times 10^{16}$ UA/mL. Estes resultados indicam que o material está adequado para processamento nas etapas cromatográficas seguintes.

O próximo passo do processo de purificação foi a cromatografia em coluna de gel filtração, também conhecida como cromatografia por exclusão molecular ou cromatografia por permeação. A matriz presente nesta coluna é um
15 material inerte contendo poros. Ela apresenta forma, tamanho e porosidade controlados, sendo, assim, denominada fase estacionária. O espaço entre as partículas e também no seu interior é ocupado pelo líquido que flui pela coluna, denominada fase móvel, que é, habitualmente, uma solução tamponada. A fase móvel carrega as substâncias que se deseja separar. Como a matriz possui poros
20 de diâmetro controlado, as substâncias a serem separadas serão eluídas em tempos diferentes. Assim, moléculas com massas moleculares maiores não serão capazes de penetrar nos poros da matriz, tendo um percurso menor para se deslocar, sendo eluídas primeiramente; moléculas com massas moleculares intermediárias serão capazes de penetrar em apenas alguns poros, sendo eluídas
25 em seguida; e moléculas com massas moleculares menores deslocam passando pelos poros da matriz, fazendo um percurso mais longo, sendo eluídas por último (Rotbschild, 2006).

O *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica) foi cromatografado em coluna de gel filtração Superose 12 HR 10/30, que apresenta
30 uma faixa de separação ótima de 1.000 Da a 30.000 Da. Nesta corrida, foram obtidas 14 frações ativas. Respeitando o perfil cromatográfico e a expressão de atividade antagonista, frações foram selecionadas, algumas foram agrupadas em *pools* e o material foi encaminhado para cromatografia de fase reversa.

A cromatografia em coluna de fase reversa possui fase estacionária contendo sílica ligada a grupo funcional apolar, como, por exemplo, octil (-C₈H₁₇), octatil (-C₁₈H₃₇) e fenil(-C₆H₅). O nome deste tipo de cromatografia foi dado em oposição à cromatografia de adsorção ou de fase normal, que apresenta a sua
5 fase estacionária constituída por um grupo de natureza polar, como o grupo amino (-NH₂), nitrilo (-CH) ou diol [-CH₂(OH)₂]. Na cromatografia de fase reversa, a amostra ligada à fase estacionária é eluída por uma fase móvel, que deve possuir polaridade alta a intermediária. Normalmente, utiliza-se um gradiente crescente de solvente orgânico miscível em água, como água-metanol ou água-acetonitrila. Assim, a amostra é separada pelo seu grau de hidrofobicidade, ou
10 seja, compostos com maior polaridade são eluídos primeiro, em menor concentração de solvente orgânico (Jardim *et al.*, 2006). Na cromatografia de fase reversa, a coluna com fase estacionária octatil ou C18 é a mais frequentemente utilizada. As colunas C18 diferem em relação a tamanho da coluna e da partícula,
15 pontos que devem ser levado em consideração no momento da escolha da coluna.

Duas etapas consecutivas de cromatografia de fase reversa foram empregadas com o intuito de se obter uma melhor purificação do material. Como estratégia de purificação, foi selecionada a cromatografia de fase reversa em
20 coluna Poros[®] seguida por corrida em coluna Supelcosil[™]. A segunda coluna é maior que a primeira, o que pode favorecer a melhor separação do material.

Por fim, as frações ativas obtidas da última etapa de cromatografia foram analisadas por espectrometria de massas. Entre elas, destaca-se a fração 34, recuperada da cromatografia de fase reversa em coluna Supelcosil, que
25 apresentou tempo de retenção de 34 min e foi eluída em 80 % de acetonitrila. Esta fração foi purificada, sua massa molecular foi determinada (7.279,234 Da) e foi possível o sequenciamento de 17 resíduos da molécula. A sequência apresentou identidade de 83 % com a proteína ribossomal de *E. coli* e com a porção 50S da proteína ribossomal de *Edwardsiella ictaluri*, além de identidade de
30 78 % com a porção 50S da proteína ribossomal de outras bactérias. Quando a sequência foi analisada no BACTIBASE, não se observou similaridade com nenhuma bacteriocina depositada neste banco de dados.

O resultado final obtido confirma dados previamente divulgados pelo nosso grupo de pesquisa, relativos à detecção de fração proteica parcialmente purificada, com massa molecular de 7,2 kDa, ativa contra SS12 (Moreira, 2011). A caracterização realizada na presente investigação permite sugerir que a substância antagonista seja enquadrada na classe II de microcinas. Consideramos o dado relevante, uma vez que a expressão de microcinas ainda não foi descrita para *Shigella*.

Merece menção o fato de que, em algumas frações ativas parcialmente purificadas, apenas uma massa molecular foi detectada. O resultado indica que outras substâncias antagonistas sejam expressas por SS9. Entretanto como o perfil do espectro de massas apresentava ruídos, o dado requer confirmação. Outras frações ativas apresentaram massas moleculares diferentes, inclusive, inferiores a 10 kDa, o que sugere que a amostra é capaz de produzir mais de uma microcina e mais de uma colicina. Para isto, outros ensaios visando à purificação destas frações devem ser conduzidos.

Além da síntese de microcinas, frações ativas *recromatografadas* e parcialmente purificadas apresentaram massas moleculares na faixa de 25 a 30 kDa, sugerindo a produção de colicinas. Em estudo anterior, Sousa e colaboradores (2013) purificaram uma colicina com massa molecular de 18,56 kDa produzida por SS9. Assim, o conjunto de dados indica que SS9 é capaz de sintetizar mais de uma bacteriocina. Segundo a literatura, estima-se que entre 30% a 99% das bactérias são capazes de produzir pelo menos uma bacteriocina. Ainda, a síntese de duas ou mais bacteriocinas já foi relatada (Rebuffat, 2011a; Dobson *et al.*, 2012).

Como mencionado anteriormente, outro processo de purificação de bacteriocinas é a utilização do método de ultrafiltração seguido de processos cromatográficos. No presente estudo, empregamos, também, esta metodologia, submetendo C-75 a ultrafiltração seguida de cromatografia de fase reversa. Este protocolo pode representar uma estratégia adequada de purificação, uma vez que há redução de tempo e custo do processo. Por outro lado, algumas características da substância deixam de ser avaliadas, como, por exemplo, a carga líquida, observada na cromatografia em coluna de troca iônica. Nesta investigação, esta

tática de purificação não foi bem sucedida, uma vez que houve perda da atividade após a ultrafiltração.

Os agentes antibacterianos podem ser diferenciados em bactericidas e bacteriostáticos. Drogas bactericidas eliminam a célula bacteriana com eficácia de 5 99 % ao passo que antimicrobianos bacteriostáticos apenas interrompem a multiplicação bacteriana (Kohanski *et al.*, 2007). Em geral, drogas bactericidas atuam inibindo a síntese da parede celular, interferindo na replicação e no reparo do DNA ou na síntese de enzimas essenciais ou alterando a integridade da membrana citoplasmática. Por outro lado, drogas bacteriostáticas agem, de 10 maneira geral, inibindo a função ribossomal e a síntese proteica. Também como já discutido, fatores como concentração da droga e alvo podem determinar ação bacteriostática ou bactericida de determinada droga antimicrobiana. Por exemplo, o cloranfenicol expressa atividade bacteriostática contra enterobactérias, *S. aureus* e *Streptococcus* do grupo B e atividade bactericida contra *Haemophilus* 15 *influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. Ainda, a linezolid, testada *in vitro*, possui atividade bacteriostática contra *Staphylococcus* e *Enterococcus* e atividade bactericida contra *Streptococcus*, incluindo *S. pneumoniae* (Finberg *et al.*, 2004; Pankey & Sabath, 2004; Kohanski *et al.*, 2007; Calvo & Martínez-Martínez, 2009). Adicionalmente, a fase de crescimento e a carga bacteriana também interferem 20 na atividade de uma droga antimicrobiana (Pankey & Sabath, 2004). Para a avaliação do mecanismo de ação de um agente antibacteriano *in vitro*, habitualmente, a bactéria é confrontada com a substância inibitória e, a seguir, o material é inoculado em meio de cultura sem a droga, para verificação de viabilidade celular (Finberg *et al.*, 2004).

25 Ao longo de todo o processo de purificação por cromatografia, as frações obtidas foram avaliadas para verificação da preservação da atividade antagonista. No entanto, a quantidade de material é extremamente reduzida em diversos pontos deste processo, o que, muitas vezes, inviabiliza a realização de outros ensaios. Na tentativa de permitir a avaliação do modo de ação da(s) substância(s) 30 antagonista(s), propusemos um ensaio que empregava o cultivo do material raspado do halo de inibição da amostra reveladora. Os dados obtidos sugerem que este ensaio funcionou adequadamente. O método proposto pode auxiliar na avaliação do modo de ação deste tipo de substância, com gasto de pequena

quantidade do material a ser testado. O teste é simples, rápido e de baixo custo, e permite o aproveitamento de uma amostra preciosa que seria descartada.

SS12 mostrou-se suscetível à ação dos antimicrobianos testados como controle do novo ensaio proposto. O cultivo do material obtido da porção mais interna do halo de inibição revelou multiplicação de um bastonete Gram negativo sugestivo de *Shigella* apenas no teste relativo a sulfazotrim. Sabe-se que esta droga possui realmente ação bacteriostática contra *Shigella* (Melo *et al.*, 2012). Nos ensaios que empregaram ampicilina e cirpofloxacina, não foi observada viabilidade no halo de inibição de SS12, indicando atividade bactericida. Os dados reforçam a confiabilidade dos dados gerados pelo ensaio proposto.

Não foi observada multiplicação bacteriana a partir de material obtido dos halos de inibição promovidos pela ação de dos extratos C-30 e C-75. Considerando-se que a amostra em estudo sintetiza mais de uma bacteriocina, o resultado parece esperado, pois é plausível supor que as bacteriocinas produzidas apresentem modos de ação diversos. Nesta situação, a ação bacteriostática não poderia ser revelada.

Da mesma forma, o *pool* TI (frações 1 a 7 originadas da cromatografia de troca iônica) exibiu atividade bactericida. O mesmo raciocínio desenvolvido para os extratos C-30 e C-75 se aplica. No que se refere às frações oriundas das cromatografias de gel filtração e de fase reversa Poros[®] e Supelcosil[™], diversas demonstraram ação bacteriostática. No entanto, as frações que deram origem à fração que contém a microcina purificada e esta fração apresentaram ação bactericida. Como mencionado, a microcina purificada pode ser enquadrada na classe II das microcinas. Noriega (2009) relata que todas as microcinas de classe II que tiveram seu modo de ação elucidado apresentam ação bactericida por atuarem na permeabilidade da membrana citoplasmática. As frações obtidas por *recromatografia* de fase reversa, por ultrafiltração e por cromatografia de fase reversa Supelcosil[™] das frações resultantes da ultracentrifugação exibiram atividade bactericida. É possível que nas frações bacteriostáticas a(s) concentração(ões) da(s) substância(s) antagonista(s) fosse(m) baixa(s), resultando em atividade bacteriostática. A plausibilidade desta hipótese é reforçada pela detecção de frações com atividade bactericida originadas destas frações que exibiram apenas atividade bacteriostática previamente. Como as

extrações e cromatografias eram repetidas, para que um maior volume de material fosse obtido, concentrações mais elevadas podem ter sido atingidas em etapas finais do processo de purificação. Alternativamente, não é possível descartar a possibilidade de que, em algumas das frações, já parcialmente purificadas, a(s) substância(s) bactericida(s) não estivesse(m) mais presente(s). Neste caso, todas as frações originadas destas apresentariam resultados compatíveis com ação bacteriostática até o final do processo de purificação.

Outro ensaio para avaliar o modo de ação das substâncias em estudo foi empregado. A determinação da CIM e da CBM são testes frequentemente realizados para avaliação da atividade de agentes antibacterianos. A CIM é definida como a menor concentração de uma droga antimicrobiana capaz de impedir a multiplicação visível de um microrganismo. A CBM é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de reduzir a contagem microbiana em 99,9 %, determinada por subcultura em meio sem a droga (Andrews; 2001; CLSI, 2013).

Neste estudo, os valores de CIM e CBM dos extratos proteicos C-30 e C-75 e de frações ativas originadas de cromatografia foram determinados. Para pesquisa da CIM, os testes foram realizados em microplacas e a adição de TTC aos poços precedeu a leitura. TTC auxilia na verificação da presença de células viáveis, devido à redução da substância pela ação de enzimas bacterianas. O composto gerado, formazano, possui coloração rósea, facilitando a leitura (Beloti *et al.*; 1999). Para avaliação da CBM realizou-se o teste clássico, que consiste no subcultivo, em meio sem o agente antimicrobiano, de alíquotas dos poços nos quais não se observa multiplicação da amostra indicadora, obtidas do teste para determinação da CIM.

O *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica) apresentou maior atividade (menor CIM) que os extratos intracelulares C-30 e C-75 e as frações originadas da cromatografia de gel filtração mostraram-se menos ativas. A coincidência de resultados de CIM e CBM das frações testadas demonstra atividade bactericida das mesmas, uma vez que o agente bacteriano é considerado bactericida quando o valor da CBM é no máximo quatro vezes o valor da CIM (Matthew & Levison, 2004). Estes resultados confirmam aqueles obtidos nos ensaios para avaliação do modo de ação da substância antagonista já

discutido, empregando o material raspado dos halos de inibição da amostra reveladora. O fato reforça a nossa hipótese a respeito da eficácia do *novo* ensaio proposto para este fim.

5 Apenas os extratos C-30, C-75 e o *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica) foram empregados no ensaio de cinética de ação. As outras frações ativas, oriundas das demais etapas de cromatografia não foram submetidas a esta análise, devido à quantidade insuficiente de amostra. Apesar de C-30 e C-75 apresentarem os mesmos valores de CIM e CBM, C-30 demonstrou melhor desempenho, eliminando totalmente a amostra indicadora *S. sonnei* SS12 em metade do tempo necessário para que C-75 produzisse o mesmo efeito. O *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica), por sua vez, apresentou melhor valor de CIM, mas, só foi capaz de eliminar SS12 após 245 minutos. Ainda que tenha sido observada variação no tempo requerido para eliminação de SS12 para as amostras analisadas, os resultados indicam ação bactericida, corroborando os dados obtidos para CBM e para o *novo* ensaio do cultivo do material raspado do halo de inibição da amostra reveladora proposto neste trabalho.

20 Eletroforese em gel de poliacrilamida pode ser empregado para separação de macromoléculas, entre elas, de natureza proteica. O uso de gradiente de poliacrilamida favorece uma melhor discriminação das amostras analisadas, em virtude do efeito de peneiramento. Assim, o gel apresenta poros maiores na região superior e poros menores na região inferior (Alfenas & Brune, 1998). O fracionamento proteico através de gel com gradiente de 15 a 20% de poliacrilamida mostrou-se adequado para a separação das bandas proteicas presentes nas frações analisadas, auxiliando na comprovação da eficácia do processo de purificação empregado, por meio da revelação da redução do número de bandas presentes.

30 O teste de atividade *in situ* consiste na avaliação da expressão de antagonismo pelas bandas proteicas discriminadas por meio de revelação com a amostra indicadora SS12. A técnica permitiu a identificação de três bandas ativas, entre as quais não se inclui nenhuma banda que possa corresponder à microcina com massa molecular de 7,2 kDa, purificada nesta investigação. A referida banda foi discriminada por SDS-PAGE, a partir do extrato C-75 e de outras frações

originadas das etapas de cromatografia. No teste de atividade *in situ*, mesmo aplicando-se no gel um grande volume da fração que continha substâncias com massas moleculares de 3 a 10 kDa, a fração não foi observada. Além disto, as substâncias ativas parcialmente purificadas com massas moleculares inferior a 10 kDa e na faixa aproximada de 25 a 30 kDa também não foram evidenciadas no teste de atividade *in situ*. A ausência destas bandas ativas pode se dever a uma mudança conformacional da proteína, que teria levado à perda da atividade ou à baixa concentração da proteína ativa, insuficiente para produzir uma banda de inibição visível.

10 Em resumo, nesta investigação, além da detecção de algumas possíveis substâncias antagonistas que foram pré-purificadas, foi possível a purificação e sequenciamento parcial de uma microcina, classe de bacteriocina ainda não descrita para *Shigella*. É plausível supor que microcinas desempenham papel relevante no processo de colonização intestinal. Cotter e colaboradores (2013) realizaram um estudo *in vivo*, no qual inocularam em camundongos linhagens produtoras ou não de Mcc V, uma microcina de classe II. O resultado demonstrou que a linhagem capaz de sintetizar a microcina foi capaz de colonizar o intestino grosso dos animais, enquanto que a linhagem não produtora não conseguiu se estabelecer.

20 Avaliados em conjunto, os dados gerados pelas etapas de purificação, espectrometria de massas, SDS-PAGE, teste de atividade *in situ* e os resultados previamente obtidos pelo nosso grupo sugerem que SS9 produza, pelo menos, cinco bacteriocinas ativas contra SS12. A purificação das demais substâncias antagonistas é uma etapa fundamental para a caracterização das mesmas, assim como para uma melhor compreensão do potencial antagonista da amostra de *S. sonnei* SS9, empregada neste estudo.

7 SÍNTESE DOS RESULTADOS, CONCLUSÕES E PERSPECTIVA

De acordo com os resultados gerados pelas corridas cromatográficas, espectrometria de massas, SDS-PAGE e avaliação da atividade antagonista *in situ*, a amostra bacteriana em estudo, *S. sonnei* SS9, é capaz de sintetizar substâncias antagonistas de natureza proteica, portanto, bacteriocinas. Com base nas definições atuais, tanto microcinas como colicinas são produzidas pela bactéria. Considerando a grande competitividade, característica de sítios densamente colonizados, como o intestino, em especial o intestino grosso, é plausível supor que estas substâncias antagonistas contribuam para a virulência de *S. sonnei*, conferindo vantagem seletiva na competição contra membros da microbiota indígena e contra outros enteropatógenos. O espectro de atividade da amostra produtora reforça esta possibilidade

Os extratos proteicos intracelulares de *S. sonnei* obtidos por precipitação às concentrações de 30 % e 75 % de sulfato de amônio, algumas frações parcialmente purificadas e a fração purificada exibiram atividade bactericida contra a amostra indicadora, *S. sonnei* SS12. Entretanto, para a aquisição de mais informações a este respeito, é importante a realização de ensaios para determinação da CIM, CBM e cinética de ação, empregando as substâncias purificadas. Para isto, é necessária a obtenção de frações purificadas, o sequenciamento das substâncias e a produção sintética das proteínas e/ou peptídeos ativos, visto que a quantidade de material obtida ao final das diversas etapas de purificação é insuficiente para a realização dos experimentos.

A bacteriocina purificada possui massa molecular de 7,2 kDa, sendo, assim, definida como uma microcina classe II. Esta é a primeira microcina descrita para *Shigella*. Dados da literatura demonstram o emprego de microcinas para diversos fins, por exemplo, como agente antitumoral e na conservação de alimentos. Como microcinas e bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico compartilham diversas características e as últimas são amplamente utilizadas, pode-se prever possibilidades concretas de aplicação da microcina descrita neste estudo.

A continuação desta investigação, incluindo a síntese *in vitro* da substância ativa purificada, é fundamental para a caracterização mais completa da mesma, o que pode possibilitar a melhor compreensão de seu papel e de seu potencial de aplicação biotecnológica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALFENAS, A. C. & BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: ALFENAS, A. C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. UFV, 1998. p.151-182.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.48, p.5-16, 2001.

BAKKAL, S.; ROBINSON, S. M.; RILEY, M. A. Bacteriocins of aquatic microorganisms and their potential applications in the seafood industry. In: CARVALHO, D. E.; DAVID, G. S.; SILVA, R. J. *Health and Environment in Aquaculture*. InTech, 2012. p.303-328.

BALCIUNAS, E. M.; MARTINEZ, F. A. C.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. S. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control.*, v. 32, p.134-142, 2013.

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

BARRY, E. M.; PASETTI, M. F.; SZTEIN, M. B.; FASANO, A.; KOTLOFF, K. F.; LEVINE, M. M. Progress and pitfalls in *Shigella* vaccine research. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, v.10, p.245–255, 2013.

BATDORJ, B.; DALGALARRONDO, M.; CHOISSET, Y.; PEDROCHE, J.; MÉTRO, F.; PREVOST, H.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T. Purification and

characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *J. Appl. Microbiol.*, v. 101, p. 837-848, 2006.

BELD, M. J. C. V. D.; REUBSAET, F. A. J. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 31, p.899–904, 2012.

BELGUESMIA, Y.; CHOISET, U.; PRÉVOST, H.; DALGALARRONDO, M.; CHOBERT, J. M.; DRIDER, D. Partial purification and characterization of the mode of action of enterocin S37: A bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* S37 isolated from poultry feces. *J. Environ. Public. Health*, v. 2010, p.1-8, 2010.

BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FREITAS, J. C.; NERO, L. A.; SOUZA, J. A.; SANTANA, E. H. W.; FRANCO, B. D. G. M. Frequency of 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride (TTC) Non-reducing bacteria in pasteurized milk. *Rev. Microbiol.*; v.30, p.137-140, 1999.

BONKOUNGOU, I. J. O.; HAUKKA, K.; ÖSTERBLAD, M.; HAKANEN, A. J.; TRAORÉ, A. S.; BARRO, N.; SIITONEN, A. Bacterial and viral etiology of childhood diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. *BMC Pediatrics*, v.13, p.1-6, 2013.

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, p.718-724, 1977.

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

BRANDT, K.; TADDEI, C. R.; TAKAGI, E. H.; OLIVEIRA, F. F.; DUARTE, R. T. D.; IRINO, I.; MARTINEZ, M. B.; SAMPAIO, M. C. Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in Brazilian newborns. *Clin.Sci. (Lond)*, v. 67, p.113-123, 2012.

BRAUN, V. & PATZER, S. L. Intercellular communication by related bacterial protein toxins: colicins, contact-dependent inhibitors, and proteins exported by the type VI secretion system. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 345, p.13-21, 2013.

BREITBART, M., HAYNES, M., KELLEY, S., ANGLY, F., EDWARDS, R. A., FELTS, B., MAHAFFY, J. M., MUELLER, J., NULTON, J., RAYHAWK, S., RODRIQUEZ-BRITO, B.; SALAMON, P.; ROHWER, F. Viral diversity and dynamics in an infant gut. *Res. Microbiol.*, v.159, p.367–373, 2008.

CALVO, J.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.*, v.27, p.44-52, 2009.

CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, v. 10, p.729 - 734, 2007.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Quim Nova*. v.31, p.669-675, 2008.

CARAYOL, N.; NHIEU, G. T. V. The Inside Story of *Shigella* Invasion of Intestinal Epithelial Cells. *Cold Spring Harb. Perspect Med.*, v.3, p.1-13, 2013.

CASCALES, E.; BUCHANAN, S. K.; DUCHE, D.; KLEANTHOUS, C.; LOUBES, R.; POSTLE, K.; RILEY, M.; SLATIN, S.; CAVARD, D. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 71, p.158–229, 2007.

CLEMENTE, J. C.; URSELL, L. K.; PARFREY, L. W.; KNIGHT, R. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell*, v.148, p.1258-1270, 2012.

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

Clinical And Laboratory Standards Institute. *M100-S15: Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbio: norma aprovada.* v. 23, 2003. p.177.

Clinical And Laboratory Standards Institute. *M100-S23: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement.* v.33, 2013. p.199.

CORR, S. C.; GAHAN, C. C. G. M.; HILL, H. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *Fems Immunol. Med. Microbial*, v. 52, p.2-12, 2007.

CORSINI, G.; KARAHANIAN, E.; TELLO, M.; FERNANDEZ, K.; RIVERO, D.; SAAVEDRA, J. M.; FERRER, A. Purification and characterization of the antimicrobial peptide Microcin N. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.312, p.119-125, 2010.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Micro.*, v. 11, p. 95- 105, 2013.

CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas: O papel-chave da espectrometria de massa na era pós-genômica. *Biotechnol. Cien. Desenvol.*, v.36, p.40-46, 2006.

CURSINO, L.; SMAJS, D.; SMARDA, J.; NARDI, R. M. D.; NICOLI, J. R.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Exoproducts of the *Escherichia coli* strain H22 inhibiting some enteric pathogens both in vitro and in vivo. *J. Appl. Microbiol.*, v.100, p.821-829, 2006.

DAW, M. A.; FALKINER, F. R. Bacteriocins: Nature, Function and Structure. *Micron.*, v.27, p.467-479, 1996.

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

DIBAISE, J. K.; ZHANG, H.; CROWELL, M. D.; KRAJMALNIK-BROWN, R.; DECKER, G. A.; RITTMANN, B. E. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo clin. Proc.*, v. 83, p.460 - 469, 2008.

DICKENSON, N. E.; ARIZMENDI, O.; PATIL, M. K.; TOTH, R. T.; MIDDAUGH, C. R.; PICKING, W. D.; PICKING, W. L. N-terminus of ipab provides a potential anchor to the *Shigella* type III secretion system tip complex protein ipad. *Biochemistry*, v. 52, p.8790-8799, 2013.

DICKS, L. M. T.; HEUNIS, D. A.; STADEN, V.; BRAND, A.; SUTYAK, N.; CHIKINDAS, M. L. Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In: DRIDER D, REBUFFAT S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer, 2011. p. 391-421.

DOBSON, A.; COTTER, P. D.; ROSS, R. R.; HILL, C. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 78, p. 1-6, 2012.

DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; COSTELLO, E. K.; CONTRERAS, M.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns, *PNAS*, v.107, p.11971-11975, 2010.

DONOHOE, C. L.; O'FARRELL, N. J.; DOYLE, S. L.; REYNOLDS, J. V. The role of obesity in gastrointestinal cancer: evidence and opinion. *Ther. Adv. Gastroenterol.*, v.7, p.38-60, 2014.

DORÉ, J.; CORTHER, G. The human intestinal microbiota. *Gastroentérol. Clin. Biol.*, v.34, p. 7-15, 2010.

DUQUESNE, S.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; PEDUZZI, J.; REBUFFAT, S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod. Rep.*, v. 24, p. 708–734, 2007.

DUNNE C. Adaptation of bacteria to the niche: probiotics and gut disorder. *Inflam. Bowel Dis.*, v.7, p.136-145, 2001.

EDMAN, P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.*, v. 4, p. 283–293, 1950.

ELLEN, A. F.; ROHULYA, O. V.; FUSETTI, F; WAGNER, M.; ALBERS, S. V.; DRIESSEN, A. J. M. The sulfolobacin genes of *Sulfolobus acidocaldarius* encode novel antimicrobial proteins. *J. Bacteriol.*, v. 193, p. 4380–4387, 2011.

EVERSE, J.; STOLZENBACH, F. E. Lyophilization. In: JAKOBY, W. B. (Ed.) *Methods Enzymol.*, v. 22, p. 33-39, 1971.

FARFÁN, M.; TORO, C. S.; BARRY, E. M.; NATARO, J. P. *Shigella* enterotoxin-2 is a type III effector that participates in *Shigella*-induced interleukin 8 secretion by epithelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 61, p.332-339, 2011.

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

FATH, M. J.; ZHANG, L. H.; RUSH, J.; KO1TER, R. Purification and characterization of colicin V from *Escherichia coli* culture supernatants. *Biochem.*, v.33, p. 6911-6917, 1994.

FINBERG, R. W.; MOELLERING, R. C.; TALLY, F. P.; CRAIG, W. A.; PANKEY, G. A.; DELLINGER, E. P.; WEST, M. A.; JOSHI, M.; LINDEN, P. K.; ROLSTON, K. V.; ROTSCHAFER, J. C.; RYBAK, M. J. The importance of bactericidal drugs: Future directions in infectious disease. *Clin. Infect. Dis.*, v. 39, p.1314–1320, 2004.

FOXMAN, B.; GOLDBERG, D.; MURDOCK, C.; X. I. C.; GILSDORF, J. R. Conceptualizing human microbiota: From multicelled organ to ecological community. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, v. 2008, p. 1-8, 2008.

GAGGERO, C.; MORENO, F.; LAVINA, M. Genetic analysis of microcin H47 antibiotic system. *J of Bacteriol*, v.175, p. 5420-5427, 1993.

GALVÉZ, A.; ABRIOUEL, H.; OMAR, N. B.; LUCAS, R. Food applications and regulation. In: DRIDER, D.; REBUFFAT, S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer, 2011. p. 353-390.

GARNEAU, S.; MARTIN, N. I.; VEDERAS, J. C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, v. 84, p.577-592, 2002.

GARRETT, W. S.; GORDON, J. I.; GLIMCHER, L. H. Homeostasis and Inflammation in the Intestine. *Cell*, v.140, p.859–870, 2010.

GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 81, p.591-606, 2009.

GILSON, L.; MAHANTY, H. K.; KOLTER, R. Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. *J. Bacteriol.*, v. 169, p. 2466–2470, 1987.

GRINTER, R.; MILNER, J.; WALKER, D. Ferredoxin containing bacteriocins suggest a novel mechanism of iron uptake in *Pectobacterium* spp. *Plos ONE*, v. 7, p.1-9, 2012.

GRODZKI, A. C. & BERENSTEIN, E. Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration. *Methods Mol. Biol.*, v.588, p.15-26, 2010.

HAMMAMI, R.; FERNANDEZ, B.; LACROIX, C.; FLISS, I. Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 70, p. 2947–2967, 2013.

HARRIS, D. C. Espectrometria de massa. In: HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. LTC, 2005. p. 507-537.

HERSCHMAN, H. R. & HERLINSKI, D. R. Purification and characterization of colicin E₂ and colicin E₃. *J. Biol. Chem.*, v.242, p.5360-5368, 1967.

HODGES, K.; GILL, R. Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. *Gut Microbes*, v.1, p.4-21, 2010.

HOLT, K. E.; BAKER, S.; WEILL, F. X.; HOLMES, E. C.; KITCHEN, A.; YU, J.; SANGAL, V.; BROWN, D. J.; COIA, J. E.; KIM, D. W.; CHOI, S. Y.; KIM, S. H.; SILVEIRA, W. D.; PICKARD, D. J.; FARRAR, J. J.; PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; THOMSON, N. R. *Shigella sonnei* genome sequencing and phylogenetic analysis indicate recent global dissemination from Europe. *Nat. Genet.*, v. 44, p. 1056-1061, 2012.

HOLT, K. E.; NGA, T. V. T.; THANH, D. P.; VINH, H.; KIM, D. W.; TRA, M. P. V.; CAMPBELL, J. L.; HOANG, N. V. M.; VINH, N. T.; MINH, P. V.; THUY, C. T.; NGA, T. T. T.; THOMPSON, C.; DUNG, T. T. N.; NHU, N, T. K.; VINH, P. V.; TUYET, P. T. N.; PHUC, H. L.; LIEN, N. T. N.; PHU, B. D.; AI, N. T. T.; TIEN, N. M.; DONG, N.; PARRY, C. M.; HIEN, T. T.; FARRAR, J. J.; PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; THOMSON, N. R.; BAKER, S. Tracking the establishment of local endemic populations of an emergent enteric pathogen. *PNAS.*; v. 110, p.17522-17527, 2013.

IRETON, K. Molecular mechanisms of cell–cell spread of intracellular bacterial pathogens. *Open Biol.*, v.3, p. 1-15, 2013.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Unicamp, 2006. p. 274-398.

JENNISON, A. V.; VERMA, N. K. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 28, p. 43-58, 2004.

JOH, R. I.; HOEKSTRA, R. M.; BARZILAY, E. J.; BOWEN, A.; MINTZ, E. D.; WEISS, H.; WEITZ, J. S. Dynamics of shigellosis epidemics: estimating individual-

level transmission and reporting rates from national epidemiologic data sets. *Am. J. Epidemiol.*, v. 178, p. 1319-1326, 2013.

KENT, U. M. Purification of antibodies using ammonium sulfate fractionation or gel filtration. *Methods Mol. Biol.*, v.111, p.11-18, 1999.

KHAN, S.; SINGH, P.; ANSARI, M.; ASTHANA, A. Isolation of *Shigella* species and their resistance patterns to a panel of fifteen antibiotics in mid and far western region of Nepal. *Asian. Pac. J. Trop. Dis.*, v.4, p.30-34, 2014.

KIM, M.; ASHIDA, H.; OGAWA, M.; YOSHIKAWA, Y.; MIMURO, H.; SASAKAWA, C. Bacterial interactions with the host epithelium. *Cell Host. Microbe.*, v.8, p. 20-35, 2010.

KIM, H. J.; YOUN, S. K.; LEE, S.; CHOI, Y. H. epidemiological characteristics of imported shigellosis in Korea, 2010 e 2011. *Osong. Public. Health Res. Perspect.*, v. 4, p. 159-165, 2013.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; HAYETE, B.; LAWRENCE, C. A.; COLLINS, J. J. A Common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, v.130, p. 797–810, 2007.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Uma introdução ás proteínas. In: LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. Sarvier, 1995. p.99-116.

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

LIMA, J. D. Sarcocystis, Isospora e Cryptosporidium. In: NEVES D. P. *Parasitologia Humana*. Atheneu, 2004. p.173-180.

LOHANS, C. T.; VEDERAS, J. C. Development of class IIa bacteriocins as therapeutic agents. *Int. J. Microbiol.*, v. 2012, p.1-13, 2012.

MAJEED, H.; GILLOR, O.; KERR, B.; RILEY, M. Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. *ISME J.*, v. 5, p. 71-81, 2011.

MARTEYN, B. S.; GAZI, A. D.; SANSONETTI, P. J. *Shigella*: A model of virulence regulation in vivo. *Gut Microbes*, v. 3, p. 104-120, 2012.

MATTHEW, E.; LEVISON, M. D. Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, v 18, p.451-465, 2004.

MEI, S.; SUN, C.; LIU, X.; LU, Q.; CAI, L.; LI, Y.; XIANG, H. The helix-loop-helix Motif at the N-terminus of hall is essential for Its immunity function against Halocin C8. *J. Bacteriol.*, v.190, p. 6501–6508, 2008.

MELO.; V. V.; DUARTE, I. P.; SOARES, A. Q. Guia de Antimicrobianos. Goiânia, ed. 1, p. 57, 2012. Disponível em: http://www.hc.ufg.br/uploads/138/original_Guia_de_Antimicrobianos_do_HC-UFG.pdf. Acesso em 07 jan. 2014.

MENDES E. N. Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility to antimicrobials. *J. Pediatr.*, v.88, p.125-128, 2012.

MERCADO, G.; TELLO, M.; MARÍN, M.; MONASTERIO, O.; LAGOS, R. The production in vivo of microcin E492 with antibacterial activity depends on salmochelin and EntF. *J. Bacteriol.*, v.190, p.5464-5471, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 7ª ed. Brasília-DF: Editora MS. 2009. p.813.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da saúde SUS. Disponível em:http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1549: Acesso em 09 jun. 2012.

MOKHTARI, W.; NSAIBIA, S.; MAJOURI, D.; HASSEN, A. B.; GHARBI, A.; AOUNI, M. Detection and characterization of *Shigella* species isolated from food and human stool samples in Nabeul, Tunisia, by molecular methods and culture techniques. *J. Appl. Microbiol.*, v. 113, p.209-222, 2012.

MOREIRA, J.S. Extração, Purificação e caracterização de substância antagonista produzida por *Shigella sonnei*. 2011. 40f. Monografia (Especialização em Microbiologia Aplicada à Ciência da Saúde) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2011.

MOSS, J. E.; FISHER, P. E.; VICK, B.; GROISMAN, E. A.; ZYCHLINSKY, A. The regulatory protein PhoP controls susceptibility to the host inflammatory response in *Shigella flexneri*. *Cell Microbiol.*, v. 2, p. 443-452, 2000.

MURIANA, P. M.; KLAENHAMMER, T. R. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.57, p.114-121, 1991.

NAVANEETHAN, U.; GIANELLA, R. A. Mechanisms of infectious diarrhea. *Nat. Clin. Pract.*,v.5, p.637-647, 2008.

NEISH, A. S. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterol.*, v. 136, p. 65-80, 2009.

NES, I. F. History, current knowledge, and future directions on bacteriocin research in lactic acid bacteria In: DRIDER D, REBUFFAT S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer, 2011. p. 3-12.

NIALL, H. D. Automated Edman degradation: the protein sequenator. *Meth. Enzymol.* v. 27, p.942–1010, 1973.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Microbiota gastrointestinal normal na doença e na saúde. In: CASTRO, L.P.; COELHO, L. G. V.(Eds). *Gastroenterologia*. Rio de Janeiro: Médica e Científica Ltda., 2004. p.1037- 1047.

NISHIE, M.; NOGAO, J.; SONOMOTO, K. Antibacterial peptides “bacteriocins”: na overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol. Sci.*, v.17, p.1-16, 2012.

NIYOGI, S. K. Shigellosis. *J. Microbiol.*, v. 43, p.133-143, 2005.

NORIEGA, J. M. S. Mecanismos de interacción entre la microcina 24 y su célula bacteriana blanco. 2009. 79. Tese (Doutorado em Bioquímica) Facultad de Ciencias Químicas y Farmaceuticas, Universidad de Chile, Santiago de Chile, 2009.

NUNES, R. C. M.; MAGALHÃES, P. P.; PENNA, F. J.; NUNES, J. M. M.; MENDES, E. N. Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility to antimicrobials. *J. Pediatr.*, v.88, p.125-128, 2012.

NYGREN, B. I.; SCHILLING, K. A.; BLANTON, E. B.; SILK, B. J.; COLE, D. J.; MINTZ, E. J. Foodborne outbreaks of shigellosis in the USA, 1998–2008. *Epidemiol. Infect.*, v.1, p.1- 9, 2012.

OGAWA, M.; HANDA, Y.; ASHIDA, H.; SUSUKI, M.; SASAKAWA, C. The versatility of *Shigella* effectors. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.6, p.11-16, 2008.

OLIVEIRA, P. L. Caracterização de bacteriocina sintetizada por amostra de *Shigella sonnei* isolada de criança com diarreia aguda. 2013. 191. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

PADILLA, C.; LOBOS, O.; HUBERT, E. *Shigella flexneri* strains produce bacteriocins active against members of the human microbial intestinal flora. *Rev. Latinoam. Microbiol.* v. 46, p.85-88, 2004.

PANKEY, G. A. SABATH, L. D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.*, v.38, p.864-870, 2004.

PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 252, p.11-18, 2005.

PAVLOVIC, M.; LUZE, A.; KONRAD, R.; BERGER, A.; SING, A.; BUSCH, U.; HUBER, I. Development of a duplex real-time PCR for differentiation between *E. coli* and *Shigella* spp. *J. Appl. Microbiol.*, v.110, p.1245–1251, 2011.

PAWLOWSKI, S. W.; WARREN, C. A.; GUERRANT, R. Diagnosis and Treatment of Acute or Persistent Diarrhea. *Gastroenterol.*, v. 136, p.1874–1886, 2009.

PHALIPON, A.; SANSONETTI, P. J. *Shigella's* ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival? *Immunol. Cell Biol.*, v. 85, p.119–129, 2007.

PINGITORE, E. V.; SALVUCCI, E.; SESMA, F.; NADER-MACÍAS, M. E. Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB). *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, v. 1, p. 557-568, 2007.

PODEWILS, L.J; MINTZ, E.D; NATARO, J.P; PARASHAR, U.D. Acute, infectious diarrhea among children in developing countries. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, v.15, p.155–168, 2004.

PONS, A. M.; DELALANDE, F.; DUARTE, M.; BENOIT, S.; LANNELUC, I.; SABLE, S.; VAN DORSSELAER, A. V.; COTTENCEAU, G. Genetic analysis and complete primary structure of microcin L. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, p.505–513, 2004.

PORTER, M. E. & DORMAN, C. J. A Role for H-NS in the Thermo-osmotic regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.*, v. 176, p. 4187-4191, 1994.

PRICE, L. B. & SHAND, R. F. Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the Haloarchaeal strain S8a. *J. Bacteriol.*, v.182, p.4951–4958, 2000.

RAOULT, D. Obesity pandemics and the modification of digestive bacteria flora. *Eur. J. Clin. Infect. Dis.*, v. 27, p.631- 634, 2008.

REA, M. C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D.; HILL, C. Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria In: DRIDER D, REBUFFAT S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer, 2011. p. 29-53.

REBUFFAT, S. Bacteriocin from Gram-negative bacteria: A classification? In: DRIDER D, REBUFFAT S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer, 2011a. p. 55-71.

REBUFFAT, S. Microcins from Enterobacteria: on the edge between Gram positive bacteriocins and colicins. In: DRIDER D, REBUFFAT S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer. 2011b. .p. 333-349.

REBUFFAT, S. Microcin in action: amazing defence strategies of enterobacteria. *Biochem. Soc. Trans.*, v.40, p.1457-1462, 2012.

REID, G.; YOUNES, J. A.; MEI, H. C. V.; GLOOR, G. B.; KNIGHT, R.; BUSSCHER, H. J. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.9, p. 27-38, 2011.

REIS, R. S.; HORN, F. Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Samonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathog.*, v.8, p.1-12, 2010.

RIBEIRO-RIBAS, R. N.; CARVALHO, M. A. R.; VIEIRA, C. A.; APOLÔNIO, A. C. M.; MAGALHÃES, P. P.; MENEZES, E. N.; OLIVEIRA, J. S.; SANTORO, M. M.; FARIAS, L. M. Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by an oral *Fusobacterium nucleatum* isolate. *J. Appl. Microbiol.*, v. 107, p. 699–705, 2009.

RILEY, A. M.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Rev. Microbiol.*, v.56, p.117–137, 2002.

RILEY, A. M. Bacteriocins, biology, ecology, and evolution. In: SCHAECHTER, M. *Encyclopedia of Microbiology*. Oxford: Elsevier, 2009. p.32-44.

RILEY, A. M. Bacteriocin-mediated competitive interactions of bacterial populations and communities. In: DRIDER D, REBUFFAT S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: from Genes to Applications*. Springer, 2011. p. 13-26.

RILEY, A. M.; ROBINSON, S. M.; ROY, C. M.; DENNIS, M.; LIU, V.; DORIT, R. L. Resistance is futile: the bacteriocin model for addressing the antibiotic resistance challenge. *Biochem. Soc. Trans.*, v.40, p.1438–1442, 2012.

ROSENBERG, I, M. Electrophoretic techniques. In: ROSENBERG, I, M. *Protein analysis and purification*. Birkhauser, 1996. p.55-98.

ROTBSCHILD, Z. Cromatografia por exclusão. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Unicamp, 2006. p.140-166.

SAAVEDRA, L. & SESMA, F. Purification techniques of bacteriocins from lactic acid bacteria and other Gram positive bacteria. In: DRIDER, D.; REBUFFAT, S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer, 2011. p.99-113.

SACK, D. V.; HOQUE, A. T. M. S.; HUQ, A.; ETHERIDGE, M. Is protection against shigellosis induced by natural infection with *Plesiomonas shigelloides*? *Lancet.*, v.343, p.1413-1415, 1994.

SANT'ANA, A. S.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre os métodos rápidos simplate TPC-CI e petrifilm AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. *Ciênc.Tecnol. Aliment.*, v.22, p.60-64, 2002.

SASAKAWA, C. A new paradigm of bacteria-gut interplay brought through the study of *Shigella*. *Proc. Jpn. Acad.*, v. 86, p.229-243, 2010.

SAYEED, S.; SACK, D. A.; QADRL, F. Protection from *Shigella sonnei* infection by Immunization of rabbits with *Plesiornonas shigelloides* (SVC 01). *J. Med. Microbiol.*, v.37, p.382-384, 1992.

SCHROEDER, G. N. & HILBI, H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin. Micro. Rev.*, v.21, p.134-156, 2008.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M. A.; BONELLI, R. R.; NUNES, M. M.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. *Alim. Nutr.*, v.14, p.229-235, 2003.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, L. C. M.; BRETT FINLAY, B. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Ver.*, v. 90, p.860-906, 2010.

SEVERINOV, K.; SEMENOVA, E., KAZAKOV, T. Class I microcins: their structures, activities, and mechanisms of resistance. In: DRIDER, D.; REBUFFAT, S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer, 2011. p.289-308.

SEVERINOV, K.; NAIR, S. K. Microcin C: biosynthesis and mechanisms of bacterial resistance. *Future Microbiol.*, v.7, 281-289, 2012.

SHEN, J.; OBIN, M. S.; ZHAO, L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol. Aspects Med.*, v. 34, p.39–58, 2013.

SHIM, D. H.; SUSUKI, T.; CHANG, S. Y.; PARK, S. M.; SANSONETTI, P. J.; SASAKAWA, C.; KWEON, M. N. New animal model of Shigellosis in Guinea Pig: Its usefulness for protective efficacy studies. *J. Immunol.*, v.178, p.2476-2482, 2007.

SILVA, E. F. & GOMES, M. A. Amebíase: *Entamoeba histolytica/ Entamoeba díspar*. In: NEVES D.P. *Parasitologia Humana*. Atheneu, 2004, p.127-138.

SILVA Jr. J. G. A cromatografia. In: SILVA Jr. J. *Cromatografia de proteínas: Guia teórico e prático*. Interciência, 2004a. p.7-9.

SILVA Jr. J. G. Métodos cromatográficos. In: SILVA Jr. J. *Cromatografia de proteínas: Guia teórico e prático*. Interciência, 2004b. p.11-34.

SIT, C. S. & VEDERAS, J. C. Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. *Biochem. Cell Biol.*, v.86, p.116-123, 2008.

ŠMAJS, D.; MICENKOVÁ, L.; ŠMARDA, J.; VRBA, M.; ŠEVCÍKOVÁ, A.; VALIŠOVÁ, Z.; WOZNICOVÁ, V. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicinE1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiol.*, v.10, p.1-10, 2010.

ŠMAJS, D.; EJKOVÁ, D. C.; MICENKOVÁ, L.; BITTENCOURT, C. I. L.; SOUZA, E. C.; ŠMARDA, J.; NASCIMENTO, A. M. A. Human *Escherichia coli* strains of different geographical and time source: bacteriocin types and their gene sequences are population-specific. *Environ. Microbiol. Rep.*, v.4, p.459-466, 2012.

SOGAYAR, M. I. T. L. & GUIMARÃES, S. *Giardia*. In: NEVES D. P. *Parasitologia Humana*. Atheneu, 2004. p.121-126.

SOUZA, M. A. B. Atividade antagonista de amostras de *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri*: extração, purificação e caracterização de bacteriocinas. 2008. 93f Relatório parcial de tese de doutorado (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

SOUSA, M. A. B.; MENDES, E. N.; APOLÔNIO, A. C. M.; FARIAS, L. M.; MAGALHÃES, P. P. Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of children with acute diarrhoea. *APMIS: Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, v. 118, p.125-135, 2010.

SOUSA, M. A. B. S.; NUNES, M. R. C. M.; MENDES, E. N.; PÉRET-FILHO, L. A.; PENNA, F. J.; MAGALHÃES, P. P. Resposta dos autores. *J. Pediatr.*, v.188, p. 367-368, 2012.

SOUSA, M. A. B.; FARIAS, L. M.; OLIVEIRA, P. L.; MOREIRA, J. S.; APOLÔNIO, A. C. M.; OLIVEIRA, J. S.; SANTORO, M. M.; MENDES, E. N.; MAGALHÃES, P. P. Antagonistic activity expressed by *Shigella sonnei*: identification of a putative new bacteriocin. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.108, p.724-729, 2013a.

SOUSA, M. A. B., MENDES, E. N.; COLLARES, G. B.; PÉRET-FILHO, L. A.; PENNA, F. J.; MAGALHÃES, P. P. *Shigella* in Brazilian children with acute diarrhoea: prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.108, p.30-35, 2013b.

SPADARO, A. C. Cromatografia por troca iônica. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Unicamp, 2006. p.104-137.

SUR, D.; RAMAMURTHY, T.; DEEN, J.; BHATTACHARYA, S. K. Shigellosis: challenges & management issues. *Indian. J. Med. Res.*, v.120, p.454-462, 2004.

SVENSSON, L.; BERGQUIST, J.; WENNERAS, C. Neuromodulation of experimental *Shigella* infection reduces damage to the mucosa. *Microbes infect.*, v.6, p.256-264, 2004.

TIIHONEN, K.; OUWEHAND, A. C.; RAUTONEN, N. Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing. Res. Rev.*, v. 9, p.107-116, 2010.

TREMAROLI, V. & BÄCKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nat.*, v.489, p.242-249, 2012.

TSUKUMO, D. M.; CARVALHO, B. M.; CARVALHO-FILHO, M. A.; SAAD, M. J. A. Translational research into gut microbiota: new horizons in obesity treatment. *Arg. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 53, p.139-145, 2009.

TUNON, P. & JOHANSSON K. E. Yet another improved silver staining method for the detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v.9, p.171-179, 1984.

VALEFF, C. N. Atividade antagonista de extrato intracelular obtido de *Fusobacterium necrophorum*: modo de ação e caracterização bioquímica. 2011. 144. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

VASSILIADIS, G.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; PEDUZZI, J. Class II microcins. In: DRIDER, D.; REBUFFAT, S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer, 2011. p.309-332.

VINH, H.; NHU, N. T. K.; NGA, T. V. T.; DUY, P. T.; CAMPBELL, J. I.; HOANG, N. V. M.; BONI, M. F.; MY, P. V. T.; PARRY, C.; NGA, T. T. T.; MINH, P. V.; THUY, C. T.; DIEP, L. T.; CHINH, M. T.; LOAN, H. T.; THAM, N. T. H.; LANH, M. N.; MONG, B. L.; ANH, C. T. C.; BAY, P. V.B.; CHAU, N. V. V.; FARRAR, J.; BAKER, S. A changing picture of shigellosis in southern Vietnam: shifting species dominance, antimicrobial susceptibility and clinical presentation. *BMC Infect Dis.*, v.9, p.204-216, 2009.

VIRGIN, H. W.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Redefining chronic viral infection. *Cell*, v.138, p.30–50, 2009.

VRIEZE, A.; HOLLEMAN, F.; ZOETENDAL, E. G.; VOS, W. M.; HOEKSTRA, J. B. L.; NIEUWDORP, M. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*, v. 53, p.606–613, 2010.

WALTER, J. & LEY, R. The human gut microbiome: Ecology and recent evolutionary changes. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 65, p.411-429, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Generic protocol to estimate the burden of *Shigella* diarrhoea and dysenteric mortality. Department of vaccines and biologicals. Geneva, Switzerland. WHO/V&B/99.26, 1999.

ZAMAROCZY, M. & CHAULEAU, M. Colicin killing: Foiled cell defense and hijacked cell functions. In: DRIDER, D.; REBUFFAT, S. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer, 2011. p.255-287.

ZIMMER, J.; LANGE, B.; FRICK, J. S.; SAUER, H.; ZIMMERMANN, K.; SCHWIERTZ, A.; RUSCH, K.; KLOSTERHALFEN, S.; ENCK, P.; A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v.66, p.53–60, 2012.

ZSCHÜTTIG, A.; ZIMMERMANN, K.; BLOM, J.; GOESMANN, A.; PÖHLMANN, C.; GUNZER, F. Identification and characterization of microcin S, a new antibacterial peptide produced by probiotic *Escherichia coli* G3/10. *PLoS One*, v.7, p.1-9, 2012.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO 1

**PERFIS CROMATOGRÁFICOS DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DA CROMATOGRAFIA
DE FASE REVERSA EM COLUNA SUPELCOSIL™**

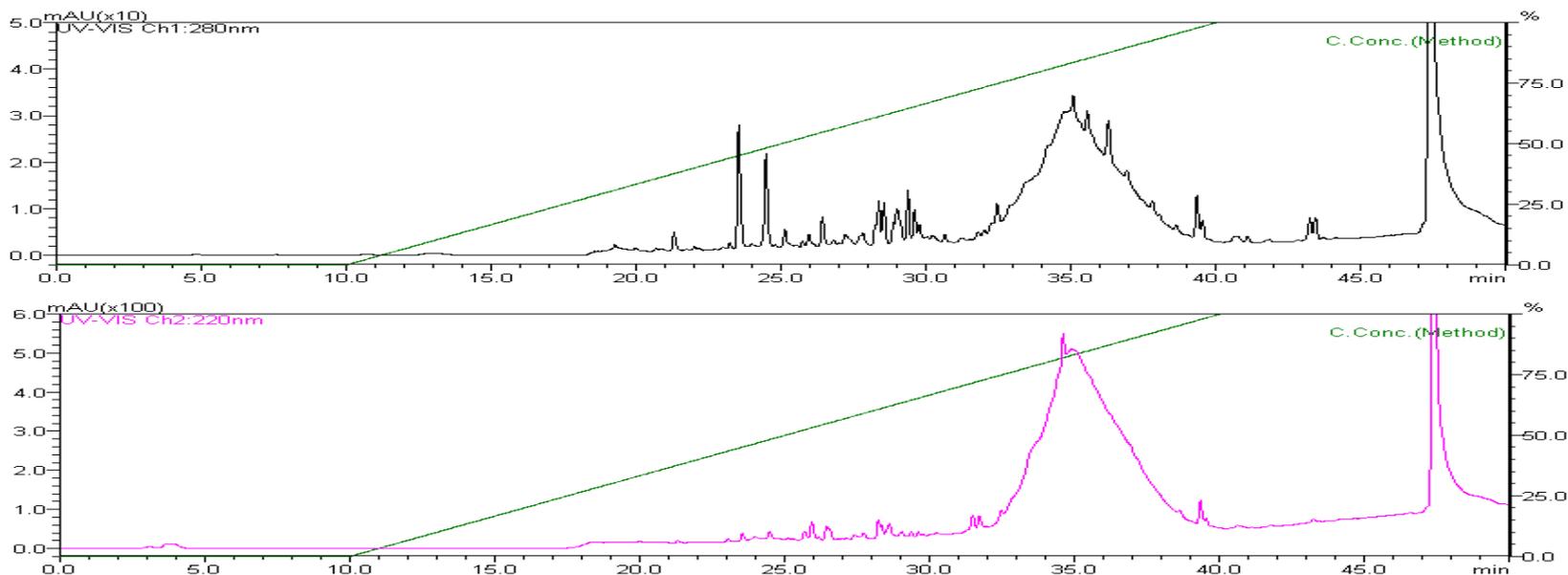


Figura 13

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* FR1 (frações 25 e 26 da coluna Poros[®]). Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 34 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, a fração 35 apresentou duas massas moleculares.

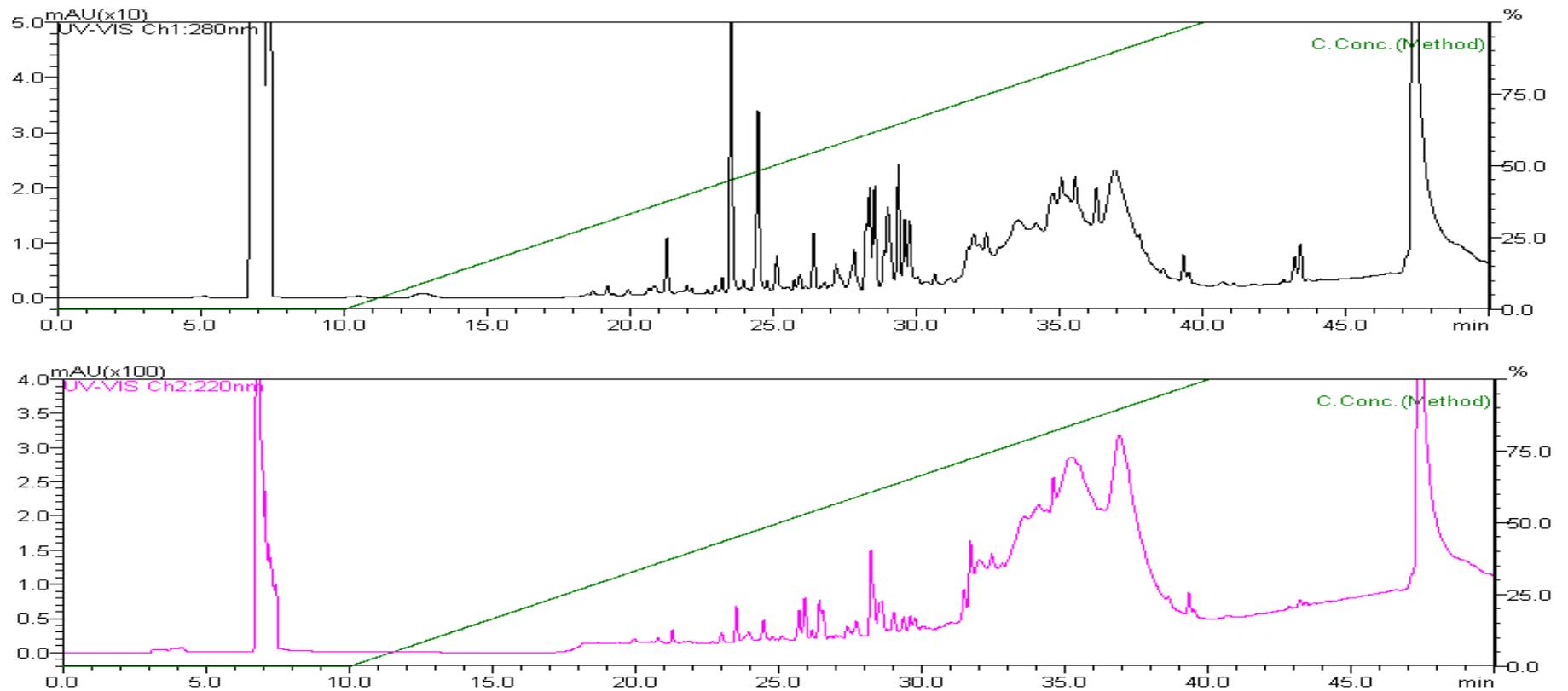


Figura 14

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool*/FR2 (frações 27 a 29 da coluna Poros[®]). Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 24 e 33 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 24 e 33 apresentaram duas e as frações 37 e 38 apresentaram três massas moleculares.

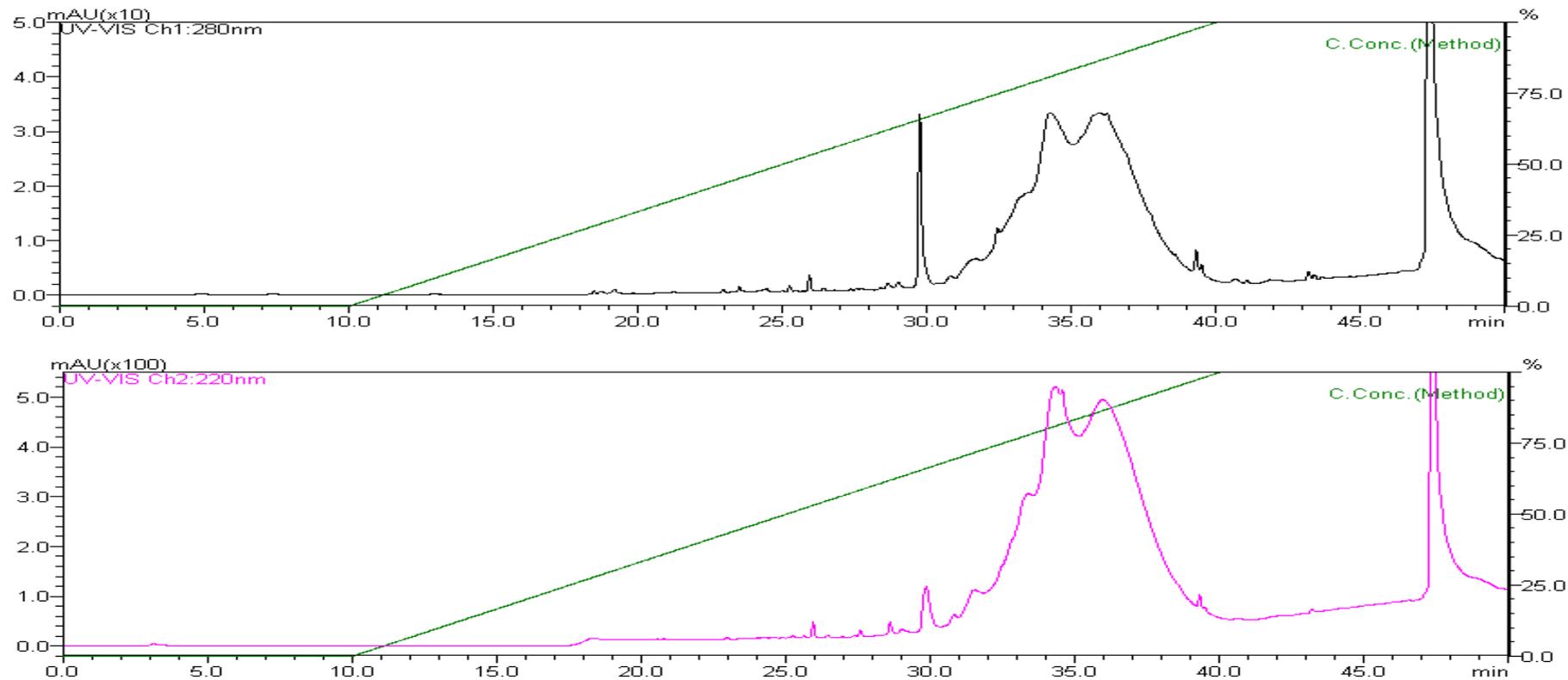


Figura 15

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 26 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]).

Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 32 a 39 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 36, 37 e 38 apresentaram quatro, duas e três massas moleculares, respectivamente.

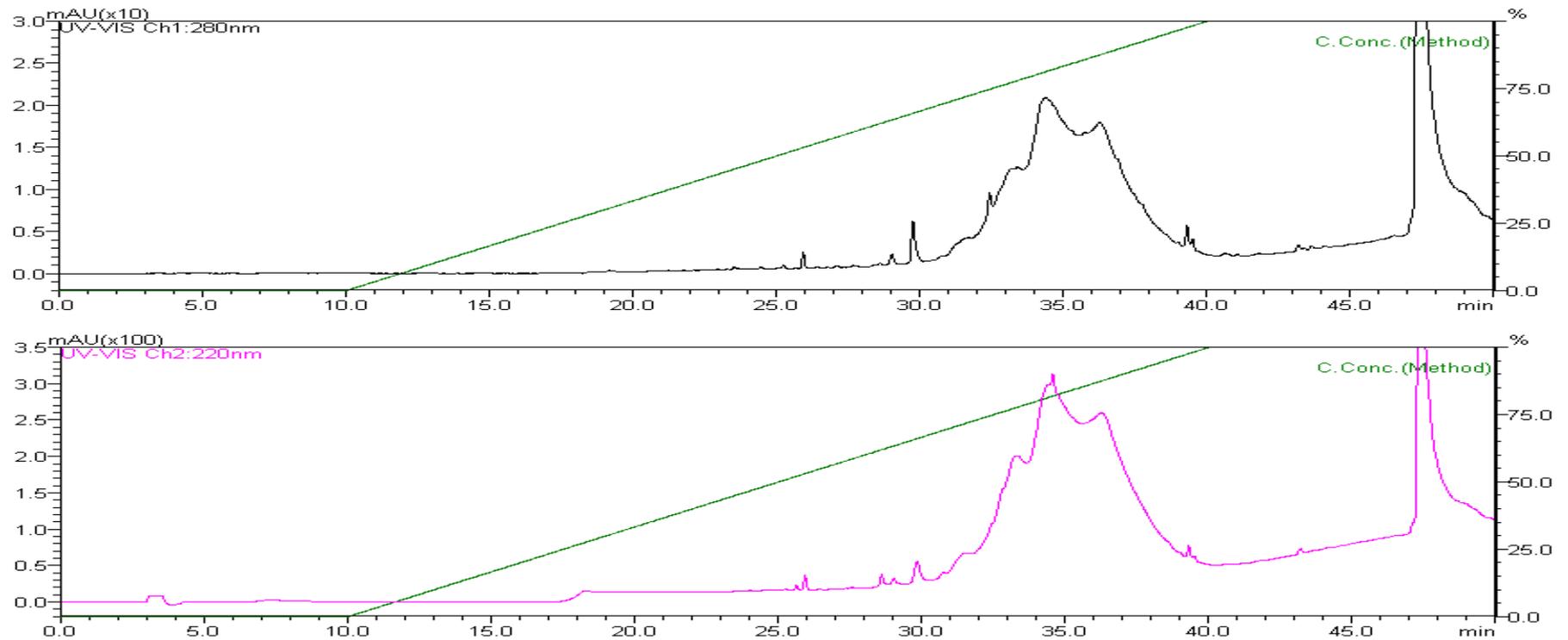


Figura 16

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 27 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]).

Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 33 a 39 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 38 e 39 apresentaram três e quatro massas moleculares, respectivamente.

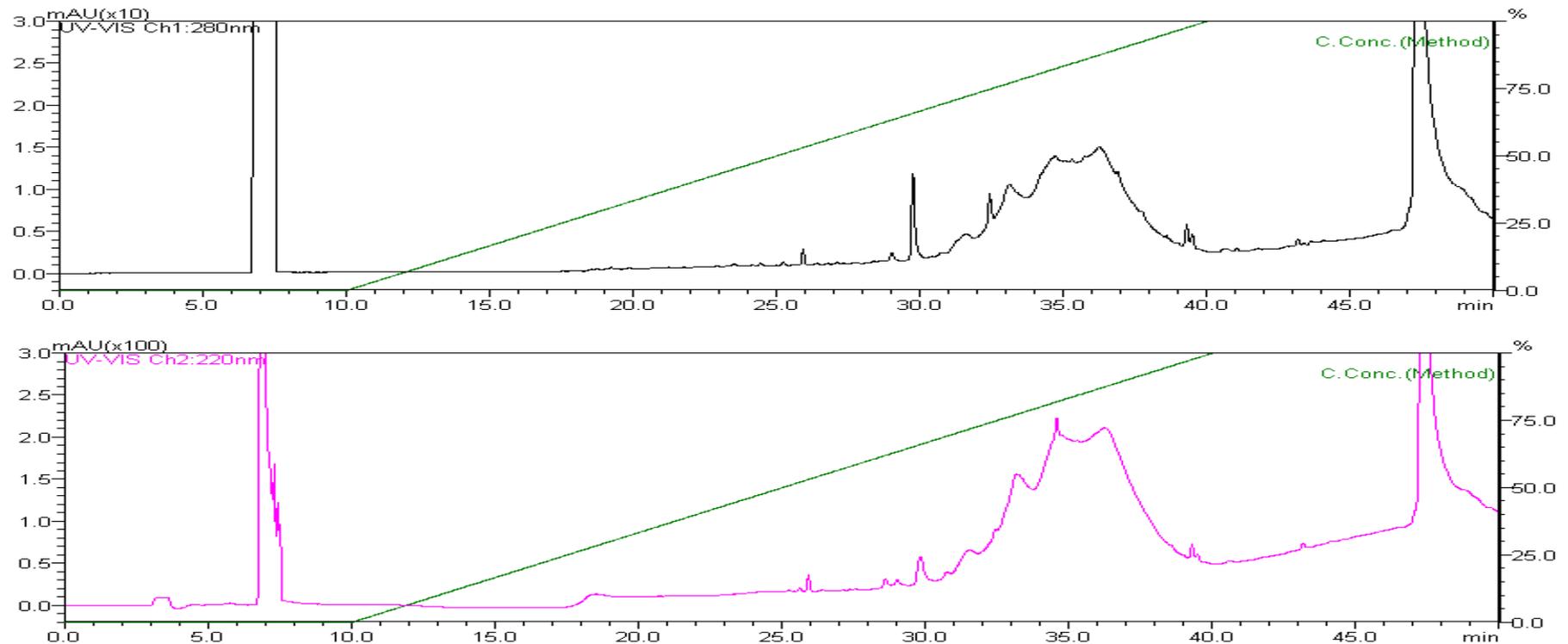


Figura 17

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 28 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]).

Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 33 a 39 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 37 e 38 apresentaram três e uma (7.377.969 Da) massas moleculares, respectivamente.

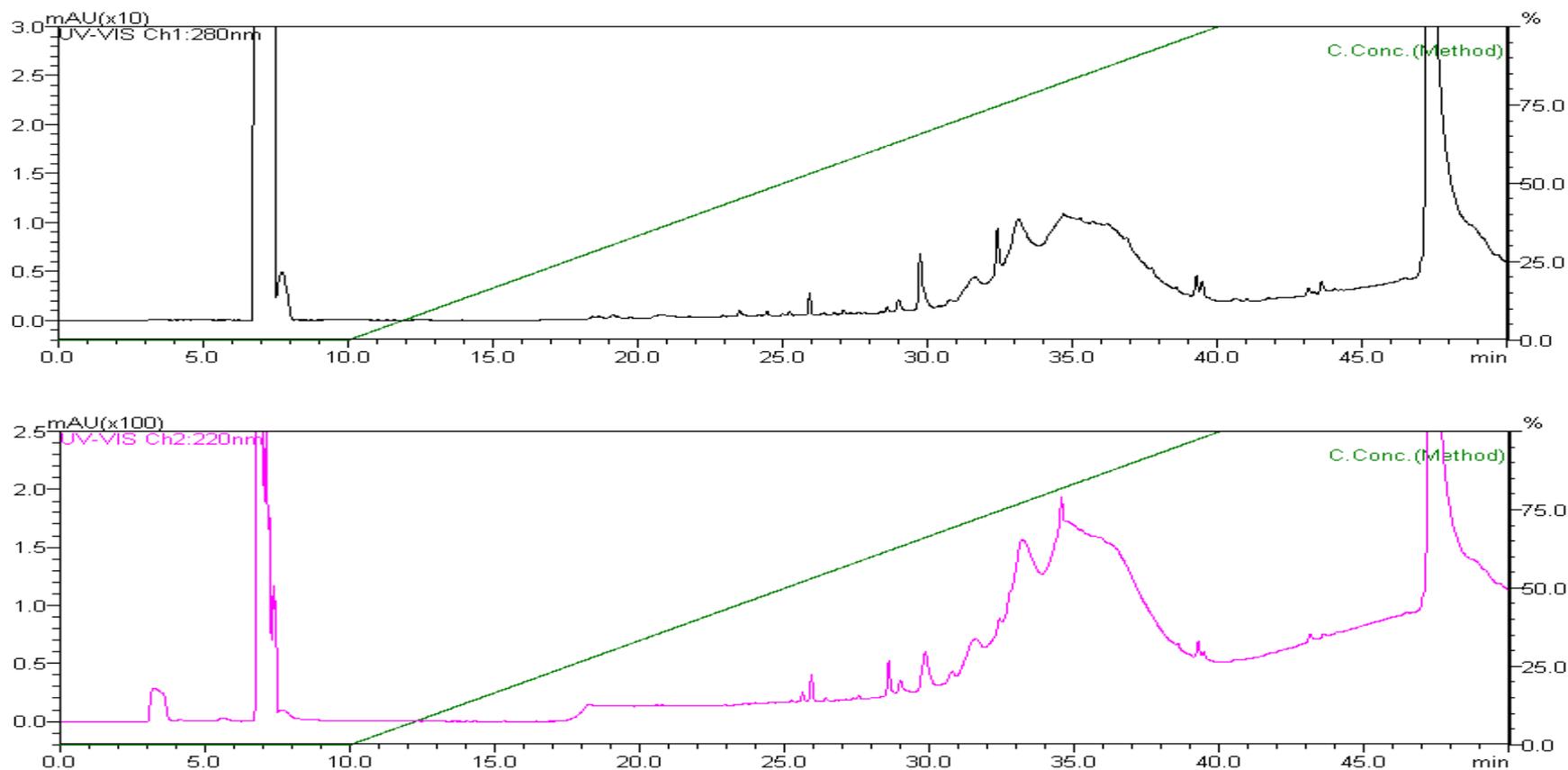


Figura 18

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* FR3 (frações 29 e 30 da coluna Poros[®]). Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 32 a 39 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 32 e 37 apresentaram três e as frações 38 e 39 duas massas moleculares.

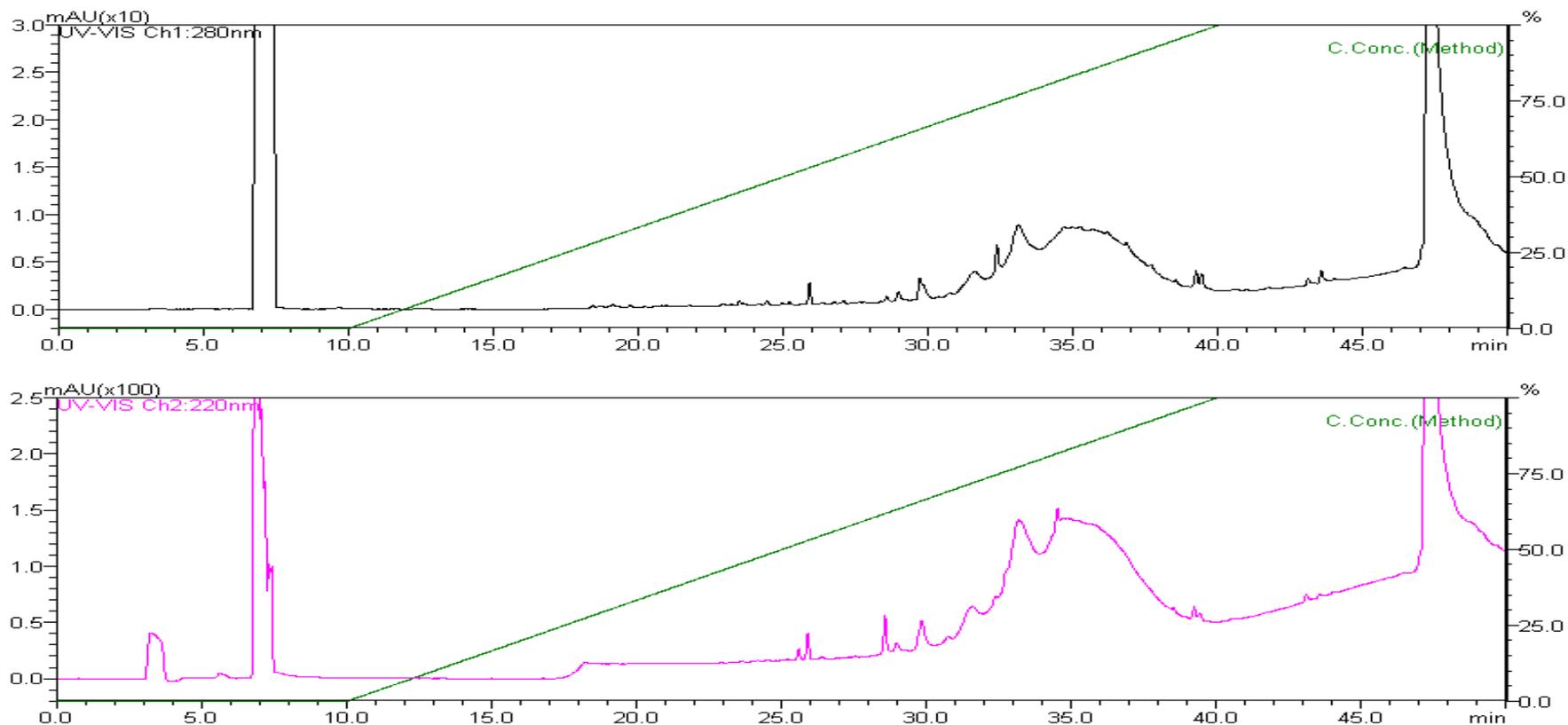


Figura 19

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* FR4 (frações 31 a 33 da coluna Poros[®]). Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 33 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 33, 37 e 38 apresentaram duas, três e quatro massas moleculares, respectivamente.

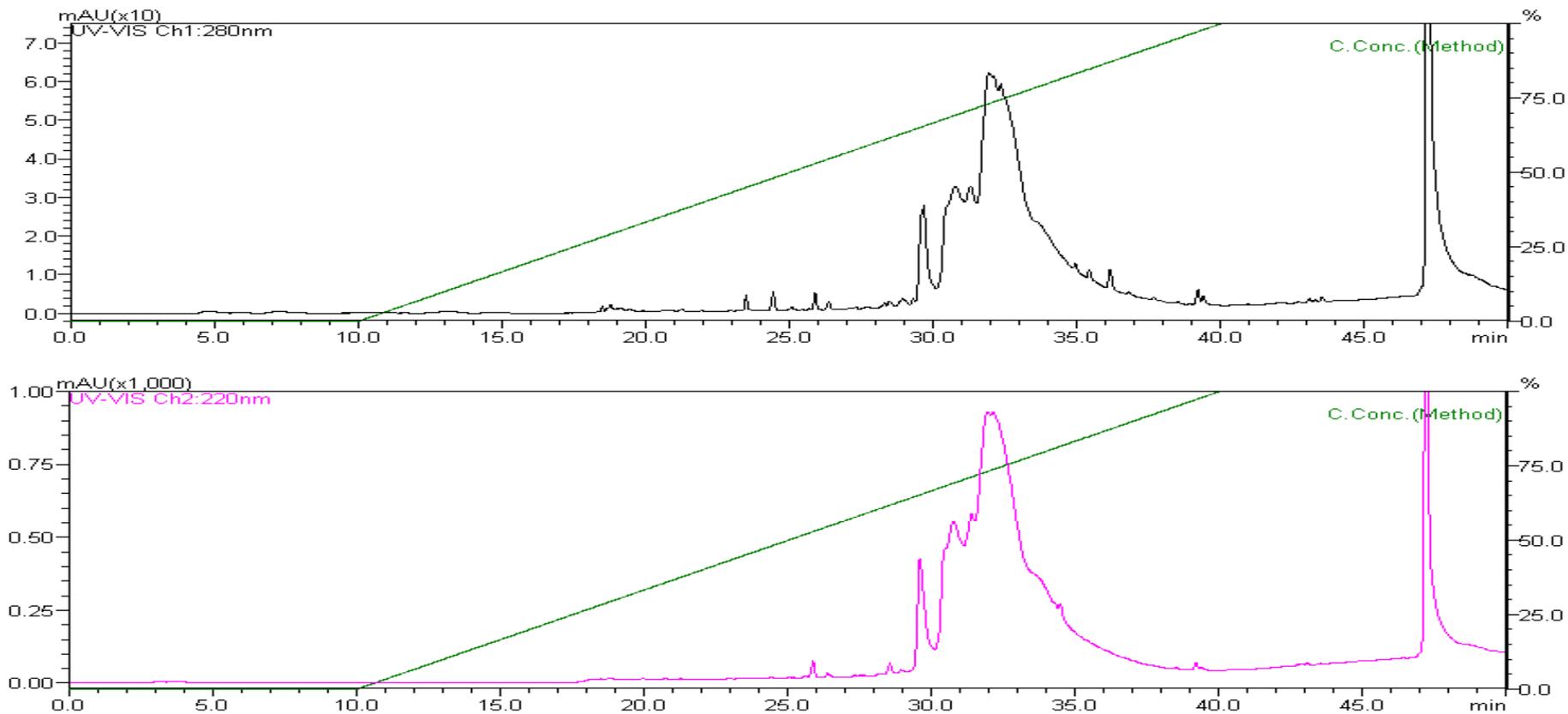


Figura 20

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 25 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]).

Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 33 a 39 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 33, 34, 37 e 39 apresentaram quatro, três, quatro e três massas moleculares, respectivamente.

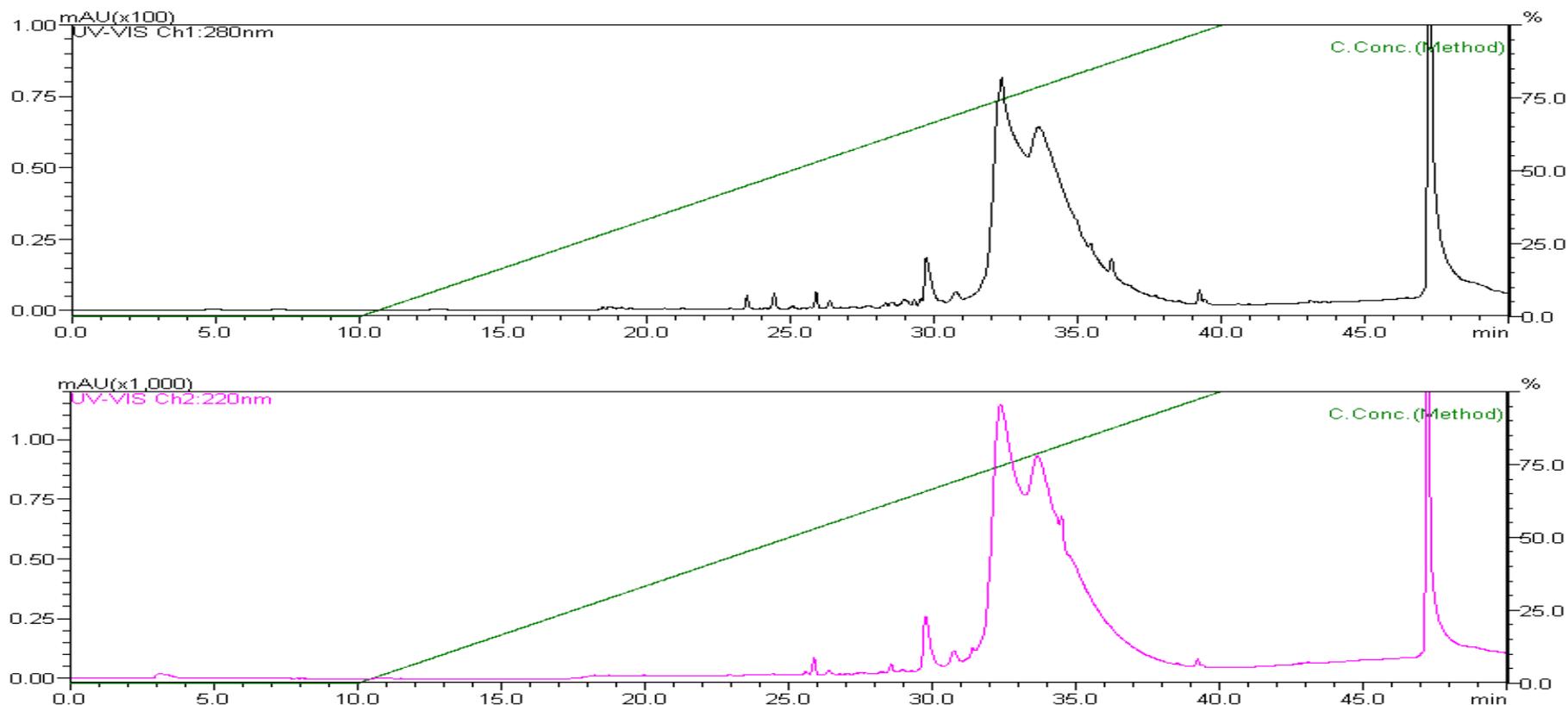


Figura 21

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 26 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]).

Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 30 a 40 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 30, 31, 32, 35 e 40 apresentaram duas, uma (7.235.679 Da), três, três e quatro massas moleculares, respectivamente.

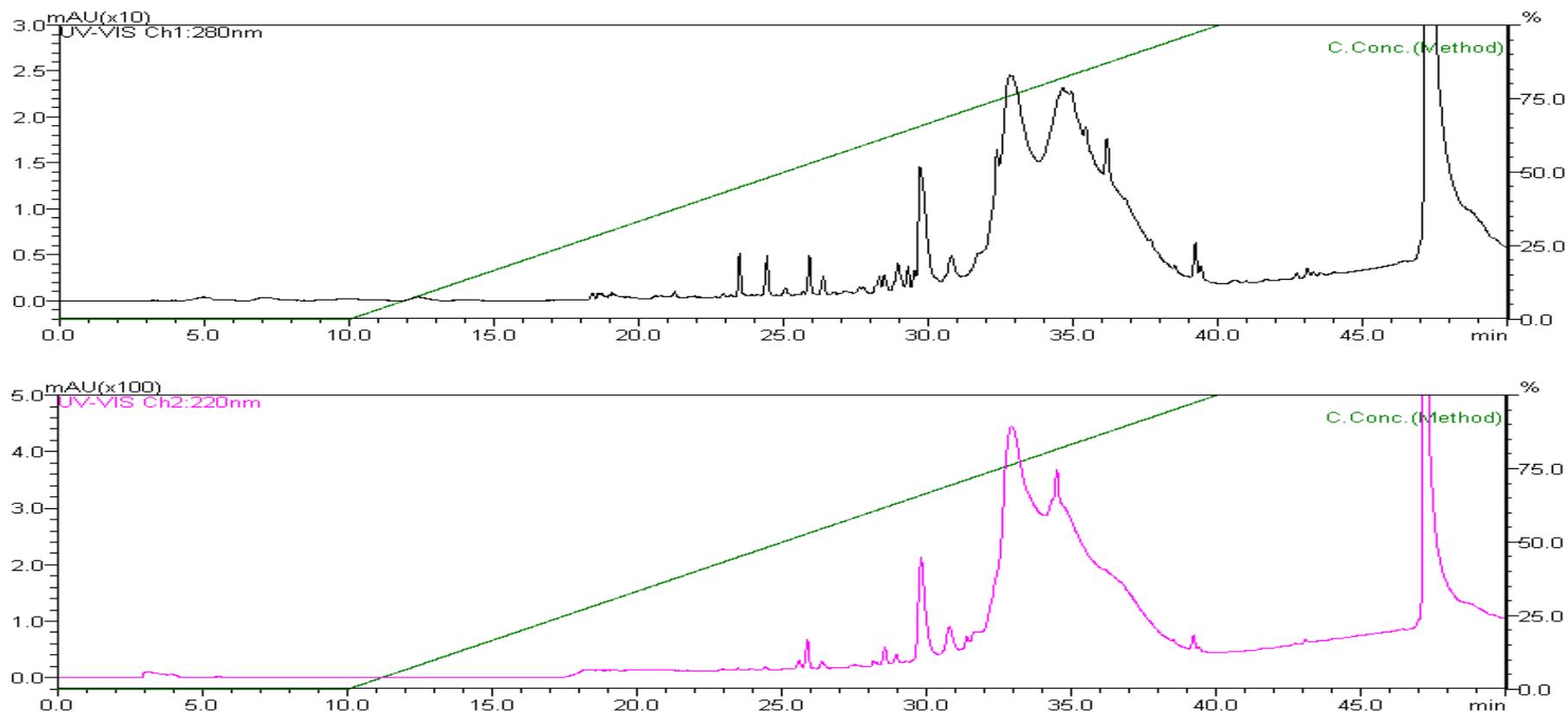


Figura 22

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 27 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]).

Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 32 a 39 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 32, 34, 35 e 39 apresentaram duas, três, quatro e duas massas moleculares, respectivamente.

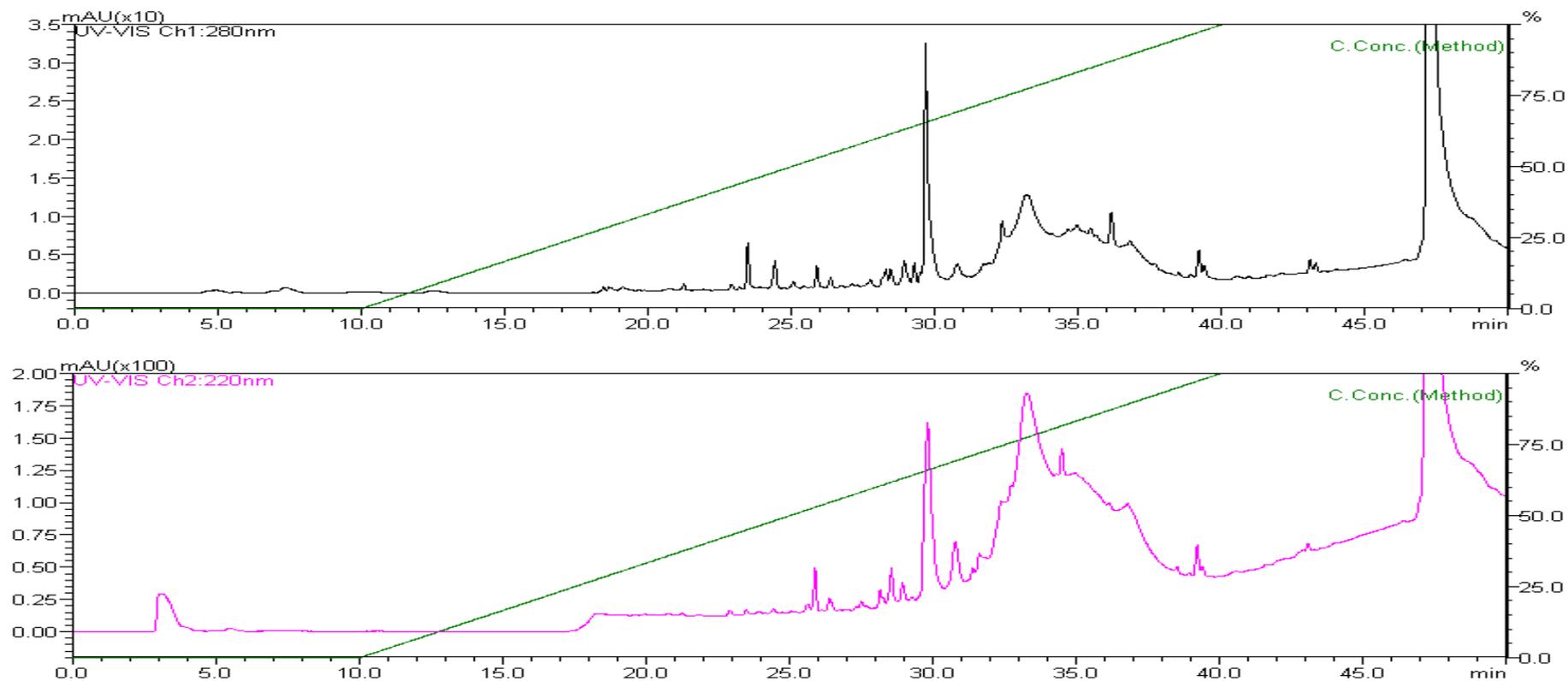


Figura 23

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 28 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]).

Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 32 a 39 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 32, 38 e 39 apresentaram duas, três e uma (10.761.097 Da) massas moleculares, respectivamente.

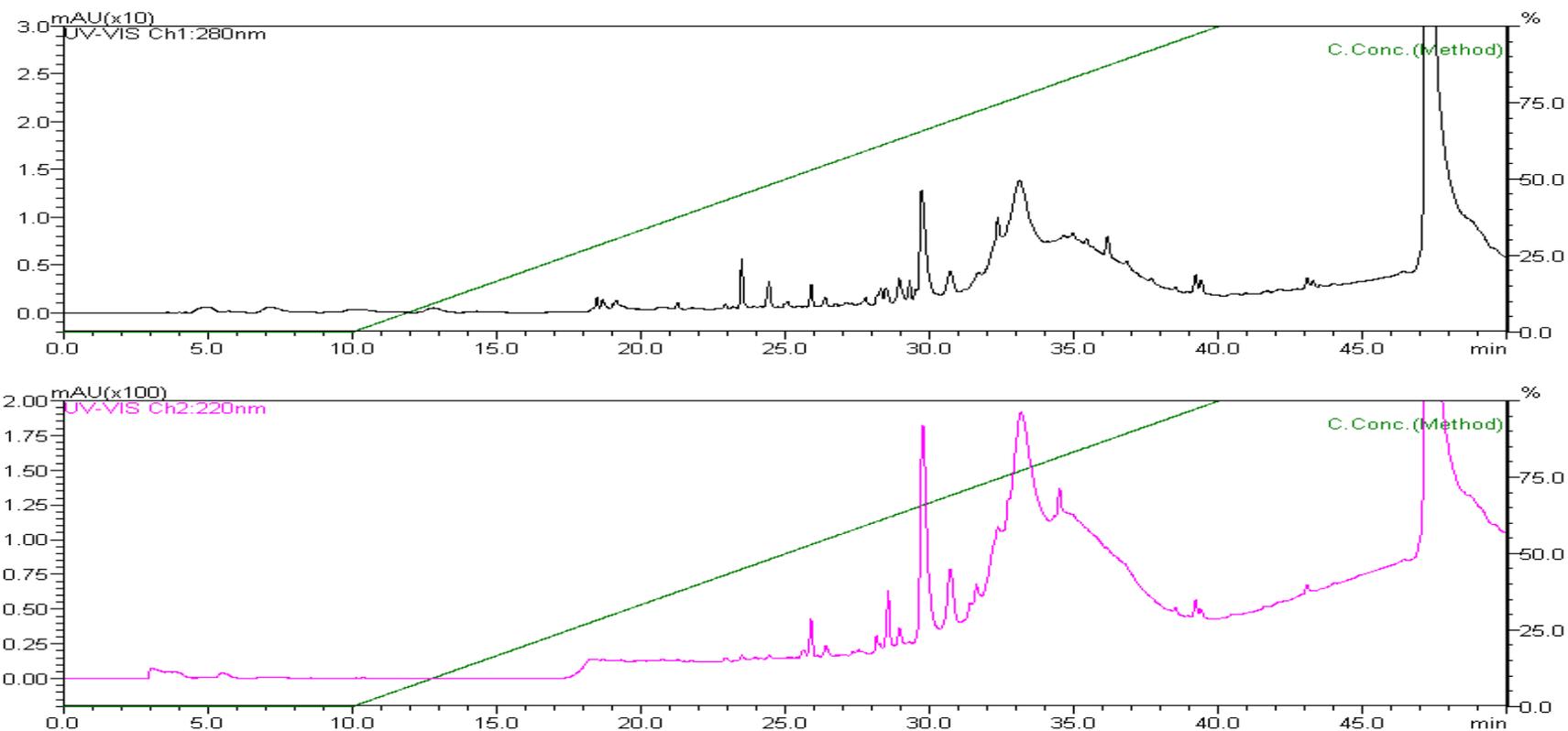


Figura 24

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* FR5 (frações 29 e 30 da coluna Poros[®]). Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 32 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 32, 34, 35, 37 e 38 apresentaram uma (7.338.008 Da), quatro, quatro, quatro e três massas moleculares, respectivamente.

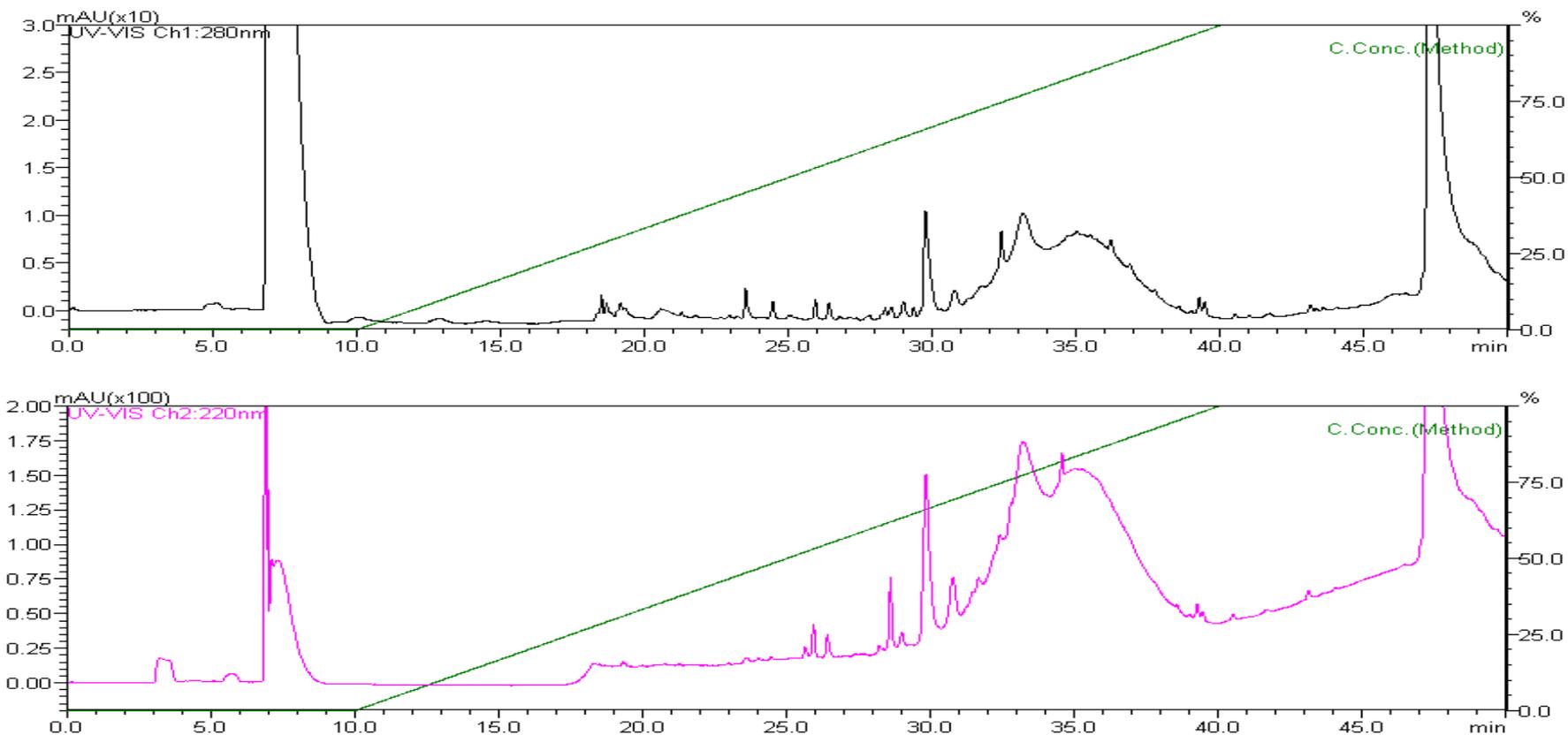


Figura 25

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* FR6 (frações 31 e 32 da coluna Poros[®]). Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 30 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 30, 32 e 38 apresentaram duas, uma (7.341.498 Da) e quatro massas moleculares, respectivamente.

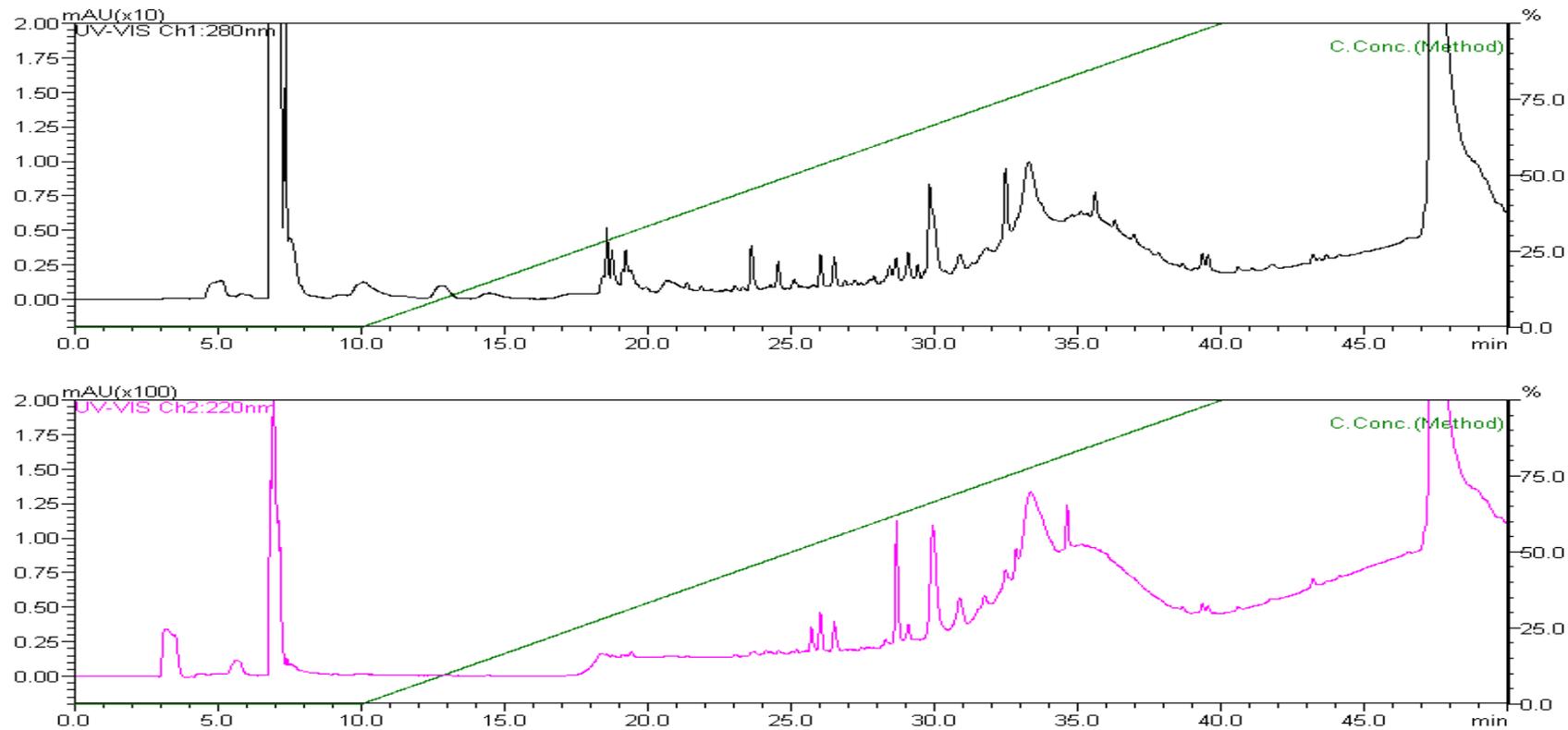


Figura 26

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* FR7 (frações 33 a 36 da coluna Poros[®]). Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 29 a 37 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 31, 32, 33, 35 e 36 apresentaram duas, duas, três, três e quatro massas moleculares, respectivamente.

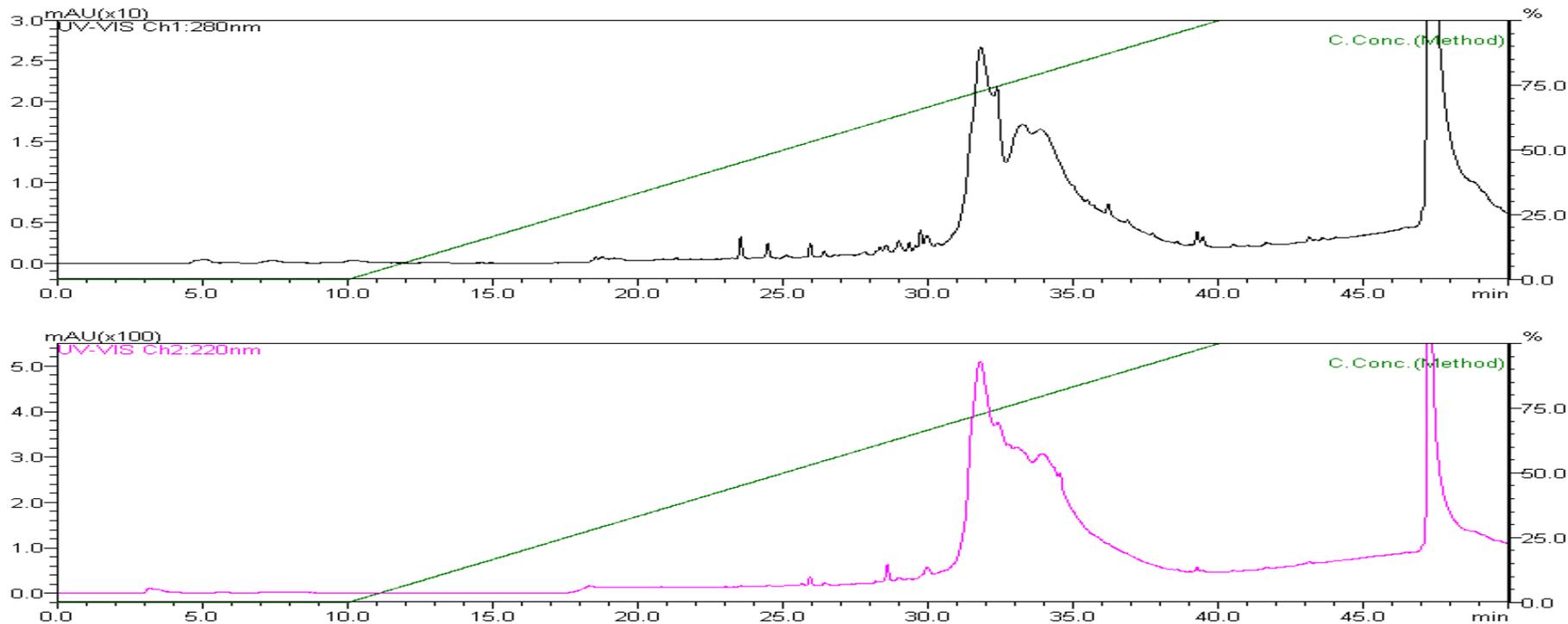


Figura 27

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 26 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]).

Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 30 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 30, 34 e 38 apresentaram três, uma (7.279.134 Da) e quatro massas moleculares, respectivamente.

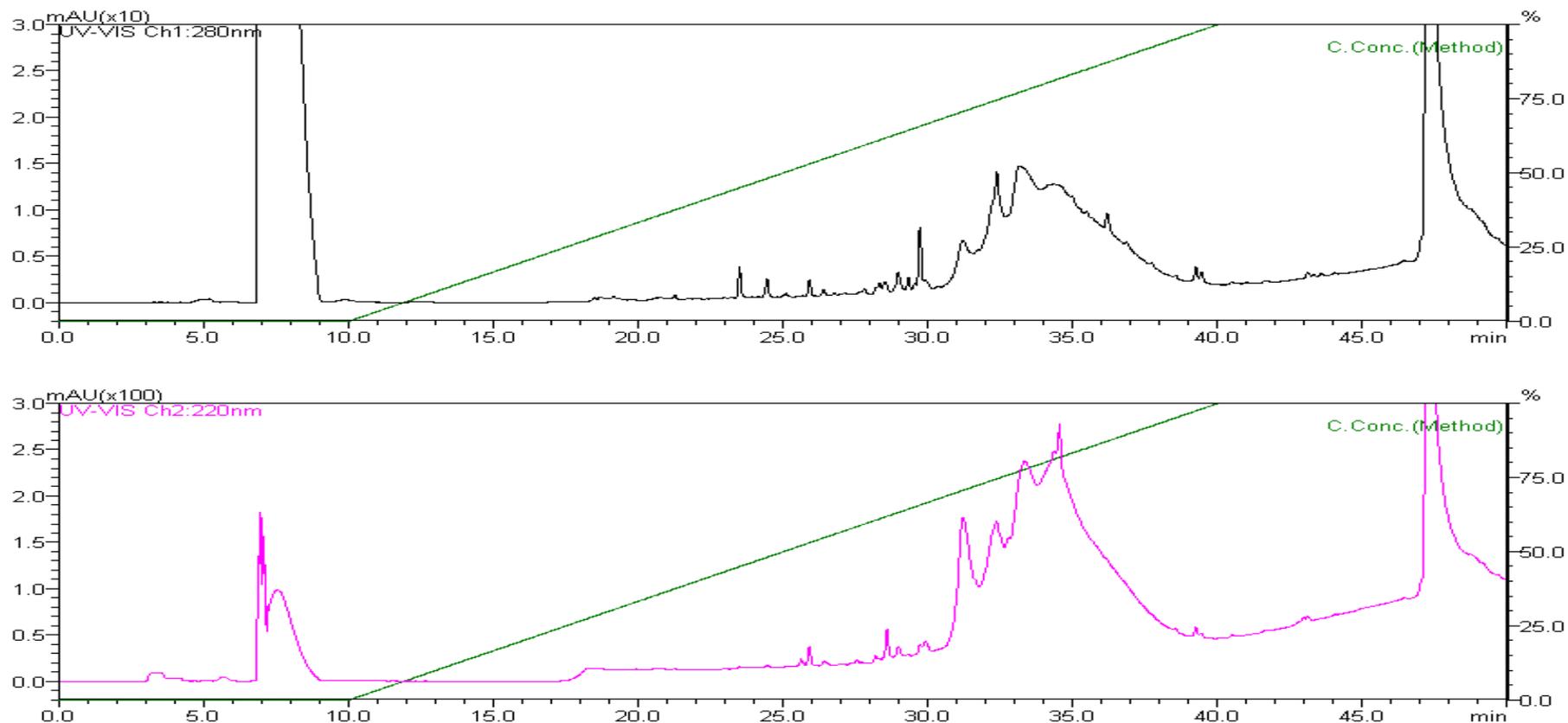


Figura 28

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 27 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]).

Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 30 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 30, 35 e 36 apresentaram duas massas moleculares.

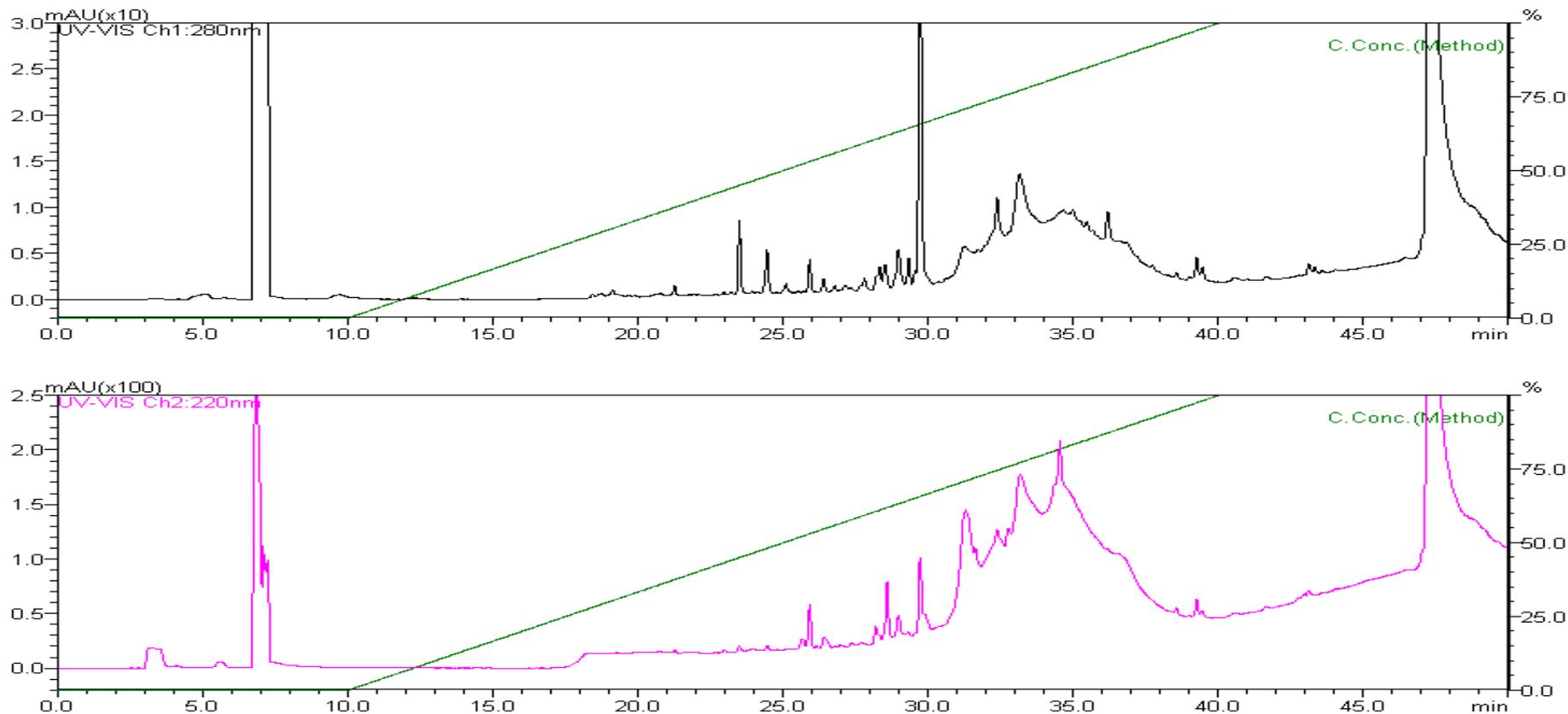


Figura 29

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* FR8 (frações 28 e 29 da coluna Poros[®]). Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 30 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 30, 33, 36, 37 e 38 apresentaram três, quatro, três, três e três massas moleculares, respectivamente.

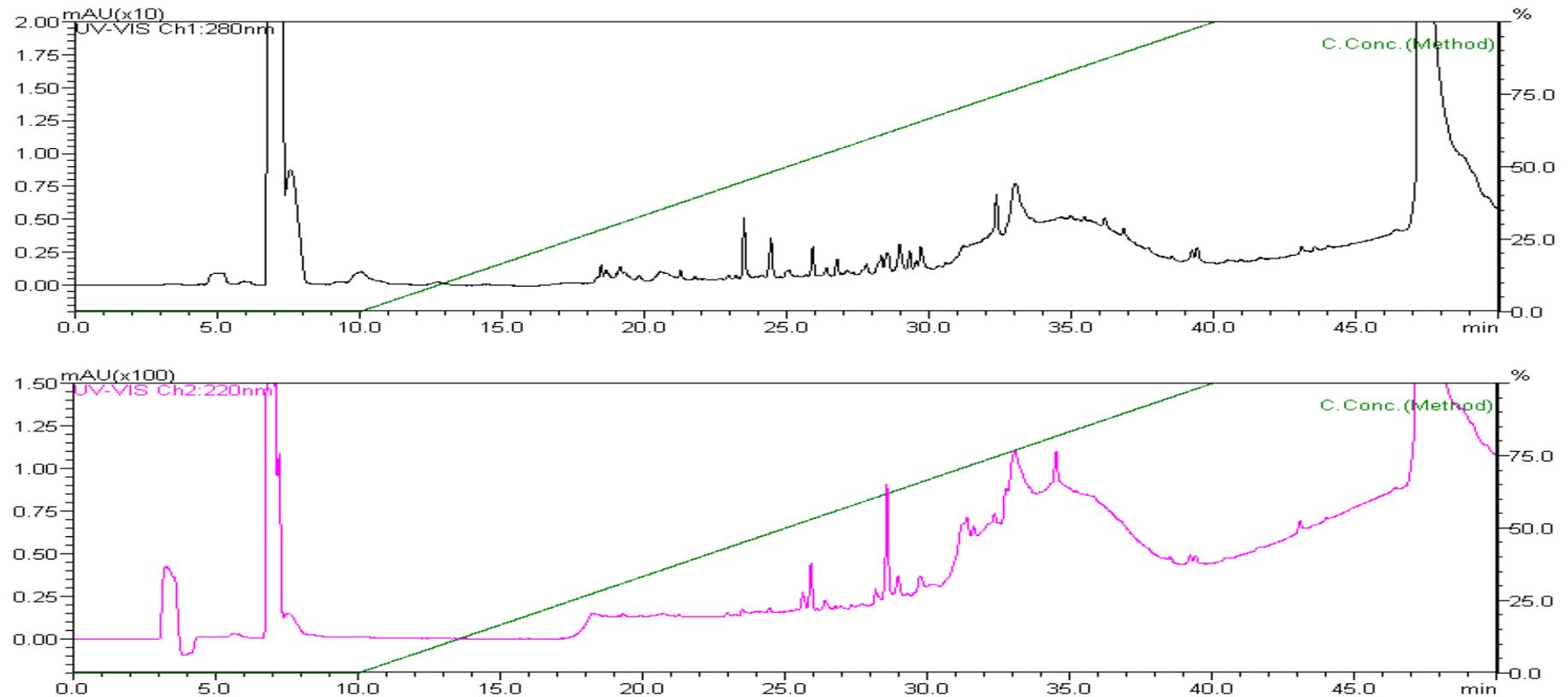


Figura 30

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* FR9 (frações 30 a 34 da coluna Poros[®]). Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 30 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 30 e 32 apresentaram uma (7.877.274 Da) e duas massas moleculares, respectivamente.

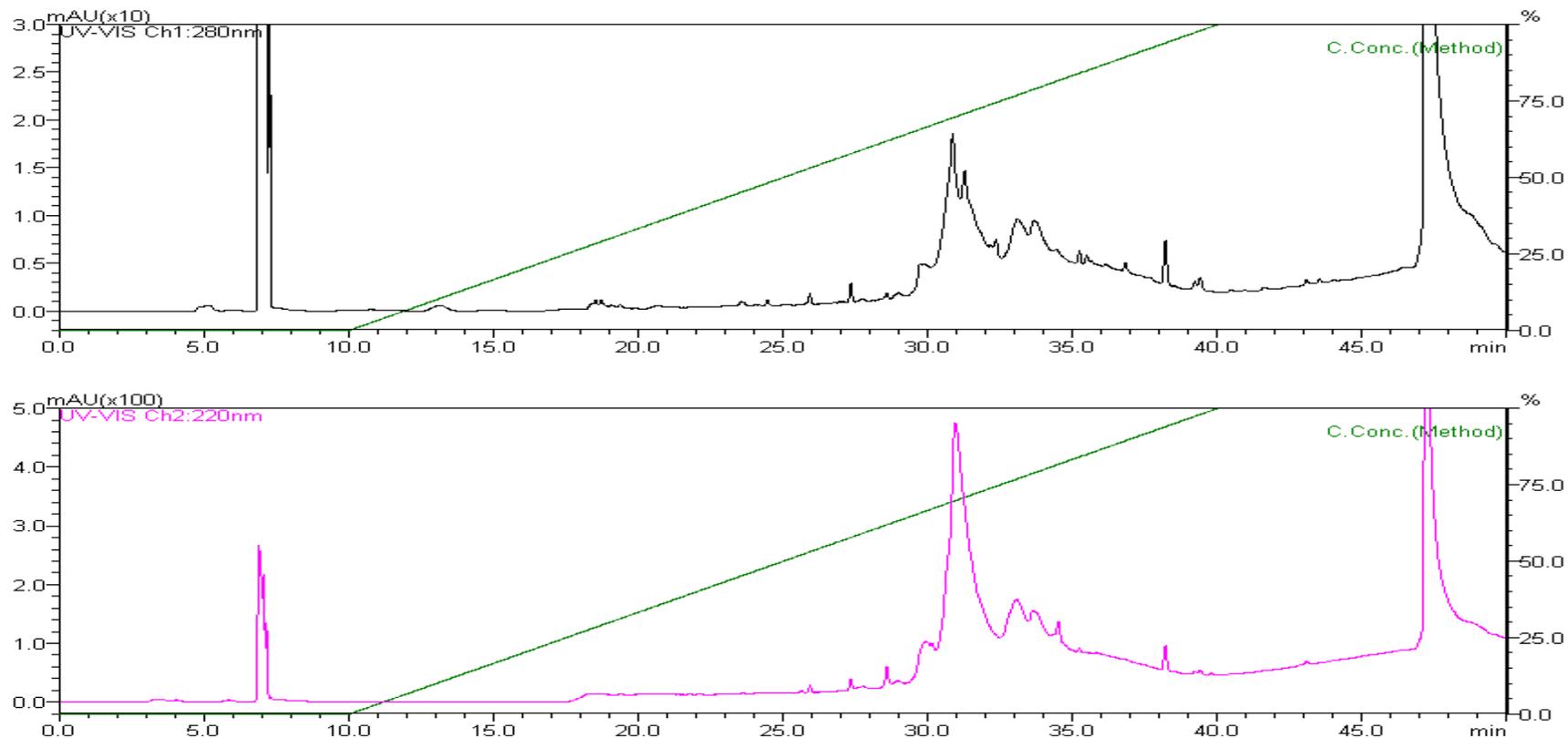


Figura 31

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 25 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]).

Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 33 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 33, 34 e 35 apresentaram três, quatro e quatro massas moleculares, respectivamente.

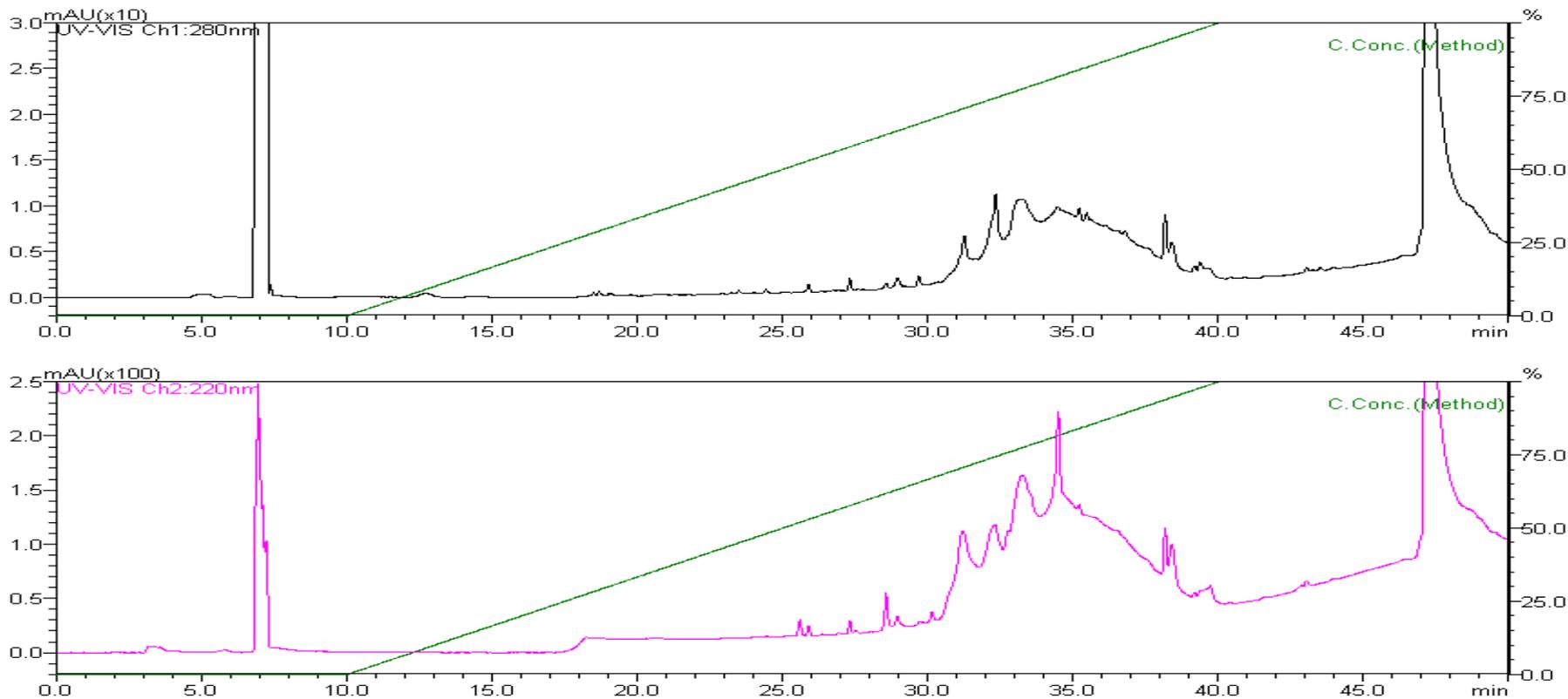


Figura 32

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa da fração 27 da coluna Poros[®]. Coluna Supelcosil[™] (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]).

Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 33 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 33 e 37 apresentaram quatro e três massas moleculares, respectivamente.

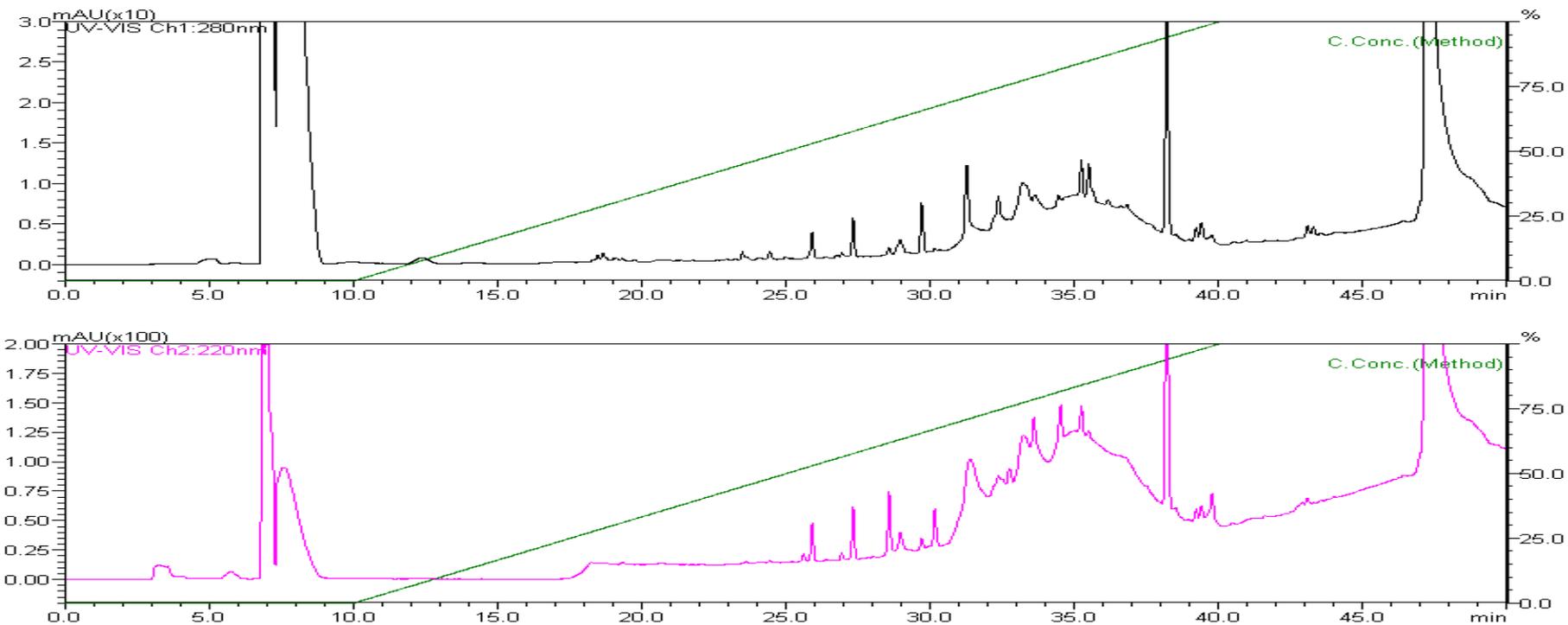


Figura 33

Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa do *pool* FR10 (frações 28 e 29 da coluna Poros[®]). Coluna SupelcosilTM (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. As frações 30 a 38 apresentaram atividade antagonista. Em análise por espectrometria de massas, as frações 30, 31, 33, 34 e 38 apresentaram duas, duas, quatro, três e três massas moleculares, respectivamente

9.2 ANEXO 2

**ESPECTROS DE MASSAS DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DA CROMATOGRAFIA DE
FASE REVERSA EM COLUNA SUPELCOSIL™**

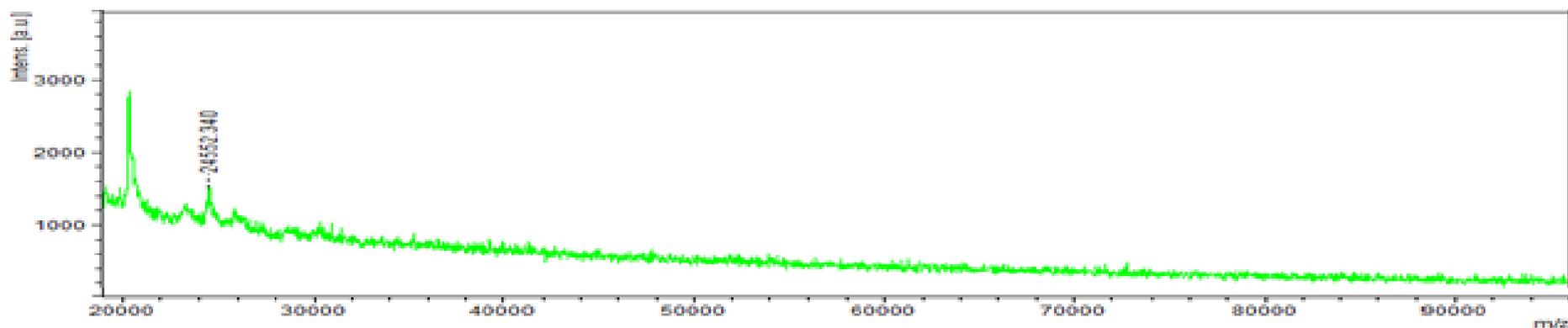
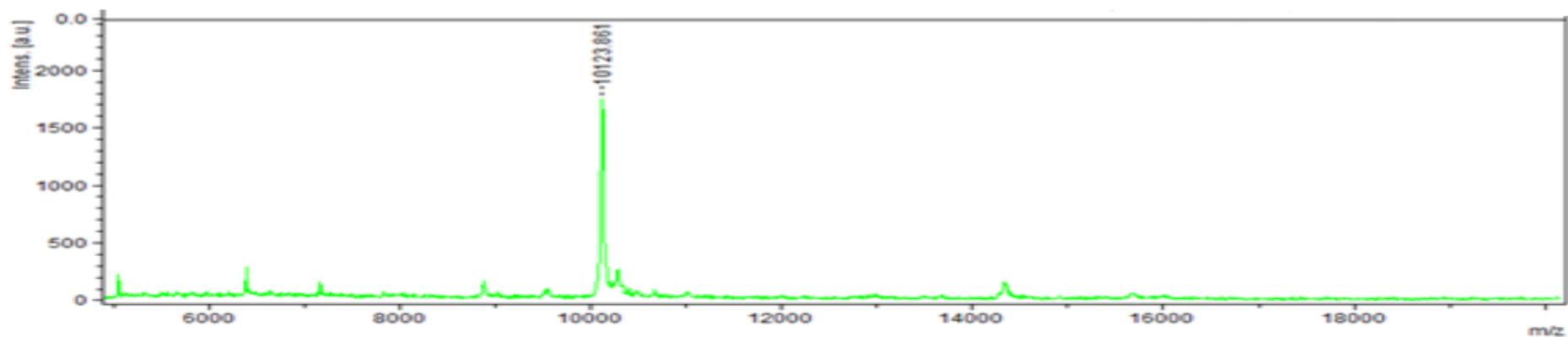


Figura 35

Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 35: massas moleculares de 10.123,861 e 24.552,340 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - *pool*/FR1 (frações 25 e 26 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool*/GF1 (frações 2 a 4 da cromatografia de gel filtração - *pool*/TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

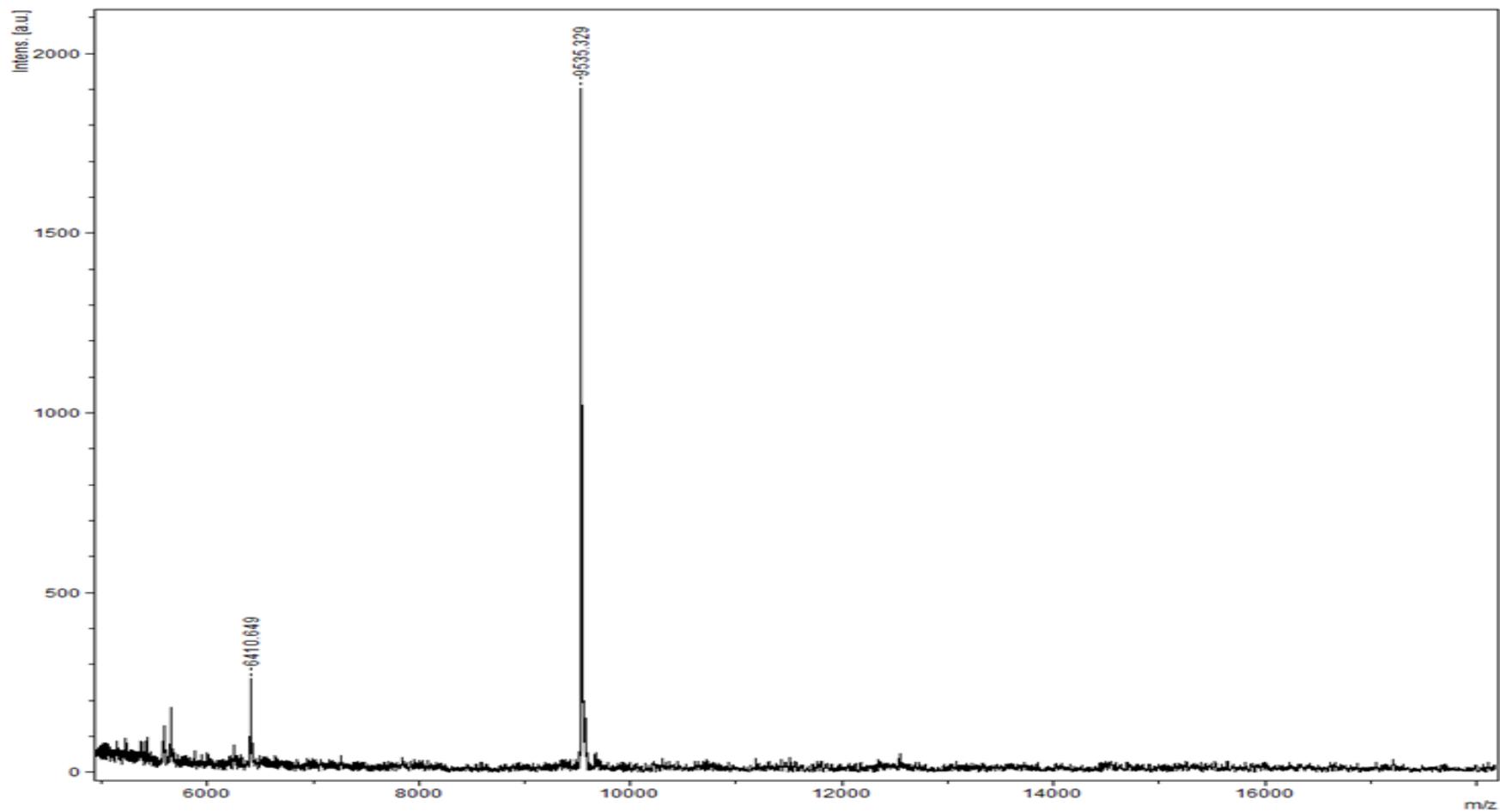


Figura 36

Espectro de massas em matriz super DHB da fração 24: massas moleculares de 6.410,649 e 9.535,329 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - *pool*/FR2 (frações 27 e 29 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool*/GF1 (frações 2 a 4 da cromatografia de gel filtração - *pool*/TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica))].

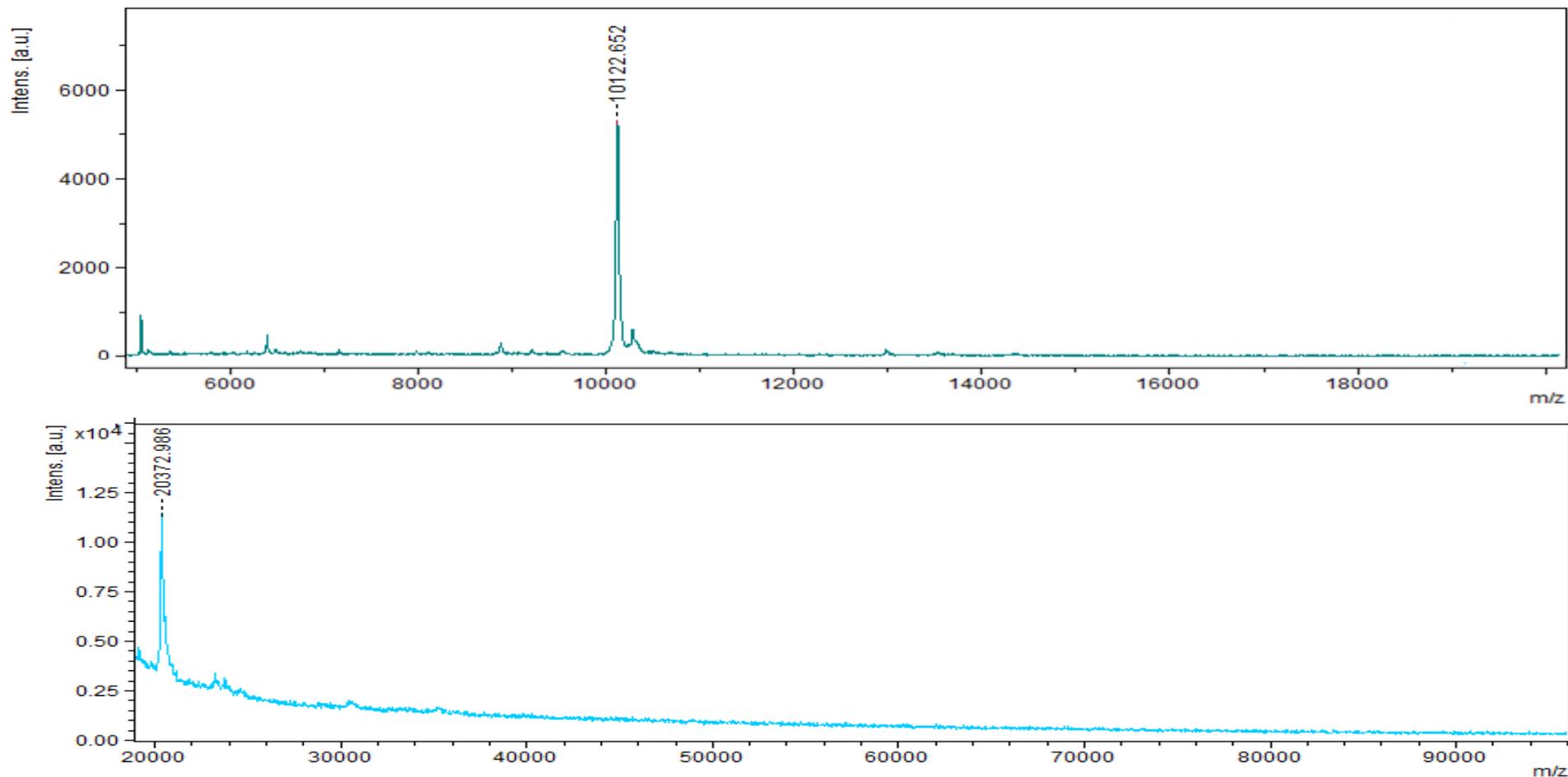


Figura 37

Espectro de massas em matrizes ácido sinapínico e super DHB, respectivamente, da fração 33: massas moleculares de 10.122,652 e 20.372,986 Da [origem: cromatografia de fase reversa SupelcosilTM - *pool* FR2 (frações 27 e 29 da cromatografia de fase reversa Poros[®]) - *pool* GF1 (frações 2 a 4 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

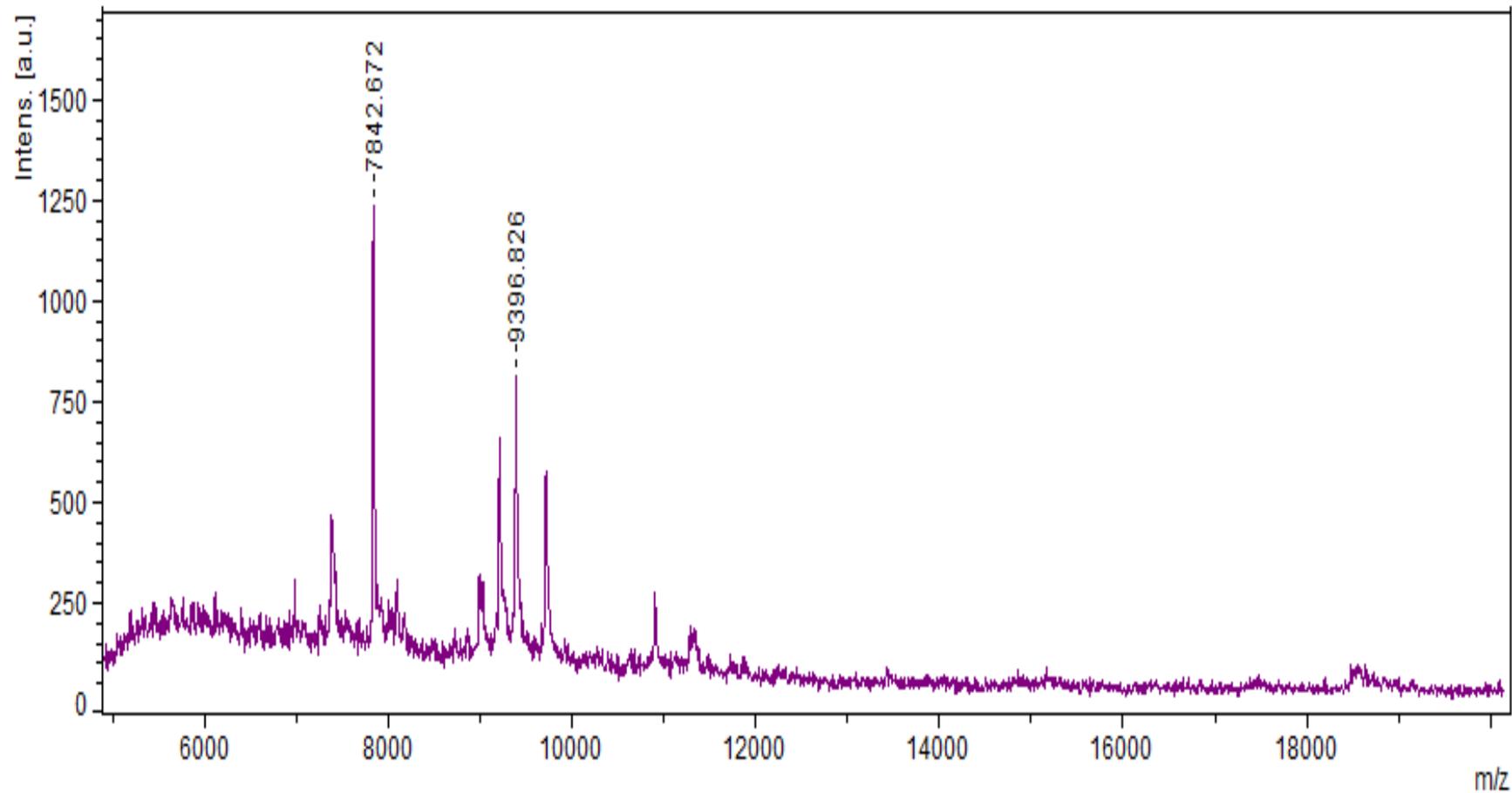


Figura 38

Espectro de massas em matriz ácido sinápico da fração 37: massas moleculares 7.842,672 e 9.396,826 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - fração 26 da cromatografia de fase reversa Poros® - *pool* GF2 (frações 5 e 6 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

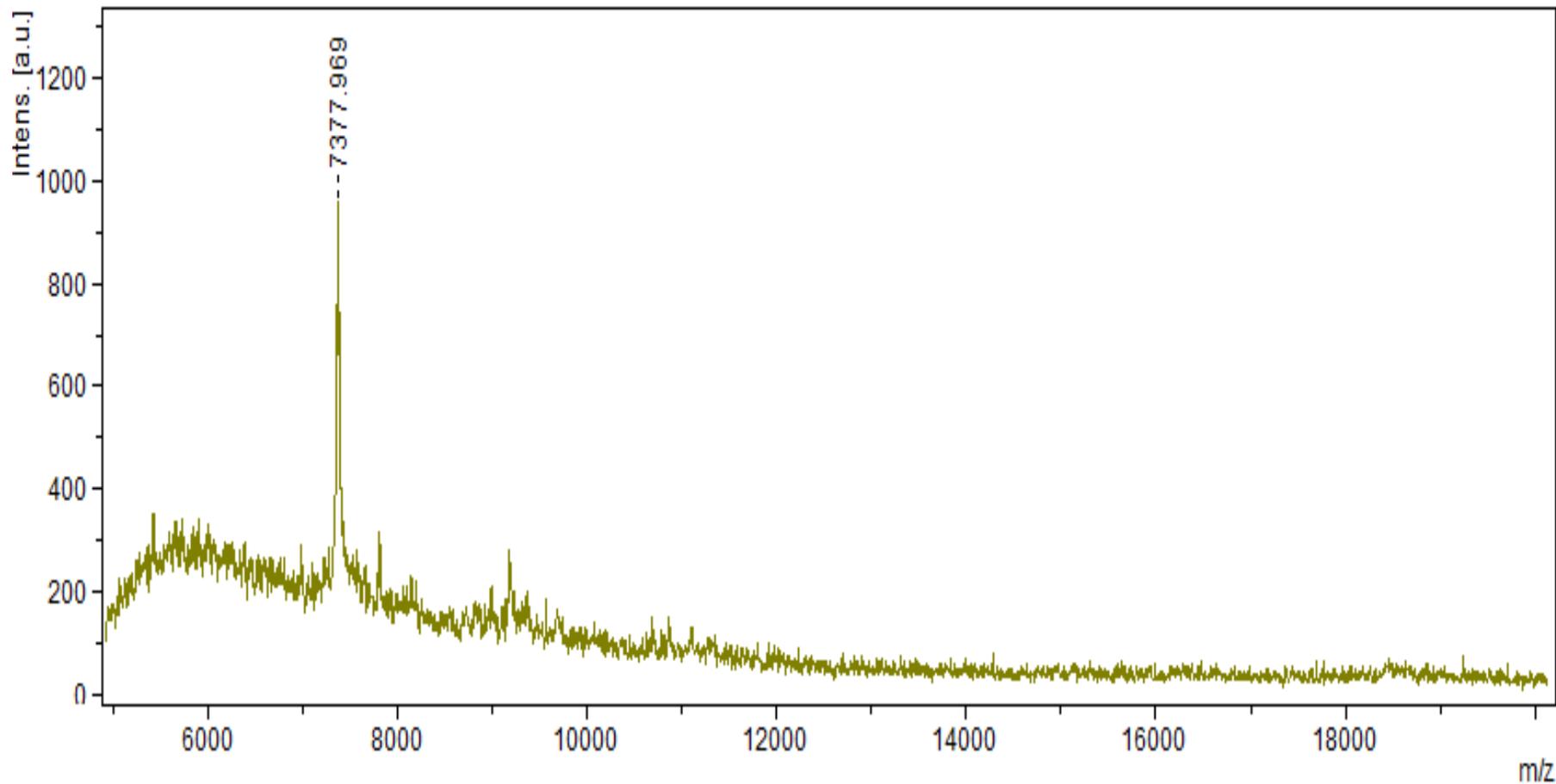


Figura 39

Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 38: massa molecular 7.377,969 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - fração 28 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool*/GF2 (frações 5 e 6 da cromatografia de gel filtração) - *pool*/TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

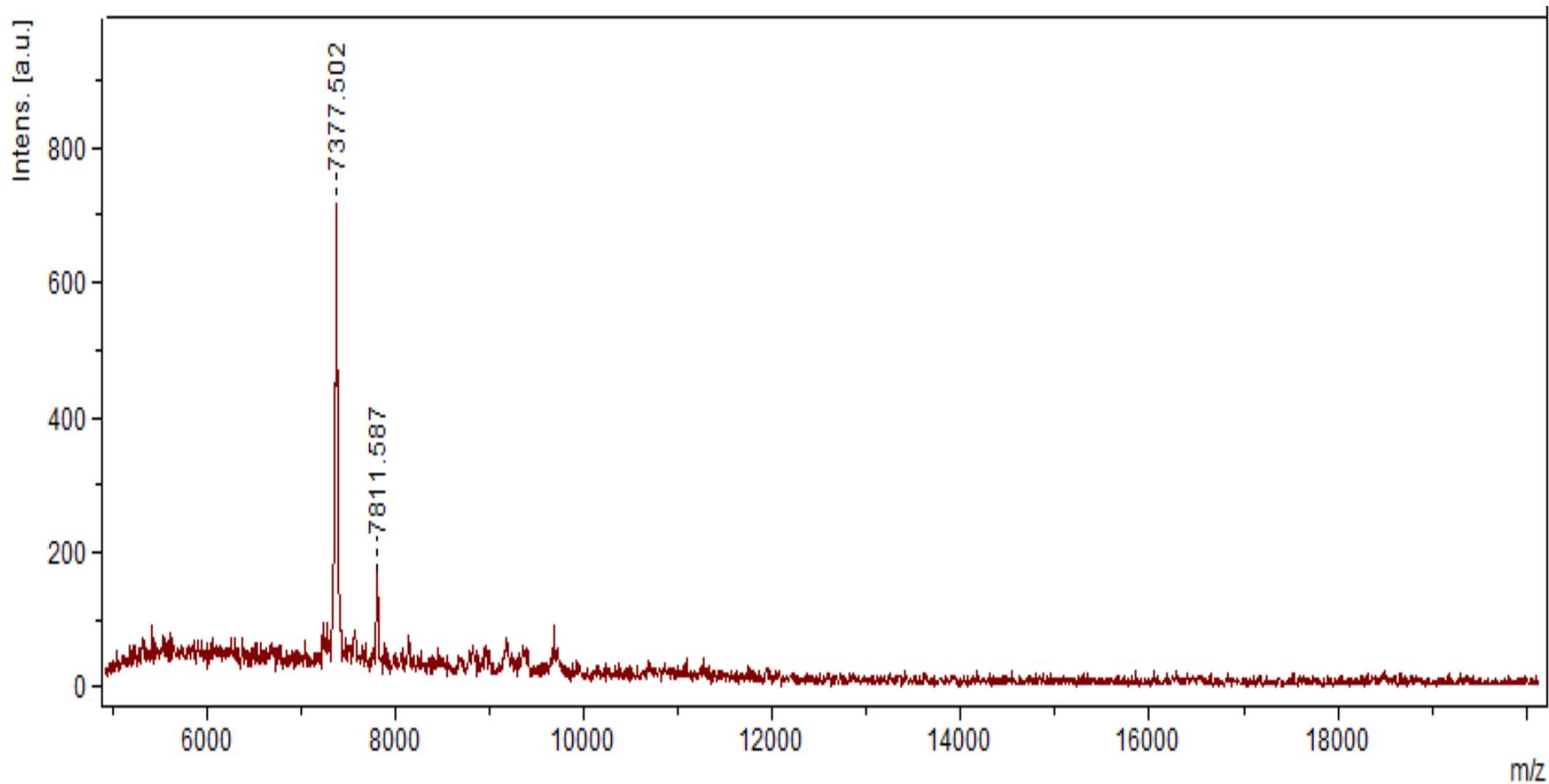


Figura 40

Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 38: massas moleculares 7.377,502 e 7.811,587 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - *pool*/FR3 (frações 29 e 30 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool*/GF2 (frações 5 e 6 da cromatografia de gel filtração - *pool*/TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

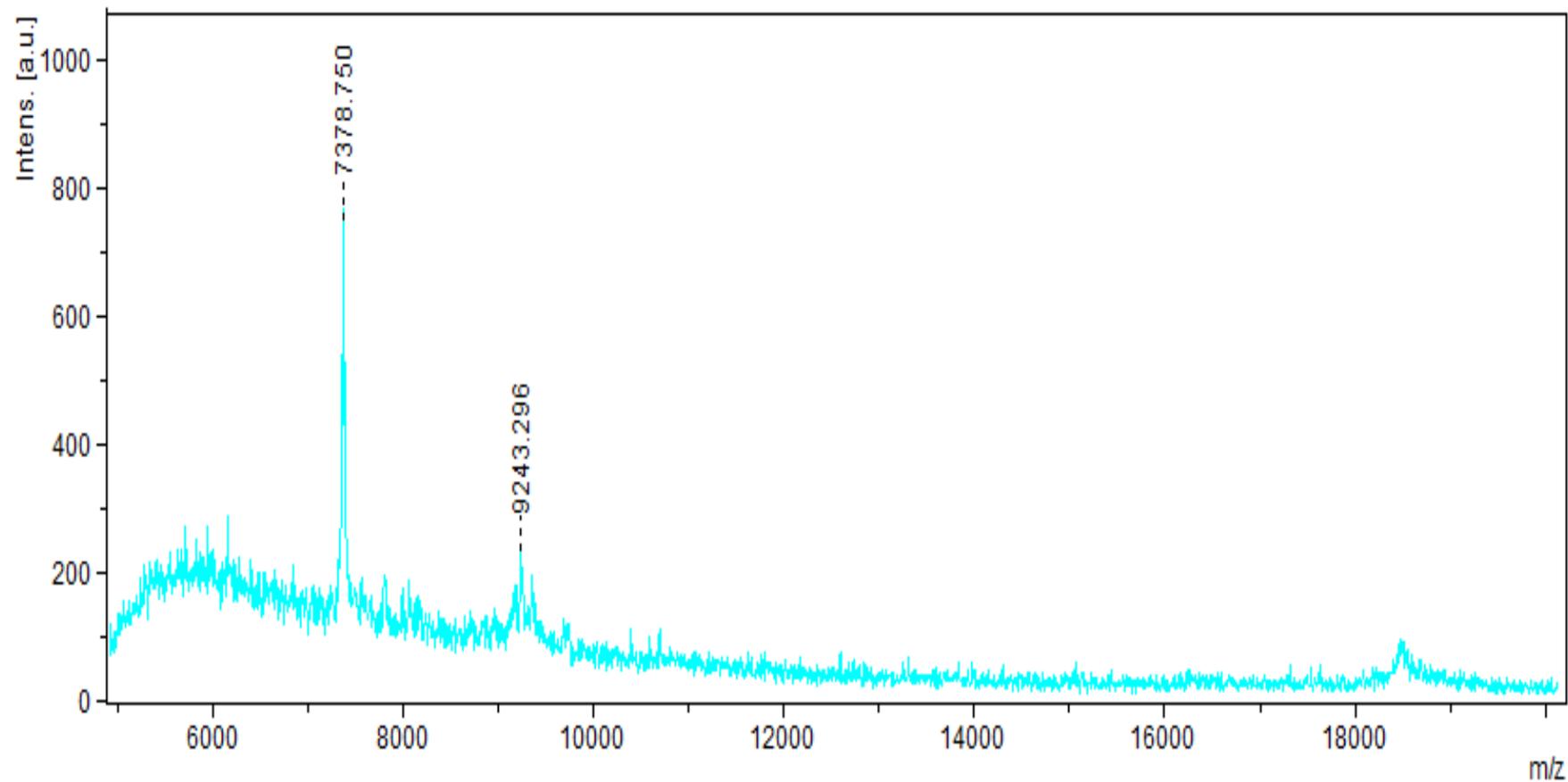


Figura 41

Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 39: massas moleculares 7.378,750 e 9.243,296 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - *pool* FR3 (frações 29 e 30 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool* GF2 (frações 5 e 6 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

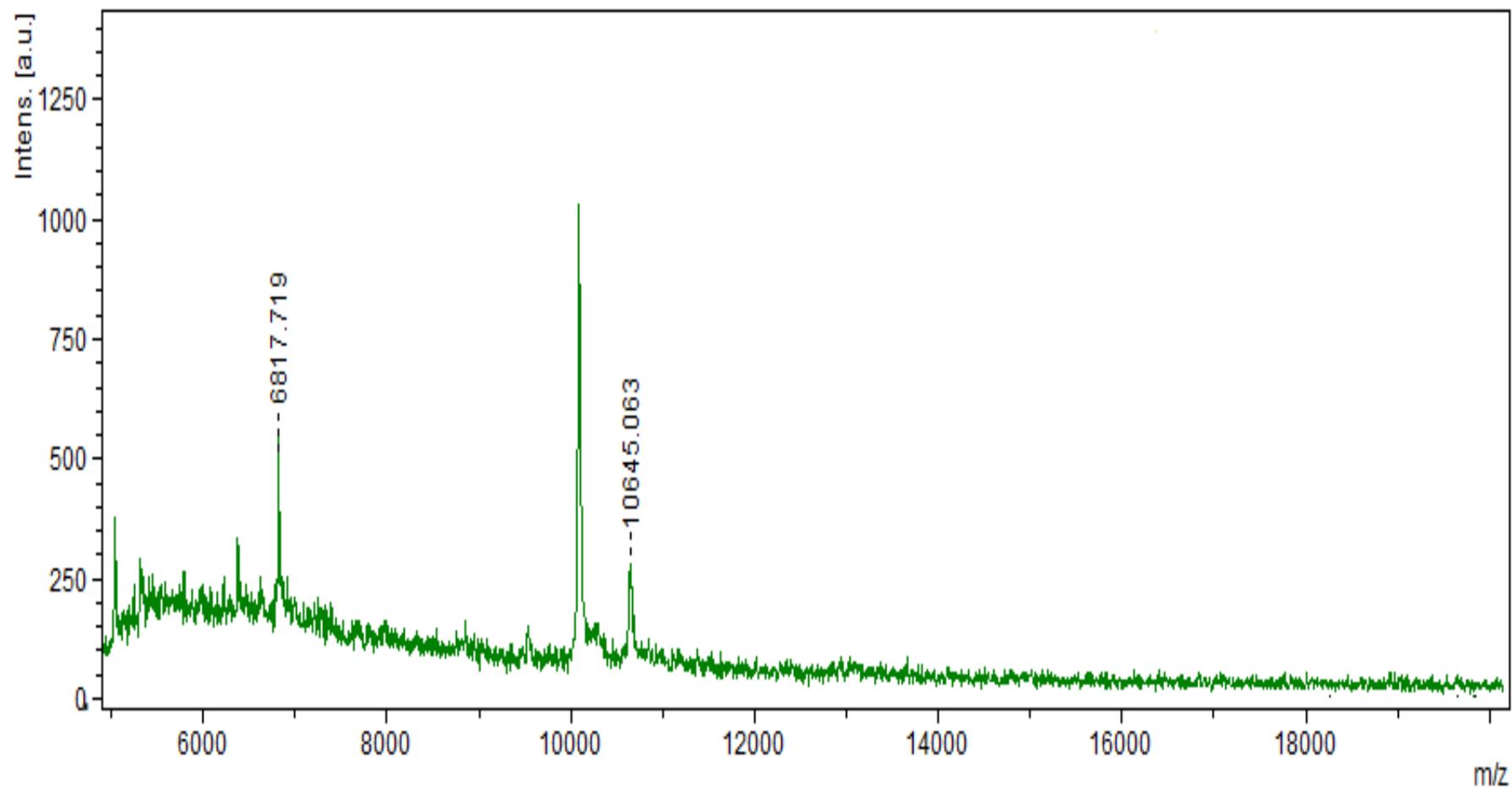


Figura 42

Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 33: massas moleculares 6.817,719 e 10.645,063 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - *pool* FR4 (frações 31 a 33 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool* GF2 (frações 5 e 6 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

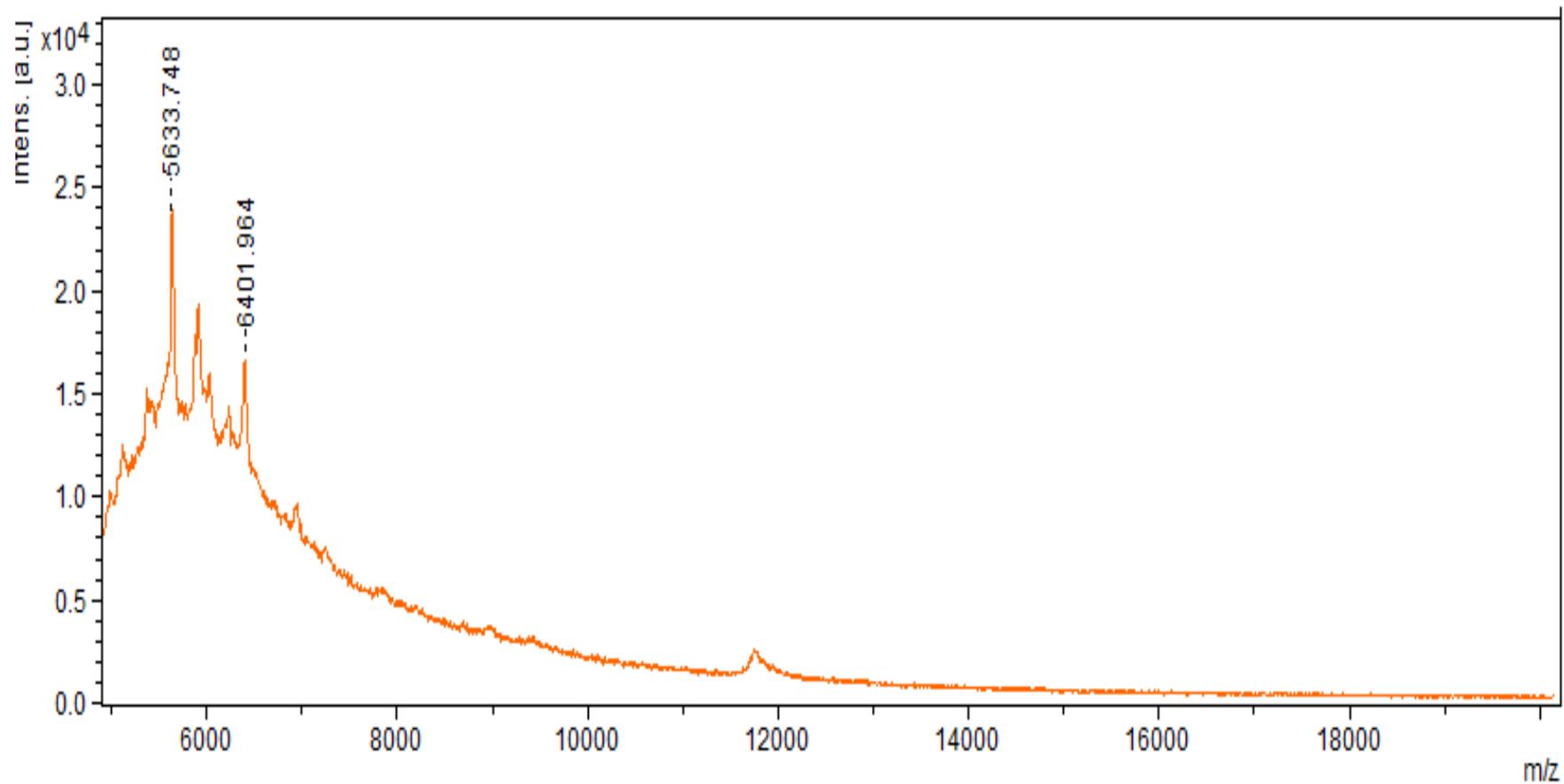


Figura 43

Espectro de massas em matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico da fração 30: massas moleculares 5.633,748 e 6.401,964 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™- fração 26 da cromatografia de fase reversa Poros® -pool GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - pool TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

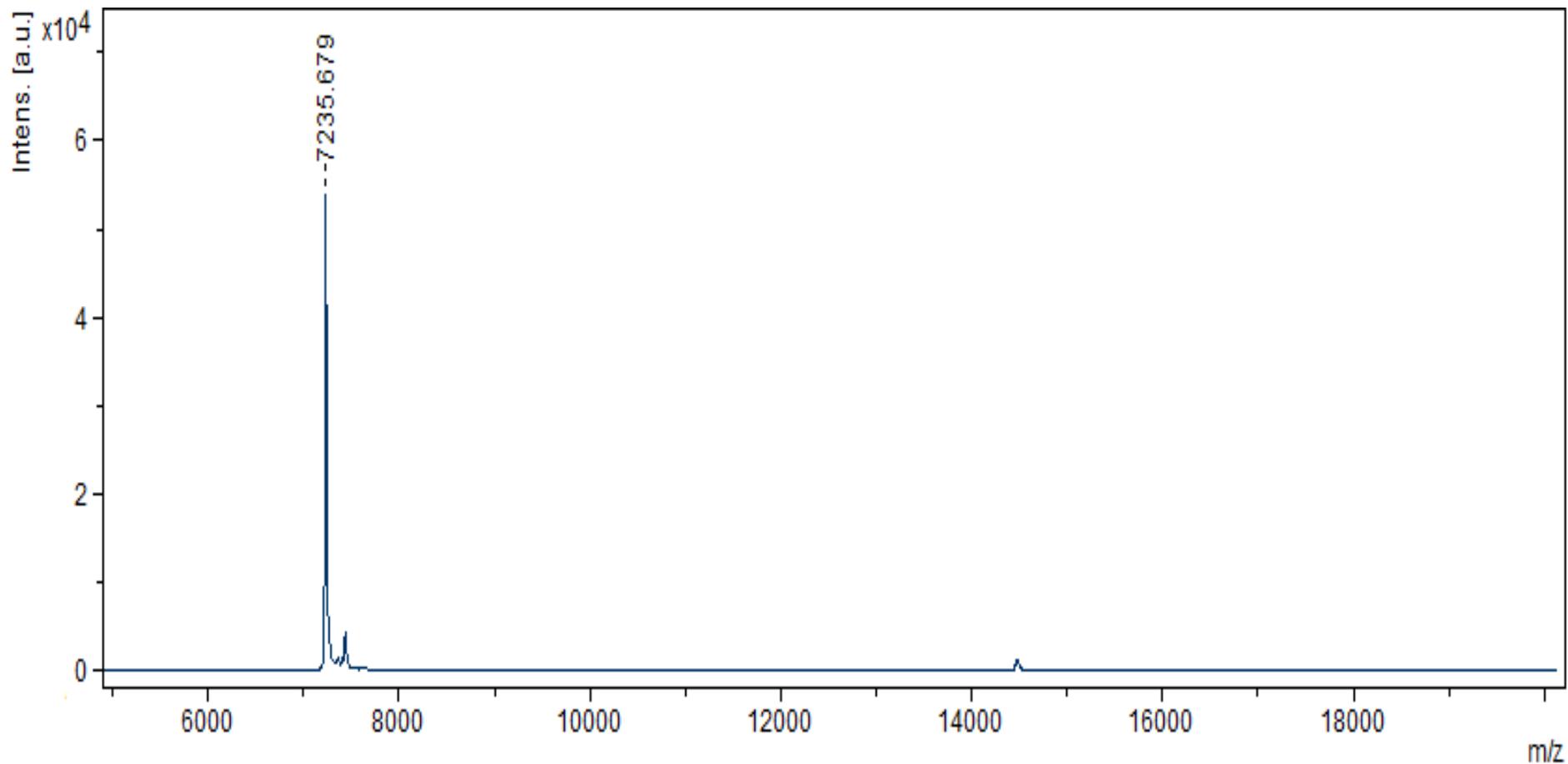


Figura 44

Espectro de massas em matriz ácido sinápínicoda fração 31: massa molecular7.235,679 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™- fração 26 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool*/GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração) - *pool*/TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

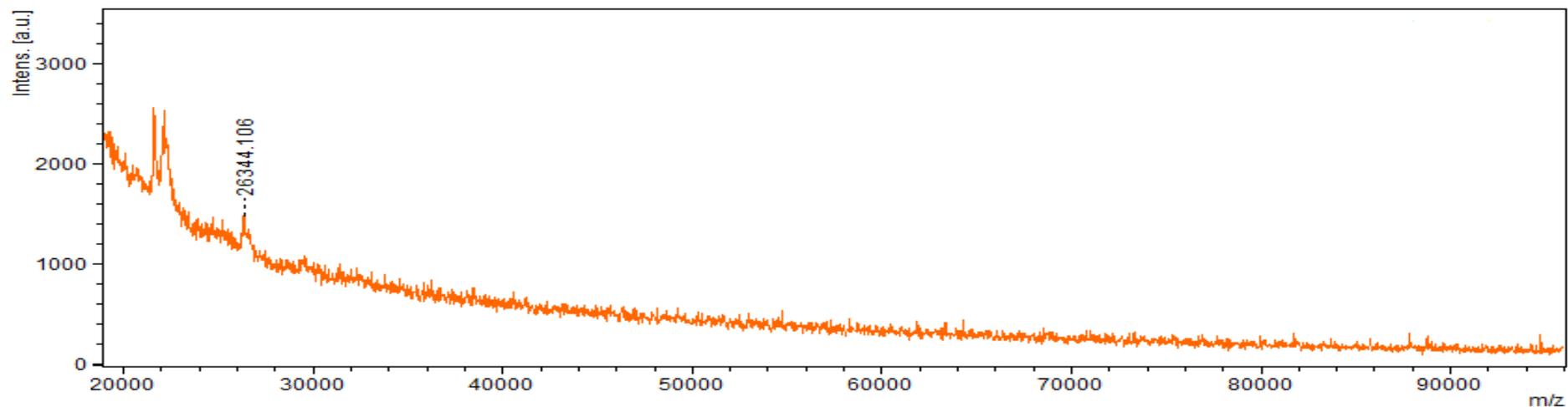
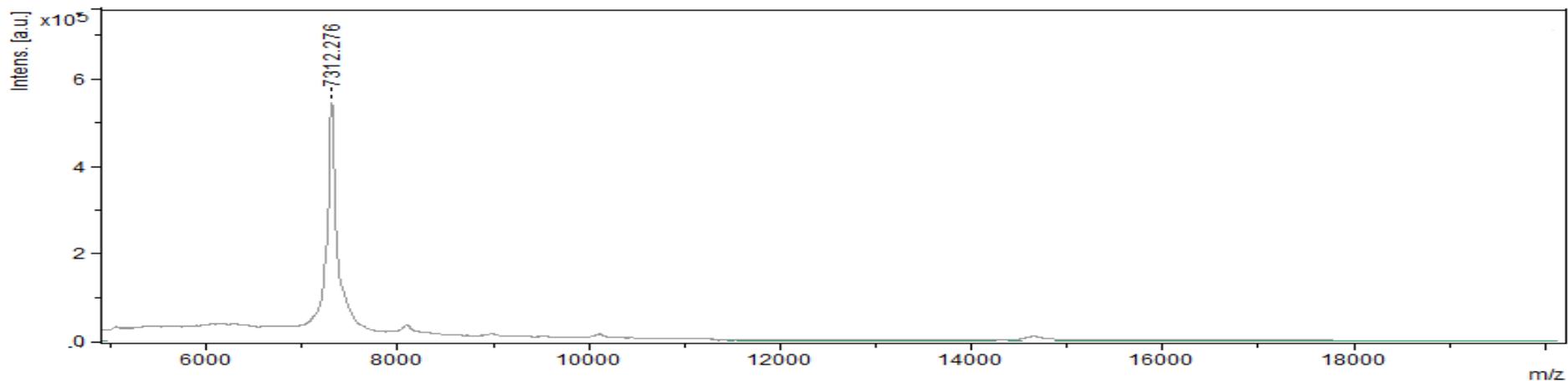


Figura 45

Espectro de massas em matrizes ácido sinapínico e super DHB, respectivamente, da fração 32: massas moleculares 7.312,276 e 26.344,106 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™- fração 27 da cromatografia de fase reversa Poros® -pool GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - pool TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

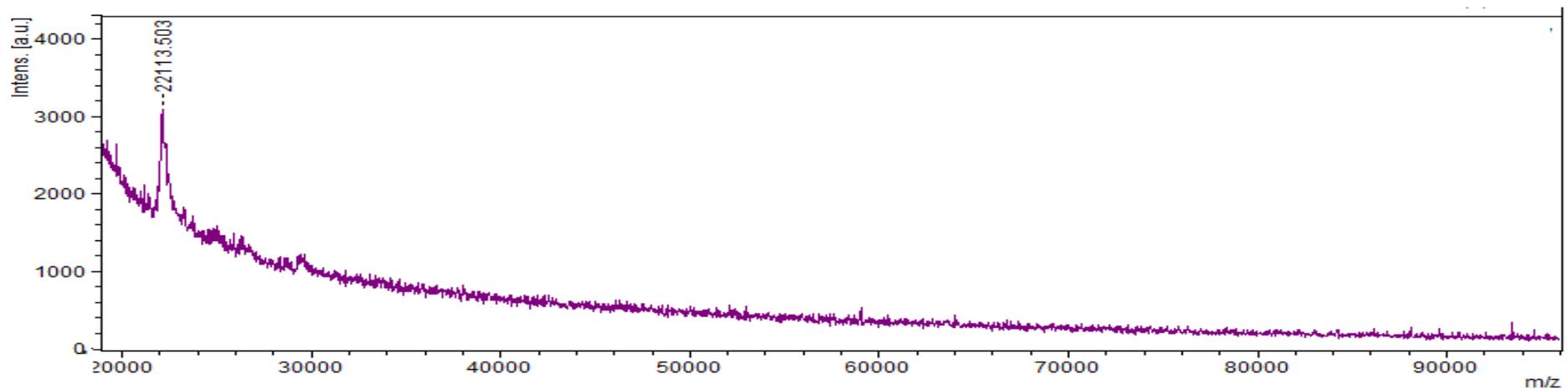
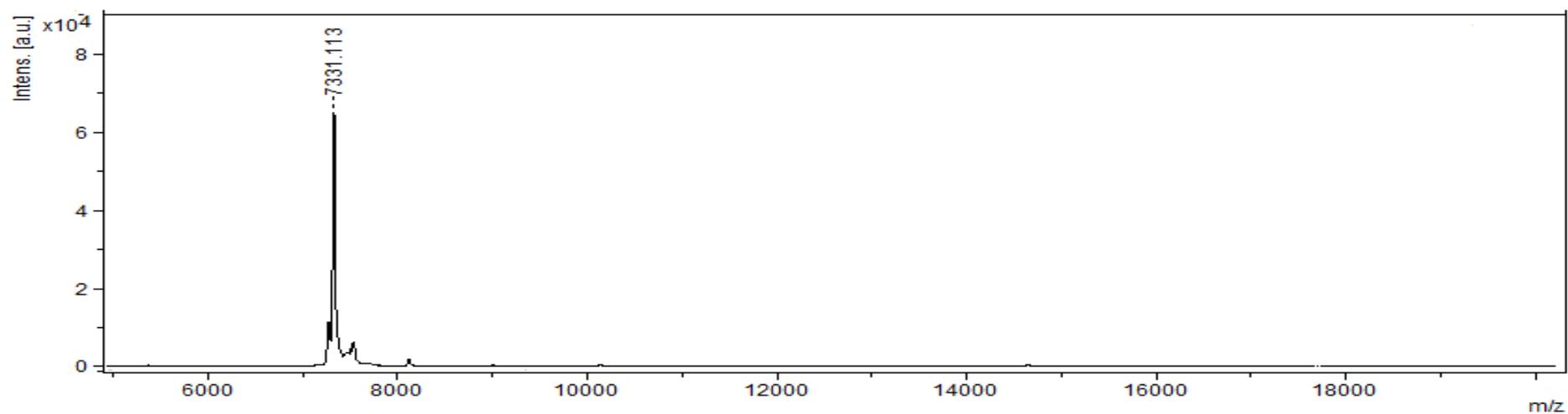


Figura 46

Espectro de massas em matriz ácido sinapínica fração 32: massas moleculares 7.331,113 e 22.113,503 Da [origem: cromatografia de fase reversa SupelcosilTM- fração 28 da cromatografia de fase reversa Poros[®] - *pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

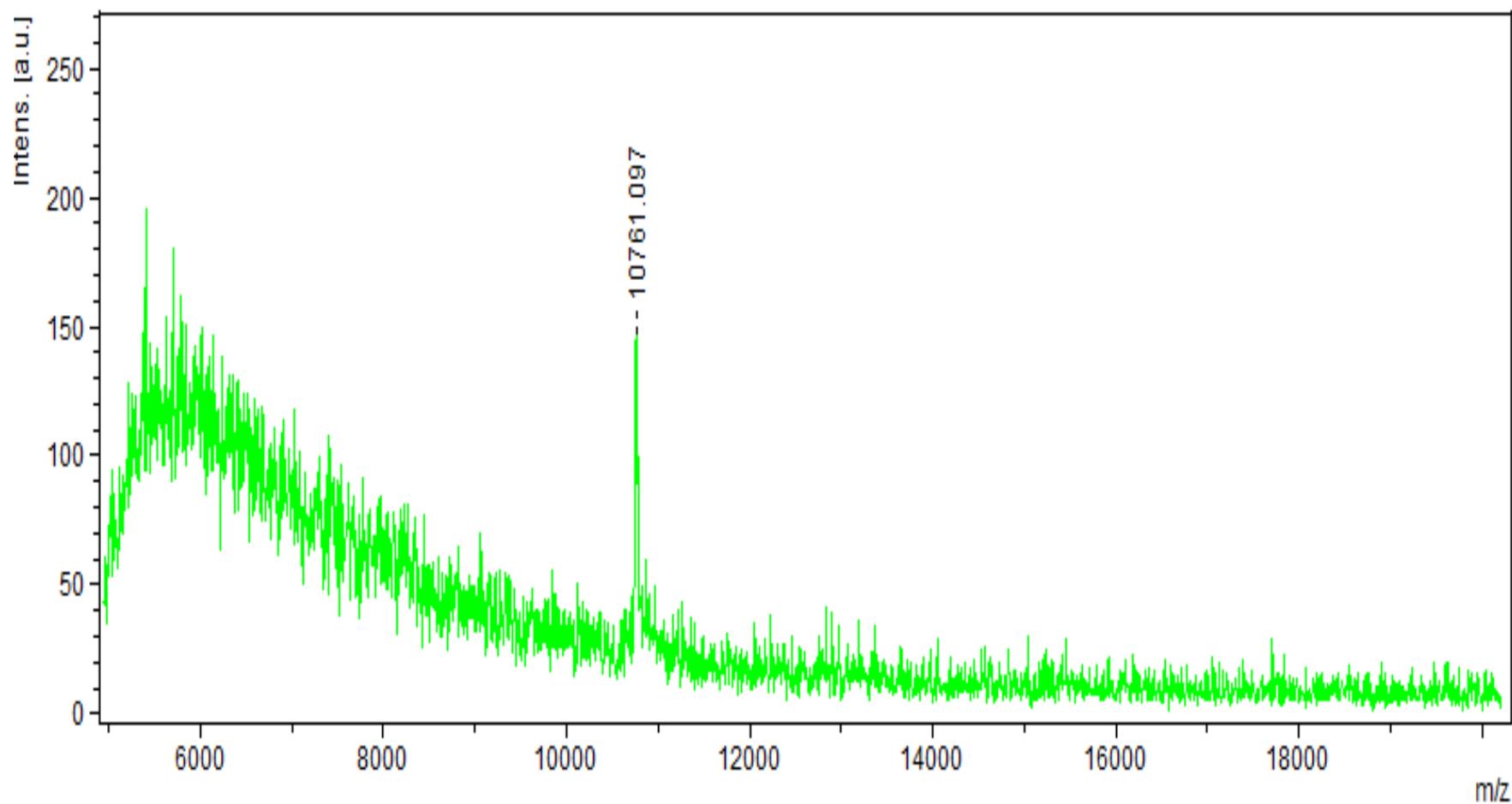


Figura 47

Espectro de massas em matriz ácido sinapínica fração 39: massa molecular 10.761,097 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™- fração 28 da cromatografia de fase reversa Poros® -pool GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - pool TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

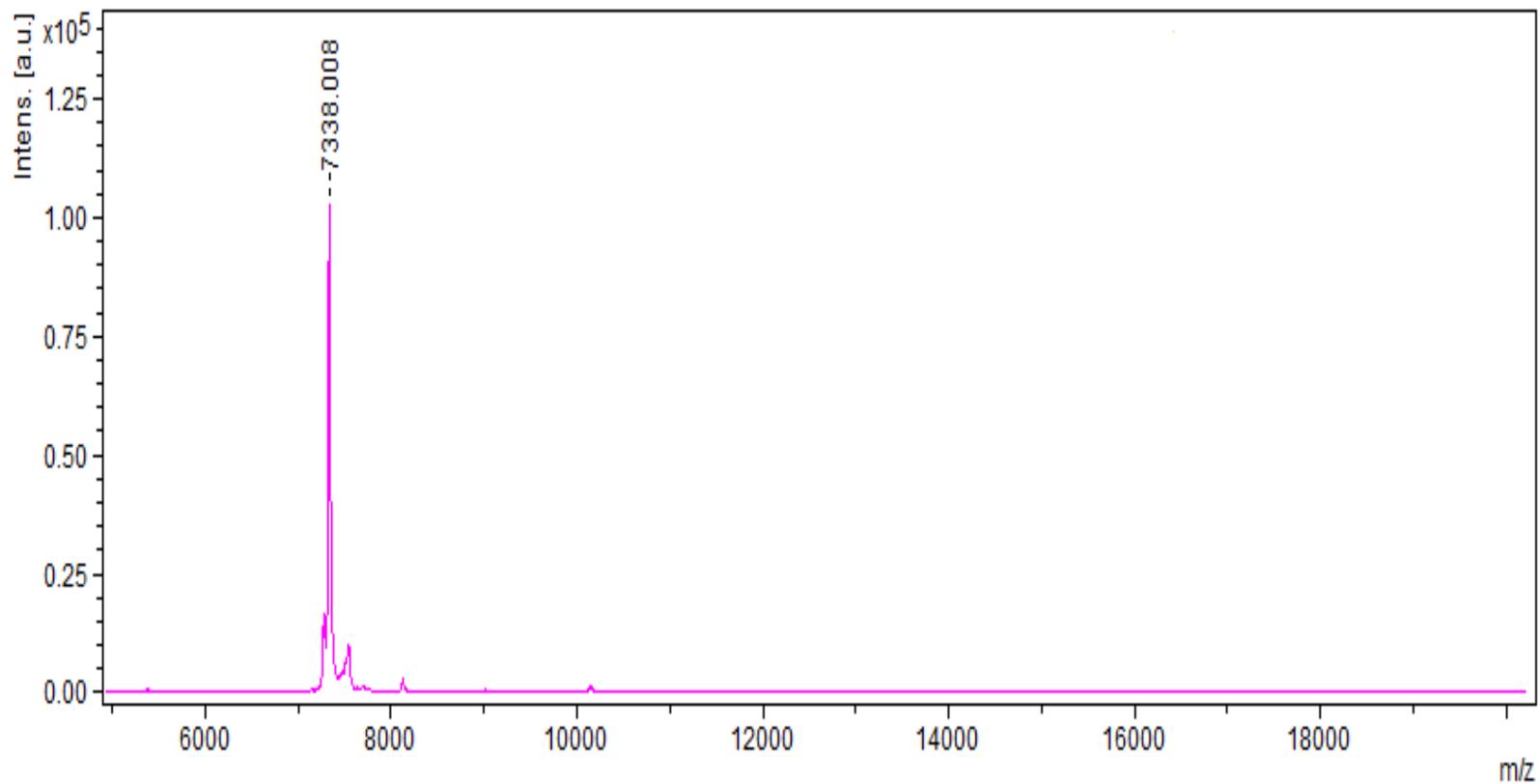


Figura 48

Espectro de massas em matriz ácido sinapínica fração 32: massa molecular 7.338,008 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™-*pool*/FR5 (frações 29 e 30 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool*/GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - *pool*/TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

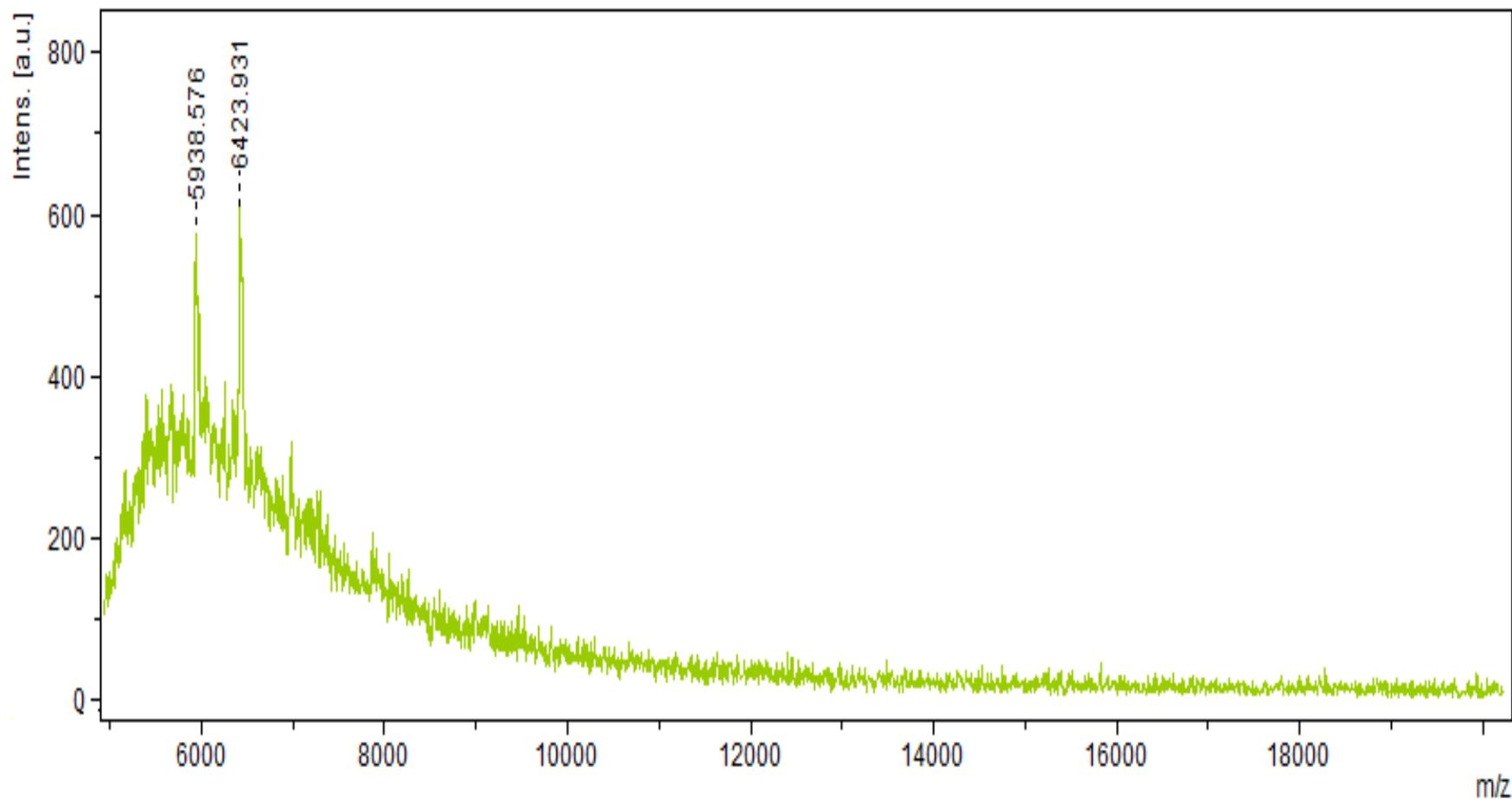


Figura 49

Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 30: massas moleculares 5.938,576 e 6.423,931 Da [origem: cromatografia de fase reversa SupelcosilTM - *pool* FR6 (frações 31 e 32 da cromatografia de fase reversa Poros[®]) - *pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

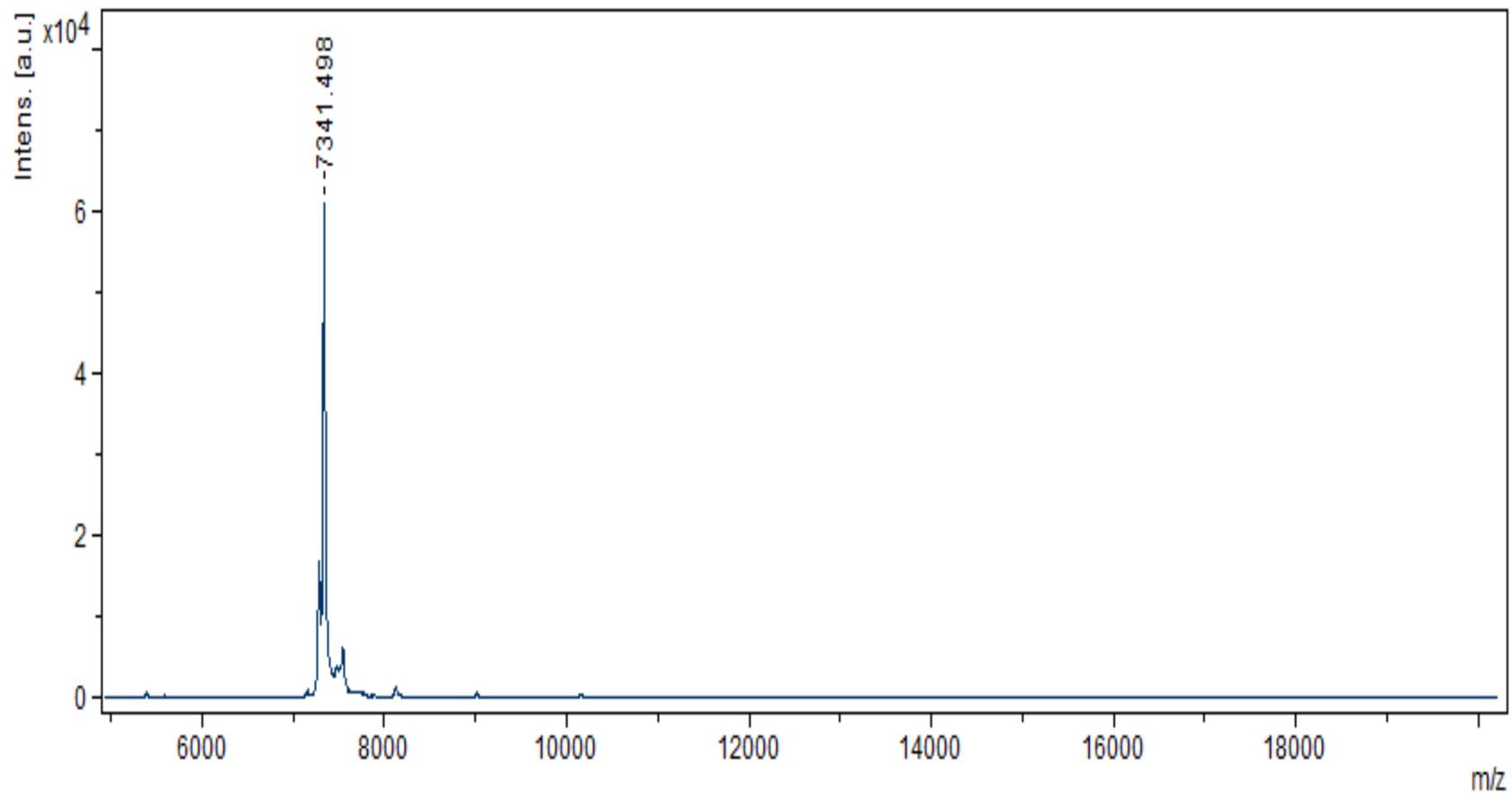


Figura 50

Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 32: massa molecular 7.341,498 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - *pool* FR6 (frações 31 e 32 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

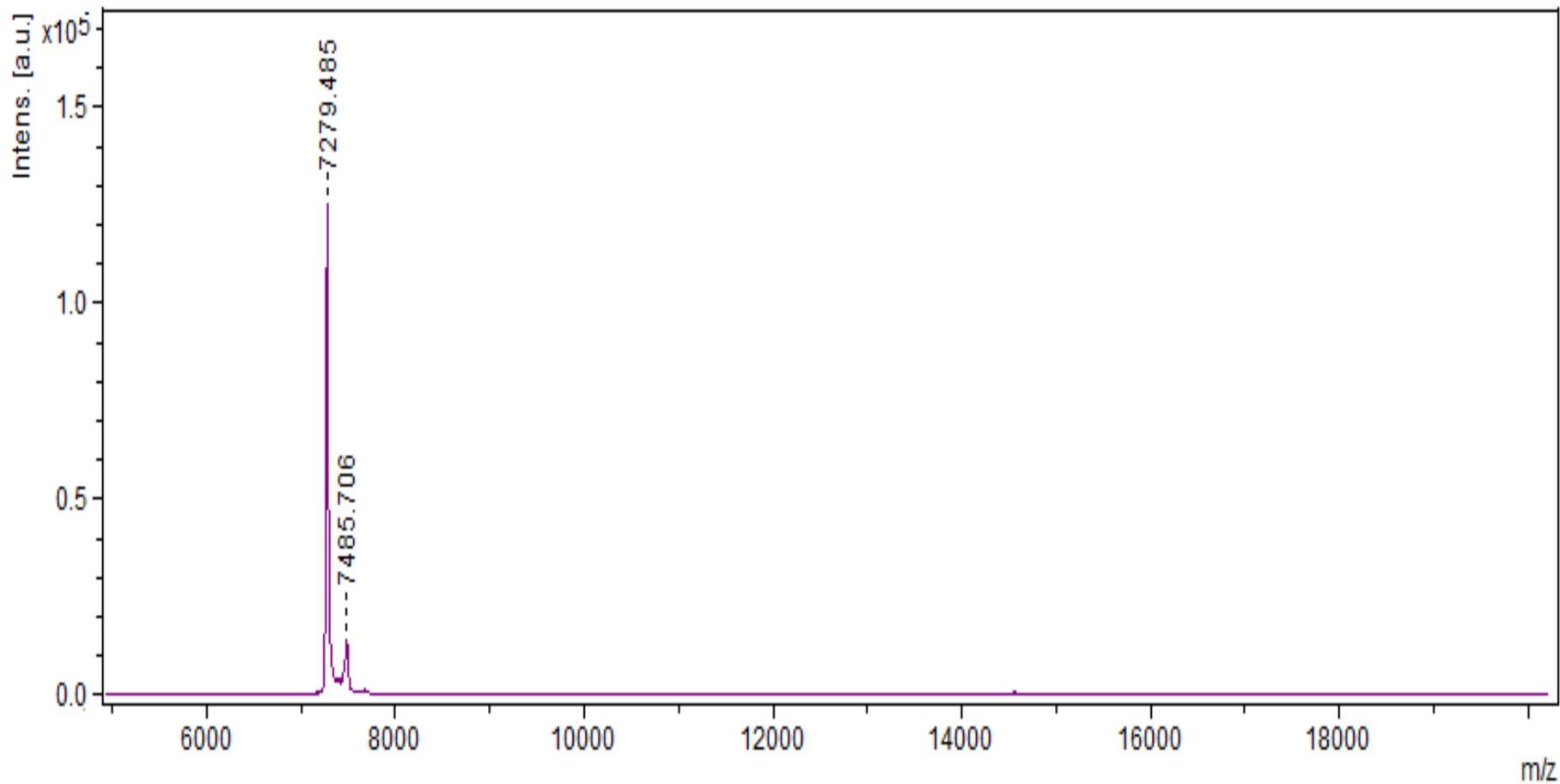


Figura 51

Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 31: massas moleculares de 7.279,485 e 7.485,706Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - *pool* FR7 (frações 33 a 36 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

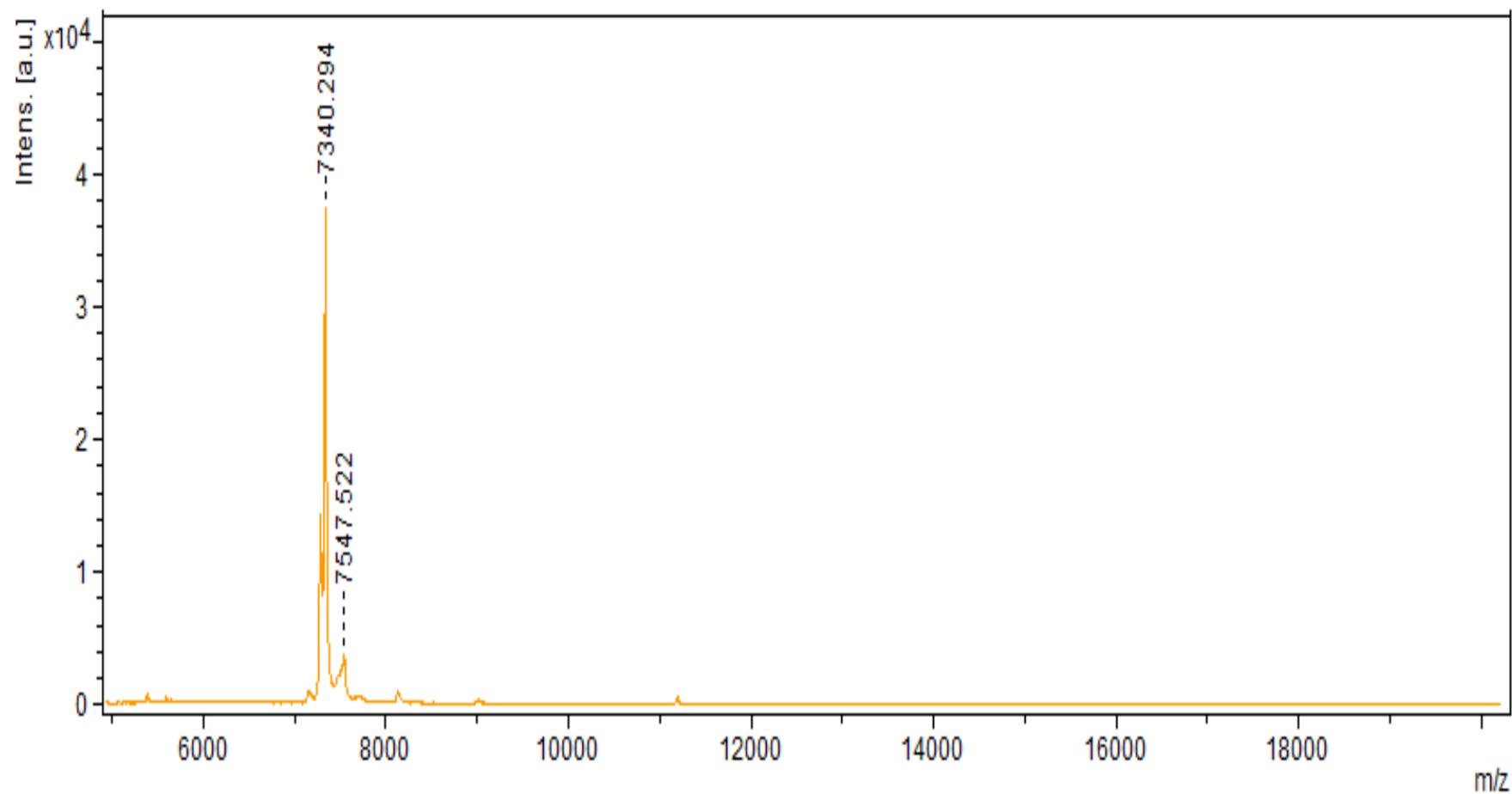


Figura 52

Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 32: massas moleculares de 7.340,294 e 7.547,522Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - *pool* FR7 (frações 33 a 36 da cromatografia de fase reversa Poros®) - *pool* GF3 (frações 7 a 9 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

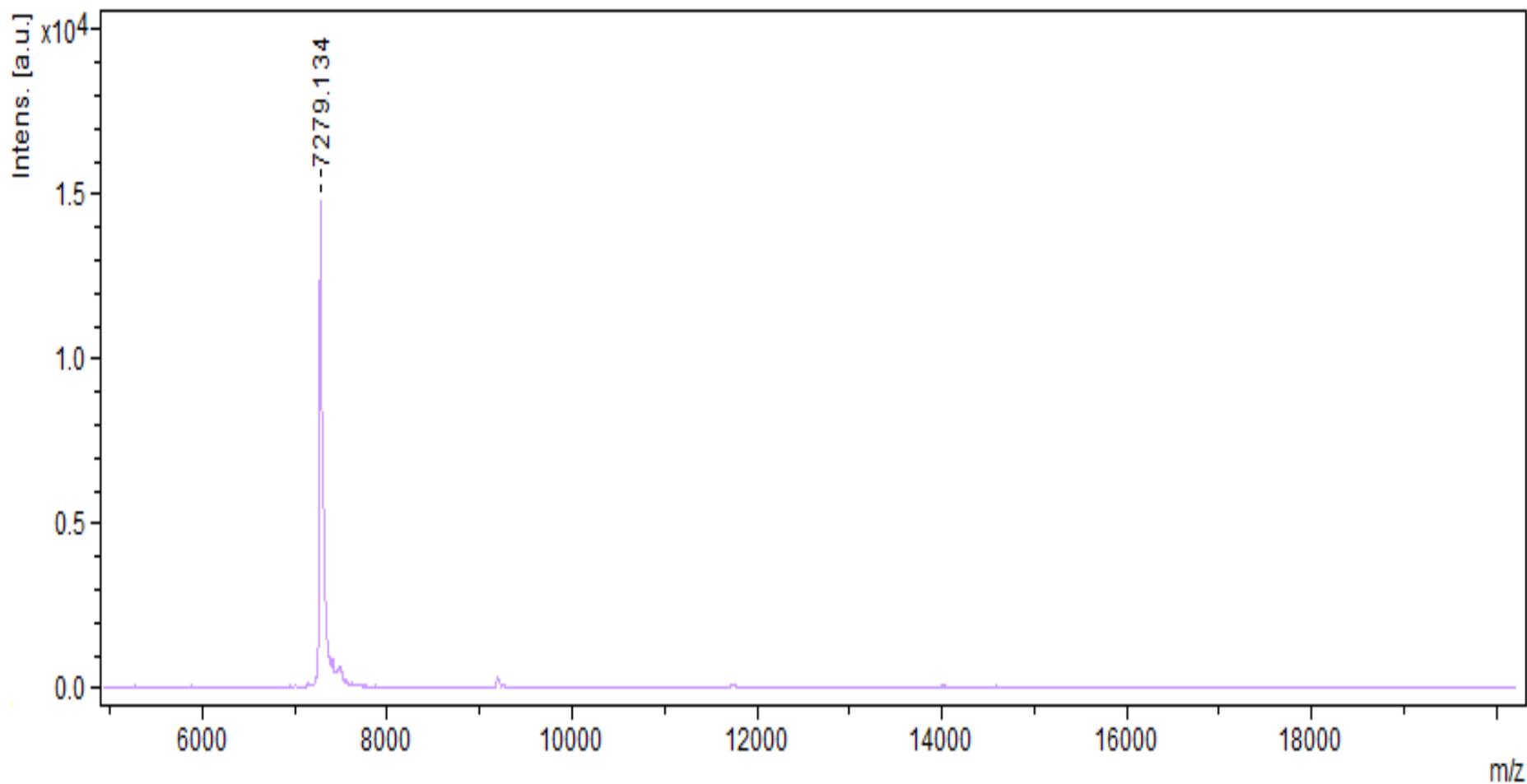


Figura 53

Espectro de massas em matriz ácido sinápico da fração 34: massa molecular de 7.279,134 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - fração 26 da cromatografia de fase reversa Poros® - fração 10 da cromatografia de gel filtração - pool TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

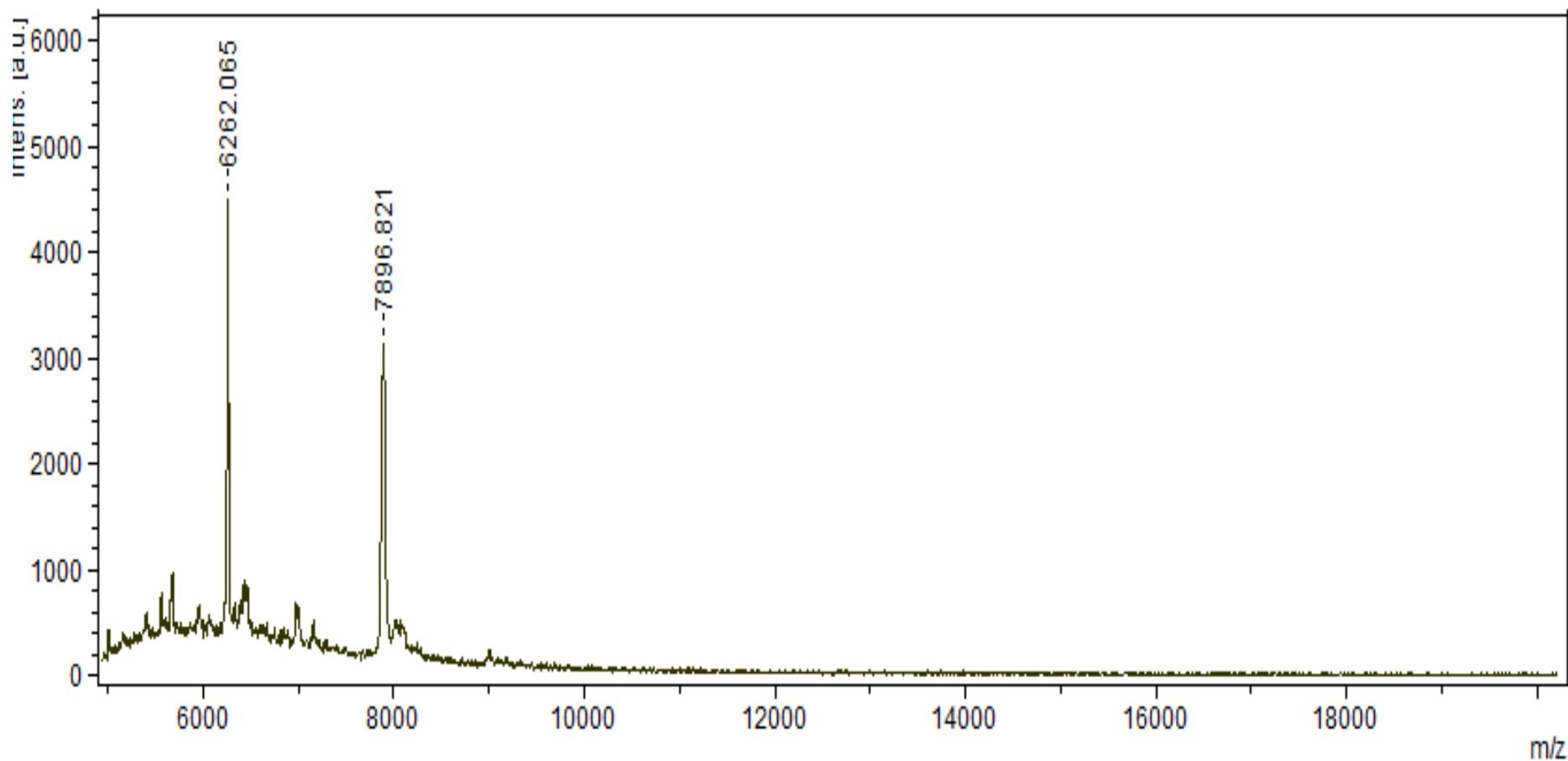


Figura 54

Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 30: massas moleculares de 6.262,065 e 7.896,821Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - fração27 da cromatografia de fase reversa Poros® - fração 10 da cromatografia de gel filtração - pool/ TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

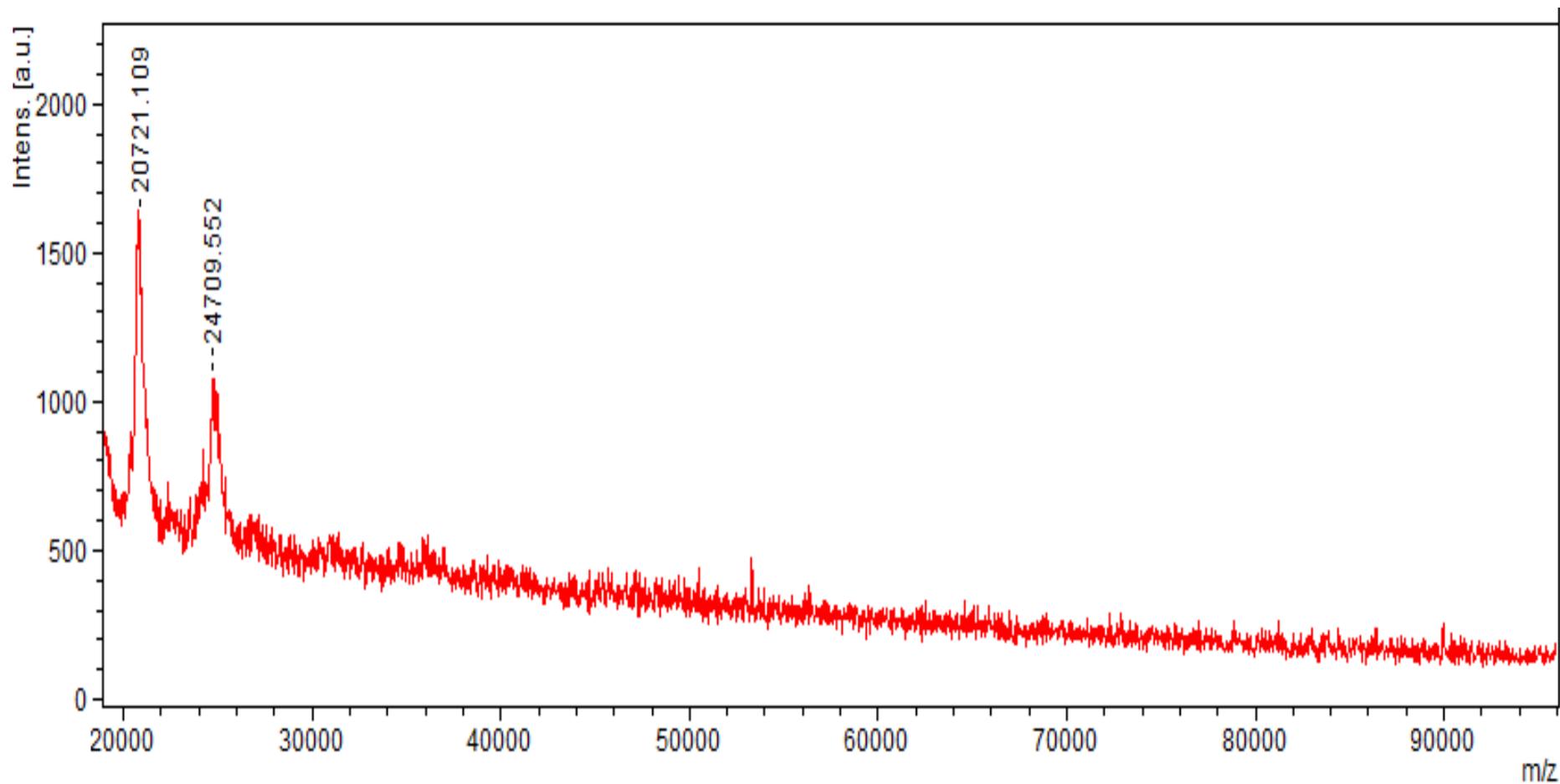


Figura 55

Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 35: massas moleculares de 20.721,109 e 24.709,552Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - fração27 da cromatografia de fase reversa Poros® - fração 10 da cromatografia de gel filtração - *pool*/ TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

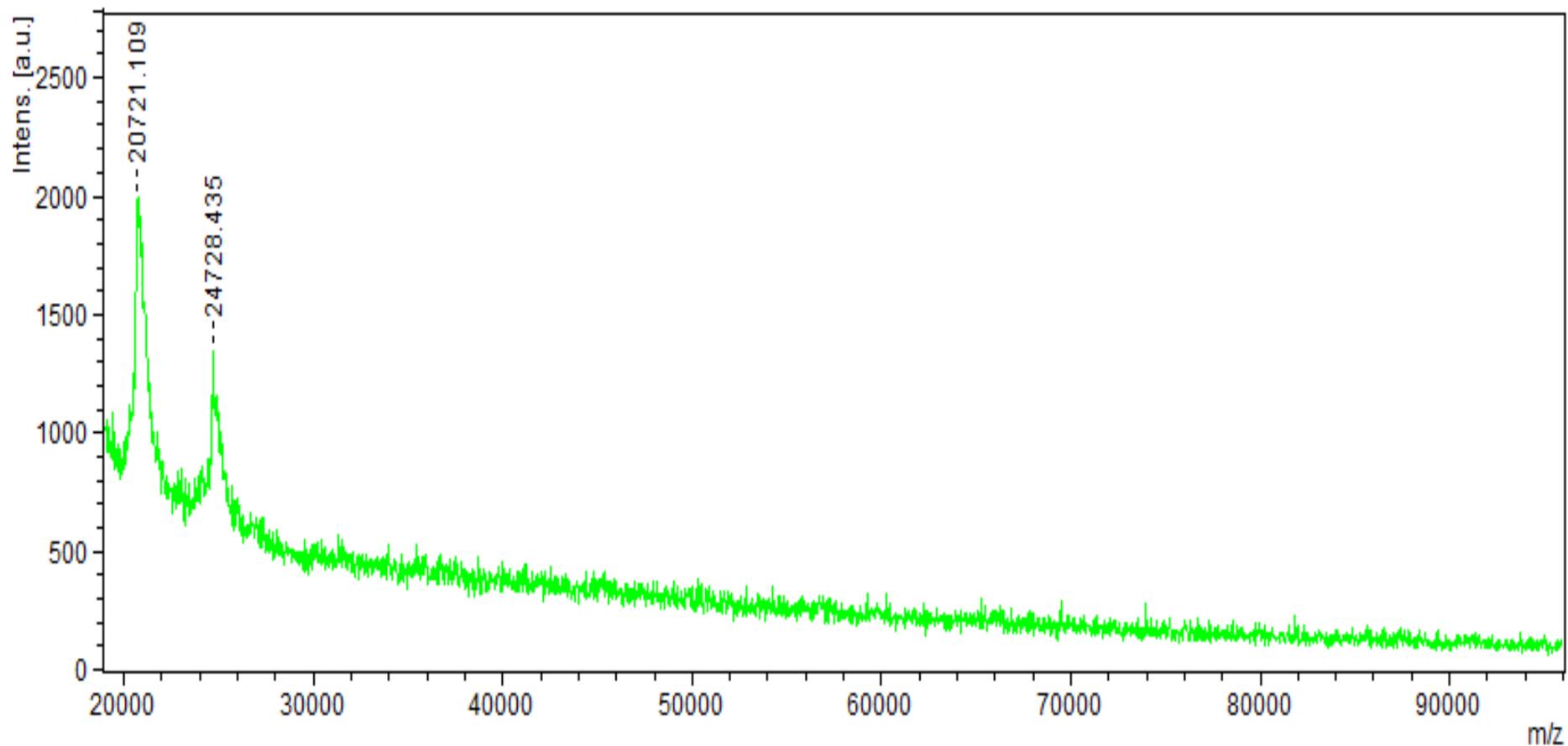


Figura 56

Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 36: massas moleculares de 20.721,109 e 24.728,435Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™ - fração27 da cromatografia de fase reversa Poros® - fração 10 da cromatografia de gel filtração - *pool*/ TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

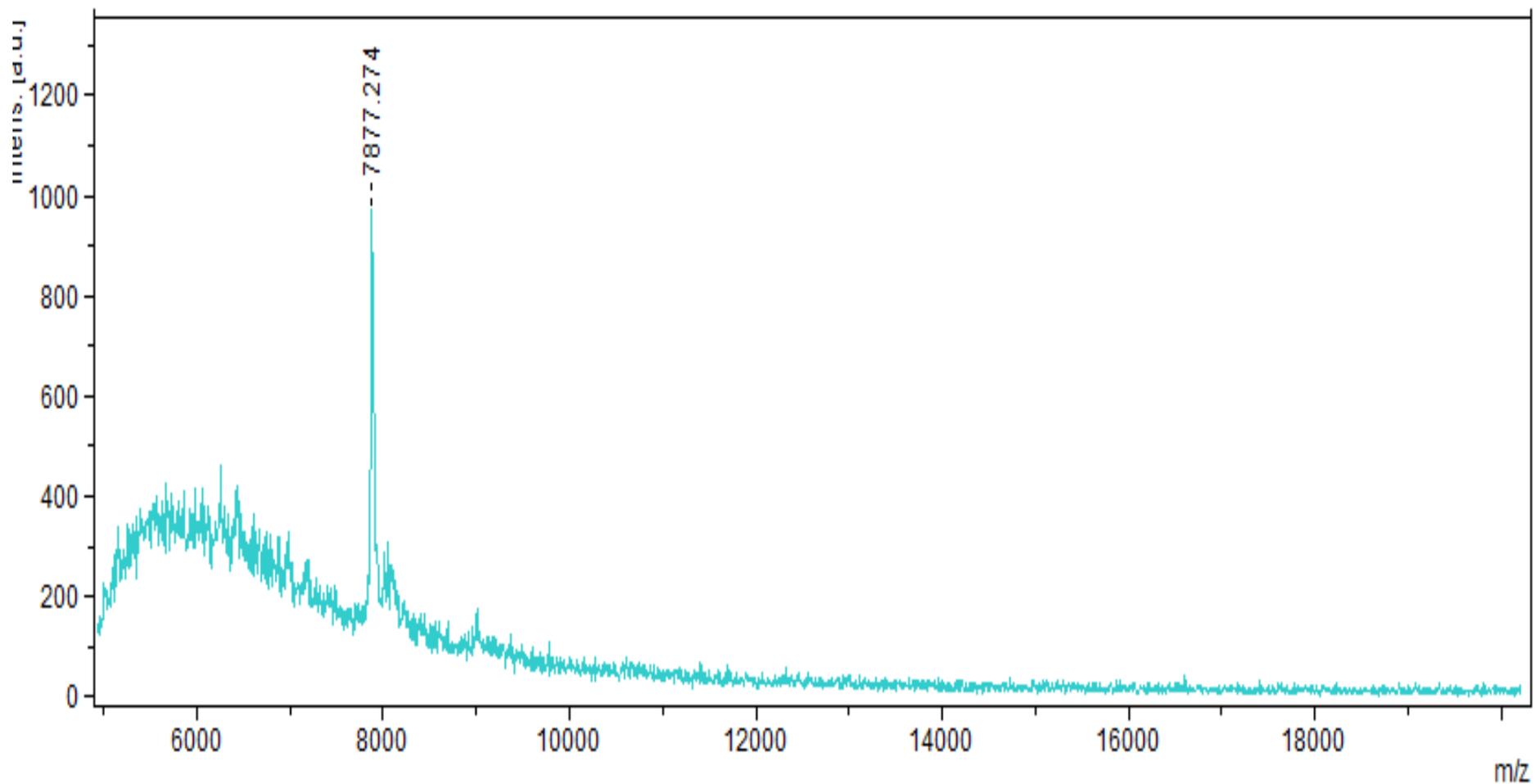


Figura 57

Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 30: massa molecular de 7.877,274 Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™-pool FR9 (frações 30 a 34 da cromatografia de fase reversa Poros®) - fração 10 da cromatografia de gel filtração - pool TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

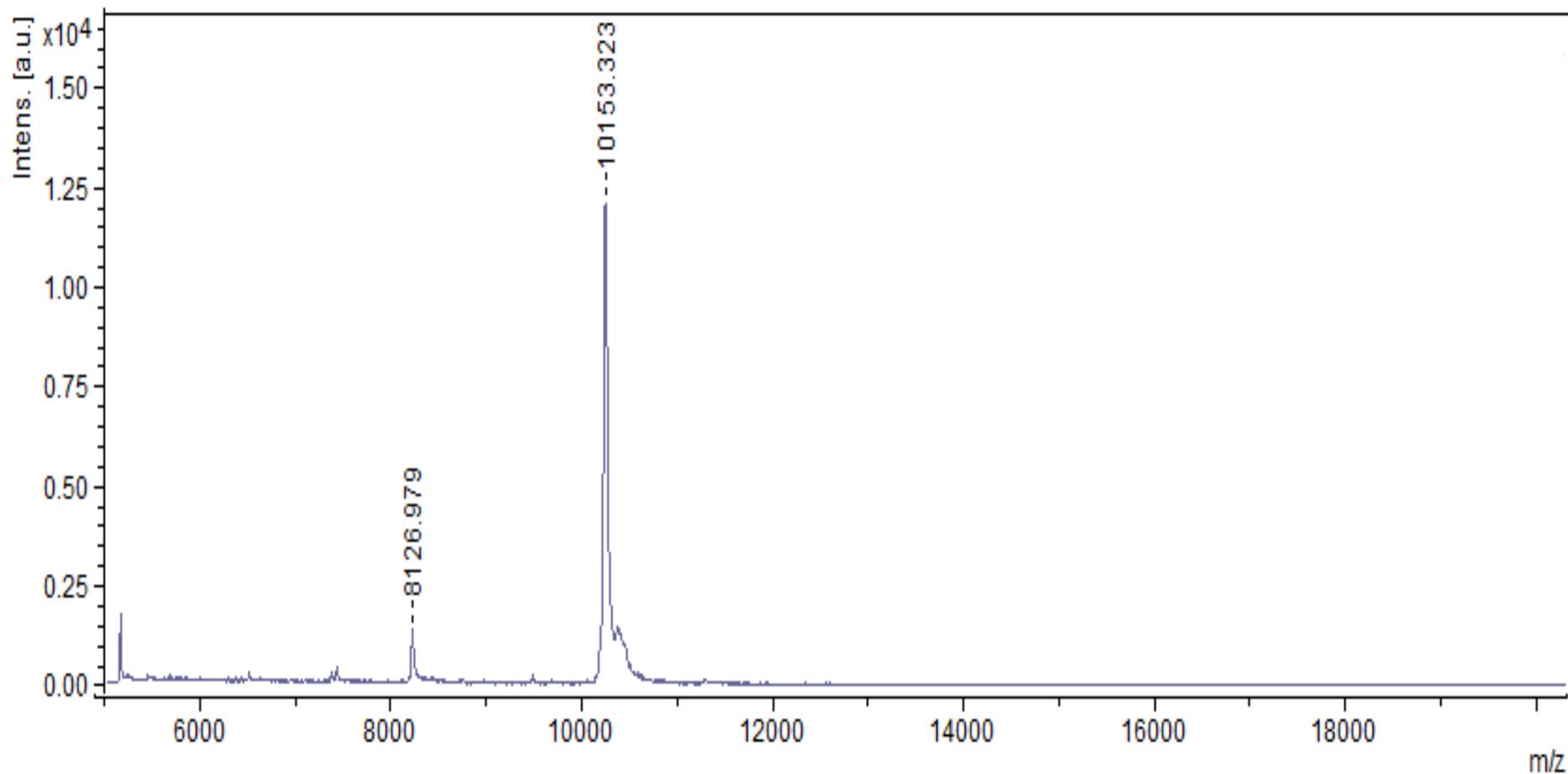


Figura 58

Espectro de massas em matriz ácido sinápico da fração 32: massas moleculares de 8.126,979 e 10.153,323Da [origem: cromatografia de fase reversa Supelcosil™-*pool*/FR9 (frações 30 a 34 da cromatografia de fase reversa Poros®) - fração 10 da cromatografia de gel filtração - *pool*/TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

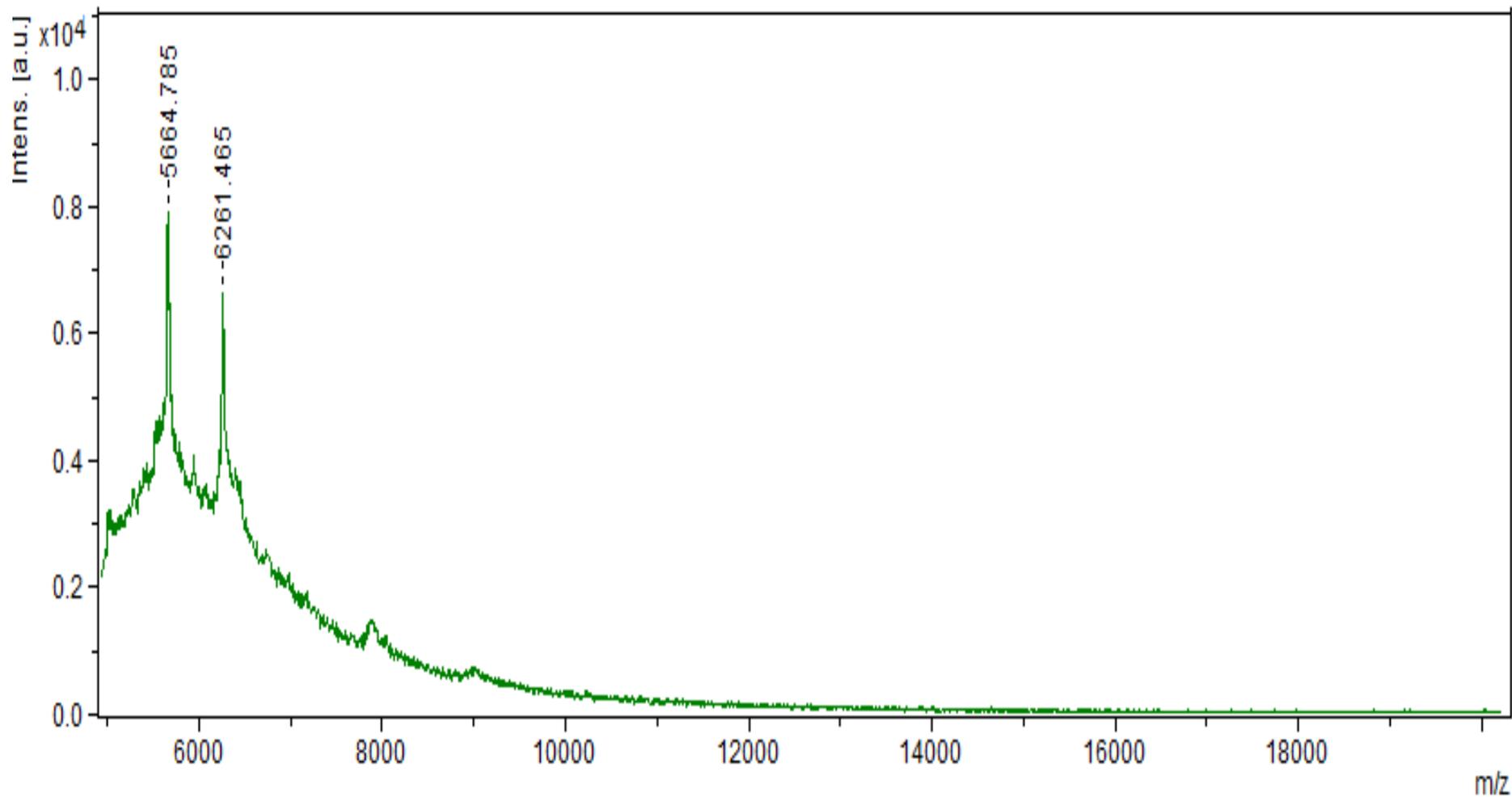


Figura 59

Espectro de massas em matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico da fração 30: massas moleculares de 5.664,785 e 6.261,465Da [origem: cromatografia de fase reversa SupelcosilTM- *pool* FR10 (frações 28 e 29 da cromatografia de fase reversa Poros[®]) - fração 11 da cromatografia de gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

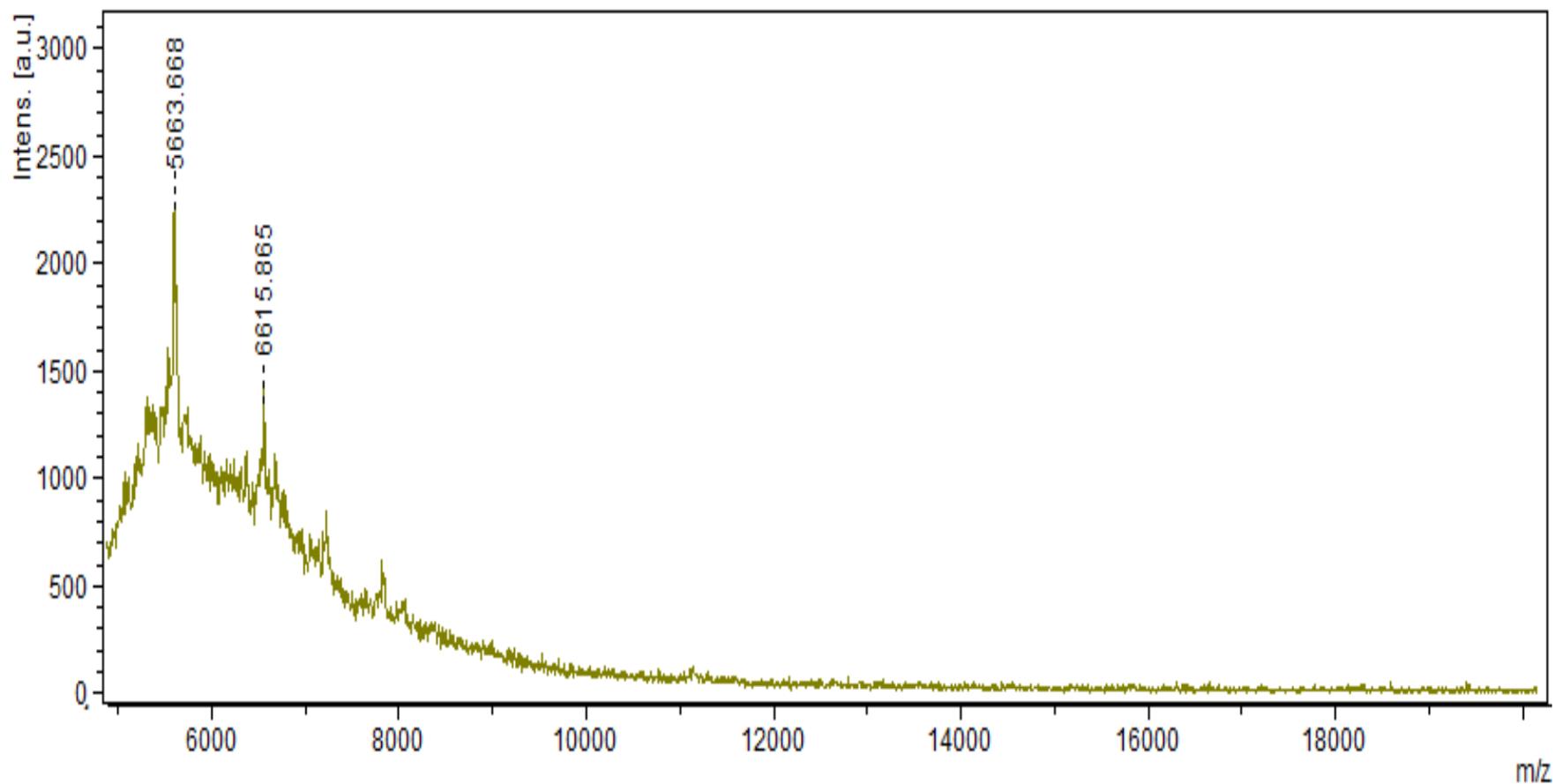


Figura 60

Espectro de massas em matriz α -ciano-4-hidroxicinâmica fração 31: massas moleculares de 5.663,668 e 6.615,865Da [origem: cromatografia de fase reversa SupelcosilTM- *pool*/FR10 (frações 28 e 29 da cromatografia de fase reversa Poros[®]) - fração 11 da cromatografia de gel filtração - *pool*/TI (frações 1 a 7 da cromatografia de troca iônica)].

9.3 ANEXO 3

**PERFIL CROMATOGRÁFICO E ESPECTROS DE MASSAS DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DA
RECROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA EM COLUNA SUPELCOSIL™**

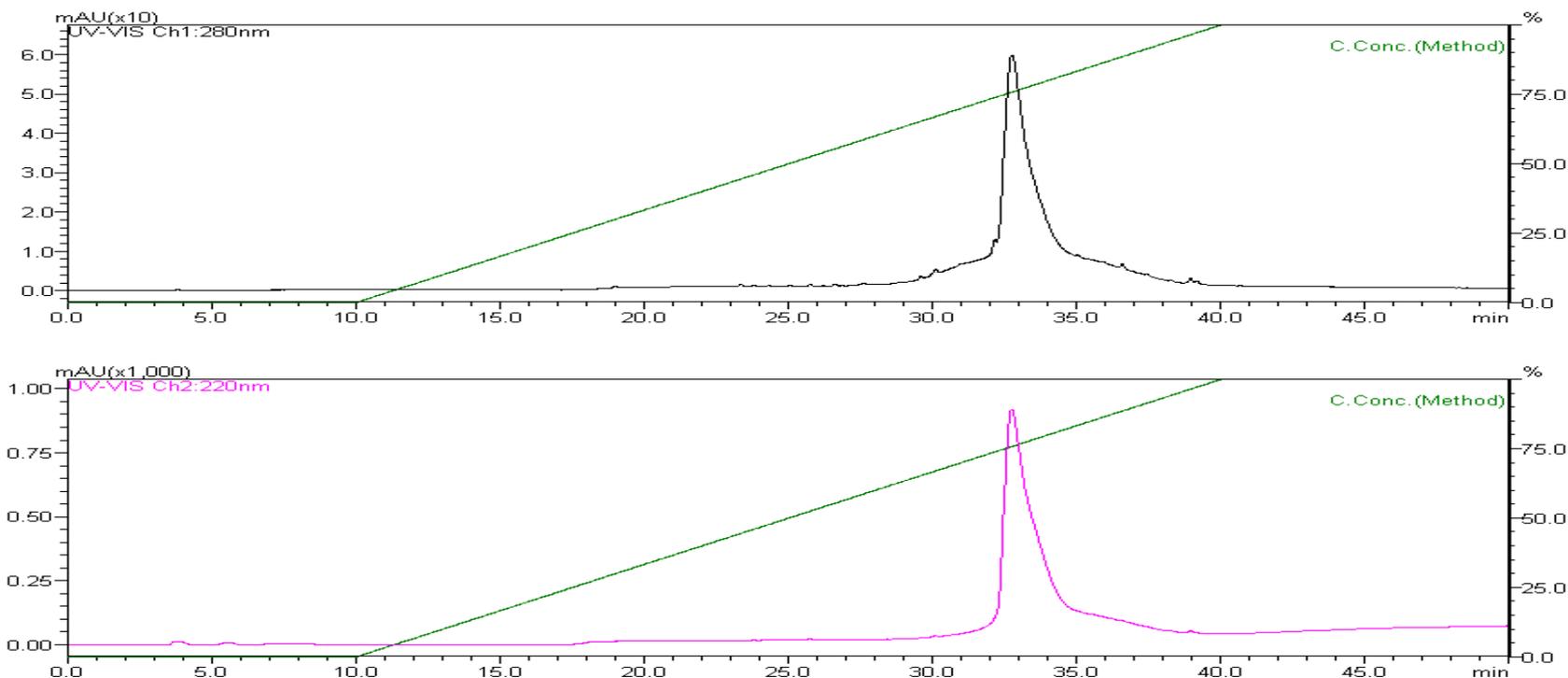


Figura 61

Perfil cromatográfico da *recromatografia* em coluna de fase reversa da fração 35 da coluna Supelcosil^{TMTM} [origem: fração 25 da fase reversa Poros[®] - *pool* GF1 (frações 2 a 4) da gel filtração - *pool* TI (frações 1 a 7) da troca iônica]. Coluna Supelcosil^{TMTM} (Sigma) eluída com solução B (acetonitrila 100 % v/v acrescida de ácido trifluoroacético (TFA) 0,05 %) e equilibrada com solução A (TFA 0,05 % v/v em água Milli-Q[®]). Frações eluídas com as soluções A e B, mantendo-se fluxo de 60mL/h, perfazendo um gradiente linear de 0 a 100 % (linha verde), utilizando o seguinte programa: 0-10 min 100 % da solução A, 10-40 min 0-100 % da solução B e 40-50 min 100 % da solução B. A corrida foi monitorada a 220 nm (rosa) e 280 nm (preto), com temperatura aproximada de 25 °C. Foram coletadas 5 frações/min, v = 200 µL. Todas as subfrações obtidas a partir das frações 34, 35 e 36 (representadas na figura) apresentaram atividade antagonista, exceto a fração 36.5.

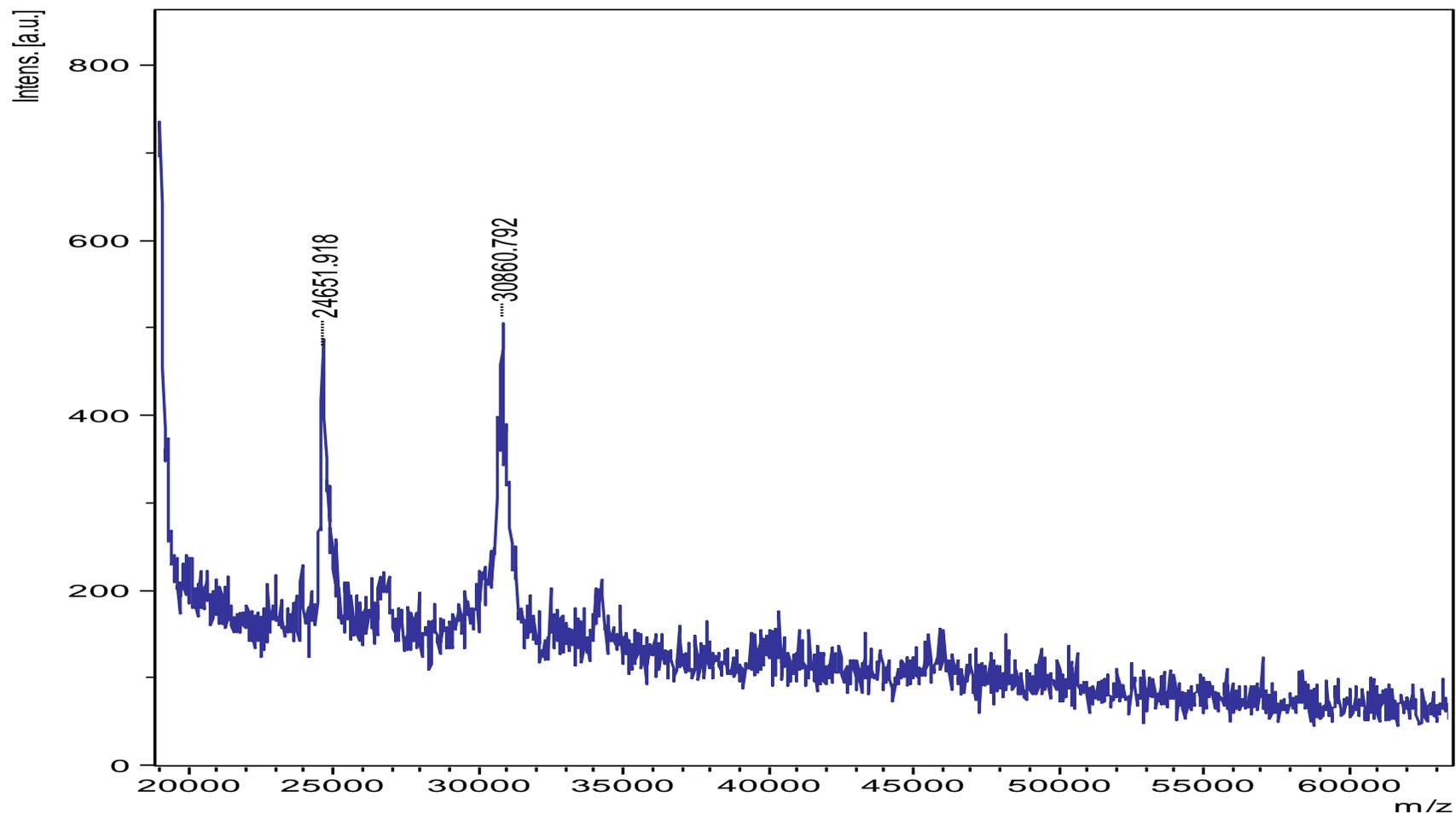


Figura 62

Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 34.2: massas moleculares de 24.651,918 e 30.860,792 Da [origem: *recromatografia* de fase reversa Supelcosil™ - fração 35 da *recromatografia* de fase reversa Supelcosil™ - fração 25 da *recromatografia* de fase reversa Poros®) - *pool* GF1 (frações 2 a 4 da *recromatografia* de gel filtração) - *pool* TI (frações 1 a 7 da *recromatografia* de troca iônica)].

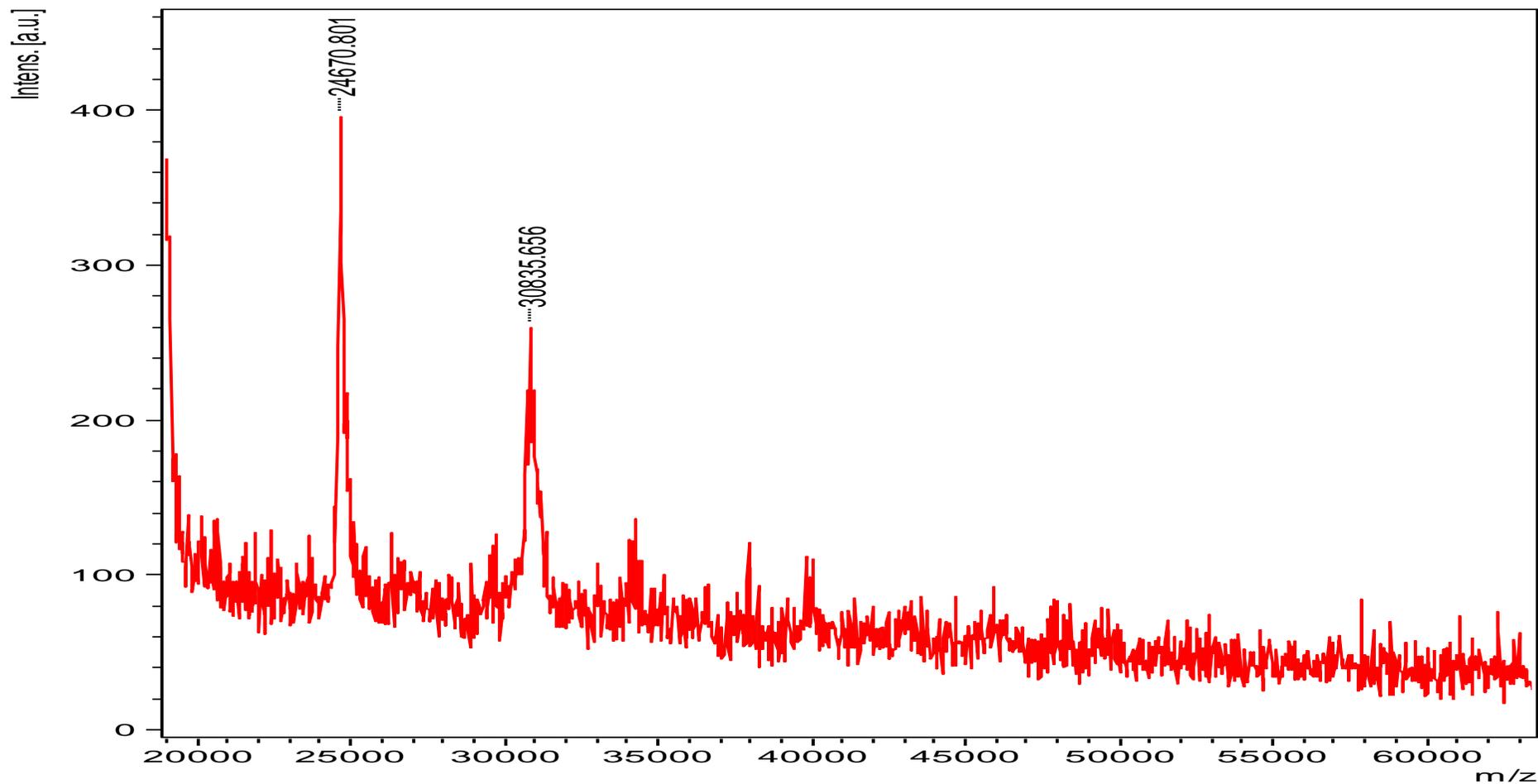


Figura 63

Espectro de massas em matriz ácido sinapínico da fração 34.3: massas moleculares de 24.670,801 e 30.835,656 Da [origem: *recromatografia* de fase reversa Supelcosil™ - fração 35 da *cromatografia* de fase reversa Supelcosil™ - fração 25 da *cromatografia* de fase reversa Poros®) - *pool* GF1 (frações 2 a 4 da *cromatografia* de gel filtração) - *pool* TI (frações 1 a 7 da *cromatografia* de troca iônica)].